

**Verteilung und biologische Rolle von  
Inositolphosphaten im Gehirn von *Rattus  
norvegicus* (BERKENHOUT, 1769)**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades des  
Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Heike Gustke**

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. G. W. MAYR  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H. BRETTING  
Tag der Disputation: 27. April 2007

Hamburg, den 10. April 2007



A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

1. Gutachter: Prof. Dr. G.W. Mayr
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Bretting

## Inhaltsverzeichnis

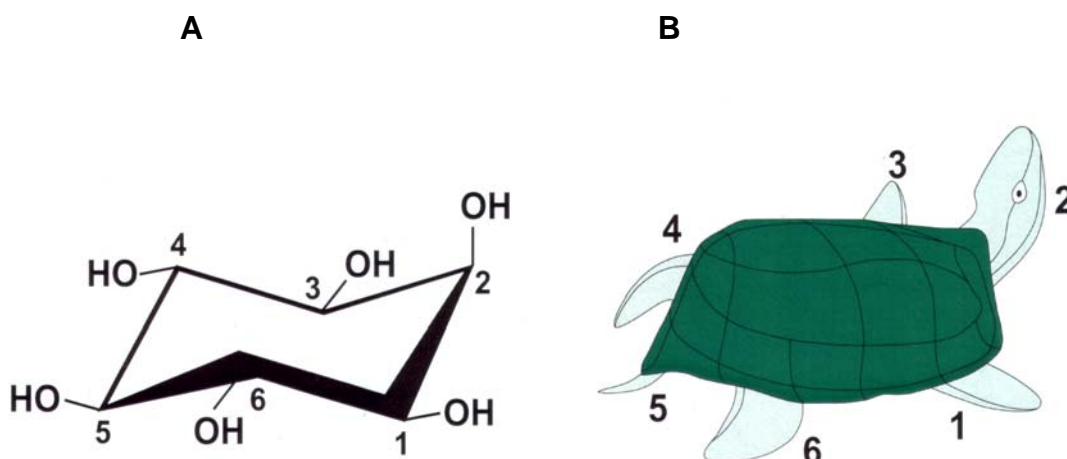
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1	Inositolphosphate als essentielle Zellbestandteile.....	4
1.2	InsP metabolisierende Enzyme.....	9
1.2.1	Inositolphosphatkinasen.....	10
1.2.1.1	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> -3-Kinasen.....	10
1.2.1.2	Inositolpolyphosphat-Multikinase.....	12
1.2.1.3	Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> -2-Kinase.....	13
1.2.1.4	InsP <sub>6</sub> -Kinasen.....	13
1.2.1.5	Ins(1,3,4)P <sub>3</sub> -5/6 Kinase/Ins(3,4,5,6)P <sub>4</sub> -1-Kinase.....	14
1.2.2	Inositolphosphatphosphatasen.....	15
1.2.2.1	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> /Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> -5-Phosphatase.....	15
1.2.2.2	Multiple Inositolpolyphosphat Phosphatase.....	15
1.2.2.3	Diphosphoinositol-Polyphosphat Diphosphatase.....	15
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1	Material.....	17
2.1.1	Geräte.....	17
2.1.2	Software.....	17
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.4	Chemikalien.....	18
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	18
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Optimierung der Fixierung und Extraktion von Inositolphosphaten aus Gehirngewebe.....	18
2.2.1.1	Versuchstiere für die Optimierung der Fixierungstechnik.....	18
2.2.1.2	Präparation des Gehirngewebes.....	18
2.2.1.2.1	Präparation von unfixiertem Gehirngewebe.....	19
2.2.1.2.2	Präparation von fixiertem Gehirngewebe.....	19
2.2.1.3	Zeitabhängige Veränderungen der InsP Konzentrationen.....	20
2.2.1.4	Extraktion der Inositolphosphate.....	20
2.2.1.5	Analyse von Inositolphosphaten mittels Micro-MDD-HPLC.....	21
2.2.2	Effekte von erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad auf die InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte.....	23
2.2.2.1	Versuchstiere für die Beeinflussung der InsP Konzentrationen.....	23
2.2.2.2	Behandlung der Tiere und Präparation des Gehirngewebes.....	23
2.2.2.2.1	Kontrollgruppe.....	23

2.2.2.2.2	Erlertes Laufen im Laufrad.....	23
2.2.2.2.3	Erzwungenes Laufen im Laufrad.....	24
2.2.2.3	Analyse von Inositolphosphaten mit Micro-MDD-HPLC.....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
3.1	Einfluss verschiedener Fixierungstechniken auf die InsP Konzentrationen.....	27
3.1.1	Verteilung der Inositolphosphate im unfixierten Gehirngewebe.....	27
3.1.2	Verteilung der Inositolphosphate im fixierten Gehirngewebe.....	28
3.1.2.1	Einfluss der Immersionsfixierung auf die InsP Konzentrationen.....	29
3.1.2.2	Einfluss der Perfusionsfixierung auf die InsP Konzentrationen.....	30
3.2	Zeitabhängige Veränderungen der InsP Konzentrationen.....	34
3.3	Effekte von erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad auf die InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte.....	35
3.3.1	Veränderungen der Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	37
3.3.2	Veränderungen der Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	45
3.3.3	Veränderungen der Ins(1,3,4)P <sub>3</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	49
3.3.4	Veränderungen der Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	55
3.3.5	Veränderungen der Ins(3,4,5,6)P <sub>4</sub> /Ins(1,4,5,6)P <sub>4</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	59
3.3.6	Veränderungen der InsP <sub>6</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	66
3.3.7	Veränderungen der Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub> , Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> , Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> und InsP <sub>7</sub> Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	72
3.4	Gradienten der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte.....	76
3.5	Ableitung der InsP metabolisierenden Enzymaktivitäten.....	77
3.5.1	Ableitung der Änderung der PLC.....	78
3.5.2	Ableitung der Änderung der Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> -3-Kinase.....	80
3.5.3	Ableitung der Änderung der Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> -5-Phosphatase.....	82
3.5.4	Ableitung der Änderung der Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> -2-Kinase.....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
4.1	Beeinflussung der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte mittels verschiedener Fixierungstechniken.....	87
4.2	Regionale Unterschiede in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte.....	91
4.2.1	Vergleich der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte mit der Literatur.....	91

4.2.2	Ursachen für die regionalen Unterschiede in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte.....	93
4.2.3	Hemisphärenunterschiede in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte.....	97
4.3	Funktionelle Veränderungen der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte.....	98
4.3.1	Ursachen für die veränderten InsP Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	99
4.3.2	Charakterisierung der veränderten InsP metabolisierenden Enzyme nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	102
4.3.2.1	Abhängigkeit zwischen einzelnen InsP metabolisierenden Enzymen....	102
4.3.2.2	Die Beziehung der Inositolphosphate und InsP metabolisierenden Enzyme im Thalamus und Hypothalamus.....	104
4.3.3	Biologische Funktionen der Inositolphosphate im Gehirn der Ratte.....	109
4.3.3.1	Rolle der Inositolphosphate im limbischen System der Ratte.....	109
4.3.3.2	Rolle der Inositolphosphate bei der motorischen Aktivität der Ratte.....	111
4.4	Ausblick	112
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>123</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	123
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	126
7.3	Tabellenverzeichnis.....	129
	<b>Danksagung.....</b>	<b>130</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>131</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>132</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>133</b>

# 1 Einleitung

Inositolphosphate sind seit über 80 Jahren bekannt. Die Entdeckung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  als Calcium-mobilisierender *second messenger* führte innerhalb kürzester Zeit zur Identifizierung weiterer Inositolphosphat (InsP) Isomere, deren biologische Funktionen jedoch in vielen Fällen unklar waren [Irvine & Schell, 2001]. Für einige Isomere konnten in den letzten Jahren verschiedene zelluläre Funktionen identifiziert werden, auf die in Abschnitt 1.1 ausführlicher eingegangen wird. Die Inositolphosphate bestehen aus einem Inositolring [Shears, 2004], der eine unterschiedliche Anzahl an Phosphatgruppen besitzen kann und sind daher wasserlöslich [Irvine & Schell, 2001]. Grundstruktur der Inositolphosphate ist die thermodynamisch stabile Sesselkonformation des myo-Inositols [Shears, 2004], die mit ihren Hydroxylgruppen durch eine Schildkröte repräsentiert werden kann [Agranoff, 1978]. Dabei ist das rechte Vorderbein der Schildkröte die 1 Hydroxylgruppe, der Kopf symbolisiert die 2 Hydroxylgruppe, welche als einzige eine axiale Position einnimmt, während die anderen 4 Hydroxylgruppen äquatorial sind (Abb. 1-1) [Shears, 2004]. Die Nummerierung erfolgt immer nach der D-Nomenklatur und ist gegen den Uhrzeigersinn. Mathematisch sind 63 Inositolmonophosphate möglich, diese Anzahl kann durch das Anfügen von Pyrophosphatgruppen anstelle von Monophosphaten erweitert werden [Irvine & Schell, 2001].



**Abb. 1-1: InsP Nomenklatur.** Dargestellt sind  $\text{InsP}_6$  (A) und Agranoffs Schildkröte (B) [Irvine & Schell, 2001].

## 1.1 Inositolphosphate als essentielle Zellbestandteile

Der *second messenger*  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ist das bekannteste InsP und ist mit der zellulären Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Regulation assoziiert.  $\text{Ca}^{2+}$  ist ein intrazellulärer Botenstoff, der eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie die Gentranskription, die Muskelkontraktion, die Zellproliferation sowie die synaptische Aktivität kontrolliert [Berridge, 1998; Bootman *et al.*,

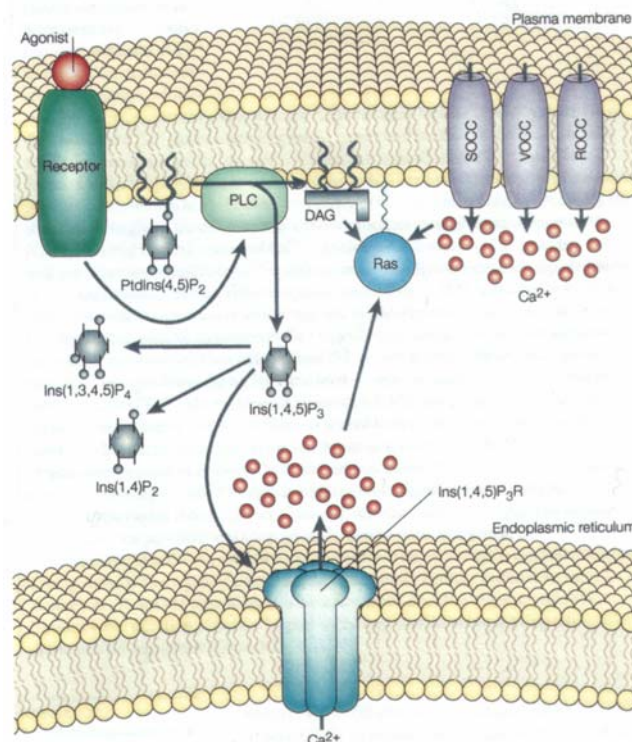
2001]. Der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Signaltransduktionsweg führt über die Aktivierung von heterotrimeren G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch Neurotransmitter und Hormone zur Stimulation von Phospholipase C (PLC) [Berridge *et al.*, 1998]. Diese katalysiert die Hydrolyse des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) zu Diacylglycerol (DAG) und  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  [Berridge, 1993]. DAG aktiviert bestimmte Isoformen der Proteinkinase C (PKC), während  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  mit seinen spezifischen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Rezeptoren ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder seinem Muskeläquivalent, dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) interagiert und dabei die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus deren Lumen verursacht (Abb. 1.1-1) [Berridge *et al.*, 2003]. Die  $\text{InsP}_3\text{R}$  werden u.a. in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns [Worley *et al.*, 1989], in den CA1 Pyramidenzellen des Hippocampus [Sharp *et al.*, 1993] und in den Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS) [Sharp *et al.*, 1999] exprimiert. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt auch aus den  $\text{InsP}_3\text{R}$  strukturell verwandten Ryanodin-Rezeptoren (RyR), besonders in exzitatorischen Zellen [Berridge *et al.*, 1998]. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität dieser beiden Rezeptoren kann durch eine Vielzahl von Faktoren, einschließlich anderer Botenstoffe wie zyklische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR), Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP) sowie Sphingosin-1-Phosphat (S1P), beeinflusst werden [Berridge *et al.*, 2003].

Um eine dauerhafte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu verhindern, existieren verschiedene Austauscher und Pumpen, die  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle entfernen. Dabei schleusen die in der Plasmamembran lokalisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (PMCA) und die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauscher  $\text{Ca}^{2+}$  zur Außenseite, während die sarkoplasmatischen/endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (SERCA)  $\text{Ca}^{2+}$  in das ER zurückpumpen. Mitochondrien haben eine aktive Funktion in diesem Regenerationsprozess, sie nehmen sehr hohes zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  schnell durch einen *Uniporter* auf und geben es langsam zurück in das Zytosol [Berridge *et al.*, 2003]. Allerdings bewirkt eine Überladung der Mitochondrien mit  $\text{Ca}^{2+}$  einen abnormen mitochondrialen Metabolismus, der zum programmierten Zelltod führen kann [Berridge *et al.*, 1998].

Die Stärke der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Generierung im Gehirn ist von unterschiedlich aktivierten Rezeptortypen abhängig. So aktiviert Glutamat den metabotropen Glutamatrezeptor Typ 1 (mGluR1) in Purkinje-Zellsynapsen. Dieser aktiviert die PLC und führt zur Bildung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , welches mit dem  $\text{InsP}_3\text{R}$  Typ 1 interagiert und die  $\text{Ca}^{2+}$  Kaskade aktiviert. Dagegen erfolgt der gleiche Signalweg in den hippocampalen Neuronen über die Aktivierung des metabotropen Glutamatrezeptors Typ 5 (mGluR5) [Berridge *et al.*, 2003]. Der Grund, warum die Neurone divergente Signalwege nutzen, ist unklar, allerdings existieren Beweise, dass mGluR1 und mGluR5 unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$  Signale hervorrufen.



So produziert mGluR1 eine einzige  $\text{Ca}^{2+}$  Spitze, während mGluR5 ein oszillierendes Muster erzeugt [Berridge *et al.*, 2003].



**Abb. 1.1-1: Zusammenfassung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Signaltransduktion.** Verschiedene Agonisten binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, was zur Stimulation von PLC- $\beta_1$  führt und diese bewirkt die Bildung von DAG und Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  aus PtdIns(4,5) $\text{P}_2$ . Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  diffundiert in das Zytosol und bindet an die Ins $\text{P}_3$ R, welche die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  stimulieren. Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  kann durch die 5-Phosphatase zum Ins(1,4) $\text{P}_2$  oder durch die  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase zum Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$  metabolisiert werden. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  kann ebenfalls durch Öffnen der Speicher-gesteuerten- (SOCC), der Spannungs-gesteuerten- (VOCC) oder der Rezeptor-gesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle (ROCC) erfolgen. Dabei ist das kleine GTPase Molekül Ras sensitiv für Veränderungen im intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel [Cullen & Lockyer, 2002].

Der putative *second messenger* Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$  ist ebenfalls an der Regulation des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegels beteiligt [Lockyer *et al.*, 1999]. So gibt es direkte und indirekte Hinweise, dass Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$   $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle in der Plasmamembran von Endothelzellen und Neuronen aktiviert [Irvine & Schell, 2001]. Die Konsequenz für die Neurone ist eine verstärkte Langzeit-Potenzierung (LTP), ein Phänomen welches vielen Arten von Lernen und Gedächtnis zugrunde liegt [Irvine & Schell, 2001]. Zudem wird Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$  durch die gleiche Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ /Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$ -5-Phosphatase (5-Phosphatase) hydrolysiert, die auch Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  metabolisiert jedoch bei niedrigen Km Werten, was auf eine Schutzfunktion im Hinblick auf die Hydrolyse von Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  hinweist. Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$  kann in hohen Konzentrationen mit den Ins $\text{P}_3$ R im ER interagieren und deren Aktivität modulieren [Irvine & Schell, 2001]. Weiterhin konnte ein Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$  bindendes Protein, das GAP1<sup>IP4BP</sup>, identifiziert werden, das zur Familie der GTPase aktivierenden Proteine gehört und eine erhöhte Expression im Gehirn aufweist. Damit

kann  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel durch Aktivierung von Ras GTPasen regulieren [Lockyer *et al.*, 1999]. Diese beeinflussen ebenso Proteinkinase-Kaskaden wie ERK/MAPK (extrazellulär-Signal-regulierte Kinase/Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und regulieren die PLC- $\epsilon$  Aktivität, die auch am  $\text{Ca}^{2+}$  *signalling* beteiligt ist [Cullen & Lockyer, 2002].

Neben  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  sind weitere  $\text{InsP}_4$  Isomere wie  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  in der Zelle beschrieben. Das  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  ist an der Modulation von Chloridkanälen ( $\text{Cl}^-$  Kanälen) beteiligt. In Endothelzellen fungiert  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  als Inhibitor von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Kinase II (CaMKII) aktivierten  $\text{Cl}^-$  Kanälen [Nilius *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2001]. Die  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{Cl}^-$  Kanäle sind für die Salz- und Flüssigkeitssekretion sowie die Regulation der Membranerregung verantwortlich [Ho *et al.*, 2001]. Die zelluläre Akkumulation von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  wird durch eine Korrelation mit Rezeptor abhängigen Veränderungen in der PLC Aktivität hervorgerufen, allerdings sind die molekularen Mechanismen dafür unbekannt [Yang *et al.*, 1999]. Dagegen sind mögliche physiologische Funktionen von  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  wenig beschrieben. Eine Infektion von Epithelzellen des Darms mit Salmonellen führte zu einer 14-fachen Erhöhung des  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegels, die mit einer Inhibition der EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) stimulierten Phosphatidylinositol-3-kinase einhergeht [Eckmann *et al.*, 1997].

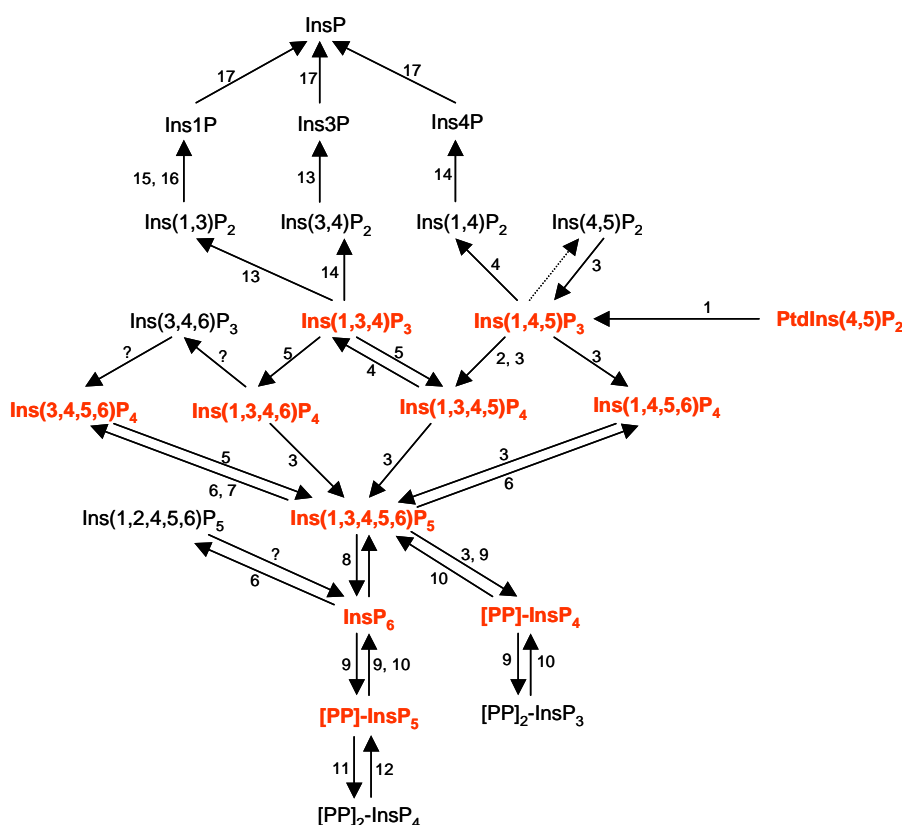
Die  $\text{InsP}_4$  Isomere werden im  $\text{InsP}$  Stoffwechsel durch verschiedene Enzyme (Abschnitt 1.2) zum  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  metabolisiert. Dieses  $\text{InsP}_5$  ist das vorherrschende  $\text{InsP}_5$  Isomer in den meisten Säugetierzellen, deren Spiegel zwischen 15-50  $\mu\text{M}$  liegt [Riley *et al.*, 2006]. Dabei fungiert  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  als metabolisches Zentrum im  $\text{InsP}$  Stoffwechsel [Irvine & Schell, 2001]. Für das Isomer werden verschiedene biologische Funktionen diskutiert, u.a. beeinflusst es die Rate der zellulären Proliferation [Orchiston *et al.*, 2004] und moduliert die Apoptose [Piccolo *et al.*, 2004]. Weiterhin reguliert  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  das virale *assembly*, das Chromatin *remodelling* und die Aktivität von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen [Riley *et al.*, 2006; Deleu *et al.*, 2006].

$\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  wird durch Phosphorylierung an der 2 Position des Inositolringes zum  $\text{InsP}_6$  umgewandelt.  $\text{InsP}_6$  ist bei der Kontrolle verschiedener physiologischer Prozesse involviert. Für dieses  $\text{InsP}$  sind ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierende Eigenschaften in pankreatischen  $\beta$ -Zellen [Barker & Berggren, 1999] und in hippocampalen Neuronen [Yang *et al.*, 2001] beschrieben worden. In pankreatischen  $\beta$ -Zellen konnte gezeigt werden, dass erhöhte  $\text{InsP}_6$  Konzentrationen die Aktivität von spannungsgesteuerten L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen durch Inhibition von Serin/Threonin Phosphatasen stimulieren [Larsson

*et al.*, 1997]. In weiteren Versuchen konnte die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass  $\text{InsP}_6$  die PKC- $\epsilon$  stimuliert, die an der Exozytose pankreatischen  $\beta$ -Zellen beteiligt ist [Efanov *et al.*, 1997; Barker & Berggren, 1999; Hoy *et al.*, 2003]. In hippocampalen Neuronen stimuliert  $\text{InsP}_6$  die Adenylatcyclase, wodurch eine Aktivierung der Proteinkinase A und eine verstärkte Aktivität von spannungsgesteuerten L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen hervorgerufen wird [Yang *et al.*, 2001]. Weiterhin ist  $\text{InsP}_6$  an nukleären Prozessen, wie dem RNA Export sowie der DNA Reparatur und Rekombination beteiligt [Shears, 2001].  $\text{InsP}_6$  bindet an die Ku70/80-Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) und stimuliert somit die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen über eine nicht-homologe Endverknüpfung [Hanakahi & West, 2002; Byrum *et al.*, 2004]. Allerdings wurde dieser Effekt auch für  $\text{InsP}_4$  und  $\text{InsP}_5$  beobachtet. Außerdem wird  $\text{InsP}_6$  eine Beteiligung an Prozessen der Endo- und Exozytose zugesprochen. So konnte die Bindung von  $\text{InsP}_6$  an eine Vielzahl von Proteinen, die mit der Regulation des Vesikeltransports assoziiert sind, beobachtet werden [Shears, 1998]. Die Interaktion von  $\text{InsP}_6$  mit Synaptotagmin, einem sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor, der an der Regulation der neuronalen Exozytose durch Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt ist [Chapman, 2002], führt zur Inhibition dessen Funktion [Irvine & Schell, 2001]. Jedoch wird dieser Prozess in der Literatur sehr differenziert betrachtet, da  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  eine stärkere Interaktion mit diesem Protein aufweisen. So wird vermutet, dass diese Lipidinteraktion eine höhere physiologische Relevanz besitzt. So könnten die Phosphatidylinositole die eigentlichen Modulatoren der Endo- und Exozytose sein [Irvine & Schell, 2001]. Ferner bindet  $\text{InsP}_6$  an die Adapter-Proteine AP-2 [Voglmaier *et al.*, 1992] und AP-180 [Norris *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 1995], welche beide die Bildung von Clathrin ummantelten Vesikeln (*coated vesicles*) fördern und damit die ersten Schritte der Endozytose beeinflussen [Shears, 1998]. Die Bindung von  $\text{InsP}_6$  an diese Proteine blockiert die Ausbildung des Clathrin Käfigs [Shears, 1998]. Ein weiteres  $\text{InsP}_6$  bindendes Protein ist das Arrestin, das mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren interagiert. So kann  $\text{InsP}_6$  durch eine direkte Bindung an Arrestin, die licht-induzierte Desensibilisierung des Sehpigments Rhodopsin reduzieren [Palczewski *et al.*, 1991; Palczewski *et al.*, 1992]. Zudem konnte eine  $\text{InsP}_6$ /[PP]- $\text{InsP}_5$  sensitive Proteinkinase identifiziert werden, die den Pacsin/Syndapin I Komplex phosphoryliert, der im synaptischen Vesikel Recycling involviert ist [Hilton *et al.*, 2001]. Weiterhin ist  $\text{InsP}_6$  ein essentieller Kofaktor für die RNA-editierenden Enzyme ADAR (*adenosine deaminases that act on RNA*) und ADAT (*adenosine deaminases that act on transfer RNA*) [Macbeth *et al.*, 2005].

## 1.2 InsP metabolisierende Enzyme

Der InsP Stoffwechsel wird durch eine Vielzahl von InsP Kinasen und Phosphatasen reguliert. Zu den InsP Kinasen zählen die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen, die IPMK, die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase, die InsP<sub>6</sub>-Kinasen sowie die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-5/6 Kinase/Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>-1-Kinase. Aufgrund eines gemeinsamen Consensus-Motives **P-C-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G** werden die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen, die IPMK und InsP<sub>6</sub>-Kinasen zu einer Kinase Familie, der PDKG Familie zusammengefasst [Bertsch *et al.*, 2000]. Zusätzlich besitzen alle einen hochkonservierten C-Terminus, der die Bindungsstellen für ATP und die InsP Substrate beinhaltet. Dagegen zeigt der N-Terminus dieser InsP Kinasen Unterschiede in der Länge und ist in zelluläre Zielsteuerung sowie Regulation involviert. Zu den wichtigsten InsP Phosphatasen zählen die 5-Phosphatase, die Multiple Inositolpolyphosphat Phosphatase und die Diphosphoinositol-Polyphosphat Diphosphatase. Die Rolle dieser InsP metabolisierenden Enzyme im InsP Stoffwechsel ist in Abb. 1.2-1 zusammengefasst.



**Abb. 1.2-1: Der InsP Metabolismus in tierischen Zellen.** Dargestellt sind die Konversionswege der Inositolphosphate in tierischen Zellen. Die Hauptprodukte sind farblich gekennzeichnet. Die Zahlen benennen die Enzyme, welche die Syntheseschritte katalysieren: 1. PLC, 2. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase, 3. IPMK, 4. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase, 5. Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-5/6 Kinase/Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>-1-Kinase, 6. MIPP, 7. PTEN, 8. Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase, 9. InsP<sub>6</sub>-Kinase, 10. DIPP, 11. Bis- Diphosphoinositol-Polyphosphat-Synthase, 12. Diphosphoinositol-Polyphosphat-Phosphohydrolase, 13. Ins(3,4)P<sub>2</sub>/Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-4-Phosphatase, 14. Ins(1,4)P<sub>2</sub>/Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-1-Phosphatase, 15. Ins(1,3)P<sub>2</sub>-3-Phosphatase Typ I, 16. Ins(1,3)P<sub>2</sub>-3-Phosphatase Typ II, 17. Inositolmonophosphat-Phosphatase. Verändert nach [Abel *et al.*, 2001; Irvine & Schell, 2001].

## 1.2.1 Inositolphosphatkinasen

### 1.2.1.1 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen

Die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zum Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> [Xia & Yang, 2005]. Die Enzyme konnten aus unterschiedlichen Organismen wie *Homo sapiens* [Takazawa<sup>a</sup> *et al.*, 1991; Dewaste *et al.*, 2000], Ratte [Takazawa<sup>b</sup> *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1994; Nalaskowski *et al.*, 2003] und Huhn [Bertsch *et al.*, 1999] kloniert werden. Es existieren drei verschiedene Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Isoformen: A, B und C, deren Aminosäuren (AS) am C-Terminus, welche die katalytische Domäne beinhaltet, zu 80 % identisch sind, während der N-Terminus in der Länge und Sequenz stark divergent ist. Weitere Differenzen zwischen den Isoformen sind im Molekulargewicht, in der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM) Sensitivität, in der intrazellulären Verteilung und in der Gewebeexpression zu finden (Tab. 1.2.1.1-1).

Organismus	Isoform	Molekulargewicht (kDa)	Aminosäuren
Human	HsIP <sub>3</sub> 3K-A	50,0	461
	HsIP <sub>3</sub> 3K-B	53,5	472
	HsIP <sub>3</sub> 3K-C	75,2	684
Ratte	RnIP <sub>3</sub> 3K-A	50,9	459
	RnIP <sub>3</sub> 3K-B	74,0	673
	RnIP <sub>3</sub> 3K-C	74,5	678

**Tab. 1.2.1.1-1: Biochemische Charakteristika der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Isoformen.** Dargestellt sind die drei Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase (IP<sub>3</sub>3K) Isoformen A, B und C aus *Homo sapiens* (Hs) und *Rattus norvegicus* (Rn). Verändert nach [Xia & Yang, 2005].

Im N-Terminus der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen konnte eine zusätzliche Sequenz, das PEST Motiv (Prolin (**P**), Glutaminsäure (**E**), Serin (**S**), Threonin (**T**)), identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein proteolytisches Signal. Es wird vermutet, dass Proteine, die solche Motive enthalten, einer schnellen Degradation unterliegen [Rechsteiner & Rogers, 1996]. Weiterhin konnte ein SSSL-Motiv (Serin (**S**), Serin (**S**), Leucin (**L**), Leucin (**L**)) identifiziert werden [Saiardi<sup>a</sup> *et al.*, 2001; Shears, 2004]. In Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass der Verlust dieses Motivs die katalytische Aktivität der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen behindern kann [Saiardi<sup>a</sup> *et al.*, 2001]. Mittlerweile ist aus der 3D Struktur der katalytischen Domäne der Isoformen A und B klar ersichtlich, dass es sich bei InsP<sub>3</sub> Kinasen vom PDKG Typ um Proteinkinase-ähnliche Kinasen handelt. Das SSSL-Motiv ist hierbei Teil einer für die ATP Bindung essentieller  $\beta$ -Faltblatt-Domäne. Zudem wurde im N-terminalen Bereich der Ratten Isoform A (RnIP<sub>3</sub>3K-A) eine F-Aktin Bindungsstelle gefunden [Schell *et al.*, 2001]. Neuere Untersuchungen an der Ratten Isoform B (RnIP<sub>3</sub>3K-B) zeigten ebenfalls eine Lokalisation mit F-Aktin [Brehm *et al.*, 2004].

Die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen zeigen Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation. Die humane Isoform A (HsIP<sub>3</sub>3K-A) ist im Zytoskelett zu finden, dagegen ist die humane Isoform B (HsIP<sub>3</sub>3K-B) in der Plasmamembran, im Zytoskelett und im ER lokalisiert, während die Isoform C (HsIP<sub>3</sub>3K-C) im Zytoplasma vorherrschend ist [Dewaste *et al.*, 2003]. Für die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen in der Ratte wurde ähnliches beobachtet, so ist die Isoform B (RnIP<sub>3</sub>3K-B) im ER lokalisiert [Soriano & Banting, 1997] und die Isoform C (RnIP<sub>3</sub>3K-C) auf das Zytoplasma beschränkt [Nalaskowski *et al.*, 2003]. Außerdem konnte für die Isoform C (RnIP<sub>3</sub>3K-C) ein Kern-Zytoplasma Transport beobachtet werden, der durch ein Kernexportsignal (NES) vermittelt wird [Nalaskowski *et al.*, 2003].

Die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Isoformen zeigen eine Gewebespezifität, so wird die Ratten Isoform A (RnIP<sub>3</sub>3K-A) hauptsächlich im Gehirn (v.a. in Neuronen) und im Hoden exprimiert, während die Isoform B (RnIP<sub>3</sub>3K-B) vorherrschend in der Lunge, im Thymus, im Herz, im Hoden und im Gehirn ist [Vanweyenberg *et al.*, 1995]. Für die Isoform C (RnIP<sub>3</sub>3K-C) wurde bei der Ratte eine hohe Expression im Herz, im Gehirn und im Hoden gefunden [Nalaskowski *et al.*, 2003]. Dagegen wurde ein 3,7 kb Transkript der humanen Isoform C (HsIP<sub>3</sub>3K-C) in der Bauchspeicheldrüse, dem Skelettmuskel, der Leber, der Lunge und dem Herz detektiert [Dewaste *et al.*, 2002]. Solche spezifischen Verteilungs- und Expressionsmuster der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen können zu ihren verschiedenen physiologischen Funktionen beitragen.

Die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinasen sind sensitiv für Ca<sup>2+</sup>/CaM, diese Stimulation ist Zell-, Gewebe- und Isoform-spezifisch. CaM erkennt Sequenzen, die eine amphiphile  $\alpha$ -Helix mit *Clustern* aus positiv geladenen und hydrophoben AS enthalten. In der Ratten Isoform A (RnIP<sub>3</sub>3K-A) ist für die CaM Bindung eine Sequenz aus Serin-156 und Leucin-189 zusammen mit Tryptophan-165 erforderlich [Takazawa & Erneux, 1991]. Der Ca<sup>2+</sup>/CaM Komplex stimuliert die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Aktivität und kann für die Kontrolle der Ca<sup>2+</sup> Oszillation wichtig sein. Die Aktivität der Isoform A wird durch Bindung des Ca<sup>2+</sup>/CaM Komplexes um das 2-3-fache gesteigert, während die Aktivität der Isoform B um das 7-8-fache erhöht ist [Xia & Yang, 2005]. Die Aktivität der humanen Isoform C (HsIP<sub>3</sub>3K-C) wird auf komplexe Art durch den Ca<sup>2+</sup>/CaM Komplex beeinflusst [Dewaste *et al.*, 2000]. Die Ratten Isoform C (RnIP<sub>3</sub>3K-C) zeigt eine Aktivitätssteigerung um das 8-fache, die zusätzlich eine allosterische Produktaktivierung durch Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> aufweist [Nalaskowski *et al.*, 2003].

Weitere Regulatoren der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase sind die Proteinkinase A (PKA), die PKC und die CaMKII. Die PKA und die CaMKII stimulieren die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Aktivität, während die PKC ein negativer Regulator ist [Xia & Yang, 2005].

Funktionell sind die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinasen im  $\text{InsP}$  Pathway, in der  $\text{Ca}^{2+}$  Signaltransduktion, Lern- und Gedächtnisprozessen, Stressantwort und Gentranskription involviert [Xia & Yang, 2005]. Sowohl das Substrat als auch das Produkt der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase regulieren die  $\text{Ca}^{2+}$  Mobilisation. Daher wird vermutet, dass eine gesteigerte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität die zelluläre  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration reduzieren kann und damit die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Funktion abschwächt [Xia & Yang, 2005]. Die putative Beteiligung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase an den Lern- und Gedächtnisprozessen wird aus ihrer Verteilung im Gehirn abgeleitet. So konnten hohe  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitäten in hippocampalen Neuronen und in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns detektiert werden, dagegen war die Aktivität im Thalamus, Hypothalamus sowie in der weißen Substanz verringert [Mailleux *et al.*, 1991; Heacock *et al.*, 1990]. Neue Studien zeigten, eine erhöhte Expression der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Isoform A ( $\text{RnIP}_3\text{K-A}$ ) in der Hippocampusformation von Ratten während des Trainings im Morris-Wasser-Labyrinth [Kim *et al.*, 2004].

### 1.2.1.2 Inositolpolyphosphat-Multikinase

Es wird vermutet, dass die Inositolpolyphosphat-Multikinase (IPMK) ein evolutionärer Vorläufer der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinasen und  $\text{InsP}_6$ -Kinasen ist [Nalaskowski & Mayr, 2004]. Die IPMK katalysiert eine Reihe von Reaktionen im  $\text{InsP}$  Metabolismus und ist ein zentrales Enzym bei der Generierung von höher phosphorylierten Inositolphosphaten. Das Enzym konnte aus unterschiedlichen Organismen wie *Homo sapiens*, der Ratte, Hefe und Pflanzen kloniert werden [Übersicht in: Shears, 2004]. Die AS Sequenz der humanen IPMK ist zu 84 % identisch mit der Ratten IPMK [Xia & Yang, 2005]. Die humane IPMK wird hauptsächlich in der Leber und im Skelettmuskel exprimiert [Nalaskowski *et al.*, 2002], während die Ratten IPMK hohe Expressionsspiegel in der Niere und im Gehirn aufweist [Chang *et al.*, 2002]. Das humane IPMK Gen enthält sechs Exons und ist auf Chromosom 10 lokalisiert [Nalaskowski *et al.*, 2002]. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 47 kDa und besteht aus 416 AS. Funktionell wichtige Motive sind: die  $\text{InsP}$  und ATP Bindungsstelle sowie die SSSL Domäne. Zusätzlich besitzt es ein Kernlokalisierungssignal (NLS) [Nalaskowski *et al.*, 2002]. Das Enzym phosphoryliert  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  an der 3 und 6 Position, wobei  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  entsteht. Außerdem katalysiert es die Reaktion von  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  sowie von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  zu  $[\text{PP}]\text{-InsP}_4$  [Saiardi<sup>a</sup> *et al.*, 2001]. Zudem berichteten Chang und Majerus [2006], dass das rekombinante humane Protein *in vitro* die Umwandlung von  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  in  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  katalysieren kann. Gleichzeitig reguliert es den  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegel und hat einen Effekt auf die  $\text{Cl}^-$  Kanalregulation [Chang & Majerus, 2006]. In neuen Studien konnten Inhibitoren der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinasen und der IPMK identifiziert werden. Dabei

fiel Aurintricarbonsäure (ATA) als potenter Inhibitor der IPMK auf, diesem Wirkstoff werden antiproliferative und antiapoptotische Wirkungen zugesprochen [Mayr *et al.*, 2005].

Das Homolog zur humanen IPMK ist das Hefe Protein ArgRIII (= ARG-82p). Dieses ist ein Transkriptionsregulator im Arginin-Metabolismus. Zudem beeinflusst es den Kern RNA Export und besitzt Kinase-Aktivität [Saiardi<sup>a</sup> *et al.*, 2000; Saiardi<sup>a</sup> *et al.*, 2001]. In der Hefe phosphoryliert ArgRIII Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> sowohl an der 3 als auch an der 6 Position. ArgRIII besitzt keine CaM Bindungsstelle und ist somit unempfindlich gegenüber dem Ca<sup>2+</sup>/CaM Komplex [Xia & Yang, 2005].

### 1.2.1.3 Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase

Die Existenz der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase ist aus Untersuchungen mit Hefen schon länger bekannt [Ives *et al.*, 2000]. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 56 kDa und besteht aus 491 AS. Die humane Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase ist auf Chromosom 9 lokalisiert. In *Northern-Blot* Analysen konnte gezeigt werden, dass die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase im Gehirn, im Herz, in der Plazenta und im Hoden exprimiert wird [Verbsky *et al.*, 2002]. Dagegen wird die kürzlich identifizierte murine Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase im Hippocampus, Kortex, in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns und im Hoden exprimiert [Verbsky<sup>a</sup> *et al.*, 2005]. Das Enzym katalysiert die Bildung von InsP<sub>6</sub> aus Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> [Verbsky<sup>b</sup> *et al.*, 2005].

### 1.2.1.4 InsP<sub>6</sub>-Kinasen

Die InsP<sub>6</sub>-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von InsP<sub>6</sub> zum 5-[PP]-InsP<sub>5</sub> sowie von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zum [PP]-InsP<sub>4</sub> [Saiardi<sup>b</sup> *et al.*, 2000]. Es existieren drei verschiedene InsP<sub>6</sub>-Kinase Isoformen: 1, 2 und 3. Dabei konnte die Isoform 1 aus Maus und die Isoformen 2 und 3 aus *Homo sapiens* kloniert werden [Saiardi<sup>b</sup> *et al.*, 2001]. Weitere Differenzen zwischen den Isoformen sind im Molekulargewicht und der Sequenzlänge zu finden (Tab. 1.2.1.4-1).

Organismus	Isoform	Molekulargewicht (kDa)	Aminosäuren
Maus	mInsP <sub>6</sub> K1	49,215	433
Human	hInsP <sub>6</sub> K2	49,180	426
	hInsP <sub>6</sub> K3	46,431	410

**Tab. 1.2.1.4-1: Biochemische Charakteristika der InsP<sub>6</sub> Kinase Isoformen.** Dargestellt sind die drei InsP<sub>6</sub>-Kinase (InsP<sub>6</sub>K) Isoformen 1, 2 und 3 aus *Homo sapiens* (h) und Maus (m) [Saiardi<sup>b</sup> *et al.*, 2001].



Die Isoform 3 zeigt eine Sequenzidentität von 50 % bzw. 45 % zur Isoform 1 bzw. Isoform 2. Die  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoformen: 1 (m $\text{InsP}_6$ K1) und 2 (h $\text{InsP}_6$ K2) sind beide auf Chromosom 3 lokalisiert, dagegen ist die Isoform 3 (h $\text{InsP}_6$ K3) auf Chromosom 6 lokalisiert [Saiardi<sup>b</sup> et al., 2001]. Die  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoformen zeigen ebenfalls Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation und der Gewebeexpression. Die  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoform 1 (m $\text{InsP}_6$ K1) ist im Zellkern und Zytoplasma vorherrschend, während die Isoform 2 (h $\text{InsP}_6$ K2) nur im Zellkern zu finden ist und die Isoform 3 (h $\text{InsP}_6$ K3) eine zytoplasmatische Lokalisation zeigte. In *Northern-Blot* Analysen konnte gezeigt werden, dass die Isoform 1 (m $\text{InsP}_6$ K1) im Gehirn und Hoden, die Isoform 2 (h $\text{InsP}_6$ K2) im Gehirn sowie in der Lunge und die Isoform 3 (h $\text{InsP}_6$ K3) fast ausschließlich im Gehirn exprimiert werden [Saiardi<sup>b</sup> et al., 2001]. Durch *in situ* Hybridisierung konnte eine selektive Lokalisation der cerebralen  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoform 3 (h $\text{InsP}_6$ K3) in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns und in den Pyramidenzellen des Hippocampus indiziert werden.

Neue Studien zeigen, dass die  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoform 2 (h $\text{InsP}_6$ K2) ein physiologischer Mediator der Apoptose ist. Dabei konnte in unterschiedlichen Zelllinien (HEK293-Zellen, HeLa-Zellen, PC 12-Zellen, Jurkat T-Zellen und HL 60-Zellen) nach Gabe verschiedener Stressoren eine erhöhte Apoptose nach Transfektion der  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoform 2 beobachtet werden. Zusätzlich war die Zytotoxizität mit einer Translokation der  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoform 2 aus dem Zellkern in die Mitochondrien assoziiert, während die intrazelluläre Lokalisation der anderen  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoformen unverändert war [Nagata et al., 2005].

Für die  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoform 1 konnte ein Interaktionspartner identifiziert werden. Das Enzym interagiert mit GRAB (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Rab3A). GRAB ist ein physiologisches GEF (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor) für Rab3A, eine Ras ähnliche GTPase, die die Exozytose in synaptischen Vesikeln reguliert. Die Assoziation der  $\text{InsP}_6$ -Kinase Isoform 1 mit GRAB weist auf eine mögliche Rolle von [PP]- $\text{InsP}_5$  in der Vesikel Exozytose hin [Luo et al., 2001].

#### 1.2.1.5 $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6 Kinase/ $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase

Das Enzym katalysiert die Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  zu  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  sowie  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  zu  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ . In neuen Untersuchungen wurde gezeigt, dass das Enzym auch eine 1' Kinase-Aktivität besitzt und damit auch  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  in  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  metabolisieren kann [Shears, 2004]. Zudem reguliert die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  1-Kinase die Apoptose, Salz- und Flüssigkeitssekretion sowie die Transkription [Qian et al., 2005]. Die  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6 Kinase hat ein Molekulargewicht von 46 kDa und besteht aus 414 AS. Die Kinase mRNA Transkripte sind in allen tierischen Zellen zu finden, zeigen aber einen besonders hohen Expressionsspiegel im Gehirn und

im Herz. Das Enzym ist phylogenetisch weit verbreitet und kommt auch bei Pflanzen zum Teil in mehreren Isoformen vor [Shears, 2004].

## 1.2.2 Inositolphosphatphosphatasen

### 1.2.2.1 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase

Die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase (5-Phosphatase) dephosphoryliert Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zum Ins(1,4)P<sub>2</sub> sowie Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> zum Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> [Erneux *et al.*, 1998]. Das Enzym hat eine 100-fach höhere Affinität zum Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> als zum Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. Dieses deutet auf eine Schutzfunktion im Hinblick auf die Hydrolyse von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> hin [Irvine & Schell, 2001]. Zusätzlich ist das Enzym mit der Regulation der Ca<sup>2+</sup> Signaltransduktion assoziiert, da es Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> hydrolysiert und damit das Ca<sup>2+</sup> Signal beendet [Majerus *et al.*, 1999]. Die 5-Phosphatase Aktivität ist Magnesium-abhängig und wird durch 2,3 Bisphosphoglycerat inhibiert. Das Enzym besteht aus 412 AS [Erneux *et al.*, 1998]. Hohe 5-Phosphatase Aktivitäten wurden im cerebralen Kortex, im Hippocampus, im Hypothalamus und im Kleinhirn gemessen [Heacock *et al.*, 1990].

### 1.2.2.2 Multiple Inositolpolyphosphat Phosphatase

Die Multiple Inositolpolyphosphat Phosphatase (MIPP) baut mehrere hochphosphorylierte Inositole *in vitro* ab [Yu *et al.*, 2003]. Allerdings ist es auf das Lumen des ER beschränkt, wo bisher keine Inositolphosphate nachgewiesen werden konnten [Irvine & Schell, 2001]. Ein MIPP *knockout* in Mäusen zeigte keinen auffälligen Phänotyp, aber Veränderungen im Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> Spiegel, was doch auf eine Beteiligung von MIPP an der Hydrolyse dieser InsP Isomere schließen lässt [Irvine & Schell, 2001].

### 1.2.2.3 Diphosphoinositol-Polyphosphat Diphosphatase

Es existieren drei Diphosphoinositol-Polyphosphat Diphosphatase (DIPP) Enzyme, welche die β-Phosphatgruppe von Pyrophosphaten wie [PP]-InsP<sub>5</sub> und [PP]<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub> entfernen. DIPP2 $\alpha$  und DIPP2 $\beta$  unterscheiden sich nur in einer AS. Die DIPP Enzyme weisen eine NUDT Domäne auf, die eine Schutzfunktion besitzt [Irvine & Schell, 2001].

### **1.3 Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit sollte erstmals eine topologisch hochaufgelöste Analyse der Verteilung und biologischen Rolle von Inositolphosphaten in verschiedenen Gehirnregionen ermöglichen. Für die Untersuchungen wurden Wistar-Ratten als Tiermodell ausgewählt. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Inositolphosphate im Gehirngewebe wurde eine Micro-Variante der *Metal-Dye-Detection High Pressure Liquid Chromatography* (MDD-HPLC) angewendet, da hiermit die zu bestimmenden Inositolphosphate ohne radioaktive Markierung in Gewebeproben von minimal 5 x 5 mm (> 25 mg Feuchtgewicht) detektiert werden können. Messungen der InsP Konzentrationen wurden bisher stets an größeren Proben unfixierten Gehirngewebes durchgeführt, dieses Verfahren ist jedoch für räumlich hochaufgelöste Analysen von regionalen Unterschieden der Inositolphosphat Konzentration ungeeignet. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine metabolische und strukturerhaltende Fixierungstechnik etabliert werden, mit der regionale Unterschiede und funktionelle Veränderungen in der Inositolphosphat Konzentration in kleinsten Volumenelementen erfasst werden können.

Für einzelne InsP Isomere wurden in verschiedenen Studien vielfältige zelluläre Funktionen beschrieben, wobei bisher keine umfassenden und spezifischen Untersuchungen in Bezug auf mögliche biologische Funktionen der Inositolphosphate in bestimmten Gehirnregionen durchgeführt wurden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit erstmals der Effekt von motorischer Aktivität, Lern- und Gedächtnisprozessen sowie Stress auf die InsP Konzentrationen in präzise definierten Gehirnregionen des gesamten Gehirns, induziert durch erlerntes und erzwungenes Laufen im Laufrad, untersucht. Im Rahmen der Diskussion der erhaltenen experimentellen Daten können nun erstmals Hypothesen über die physiologische Funktion der Inositolphosphate in bestimmten Gehirnregionen abgeleitet werden.

Zur Visualisierung der basalen Konzentrationen sowie Veränderungen der InsP Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad sollten hochaufgelöste biochemische Tomogramme rekonstruiert werden. Unter Zuhilfenahme der Fixierungstechnik sollten aus Gehirnscheiben von 0,4 mm Dicke nach einer anatomisch präzisen Dissektion Hirnareale und Kernregionen analysiert und so präzise rekonstruiert werden, dass eine virtuelle Voxelzahl von mindestens dem 5-fachen pro Gehirn dissezierten Regionen für die Rekonstruktion entsteht. Für die Anfertigung der Tomogramme sollten mit Hilfe unterschiedlicher Softwareprogramme Frontalschnitte rekonstruiert und die Konzentrationen der Inositolphosphate über Falsch-Farben-Skalen dargestellt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Analysewaage BP 221S	Sartorius
Laufrad Easy Run Ø 30 cm	Zoohandlung
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph
pH-Meter MultiLab 540	WTW
Pipette, Model Reference, 1 – 10 µl	Eppendorf
Pipette, Model Reference, 1 – 100 µl	Eppendorf
Pipette, Model Reference, 100 – 1000 µl	Eppendorf
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Ultra-Turrax T25 basic	IKA
Vakuumbzentrifuge	Bachhofer
Waage BP 2100S	Sartorius
Wasserbad M12	Lauda

#### 2.1.2 Software

HPLC-Data-Manager Version 2.0	Georg W. Mayr
Kroma 3000	Bio-Tek
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc.
MS Word, Excel	Microsoft
SigmaPlot 8.0	SPSS Inc.

#### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

HPLC-Filter Spartan 3/0,2 PA, 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
HPLC-Glasfläschchen Supelco Crimp 2,0 ml Volumen	Sigma-Aldrich
HPLC-Säulen Mini Q™ PC 3.2/3	Amersham Pharmacia
Injektionskanüle 0,55/25 mm	Braun
Kryo-Probenröhrchen 1,0 ml Volumen	Nunc
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße aus Polypropylen 0,5 ml Volumen	Eppendorf
Reaktionsgefäße aus Polypropylen 2,0 ml Volumen	Eppendorf
Probenröhrchen aus Polypropylen (steril) 12 ml Volumen	Greiner
Spritze Omnifix 40 Solo 1 ml Volumen	Braun
Sterilfilter Millex 0,22 µm Porengröße	Millipore

#### 2.1.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Serva, Janssen Chimica, Atarost, Bayer und Braun bezogen. Die Bezugsquellen der übrigen Materialien sind im nachfolgenden Text angegeben.

#### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Fixierungs- und Perfusionslösung                      4 % Paraformaldehyd (PFA) (w/v) in 0,1 M HEPES, pH 7,0, 4 °C

Puffer für die MDD-HPLC

Puffer A	0,2 mM HCl, 15 µM YCl <sub>3</sub>
Puffer B	0,5 M HCl, 15 µM YCl <sub>3</sub>
Puffer C	1,6 M Triethanolamin, 300 µM PAR, pH 9,0
Aufnahmepuffer	2 mM Natrium-Acetat, 2 mM NaF

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Optimierung der Fixierung und Extraktion von Inositolphosphaten aus Gehirngewebe

##### 2.2.1.1 Versuchstiere für die Optimierung der Fixierungstechnik

Diese Versuche wurden an 24 männlichen Wistar-Ratten von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 3 Monate alt und hatten ein Gewicht von 354 g ± 11 g. Die Haltung erfolgte in Standardkäfigen in Gruppen zu jeweils 5 Tieren bei einer Raumtemperatur von 19 – 21 °C und unter Beibehaltung des normalen Tag-Nacht-Rhythmus (Dunkelphase von 19 – 7 Uhr). Die Tiere erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum* und wurden mindestens 6 – 8 Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung und Eingewöhnung im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes von 1998 der Bundesrepublik Deutschland unter der Versuchsnummer org 136 von der Behörde für Umwelt und Gesundheit in Hamburg genehmigt.

##### 2.2.1.2 Präparation des Gehirngewebes

Es wurden verschiedenartige Techniken getestet, um möglichst optimale Analysenergebnisse zu erzielen. Dabei wurde sowohl eine unfixierte als auch fixierte Gewebepreparation vorgenommen. Bei der Fixierung der Gehirne wurde sowohl eine Immersions- als auch eine Perfusionsfixierung getestet. Die Perfusionsfixierung erfolgte darüber hinaus bei unterschiedlichen Temperaturen.

### **2.2.1.2.1 Präparation von unfixiertem Gehirngewebe**

Die Wistar-Ratten ( $n = 10$ ) wurden mit Ether anästhesiert und anschließend durch Kehlschnitt getötet. Die Schädel wurden geöffnet, die Gehirne entnommen und sofort in eiskalte physiologische Kochsalzlösung gelegt. Die Kleinhirne wurden auf Eis in die rechte und linke Kleinhirnhemisphäre sowie den rechten und linken Kleinhirnwurm disseziert. Die Kleinhirn-Proben wurden gewogen ( $58 \text{ mg} \pm 16 \text{ mg}$  Feuchtgewicht) und bis zur weiteren Aufarbeitung in 1,0 ml Kryo-Röhrchen bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Diese Art der Gewebepräparation wurde bisher von verschiedenen Arbeitsgruppen für die Inositolphosphat-Messung verwendet [Grases *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001] und diente für diese Versuche als Kontrolle.

### **2.2.1.2.2 Präparation von fixiertem Gehirngewebe**

Fixieren bedeutet die Unterbrechung der komplexen Stoffwechselprozesse, die Festlegung der Strukturen, die sie ermöglichen, und die Verhinderung der postmortalen Zerfallerscheinungen [Romeis, 1989]. Es wurden verschiedene Fixierungsmethoden getestet, zum einen die Immersionsfixierung, bei der die Gewebeproben in die Fixierungslösung eingelegt werden und zum anderen die Perfusionsfixierung, bei welcher am anästhesierten Organismus die Fixierungslösung über den Blutweg in die zu fixierenden Organe gelangt.

Für die Immersionsfixierung wurde eine Wistar-Ratte mit Ether betäubt und durch Kehlschnitt getötet. Das Gehirn wurde sofort entnommen und in die Fixierungslösung für 3 Tage bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  eingelegt. Das Kleinhirn wurde auf Eis präpariert und bis zur weiteren Aufarbeitung in 1,0 ml Kryo-Röhrchen bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Perfusionsfixierung wurde sowohl bei Raumtemperatur als auch bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Eine Wistar-Ratte wurde durch eine i.p. Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin-Rompun-NaCl (12 %, 8 %, 80 %) anästhesiert. Die anschließende Perfusion erfolgte bei Raumtemperatur mit 300 – 400 ml der Fixierungslösung (siehe 2.1.5) für 20 min durch den linken Ventrikel des Herzens. Das Gehirn wurde sofort entnommen, das Kleinhirn auf Eis präpariert (Dissektionszeit: 1 min) und bis zur weiteren Aufarbeitung in 1,0 ml Kryo-Röhrchen bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Perfusionsfixierung bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden 8 Wistar-Ratten durch eine i.p. Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin-Rompun-NaCl (12 %, 8 %, 80 %) anästhesiert. Die Tiere wurden nach Herstellung der tiefen Narkose auf Eis gelegt und die Köpfe bei etwa  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Durch das Abkühlen sollten die Stoffwechselforgänge und postmortalen

Veränderungen verzögert werden. Die Gehirne wurden 20 min durch eine transkardiale Perfusion mit 300 – 400 ml der auf 4°C vorgekühlten Fixierungslösung (siehe 2.1.5) fixiert. Diese wurde während der gesamten Perfusion bei etwa 4 °C weitergekühlt. Die Gehirne wurden entnommen und in der Fixierungslösung bei 4 °C für weitere 30 min nachfixiert. Anschließend wurden die Kleinhirne disseziert und das restliche Gehirn in 10 – 12 Frontalschnitte (0,2 mm Dicke) segmentiert. Hierzu wurde ein selbstgebautes „Schneidegerät“ verwendet, welches aus 15 Rasierklingen, fest montiert in einem Abstand von 0,2 mm, bestand. Die Frontalschnitte wurden mit Hilfe des Gehirn-Atlases von Palkovits & Brownstein [1988] unter dem Mikroskop in verschiedene Gehirn Regionen unterteilt. Während der Präparation lagen die Frontalschnitte auf einem Eisblock, um ihre Temperatur bei 0-4 °C zu halten. Die Gehirnproben (n = 126 pro Gehirn) hatten ein Gewicht von 15 – 70 mg Feuchtgewicht und wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in 1,0 ml Kryo-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.3 Zeitabhängige Veränderungen der InsP Konzentrationen**

Die Wistar-Ratten (n = 4) wurden durch eine i.p. Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin-Rompun-NaCl (12 %, 8 %, 80 %) anästhesiert. Die Gehirne wurden bei 4 °C perfusionsfixiert, schnell entnommen und in der Fixierungslösung bei 4 °C für 30 min nachfixiert (2.2.1.2.2). Anschließend wurden die Kleinhirne in 6 Segmente präpariert, 2 vom Kleinhirnwurm sowie 2 von jeder Kleinhirnhemisphäre. Die Kleinhirnproben wurden dann in der Fixierungslösung bei 4 °C für weitere 1,5 h, 3 h, 8 h, 24 h, 3 Tage und 7 Tage aufbewahrt. So wurden für jedes Tier 6 unterschiedliche Inkubationszeiten getestet.

### **2.2.1.4 Extraktion der Inositolphosphate**

Alle Reaktionsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Gehirnproben wurden in 12 ml Polypropylen-Probenröhrchen (PP-Probenröhrchen) überführt. Jede Gehirnprobe wurde mit 1 ml einer 8 %igen (w/v) Trichloressigsäure, 12 µl einer 0,2 M EDTA-Lösung (2,4 µmol), 10 µl einer 0,1 M NaF-Lösung (1 µmol) und 10 µl einer 20 %igen (w/v) Norit-A Suspension (mit 1 M HCl säurebehandelte Aktivkohle-Suspension) versetzt. Die Gehirnprobe wurde viermal bei 9500 rpm für 10 sek auf Eis mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde für 20 min auf Eis extrahiert und anschließend für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues PP-Probenröhrchen überführt und für 15 min bei 37 °C inkubiert, um das Kreatinphosphat zu zerstören [Mayr, 1990]. Zur Entfernung der Trichloressigsäure wurde der Überstand dreimal mit 3 ml wassergesättigtem Diethylether für 2 min durch kräftiges Schütteln extrahiert. Der Ether wurde zwischendurch mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Probe wurde mit 10 µl einer 1 M Triethanolamin-Lösung (pH 7,0) auf einen pH von 6 – 7

eingestellt. Der verbleibende Ether wurde in der Vakuumzentrifuge abgesaugt (45 min). Nach der Lyophilisierung betrug das Probenvolumen 350 – 550  $\mu\text{l}$ . Die Probe wurde mit einer Spritze durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  Filter gedrückt und mit dem Micro-MDD-HPLC Aufnahmebuffer auf ein Volumen von 1300  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden bis zur Messung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.1.5 Analyse von Inositolphosphaten mittels Micro-MDD-HPLC

Die Micro-MDD-HPLC Technik wird sowohl für die Identifizierung als auch für die Quantifizierung von Inositolphosphaten verwendet [Mayr, 1990; Guse *et al.*, 1995]. Die zu bestimmenden Inositolphosphate werden ohne radioaktive Markierung direkt komplexometrisch nachsäulenderivatisiert und dadurch online detektiert. Das MDD-System ist zusammengesetzt aus dem metallbindenden Farbstoff PAR (4-(2-pyridylazo)resorcinol), dem dreiwertigen Übergangsmetallkation Yttrium sowie den zu analysierenden metallbindenden Inositolphosphaten. Die Trennung der Inositolphosphate erfolgt an einer Anionenaustauschersäule in einem sauren Puffermilieu. Die Puffer enthalten Yttrium im Überschuss, bezogen auf die Inositolphosphatkonzentration in der Probe. Danach wird das Eluat durch die Zumischung eines dritten Puffers, welcher den Farbstoff PAR enthält, alkalisiert. Der Farbstoff PAR bindet spezifisch Yttrium und führt zu einer starken Veränderung der Basisabsorption bei einer Wellenlänge von 520 – 550 nm. Bei alkalischem pH besitzen die Inositolphosphate eine deutlich höhere Bindungsaffinität zum Yttrium als der Farbstoff PAR. Dies führt zu einer Reduzierung des Metall-Farbstoffkomplexes, wenn Inositolphosphate vorhanden sind. Auf diese Weise erzeugen die Inositolphosphate ein negatives Signal, das durch die Spannungsumkehr am Monitor in ein positives Signal umgewandelt wird. Der Geräteaufbau der Micro-MDD-HPLC ist in Abbildung 2.2.1.5-1 dargestellt.

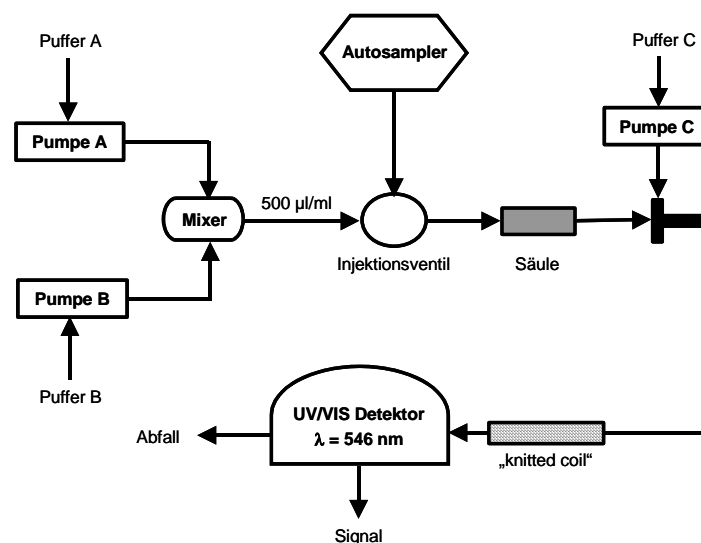


Abb. 2.2.1.5-1: Schematische Darstellung des Geräteaufbaus der Micro-MDD-HPLC.



Die für die Micro-MDD-HPLC eingesetzten Geräte sind nachfolgend aufgelistet:

Autosampler HPLC 360	Kontron
Deuterium Lampe	Sofi GmbH
Pumpe A und B 422 Master	Kontron
Pumpe C LC-10 AD	Shimadzu
UV/VIS Detektor VWM	Pharmazcia
UV/VIS Detektor SPD-10 AV (alternativ)	Shimadzu

Der verwendete HPLC-Gradient ist in Tabelle 2.2.1.5-1 aufgeführt. Die Laufzeit jeder Probenanalyse betrug 15 min.

Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	A (%)	B (%)
0,00	500	97	3
1,00	500	96	4
3,00	500	95	5
3,30	500	91	9
5,50	500	47	53
5,80	500	45	55
6,30	500	40	60
8,30	500	20	80
10,30	500	0	100
12,30	500	0	100
12,50	500	100	0
14,50	500	100	0
14,70	20	100	0

**Tab. 2.2.1.5-1: HPLC-Gradient für die Trennung der verschiedenen Inositolphosphate.**

Die Quantifizierung der Peaks erfolgte mit dem Programm HPLC-Data-Manager Version 2.0. Die Rohdaten wurden mit MS Excel und GraphPad Prism 4 ausgewertet und mit SigmaPlot 8.0 als Histogramm dargestellt. Die statistisch signifikanten Unterschiede der Mittelwerte wurden durch einen ungepaarten *t*-Test nachgewiesen und als signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  war. Dafür wurde vorausgesetzt, dass die Daten normalverteilt waren und gleiche Varianzen hatten. Alle graphisch dargestellten Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) aufgeführt.

Für die Erstellung der biochemische Tomogramme der Gehirndaten wurden Roh-Tomogramme in MS Excel angefertigt und in SigmaPlot 8.0 in *Contour-Plots* umgewandelt.

## **2.2.2 Effekte von erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad auf die InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte**

### **2.2.2.1 Versuchstiere für die Beeinflussung der InsP Konzentrationen**

Für diese Untersuchungen wurden 18 männliche Wistar-Ratten von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Vor Versuchsbeginn waren die Tiere 74 Tage alt und hatten ein Gewicht von  $290 \text{ g} \pm 54 \text{ g}$ . Die Wistar-Ratten wurden in Dreiergruppen in Standardkäfigen für mindestens 6 – 8 Tage im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eingewöhnt (2.2.1.1). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes von 1998 der Bundesrepublik Deutschland unter der Versuchsnummer 66/03 von der Behörde für Umwelt und Gesundheit in Hamburg genehmigt.

Für die Versuche wurden die Tiere in 3 Gruppen ( $n = 6$ ) eingeteilt (Kontrollgruppe, erlerntes und erzwungenes Laufen).

### **2.2.2.2 Behandlung der Tiere und Präparation des Gehirngewebes**

Zum eigentlichen Versuchsbeginn, d.h. nach Abschluss der Trainingsphase waren alle Tiere 134 Tage alt und hatten ein Gewicht von  $464 \text{ g} \pm 71 \text{ g}$ . Die Untersuchungen wurden an 6 Tagen durchgeführt, wobei jeweils ein Tier pro Gruppe eingesetzt wurde. Die Versuche waren randomisiert.

#### **2.2.2.2.1 Kontrollgruppe**

Es wurde darauf geachtet, dass die untrainierten Wistar-Ratten der Kontrollgruppe keinem Stress durch experimentelle Handhabungen ausgesetzt waren. Die Tiere wurden vorsichtig am Genick gepackt, aus ihrem Käfig genommen und durch eine i.p. Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin-Rompun-NaCl (12 %, 8 %, 80 %) anästhesiert. Danach wurde, wie unter Abschnitt 2.2.1.2.2 beschrieben, die Perfusionsfixierung bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Anschließend wurden die Sehnerven, der Bulbus olfactorius, die Kleinhirnhemisphären, der Kleinhirnwurm, das Mittelhirn einschließlich der Vierhügelplatte, die Brücke und die Medulla oblongata sezirt. Das restliche Gehirn wurde in 5 Frontalschnitte (0,4 mm Dicke) segmentiert. Die Frontalschnitte wurden mit Hilfe des Gehirn-Atlases von Palkovits & Brownstein [1988] unter dem Mikroskop präpariert. In Tabelle 2.2.2.2.1-1 sind die präparierten Regionen und Nuklei der einzelnen Frontalschnitte aufgelistet.

#### **2.2.2.2.2 Erlerntes Laufen im Laufrad**

Das Training der Wistar-Ratten dauerte 60 Tage. Es wurde an 3 Tagen in der Woche trainiert. In dieser Zeit sollten die Tiere an das Laufrad und die experimentellen

Bedingungen adaptiert werden, des weiteren sollten die Versuchstiere lernen, sich aus eigenem Antrieb im Laufrad zu bewegen, um Stresseffekte zu reduzieren.

Zu Trainingsbeginn (1 – 15 Trainingstag) wurden die Wistar-Ratten mit dem Laufrad vertraut gemacht und liefen freiwillig 30 – 60 sek im Laufrad. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Tiere noch Stressreaktionen, wie erhöhte Defäkation und Harnentleerung sowie eine laute Vokalisierung. Diese sind auf das durch den Experimentator erzwungene Einsetzen ins Laufrad zurückzuführen.

Ab dem 20 Trainingstag liefen die Tiere freiwillig konstant über 1 min im Laufrad und wurden von nun an nach dem Laufen mit Käsecrackern belohnt. Im Verlauf des Trainings erhöhte sich die Laufzeit auf 2 – 3 min und die Tiere zeigten keine Stressreaktionen mehr. Am Ende des Trainings liefen die Wistar-Ratten kontinuierlich 4 min im Laufrad.

Die trainierten Wistar-Ratten wurden am Versuchstag sachte am Genick gepackt, aus dem Käfig genommen und in das Laufrad gesetzt. Die Tiere liefen im Laufrad kontinuierlich 4 min. Danach wurden sie sofort durch eine i.p. Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin-Rompun-NaCl (12 %, 8 %, 80 %) anästhesiert. Die Gehirne wurden perfusionsfixiert bei 4 °C für 20 min, schnell entnommen und in der Fixierungslösung bei 4 °C für 30 min nachfixiert. Anschließend wurden die Gehirne präpariert (2.2.2.2.1). Die Gehirnproben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in 1,0 ml Kryo-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.2.3 Erzwungenes Laufen im Laufrad**

Die untrainierten Wistar-Ratten wurden am Genick gefasst, aus dem Käfig genommen und ins Laufrad gesetzt. Die Tiere kamen das erste Mal mit dem Laufrad in Berührung und wurden gezwungen zu laufen. Sie liefen selbstständig etwa 30 sek im Laufrad. Dann sprangen sie aus dem Laufrad und wurden zum Laufen sofort wieder reingesetzt. Dieses wurde mehrmals (10-15 Mal) wiederholt. Der Stress durch diese Behandlung und die ungewohnte Bewegung verursachte bei den Tieren eine erhöhte Defäkation und Harnentleerung sowie eine laute Vokalisierung. Nach 15 min wurde der Laufversuch beendet und die Tiere wurden anästhesiert (2.2.2.2.1). Die Perfusionsfixierung und die Gewebepreparation erfolgten bei 4 °C (2.2.2.2.1). Die Gehirnproben wurden bis zur weiteren Verwendung in 1,0 ml Kryo-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

Frontalschnitt	Regionen und Nuklei
Frontalschnitt 1	linker und rechter Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium linker und rechter frontopolarer Kortex
Frontalschnitt 2	linker und rechter cingulärer Kortex linker und rechter parietaler Kortex, motorisch linker und rechter parietaler Kortex, somatosensorisch linkes und rechtes Striatum, lateral linkes und rechtes Striatum, medial Septum Tuberculum olfactorium linker und rechter Hypothalamus linker und rechter piriformer Kortex weiße Substanz
Frontalschnitt 3	linker und rechter Hypothalamus linker und rechter piriformer mit entorhinalem Kortex linke und rechte Amygdala linker und rechter Thalamus linkes und rechtes Striatum linker und rechter Hippocampus Fornix linker und rechter temporaler Kortex linker und rechter okzipitaler Kortex linker und rechter cingulärer Kortex weiße Substanz
Frontalschnitt 4	linker und rechter Thalamus linker und rechter Hippocampus linker und rechter entorhinaler Kortex linker und rechter temporaler Kortex linker und rechter okzipitaler Kortex linker und rechter cingulärer Kortex weiße Substanz
Frontalschnitt 5	linker und rechter okzipital Pol

**Tab. 2.2.2.2.1-1: Zusammenstellung der einzelnen Frontalschnitte.**

Die Aufarbeitung der Inositolphosphate aus diesen Gehirnproben (n = 65 pro Gehirn) wurde wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

### 2.2.2.3 Analyse von Inositolphosphaten mit Micro-MDD-HPLC

1000 µl von jeder Gehirnprobe wurden für die quantitative Analyse mittels Micro-MDD-HPLC injiziert. Der verwendete HPLC-Gradient ist in Tabelle 2.2.2.4-1 aufgeführt. Die Laufzeit jeder Probenanalyse betrug 25 min. Für die Analyse dieser Gehirnproben wurde ein längerer Gradient gewählt, um mögliche hochphosphorylierte Inositole wie [PP]-InsP<sub>5</sub> (InsP<sub>7</sub>) oder [PP]<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub> (InsP<sub>8</sub>) nachzuweisen.

Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	A (%)	B (%)
0,00	500	97	3
1,90	500	97	3
2,90	500	95	5
3,60	500	93	7
4,10	500	91	9
7,40	500	90	10
7,70	500	89	11
7,90	500	87	13
8,20	500	85	15
8,60	500	83	17
9,20	500	82	18
10,20	500	81	19
11,40	500	75	25
11,90	500	72	28
12,70	500	65	35
13,50	500	55	45
14,90	500	30	70
15,80	500	16	84
16,30	500	10	90
16,60	500	7	93
16,90	500	5	95
17,40	500	3	97
17,60	500	0	100
22,50	500	0	100
22,60	500	100	0
24,80	20	100	0

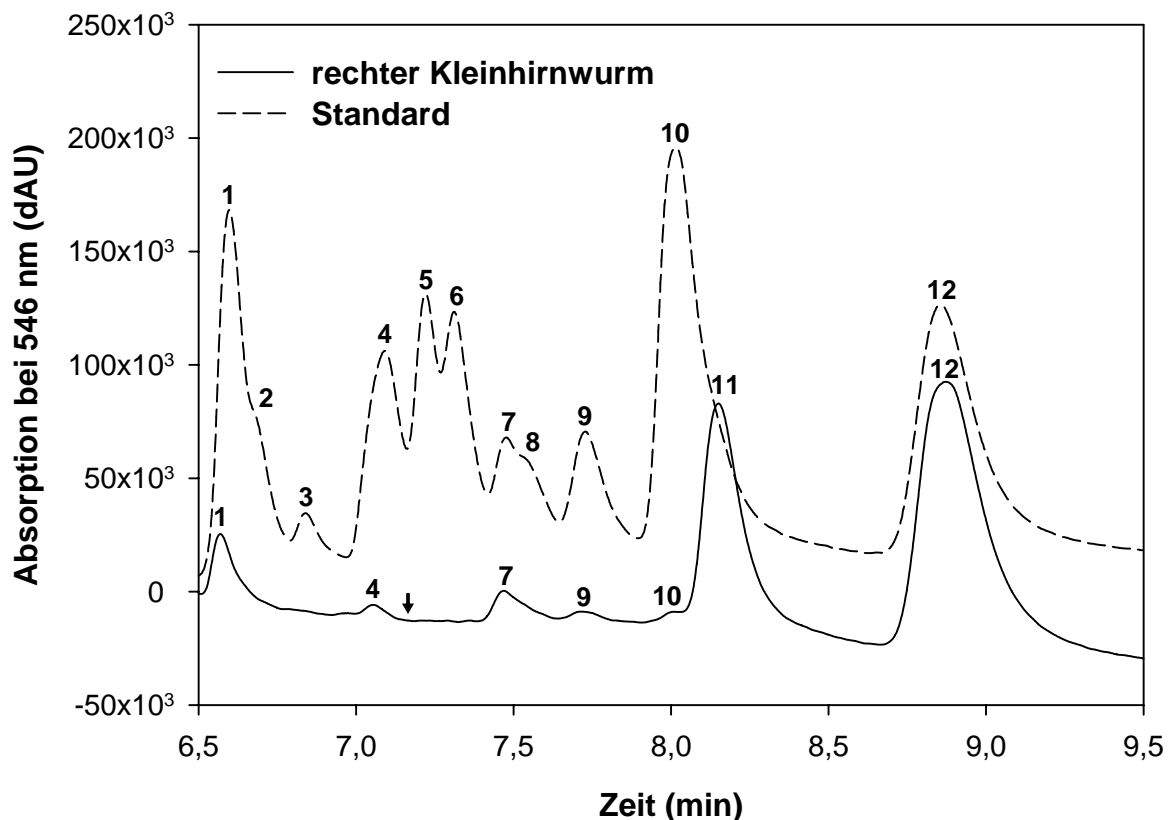
Tab. 2.2.2.3-1: HPLC-Gradient für die Trennung der verschiedenen Inositolphosphate.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss verschiedener Fixierungstechniken auf die InsP Konzentrationen

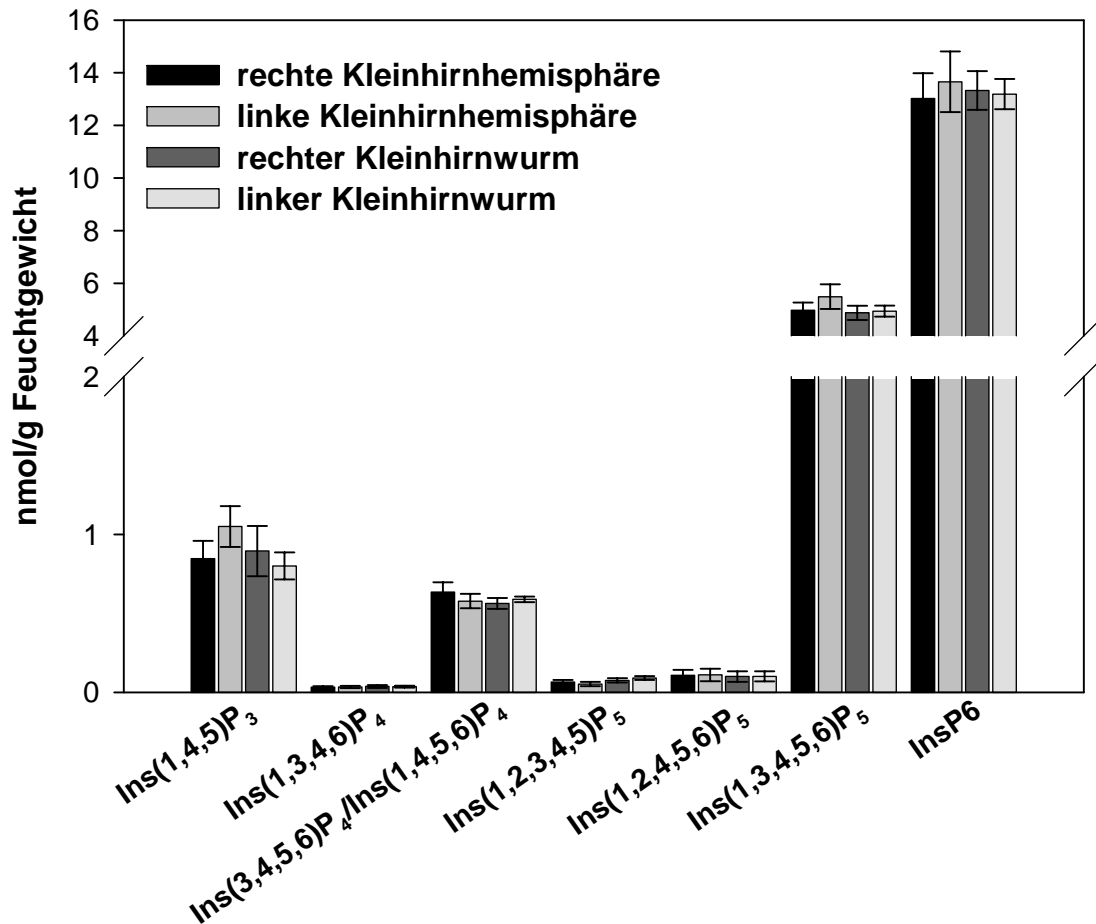
##### 3.1.1 Verteilung der Inositolphosphate im unfixierten Gehirngewebe

Die Präparation von unfixiertem Gehirngewebe (2.2.1.2.1) erfolgte nach den Protokollen, wie sie in der Literatur [Grases *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001] beschrieben wurden. Da die rasche Präparation von unfixiertem Gehirngewebe in bestimmte Regionen schwierig war, wurden nur die Kleinhirne für die Inositolphosphat-Analyse verwendet, da sie sich leicht präparieren ließen. Ein typisches Micro-MDD-HPLC Chromatogramm am Beispiel des rechten Kleinhirnwurms, disseziert innerhalb von 1 min. nach der Tötung, ist in Abb. 3.1.1-1 dargestellt. In allen Kleinhirnproben wurden folgende InsP Isomere detektiert: Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Peak 1), Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> (Peak 4), Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> (Peak 7), Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (Peak 9), Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (Peak 10), Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (Peak 11) und InsP<sub>6</sub> (Peak 12).



**Abb. 3.1.1-1: MDD-HPLC Chromatogramm vom unfixiertem Kleinhirngewebe.** Dargestellt sind die InsP Isomere im unfixierten rechten Kleinhirnwurm. Die einzelnen InsP Isomere wurden durch Vergleich mit einem InsP<sub>x</sub>-Standard (---) identifiziert. Die Standard InsP Isomere in der Reihenfolge ihrer Elution: 1 = Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, 2 = Ins(3,4,5)P<sub>3</sub>/Ins(1,5,6)P<sub>3</sub>, 3 = Ins(4,5,6)P<sub>3</sub>, 4 = Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, 5 = Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub>, 6 = Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(2,3,4,5)P<sub>4</sub>, 7 = Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, 8 = Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>, 9 = Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, 10 = Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, 11 = Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und 12 = InsP<sub>6</sub>. Der Pfeil zeigt die Position von Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, einem biologischen Isomer, das nur in geringen Mengen vorhanden ist.

Die Konzentrationen der Inositolphosphate in der unfixierten rechten und linken Kleinhirnhemisphäre sowie im rechten und linken Kleinhirnwurm sind in Abbildung 3.1.1-2 gezeigt. Die höchsten Konzentrationen wurden für die Isomere  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_6$  gefunden.  $\text{InsP}_6$  hatte die deutlich höchste Konzentration mit etwa 13 nmol/g Feuchtgewicht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kleinhirnregionen festgestellt.



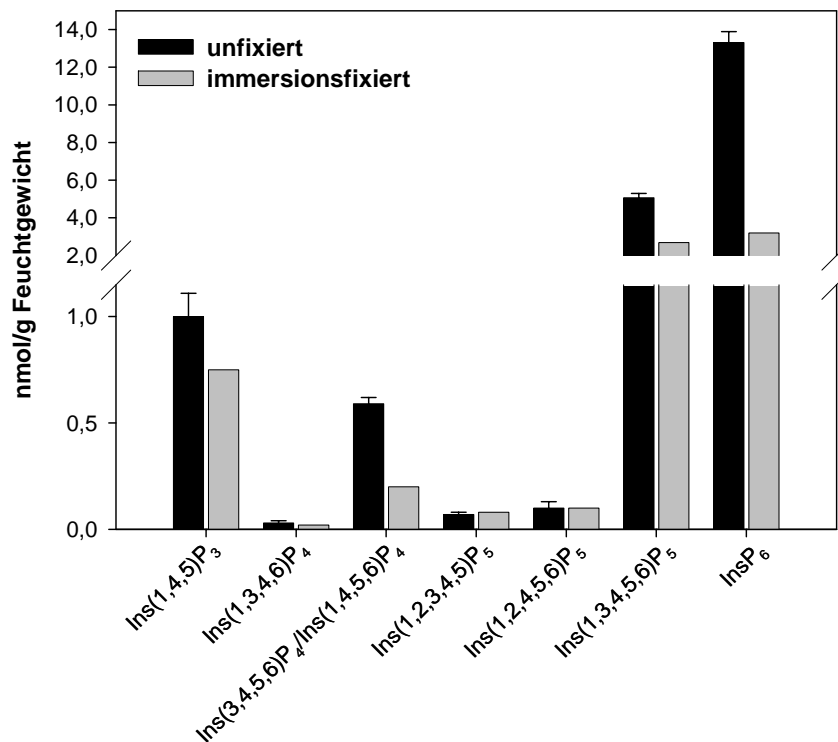
**Abb. 3.1.1-2: Verteilung der Inositolphosphate in den verschiedenen unfixierten Kleinhirnregionen.** Es sind die Mittelwerte der Kleinhirne ( $n = 10$ ) dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

### 3.1.2 Verteilung der Inositolphosphate im fixierten Gehirngewebe

Es wurden nun verschiedene Verbesserungen der Fixierungstechniken getestet, um eine möglichst optimale Fixierung des Gehirngewebes zu erreichen und damit einerseits eine exakte anatomisch präzise Dissektion der Gehirne in definierte Regionen innerhalb einer Stunde auf Eis sowie andererseits stabil metabolisch „eingefrorene“  $\text{InsP}$  Konzentrationen zu erhalten.

### 3.1.2.1 Einfluss der Immersionsfixierung auf die InsP Konzentrationen

Für die Immersionsfixierung wurde das Gehirngewebe in die Fixierungslösung für 3 Tage bei 4 °C eingelegt. Diese Methode wurde schnell verworfen, weil einerseits das Gehirngewebe trotz 3 Tage dauernder Immersionsfixierung zu weich war, um eine genaue Präparation der Gehirnregionen zu ermöglichen und andererseits eine deutliche Abnahme der InsP Konzentrationen im Vergleich zum unfixierten Gehirngewebe zu beobachten war (Abb. 3.1.2.1-1). Dennoch wurden im immersionsfixierten Kleinhirn die gleichen InsP Isomere detektiert wie im unfixierten Kleinhirngewebe.



**Abb. 3.1.2.1-1: Einfluss der Immersionsfixierung auf die InsP Konzentrationen im Kleinhirn.** Das Gehirn einer Wistar-Ratte wurde für 3 Tage bei 4 °C immersionsfixiert. Die InsP Konzentrationen des Kleinhirns wurden durch MDD-HPLC Analyse bestimmt. Die Werte mehrerer Inositolphosphate sind im Vergleich mit den unfixierten Kleinhirnen (n = 10) erheblich reduziert.

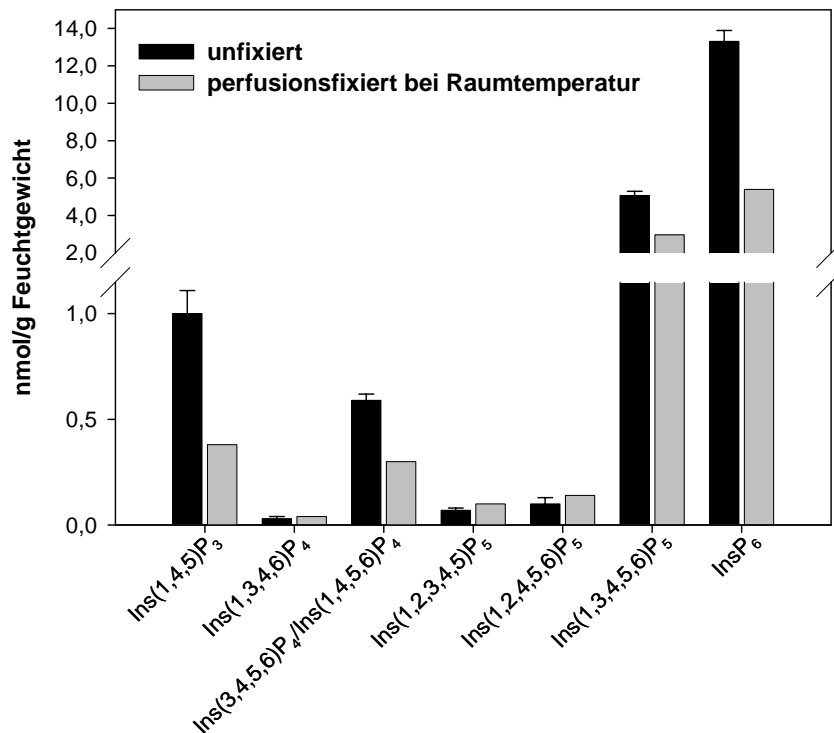
Die Konzentration von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> nahm im Vergleich zum unfixierten Kleinhirngewebe um etwa 20 % ab. Die Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> Konzentrationen waren drastischer reduziert. Der Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> Spiegel war um mehr als 60 %, der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegel um fast 50 % und der InsP<sub>6</sub> Spiegel um mehr als 75 % verringert. Im Gegensatz dazu waren die Konzentrationen von Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> ähnlich wie die Inositolphosphate im unfixierten Kleinhirngewebe.

Die Abnahme der InsP Konzentrationen könnte durch eine insuffiziente Gewebefixierung hervorgerufen sein, die zu intakten metabolischen Enzymen führt, die dann eine Degradation der InsP Konzentrationen bewirken.



### 3.1.2.2 Einfluss der Perfusionsfixierung auf die InsP Konzentrationen

Aufgrund der schlechten Ergebnisse der Immersionsfixierung wurde eine effizientere Fixierung, die transkardiale Perfusionsfixierung, durchgeführt. Diese bewirkt eine sehr schnelle Penetration der Fixierungslösung in das Gewebe und damit auch eine rasche Vernetzung und eine Inaktivierung der Proteine einschließlich der InsP metabolisierenden Enzyme. Es wurde als nächstes eine Wistar-Ratte bei Raumtemperatur perfusionsfixiert, wobei die Dissektion bei 4°C erfolgte (Abschnitt 2.2.1.2.2). Aber auch hier wurden ähnliche Effekte wie bei der Immersionsfixierung beobachtet. Erneut waren die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> Konzentrationen deutlich reduziert im Vergleich zu den InsP Konzentrationen des unfixierten Kleinhirngewebes (Abb. 3.1.2.2-1).



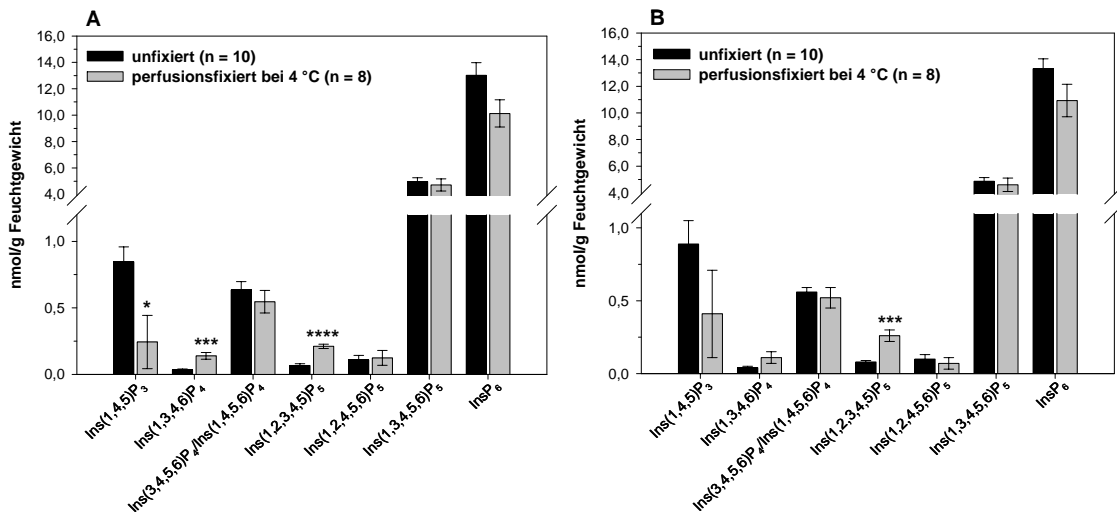
**Abb. 3.1.2.2-1: Einfluss der Perfusionsfixierung bei Raumtemperatur auf die InsP Konzentrationen im Kleinhirn.** Das Gehirn einer Wistar-Ratte wurde bei Raumtemperatur perfusionsfixiert. Die InsP Konzentrationen des Kleinhirns wurden durch MDD-HPLC Analyse bestimmt. Die Werte mehrerer Inositolphosphate sind im Vergleich mit den unfixierten Kleinhirnen (n = 10) deutlich verringert.

Der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Spiegel war um mehr als 60 %, der Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> Spiegel um fast 50 %, der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegel um mehr als 40 % und der InsP<sub>6</sub> Spiegel um beinahe 60 % vermindert. Die Konzentrationen von Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> und Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> waren wie bei der Immersionsfixierung unverändert.

Die Abnahme der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> Konzentrationen könnte darauf hindeuten, dass noch immer InsP metabolisierende

Enzyme im fixierten Gehirngewebe bei Raumtemperatur aktiv sind. Um das zu überprüfen, wurden 8 anästhesierte Wistar-Ratten auf Eis gelegt, gekühlt und hierbei perfusionsfixiert mit 4 °C kalter Fixierungslösung.

Unter diesen Bedingungen waren die Konzentrationen der meisten InsP Isomere vergleichbar mit den Werten der unfixierten Gehirngewebe (Abb. 3.1.2.2.-2).



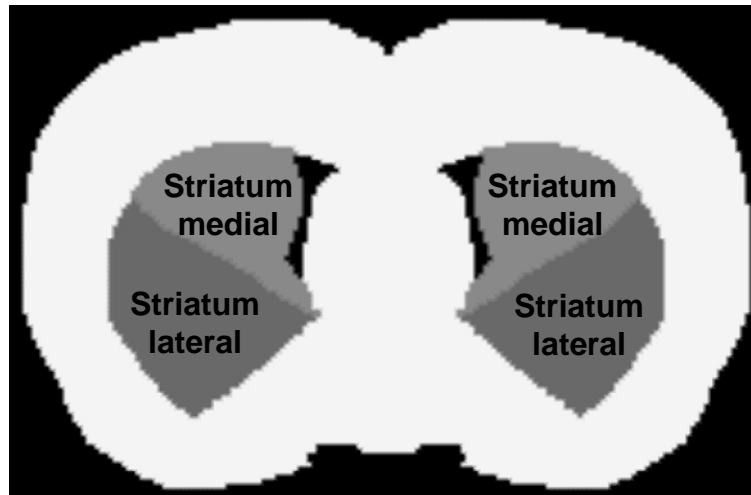
**Abb. 3.1.2.2.-2: Einfluss der Perfusionsfixierung bei 4 °C auf die InsP Konzentrationen im Kleinhirn.** Die Gehirne von 8 Wistar-Ratten wurde perfusionsfixiert bei 4 °C und die InsP Spiegel wurden durch MDD-HPLC Analyse untersucht. Dargestellt sind die InsP Konzentrationen der rechten Kleinhirnhemisphäre (A) und dem rechten Kleinhirnwurm (B) im Vergleich mit den unfixierten Kleinhirnen. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen unfixierten und perfusionsfixierten (bei 4 °C) Kleinhirnregionen sind angezeigt: \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,0005, \*\*\*\*p < 0,0001. Abgebildet sind die Mittelwerte. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar.

Auffällig war, dass die Konzentration von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> immer noch deutlich reduziert war, so war der Unterschied in der rechten Kleinhirnhemisphäre (3.1.2.2-2A) (p < 0,05) signifikant, aber nicht im rechten Kleinhirnwurm (3.1.2.2-2B). Die Konzentrationen von Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> waren nun nur geringfügig vermindert gegenüber den schnell aber ohne Fixierung extrahierten Proben. Der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegel war ähnlich wie in den unfixierten Kleinhirnregionen. Allerdings waren die Werte von zwei InsP Isomeren gesteigert. Die Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> Konzentration war sowohl in der rechten Kleinhirnhemisphäre (p < 0,0001) als auch im rechten Kleinhirnwurm (p < 0,0005) signifikant erhöht. Der Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> Spiegel war in der rechten Kleinhirnhemisphäre (p < 0,0005) deutlich erhöht, während dieser Unterschied im rechten Kleinhirnwurm nicht signifikant war.

Es konnte gezeigt werden, dass bei der Perfusionsfixierung bei 4 °C gut fixiertes Gehirngewebe erhalten wird, welches innerhalb von 60 min präpariert werden kann und das geringe Veränderungen in der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und InsP<sub>6</sub> Konzentration aufweist, aber

keine Verringerung der anderen InsP Spiegel, verglichen mit dem unfixierten Gehirngewebe.

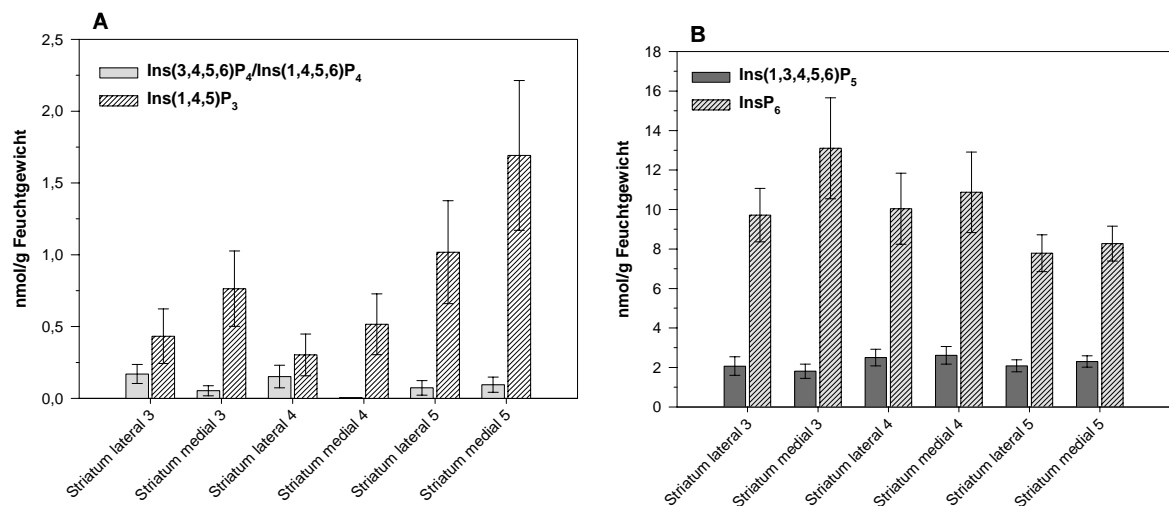
Nun sollte überprüft werden, ob mit dieser Art der Fixierung regionale Unterschiede in der InsP Verteilung untersucht werden können. Unter Verwendung dieser Fixierungstechnik konnte das Gehirngewebe in mehrere dünne Frontalschnitte mit einer Dicke von 0,2 mm zerlegt werden. Für die Untersuchung wurde das Striatum ausgewählt, weil es schwer zu präparieren war, dieses konnte in einen lateralen und medialen Teil präpariert werden (Abb. 3.1.2.2-3).



**Abb. 3.1.2.2-3: Präparationsschema des Striatums.** Dargestellt ist der Frontalschnitt 4. Der mediale und der laterale Teil des Striatums sind grau unterlegt.

Das Striatum ist eine heterogene Gehirnstruktur, wobei die regionalen Variationen durch die unterschiedlichen Funktionen zustande kommen (Szostak *et al.*, 1989). Das mediale Striatum erhält kortikale Inputs vorwiegend aus dem medialen präfrontalen Kortex sowie dem anterioren cingulären Kortex und ist in kognitive Funktionen verwickelt [Rogers *et al.*, 2001]. Zudem haben verschiedene Studien gezeigt, dass Läsionen oder Blockierungen der NMDA Rezeptoren das räumliche Arbeitsgedächtnis im medialen Striatum beeinträchtigen und eine verminderte Nutzung der räumlichen Strategie im Morris-Wasser-Labyrinth bewirken [Ragozzino & Choi, 2004]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass speziell das mediale Striatum zur Verhaltensflexibilität befähigt ist, wenn bestimmte Bedingungen den Lernvorgang oder die Nutzung der räumlicher Information erfordern, allerdings sind die neurochemischen Prozesse, welche diese Funktion belegen, noch unklar [Ragozzino & Choi, 2004]. Das laterale Striatum erhält kortikale Afferenzen von anterolateralen sowie parietalen Gebieten des Neokortex. Dieser Teil des Striatums ist hauptsächlich an der motorischen Kontrolle beteiligt [Rogers *et al.*, 2001].

Die Micro-MDD-HPLC Analyse des Striatums ergab wie im Kleinhirn das die Isomere  $\text{InsP}_6$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  in den höchsten Konzentrationen vorhanden sind (Abb. 3.1.2.2-4B), während die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegel deutlicher geringer waren (Abb. 3.1.2.2-4A). Außerdem konnten mit dieser Fixierungstechnik regionale Unterschiede in den  $\text{InsP}$  Konzentrationen bestimmt werden. Sowohl für  $\text{InsP}_6$  (Abb. 3.1.2.2-4B) als auch für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Abb. 3.1.2.2-4A) wurden höhere Konzentrationen im medialen Teil des Striatums beobachtet als im lateralen Teil. Im Gegensatz dazu waren die Spiegel von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  im lateralen Teil des Striatums höher als im medialen Teil (Abb. 3.1.2.2-4A). Darüber hinaus wurde in der  $\text{InsP}_6$  Konzentration ein fronto-okzipitaler Gradient beobachtet. Die  $\text{InsP}_6$  Werte waren im frontalen Teil des Striatums (Frontalschnitt 3) höher als im okzipitalen Teil (Frontalschnitt 5). Die Verteilung des  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Isomers zeigte jedoch keine regionalen Unterschiede (Abb. 3.1.2.2-4B).

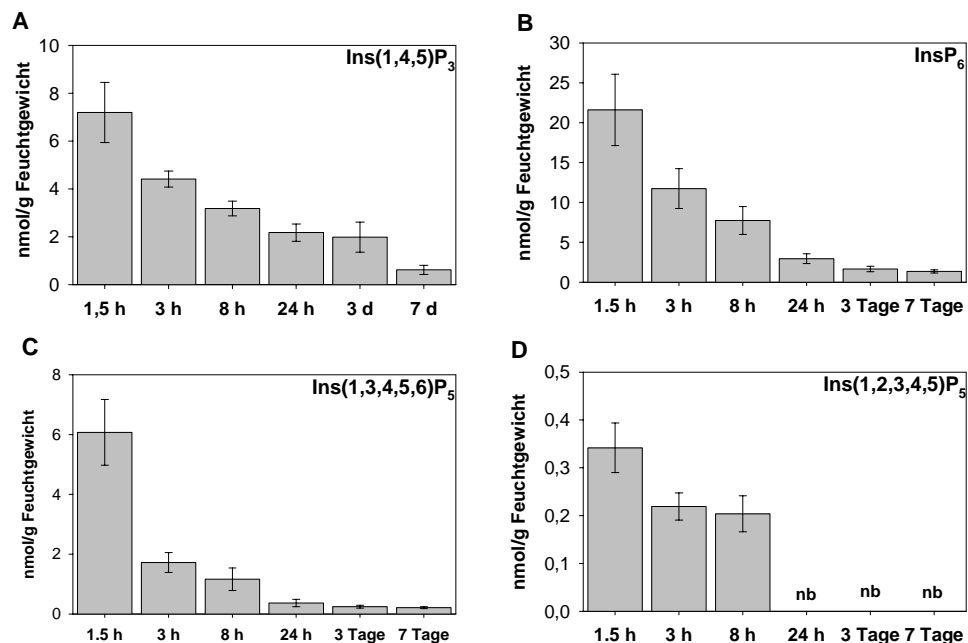


**Abb. 3.1.2.2-4: Verteilung der Inositolphosphate im Striatum.** Die Gehirne von 8 Wistar-Ratten wurden perfusionsfixiert bei 4 °C. Dargestellt sind die Konzentrationen von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (A),  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  (A),  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  (B) und  $\text{InsP}_6$  (B) im medialen und lateralen Teil des Striatums. Die Zahlen (3,4,5) kennzeichnen die Frontalschnitte, aus welchem die Proben stammen. Frontalschnitt 3 repräsentiert den frontalen Teil und Frontalschnitt 5 kennzeichnet den okzipitalen Teil des Striatums. Gezeigt sind die Mittelwerte. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar.

Diese Pilotstudie belegte, dass die optimierte Fixierungstechnik drei Vorteile hat: (1) eine genügend strukturelle Fixierung für anatomisch hochaufgelöste Dissektionen, (2) eine metabolische Fixierung der  $\text{InsP}$  Konzentrationen und (3) eine genügend geringe Varianz der Konzentrationsbestimmungen, so dass regionale und voraussichtlich auch funktionelle Konzentrationsunterschiede statistisch signifikant zu ermitteln sind.

### 3.2 Zeitabhängige Veränderungen der InsP Konzentrationen

Hinsichtlich der Ergebnisse der Perfusionsfixierung bei 4 °C sollte geklärt werden, ob sich die InsP Konzentrationen verändern, wenn das Gehirngewebe in der Fixierungslösung für unterschiedliche Zeitpunkte bei 4 °C aufbewahrt wird. Auf diese Art sollten mögliche noch vorhandene Enzym Aktivitäten ausgeschlossen werden und der Zeitraum gefunden werden, über den Dissektionen ohne wesentliche Veränderung der Analyseergebnisse möglich sein sollten. Perfusionsfixierte Kleinhirnproben (4 °C) von 4 Wistar-Ratten wurden unterschiedlich lange (1,5 h, 3 h, 8 h, 24 h, 3 und 7 Tage) in der Fixierungslösung bei 4 °C inkubiert. Tatsächlich waren die Konzentrationen aller Inositolphosphate mit der Zeit vermindert (Abb. 3.2-1). Verglichen mit den Konzentrationen, die nach 1,5 h Inkubation gemessen wurden, nahmen die Spiegel von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Abb. 3.2-1A), InsP<sub>6</sub> (Abb. 3.2-1B) und Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (Daten nicht gezeigt) nach 3 h Inkubation um etwa 50 % ab. Nach 7 Tagen Inkubation sanken die Konzentrationen auf etwa 10 % ab. Das Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Isomer zeigte eine sehr viel auffälligere Konzentrationsabnahme. Die Konzentration fiel zwischen 1,5 und 3 h um etwa 70 % und war nach 7 Tagen Inkubation um etwa 97 % reduziert, verglichen mit den 1,5 h Spiegel (Abb. 3.2-1C). Die Isomere Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (Abb. 3.2-1D) und Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> (Daten nicht gezeigt), welche in sehr geringen Konzentrationen im Gehirngewebe vorkommen, zeigten ähnlichen Konzentrationsabnahmen innerhalb der ersten 8 h. Nach 24 h Inkubation lagen ihre Konzentration unterhalb des Detektionslimits.



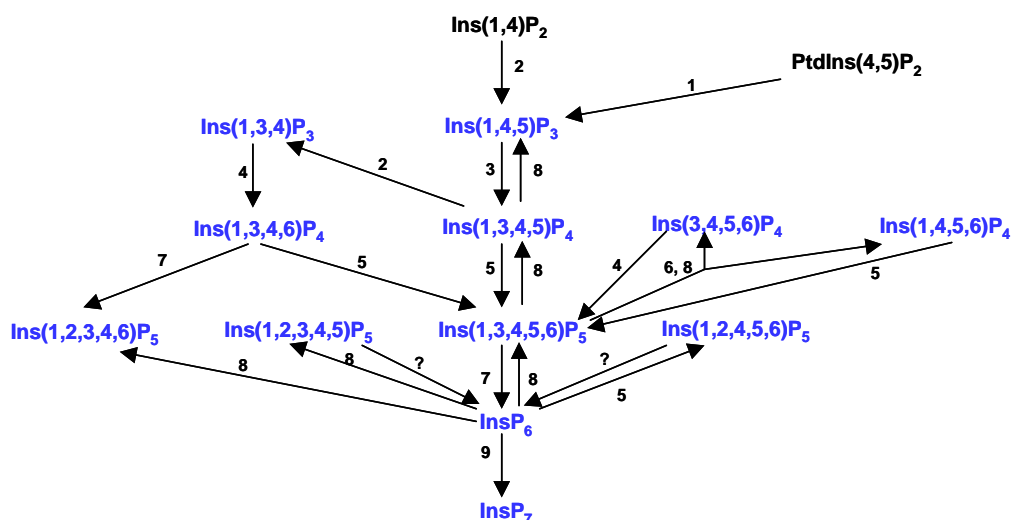
**Abb. 3.2-1: Zeitabhängige Veränderungen der InsP Konzentrationen.** Die Gehirne von 4 Wistar-Ratten wurden perfusionsfixiert bei 4 °C und in der Fixierungslösung für 1,5 h, 3 h, 8 h, 24 h, 3 und 7 Tage inkubiert. Die Konzentrationen von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (A), InsP<sub>6</sub> (B), Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (C) und Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (D) nahmen mit der Zeit kontinuierlich ab. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM. (nb) nicht bestimmt.

Die InsP Konzentrationen unterliegen also einer zeitabhängigen Abnahme, damit ist das Zeitfenster für Dissektionen klar limitiert, und es wurde für die folgenden Studien auf maximal 1,5 h gesetzt.

### 3.3 Effekte von erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad auf die InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte

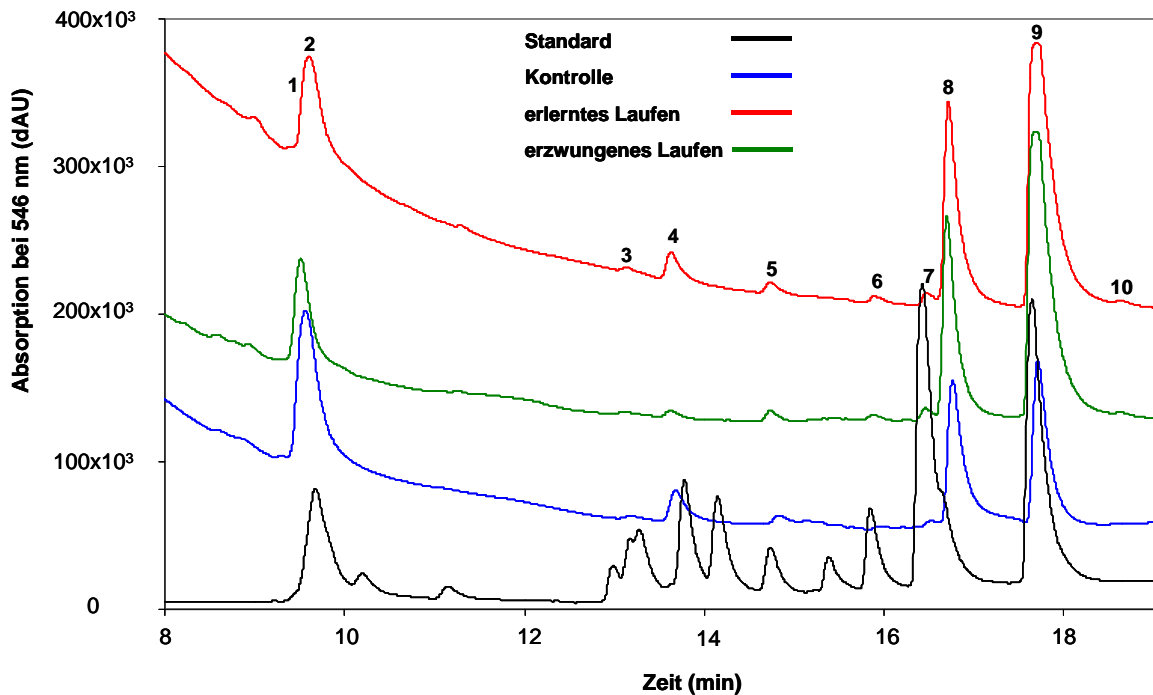
Es sollte nun untersucht werden, wie sich die Konzentrationen der analysierten InsP Isomere in den einzelnen Gehirnregionen des Gesamtgehirns in Bezug auf physische Aktivität und Stress verändern. Die für diese Versuche verwendeten Tiere, wurden in 3 Gruppen eingeteilt (Kontrollgruppe, erlerntes Laufen und erzwungenes Laufen). Die Tiere der Kontrollgruppe (n = 6) wurden keiner physischen und psychischen Komponente sowie Stress durch experimentelle Manipulationen ausgesetzt (2.2.2.2.1). Dagegen standen beim erlernten Laufen (n = 6) die physische Aktivität sowie Lern- und Gedächtnisprozesse im Vordergrund (2.2.2.2.2). Das einmalig erzwungene Laufen (n = 6) diente als Modell für einen kombinierten akuten physischen und psychischen Stressor (2.2.2.2.3). Hierzu wurden die Tiere gezwungen, zu laufen.

In den einzelnen Gehirnregionen und Nuklei wurden sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach erlerntem und erzwungenem Laufen nachfolgende InsP Isomere detektiert: Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, InsP<sub>6</sub> und InsP<sub>7</sub> (Abb. 3.3-1).



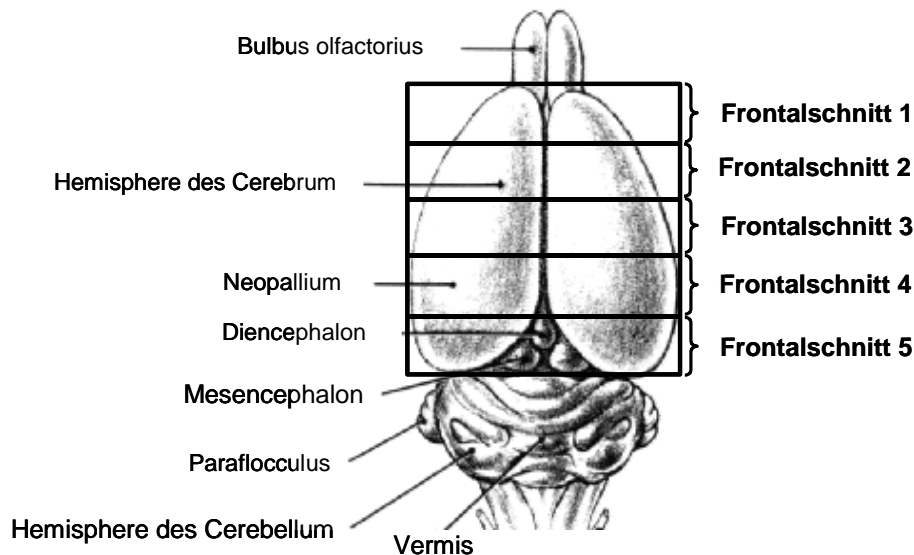
**Abb. 3.3-1: Ausschnitt aus dem InsP Metabolismus in tierischen Zellen.** Dargestellt sind die Konversionswege der Inositolphosphate in tierischen Zellen. Die InsP Isomere, die in den Untersuchungen nachgewiesen wurden, sind blau markiert. Die Zahlen bezeichnen die Enzyme, welche die Syntheseschritte katalysieren: 1. PLC, 2. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase, 3. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase, 4. Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-5/6-Kinase/Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>-1-Kinase, 5. IPMK, 6. InsP<sub>5</sub>-Phosphatase, 7. Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase, 8. MIPP, 9. InsP<sub>6</sub> Kinase. Verändert nach [Irvine & Schell, 2001; Shears, 2004; Yu *et al.*, 2003].

Ein typisches Micro-MDD-HPLC Chromatogramm am Beispiel des Bulbus olfactorius ist in Abb. 3.3-2 dargestellt. Im Bulbus olfactorius wurden nachfolgende InsP Isomere gemessen: Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> (Peak 1), Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Peak 2), Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> (Peak 3), Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Peak 4), Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> (Peak 5), Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (Peak 6), Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (Peak 7), Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (Peak 8), InsP<sub>6</sub> (Peak 9) und InsP<sub>7</sub> (Peak 10).



**Abb. 3.3-2: Micro-MDD-HPLC Chromatogramm im Bulbus olfactorius.** Dargestellt sind die InsP Isomere im Bulbus olfactorius, die Proben stammen aus dem 3 Versuch und hatten ähnliche Gewichte (Kontrollgruppe = 157,3 mg, erlerntes Laufen = 167,1 mg und erzwungenes Laufen = 170,9 mg). Die einzelnen InsP Isomere wurden durch Vergleich mit einem InsP<sub>x</sub>-Standard identifiziert. Die Standard InsP Isomere in der Reihenfolge ihrer Elution: 1 = Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>, 2 = Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, 3 = Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, 4 = Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, 5 = Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, 6 = Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, 7 = Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, 8 = Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, 9 = InsP<sub>6</sub>, 10 = InsP<sub>7</sub>.

Um die Modifikationen der InsP Konzentrationen in den verschiedenen ZNS Regionen infolge von erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad besser zu charakterisieren, wurden 2-dimensionale biochemische Tomogramme erstellt. Bei der Präparation wurde das Gehirn in 5 Frontalschnitte (0,4 mm Dicke) zerlegt (Abb. 3.3-3) und anschließend in definierte Gehirnregionen und Nuklei segmentiert (Tab. 2.2.2.2.1-1). Für die Anfertigung der biochemischen Tomogramme wurden diese Frontalschnitte einschließlich der dissezierten Regionen rekonstruiert und die Konzentrationen der InsP Isomere über eine Falsch-Farben-Skala dargestellt.



**Abb. 3.3-3: Darstellung der Frontalschnitte im Gehirn der Ratte.**

### 3.3.1 Veränderungen der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

Das  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  entsteht bei der Hydrolyse des Membranphospholipids  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , die Reaktion wird durch  $\text{PLC-}\beta_1$  katalysiert [Berridge, 1993] (Abb. 3.3-1). Eine Übersicht über die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen zeigt Abb. 3.3.1-1. Die mittlere  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration betrug in der Kontrollgruppe  $10,12 \pm 0,34$  nmol/g Fg und war nach erlerntem ( $9,56 \pm 0,40$  nmol/g Fg) und erzwungenem Laufen im Laufrad ( $8,97 \pm 0,39$  nmol/g Fg) reduziert.

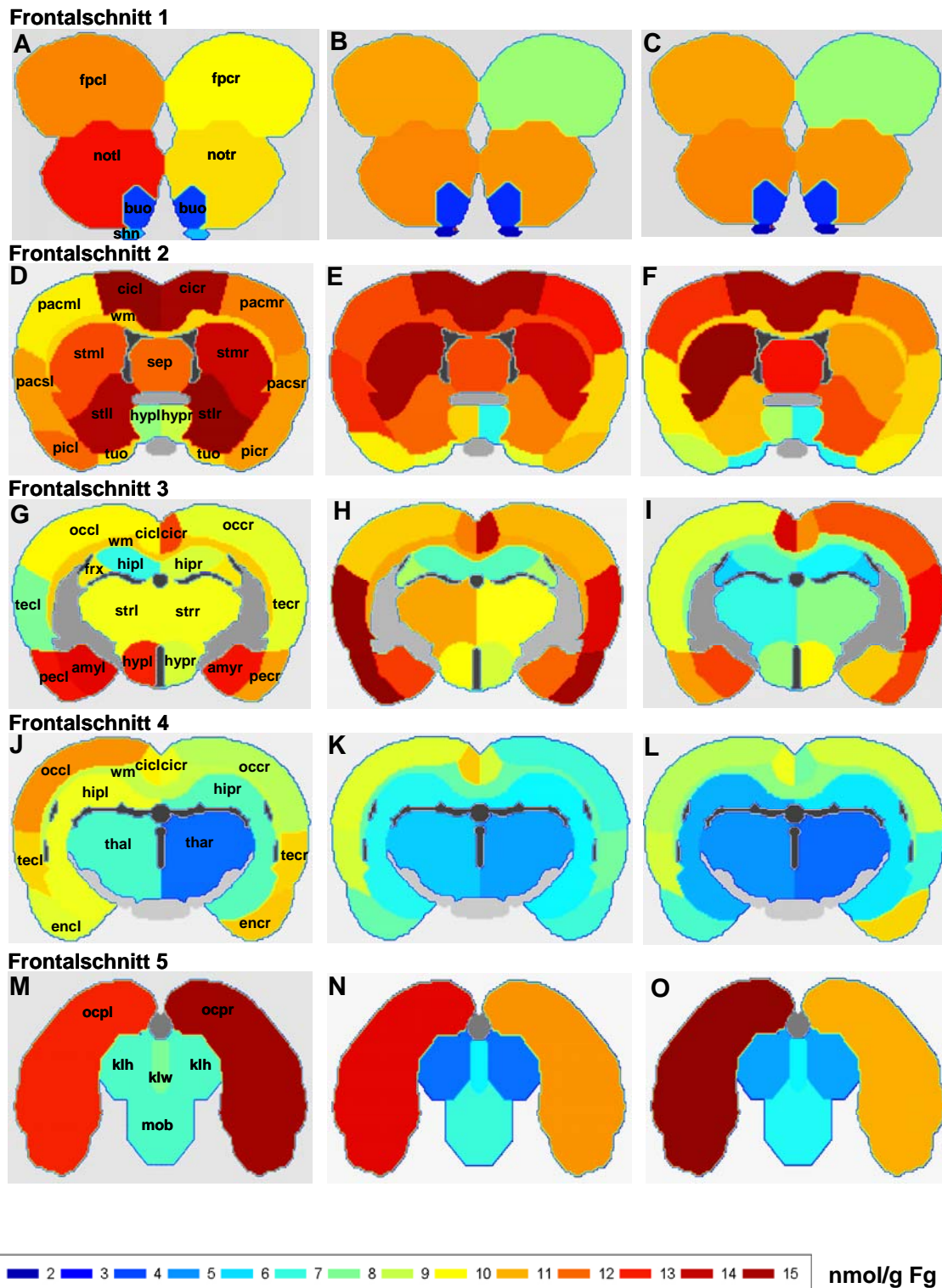
In den Gehirnregionen der Kontrollgruppe lagen die Normal-  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen zwischen 3,75 und 16,28 nmol/g Fg. Die höchsten Konzentrationen wurden im linken Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notl) ( $13,16$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.1-1A), im rechten cingulären Kortex (cicr) ( $16,12$  nmol/g Fg) und im rechten lateralen Striatum (stlr) ( $14,52$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.1-1D) sowie im linken okzipital Pol (ocpl) ( $16,28$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.1-1M) gefunden. Dagegen wiesen der rechte Thalamus (thar) ( $3,75$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.1-1J), die Kleinhirnhemisphären (klh) ( $4,90$  nmol/g Fg) und die Medulla oblongata (mob) ( $5,06$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.1-1M) niedrige  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen auf. Somit sind die hohen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegel fast ausschließlich in weit frontal bzw. okzipital liegenden Gehirnregionen zu finden. Gleichzeitig konnte ein deutlicher links/rechts Unterschied in der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration festgestellt werden. Dieser zeigte sich besonders im frontopolaren Kortex (fpcl/fpcr) und im Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notl/notr) (Abb. 3.3.1-1A), in der motorischen Region des parietalen Kortex (pacml/pacmr) (Abb. 3.3.1-1D) sowie im okzipitalen (occl/occr) und cingulären Kortex (cicl/cicr) (Abb. 3.3.1-1G und J).



Nach erlerntem Laufen zeigte sich ein verändertes Muster der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Verteilung (Normal-Konzentrationen zwischen 3,45 und 17,0 nmol/g Fg). Die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 (Abb. 3.3.1-1B) und des Frontalschnitts 4 (Abb. 3.3.1-1K) nahmen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe nach erlerntem Laufen ab, während in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 (Abb. 3.3.1-1H) ein  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Anstieg beobachtet wurde. Dagegen waren die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegel in den meisten Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.1-1E) und des Frontalschnitts 5 (Abb. 3.3.1-1N) unverändert, verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine Ausnahme bildete der parietale Kortex (pacm/pacs), der eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationszunahme aufwies (Abb. 3.3.1-1E). Der in der Kontrollgruppe gefundene links/rechts Unterschied im  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegel war nach erlerntem Laufen weniger stark ausgeprägt und konnte nur noch im frontopolen Kortex (fpcl/fpcr) und im Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notl/notr) (Abb. 3.3.1-1B), im Hypothalamus (hypl/hypr) (Abb. 3.3.1-1E) sowie im cingulären Kortex (cicl/cicr) (Abb. 3.3.1-1K) deutlich erfasst werden.

Nach erzwungenem Laufen im Laufrad wurde wie nach erlerntem Laufen eine ähnliche Veränderung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration festgestellt. Die Gehirnregionen der Frontalschnitte 1 (Abb. 3.3.1-1C) und 4 (Abb. 3.3.1-1L) zeigten eine Abnahme des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegels, dagegen waren die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen in den Gehirnregionen der Frontalschnitte 2 (Abb. 3.3.1-1F) und 5 (Abb. 3.3.1-1O) ähnlich hoch wie in den Kontrollgruppen. Wobei der parietale Kortex (pacm/pacs) im Frontalschnitt 2 eine Zunahme des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegels zeigte (Abb. 3.3.1-1F). Die Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 (Abb. 3.3.1-1I) bildeten eine Ausnahme, hier führte erzwungenes Laufen im Laufrad zu einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Zunahme in allen Kortexarealen auf der rechten Seite, während die anderen Gehirnregionen eine geringfügige Abnahme der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration aufwiesen. Die Bestimmung der Normal-Konzentrationen ergab einen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegel zwischen 4,0 und 17,03 nmol/g Fg. Der gefundene links/rechts Unterschied war nach erzwungenem Laufen deutlicher ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Auffällige Hemisphärenunterschiede wurden in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 (Abb. 3.3.1-1C), sowie im okzipitalen (occl/occr) (Abb. 3.3.1-1I), temporalen (tecl/tecr) (Abb. 3.3.1-1I) und entorhinalen Kortex (encl/encr) (Abb. 3.3.1-1L) nachgewiesen.

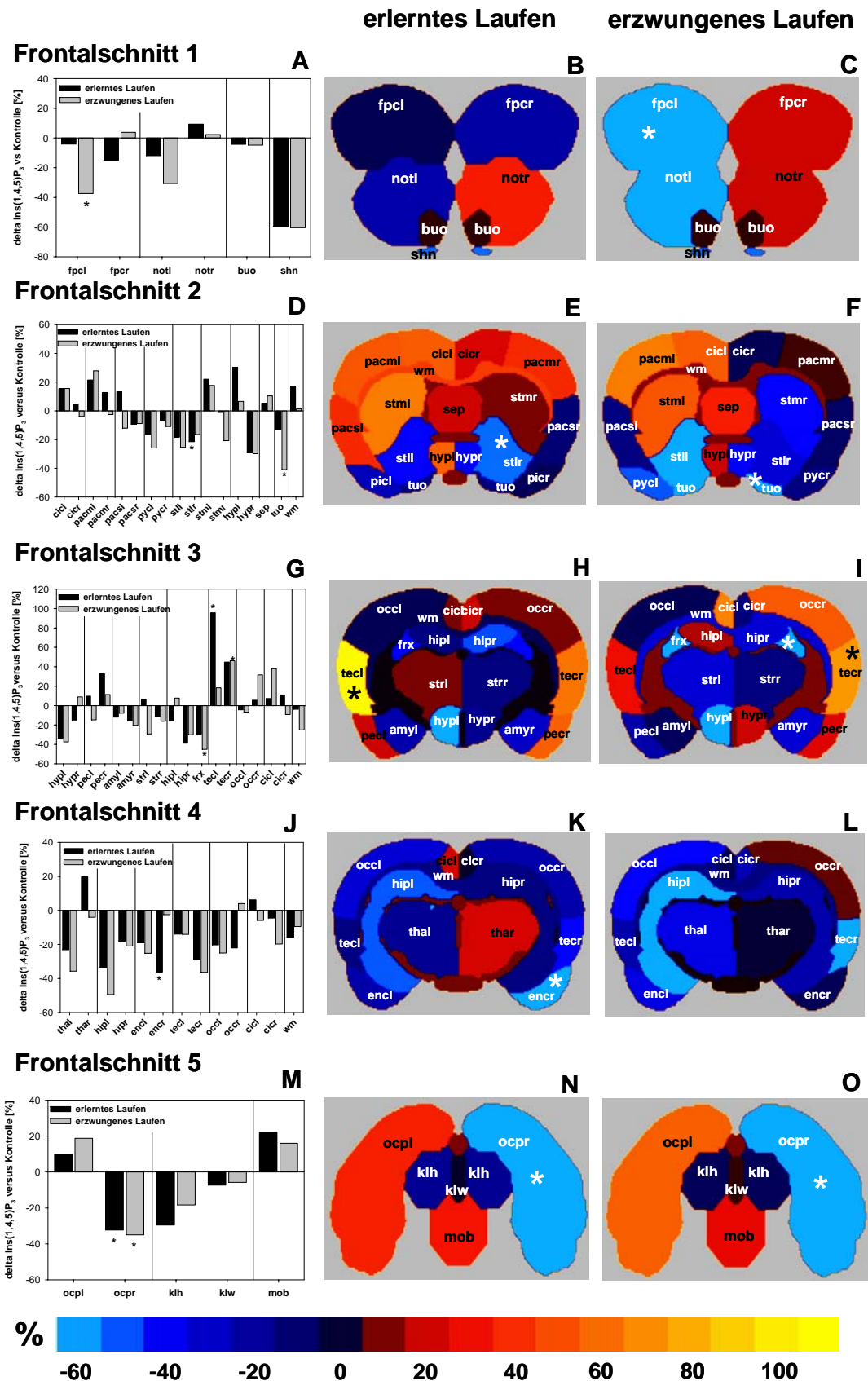
Um die Veränderungen der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen nach erlernter und erzwungener körperlicher Aktivität im Laufrad deutlich zu machen, wurden die Unterschiede zwischen erlerntem bzw. erzwungenem Laufen im Laufrad und der Kontrollgruppe ermittelt und in Differenztomogrammen dargestellt. Eine Übersicht über die delta Veränderungen der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration ist in Abb. 3.3.1-2 gezeigt.



**Abb. 3.3.1-1:** Verteilung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte. Dargestellt sind die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt. Die Ventrikel sind schwarz markiert und die grauen Regionen sind nicht präparierte Areale.

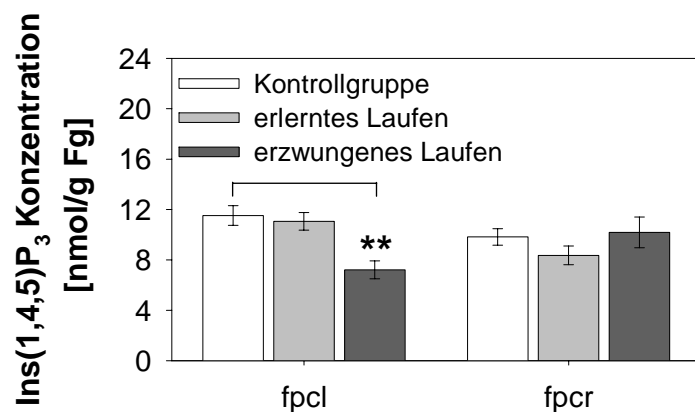
Bezeichnung	Region und Nuklei
amyl	Amygdala links
amyr	Amygdala rechts
buo	Bulbus olfactorius
brm	Brücke bis Mittelhirn
cicl	cingulärer Kortex links
cicr	cingulärer Kortex rechts
encl	entorhinaler Kortex links
encr	entorhinaler Kortex rechts
fpcl	frontopolarer Kortex links
fpcr	frontopolarer Kortex rechts
frx	Fornix
hipl	Hippocampus links
hipr	Hippocampus rechts
hypl	Hypothalamus links
hypr	Hypothalamus rechts
klh	Kleinhirnhemisphären
klw	Kleinhirnwurm
mih	Mittelhirn
mob	Medulla oblongata
notl	Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium links
notr	Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium rechts
occl	okzipitaler Kortex links
occr	okzipitaler Kortex rechts
ocpl	okzipital Pol links
ocpr	okzipital Pol rechts
pacml	parietaler Kortex, motorisch links
pacmr	parietaler Kortex, motorisch rechts
pacsl	parietaler Kortex, somatosensorisch links
pacsr	parietaler Kortex, somatosensorisch rechts
pecl	piriformer mit entorhinalem Kortex links
pecr	piriformer mit entorhinalem Kortex rechts
picl	piriformer Kortex links
picr	piriformer Kortex rechts
shn	Sehnerven
sep	Septum
stll	Striatum, lateral links
stlr	Striatum, lateral rechts
stml	Striatum, medial links
stmr	Striatum, medial rechts
strl	Striatum links
strr	Striatum rechts
tecl	temporaler Kortex links
tecr	temporaler Kortex rechts
thal	Thalamus links
thar	Thalamus rechts
tuo	Tuberculum olfactorium
wm	weiße Substanz

Tab. 3.3.1-1: Bezeichnung der Gehirnregionen und Nuklei.



**Abb. 3.3.1-2: Delta Veränderung der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.** Gezeigt sind die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Spiegel im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Signifikante Erhöhungen und Erniedrigungen weisen einen Stern (\*) auf. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.

Elerntes Laufen im Laufrad führte im frontopolaren Kortex (fpcl/fpcr) und im Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notl/notr) zu geringfügigen Veränderungen der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration (Abb. 3.3.1-2A und B). Nach erzwungenem Laufen im Laufrad konnte dagegen eine deutliche Abnahme der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration im linken frontopolaren Kortex (fpcl) und im linken Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notl) festgestellt werden (Abb. 3.3.1-2A und C). Eine signifikante Reduktion wurde aber nur im linken frontopolaren Kortex (fpcl) beobachtet (Abb. 3.3.1-3). Gleichzeitig wiesen die Sehnerven (shn) eine starke, allerdings nicht signifikante Verminderung des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegels unter beiden Bedingungen auf.

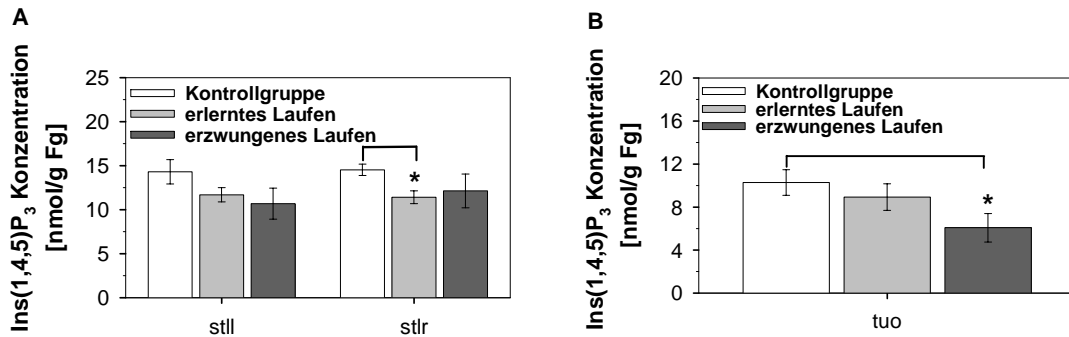


**Abb. 3.3.1-3:  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration im frontopolaren Kortex.** Gezeigt sind die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen im linken (fpcl) und rechten frontopolaren Kortex (fpcr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*\* $p < 0,005$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

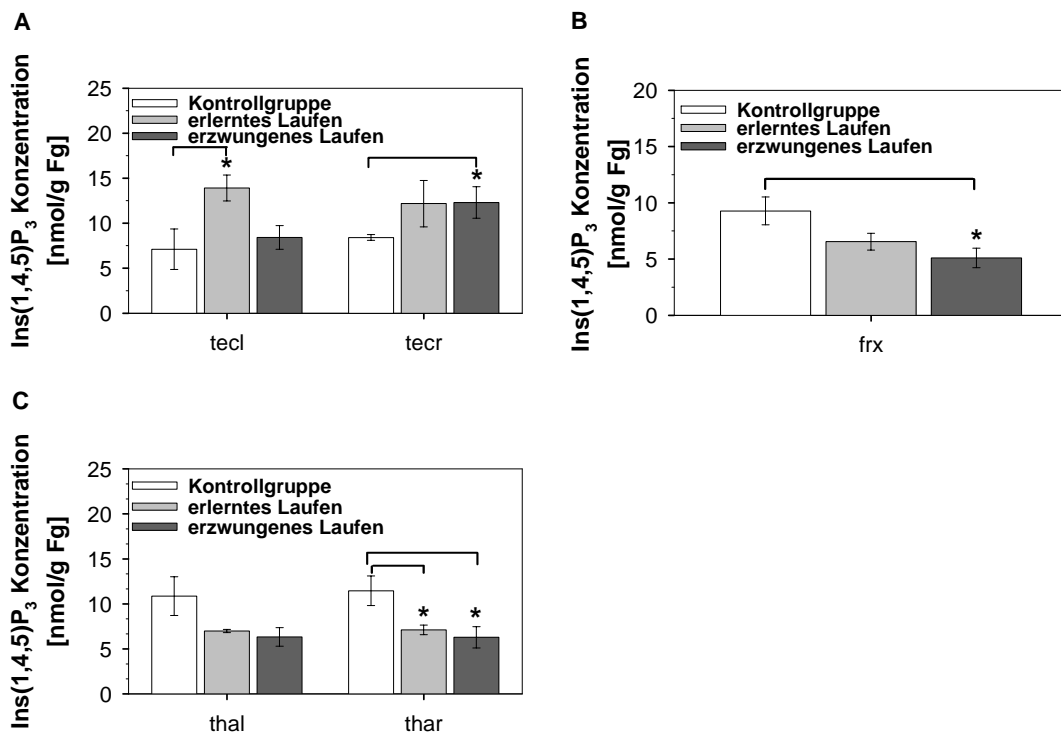
Alle Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 zeigten im Gegensatz zu Frontalschnitt 1 stärkere Veränderungen der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad (Abb. 3.3.1-2D). Allerdings konnte eine signifikante Erniedrigung des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegels ( $p < 0,05$ ) nur im rechten lateralen Striatum (stlr) nach erlerntem Laufen (Abb. 3.3.1-2E und 3.3.1-4A) und im Tuberculum olfactorium (tuo) nach erzwungenem Laufen (Abb. 3.3.1-2F und 3.3.1-4B) nachgewiesen werden.

Die Induktion der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationsveränderung nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad konnte auch in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 bestätigt werden (Abb. 3.3.1-2G). Die Modifikationen waren besonders im Hypothalamus (hypl/hypr), Hippocampus (hipl/hipr) und allen Kortexregionen erkennbar (Abb. 3.3.1-2G). Nach erlerntem Laufen konnte eine signifikante Erhöhung des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegels ( $p < 0,05$ ) im linken temporalen Kortex (tecl) (Abb. 3.3.1-2H und 3.3.1-5A) und eine signifikante Erniedrigung im rechten Thalamus (thar) (Abb. 3.3.1-5C) nachgewiesen werden. Zudem wurde nach erzwungenem Laufen eine signifikante

Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Zunahme ( $p < 0,05$ ) im rechten temporalen Kortex (tecr) (Abb. 3.3.1-2I und 3.3.1-5A) und eine Konzentrationsabnahme ( $p < 0,05$ ) im Fornix (frx) (Abb. 3.3.1-2I und Abb. 3.3.1-5B) sowie im rechten Thalamus (thar) (Abb. 3.3.1-5C) festgestellt.

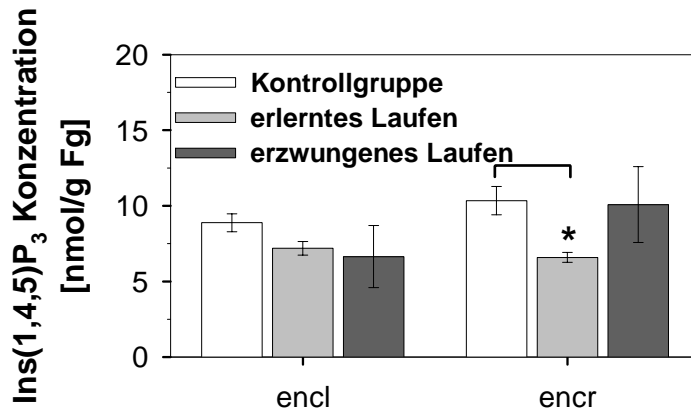


**Abb. 3.3.1-4: Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentrationen im lateralen Striatum und im Tuberculum olfactorium.** Gezeigt sind die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentrationen im linken (stll) und rechten lateralen Striatum (stlr) (A) sowie im Tuberculum olfactorium (tuo) (B) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.



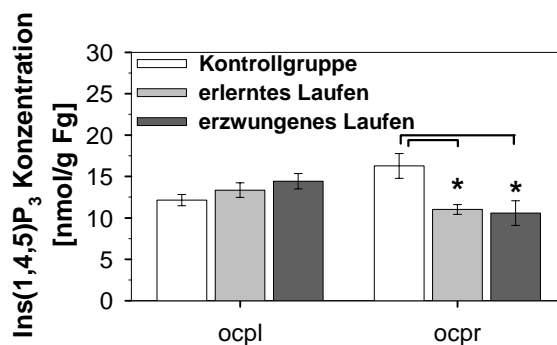
**Abb. 3.3.1-5: Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration im temporalen Kortex, im Fornix und im Thalamus.** Gezeigt sind die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentrationen im linken (tecl) und rechten temporalen Kortex (tecr) (A), im Fornix (frx) (B) sowie im linken (thal) und rechten Thalamus (thar) (C) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Gezeigt sind die Mittelwerte ( $n \geq 5$ )  $\pm$  SEM.

Beide Bedingungen verursachten eine Abnahme der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration in allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 4, nur der rechte Thalamus (thar) und okzipitale Kortex (occr) sowie der linke cinguläre Kortex (cicl) zeigten eine Zunahme (Abb. 3.3.1-2J). Signifikant war die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Reduktion ( $p < 0,05$ ) nur im rechten entorhinalen Kortex (encl) (Abb. 3.3.1-2K und 3.3.1-6).



**Abb. 3.3.1-6:  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration im entorhinalen Kortex.** Gezeigt sind die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen im linken (encl) und rechten entorhinalen Kortex (encr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

Die Messung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration im Frontalschnitt 5 (Abb. 3.3.1-2M) ergab, dass der linke okzipital Pol (ocpl) sowohl nach erlerntem (Abb. 3.3.1-3N) als auch nach erzwungenem Laufen (Abb. 3.3.1-3O) eine leichte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Erhöhung ( $\approx 15\%$ ) aufwies, während der rechte okzipital Pol (ocpr) eine signifikante Verminderung ( $p < 0,05$ ) zeigte (Abb. 3.3.1-2M und 3.3.1-7). Die Kleinhirnregionen wiesen eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Abnahme auf nach erlernter und erzwungener körperlicher Aktivität im Laufrad, während die Medulla oblongata (mob) eine Zunahme zeigte, wobei die Stärke der Veränderung variierte.



**Abb. 3.3.1-7:  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration im okzipital Pol.** Dargestellt sind die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Spiegel im linken (ocpl) und rechten okzipital Pol (ocpr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Gezeigt sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

### 3.3.2 Veränderungen der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> wird bei der Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase gebildet [Nalaskowski & Mayr, 2004; Xia & Yang, 2005] (Abb. 3.3-1). Die mittlere Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration betrug bei der Kontrollgruppe  $1,37 \pm 0,08$  nmol/g Fg und war nach erlerntem Laufen in Laufrad leicht erhöht ( $1,43 \pm 0,08$  nmol/g Fg) und nach erzwungenem Laufen im Laufrad vermindert ( $1,32 \pm 0,08$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1).

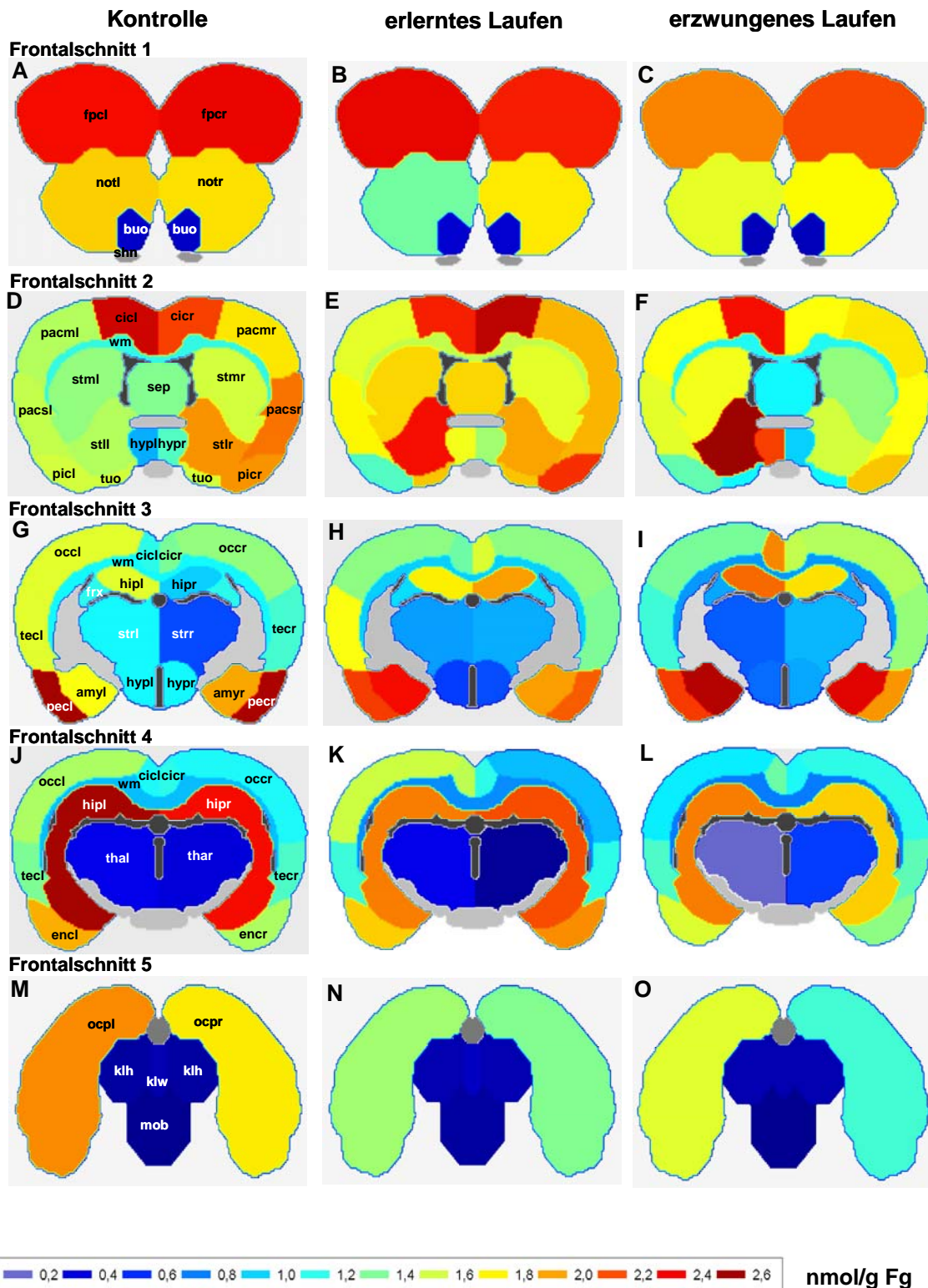
In den Gehirnregionen der Kontrollgruppe lagen die Normal- Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationen zwischen 0,10 und 2,66 nmol/g Fg. Hohe Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegel wurden im Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (not) ( $2,27$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1A), im cingulären Kortex (cic) ( $2,26$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1D), im piriformen mit entorhinalen Kortex (pec) ( $2,57$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1G) und im Hippocampus (hip) ( $2,51$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1J) gemessen. Hingegen zeigten das Striatum (str) ( $0,63$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1G), der Thalamus (tha) ( $0,39$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1J), das Kleinhirn ( $0,17$  nmol/g Fg) und die Medulla oblongata (mob) ( $0,10$  nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1M) niedrige Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationen. Die Hemisphärenasymmetrie war besonders im parietalen (pacm/pacs) (Abb. 3.3.2-1D) und entorhinalen Kortex (enc) (Abb. 3.3.2-1J) deutlich.

Erlerntes Laufen im Laufrad induzierte eine Veränderung des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegels (Konzentrationsbereich zwischen  $0,13$  und  $2,40$  nmol/g Fg). Nahezu alle Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.2-1E) zeigten eine Zunahme der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration. Gleiches konnte auch für den Hippocampus (hip) und die Amygdala (amy) des Frontalschnitts 3 (Abb. 3.3.2-1H) sowie für den entorhinalen Kortex (enc) des Frontalschnitts 4 (Abb. 3.3.2-1K) beobachtet werden. Demgegenüber waren die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegel in den anderen Gehirnregionen unverändert, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Hemisphärenasymmetrie konnte nur im piriformen Kortex (picl/picr) (Abb. 3.3.2-1E) bestätigt werden.

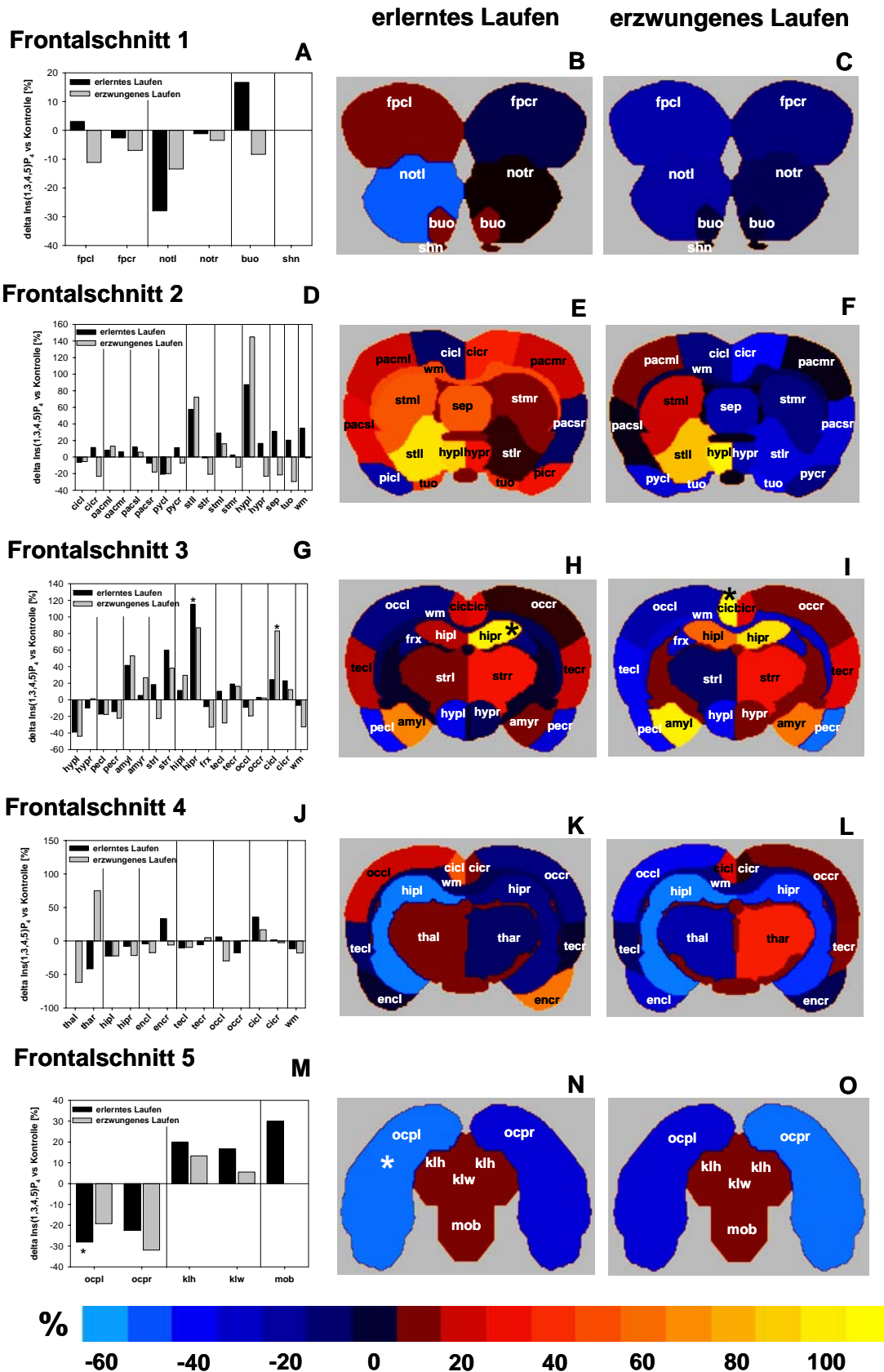
Der Effekt des erzwungenen Laufen im Laufrad auf die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration im Gehirn der Ratte war deutlicher ausgeprägt. Die Gehirnregionen der Frontalschnitte 1 (Abb. 3.3.2-1C), 4 (Abb. 3.3.2-1L) und 5 (Abb. 3.3.1-1O) zeigten eine Abnahme des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegels. In den Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.2-1F) und 3 (Abb. 3.3.2-1I) waren die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegel ähnlich hoch wie in den Kontrollgruppen. Ein Ausnahme bildete das linke Striatum (stll) (Abb. 3.3.2-1F) und der Hippocampus (hip) (Abb. 3.3.2-1I), die eine Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationszunahme zeigten. Der gefundene Hemisphärenunterschied war im cingulären Kortex (cicl/cicr) (Abb. 3.3.2-1F-L) und im Striatum (stll/stlr) (Abb. 3.3.2-1F) besonders auffällig.



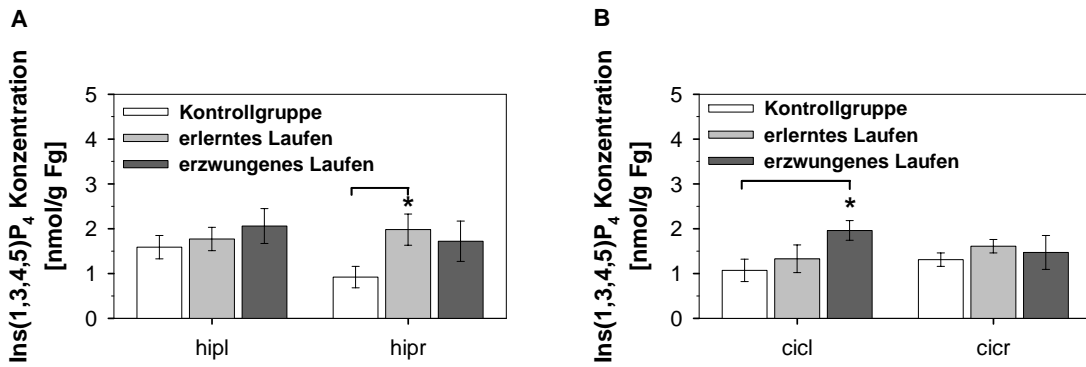
Die erstellten Differenztomogramme zeigen die Veränderung der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration nach erlernten und erzwungenen Laufen im Laufrad (Abb. 3.3.2-2). Die Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 wiesen nach beiden Einflüssen eine Erniedrigung des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegels auf (Abb. 3.3.2-1A-C). Nur der Bulbus olfactorius (buo) zeigte eine Erhöhung um etwa 15 % (Abb. 3.3.2-1A). Erlerntes Laufen im Laufrad bewirkte eine Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationszunahme in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.2-2 D und E), welche besonders in der linken Hemisphäre sehr deutlich war. Dagegen verursachte erzwungenes Laufen im Laufrad in den meisten Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 eine Abnahme des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegels (Abb. 3.3.2-2D und F). Eine Ausnahme bildeten das linke Striatum (still) und der linke Hypothalamus (hypl), in denen eine ausgeprägte Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Erhöhung nachgewiesen wurde. In den Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 war eine deutliche Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationsveränderung auf bestimmte Gehirnareale beschränkt. Es zeigte sich eine Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Zunahme im cingulären Kortex (cicl/cicr), im Hippocampus (hipl/hipr), im Striatum (strl/attr), im temporalen Kortex (tecl/tecr) und in der Amygdala (amyl/amyr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad (Abb. 3.3.2-2 G–I). Diese war im rechten Hippocampus (hipr) nach erlerntem Laufen (Abb. 3.3.2-2H und 3.3.2-3A) und im linken cingulären Kortex (cicl) nach erzwungenem Laufen (Abb. 3.3.2-2I und 3.3.2-3B) signifikant ( $p < 0,05$ ). Erlerntes und erzwungenes Laufen im Laufrad hatten einen begrenzten Effekt auf die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 4 (Abb. 3.3.2-2J). So wurde eine deutliche Zunahme der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration im linken cingulären (cicl) und okzipitalen Kortex (occl) sowie im rechten entorhinalen Kortex (encl) gemessen und eine klare Abnahme in den übrigen Gehirnarealen nach erlerntem Laufen im Laufrad (Abb. 3.3.2-2K). Nach erzwungenem Laufen zeigte sich eine Steigerung des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegels im linken cingulären Kortex (cicl) und im rechten Thalamus (thar), dagegen wiesen die anderen Gehirnregionen dieses Frontalschnitts eine Reduktion auf (Abb. 3.3.2-2L). In den Gehirnregionen des Frontalschnitts 5 wurden unter beiden Bedingungen eine deutliche Abnahme der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration nachgewiesen (Abb. 3.3.2-2M), die im linken okzipital Pol (ocpl) nach erlernter körperlicher Aktivität im Laufrad signifikant ( $p < 0,05$ ) war (Abb. 3.3.2-2N und 3.3.2-4).



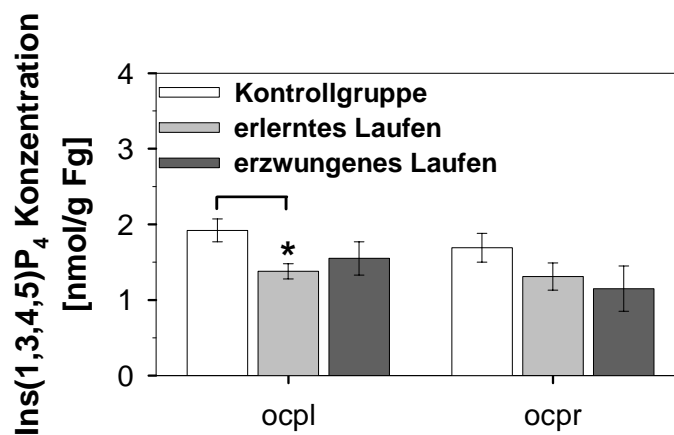
**Abb. 3.3.2-1: Verteilung von Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Dargestellt sind die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationen im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt. Die Ventrikel sind schwarz markiert und die grauen Regionen sind nicht präparierte Areale.



**Abb. 3.3.2-2: Delta Veränderung der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.** Gezeigt sind die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegel im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Signifikante Erhöhungen und Erniedrigungen weisen einen Stern (\*) auf. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.



**Abb. 3.3.2-3: Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration im Hippocampus und im cingulären Kortex.** Dargestellt sind die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationen im linken (hipl) und rechten Hippocampus (hipr) (A) sowie im linken (cicl) und rechten cingulären Kortex (cicr) (B) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*p < 0,05. Abgebildet sind die Mittelwerte (n ≥ 5) ± SEM.



**Abb. 3.3.2-4: Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration im okzipital Pol.** Gezeigt sind die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentrationen im linken (ocpl) und rechten okzipital Pol (ocpr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*p < 0,05. Abgebildet sind die Mittelwerte (n ≥ 4) ± SEM.

### 3.3.3 Veränderungen der Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

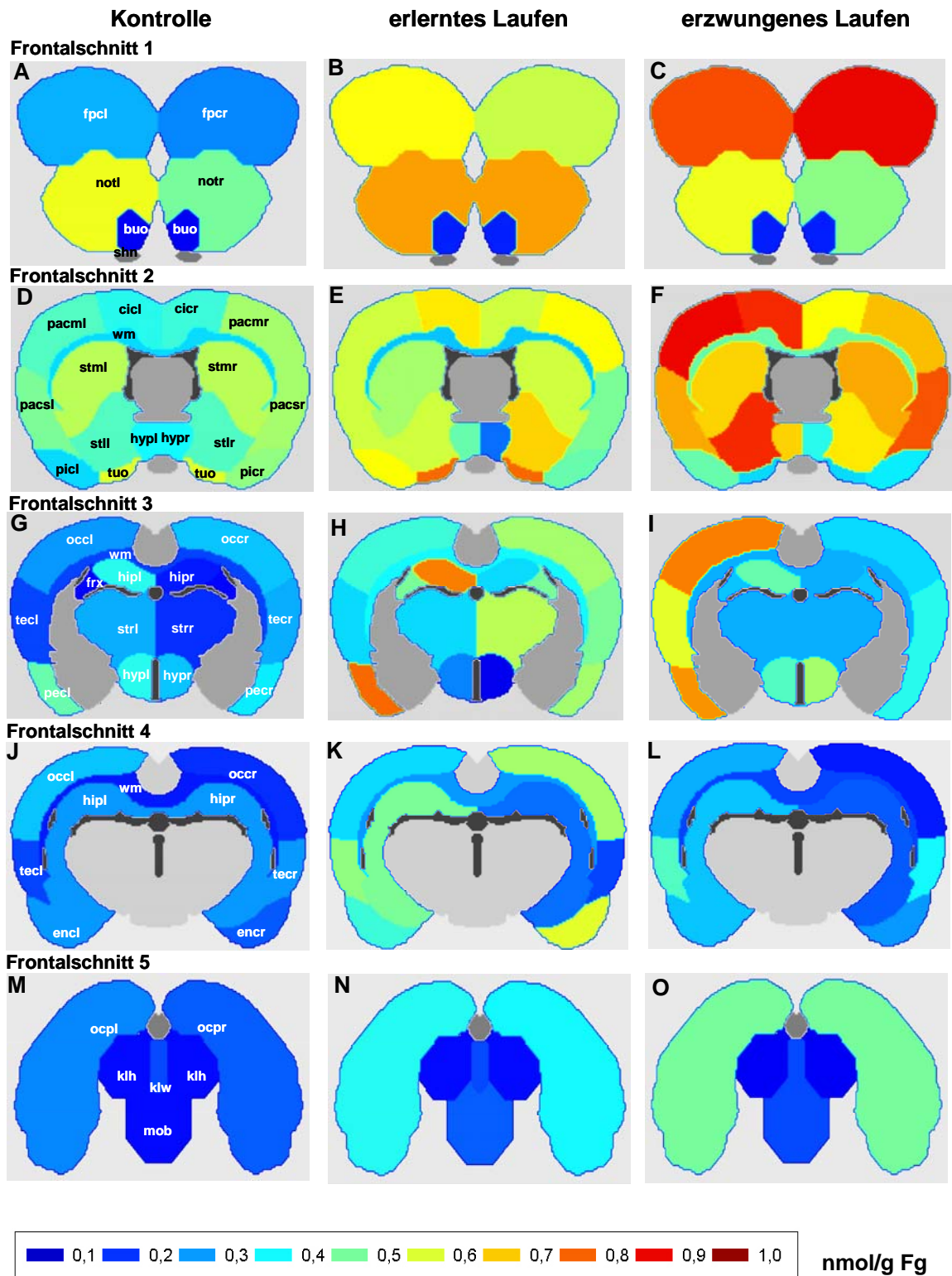
Das Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> entsteht durch Dephosphorylierung aus Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, wobei die Reaktion durch die 5-Phosphatase katalysiert wird [Majerus *et al.*, 1999] (Abb. 3.3-1). Der Mittelwert des Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Spiegels betrug bei der Kontrollgruppe  $0,35 \pm 0,02$  nmol/g Fg und war nach erlerntem ( $0,47 \pm 0,02$  nmol/g Fg) und erzwungenem Laufen im Laufrad ( $0,48 \pm 0,03$  nmol/g Fg) erhöht. Eine Zusammenfassung über die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentrationen in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen dokumentiert Abb. 3.3.3-1.

In der Kontrollgruppe zeigte sich, dass die weit frontal liegenden Gehirnregionen (Frontalschnitt 1 und 2) hohe  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentrationen aufwiesen (Abb. 3.3.3-1A und D). Im Gegensatz dazu wurden in den Gehirnregionen, die medial und okzipital liegen (Frontalschnitt 3 bis 5), deutlich verminderte  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentrationen gemessen, verglichen mit den frontal liegenden Gehirnregionen (Abb. 3.3.3-1G, J und M). Die Bestimmung der Normal-Konzentrationen ergab einen  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Spiegel zwischen 0,12 und 0,61 nmol/g Fg. Des Weiteren konnte kein deutlicher links/rechts Unterschied in der Kontrollgruppe festgestellt werden.

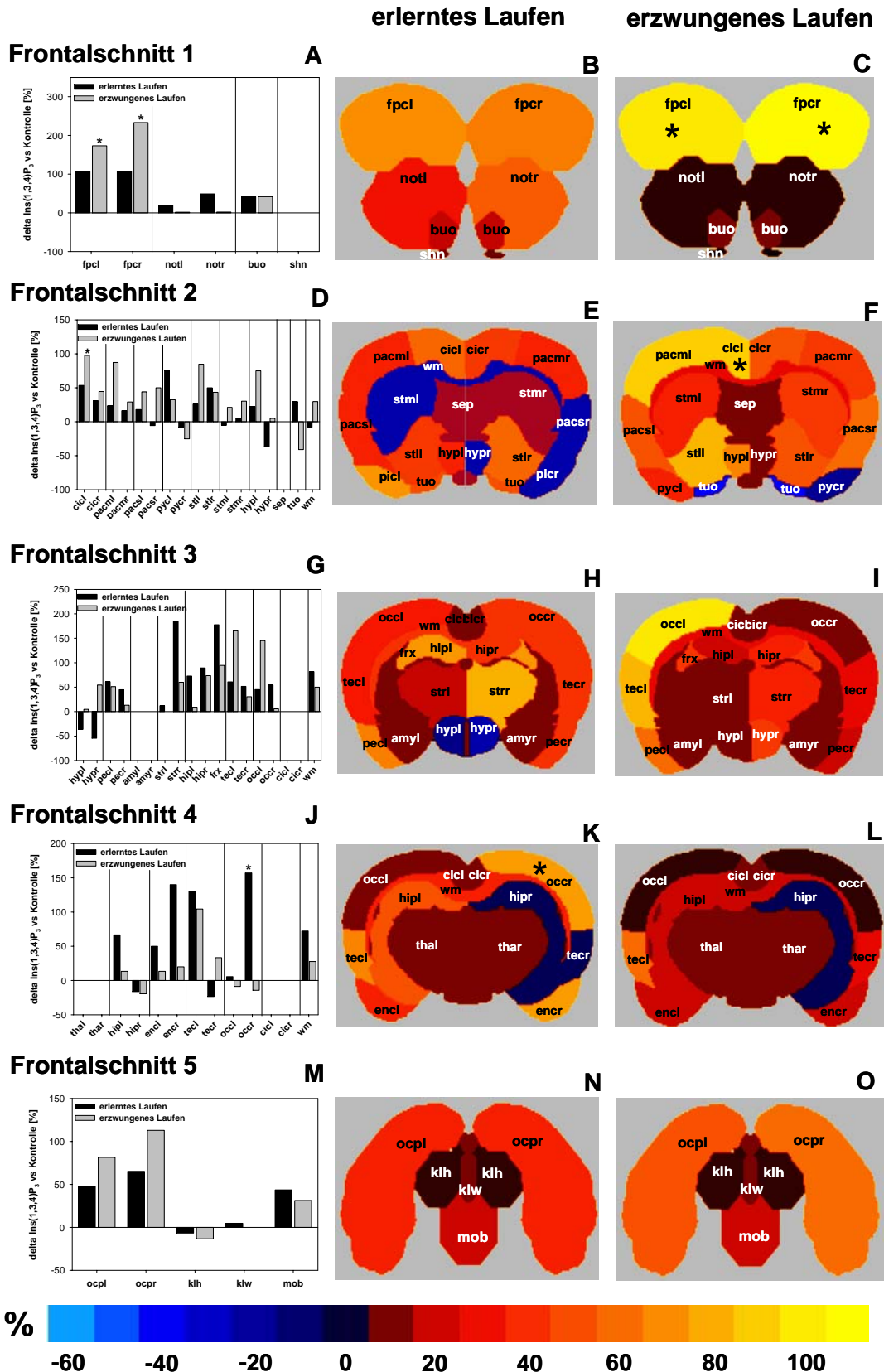
Erlernetes Laufen im Laufrad induzierte eine  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentrationsveränderung im Gehirn der Ratte (Konzentrationsbereich zwischen 0,14 und 0,79 nmol/g Fg). Alle Gehirnregionen zeigten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen gesteigerte  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Spiegel. Jedoch war die Zunahme in den frontal gelegenen Gehirnregionen (Frontalschnitt 1 und 2) am stärksten ausgebildet (Abb. 3.3.3-1B und E). Die höchsten  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentrationen wurden im Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (not) (0,73 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.2-1B), im Tuberculum olfactorium (tuo) (0,79 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.3-1E), im linken Hippocampus (hipl) (0,76 nmol/g Fg) und im linken piriformen mit entorhinalem Kortex (pecl) (0,79 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.3-1H) gemessen. Ein deutlicher links/rechts Unterschied konnte im Hypothalamus (hypl/hypr) (Abb. 3.3.3-1E), im Hippocampus (hipl/hipr) und im piriformen mit entorhinalem Kortex (pecl/pecr) (Abb. 3.3.3-1H) bestimmt werden.

Auch das erzwungene Laufen im Laufrad hatte einen direkten Einfluss auf den  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Spiegel im Gehirn der Ratte (Normalkonzentration zwischen 0,13 und 0,90 nmol/g Fg). Alle Gehirnregionen wiesen eine  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentrationszunahme auf, verglichen mit der Kontrollgruppe. Besonders deutlich war dies in den frontal liegenden Gehirnregionen (Frontalschnitt 1 und 2) zu sehen (Abb. 3.3.3-1C und F). Allerdings war die Stärke der Zunahme deutlich höher als nach erlerntem Laufen im Laufrad. Hohe  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Spiegel wurden im frontopolaren Kortex (fpc) (0,90 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.3-1C), im linken cingulären Kortex (cicl) (0,85 nmol/g Fg), im linken Striatum (stll) (0,85 nmol/g Fg) und in der linken motorischen Region des parietalen Kortex (pacml) (0,88 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.3-1F) nachgewiesen. Der gefundene links/rechts Unterschied war nach erzwungenem Laufen deutlicher ausgeprägt als nach erlerntem Laufen und in der Kontrollgruppe. Auffällige Hemisphärenunterschiede wurden im Hypothalamus (hypl/hypr) (Abb. 3.3.3-1F), im okzipitalen (occl/occr), temporalen (tecl/tecr) und piriformen mit entorhinalem Kortex (pecl/pecr) (Abb. 3.3.3-1I) bestimmt.

Die Differenztomogramme für die Veränderung des  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Spiegels im Gehirn der Ratte sind in Abb. 3.3.3-2 dargestellt.

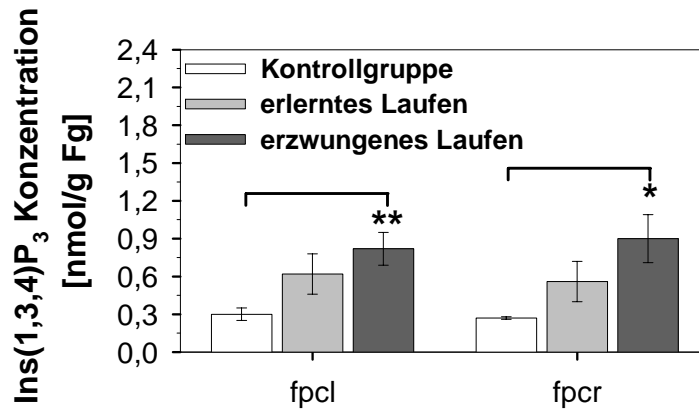


**Abb. 3.3.3-1: Verteilung von Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Dargestellt sind die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentrationen im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt. Die Ventrikel sind schwarz markiert und die grauen Regionen sind nicht präparierte Areale.



**Abb. 3.3.3-2: Delta Veränderung der Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.** Gezeigt sind die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Spiegel im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Signifikante Erhöhungen und Erniedrigungen weisen einen Stern (\*) auf. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.

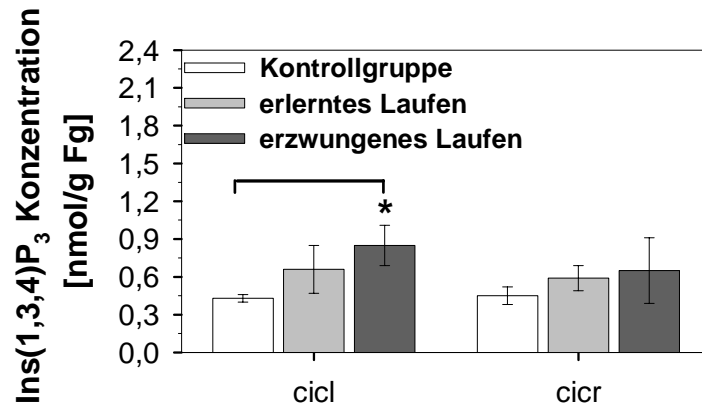
Während beide Bedingungen eine deutliche Zunahme der Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im frontopolen Kortex (fpc) verursachten (Abb. 3.3.3-2B und C), die außerdem nach erzwungenem Laufen im Laufrad signifikant war ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.3.3-3), änderte sich der Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Spiegel in den anderen Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 nur geringfügig (Abb. 3.3.3-2A).



**Abb. 3.3.3-3: Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im frontopolen Kortex.** Dargestellt ist die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im linken (fpcl) und rechten frontopolen Kortex (fpcr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*\* $p < 0,005$ ; \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 5$ )  $\pm$  SEM.

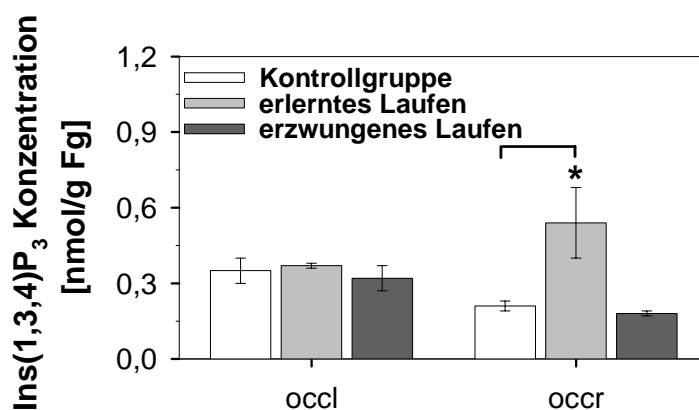
Im Frontalschnitt 2 verursachte erlerntes Laufen eine Zunahme der Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im cingulären Kortex (cicl/cicr), im parietalen Kortex (pacm/pacs), im linken piriformen Kortex (picl) und im lateralen Striatum (stll/stlr) (Abb. 3.3.3-2D und E). Nach erzwungenem Laufen konnte eine Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentrationserhöhung in den gleichen Gehirnregionen beobachtet werden (Abb. 3.3.3-2D und F), allerdings war diese stärker ausgeprägt als nach erlerntem Laufen. Zudem wurde im linken cingulären Kortex (cicl) eine signifikante Erhöhung des Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Spiegels ( $p < 0,05$ ) nach erzwungenem Laufen bestimmt (Abb. 3.3.3-4). Im Frontalschnitt 3 war die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration in allen Gehirnregionen nach erlernter Bewegung im Laufrad von bis zu 200 % gesteigert (Abb. 3.3.3-2G und H). Eine Ausnahme bildete der Hypothalamus (hypl/hypr), der eine Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Verminderung aufwies. Nach erzwungener körperlicher Aktivität im Laufrad wurde ebenfalls in allen Gehirnregionen eine Zunahme des Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Spiegels um bis zu 150 % beobachtet (Abb. 3.3.3-2G und I).





**Abb. 3.3.3-4: Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im cingulären Kortex.** Dargestellt ist die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im linken (cicl) und rechten cingulären Kortex (cicr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

Im Frontalschnitt 4 wurde nach erlerntem Laufen eine sehr deutliche Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentrationszunahme um bis zu ca. 150 % im linken Hippocampus (hipl), im entorhinalen Kortex (encl/encr), im linken temporalen (tecl) und im rechten okzipitalen Kortex (occr) ermittelt (Abb. 3.3.3-2J und K). Die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Erhöhung war im rechten okzipitalen Kortex (occr) signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.3.3-5). Erzwungenes Laufen bewirkte eine Konzentrationszunahme von Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> im linken Hippocampus (hipl), im entorhinalen (enc) und temporalen Kortex (tec) (Abb. 3.3.3-2J und L). Die Veränderung in den anderen Gehirnregionen war eher unbedeutend.



**Abb. 3.3.3-5: Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im okzipitalen Kortex.** Dargestellt ist die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im linken (occl) und rechten okzipitalen Kortex (occr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

In den okzipital Polen (ocp) (Frontalschnitt 5) wurden Steigerungen des Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Spiegels sowohl nach erlerntem als auch nach erzwungenem Laufen im Laufrad um bis zu 100 % beobachtet (Abb.3.3.3-2M-O). Dagegen hatten beide Bedingungen kaum Auswirkungen auf das Kleinhirn (klh/klw) und die Medulla oblongata (mob).

Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> wird durch die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-5/6-Kinase/InsP<sub>4</sub>-1-Kinase zum Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> umgesetzt [Abel *et al.*, 2001]. Das Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> Isomer konnte in den Versuchen für die Methodenentwicklung (siehe Abschnitt 3.1) nachgewiesen werden, allerdings lag es bei diesen Versuchen häufig unterhalb der Detektionsschwelle, weshalb seine Konzentrationen nicht systematisch dokumentiert und ausgewertet wurden.

### 3.3.4 Veränderungen der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

Das Isomer Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> kann sowohl aus Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> als auch aus Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> durch die IPMK gebildet werden [Irvine & Schell, 2001] (Abb. 3.3-1). Eine Übersicht über die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationen in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen zeigt Abb. 3.3.4-1. Die mittlere Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration betrug bei der Kontrollgruppe  $4,27 \pm 0,11$  nmol/g Fg. Erlerntes Laufen im Laufrad bewirkte eine Verminderung des mittleren Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegels ( $4,06 \pm 0,12$  nmol/g Fg) und erzwungenes Laufen im Laufrad eine Steigerung ( $4,41 \pm 0,13$  nmol/g Fg).

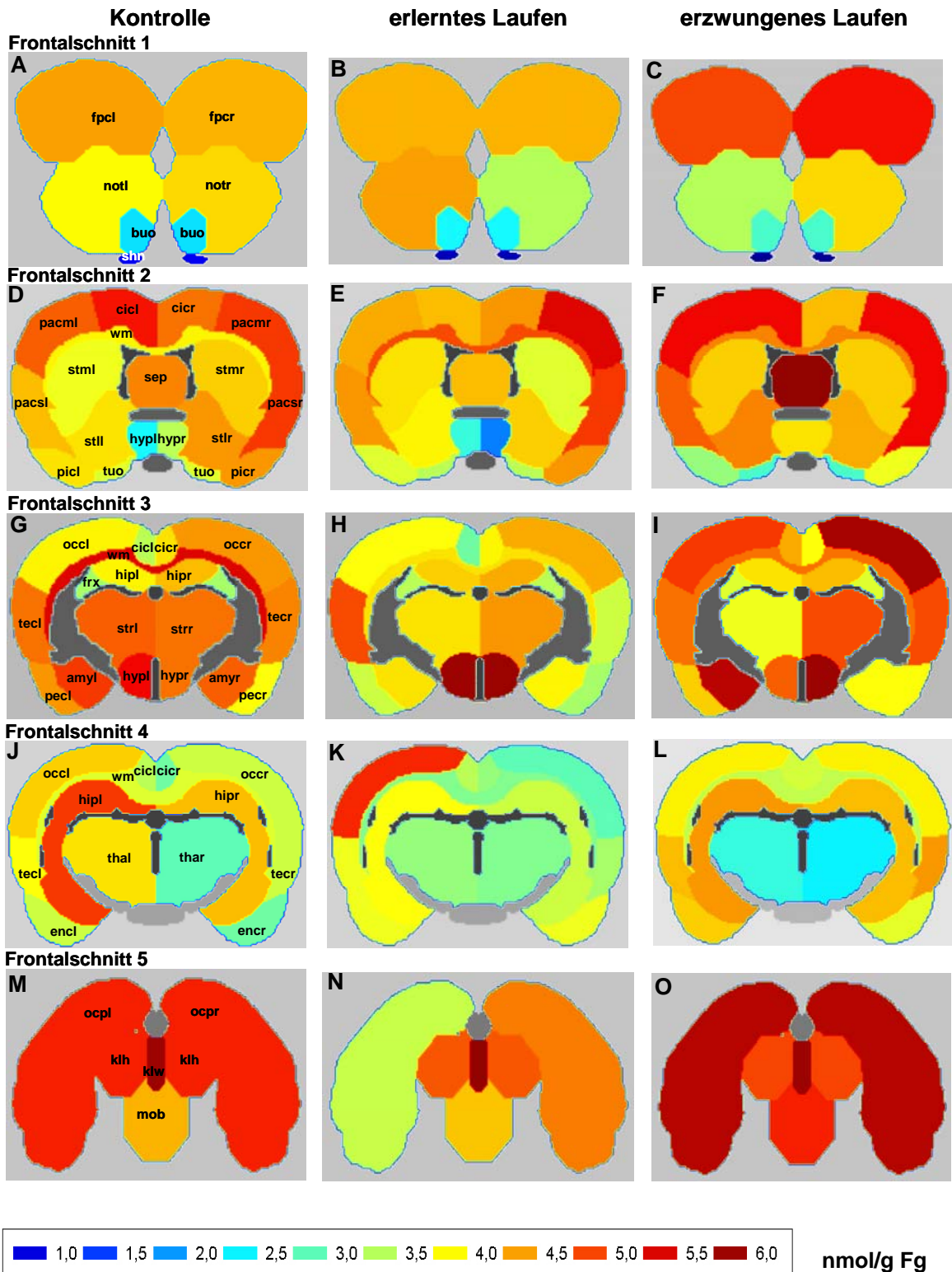
Das Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> der Kontrollgruppe lag bei fast allen Gehirnregionen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich (3,17 – 4,88 nmol/g Fg). Eine Ausnahme bildeten der parietale Kortex (pacm/pacs) (5,02 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.4-1D), der okzipital Pol (ocp) (5,08 nmol/g Fg) und das Kleinhirn (klh/klw) (5,80 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.4-1M), diese Regionen wiesen deutliche höhere Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegel auf, verglichen mit den anderen Gehirnregionen. Ein weiterer Sonderfall waren der Bulbus olfactorius (buo) (2,32 nmol/g Fg) und die Sehnerven (shn) (1,04 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.4-1A) sowie der linke Hypothalamus (hypl) (2,69 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.4-1D), diese Regionen zeigten im Vergleich zu den anderen Gehirnregionen eine Reduktion der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration. Deutliche Hemisphärenunterschiede konnten im piriformen Kortex (picl/picr), im Hypothalamus (hypl/hypr) (Abb. 3.3.4-1D), im okzipitalen (occl/occr) und temporalen Kortex (tecl/tecr) (Abb. 3.3.4-1J) beobachtet werden.

Die Veränderungen der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration induziert durch erlerntes Laufen im Laufrad fielen nicht so stark aus (Konzentrationsbereich zwischen 0,78 und 5,80 nmol/g Fg), verglichen mit der Kontrollgruppe. Allerdings zeigten Gehirnregionen wie die weiße Substanz (wm) (Abb. 3.3.4-1E), der Hypothalamus (hyp) (Abb. 3.3.4-1H) und der linke okzipitale Kortex (occl) (Abb. 3.3.4-1K) vergleichsweise größere Abweichungen im

Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegel als die anderen Gehirnareale. Auffällige links/rechts Unterschiede wurden im cingulären (cicl/cicr) (Abb. 3.3.4-1H), temporalen (tecl/tecr) (Abb. 3.3.4-1H) und okzipitalen Kortex (occl/occr) (Abb. 3.3.4-1K) gefunden.

Im Gegensatz zum erlernten Laufen verursachte erzwungenes Laufen im Laufrad eine stärkere Modifikation der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration. In den meisten Gehirnregionen verursachte dieser Stressor eine Erhöhung des Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegels. So wiesen der frontopolare Kortex (fpc) (Abb. 3.3.4-1C), der parietale Kortex (pacm/pacs) (Abb. 3.3.4-1F), das Septum (sep) (Abb. 3.3.4-1F), der Hypothalamus (hyp) (Abb. 3.3.4-1F), der okzipitale Kortex (occ) (Abb. 3.3.4-1I) und die okzipital Pole (ocp) (Abb. 3.3.4-1O) deutliche Konzentrationszunahmen auf. Die Bestimmung der Normal-Konzentrationen ergab einen Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegel zwischen 0,58 und 7,00 nmol/g Fg. Der links/rechts Unterschied war nach erzwungenem Laufen schwächer ausgebildet als nach erlerntem Laufen und in der Kontrollgruppe. Es gab keine besonders auffälligen Hemisphärenunterschiede in den einzelnen Gehirnregionen.

Das Differenztomogramm (Abb. 3.3.4-2) zeigt, dass erlerntes Laufen im Laufrad einen geringfügigen Einfluss auf die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 hatte (Abb. 3.3.4-2A). Nur die Sehnerven (shn) zeigten eine deutliche Erniedrigung (Abb. 3.3.4-2B). Im Unterschied dazu hatte erzwungenes Laufen im Laufrad größere Auswirkungen auf die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration (Abb. 3.3.4-2C). Es zeigte sich eine Zunahme des Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegels im frontopolen Kortex (fpc) und im Bulbus olfactorius (buo), während im Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (not) und in den Sehnerven (shn) eine Abnahme beobachtet wurde. Im Frontalschnitt 2 wurden in der weißen Substanz (wm) eine Erhöhung um ca. 20 % und im linken cingulären Kortex (cicl) sowie rechten Hypothalamus (hypr) eine Abnahme der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration um bis zu 50 % nach erlerntem Laufen festgestellt (Abb. 3.3.4-2D und E). Während die anderen Gehirnregionen eher unauffällig blieben. Nach erzwungenem Laufen wurden im parietalen Kortex (pacm/pacs), in der weißen Substanz (wm), im linken Striatum (stll), im Septum (sep) und im Hypothalamus (hyp) eine Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationszunahme ermittelt. Dagegen zeigten sich im Tuberculum olfactorium (tuo) und im piriformen Kortex (pic) eine Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationserniedrigung (Abb. 3.3.4-2F). Erlerntes Laufen im Laufrad führte in den meisten Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 zu einer Abnahme des Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegels um bis zu 25 % (Abb. 3.3.4-2G). Nur der Hypothalamus (hyp) wies eine klare Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Erhöhung auf (Abb. 3.3.4-2H). Erzwungenes Laufen im Laufrad bewirkte eine Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationszunahme in bestimmten Gehirnregionen, wobei der linke Hypothalamus (hypl), das linke Striatum (strl), der rechte cinguläre Kortex (cicr) und die weiße Substanz (wm) eine Abnahme zeigten (Abb. 3.3.4-2I).



**Abb. 3.3.4-1: Verteilung von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Dargestellt sind die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationen im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt. Die Ventrikel sind schwarz markiert und die grauen Regionen sind nicht präparierte Areale.

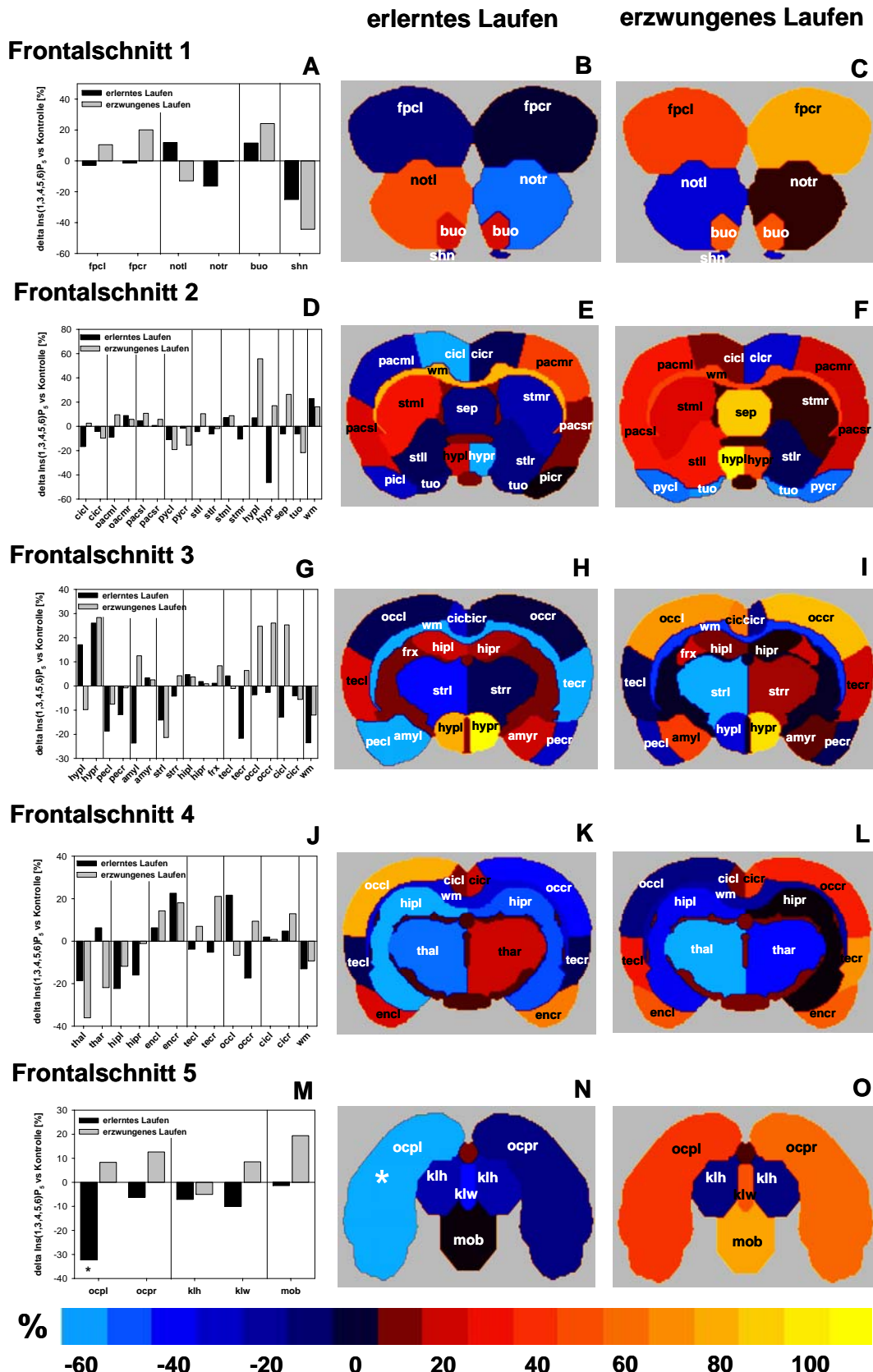
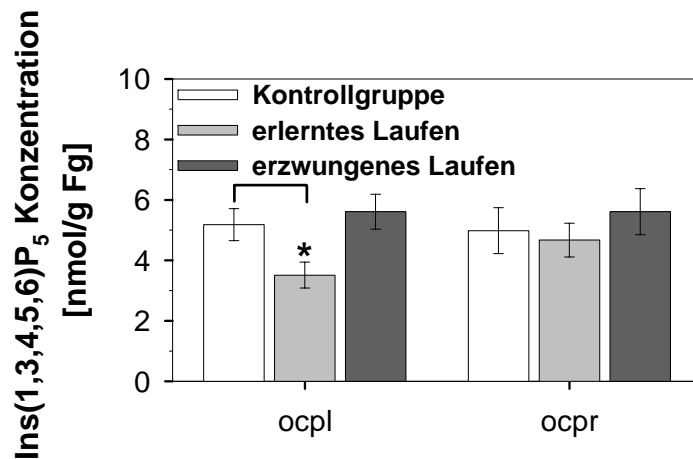


Abb. 3.3.4-2: Delta Veränderung der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte. Gezeigt sind die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Spiegel im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Signifikante Erhöhungen und Erniedrigungen weisen einen Stern (\*) auf. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt.

Die weiter okzipital liegenden Gehirnregionen (Frontalschnitt 4 und 5) zeigten sehr divergente Veränderungen der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration, die oft eher unerheblich waren (Abb. 3.3.4-2J und M). Die Modifikation lag bei den meisten Gehirnregionen bei etwa 20 %. Eine deutliche Abnahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Spiegel wurde im Thalamus (tha) und im Hippocampus (hip) des Frontalschnitts 4 sowohl nach erlerntem als auch nach erzwungenem Laufen im Laufrad beobachtet (Abb. 3.3.4-2J). Im linken okzipital Pol (ocpl) konnte eine signifikante  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Verringerung ( $p < 0,05$ ) nach erlerntem Laufen gemessen werden (Abb. 3.3.4-2N und Abb. 3.3.4-3).



**Abb. 3.3.4-3:  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration im okzipital Pol.** Dargestellt ist die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration im linken (ocpl) und rechten okzipital Pol (ocpr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

### 3.3.5 Veränderungen der $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

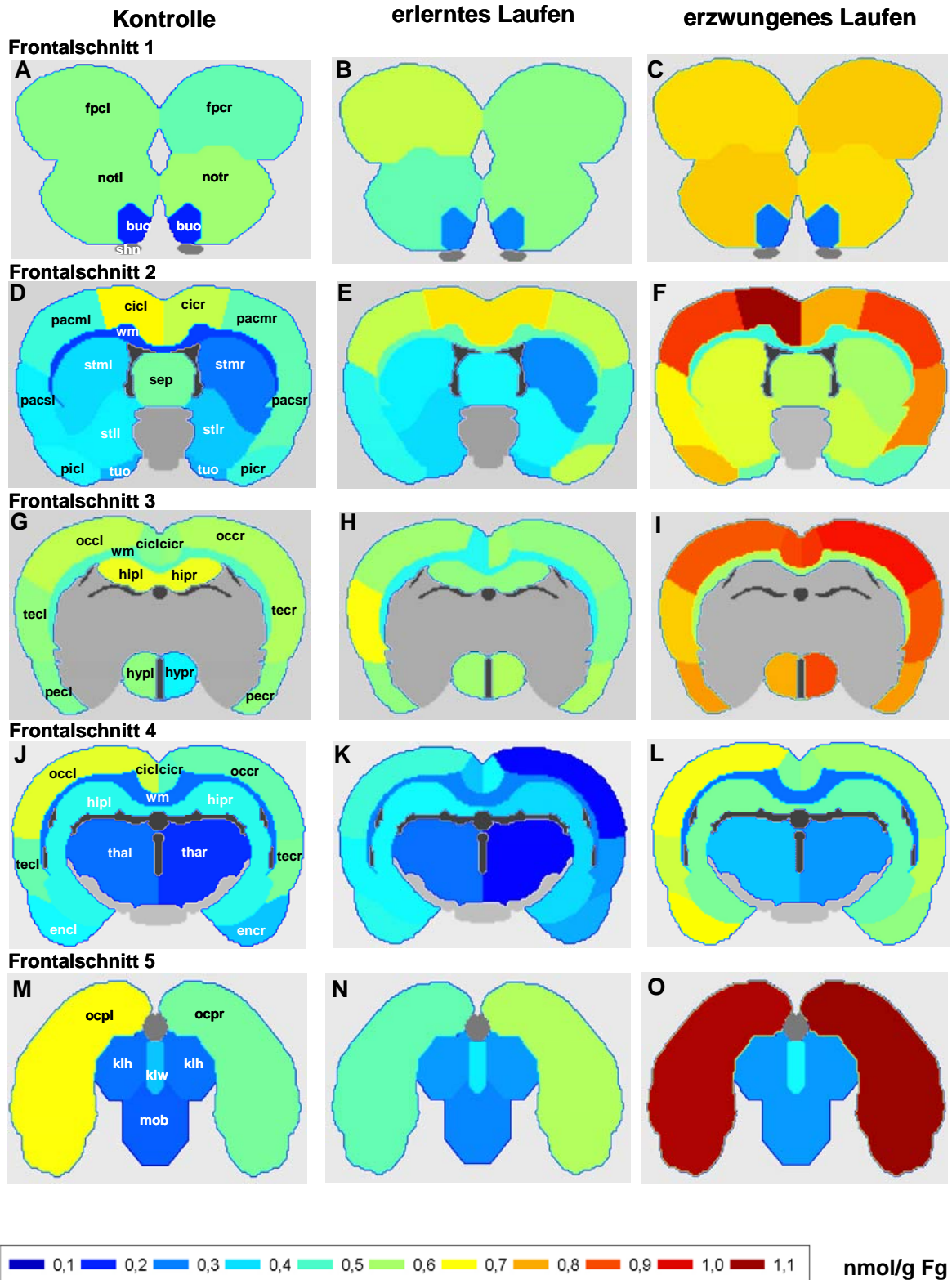
Die eigene  $\text{InsP}$  Analyse im Gehirn der Ratte lieferte neben  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  zwei weitere  $\text{InsP}_4$  Isomere,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ . Allerdings kann die Micro-MDD-HPLC aufgrund der identischen Retentionszeiten nicht zwischen beiden Enantiomeren differenzieren [Irvine & Schell, 2001].

Eine Zusammenfassung über die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentrationen in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad zeigt Abb. 3.3.5-1. Die mittlere  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration betrug bei der Kontrollgruppe  $0,44 \pm 0,02$  nmol/g Fg und war nach erlerntem Laufen in Laufrad unverändert ( $0,44 \pm 0,02$  nmol/g Fg) und nach erzwungenem Laufen im Laufrad deutlich erhöht ( $0,61 \pm 0,03$  nmol/g Fg).

Die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegel der Kontrollgruppe waren in fast allen Gehirnregionen ähnlich (0,40 – 0,55 nmol/g Fg). Eine Ausnahme bildeten der cinguläre Kortex (cic) (0,72 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.5-1D), der Hippocampus (hip) (0,59 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.5-1G), der linke okzipitale Kortex (occl) (0,60 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.5-1J) und der linke okzipital Pol (ocpl) (0,62 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.5-1M), diese wiesen eine leichte  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Erhöhung auf, verglichen mit den anderen Gehirnregionen. Ausgeprägte Hemisphärenunterschiede konnten in der Kontrollgruppe nicht gefunden werden.

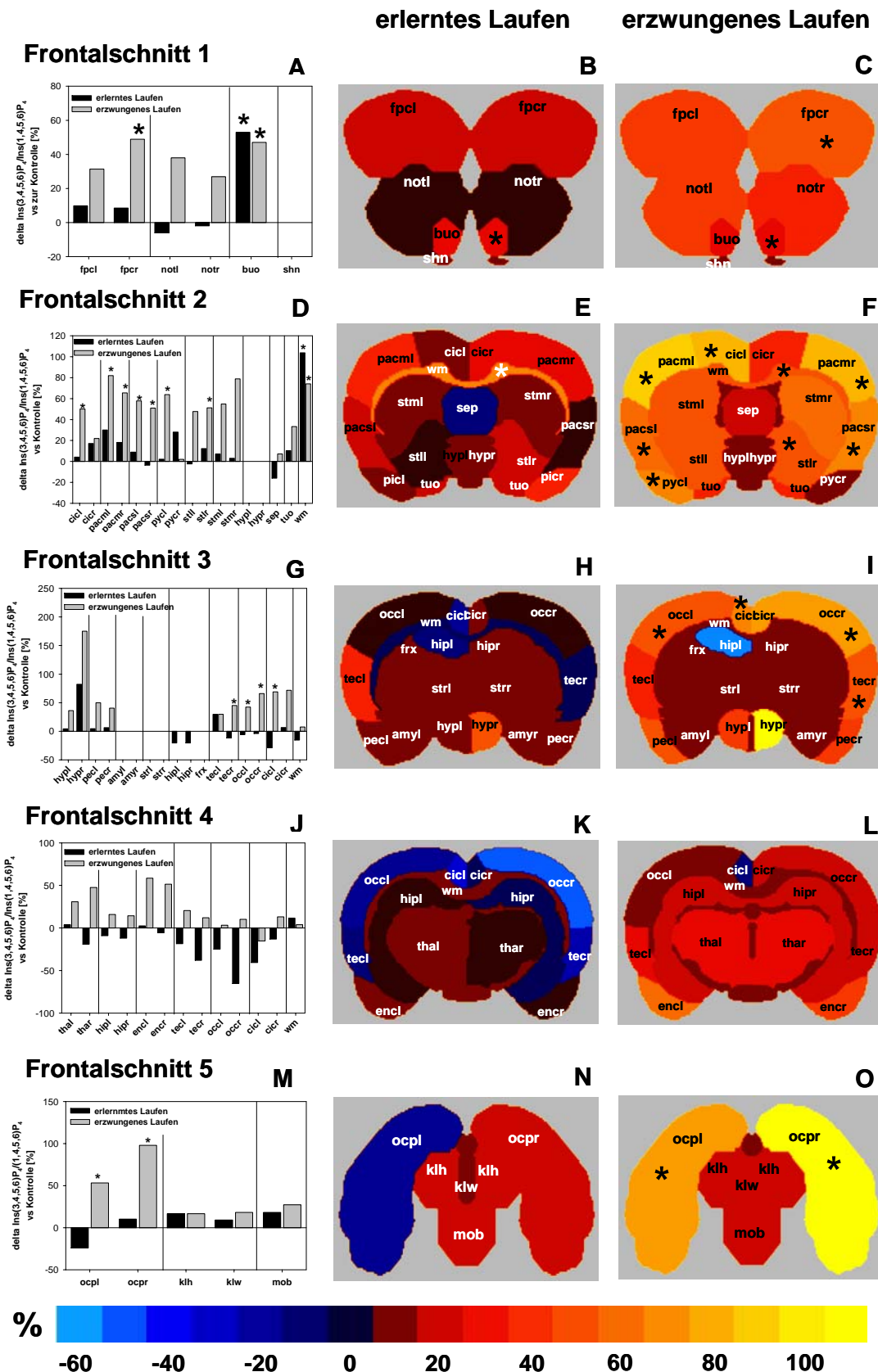
Erlerntes Laufen im Laufrad hatte kaum Auswirkungen auf die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentrationen (Konzentrationsbereich zwischen 0,17 und 0,75 nmol/g Fg). Nur der okzipitale Kortex (occ) (0,31 nmol/g Fg nach erlerntem Laufen vs 0,55 nmol/g Fg in der Kontrollgruppe) und temporale Kortex (tec) (0,36 nmol/g Fg nach erlerntem Laufen vs 0,50 nmol/g Fg in der Kontrollgruppe) zeigten eine Reduktion des  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegels nach erlerntem Laufen (Abb. 3.3.5-1K). Wie schon in der Kontrollgruppe beobachtet, konnten nach erlerntem Laufen im Laufrad keine deutlichen links/rechte Unterschiede ausgemacht werden.

Nach erzwungenem Laufen wurde in allen Gehirnregionen eine deutliche Steigerung der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration beobachtet. Besonders auffällig war dies in allen Kortexarealen und in den okzipital Polen (ocp). Der höchste  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegel wurde im linken cingulären Kortex (cicl) (1,08 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.5-1F) beobachtet. Dagegen war der niedrigste  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegel im Bulbus olfactorius (buo) (0,25 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.5-1C). Erzwungenes Laufen im Laufrad induziert keine deutlichen Hemisphärenunterschiede in der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration.



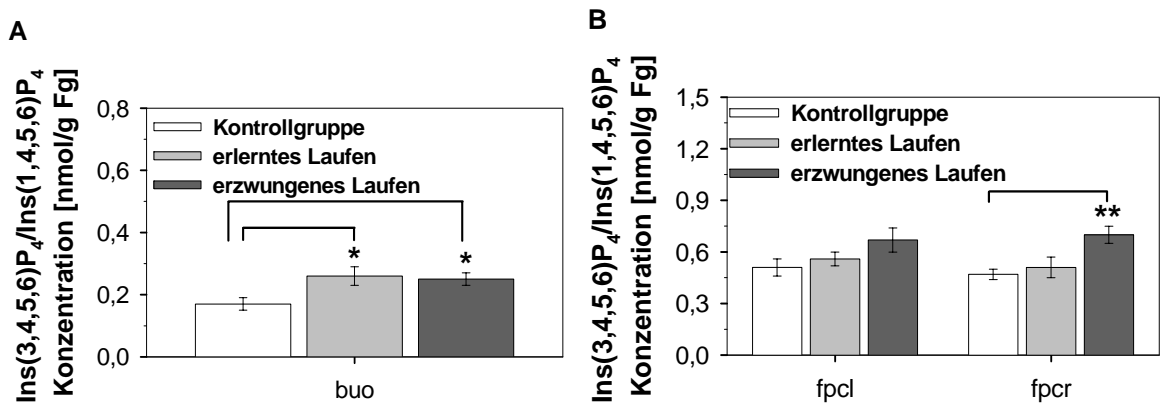
**Abb. 3.3.5-1: Verteilung von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Gezeigt sind die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentrationen im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt. Die Ventrikel sind schwarz markiert und die grauen Regionen sind nicht präparierte Areale.





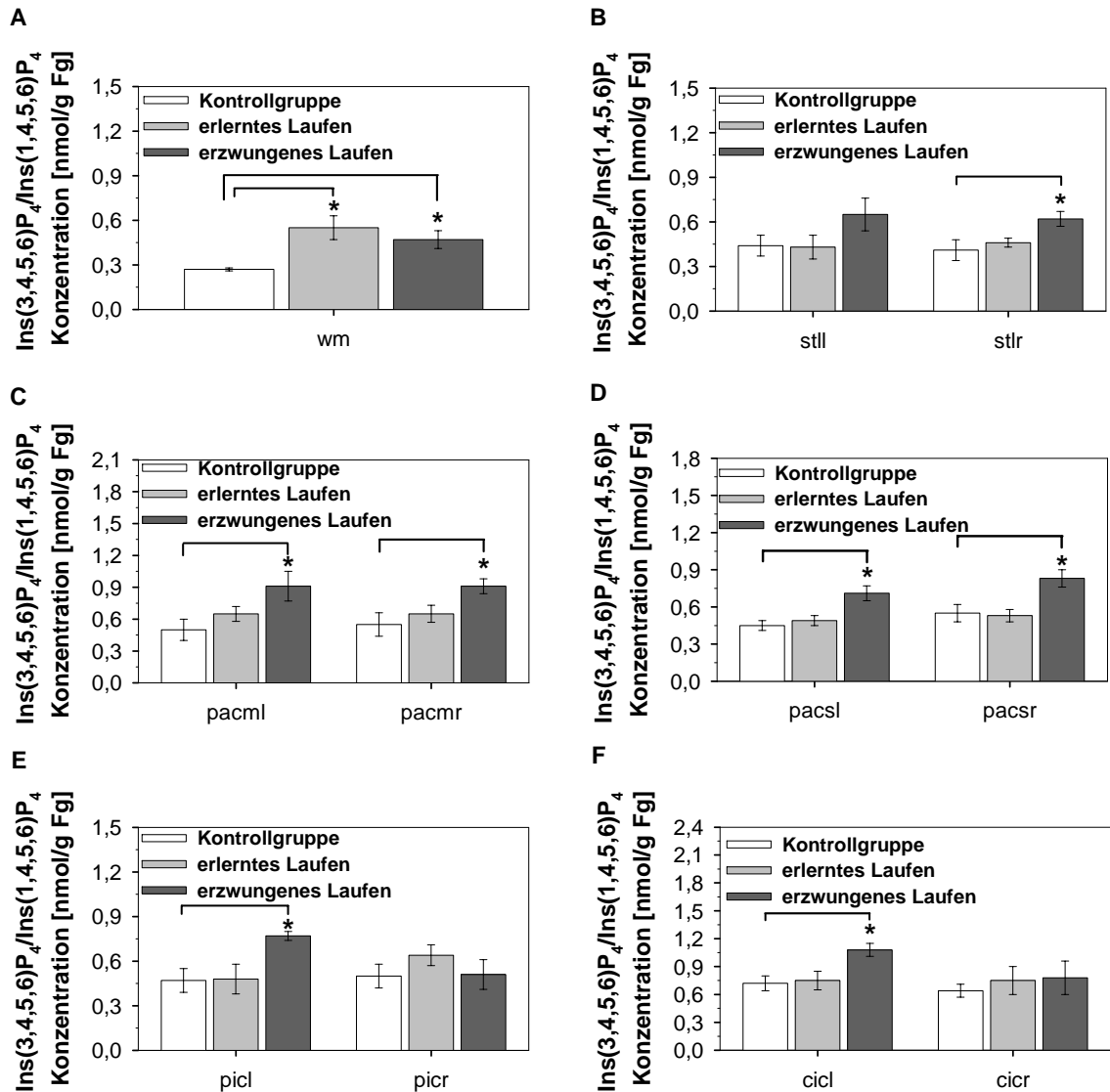
**Abb. 3.3.5-2:** Delta Veränderung der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte. Gezeigt sind die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegel im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Signifikante Erhöhungen und Erniedrigungen weisen einen Stern (\*) auf. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.

Abbildung 3.3.5-2A zeigt, dass erlerntes Laufen im Laufrad zu einem signifikanten Anstieg des  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegels im Bulbus olfactorius (buo) führte (Abb. 3.3.5-3A), während sich die Konzentration in den anderen Gehirnregionen kaum veränderte (Abb. 3.3.5-2B). Dagegen wurde nach erzwungenem Laufen eine deutliche Zunahme der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration in allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 festgestellt (Abb. 3.3.5-2A und C). Eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,005$ ) wurde im Bulbus olfactorius (buo) (Abb. 3.3.5-3A) und im rechten frontopolen Kortex (fpcr) beobachtet (Abb. 3.3.5-3B).



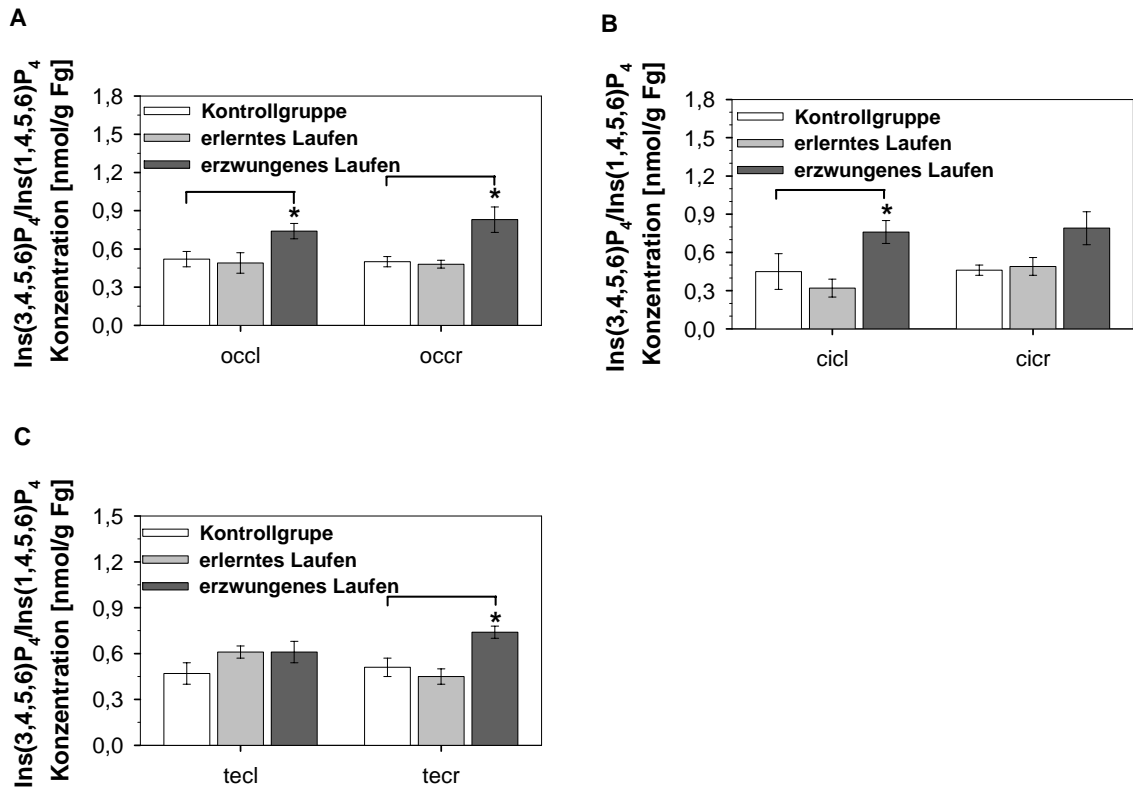
**Abb. 3.3.5-3:  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration im Bulbus olfactorius und im frontopolen Kortex.** Dargestellt ist die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration im Bulbus olfactorius (buo) (A) sowie im linken (fpcl) und rechten frontopolen Kortex (fpcr) (B) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 5$ )  $\pm$  SEM.

Auch in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 zeigte sich, dass das erzwungene Laufen einen stärkeren Effekt auf die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration hatte als das erlernte Laufen im Laufrad (Abb. 3.3.5-2D). Jedoch wurde in der weißen Substanz (wm) eine signifikante Erhöhung des  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegels ( $p < 0,05$ ) nach erlerntem Laufen im Laufrad gemessen (Abb. 3.3.5-2E und Abb. 3.3.5-4A). Nach erzwungenem Laufen wurde eine signifikante Zunahme ( $p < 0,05$ ) der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration im linken cingulären Kortex (cicl), im parietalen Kortex (pacm/pacs), im rechten lateralen Striatum (stlr), im linken piriformen Kortex (picl) sowie in der weißen Substanz (wm) festgestellt (Abb. 3.3.5-2F und Abb. 3.3.5-4B bis F).



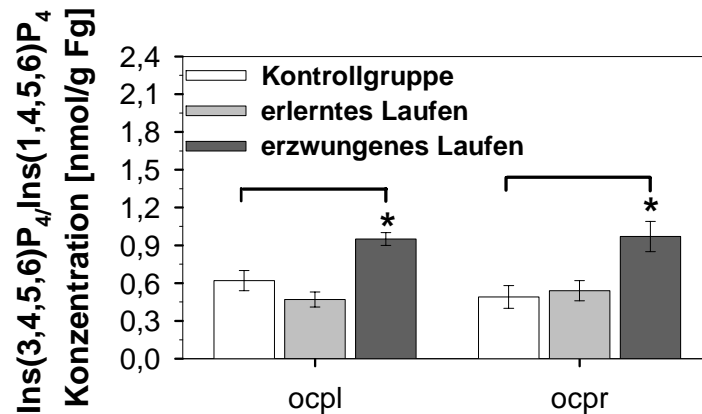
**Abb. 3.3.5-4:  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration in der weißen Substanz, im lateralen Striatum, im parietalen, piriformen und cingulären Kortex.** Dargestellt ist die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration in der weißen Substanz (wm) (A), im linken (stll) und rechten lateralen Striatum (stlr) (B), in der linken (pacml) und rechten motorischen Region (pacmr) des parietalen Kortex (C), in der linken (pacsl) und rechten somatosensorischen Region (pacsr) des parietalen Kortex (D), im linken (picl) und rechten piriformen Kortex (picr) (E) sowie im linken (cicl) und rechten cingulären Kortex (cicr) (F). Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Gezeigt sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

Auch die Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 zeigten kaum Veränderungen in der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration nach erlerntem Laufen (Abb. 3.3.5-2G und H). Allerdings wurde nach erzwungenem Laufen eine deutliche Zunahme des  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Wertes um bis zu 150 % beobachtet (Abb. 3.3.5-2G und I). Diese war im okzipitalen Kortex (occ) (Abb. 3.3.5-2I und Abb. 3.3.5-5A), im linken cingulären Kortex (cicl) (Abb. 3.3.5-2I und Abb. 3.3.5-5B) und im rechten temporalen Kortex (tecr) (Abb. 3.3.5-2I und Abb. 3.3.5-5C) signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.3.5-5:  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration im okzipitalen, cingulären und temporalen Kortex.** Dargestellt ist die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration im linken (occl) und rechten okzipitalen Kortex (occr) (**A**), im linken (cicl) und rechten cingulären Kortex (cicr) (**B**) sowie im linken (tecl) und rechten temporalen Kortex (tecr) (**C**). Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Gezeigt sind die Mittelwerte ( $n \geq 5$ )  $\pm$  SEM.

Im Frontalschnitt 4 war der Einfluss des erlernten und erzwungenen Laufens auf die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration deutlich geringer ausgeprägt. Erlerntes Laufen führte zu einer  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentrationsverringern im temporalen (tec), okzipitalen (occ) und linken cingulären Kortex (cicl) (Abb. 3.3.5-2J und K). Erzwungenes Laufen verursachte eine geringfügige Erhöhung des  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegels im Thalamus (tha), im Hippocampus (hip), im entorhinalen (enc) und temporalen Kortex (tec) (Abb. 3.3.5-2J und L). Erlerntes Laufen im Laufrad hatte kaum Auswirkungen auf die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration in den Gehirnregionen des Frontalschnitts 5 (Abb. 3.3.5-2M und N). Dagegen bewirkte erzwungenes Laufen im Laufrad eine  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentrationserhöhung in allen Gehirnregionen (Abb. 3.3.5-2 M und O), die im okzipital Pol (ocp) signifikant war (Abb. 3.3.5-6).



**Abb. 3.3.5-6: Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> Konzentration im okzipital Pol.** Dargestellt ist die Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> Konzentration im linken (ocpl) und rechten okzipital Pol (ocpr). Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*p < 0,05. Gezeigt sind die Mittelwerte (n ≥ 5) ± SEM.

### 3.3.6 Veränderungen der InsP<sub>6</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

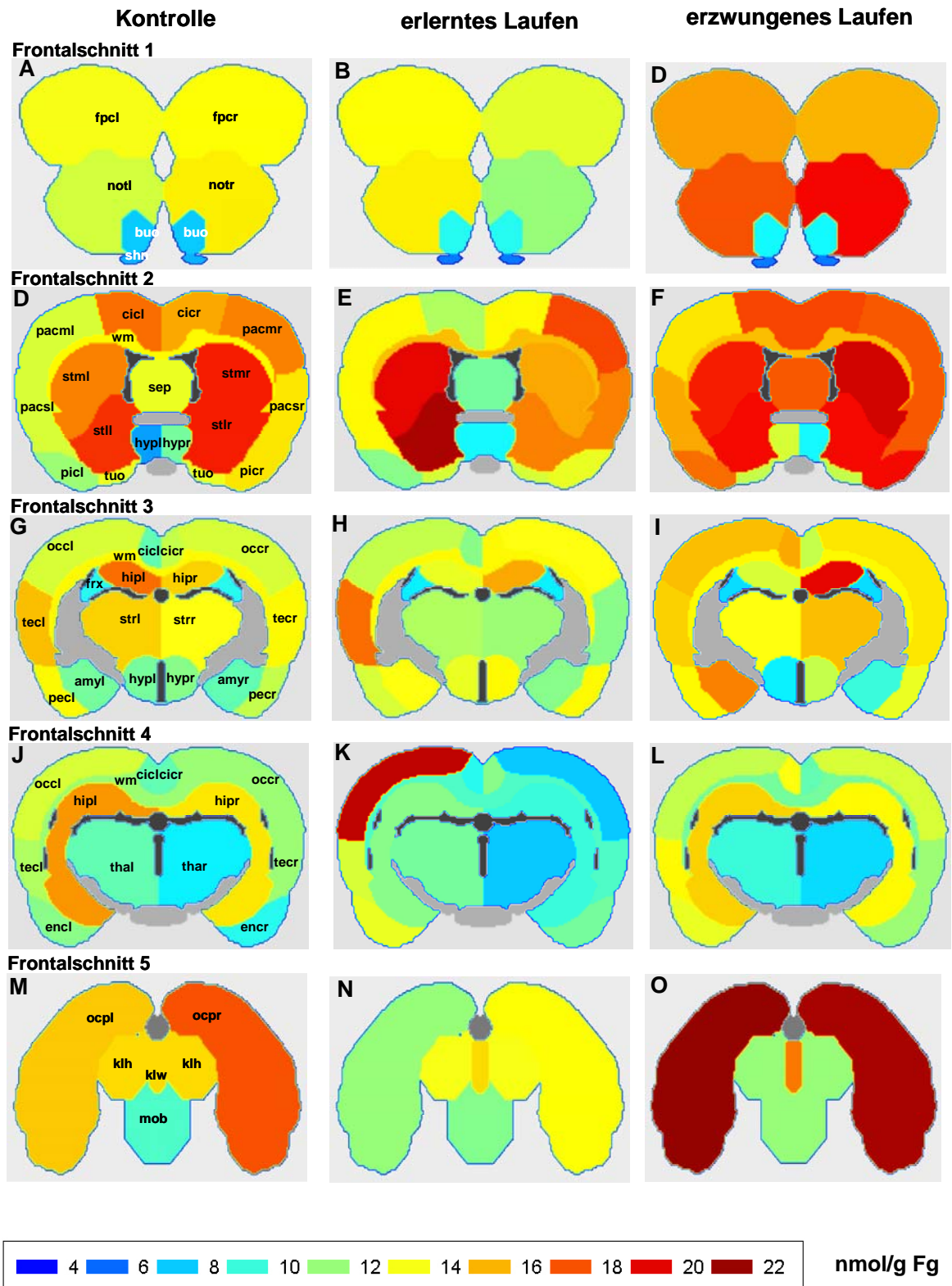
InsP<sub>6</sub> kann aus den InsP<sub>5</sub> Isomeren: Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> oder Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> gebildet werden (Abb. 3.3-1). Abbildung 3.3.6-1 zeigt eine Zusammenfassung der InsP<sub>6</sub> Konzentrationen in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die mittlere InsP<sub>6</sub> Konzentration betrug bei der Kontrollgruppe  $13,54 \pm 0,35$  nmol/g Fg. Erlerntes Laufen im Laufrad bewirkte eine Verminderung des mittleren InsP<sub>6</sub> Spiegels ( $13,24 \pm 0,37$  nmol/g Fg) und erzwungenes Laufen eine Zunahme ( $14,86 \pm 0,44$  nmol/g Fg).

In den Gehirnregionen der Kontrollgruppe lagen die Normal- InsP<sub>6</sub> Konzentrationen zwischen 7,43 und 19,19 nmol/g Fg. Frontalschnitt 2 (Abb. 3.3.6-1D) und 5 (Abb. 3.3.6-1M) zeigten höhere InsP<sub>6</sub> Spiegel als die Frontalschnitte 1 (Abb. 3.3.6-1A), 3 (Abb. 3.3.6-1G) und 4 (Abb. 3.3.6-1J). Dabei wurden die höchsten Konzentrationen im Striatum (str) (18,50 nmol/g Fg), im cingulären (cic) (16,76 nmol/g Fg) und rechten parietalen Kortex (pacmr/pacsr) (16,07 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.6-1D) sowie im okzipital Pol (ocp) (16,71 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.6-1M) gemessen. Dagegen wiesen der linke Hypothalamus (hypl) (7,39 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.6-1D), der rechte Thalamus (thar) (8,97 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.6-1J), der Bulbus olfactorius (buo) (7,76 nmol/g Fg) und die Sehnerven (shn) (7,43 nmol/g Fg) (Abb. 3.3.6-1M) die niedrigsten InsP<sub>6</sub> Konzentrationen auf. Auffällige links/rechts Unterschiede in der InsP<sub>6</sub> Konzentrationen wurden im parietalen Kortex (pacm/pacs) und im Hypothalamus (hypl/hypr) (3.3.6-1D) sowie im Hippocampus (hipl/hipr) (Abb. 3.3.6-1G) und im Thalamus (thal/thar) (Abb. 3.3.6-1J) bestimmt.

Erlerntes Laufen im Laufrad bewirkte in fast allen Gehirnregionen eine Veränderung des  $\text{InsP}_6$  Spiegels (Konzentrationsbereich zwischen 6,05 und 20,82 nmol/g Fg). Besonders auffällig war diese im cingulären Kortex (cic) (Abb. 3.3.6-1E und H), im Hippocampus (hip) und im okzipitalen Kortex (occ) (Abb. 3.3.6-1K). Der Hemisphärenunterschied war im parietalen (pacm/pacs) (Abb. 3.3.6-1E), temporalen (tecl/tecr) (Abb. 3.3.6-1H) und okzipitalen Kortex (occl/occr) (Abb. 3.3.6-1K) besonders stark ausgeprägt.

Im Gegensatz zum erlernten Laufen verursachte erzwungenes Laufen im Laufrad eine stärkere Modifikation der  $\text{InsP}_6$  Konzentration. In den meisten Gehirnregionen verursachte dieser Stressor eine Erhöhung des  $\text{InsP}_6$  Spiegels. So zeigten der Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (not) (Abb. 3.3.6-1C), der parietale (pacm/pacs) und der piriforme Kortex (pic) (Abb. 3.3.6-1F), der rechte Hippocampus (hipr) (Abb. 3.3.6-1I), die linke Amygdala (amyl) (Abb. 3.3.6-1I) und der okzipital Pol (ocp) (Abb. 3.3.6-1O) deutliche Konzentrationszunahmen. Die Bestimmung der Normal-Konzentrationen ergab einen  $\text{InsP}_6$  Spiegel zwischen 6,08 und 21,59 nmol/g Fg. Der links/rechts Unterschied war nach erzwungenem Laufen schwächer ausgebildet als nach erlerntem Laufen und in der Kontrollgruppe. Der Hemisphärenunterschied war im Hypothalamus (hypl/hypr), in der Amygdala (amyl/amyr) und im Hippocampus (hipl/hipr) (Abb. 3.3.6-1I) am auffälligsten.

Abbildung 3.3.6-2 fasst die delta Veränderung der  $\text{InsP}_6$  Konzentration nach erlernter und erzwungener körperlicher Bewegung im Laufrad im Gehirn der Ratte zusammen. Das Differenztomogramm von Frontalschnitt 1 bestätigt, dass erlerntes Laufen im Laufrad den  $\text{InsP}_6$  Spiegel nur geringfügig verändert (Abb. 3.3.6-2B). Im Unterschied dazu bewirkte die erzwungene Bewegung im Laufrad eine  $\text{InsP}_6$  Konzentrationszunahme in allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 1, mit Ausnahme der Sehnerven (shn) (Abb. 3.3.6-2A und C). Diese war im linken frontopolen Kortex (fpcl) und im linken Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notl) (Abb. 3.3.6-2C und Abb. 3.3.6-3) signifikant ( $p < 0,05$ ). Im Frontalschnitt 2 verursachte erlerntes Laufen eine  $\text{InsP}_6$  Konzentrationserhöhung im linken medialen und lateralen Striatum (stml/stll) sowie im linken Hypothalamus (hypl) (Abb. 3.3.6-2E). Dagegen wurde im cingulären Kortex (cic) sowie im rechten lateralen und medialen Striatum (stmr/stlr) eine Verringerung des  $\text{InsP}_6$  Spiegels beobachtet (Abb. 3.3.6-2E). Die erzwungene Benutzung des Laufrades führte in den meisten Gehirnregionen zu einer  $\text{InsP}_6$  Konzentrationszunahme (Abb. 3.3.6-2F). Besonders deutlich war dies in der somatosensorischen Region des parietalen Kortex (pacs), im piriformen Kortex (pic), im linken Hypothalamus (hypl) und im Septum (sep) zu sehen (Abb. 3.3.6-2F). Im Septum (sep) und in der linken somatosensorischen Region des parietalen Kortex (pacsl) war die  $\text{InsP}_6$  Konzentrationserhöhung signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.3.6-4).



**Abb. 3.3.6-1:** Verteilung von  $\text{InsP}_6$  in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte. Gezeigt sind die  $\text{InsP}_6$  Konzentrationen im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt. Die Ventrikel sind schwarz markiert und die grauen Regionen sind nicht präparierte Areale.

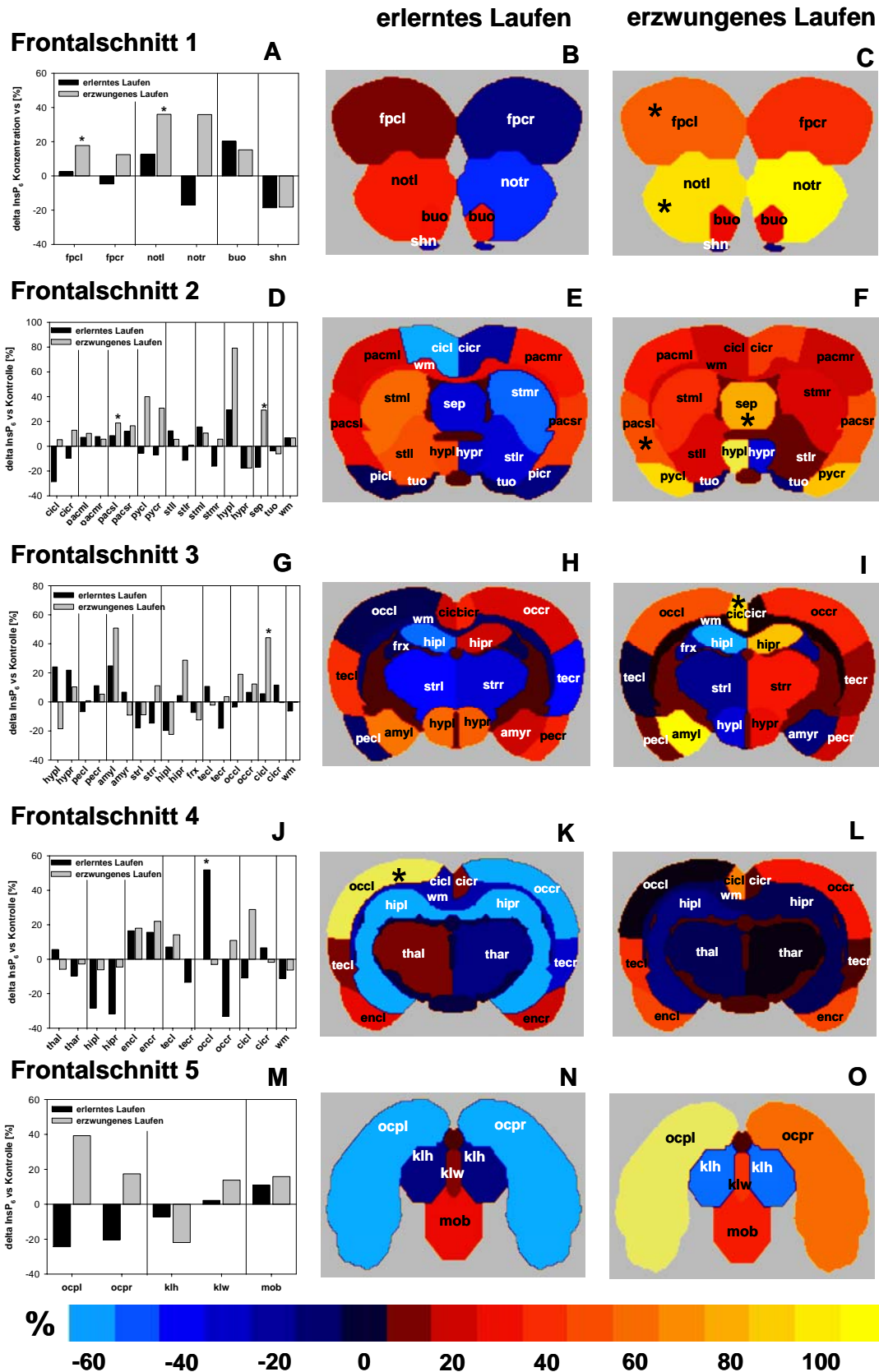
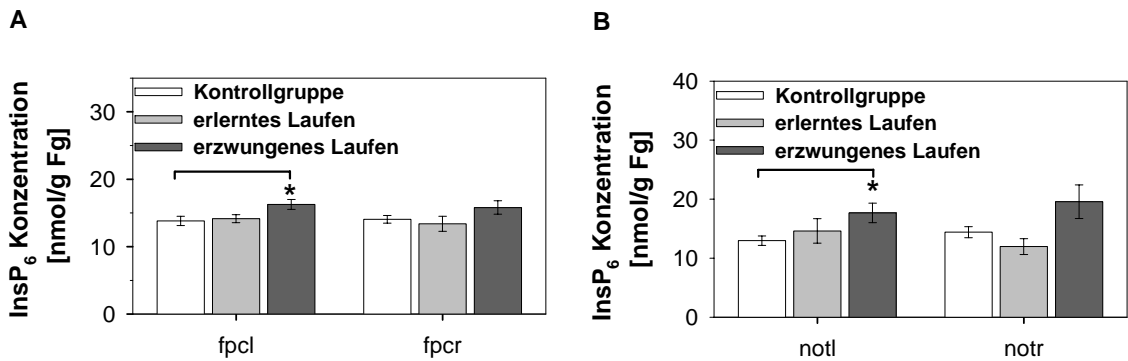
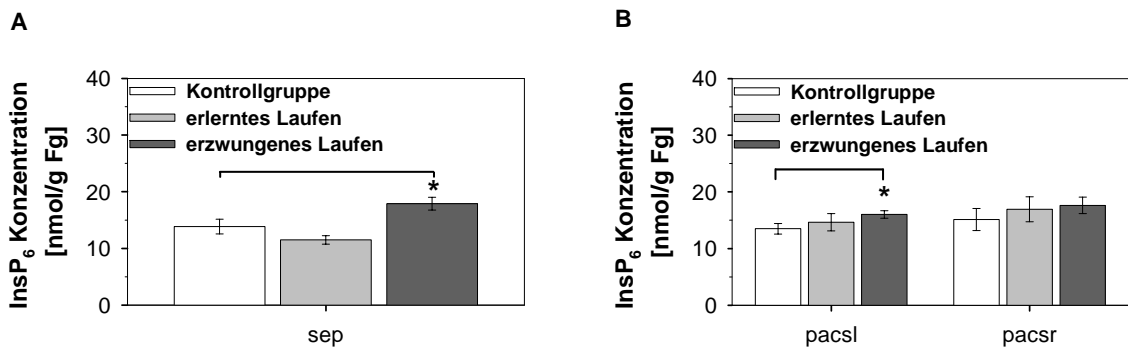


Abb. 3.3.6-2: Delta Veränderung der  $\text{InsP}_6$  Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte. Gezeigt sind die  $\text{InsP}_6$  Spiegel im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von  $\text{InsP}_6$  spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Signifikante Erhöhungen und Erniedrigungen weisen einen Stern (\*) auf. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt.



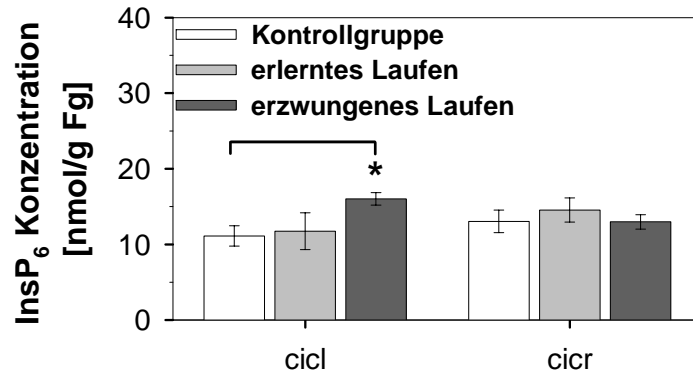


**Abb. 3.3.6-3: InsP<sub>6</sub> Konzentration im frontopolaren Kortex und im Nucleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium.** Gezeigt ist die InsP<sub>6</sub> Konzentration im linken (fpcl) und rechten frontopolaren Kortex (fpcr) (A) sowie im linken (notl) und rechten Nucleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notr) (B) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.



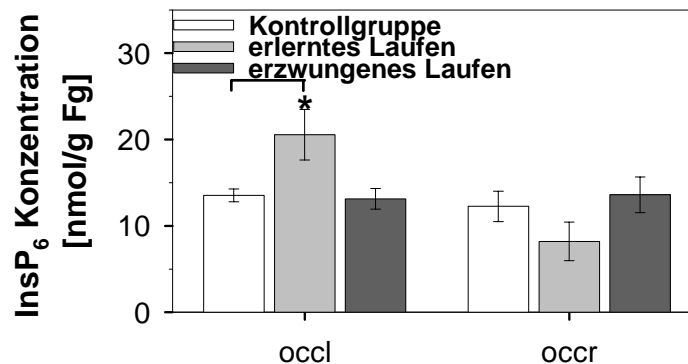
**Abb. 3.3.6-4: InsP<sub>6</sub> Konzentration im Septum und in der somatosensorischen Region des parietalen Kortex.** Gezeigt ist die InsP<sub>6</sub> Konzentration im Septum (sep) (A) sowie in der linken (pacsl) und rechten somatosensorischen Region des parietalen Kortex (pacsr) (B) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

Es zeigte sich im Frontalschnitt 3 nach erlerntem Laufen eine Erhöhung des InsP<sub>6</sub> Spiegels im Hypothalamus (hyp) sowie in der linken Amygdala (amyl) (Abb. 3.3.6-2H). Gleichzeitig wurde eine Abnahme des InsP<sub>6</sub> Spiegels im Striatum (str), im linken Hippocampus (hipl) und im rechten temporalen Kortex (tecr) beobachtet (Abb. 3.3.6-2H). Die erzwungene körperliche Bewegung im Laufrad führte zu einer deutlich erhöhten InsP<sub>6</sub> Konzentration in der linken Amygdala (amyl), im rechten Hippocampus (hipr) und im linken cingulären Kortex (cicl) (Abb. 3.3.6-2I). Allerdings war die Erhöhung der InsP<sub>6</sub> Konzentration nur im linken cingulären Kortex (cicl) signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.3.6-5). Zudem wurde im linken Hypothalamus (hyp) und im linken Hippocampus (hipl) eine Erniedrigung des InsP<sub>6</sub> Spiegels festgestellt (Abb. 3.3.6-2I).



**Abb. 3.3.6-5: InsP<sub>6</sub> Konzentration im cingulären Kortex.** Dargestellt ist die InsP<sub>6</sub> Konzentration im linken (cicl) und rechten cingulären Kortex (cicr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*p < 0,05. Abgebildet sind die Mittelwerte (n ≥ 4) ± SEM.

Im Frontalschnitt 4 war der InsP<sub>6</sub> Spiegel im linken okzipitalen Kortex (occl) signifikant (p < 0,05) erhöht nach erlerntem Laufen im Laufrad (Abb. 3.3.6-2K und Abb. 3.3.6-6) und im Hippocampus (hip) sowie im rechten okzipitalen Kortex (occr) erniedrigt (Abb. 3.3.6-2J und K). Nach erzwungenem Laufen zeigte sich eine InsP<sub>6</sub> Konzentrationserhöhung im entorhinalen Kortex (enc) und im linken cingulären Kortex (cicl) (Abb. 3.3.6-2L). Die anderen Gehirnregionen blieben unauffällig.



**Abb. 3.3.6-6: InsP<sub>6</sub> Konzentration im okzipitalen Kortex.** Dargestellt ist die InsP<sub>6</sub> Konzentration im linken (occl) und rechten okzipitalen Kortex (occr) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*p < 0,05. Abgebildet sind die Mittelwerte (n ≥ 4) ± SEM.

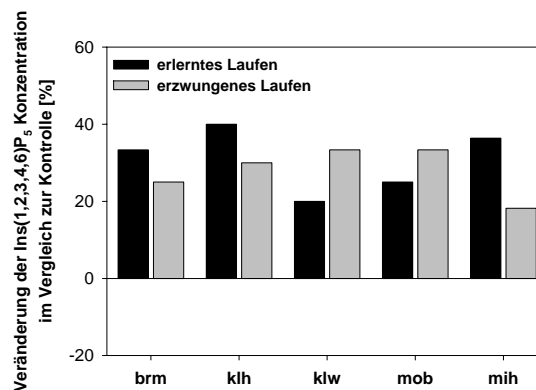
Der linke und rechte okzipital Pol (ocp) wiesen nach erlerntem Laufen im Laufrad eine deutliche Abnahme des InsP<sub>6</sub> Spiegels auf (Abb. 3.3.6-2M und N), während die Veränderung der InsP<sub>6</sub> Konzentration in den anderen Gehirnregionen des Frontalschnitts 5 geringfügig war. Nach erzwungenem Laufen zeigte sich mit Ausnahme der

Kleinhirnhemisphären (klh) eine  $\text{InsP}_6$  Steigerung in allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 5 (Abb. 3.3.6-20).

### 3.3.7 Veränderungen der $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ , $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ , $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ und $\text{InsP}_7$ Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

In einigen Gehirnregionen konnten zusätzlich die  $\text{InsP}$  Isomere:  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_7$  nachgewiesen werden.  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  kann durch Phosphorylierung aus  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  oder durch Dephosphorylierung aus  $\text{InsP}_6$  gebildet werden.  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  entsteht aus  $\text{InsP}_6$ , diese Reaktion wird durch MIPP katalysiert. Die Bildung von  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  erfolgt ebenfalls aus dem  $\text{InsP}_6$ , allerdings ist das Enzym, welches die Reaktion katalysiert noch nicht näher beschrieben. Auch das Isomer  $\text{InsP}_7$  wird aus  $\text{InsP}_6$  gebildet, die Phosphorylierung wird von der  $\text{InsP}_6$  Kinase synthetisiert (Abb. 3.3-1).

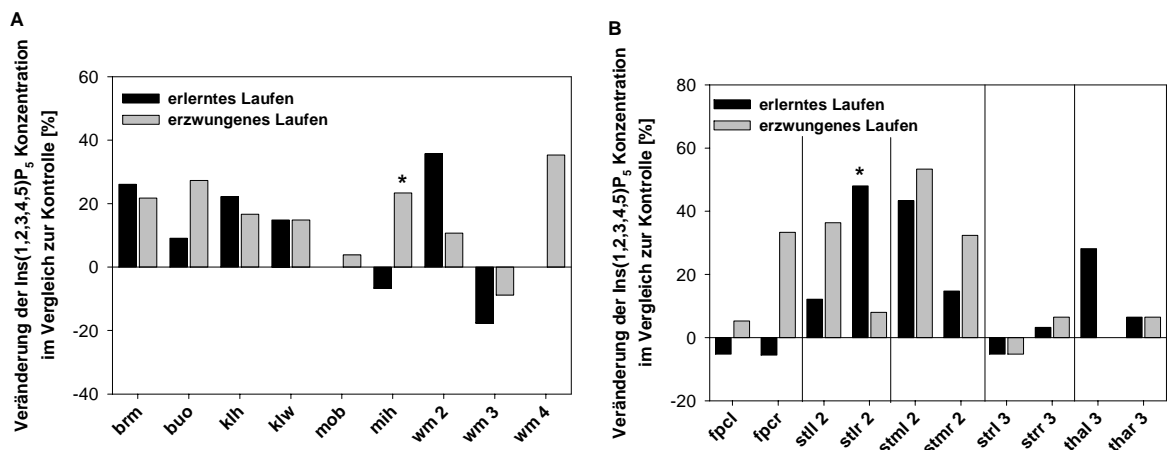
Das Isomer  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  wurde in der Brücke (Pons) bis Medulla (brm), im Kleinhirn (klh/klw), in der Medulla oblongata (mob) und im Mittelhirn (mih) gefunden. In der Kontrollgruppe lag der  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  Spiegel zwischen 0,10 und 0,15 nmol/g Fg. Erlerntes und erzwungenes Laufen im Laufrad führten zu einer deutlichen  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  Konzentrationszunahme in allen Gehirnarealen (Abb. 3.3.7-1).



**Abb. 3.3.7-1: Veränderung der  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  Konzentrationen in der Brücke bis Medulla, im Kleinhirn, in der Medulla oblongata und im Mittelhirn.** Gezeigt sind die  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  Konzentrationen in der Brücke bis Medulla (brm), im Kleinhirn (klh und klw), in der Medulla oblongata (mob) und im Mittelhirn (mih) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n = 5$ )  $\pm$  SEM.

Das  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  konnte in der Brücke (Pons) bis Medulla (brm), im Bulbus olfactorius (buo), im Kleinhirn (klh/klw), in der Medulla oblongata (mob), im Mittelhirn (mih), in der weißen Substanz (wm), im frontopolen Kortex (fpc), im Striatum (str) und im Thalamus (tha) detektiert werden. Der Konzentrationsbereich von  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  lag in der Kontrollgruppe zwischen 0,11 und 0,38 nmol/g Fg. Die Brücke (Pons) bis Medulla (brm), der Bulbus olfactorius (buo), das Kleinhirn (klh/klw) und die Medulla oblongata (mob)

zeigten wie beim  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  eine Konzentrationssteigerung nach erlerntem und erzwungenem Laufen (Abb. 3.3.7-2A). Das Mittelhirn (mih) wies eine signifikante  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Konzentrationszunahme ( $p < 0,05$ ) nach erzwungenem Laufen auf (Abb. 3.3.7-2A). Die Veränderung des  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Spiegels war in der weißen Substanz (wm) sehr divergent. In der weißen Substanz des Frontalschnitts 2 (wm 2) war eine  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Steigerung um bis zu 40 % nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad zu beobachten, während im Frontalschnitt 3 die  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Konzentration reduziert war (Abb. 3.3.7-2A). Dagegen war im Frontalschnitt 4 eine deutliche  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Zunahme nach erzwungenem Laufen sichtbar (Abb. 3.3.7-2A). Beim frontopolen Kortex (fpc) zeigte nur die rechte Seite eine Erhöhung der  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Konzentration nach erzwungenem Laufen (Abb. 3.3.7-2B). Das Striatum (str) des Frontalschnitts 2 wies eine auffallende  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Konzentrationszunahme sowohl nach erlerntem als auch nach erzwungenem Laufen im Laufrad auf, diese war im rechten lateralen Striatum (stlr 2) signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.3.7-2B). Dagegen war die Veränderung im Striatum (str) des Frontalschnitts 3 und im Thalamus (tha) eher unbedeutend.

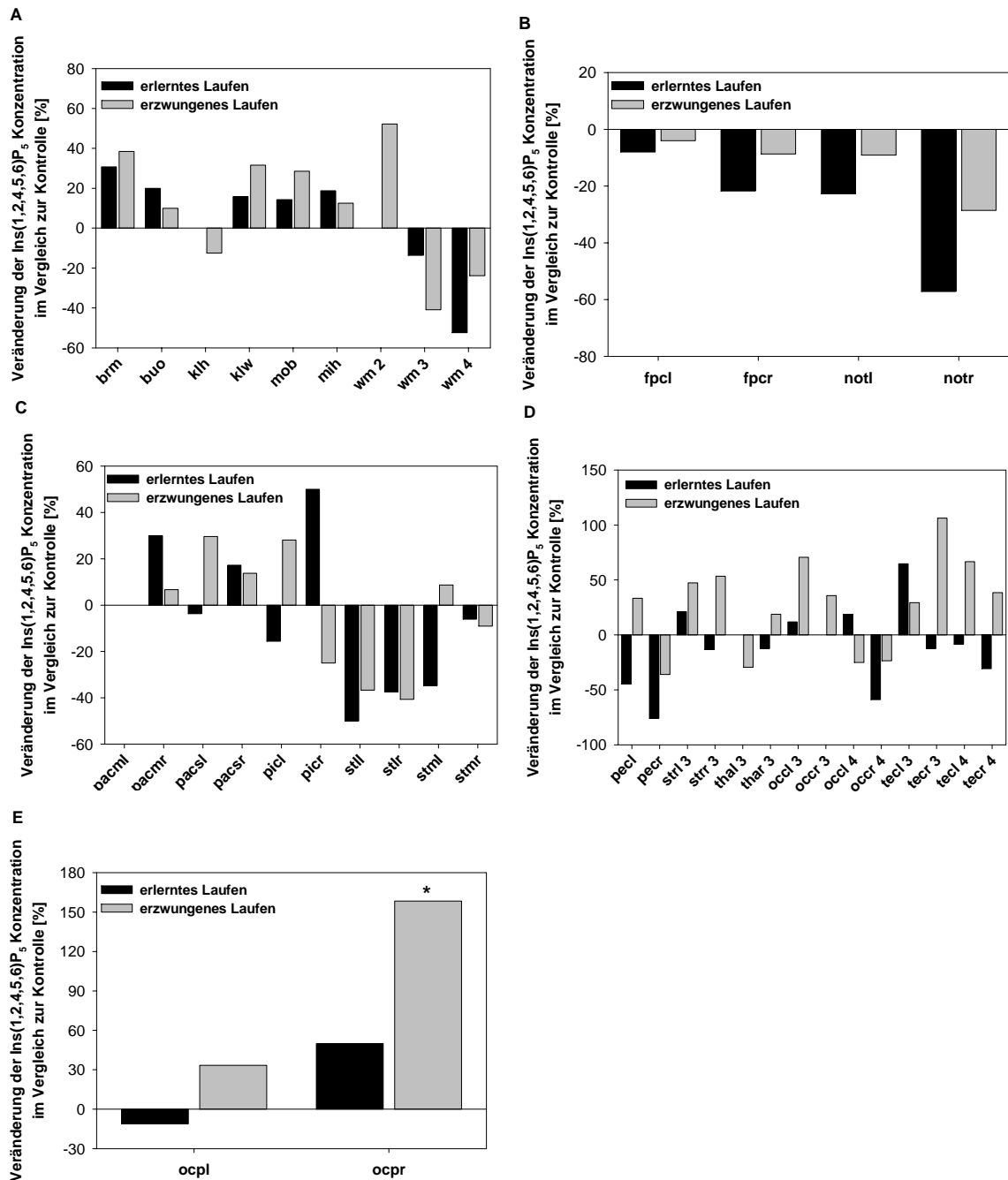


**Abb. 3.3.7-2: Veränderung der  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen.** Abgebildet sind in (A) die  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Konzentrationen in der Brücke bis Medulla (brm), im Bulbus olfactorius (buo), im Kleinhirn (klh und klw), in der Medulla oblongata (mob), im Mittelhirn (mih) und in der weißen Substanz (wm) und in (B) die  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Mengen im frontopolen Kortex (fpcl und fpcr), im Striatum (stll 2, stlr 2, stml 2, stmr 2, stlr 3 und stlr 3) sowie im Thalamus (thal 3 und thar 3) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Zahlen hinter den Bezeichnungen der Gehirnregionen kennzeichnen den Frontalschnitt, aus dem diese stammen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \* $p < 0,05$ . Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n = 5$ )  $\pm$  SEM.

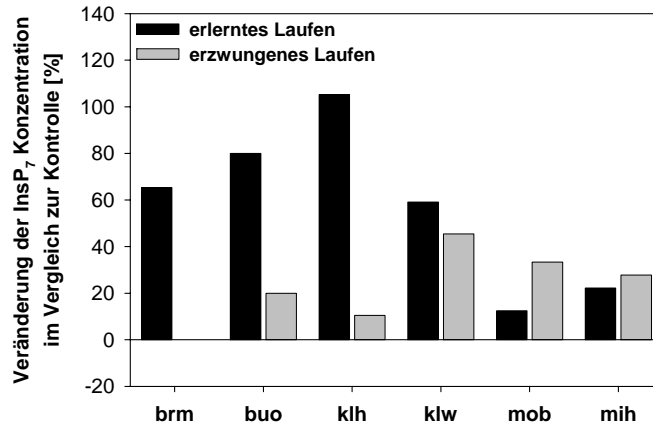
Das  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  Isomer konnte in einigen Gehirnregionen nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe lag die  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration zwischen 0,10 und 0,32 nmol/g Fg. Die Brücke (Pons) bis Medulla (brm), der Bulbus olfactorius (buo), das Kleinhirn (klh/klw), die Medulla oblongata (mob) und das Mittelhirn (mih) zeigten wie beim

Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> ein Konzentrationssteigerung nach erlerntem und erzwungenem Laufen (Abb. 3.3.7-3A). Die weiße Substanz (wm) zeigte auch bei diesem Isomer eine abwechselnde Modifikation in den einzelnen Frontalschnitten. Im Frontalschnitt 2 konnte ein Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Zunahme nach erzwungenem Laufen im Laufrad beobachtet werden, demgegenüber wurden im Frontalschnitt 3 und 4 eine Reduktion um bis zu 50 % sowohl nach erlerntem als auch nach erzwungenem Laufen detektiert (Abb. 3.3.7-3A). Die Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 (frontopolarer Kortex und Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium) zeigten eine Erniedrigung des Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Spiegels nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad (Abb. 3.3.7-3B). Dagegen wiesen der parietale (pac) und der piriforme Kortex (pic) eine Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationszunahme um bis zu 50 % auf (Abb. 3.3.7-3C). Erlerntes und erzwungenes Laufen führte im Striatum (str) des Frontalschnitts 2 zu einer deutlichen Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Reduktion um bis zu 50 % (Abb. 3.3.7-3C). Erlerntes Laufen im Laufrad bewirkte eine Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationsabnahme im piriformen mit entorhinalem Kortex (pec), im rechten okzipitalen (occr) und temporalen Kortex (tecr) des Frontalschnitts 4 um bis zu 60 %, während der linke temporale Kortex (tecl) des Frontalschnitts 3 eine Zunahme aufwies (Abb. 3.3.7-3D). Im linken piriformen mit entorhinalem Kortex (pecl), im Striatum (str) und okzipitalen Kortex (occ) des Frontalschnitt 3 sowie im temporalen Kortex (tec) des Frontalschnitts 3 und 4 (Abb. 3.3.7-3D) und im okzipital Pol (ocp) (Abb. 3.3.7-3E) wurde ein Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Erhöhung nach erzwungenem Laufen im Laufrad beobachtet. Diese war im rechten okzipital Pol (ocpr) signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.3.7-3E).

Das InsP<sub>7</sub> konnte in der Brücke (Pons) bis Medulla (brm), im Bulbus olfactorius (buo), im Kleinhirn (klh/klw), in der Medulla oblongata (mob) und im Mittelhirn (mih) detektiert werden. Der Konzentrationsbereich von InsP<sub>7</sub> lag in der Kontrollgruppe zwischen 0,05 und 0,26 nmol/g Fg. Alle Gehirnregionen zeigten sowohl nach erlerntem als auch nach erzwungenem Laufen im Laufrad eine InsP<sub>7</sub> Konzentrationssteigerung (Abb. 3.3.7-4). Allerdings war die Erhöhung nach erlerntem Laufen (Konzentrationsbereich zwischen 0,09 und 0,43 nmol/g Fg) deutlicher als nach erzwungenem Laufen (Konzentrationsbereich zwischen 0,06 und 0,32 nmol/g Fg) im Laufrad.



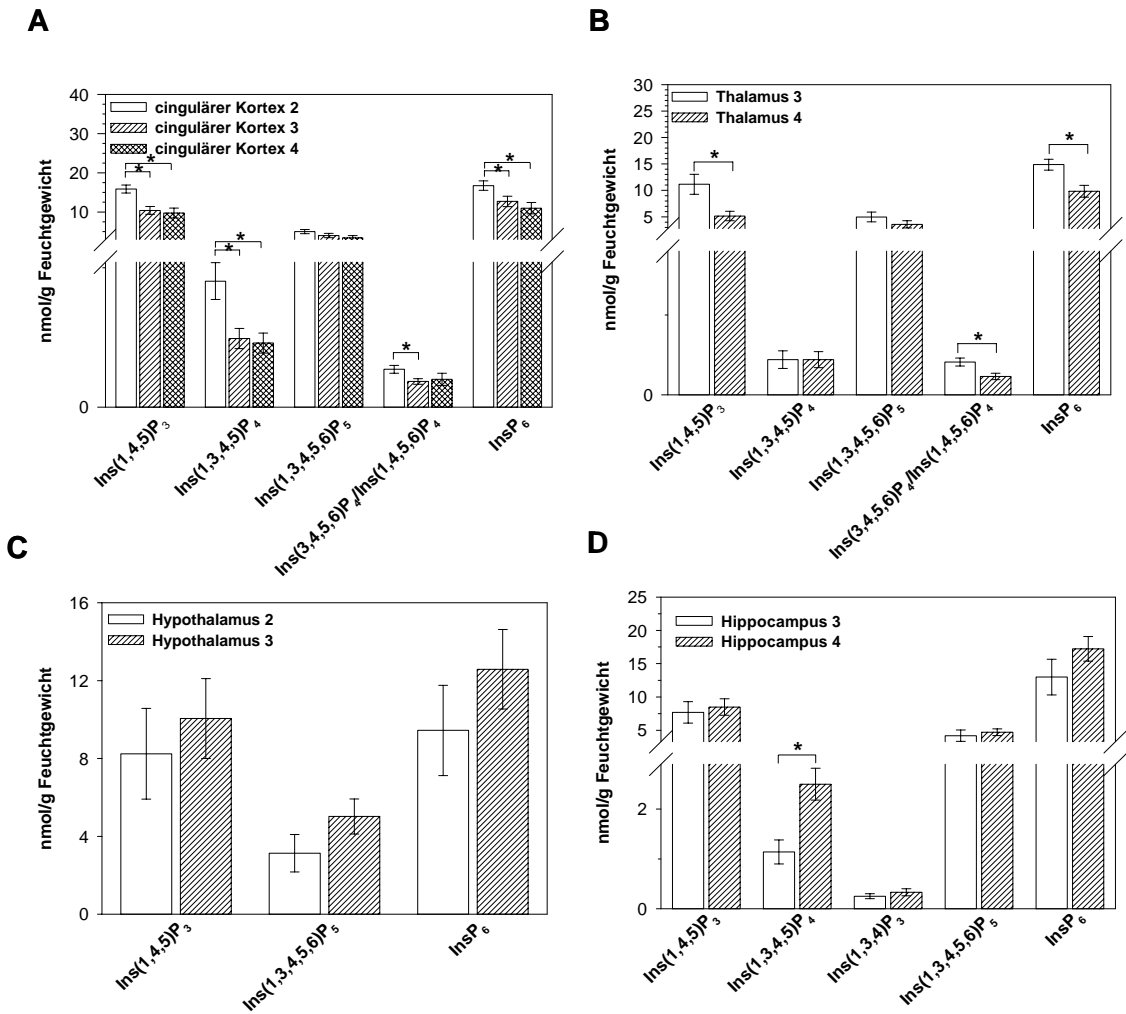
**Abb. 3.3.7-3: Veränderung der Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen.** Abgebildet sind die Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> Mengen: **(A)** in der Brücke bis Medulla (brm), im Bulbus olfactorius (buo), im Kleinhirn (klh/klw), in der Medulla oblongata (mob), im Mittelhirn (mih) und in der weißen Substanz (wm); **(B)** im frontopolaren Kortex (fpc) und im Nucleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (not), **(C)** im parietalen (pac) und piriformen Kortex (pic) sowie im Striatum (str); **(D)** im piriformen mit entorhinalem Kortex (pec), im entorhinalen (enc), okzipitalen (occ) und temporalen Kortex (tec) sowie im Thalamus (tha) und **(E)** in den okzipitalen Polen (opc) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Zahlen hinter den Bezeichnungen der Gehirnregionen markieren den Frontalschnitt, aus dem diese hervorgehen. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem erlernten bzw. erzwungenen Laufen sind markiert: \*p < 0,05. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 4) ± SEM. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.



**Abb. 3.3.7-4: Veränderung der InsP<sub>7</sub> Konzentrationen in der Brücke bis Medulla, im Bulbus olfactorius, im Kleinhirn, in der Medulla oblongata und im Mittelhirn nach.** Gezeigt sind die InsP<sub>7</sub> Konzentrationen in der Brücke bis Medulla (brm), im Bulbus olfactorius (buo), im Kleinhirn (klh und klw), in der Medulla oblongata (mob) und im Mittelhirn (mih) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n = 5$ )  $\pm$  SEM.

### 3.4 Gradienten der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte

In nahezu allen Gehirnregionen konnten Gradienten in der InsP Konzentration beobachtet werden (Abb. 3.3.1-1, Abb. 3.3.2-1, Abb. 3.3.4-1, Abb. 3.3.5-1, Abb. 3.3.6-1). Im cingulären Kortex, Thalamus, Hypothalamus und Hippocampus wurden signifikante Unterschiede der InsP Verteilung in der fronto-okzipitalen Ausdehnung nachgewiesen (Abb. 3.4-1). Die Isomere Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> und InsP<sub>6</sub> des cingulären Kortex (Abb. 3.4-1A) und des Thalamus (Abb. 3.4-1B) waren im frontalen Teil in höheren Konzentrationen vorhanden als im okzipitalen Teil. Im Hypothalamus (Abb. 3.4-1C) und im Hippocampus (Abb. 3.4-1D) waren Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> im okzipitalen Teil dominierend gegenüber dem frontalen Teil.



**Abb. 3.4-1: Verteilung der Inositolphosphate im cingulären Kortex, im Thalamus, im Hypothalamus und im Hippocampus.** Gezeigt sind InsP Konzentrationen im cingulären Kortex (A), im Thalamus (B), im Hypothalamus (C) und im Hippocampus (D). Die Zahlen (2,3,4) kennzeichnen die Frontalschnitte, aus denen die Proben stammen. Frontalschnitt 2 repräsentiert den frontalen Teil und Frontalschnitt 4 kennzeichnet den okzipitalen Teil. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen den frontalen und okzipitalen Schnitte sind markiert: \* $p < 0,05$  Abgebildet sind die Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM.

### 3.5 Ableitung der InsP metabolisierenden Enzymaktivitäten

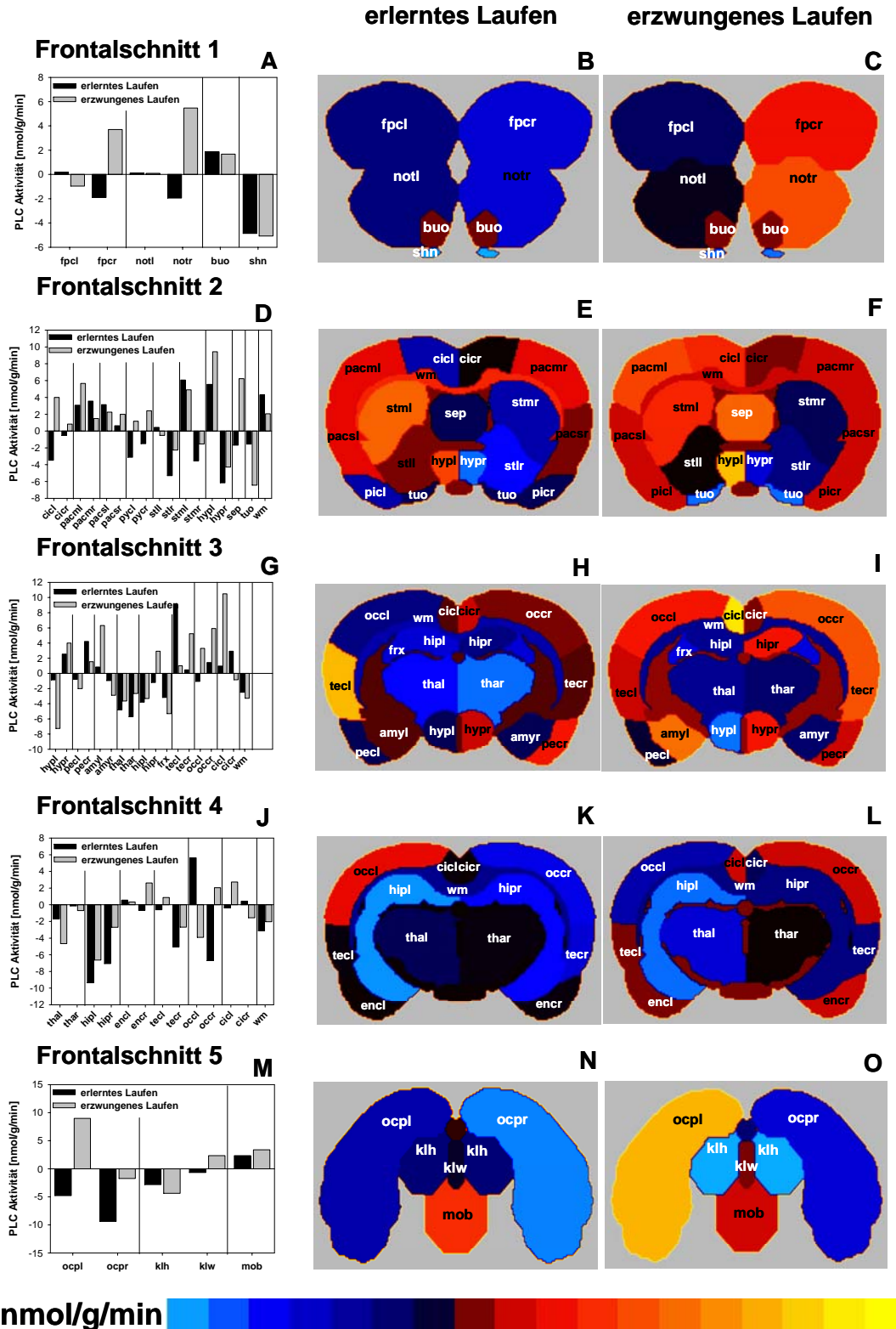
Aus den gemessenen InsP Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad lassen sich Rückschlüsse über die Aktivitätsänderungen einzelner InsP metabolisierender Enzyme ableiten. Dabei wurde für jedes InsP Isomer die jeweiligen Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad von der Kontrollgruppe subtrahiert. Dies wurde für jede Gehirprobe durchgeführt. Die erhaltenen  $\Delta$  InsP Konzentrationen wurden für das jeweilige InsP metabolisierende Enzym summiert. Die positive Werten entsprachen einer Aktivitätssteigerung, während die negativen Werte eine Aktivitätsreduktion der InsP metabolisierenden Enzyme anzeigten.



### 3.5.1 Ableitung der Änderung der PLC

Die PLC katalysiert die Hydrolyse des Membranphospholipids  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zu DAG und  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  [Berridge, 1993]. Für die Ableitung der Änderung der PLC wurde  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  nach folgendem Berechnungsmodus bestimmt:  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}} = \Delta \text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3 + \Delta \text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4 + \Delta \text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3 + \Delta \text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5 + \Delta \text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4 / \text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4 + \Delta \text{InsP}_6$ . Bei den berechneten  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Werten handelt es sich um annähernd reale  $\Delta$ -Werte, da die Anstiege der direkten Dephosphorylierungsprodukte von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ , dieses sind mehrere  $\text{InsP}_2$  und  $\text{InsP}$  Isomere, nicht analysiert wurden. Zudem wurde angenommen, dass keine signifikanten  $\text{InsP}_6$  Dephosphorylierungen in der Versuchszeit stattfanden. Die Abschätzung von  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  erfasst nur den Teil der PLC Aktivität, der zu anabolen Folgenreaktionen führt.

Die Gehirnregionen des Frontalschnitt 1 zeigten nach erlernten und erzwungenem Laufen im Laufrad Änderungen in der Aktivität von  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  (Abb. 3.5.1-1A). Im rechten frontopolen Kortex (fpcr) und im rechten Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notr) wurde nach erlerntem Laufen im Laufrad eine Abnahme der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität beobachtet, während nach erzwungenem Laufen im Laufrad eine Steigerung der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität erfasst wurde (Abb. 3.5.1-1B und C). Der Bulbus olfactorius (buo) zeigte nach beiden Bedingungen eine  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivitätssteigerung, wobei in den Sehnerven nach beiden Bedingungen eine  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivitätsreduktion beobachtet wurde (Abb. 3.5.1-1B und C). Im Frontalschnitt 2 wurde für den cerebralen Kortex eine Abnahme der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität nach erlerntem Laufen im Laufrad beobachtet, während nach erzwungenem Laufen im Laufrad die Aktivität von  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  gesteigert war (Abb. 3.5.1-1D). Eine Ausnahme bildete der parietale Kortex (pac), der nach beiden Bedingungen eine  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivitätszunahme aufwies (Abb. 3.5.1-1E und F). Im Striatum (str), Hypothalamus (hyp), Septum (sep) und Tuberculum olfactorium (tuo) wurde eine Änderung der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität sowohl nach erlernten und erzwungenem Laufen im Laufrad beobachtet als auch zwischen der linken und rechten Gehirnhälfte (Abb. 3.5.1-1D). Dagegen wies die weiße Substanz nach erlernter und erzwungener Bewegung im Laufrad eine Zunahme der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität auf (Abb. 3.5.1-1E und F). Im Frontalschnitt 3 wurde für den cerebralen Kortex eine  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivitätssteigerung nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad beobachtet (Abb. 3.5.1-1G bis I). Demgegenüber zeigte sich im Thalamus (tha), im Hippocampus (hip) und in der weißen Substanz (wm) eine Abnahme der PLC Aktivität nach beiden Bedingungen (Abb. 3.5.1-1H und I). Eine  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivitätsverminderung wurde auch im Thalamus (tha), im Hippocampus (hip) und in der weißen Substanz (wm) des Frontalschnitts 4 beobachtet (Abb. 3.5.1-1K und L).



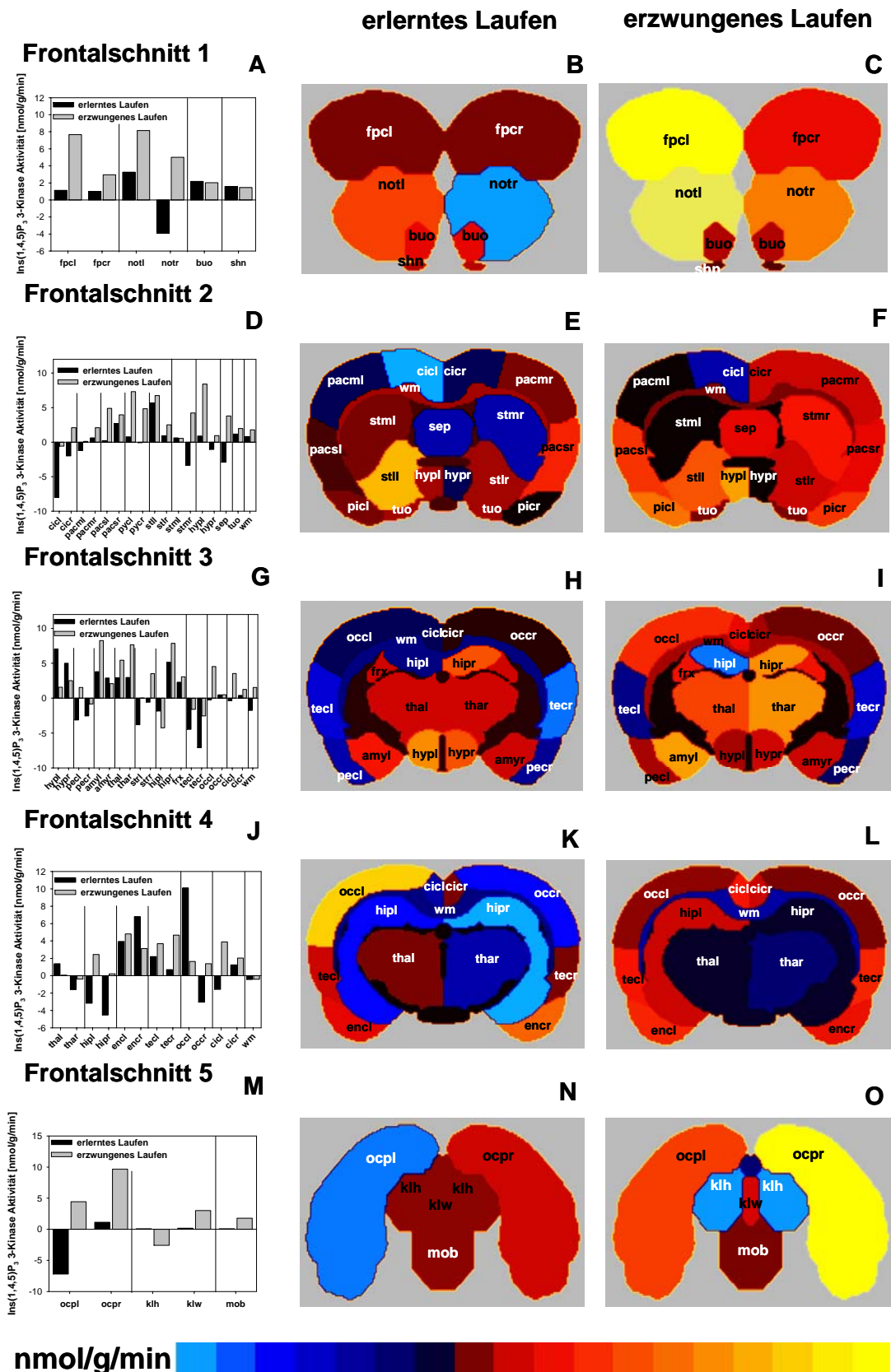
**Abb. 3.5.1-1: Veränderung von PLC<sub>anabol</sub> nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Dargestellt sind die Aktivitätsänderungen von  $\Delta$  PLC<sub>anabol</sub> im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad. Die Konzentrationszunahme von  $\Delta$  PLC<sub>anabol</sub> spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in Tab. 3.3.1-1 gezeigt.

Im okzipital Pol (ocp) wurde nach erlerntem Laufen im Laufrad eine reduzierte  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität beobachtet (Abb. 3.5.1-1M und N), gleichzeitig wurde nach erzwungenem Laufen im Laufrad eine Steigerung der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität im linken okzipital Pol (ocpl) erfasst (Abb. 3.5.1-1M und O). Die Kleinhirnregionen zeigten nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad unterschiedlich veränderte  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivitäten (Abb. 3.5.1-1N und O). In der Medulla oblongata (mob) war nach beiden Bedingungen die Aktivität der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  erhöht (Abb. 3.5.1-1N und O).

### 3.5.2 Ableitung der Änderung der Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase

Die Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  zum Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$  [Xia & Yang, 2005]. Die Ableitung der Änderung der Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität erfolgte nach folgendem Berechnungsmodus:  $\Delta \text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{-3-Kinase} = (\Delta \text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4 + \Delta \text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3 + \Delta \text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5 + \Delta \text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4 / \text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4 + \Delta \text{InsP}_6) - \Delta \text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .

Der frontopolare Kortex (fpc), der linke Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notl), der Bulbus olfactorius (buo) und die Sehnerven (shn) wiesen nach erlerntem Laufen im Laufrad eine Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitätszunahme auf, dagegen war im rechten Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notr) die Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität reduziert (Abb. 3.5.2-1A und B). Erzwungenes Laufen im Laufrad führte in allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 zu einer Steigerung der Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität (Abb. 3.5.2-1A und C). Die Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 zeigten nach erlerntem Laufen im Laufrad eine Reduktion der Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität, jedoch wurde im parietalen Kortex (pacmr und pacsr), im linken piriformen Kortex (picl), im lateralen Striatum (stl) und im linken medialen Striatum (stml), im linken Hypothalamus (hypl), im Tuberculum olfactorium (tuo) und in der weißen Substanz (wm) eine Zunahme beobachtet (Abb. 3.5.2-1D und E). Dagegen führte erzwungenes Laufen im Laufrad in den meisten Gehirnregionen des Frontalschnitt 2, mit Ausnahme des linken cingulären Kortex (cicl), zu einer Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitätssteigerung (Abb. 3.5.2-1D und F). Erlerntes Laufen im Laufrad verursachte veränderte Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitäten in nahezu allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 (Abb. 3.5.2-1G). Der Hypothalamus (hyp), die Amygdala (amy), der Thalamus (tha), der rechte Hippocampus (hipr), der Fornix (frx), der rechte okzipitale Kortex (occr) und der cinguläre Kortex (cicr) wiesen eine Zunahme der Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität auf, während in den anderen Gehirnregionen die Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität erniedrigt war (Abb. 3.5.2-1H).



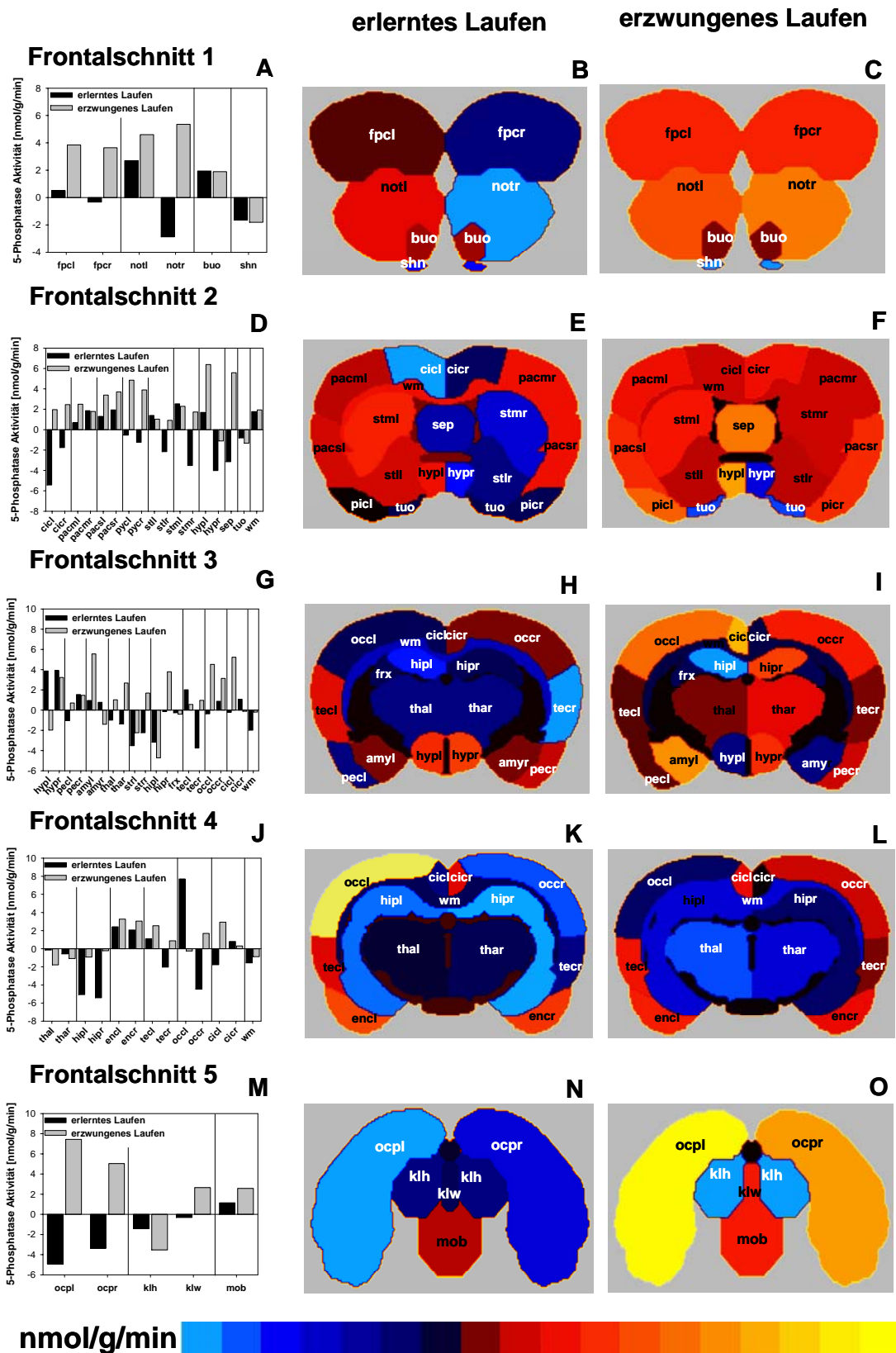
**Abb. 3.5.2-1: Veränderung der  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Dargestellt sind die Aktivitätsänderungen von  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.

Erzwungenes Laufen im Laufrad führte zu einer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitätsreduktion im rechten piriformen mit entorhinalem Kortex (pecr), im linken Hippocampus (hipl) und im temporalen Kortex (tec), dagegen zeigten die anderen Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 eine Zunahme (Abb. 3.5.2-1I). Im Frontalschnitt 4 wurde in den meisten Gehirnregionen eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitätsverminderung nach erlerntem Laufen im Laufrad beobachtet, nur der linke Thalamus (thal), der entorhinale (enc), der temporale (tecl), der linke okzipitale (occl) sowie der rechte cinguläre Kortex (cicr) zeigten eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase Aktivitätssteigerung (Abb. 3.5.2-1J und K). Erzwungenes Laufen im Laufrad bewirkte in nahezu allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 4 eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitätszunahme, nur der rechte Thalamus (thar) und die weiße Substanz bildeten eine Ausnahme (Abb. 3.5.2-1J und L). Im Frontalschnitt 5 zeigte der linke okzipital Pol (ocpl) eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivitätsverringerng, während der rechte okzipital Pol eine Steigerung aufwies (Abb. 3.5.2-1M und N). Erzwungenes Laufen verursachte eine erhöhte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität im okzipital Pol (ocp), im Kleinhirnwurm (klw) und in der Medulla oblongata (mob), dagegen zeigten die Kleinhirnhemisphären (klh) eine Abnahme (Abb. 3.5.2-1M und O).

### 3.5.3 Ableitung der Änderung der $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase

Die 5-Phosphatase dephosphoryliert  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zum  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  sowie  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  zum  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  [Erneux *et al.*, 1998]. Es wird nur die  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase abgeleitet, da das Isomer  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  nicht nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Annahme ist, dass  $\text{InsP}_5$  und seine Folgeprodukte überwiegend über  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3 \rightarrow \text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4 \rightarrow \text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und nicht durch direkte Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  gebildet werden. Diese wird durch Arbeiten in humanen Zellen unterstützt [Miller *et al.*, 2005]. Die Ableitung der Änderung der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase wurde nach folgendem Berechnungsmodus bestimmt:  $\Delta \text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4\text{-5-Phosphatase} = (\Delta \text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3 + \Delta \text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5 + \Delta \text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4 / \text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4 + \Delta \text{InsP}_6) - \Delta \text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ .

Die  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität war in den meisten Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 nach erlerntem Laufen im Laufrad erhöht, eine Ausnahme bildeten der rechte frontopolare Kortex (fpcr) und Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notr) sowie die Sehnerven (shn) (Abb. 3.5.3-1A und B). Erzwungenes Laufen führte in allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 1, außer in den Sehnerven, zu einer  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivitätssteigerung (Abb. 3.5.3-1A und C).

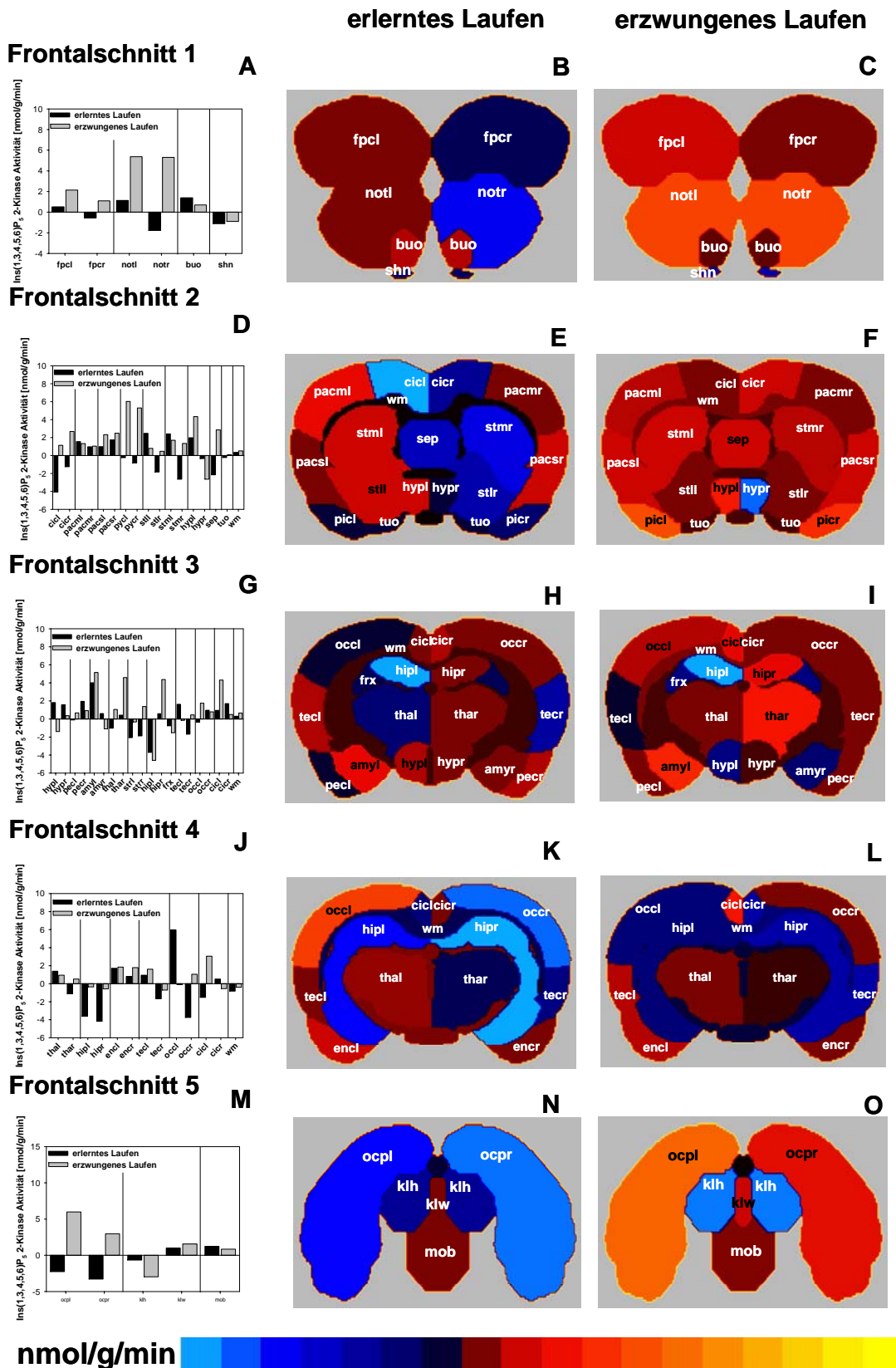


**Abb. 3.5.3-1: Veränderung der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Dargestellt sind die Aktivitätsänderungen von  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.

Erlernetes Laufen im Laufrad bewirkte im parietalen Kortex (pac), im linken lateralen (stll) und medialen Striatum (stml), im linken Hypothalamus (hypl) und in der weißen Substanz (wm) des Frontalschnitts 2 eine  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivitätszunahme, während die restlichen Gehirnregionen dieses Frontalschnitts eine Reduktion aufwiesen (Abb. 3.5.3-1D und E). Erzwungenes Laufen führte in allen Gehirnregionen, mit Ausnahme des rechten Hypothalamus (hypr) und des Tuberculum olfactorium (tuo), zu einer  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivitätssteigerung (Abb. 3.5.3-1D und F). Der Thalamus (tha), der Hippocampus (hip), der rechte temporale (tecr), der linke okzipitale (occl) und der linke cinguläre Kortex sowie die weiße Substanz (wm) des Frontalschnitts 3 zeigten nach erlerntem Laufen im Laufrad eine Reduktion der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität (Abb. 3.5.3-1G und H). Die anderen Gehirnregionen dieses Frontalschnitts wiesen eine  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivitätszunahme auf. Erzwungenes Laufen im Laufrad rief eine Steigerung der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität in nahezu allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 3 hervor, jedoch zeigten der linke Hypothalamus (hypl), die rechte Amygdala (amyr), der linke Hippocampus (hipl) und die weiße Substanz (wm) eine verminderte  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität (Abb. 3.5.3-1G und I). Im Thalamus (tha), Hippocampus (hip) und in der weißen Substanz (wm) des Frontalschnitts 4 wurden sowohl nach erlerntem als auch nach erzwungenem Laufen im Laufrad eine Abnahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität beobachtet (Abb. 3.5.3-1K und L). Die einzelnen Regionen des cerebralen Kortex wiesen nach beiden Bedingungen unterschiedliche Änderungen der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität auf (Abb. 3.5.3-1K und L). Erlernetes Laufen im Laufrad löste in nahezu allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 5, mit Ausnahme der Medulla oblongata (mob), eine  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivitätsverminderung aus (Abb. 3.5.3-1M und N). Nach erzwungenem Laufen im Laufrad wurde in den Kleinhirnhemisphären (klh) eine Abnahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität beobachtet, dagegen zeigten die anderen Gehirnregionen des Frontalschnitts 5 eine  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivitätszunahme (Abb. 3.5.3-1M und O).

#### 3.5.4 Ableitung der Änderung der $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase

$\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase katalysiert die Bildung von  $\text{InsP}_6$  aus  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  [Verbsky<sup>b</sup> *et al.*, 2005]. Die Ableitung der Änderung der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase Aktivität erfolgte nach folgendem Berechnungsmodus:  $\Delta \text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase =  $\Delta \text{InsP}_6$  — ( $\Delta \text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  —  $\Delta \text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4 / \text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ ).



**Abb. 3.5.4-1: Veränderung der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Dargestellt sind die Aktivitätsänderungen von  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase im Frontalschnitt 1 (A-C), im Frontalschnitt 2 (D-F), im Frontalschnitt 3 (G-I), im Frontalschnitt 4 (J-L) und im Frontalschnitt 5 (M-O) nach erlerntem und erzwungenem Laufen. Die Konzentrationszunahme von  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase spiegelt der rot-gelbe Farbbereich wieder, dagegen ist die Abnahme durch blaue Farben gekennzeichnet. Die Bezeichnung der Gehirnregionen ist in **Tab. 3.3.1-1** gezeigt.



Der rechte frontopolare Kortex (fpcr) und Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (notr) sowie die Sehnerven (shn) des Frontalschnitts 1 zeigten nach erlerntem Laufen im Laufrad eine Abnahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$  Aktivität. Die anderen Gehirnregionen dieses Frontalschnitts wiesen eine Erhöhung auf (Abb. 3.5.4-1A und B). Erzwungenes Laufen im Laufrad verursachte in nahezu allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 1 eine  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$  Aktivitätssteigerung, nur die Sehnerven (shn) wiesen eine Aktivitätsreduktion auf (Abb. 3.5.4-1A und C). Erlerntes Laufen im Laufrad bewirkte im cingulären Kortex (cic), im piriformen Kortex (pic), im rechten lateralen (stlr) und medialen Striatum (stmr) sowie im Septum (sep) und im Tuberculum olfactorium (tuo) des Frontalschnitts 2 eine Abnahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$  Aktivität (Abb. 3.5.4-1D und E). Die anderen Gehirnregionen dieses Frontalschnitts zeigten eine Aktivitätssteigerung. Erzwungenes Laufen im Laufrad führte in allen Gehirnregionen des Frontalschnitts 2 zu einer Steigerung der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$  Aktivität, nur der rechte Hypothalamus zeigte eine Abnahme (Abb. 3.5.4-1D und F). Der linke Thalamus (thal), der linke Hippocampus (hipl), der Fornix (frx), der rechte temporale (tecr) sowie der linke okzipitale Kortex (occl) des Frontalschnitts 3 wiesen nach erlerntem Laufen im Laufrad eine Reduktion auf (Abb. 3.5.4-1G und H). Erzwungenes Laufen im Laufrad verursachte in den meisten Gehirnregionen des Frontalschnitts 4 eine Aktivitätssteigerung der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$ . Jedoch zeigten der linke Hypothalamus (hypl), die rechte Amygdala (amyr), der linke Hippocampus (hipl), der Fornix (frx) und der linke temporale Kortex (tecl) eine Verminderung (Abb. 3.5.4-1G und I). Auch im Frontalschnitt 4 wurde für den rechten Thalamus (thar), den Hippocampus (hip), dem rechten temporalen (tecr) und okzipitalen Kortex (occr) sowie dem linken cingulären Kortex (cicl) und der weißen Substanz (wm) nach erlerntem Laufen im Laufrad eine Abnahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$  Aktivität erfasst (Abb. 3.5.4-1J und K). Die restlichen Gehirnregionen des Frontalschnitts 4 zeigten eine Aktivitätssteigerung. Erzwungene körperliche Bewegung im Laufrad bewirkte eine Aktivitätsabnahme des Enzyms im Hippocampus (hip), im rechten temporalen (tecr) und cingulären Kortex (cicr) sowie in der weißen Substanz, während der Thalamus (tha), der entorhinale (enc) und okzipitale Kortex (occ) sowie der linke temporale (tecl) und cinguläre Kortex (cicl) eine gesteigerte Enzymaktivität aufwiesen (Abb. 3.5.4-1J und L). Im okzipital Pol (ocp) und in den Kleinhirnhemisphären (klh) wurden nach erlerntem Laufen eine Reduktion der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$  Aktivität erfasst (Abb. 3.5.4-1M und N). Erzwungenes Laufen im Laufrad führte im okzipital Pol (ocp), im Kleinhirnwurm (klw) und in der Medulla oblongata (mob) zu einer gesteigerten  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5\text{-2-Kinase}$  Aktivität (Abb. 3.5.4-1M bis O).

## 4 Diskussion

In den achtziger Jahren wurde erstmals  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  als  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierender *second messenger* beschrieben [Streb *et al.*, 1983]. Seitdem haben zahlreiche Arbeitsgruppen weitere Inositolphosphate gefunden und hinsichtlich ihrer biologischen Funktion untersucht. Allerdings gibt es bisher keine ausführlichen und spezifischen Untersuchungen in Bezug auf mögliche biologische Funktionen der Inositolphosphate im Gehirn der Ratte. In dieser Arbeit wurden regionale Unterschiede und die biologische Rolle der Inositolphosphate im Gehirn der Ratte charakterisiert.

### 4.1 Beeinflussung der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte mittels verschiedener Fixierungstechniken

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine Fixierungstechnik etabliert werden, die es ermöglicht, ausreichend fixiertes Gehirngewebe zu erhalten, um die InsP Konzentrationen in den einzelnen Gehirnregionen und Nuklei untersuchen zu können.

In der Literatur sind die Bestimmungen der InsP Konzentrationen und anderer metabolischer Verbindungen ausschließlich mit unfixierten Gehirngewebe durchgeführt worden [Grases *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001], daher diente unfixiertes Gehirngewebe in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle für die Etablierung einer Fixierungstechnik. Die InsP Isomere  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_6$  können im unfixierten Gehirngewebe mittels Micro-MDD-HPLC detektiert werden (Abb. 3.1.1-1). Die ermittelten InsP Konzentrationen stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. So kommen die Isomere,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_6$  in den höchsten Konzentrationen vor [Martin *et al.*, 1987; Szwegold *et al.*, 1987; Stephens *et al.*, 1988], während  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind [Yang *et al.*, 2001]. Darüber hinaus ist eine  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration von  $0,59 \pm 0,10$  nmol/g Fg im Kleinhirn der Ratte vorhanden. Der Wert liegt in der gleichen Größenordnung, wie von Jun *et al.* [1998] berichtet, obwohl dieser im Hippocampus der Maus ( $0,61 \pm 0,15$  nmol/g Fg) festgestellt wurde. Erstmals konnte im Nagetierkleinhirn eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration von  $1,00 \pm 0,11$  nmol/g Fg mittels Micro-MDD-HPLC detektiert werden (Abb. 3.1.1-2). Bisher konnte nur durch Radiorezeptor Assay eine  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration von  $43,9 \pm 4,8$  pmol/mg Protein für das gesamte Mausgehirn festgestellt werden [Jun *et al.*, 1998], diese entspricht etwa 2 nmol/g Feuchtwicht. Die *post mortem*

gemessenen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Spiegel können jedoch nicht die *in vivo* Konzentrationen widerspiegeln, da die PLC vermutlich auf Grund einer zellulären Ca<sup>2+</sup> Erhöhung noch aktiv ist, welche die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> katalysiert, die dann zu einem erhöhten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Spiegel führt [Ito, 2001].

Die Präparation von unfixiertem Gehirngewebe ist nicht für die Untersuchung von regionalen Unterschieden in der InsP Konzentration geeignet. Das frische Gehirngewebe ist einerseits für eine exakte Präparation in verschiedene Gehirnregionen zu weich und andererseits wird die Zeit zu lang, die für die Präparation des ganzen Gehirns in einzelne Gehirnregionen erforderlich ist. Folglich würden sich auch die InsP Konzentrationen verändern, da die Enzyme des InsP Metabolismus noch aktiv sind.

Eine mögliche Alternative für die unfixierte Gehirngewebepreparation sind Präparationen mit Gefrierschnitten [Romeis, 1989: S. 71 – 111]. Diese Methode ist jedoch für die Zielsetzung dieser Arbeit ungeeignet, weil die Gefrierschnitte für eine weitere Präparation in verschiedene Gehirnregionen zu dünn sind (etwa 10 µm). Das minimale Feuchtgewicht der Proben, aus welchem sich Inositolphosphate mittels Micro-MDD-HPLC analysieren lassen, beträgt 15 – 25 mg Fg. Somit sind die Gewebeproben aus den Gefrierschnitten für die InsP Analyse zu klein, zudem besteht die Gefahr, dass die Inositolphosphate beim Auftauen des Gewebes verloren gehen bzw. metabolisiert werden.

Eine andere Möglichkeit ist die PFA Fixierung. Deshalb wurde der Effekt der PFA Fixierung auf die Inositolphosphate im Gehirn getestet. Hierfür wurde PFA mit HEPES (pH 7,0) gepuffert, anstelle von dem üblich genutzten Phosphatpuffer, da dieser zusammen mit den Inositolphosphaten extrahiert wird und das Phosphat die anschließende MDD-HPLC Analyse beeinflussen würde. Bei der PFA Fixierung wird zwischen Immersions- und Perfusionsfixierung unterschieden, beide Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit getestet.

Bei der Immersionsfixierung wird das Gehirngewebe in die Fixierungslösung für 3 Tage bei 4 °C eingelegt. Die Immersionsfixierung hat trotz leichter Durchführung einige Mängel. Ein Nachteil dieser Methode sind die zeitlichen Unterschiede der fixierten Gehirnteile. Da die Diffusion von außen nach innen erfolgt, werden innere Regionen viel später fixiert als äußere. Die Konsequenz ist damit eine irreguläre Gewebekonservierung. Ein weiterer Nachteil ist der zeitliche Aufwand [Romeis, 1989]. Nach 3 Tagen ist das Gewebe immer noch zu weich ist, um eine präzise Präparation zu ermöglichen. Zudem zeigte sich eine erhebliche Konzentrationsreduktion aller wichtigen Inositolphosphate, z.B. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> (Abb. 3.1.2.1-1). Mögliche Ursachen für die Abnahme der InsP Konzentrationen sind der Einfluss der

Fixierungslösung selbst oder vorhandene metabolisch aktive InsP Phosphatasen [Majerus *et al.*, 1999].

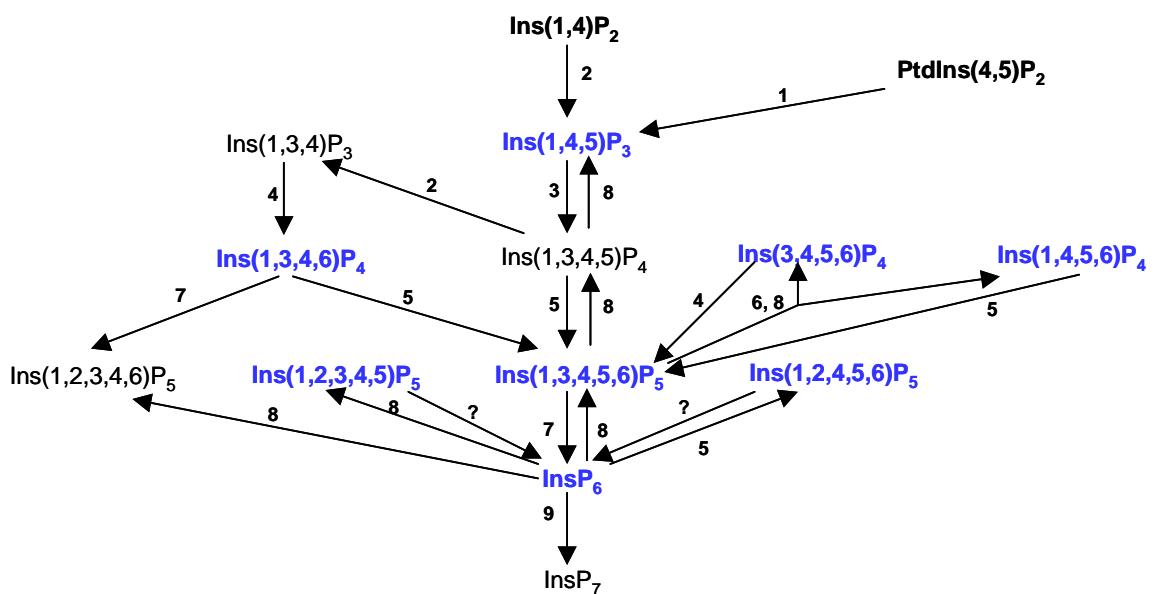
Aufgrund der Mängel der Immersionsfixierung wurde eine effizientere Fixierung, die transkardiale Perfusionsfixierung, verwendet. Hierbei wird das ganze Tier über den Gefäßweg mit der Fixierungslösung durchgespült [Lorke & Lauer, 1990]. Diese Methode verkürzt die Dauer des Fixierungsprozesses und induziert eine gleichmäßig verteilte Fixierung [Romeis, 1989]. Die Perfusionsfixierung wurde bei Raumtemperatur und 4°C durchgeführt.

Die Perfusionsfixierung bei Raumtemperatur zeigte gegenüber dem unfixierten und immersionsfixierten Gehirngewebe einen besseren Fixierungseffekt und deutlich gehärtetes Gewebe, das eine exakte Präparation der Gehirnregionen erlaubt. Trotzdem wurde erneut eine beachtliche Verminderung der InsP Konzentrationen beobachtet, die in der gleichen Größenordnung liegt wie bei der Immersionsfixierung (Abb. 3.1.2.2-1). Die Abnahme der Inositolphosphate wird vermutlich nicht direkt durch die Fixierungslösung hervorgerufen, vielmehr kann die InsP Verringerung vorhandenen Aktivitäten InsP metabolisierender Enzyme zugeschrieben werden.

Für die weiteren Versuche wurde sämtliches Gehirngewebe einer Perfusionsfixierung bei 4 °C unterzogen, da sich bei den Isomeren Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> geringere Konzentrationsveränderungen zeigten, verglichen mit dem unfixierten Gehirngewebe (Abb. 3.1.2.2-2). Nur bei Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> sowie Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> zeigten sich signifikante Veränderungen, wobei Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> reduziert und Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> sowie Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> signifikant erhöht waren (Abb. 3.1.2.2-2). Anscheinend sind InsP Phosphatasen, trotz Temperaturen von 4 °C noch schwach aktiv und verursachen somit Veränderungen in einigen InsP Konzentrationen. Diese Feststellung deckt sich auch mit den Zeit-Verlaufs Experimenten (Abschnitt 3.2). Die InsP Konzentrationen der perfusionsfixierten Kleinhirnproben (4 °C) nahmen mit der Zeit ab (Abb. 3.2-1). Nach einer Woche erreichen die Inositolphosphate nur noch 3 – 10 % ihrer Ausgangskonzentration. Die zeitabhängige Verminderung der Inositolphosphate kann durch InsP Phosphatase Aktivitäten erklärt werden.

Mögliche InsP Phosphatase Kandidaten, die für die Veränderung der InsP Konzentrationen bei der Perfusionsfixierung (4°C) in Frage kommen, sind in Abb. 4.1-1 dargestellt. Die MIPP [Shears, 1998], die InsP<sub>6</sub>/Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-3-Phosphatase (PTEN) [Nogimori *et al.*, 1991] und 5-Phosphatase [Majerus *et al.*, 1999] sind für die InsP Konzentrationsveränderungen am wahrscheinlichsten. Das Enzym MIPP ist in intakten Zellen auf das Lumen des ER beschränkt und baut mehrere hochphosphorylierte Inositole ab [Yu *et al.*, 2003]. Die Gewebefixierung bewirkt vermutlich immer Membranrisse, folglich

kann es zur Freisetzung von MIPP in das Zytosol kommen. Hierdurch werden  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_6$  metabolisiert, dieses führt zu einer signifikanten Reduzierung dieser Inositolphosphate und bewirkt zugleich eine Erhöhung von  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ . Die MIPP Aktivität erklärt die  $\text{InsP}$  Veränderungen in schlecht fixiertem Gewebe, aber nicht in perfusionsfixiertem Gehirngewebe, da dieses gut konservierte Zellmembranen aufweist [Lorke & Lauer, 1990]. Offenbar sind andere Enzyme für die Veränderungen der  $\text{InsP}$  Spiegel im perfusionsfixiertem Gehirngewebe verantwortlich. PTEN könnte die Verringerung von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  sowie  $\text{InsP}_6$  [Nogimori *et al.*, 1991] und die 5-Phosphatase [De Smedt *et al.*, 1994; De Smedt *et al.*, 1996] die Reduktion von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  erklären.



**Abb. 4.1-1: Ausschnitt aus dem  $\text{InsP}$  Metabolismus in tierischen Zellen.** Dargestellt sind die Konversionswege der Inositolphosphate in tierischen Zellen. Die  $\text{InsP}$  Isomere, die in den Untersuchungen nachgewiesen wurden, sind blau markiert. Die Zahlen bezeichnen die Enzyme, welche die Syntheseschritte katalysieren: 1. PLC, 2. 5-Phosphatase, 3.  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase, 4.  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6-Kinase/ $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase, 5. IPMK, 6.  $\text{InsP}_5$ -Phosphatase, 7.  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase, 8. MIPP, 9.  $\text{InsP}_6$ -Kinase. Verändert nach [Irvine & Schell, 2001; Shears, 2004; Yu *et al.*, 2003].

Trotz der beobachteten unvollständigen Konservierung des metabolischen *in vivo* Status der Inositolphosphate ist die Perfusion bei 4 °C die passende Fixierungstechnik für die Zielsetzung dieser Arbeit. Die Technik erlaubt eine exakte Präparation der Gehirne in definierte Regionen und Nuklei sowie eine repräsentative *ex vivo* Analyse des metabolischen Status der Inositolphosphate. Weiterhin ermöglicht die Perfusionsfixierung bei 4 °C die Identifizierung von Unterschieden in den  $\text{InsP}$  Konzentrationen in definierten Gehirnregionen. Zu diesem Zweck wurde das Striatum, eine sehr heterogene Gehirnstruktur, ausgewählt. Das Striatum konnte in einen lateralen und medialen Teil

differenziert werden (Abb. 3.1.2.2-3). Diese Gehirnregion ist in die motorische Kontrolle [Hourez *et al.*, 2005] und in kognitive Funktionen involviert [Rogers *et al.*, 2001], indem es *inputs* aus dem cerebralen Kortex integriert [Hourez *et al.*, 2005]. Im Striatum konnten regionale Unterschiede in der InsP Verteilung sowohl in der medio-lateralen als auch in der fronto-okzipitalen Ausdehnung demonstriert werden (Abb. 3.1.2.2-4). Das Isomer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ist in medialen und okzipitalen Teilen in höheren Konzentrationen vorhanden als in frontalen oder lateralen Teilen. Dagegen ist  $\text{InsP}_6$  in okzipitalen Teilen höher konzentriert, während  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  lateral vorherrschend ist (Abb. 3.1.2.2-4). Das Vorkommen dieser Inositolphosphate im Striatum stimmt mit anderen Studien überein, die gezeigt haben, dass  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{InsP}_6$  Bindungsstellen [Parent & Quirion, 1994] ebenso wie  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Rezeptoren [Rodrigo *et al.*, 1993] im Striatum stark exprimiert werden. Diese Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die spezifischen  $\text{InsP}_6$  Bindungsstellen und  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Rezeptoren weit verbreitet sind, aber besonders in Regionen mit neuronalen Perikarien angereichert sind. Die regionalen Unterschiede in den InsP Konzentrationen des Striatums können zum Teil mit den Unterschieden in der striatalen neuronalen Dichte im Zusammenhang stehen. Ursachen für diese regionalen Unterschiede in den  $\text{InsP}_3$  bzw. anderen InsP Konzentrationen können auch Abweichungen in der Calciumregulation oder in der differentiellen Modulation des dopaminergen Stoffwechsels sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine konservierende Fixierungstechnik, die den Status des InsP Metabolismus relativ zeitnah bei der Stopplung der Vitalfunktion widerspiegelt, etabliert wurde. Bei der Fixierungstechnik wird ausreichend gehärtetes Gehirngewebe erhalten. Dies ermöglicht nun exakte Gehirnpräparationen in definierte Regionen und Nuklei innerhalb einer Stunde und zeigt nur geringe, für differenzielle Analysen akzeptable Veränderungen in den InsP Konzentrationen. Die Fixierungstechnik kann daher gut für Studien zur Untersuchung von regionalen Unterschieden und funktionellen Veränderungen der InsP Konzentrationen genutzt werden.

## 4.2 Regionale Unterschiede in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte

### 4.2.1 Vergleich der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte mit der Literatur

In eigenen Untersuchungen konnten erstmals die Konzentrationen von sechs Inositolphosphaten ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ , und  $\text{InsP}_6$ ) in verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen werden.

Die mittlere  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration im Rattenhirn ist  $10,12 \pm 0,34$  nmol/g Fg (Abb. 3.3.1-1A, D, G, J und M). Die kleinste  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration (3,75 nmol/g Fg) ist im

rechten Thalamus des Frontalschnitts 4 (Abb. 3.3.1-1J) und die höchste Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration (16,28 nmol/g Fg) ist im rechten okzipital Pol des Frontalschnitts 5 (Abb. 3.3.1-1M). Die gemessenen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentrationen können nicht direkt mit der gegenwärtigen Literatur verglichen werden, da es bislang nicht möglich war, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> im Rattenhirn mittels Micro-MDD-HPLC nachzuweisen. Allerdings zeigten Smith und Mitarbeiter [1991] eine Gesamtkonzentration an IP<sub>3</sub> von 14 nmol/g Fg im cerebralen Kortex von Ratten. Eine weitere Studie an Wistar-Ratten konnte durch Gas-Chromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie eine Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration von  $4,02 \pm 0,36 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  für das gesamte Rattengehirn ermitteln [Grases *et al.*, 2002]. Diese Diskrepanzen scheinen durch Unterschiede in der Tierart oder durch unterschiedliche Messmethoden hervorgerufen zu werden.

Der gefundene mittlere Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegel beträgt  $1,37 \pm 0,08 \text{ nmol/g Fg}$  (Abb. 3.3.2-1A, D, G, J und M). Die niedrigste Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration (0,10 nmol/g Fg) ist in der Medulla oblongata des Frontalschnitts 5 (Abb. 3.3.2-1M) und die höchste Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration (2,66 nmol/g Fg) im linken Hippocampus des Frontalschnitts 4 (Abb. 3.3.2-1J). Der mittlere Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegel der vorliegenden Arbeit ist deutlich höher als für Mäuse bestimmt. So wurde eine InsP<sub>4</sub> Konzentration von  $0,62 \pm 0,16 \text{ nmol/g Fg}$  im Hippocampus von Mäusen mittels MDD-HPLC gemessen [Jun *et al.*, 1998]. Regionen spezifische Unterschiede in der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration können nicht verantwortlich gemacht werden, denn in der vorliegenden Arbeit wurde ein Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Spiegel von  $1,88 \pm 0,39 \text{ nmol/g Fg}$  im Hippocampus der Wistar-Ratten ermittelt. Eine andere Studie konnte durch Ionen chromatographische Bestimmungen eine Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration von 0,9 nmol/g Feuchtgewicht für den cerebralen Kortex bei Ratten messen [Smith *et al.*, 1991]. Die Ursachen dieser Diskrepanzen liegen möglicherweise in der Verwendung unterschiedlicher Messtechniken.

Im Rattenhirn ergibt sich eine mittlere Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration von  $0,35 \pm 0,02 \text{ nmol/g Fg}$  (Abb. 3.3.3-1A, D, G, J und M). Dabei liegt die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration zwischen 0,12 nmol/g Fg im Bulbus olfactorius des Frontalschnitts 1 (Abb. 3.3.3-1A) und 0,61 nmol/g Fg im Tuberculum olfactorium des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.3-1D). Bisher ist es nicht gelungen, die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> Konzentration im Rattengehirn nachzuweisen, daher können die gemessenen Konzentrationen nicht mit Literaturwerten verglichen werden.

Die mittlere Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration im Rattenhirn ist  $4,27 \pm 0,11 \text{ nmol/g Fg}$  (Abb. 3.3.4-1A, D, G, J und M). Die niedrigste Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration (1,04 nmol/g Fg) ist in den Sehnerven des Frontalschnitts 1 (Abb. 3.3.4-1A) und die höchste Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Konzentration (6,45 nmol/g Fg) im Kleinhirnwurm des Frontalschnitts 5 (Abb. 3.3.4-1M). Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> ist das vorherrschende InsP<sub>5</sub> Isomer in allen

Gehirnregionen, was mit den Literaturbefunden übereinstimmt [Irvine & Schell, 2001]. Der in der Regel in schnell wachsenden Zelllinien mittels Isotopenmarkierungsanalysen bestimmte Spiegel an  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  liegt zwischen 15 – 50  $\mu\text{M}$  [Shears, 2003].

Die gemessene mittlere  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration beträgt  $0,44 \pm 0,02$  nmol/g Fg (Abb. 3.3.5-1A, D, G, J und M). Die niedrigste  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration (0,17 nmol/g Fg) ist im Bulbus olfactorius des Frontalschnitts 1 (Abb. 3.3.5-1A) und die höchste  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration (0,72 nmol/g Fg) im linken cingulären Kortex des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.5-1D). Die Micro-MDD-HPLC kann aufgrund der identischen Retentionszeiten nicht zwischen beiden Enantiomeren differenzieren [Irvine & Schell, 2001]. Jedoch ist eine separate Quantifizierung von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  unter Verwendung von Enantiomer-spezifischen Enzymanalysen möglich [Irvine & Schell, 2001]. Der gemessene  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Spiegel ist in der gleichen Größenordnung wie in der Literatur beschrieben [Jun *et al.*, 1998].

Das  $\text{InsP}_6$  Isomer kommt in den höchsten Konzentrationen in allen Gehirnregionen vor [Efanov *et al.*, 1997]. Die mittlere  $\text{InsP}_6$  Konzentration ( $13,54 \pm 0,35$  nmol/g Fg) im Gehirn der Ratte (Abb. 3.3.6-1A, D, G, J und M) ist im Einklang mit den Literaturwerten (10 – 15 nmol/g Feuchtgewicht) [Yang *et al.*, 2001]. Die niedrigste  $\text{InsP}_6$  Konzentration (7,39 nmol/g Fg) ist im linken Hypothalamus des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.6-1D) und die höchste  $\text{InsP}_6$  Konzentration (19,19 nmol/g Fg) ist im rechten medialen Striatum des Frontalschnitts 2 (Abb. 3.3.6-1D).

#### **4.2.2 Ursachen für die regionalen Unterschiede in den $\text{InsP}$ Konzentrationen im Gehirn der Ratte**

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig Unterschiede in den  $\text{InsP}$  Konzentrationen in definierten Gehirnregionen nachgewiesen werden.

Das Isomer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zeigt regionenspezifische Unterschiede in seiner Konzentration. So ist es in frontal (Abb. 3.3.1-1A und D) bzw. okzipital (Abb. 3.3.1-1M) liegenden Gehirnregionen höher konzentriert als in medial liegenden Gehirnregionen (Abb. 3.3.1-1G und J). Der Hypothalamus (Abb. 3.3.1-1D), Hippocampus (Abb. 3.3.1-1G) und Thalamus (Abb. 3.3.1-1J) besitzen sehr niedrige  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentrationen. Diese neuen Ergebnisse können mit der aktuellen Literatur nicht direkt verglichen werden, da bislang nur autoradiographische Studien für die Verteilung von  $\text{InsP}$  Bindungsstellen im Gehirn der Ratte durchgeführt wurden [Parent & Quirion, 1994; Rodrigo *et al.*, 1993]. Danach sind die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Bindungsstellen im Striatum, Hippocampus, Kleinhirn, Tuberculum



olfactorium, Substantia nigra und cingulären Kortex am höchsten konzentriert. Dagegen enthalten der Thalamus, Hypothalamus und Kerne des Hirnstammes nur wenig spezifische  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Bindungsstellen. Diese und die eigenen Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei den regionalen Unterschieden in der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Konzentration um eine unterschiedliche zelluläre Expression von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Rezeptoren in Neuronen und Gliazellen im Gehirn der Ratte handelt.

Das  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase Produkt,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , weist regionale Unterschiede in seiner Konzentration in einzelnen Gehirnregionen auf. Der Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium (Abb. 3.3.2-1A), der cinguläre Kortex (Abb. 3.3.2-1D), der piriforme mit entorhinalem Kortex (Abb. 3.3.2-1G) und der Hippocampus (Abb. 3.3.2-1J) zeigen hohe  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Konzentrationen. Hingegen weisen das Striatum (Abb. 3.3.2-1G), der Thalamus (Abb. 3.3.2-1J), das Kleinhirn und die Medulla oblongata (Abb. 3.3.2-1M) besonders niedrige  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Konzentrationen auf. Für das  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  ist kein direkter Vergleich mit der Literatur möglich, da es bisher keine Untersuchungen in Bezug auf die Verteilung der Konzentrationen dieses Isomers gibt. Allerdings beobachteten Parent und Quirion [1994] in autoradiographischen Studien, dass der Hippocampus, viele kaudale Regionen des Kortex und die Amygdala reichlich  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Bindungsstellen besitzen. Auch der frontopolare, der cinguläre, der piriforme und der entorhinale Kortex weisen eine Vielzahl von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Bindungsstellen auf, während der Thalamus, der Hypothalamus und die Kerne des Hirnstammes keine spezifischen  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Bindungsstellen zeigten. Zudem fanden mehrere Autoren Unterschiede in den Aktivitäten der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase im Gehirn der Ratte [Heacock *et al.*, 1990; Mailleux *et al.*, 1991]. Die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase Aktivitäten sind in den hippocampalen CA1 Pyramidenzellen, den Purkinje-Zellen des Kleinhirns, im cerebralen Kortex und im zentralen Kern der Amygdala am höchsten. Dagegen wurden geringe Aktivitäten im Thalamus, im Hypothalamus, im Hirnstamm und in Trakten mit viel weißer Substanz gefunden. Hintergrund für die regionalen Unterschiede in der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Konzentration könnten somit die Verteilung der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Bindungsstellen und die Aktivitäten der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase in definierten Gehirnregionen sein.

Das  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ , gebildet aus  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , ist in weit frontal liegenden Gehirnregionen höher konzentriert (Abb. 3.3.3-1A und D) als in medial und okzipital liegenden Gehirnregionen (Abb. 3.3.3-1G, J und M). Heacock *et al.* [1990] untersuchten die Aktivität der 5-Phosphatase, welche die Synthese von  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  aus  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  katalysiert [Majerus *et al.*, 1999], in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte. Sie fanden hohe 5-Phosphatase Aktivitäten im cerebralen Kortex, im Hippocampus, im Hypothalamus und im Kleinhirn. Die eigenen Ergebnisse zeigen in diesen Gehirnregionen aber eher geringe  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentrationen, somit erscheinen unterschiedliche 5-Phosphatase

Aktivitäten als Ursache für die regionalen Unterschiede im  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Spiegel weniger wahrscheinlich.

In nahezu allen Gehirnregionen der Ratte liegt die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration zwischen 3,17 und 4,88 nmol/g Fg (Abb. 3.3.4-1A, D, G, J und M). Eine Ausnahme sind der parietale Kortex (Abb. 3.3.4-1D), der okzipital Pol und das Kleinhirn (Abb. 3.3.4-1M), deren  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentrationen deutlich höher sind. Dagegen weisen der Bulbus olfactorius und die Sehnerven (Abb. 3.3.4-1A) sowie der linke Hypothalamus (Abb. 3.3.4-1D) reduzierte  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Spiegel auf. Das  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  kann durch die  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6-Kinase/ $\text{InsP}_4$ -1-Kinase [Abel *et al.*, 2001] und die IPMK [Chang *et al.*, 2002] synthetisiert werden. Beide Enzyme zeigen einen besonders hohen Expressionsspiegel im Gehirn, allerdings gibt es keine detaillierten regionalen Studien über die Aktivitäten der Enzyme. Somit können sie nicht als direkte Ursache für die regionalen Unterschiede in der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration angesehen werden.

Bei den  $\text{InsP}_4$  Isomeren  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  liegen die Konzentrationen zwischen 0,40 und 0,55 nmol/g Fg in fast allen Gehirnregionen (Abb. 3.3.4-1A, D, G, J und M). Allerdings zeigen der cinguläre Kortex (Abb. 3.3.5-1D), der Hippocampus (Abb. 3.3.5-1G), der linke okzipitale Kortex (Abb. 3.3.5-1J) und der linke okzipital Pol (Abb. 3.3.5-1M) deutliche Abweichungen. Möglicherweise sind, die für diese Isomere bekannten Funktionen, für die regionenspezifischen Unterschiede verantwortlich. In der gegenwärtigen Literatur wird  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  als ein physiologisch wichtiger Inhibitor von  $\text{Ca}^{2+}$  regulierten  $\text{Cl}^-$  Kanälen dargestellt [Irvine & Schell, 2001], während  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  indirekt die  $\text{Cl}^-$  Kanal Aktivität erhöht [Chang & Majerus, 2006].  $\text{Cl}^-$  Kanäle sind für die Regulation des Zellvolumens und des transepithelialen Transportes von Salz und Wasser sowie für die Modulation der elektrischen Erregbarkeit in Neuronen essentiell [Puljak & Kilic, 2006]. Es wäre denkbar, dass die Kanalsteuerungsfunktionen der beiden  $\text{InsP}_4$  Isomere die Ursache für die regionalen Unterschiede in der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ / $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentration im Gehirn der Ratte sind.

Das  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  2-Kinase Produkt,  $\text{InsP}_6$ , zeigt ebenfalls regionenspezifische Unterschiede. So ist es in frontal (Abb. 3.3.6-1D) und okzipital liegenden Gehirnregionen (Abb. 3.3.6-1M) höher konzentriert als in medialen Gehirnregionen (Abb. 3.3.6-1G und J). Parent und Quirion [1994] zeigten in autoradiographischen Studien eine Vielzahl von  $\text{InsP}_6$  Bindungsstellen im cingulären, parietalen, temporalen und entorhinalen Kortex sowie im Striatum und Hippocampus. Gleichzeitig waren in einigen Hypothalamus und Thalamus Kernen wenig  $\text{InsP}_6$  Bindungsstellen zu finden.  $\text{InsP}_6$  wird aus  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  durch die Aktivität der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase gebildet [Verbsky<sup>b</sup> *et al.*, 2005]. Die murine  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase wird verstärkt im Hippocampus, Kortex und in der Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert [Verbsky<sup>a</sup> *et al.*, 2005]. Zudem zeigen die

eigenen Ergebnisse eine enge Korrelation zwischen der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase und der PLC (Abb. 4.3.2.1-1E und F). Vermutlich ist eine veränderte  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase Aktivität, die passiv der PLC folgt, für die regionalen Unterschiede in der  $\text{InsP}_6$  Konzentration im Gehirn der Ratte verantwortlich.

Neben diesen regionenspezifischen Unterschieden in den  $\text{InsP}$  Konzentrationen existieren in etlichen Gehirnregionen Gradienten der  $\text{InsP}$  Konzentrationen. Besonders deutlich zeigt sich dieses im cingulären Kortex, Thalamus, Hypothalamus und Hippocampus (Abb. 3.4-1). Diese Gehirnregionen weisen einen fronto-okzipitalen Gradienten in der  $\text{InsP}$  Verteilung auf. Die Isomere  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{InsP}_6$  des cingulären Kortex (Abb. 3.4-1A) und des Thalamus (Abb. 3.4-1B) sind im frontalen Teil in höheren Konzentrationen vorhanden als im okzipitalen Teil. Dagegen sind  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_6$  des Hypothalamus (Abb. 3.4-1C) und des Hippocampus (Abb. 3.4-1D) im okzipitalen Teil dominierend gegenüber dem frontalen Teil. Aufgrund der in Abschnitt 4.1 diskutierten Maßnahmen zur Überprüfung der Veränderung der  $\text{InsP}$  Konzentrationen durch verschiedene Fixierungstechniken können methodische Aspekte im Hinblick auf diese Ergebnisse vernachlässigt werden. Weiterhin ließe sich als Ursache für die Unterschiede der  $\text{InsP}$  Konzentrationen in Betracht ziehen, dass die  $\text{InsP}$  metabolisierenden Enzyme innerhalb einer Gehirnregion unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Mailleux und Kollegen [1991] beschrieben in immunhistochemischen Untersuchungen für den Hippocampus, der im engeren Sinne das Ammonshorn (CA1-4) und den Gyrus dentatus umfasst [Schünke *et al.*, 2006; Lein *et al.*, 2007], dass die CA1 Pyramidenzellen höhere  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Spiegel aufweisen als der Gyrus dentatus. Gleichzeitig ist die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase mRNA in den CA2-4 Pyramidenzellen geringer als in den CA1 Pyramidenzellen und dem Gyrus dentatus. Sie vermuten, dass das Isomer  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , gebildet durch die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase, eine spezielle Rolle in den verschiedenen Strukturen des Ammonshorns einnimmt. Dagegen zeigten Verbsky und Kollegen [2005] in immunhistochemischen Analysen eine hohe Expression der murinen  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase in allen Strukturen des Hippocampus. Daraus lässt sich schließen, dass nicht ausschließlich  $\text{InsP}$  metabolisierende Enzyme für die  $\text{InsP}$  Konzentrationsunterschiede innerhalb einer Gehirnregion verantwortlich sind. Vielmehr scheinen die Gehirnregionen selbst, die sich aus verschiedenen Kernen und Area zusammensetzen für Gradienten in den  $\text{InsP}$  Konzentrationen verantwortlich zu sein. So beinhaltet der Hippocampus in der vorliegenden Arbeit die gesamte Hippocampusformation. Diese setzt sich aus dem Ammonshorn, dem Gyrus dentatus, dem Subiculum und der Area entorhinalis des Gyrus parahippocampalis zusammen. Das gleiche gilt für den cingulären Kortex, der in einen anterioren und posterioren Teil

differenziert werden kann sowie für den Thalamus und Hypothalamus, die sich aus vielen Kerngebieten zusammensetzen [Schünke *et al.*, 2006]. Allerdings bedürfen die Gradienten in den InsP Konzentrationen weiterer lokalisations-orientierter Charakterisierung.

#### 4.2.3 Hemisphärenunterschiede in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein deutlicher Unterschied der InsP Konzentrationen in der linken und rechten Gehirnhälfte der Ratte demonstriert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen erstmals, dass die gefundenen Seitenunterschiede in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte eine funktionelle Bedeutung haben könnten.

Hemisphärendifferenzen weisen die motorische Region des parietalen Kortex (Abb. 3.3.1-1D; Abb. 3.3.2-1D; Abb. 3.3.6-1D), der cinguläre Kortex (Abb. 3.3.1-1G und J) und der Thalamus (Abb. 3.3.6-1J) auf. Diese Gehirnareale bzw. Kerngebiete sind an motorischen Mechanismen und an der Koordination von Bewegungen beteiligt [Herrero *et al.*, 2002; McCoy & Platt, 2005]. Zudem sind deutliche Hemisphärenunterschiede im okzipitalen Kortex (Abb. 3.3.1-1G und J; Abb. 3.3.4-1J), der den visuellen Kortex beinhaltet [Palkovits & Brownstein, 1988], im piriformen Kortex (Abb. 3.3.4-1D), der die größte kortikale olfaktorische Region darstellt [Klejbor *et al.*, 2005] und im temporalen Kortex (Abb. 3.3.4-1J), der das auditorische System einschließt [Palkovits & Brownstein, 1988]. Der Hippocampus als Bestandteil des limbischen Systems zeigt ebenfalls eine klare Lateralisierung (Abb. 3.3.6-1G). Daneben weisen auch der frontopolare (Abb. 3.3.1-1A) und der entorhinale Kortex (Abb. 3.3.2-1J) Unterschiede in der InsP Konzentration zwischen der linken und rechten Gehirnhälfte auf. Der frontopolaren Kortex ist in kognitive Prozesse involviert und wird bei emotionalen Abläufen, Gedächtnisfunktionen und Stressreaktionen stimuliert [Merali *et al.*, 2004]. Dagegen ist der entorhinale Kortex eine essentielle neokortikal-hippocampale Schaltstation, in dem sensorische Informationen verschaltet werden [Egorov *et al.*, 2002]. Es zeigt sich somit eine deutliche Lateralisierung in Gehirnregionen, die mit motorischen und sensorischen Funktionen sowie mit dem limbischen System als auch mit Lernen und Gedächtnis assoziiert sind.

Diese Seitendifferenzen in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte sind bisher nur sehr wenig charakterisiert. Sarmah und Mitarbeiter [2005] beschrieben, dass Inositolpolyphosphate im Zebrafisch die konservierte links/rechts Asymmetrie regulieren. Die meisten Wirbeltiere besitzen eine konservierte Asymmetrie der inneren Organe, die schon während der Embryonalentwicklung entsteht. Daneben sind in der Ratte schon Asymmetrien auf neuronaler und Verhaltensebene beschrieben worden sowie für den

Neurotransmitter Dopamin [Thiel & Schwarting, 2001]. Xu und Mitarbeiter [2005] berichteten von unterschiedlichen Dopaminkonzentrationen und Rezeptoraktivitäten im linken und rechten Striatum bei Wistar-Ratten. Andere Studien zeigten eine asymmetrische Verteilung der hippocampalen Mineralocorticoid Rezeptoren bei Mäusen [Neveu *et al.*, 1998] sowie unterschiedliche Dopaminspiegel im linken und rechten medialen präfrontalen Kortex bei Ratten infolge von Stress [Sullivan & Gratton, 1998]. Als Ursache einer Asymmetrie werden vor allem neurochemische Verteilungsdifferenzen der Neurotransmitter, Rezeptoren und ihrer Subtypen diskutiert [Thiel & Schwarting, 2001]. Tang und Mitarbeiter [2003] vermuten, dass es sich bei der Asymmetrie von Neurotransmittern im Gehirn um adaptive Vorteile für den Organismus handelt. Frühere Studien sprechen dafür, dass die Hemisphärenunterschiede auch durch gesammelte Erfahrungen, Alter und Geschlecht bestimmt werden. So zeigten Tang und Zou [2002], dass Neuigkeitsreize im neonatalen Alter von Ratten in der CA1 Region des rechten Hippocampus die Langzeit-Potenzierung verstärken. Gleichzeitig beobachteten Verstynen und Kollegen [2001], dass Neuigkeitsreize im neonatalen Alter von Ratten die hippocampale volumetrische Asymmetrie modulieren. Aus diesen und den eigenen Befunden kann abgeleitet werden, dass Umweltmanipulationen im frühen Lebensalter, selektive Erhöhungen in der Neuronenzahl sowie Neuromodulatoren oder Neuroregulatoren eine Asymmetrie in den InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte hervorrufen können. Allerdings sind die molekularen und die physiologischen Mechanismen, welche die beobachteten Veränderungen vermitteln, noch nicht aufgeklärt.

### **4.3 Funktionelle Veränderungen der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Rolle der Inositolphosphate im Gehirn der Ratte zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde der Effekt von erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad auf die InsP Konzentrationen in definierten Gehirnregionen und Nuklei untersucht. Beim erlernten Laufen im Laufrad stehen die motorische Aktivität sowie Lern- und Gedächtnisprozesse im Vordergrund, während erzwungenes Laufen im Laufrad ein Modell für einen kombinierten akuten physischen und psychischen Stressor darstellt. Die Diskussion dieser Ergebnisse konzentriert sich besonders auf die durch erlernte bzw. erzwungene Bewegung im Laufrad initiierten Veränderungen in der Aktivität der InsP metabolisierenden Enzyme.

#### 4.3.1 Ursachen für die veränderten InsP Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals Veränderungen der InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad nachgewiesen werden. Die Veränderungen der InsP Konzentrationen sind vermutlich auf unterschiedliche Aktivitäten der InsP metabolisierenden Enzyme zurückzuführen. Im folgenden werden mögliche InsP metabolisierende Enzyme für jedes InsP Isomer vorgestellt.

Entsprechende Enzyme für die Veränderung der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad sind die PLC [Ito, 2001], die 5-Phosphatase [Majerus *et al.*, 1999] und die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase [Xia & Yang, 2005]. PLC katalysiert die Hydrolyse des Membranphospholipids PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, dabei entsteht Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und DAG [Ito, 2001]. Somit würde eine veränderte PLC Aktivität zu einem modifizierten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Spiegel führen. Die 5-Phosphatase hydrolysiert Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zum Ins(1,4)P<sub>2</sub> [Majerus *et al.*, 1999] und könnte folglich eine Reduktion der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration bewirken. Die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase phosphoryliert Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zum Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> und kann dementsprechend auch eine Verringerung des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Spiegels herbeiführen. Zudem wird der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration zugesprochen [Xia & Yang, 2005].

Die Veränderung der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration nach erlernter und erzwungener Bewegung im Laufrad könnte durch die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase [Xia & Yang, 2005], die 5-Phosphatase [Majerus *et al.*, 1999], die IPMK [Irvine & Schell, 2001] und die MIPP [Yu *et al.*, 2003; Shears, 2004] verursacht werden. Insofern kann eine gesteigerte Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Aktivität zu einer Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Zunahme führen. Dagegen würde eine erhöhte 5-Phosphatase Aktivität eine Verringerung der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Konzentration bewirken. Eine modifizierte IPMK Aktivität kann sowohl eine Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Zunahme als auch eine Abnahme bewirken, denn das Enzyme katalysiert Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> zu Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> und phosphoryliert Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> und Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> zum Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> [Irvine & Schell, 2001; Chang & Majerus, 2006]. Hingegen kann eine gesteigerte MIPP Aktivität eine Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentrationszunahme verursachen. Jedoch ist eine Aktivitätsänderung dieses Enzyms, nicht unbedingt an Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> auszumachen, da dieses nur ein Zwischenmetabolit ist. Außerdem ist dieser InsP Stoffwechselweg (InsP<sub>6</sub> → Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> → Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> → Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) in der intakten Zelle fraglich, da der Hauptteil des Enzyms auf das Lumen des ER beschränkt ist [Yu *et al.*, 2003; Shears,

2004]. Daher kann MIPP nur mit Vorbehalt zur Veränderung der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Konzentration angewendet werden.

Mögliche Enzyme, welche für die Veränderungen des  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad in Frage kommen, sind die 5-Phosphatase [Majerus *et al.*, 1999] und die  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6-Kinase/ $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase [Verbsky *et al.*, 2005]. Eine gesteigerte 5-Phosphatase kann zu einer  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentrationszunahme führen, da das Enzym die Hydrolyse von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  zum  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  bewirkt. Dagegen könnte eine erhöhte  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6-Kinase/ $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase Aktivität eine Verringerung der  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  Konzentration verursachen, weil das Enzym  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  zum  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  phosphoryliert.

Die IPMK [Irvine & Schell, 2001], die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase [Verbsky *et al.*, 2005] und die  $\text{InsP}_5$ -Phosphatase sind denkbare Enzyme, welche Veränderungen der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad verursachen können. So würde eine gesteigerte IPMK Aktivität zur Zunahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration führen. Eine Reduktion der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentration kann zum einen bei einer gesteigerten  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase Aktivität beobachtet werden, denn das Enzym phosphoryliert  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  zum  $\text{InsP}_6$  und zum anderen bei einer gesteigerten  $\text{InsP}_5$ -Phosphatase, dieses katalysiert  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  zum  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ / $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ .

Folgende Enzyme könnten für die Veränderungen der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad verantwortlich sein: die  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6-Kinase/ $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase [Verbsky *et al.*, 2005] und die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase bzw.  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ -3-Kinase, die identisch mit IPMK ist [Irvine & Schell, 2001]. Eine gesteigerte  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase bzw.  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ -3-Kinase kann zu einer Abnahme von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  führen. Gleiches ist bei einer gesteigerten IPMK Aktivität zu beobachten. Die  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  Konzentrationssteigerungen könnten auch durch eine erhöhte  $\text{InsP}_3$ -Kinase zustande kommen, allerdings gibt es bisher keine Hinweise, aus welchen  $\text{InsP}_3$  Isomeren die Synthese erfolgen könnte. Die Synthese von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zum  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  durch die IPMK ist bisher nur für Pflanzen und Hefe beschrieben [Shears, 2004]. Oliver und Mitarbeiter [1992] diskutierten sogar die Möglichkeit einer Isomerase, welche die zwei Enantiomere austauscht, jedoch wurde diese Theorie nicht weiter experimentell untersucht.

Für Änderungen der  $\text{InsP}_6$  Konzentrationen nach erlernter und erzwungener Bewegung im Laufrad können die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase [Verbsky *et al.*, 2005], die DIPP [Caffrey *et al.*, 2000] und die  $\text{InsP}_6$ -Kinase [Nagata *et al.*, 2005] verantwortlich sein. Eine  $\text{InsP}_6$

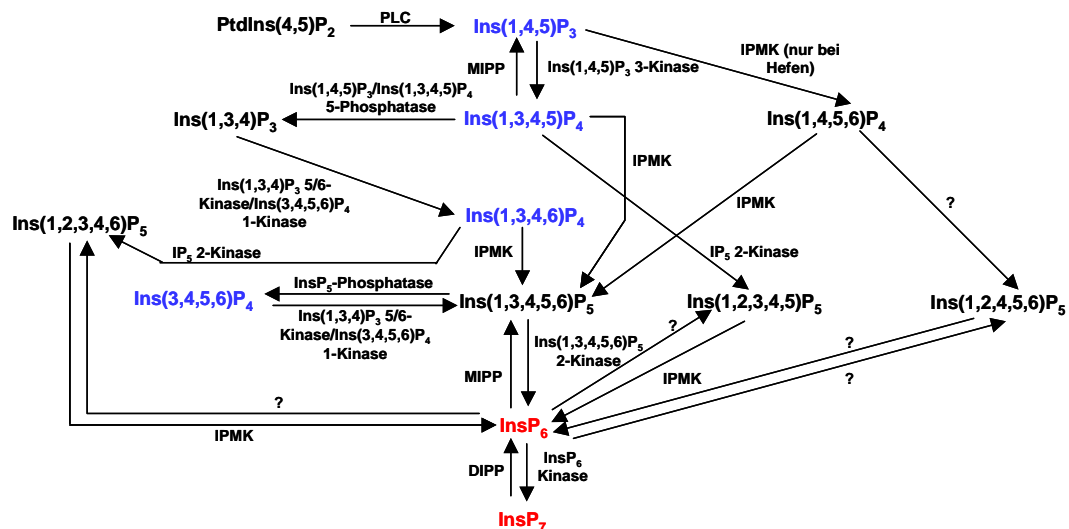
Erhöhung kann durch eine gesteigerte  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase Aktivität oder durch eine verstärkte DIPP Aktivität hervorgerufen werden. Dagegen führt eine gesteigerte  $\text{InsP}_6$ -Kinase Aktivität zur Verringerung der  $\text{InsP}_6$  Konzentration.

Denkbare Enzyme für veränderte  $\text{InsP}_7$  Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad sind die  $\text{InsP}_6$ -Kinase [Nagata *et al.*, 2005] und die DIPP [Caffrey *et al.*, 2000]. Dabei könnte eine erhöhte  $\text{InsP}_6$ -Kinase Aktivität eine Zunahme der  $\text{InsP}_7$  Konzentration verursachen, während eine gesteigerte DIPP Aktivität eine Abnahme von  $\text{InsP}_7$  bewirken kann.

Mögliche Enzyme, die veränderte  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  Konzentrationen nach erlernter und erzwungener Bewegung im Laufrad hervorrufen, sind noch hypothetisch. Modifikationen der  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Konzentrationen kommen vermutlich durch eine  $\text{InsP}_5$ -2-Kinase oder durch die IPMK zustande. Eine gesteigerte  $\text{InsP}_5$ -2-Kinase Aktivität würde einen erhöhten  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  bzw.  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  Spiegel bedeuten, dagegen würde eine erhöhte IPMK Aktivität eine Abnahme bewirken. Jedoch ist beim  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  noch unklar, welche Enzyme für die Bildung dieses Isomers verantwortlich sind. Auch ist noch nicht geklärt, aus welchem  $\text{InsP}_4$  Isomer das  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  gebildet werden kann. Eine Möglichkeit wäre die Synthese aus  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  durch eine  $\text{InsP}_5$ -2-Kinase, allerdings bedarf es dazu weiterer Untersuchungen. Die Enzyme, die für die beschriebenen Veränderungen der  $\text{InsP}$  Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad in Frage kommen, sind in Abb. 4.3.1-1 zusammengefasst.

Da alle  $\text{InsP}$  Isomere durch verschiedene Enzyme an verschiedenen Stellen des  $\text{InsP}$  Stoffwechselweges metabolisiert werden können und zudem noch der großen Variabilität äußerer Einflüsse unterliegen, ist die Einordnung der veränderten  $\text{InsP}$  Konzentrationen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad komplex.





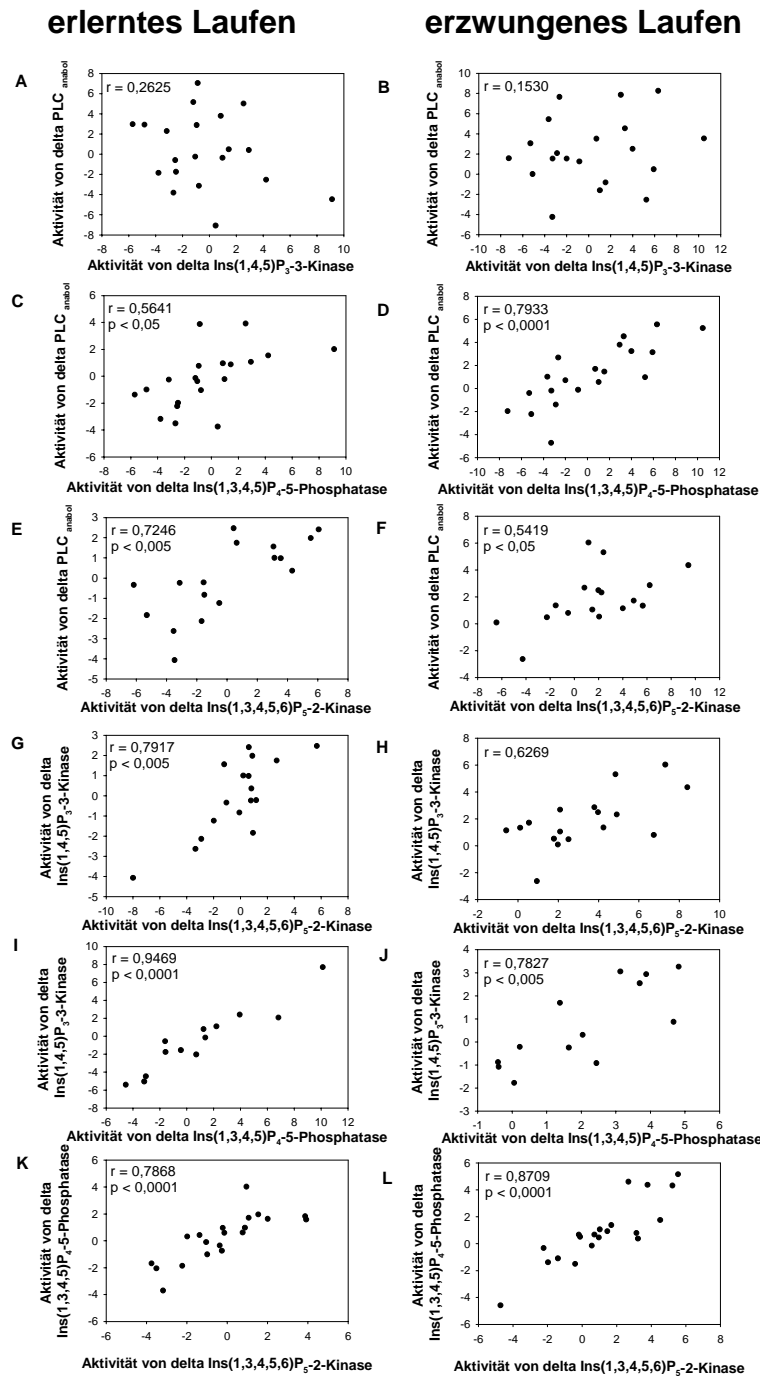
**Abb. 4.3.1-1: Ausschnitt aus dem InsP Stoffwechsel.** Dargestellt sind die möglichen InsP Konversionswege, die für die Veränderungen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad in Frage kommen. Die InsP Isomere, die blau unterlegt sind, haben Kanalsteuerungsfunktionen und die rot markierten Inositolphosphate besitzen wachstumsmodulierende Funktionen. Verändert nach [Abel *et al.*, 2001; Irvine & Schell, 2001; Shears, 2004]. (Freundlicherweise von Prof. Mayr zur Verfügung gestellt.)

#### 4.3.2 Charakterisierung der veränderten InsP metabolisierenden Enzyme nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals Aktivitätsänderungen der InsP metabolisierender Enzyme anhand der gemessenen InsP Konzentrationen im Gehirn der Ratte nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad charakterisiert werden (Abschnitt 3.5).

##### 4.3.2.1 Abhängigkeit zwischen einzelnen InsP metabolisierenden Enzymen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen erstmals, dass es einen funktionalen Zusammenhang zwischen einzelnen InsP metabolisierenden Enzymen gibt (Abschnitt 3.5). Dieser wird im folgenden durch Korrelationsanalysen zwischen den  $\Delta$  Werten der InsP metabolisierenden Enzymen gezeigt (Abb. 4.3.2.1-1). Die Aktivität der  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  korreliert nicht mit der Aktivität der  $\Delta \text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase sowohl nach erlerntem ( $r = 0,2625$ ;  $p > 0,10$ ) (Abb. 4.3.2.1-1A) als auch nach erzwungenem Laufen im Laufrad ( $r = 0,1530$ ;  $p > 0,10$ ) (Abb. 4.3.2.1-1B). Die  $\Delta \text{PLC}_{\text{anabol}}$  Aktivität korreliert schwach mit der Aktivität der  $\Delta \text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase nach erlerntem ( $r = 0,5641$ ;  $p < 0,05$ ) (Abb. 4.3.2.1-1C) und erzwungenem Laufen im Laufrad ( $r = 0,7933$ ;  $p < 0,0001$ ) (Abb. 4.3.2.1-1D).



**Abb. 4.3.2.1-1: Korrelationsanalysen zwischen den InsP metabolisierenden Enzymen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.** Abgebildet sind die Korrelationsanalysen zwischen den Aktivitäten: der  $\Delta$  PLC<sub>anabol</sub> und  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase im Frontalschnitt 3 nach erlerntem (A) und erzwungenem Laufen im Laufrad (B); der  $\Delta$  PLC<sub>anabol</sub> und  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase im Frontalschnitt 3 nach erlerntem (C) und erzwungenem Laufen im Laufrad (D); der  $\Delta$  PLC<sub>anabol</sub> und  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase im Frontalschnitt 2 nach erlerntem (E) und erzwungenem Laufen im Laufrad (F); der  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase und  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase im Frontalschnitt 2 nach erlerntem (G) und erzwungenem Laufen im Laufrad (H); der  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase und  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase im Frontalschnitt 4 nach erlerntem (I) und erzwungenem Laufen im Laufrad (J) und der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase und  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase im Frontalschnitt 3 nach erlerntem (K) und erzwungenem Laufen im Laufrad (L). Gezeigt ist der *Pearson*-Korrelationskoeffizient (*r*).

Eine ähnlich schwache Korrelation besteht auch zwischen der Aktivität der  $\Delta$  PLC<sub>anabol</sub> und der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase nach beiden Bedingungen (Abb. 4.3.2.1-1E und F) sowie der Aktivität der  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase und der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase nach erlerntem Laufen im Laufrad ( $r = 0,7917$ ;  $p < 0,005$ ) (Abb. 4.3.2.1-1G). Dagegen besteht zwischen der Aktivität der  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase und der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase nach erzwungenem Laufen im Laufrad keine signifikante Korrelation ( $r = 0,6269$ ;  $p > 0,10$ ) (Abb. 4.3.2.1-1H). Die Aktivität der  $\Delta$  Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase ist positiv mit der Aktivität der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase nach erlerntem ( $r = 0,9469$ ;  $p < 0,0001$ ) (Abb. 4.3.2.1-1I) und erzwungenem Laufen im Laufrad ( $r = 0,7827$ ;  $p < 0,005$ ) (Abb. 4.3.2.1-1I) korreliert. Zudem existiert ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase und der Aktivität der  $\Delta$  Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase nach erlerntem ( $r = 0,7868$ ;  $p < 0,0001$ ) (Abb. 4.3.2.1-1K) und erzwungenem Laufen im Laufrad ( $r = 0,8709$ ;  $p < 0,0001$ ) (Abb. 4.3.2.1-1L).

Daraus lässt sich schließen, die Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase und die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase folgen passiv der PLC. Außerdem wird die Aktivität der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase durch die Aktivität der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase reguliert. Die Aktivität der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase unterliegt der Aktivität der Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase in den verschiedenen Gehirnregionen. Hingegen wird die Aktivität der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase unabhängig von der PLC geregelt. Auch die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase und die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase sind zwei unabhängig voneinander regulierte Enzyme.

#### **4.3.2.2 Die Beziehung der Inositolphosphate und InsP metabolisierenden Enzyme im Thalamus und Hypothalamus**

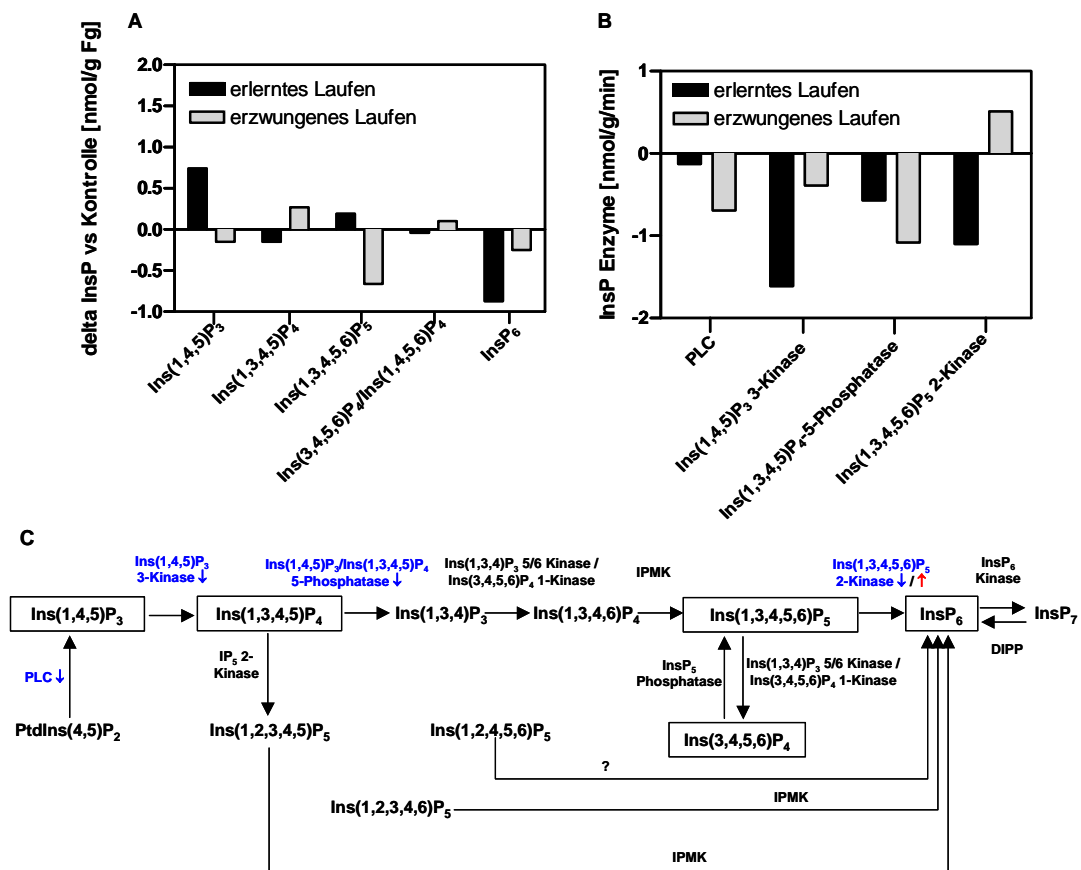
Der Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen  $\Delta$  InsP Konzentrationen und den daraus abgeleiteten Aktivitäten der InsP metabolisierenden Enzyme wird im folgenden an zwei Beispielen, dem rechten Thalamus des Frontalschnitts 4 und dem rechten Hypothalamus des Frontalschnitts 3 erläutert.

Der Thalamus ist ein Kernkomplex, der an sensorischen und motorischen Mechanismen beteiligt ist [Herrero *et al.*, 2002]. Die eigenen Ergebnisse haben gezeigt, dass erlerntes und erzwungenes Laufen im Laufrad die InsP Konzentrationen (Abschnitt 3.3) und die damit verbundenen Enzymaktivitäten (Abschnitt 3.5) im Thalamus beeinflussen (4.3.2.2-1).

Nach erlerntem Laufen im Laufrad sind die Aktivitäten aller untersuchten Enzyme reduziert (Abb. 4.3.2.2-1C). Nach erzwungenem Laufen im Laufrad sind die Aktivitäten

der PLC<sub>anabol</sub>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-Phosphatase ebenfalls vermindert, jedoch ist die Aktivität der Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase gesteigert (Abb. 4.3.2.2-1C).

Die PLC katalysiert die Hydrolyse des Membranphospholipids PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu DAG und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> [Berridge, 1993]. Watanabe und Kollegen [1998] beobachteten in *in situ* Hybridisierungsstudien, dass die PLC mRNA im Thalamus nur gering exprimiert wird. Nach erlerntem Laufen im Laufrad ist die PLC<sub>anabol</sub> Aktivität im Thalamus reduziert und die Konzentration von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> erhöht. Nach erzwungenem Laufen im Laufrad ist die PLC<sub>anabol</sub> Aktivität um das 5-fache stärker reduziert als nach erlerntem Laufen und die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration ist verringert (Abb. 4.3.2.2-1A und B). Scheinbar variiert der Grad der PLC<sub>anabol</sub> Aktivitätsreduktion nach erlernter und erzwungener Bewegung im Laufrad. Erst eine starke PLC<sub>anabol</sub> Aktivitätsreduktion, hervorgerufen durch erzwungene Bewegung im Laufrad, führt zu einer Abnahme der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration.



**Abb. 4.3.2.2-1: Zusammenfassung der Veränderung der InsP Konzentrationen und ihrer metabolisierenden Enzyme im rechten Thalamus des Frontalschnitts 4 nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.** Dargestellt sind die veränderten InsP Konzentrationen (A) und die daraus abgeleiteten Aktivitäten der InsP metabolisierenden Enzyme (B) im rechten Thalamus nach erlerntem und erzwungenem Laufen Im Laufrad. C zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse und ihren Kontext im InsP Stoffwechsel. Die gefundenen InsP Isomere sind eingerahmt. Die reduzierten Enzymaktivitäten sind blau (↓) markiert und erhöhten sind rot (↑) gekennzeichnet.

Die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zum  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  [Xia & Yang, 2005]. Der Thalamus weist eine geringe  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität auf [Mailleux *et al.*, 1991]. Erlerntes Laufen im Laufrad verursacht eine reduzierte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Konzentration. Erzwungenes Laufen im Laufrad bewirkt ebenfalls eine verminderte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität, allerdings ist der Grad der Reduktion geringer als nach erlerntem Laufen, zudem ist der Spiegel des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Produktes,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , erhöht (Abb. 4.3.2.2-1A und B). Die Bestimmung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität nach körperlicher Bewegung ist bislang nur in der Hippocampusformation von Ratten untersucht worden. Kim *et al.* [2004] beobachteten eine erhöhte Expression der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Isoform A (RnIP<sub>3</sub>3K-A) in der Hippocampusformation von Ratten während des Trainings im Morris-Wasser-Labyrinth. Die verringerte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität im Thalamus nach erlerntem Laufen im Laufrad in der vorliegenden Arbeit widerspricht somit den Untersuchungen von Kim *et al.* [2004]. Die Ursachen für diese divergierenden Ergebnisse sind vermutlich die unterschiedlichen Gehirnregionen (Thalamus vs Hippocampus) und ihre Funktionen. Für den Hippocampus ist bekannt, dass dieser in kognitive Prozesse sowie Lernen und Gedächtnis involviert ist [Popik *et al.*, 1994] und eine erhöhte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität aufweist [Kim *et al.*, 2004]. Jedoch ist die reduzierte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität nach erlerntem Laufen im Laufrad im Thalamus nachgewiesen worden und dieser ist nicht an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt. Die Ergebnisse bestärken die Vermutung von Xia und Yang [2005], die eine Beteiligung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase in die Gehirnentwicklung sowie in Lern- und Gedächtnisprozesse annehmen. Die reduzierte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität nach erzwungenem Laufen im Laufrad stimmt mit den Befunden von Kim und Mitarbeiter [1994] überein. Sie zeigten allerdings im Gyrus dentatus des Hippocampus von Ratten in *in situ* Hybridisierungsstudien, dass elektrokonvulsive Stöße die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase mRNA Expression reduzieren. Diese und die eigenen Ergebnisse zeigen, dass Stresssituationen wie erzwungenes Laufen im Laufrad oder elektrokonvulsive Stöße eine Reduktion der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase im Gehirn der Ratte hervorrufen.

Die 5-Phosphatase dephosphoryliert  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zum  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  sowie  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  zum  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  [Erneux *et al.*, 1998]. Das Enzym hat eine 100-fach höhere Affinität zum  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  als zum  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  [Irvine & Schell, 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Aktivität der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase abgeleitet, da das Isomer  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  nicht nachgewiesen werden konnte. Erlerntes Laufen im Laufrad führt zu einer reduzierten  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität (Abb. 4.3.2.2-1B). Jedoch konnte das Produkt der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Vermutlich ist die  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität so stark reduziert, dass

nur eine geringe Umsetzung von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  erfolgt, die aber nicht nachweisbar ist. Zudem ist der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Spiegel erniedrigt (Abb. 4.3.2.2-1A), was durch die reduzierte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase Aktivität erklärt werden kann. Nach erlerntem Laufen im Laufrad sind die Aktivitäten der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase im Thalamus erniedrigt (Abb. 4.3.2.2-1B). Die extrem hohe Affinität der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase zur  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase (Abb. 4.3.2.1-1I) erklärt die Abnahme der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität. Nach erzwungenem Laufen im Laufrad ist der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  Spiegel erhöht (Abb. 4.3.2.2-1A) und die Aktivität der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase reduziert (Abb. 4.3.2.2-1B). Zudem ist die Aktivität der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase, metabolisiert  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , ebenfalls erniedrigt (Abb. 4.3.2.2-1B). Daraus lässt sich schließen, dass die Umsetzung in den anabolen Weg von  $\text{InsP}_4$  führt. Zusätzlich wird die langsam produzierte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  Menge auch langsamer metabolisiert. Die Regulation der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase durch die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase (Abb. 4.3.2.1-1J) erklärt die erniedrigte  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase Aktivität nach erzwungenem Laufrad.

$\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase katalysiert die Bildung von  $\text{InsP}_6$  aus  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  [Verbsky<sup>b</sup> *et al.*, 2005]. Erlerntes Laufen im Laufrad bewirkt eine stark reduzierte  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase Aktivität und  $\text{InsP}_6$  Konzentration (Abb. 4.3.2.2-1A und B). Erzwungenes Laufen im Laufrad führt zu einer gesteigerten  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase Aktivität und einer reduzierten  $\text{InsP}_6$  Konzentration. Scheinbar ist die Stärke der  $\text{InsP}_6$  Generierung im Thalamus der Ratte von einer unterschiedlich stark aktivierten  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase abhängig.

Der Hypothalamus ist ein Kernkomplex und stellt das wichtigste Steuer- und Integrationszentrum dar. Der Hypothalamus steuert die Körpertemperatur, den Hormonhaushalt und die Nahrungsaufnahme sowie den Sympathikus als auch den Parasympathikus. Des weiteren ist der Hypothalamus an der Kontrolle von Emotionen (das Zeigen von Affekten wie Freude, Aggression und Angst gegenüber der Umwelt) beteiligt [Aumüller *et al.*, 2007]. Die eigenen Ergebnisse haben gezeigt, dass erlernte und erzwungene körperliche Bewegung im Laufrad veränderte  $\text{InsP}$  Spiegel (Abschnitt 3.3) und Enzymaktivitäten (Abschnitt 3.5) im Hypothalamus verursachen. Nach beiden Bedingungen sind die Aktivitäten der  $\text{PLC}_{\text{anabol}}$ , der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase, der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase und der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase erhöht (Abb. 4.3.2.2-2C).

Die Aktivität der  $\text{PLC}_{\text{anabol}}$  ist nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad gesteigert (Abb. 4.3.2.2-2B). Jedoch ist die Aktivität nach erzwungenem Laufen stärker als nach erlerntem Laufen im Laufrad. Der Spiegel des  $\text{PLC}_{\text{anabol}}$  Produktes,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ist nach erlerntem Laufen im Laufrad erniedrigt und nach erzwungenem Laufen im

Laufрад erhöht (Abb. 4.3.2.2-2A). Vermutlich führt eine starke PLC anabol Aktivitätssteigerung, hervorgerufen durch erzwungene körperliche Bewegung, zu einer Zunahme der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration.

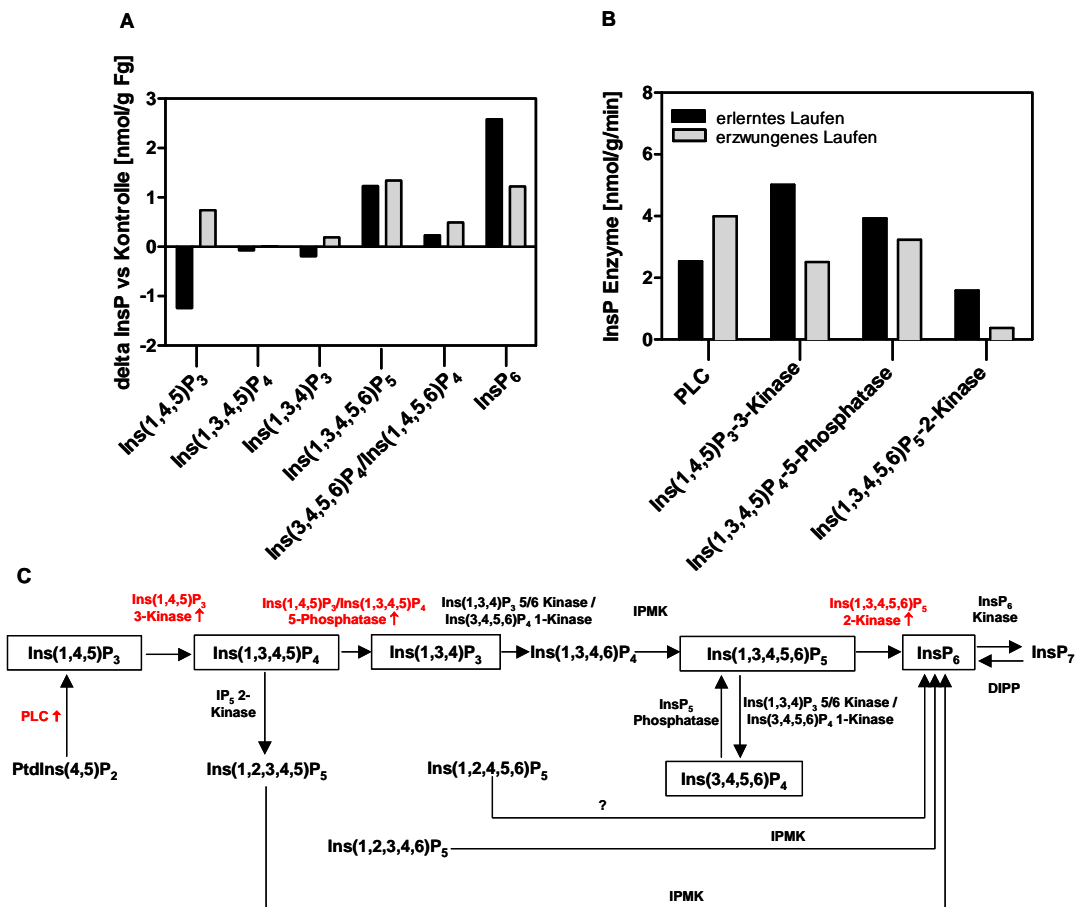


Abb. 4.3.2.2-2: Zusammenfassung der Veränderung der InsP Konzentrationen und ihrer metabolisierenden Enzyme im rechten Hypothalamus des Frontalschnitts 3 nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufрад. Dargestellt sind die veränderten InsP Konzentrationen (A) und die daraus abgeleiteten Aktivitäten der InsP metabolisierenden Enzyme (B) im rechten Hypothalamus nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufрад. C zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse und ihren Kontext im InsP Stoffwechsel. Die gefundenen InsP Isomere sind eingerahmt. Die erhöhten Enzymaktivitäten sind rot und mit einem Pfeil (↑) markiert.

Im InsP Stoffwechsel wird das Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase zu Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> metabolisiert [Xia & Yang, 2005]. Heacock *et al.* [1990] und Mailleux *et al.* [1991] wiesen eine geringe Aktivität des Enzyms im Hypothalamus nach. Die Aktivität der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase ist sowohl nach erlerntem als auch nach erzwungenem Laufen im Laufрад erhöht (Abb. 4.3.2.2-2B). Allerdings ist der Grad der Aktivitätssteigerung nach erlerntem Laufen im Laufрад stärker als nach erzwungenem Laufen im Laufрад. Die Konzentrationsänderung des Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Produktes, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, ist nach beiden Bedingungen eher unauffällig (Abb. 4.3.2.2-2A). Scheinbar ist die Steigerung der Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase Aktivität im Hypothalamus in der vorliegenden Arbeit direkt auf die

Funktion des Enzyms zurückzuführen. Die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase wird vermutlich durch Lern- und Gedächtnisprozesse reguliert.

$\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  wird durch die  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase zum  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  dephosphoryliert [Erneux *et al.*, 1998]. Heacock *et al.* [1990] beobachteten eine geringe 5-Phosphatase Aktivität im Hypothalamus. In der vorliegenden Arbeit ist die Aktivität der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad gesteigert (Abb. 4.3.2.2-2B). Die Konzentration von  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  ist nach erlerntem Laufen im Laufrad reduziert und nach erzwungenem Laufen im Laufrad erhöht (Abb. 4.3.2.2-2A). Eine mögliche Erklärung für die Aktivitätssteigerung des Enzyms ist die positive Korrelation der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase zur PLC (Abb. 4.3.2.1-1C und D) und zur  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase (Abb. 4.3.2.1-1I und J). Die Aktivitäten dieser beiden Enzyme sind ebenfalls nach beiden Bedingungen gesteigert (Abb. 4.3.2.2-2B).

Im  $\text{InsP}$  Stoffwechsel wird  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  zweimal phosphoryliert. Dabei entsteht  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ , das durch die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase zum  $\text{InsP}_6$  metabolisiert wird (Abb. 4.3.2.2-2C). Nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad ist die Aktivität der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase erhöht, allerdings ist die Aktivitätssteigerung nach erlerntem Laufen im Laufrad stärker als nach erzwungenem Laufen (Abb. 4.3.2.2-2B). Das gleiche Bild spiegelt sich in der  $\text{InsP}_6$  Konzentration wieder. Hier zeigt sich ebenfalls eine  $\text{InsP}_6$  Konzentrationszunahme nach beiden Bedingungen, die aber nach erlerntem Laufen im Laufrad stärker ist als nach erzwungenem Laufen (Abb. 4.3.2.2-2A). Vermutlich ist die Stärke der  $\text{InsP}_6$  Generierung im Hypothalamus der Ratte von einer stark aktivierten  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase abhängig. Die Aktivitätssteigerung des Enzyms ist durch die Korrelation der  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase zur PLC (Abb. 4.3.2.1-1E und F) und zur  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase (Abb. 4.3.2.1-1K und L) erklärbar. Da auch die Aktivitäten dieser beiden Enzyme nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad erhöht sind (Abb. 4.3.2.2-2B).

### 4.3.3 Biologische Funktionen der Inositolphosphate im Gehirn der Ratte

Mögliche biologische Funktionen der Inositolphosphate im Gehirn der Ratte werden im nachfolgenden an einigen Beispielen vorgestellt.

#### 4.3.3.1 Rolle der Inositolphosphate im limbischen System der Ratte

Das limbische System umfasst neo-, archi- und paleokortikale Gebiete sowie subkortikale Strukturen. Im engeren Sinne handelt es sich um folgende anatomische Regionen: Gyrus cinguli (cingulärer Kortex), Gyrus parahippocampalis, Hippocampusformation,



Septumkerne, Amygdala, Nucleus anterior thalami, Corpora mammilaria, Nucleus accumbens, Habenula und die Raphekerne. Das limbische System beteiligt sich an der Regulation des Trieb- und Affektverhaltens und ist für Lernen und Gedächtnis von entscheidender Bedeutung [Schünke *et al.*, 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurden als Teile des limbischen Systems der cinguläre Kortex, die Hippocampusformation, das Septum und die Amygdala präpariert (Tab. 2.2.2.2.1-1). Anschließend wurden die Konzentrationen von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> und InsP<sub>6</sub> nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad in diesen Gehirnregionen untersucht.

Erlerntes Laufen im Laufrad führt zu veränderten InsP Konzentrationen (Abschnitt 3.3). Im cingulären Kortex, in der Hippocampusformation, im Septum und in der Amygdala sind die Konzentrationen von Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> und InsP<sub>6</sub> in der gleichen Stärke modifiziert. So weist Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> eine Konzentrationserhöhung (Abb. 3.3.2-1E, H und K) auf, während der Spiegel an InsP<sub>6</sub> vermindert ist (Abb. 3.3.6-2E, H und K). Vermutlich sind diese beiden Inositolphosphate direkt mit Lern- und Gedächtnisprozessen assoziiert. Die veränderten Konzentrationen von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> nach erlerntem Laufen im Laufrad variieren zwischen den einzelnen Regionen des limbischen Systems.

Eine mögliche Ursache für diese divergierenden InsP Konzentrationen im cingulären Kortex, in der Hippocampusformation, im Septum und in der Amygdala könnte die Feinregulation durch Ca<sup>2+</sup> sein. Zumal diese Gehirnregionen und die in dieser Arbeit nachgewiesenen InsP Isomere mit Ca<sup>2+</sup> assoziiert sind. Im Hippocampus und in der Amygdala hat die Modulation von Ca<sup>2+</sup> Signalen eine kritische Rolle bei der Bildung des Langzeitgedächtnisses [Yuan *et al.*, 2004]. Im cingulären Kortex ist die Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>-stimulierten Adenylatzyklase 1 für die Induktion der Langzeit-Potenzierung essentiell [Liau *et al.*, 2005]. Dagegen exprimieren die Zellen des Septums multiple Ca<sup>2+</sup> Kanaltypen [Thinschmidt *et al.*, 1999]. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen *second messenger* Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> sind an der Regulation des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Spiegels beteiligt [Berridge, 1998; Lockyer *et al.*, 1999; Bootman *et al.*, 2001]. Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> reguliert die Aktivität von L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanälen [Riley *et al.*, 2006; Deleu *et al.*, 2006]. Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> ist ein physiologisch wichtiger Inhibitor von Ca<sup>2+</sup> regulierten Cl<sup>-</sup> Kanälen [Irvine & Schell, 2001]. Auch für InsP<sub>6</sub> sind Ca<sup>2+</sup> aktivierende Eigenschaften in hippocampalen Neuronen beschrieben worden [Yang *et al.*, 2001]. Daraus lässt sich schließen, dass die InsP Isomere wahrscheinlich über die Ca<sup>2+</sup> Regulation eine Rolle bei der Bildung des Langzeitgedächtnisses spielen.

Erzwungenes Laufen im Laufrad bewirkt ebenfalls veränderte InsP Konzentrationen (Abschnitt 3.3). Im cingulären Kortex, in der Hippocampusformation, im Septum und in der Amygdala sind die Konzentrationen von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{InsP}_6$  deutlich erhöht (Abb. 3.3.4-2; Abb. 3.3.5-2 und Abb. 3.3.6-2). Dies könnte bedeuten, dass diese InsP Isomere mit affektiven Verhalten assoziiert sind. Wobei das  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  besonders mit der Stressregulation verknüpft ist, da der Spiegel dieses Isomers in nahezu allen Gehirnregionen der Ratte signifikant erhöht ist (Abb. 3.3.5-2).

Die eigenen Ergebnisse zeigen erstmals biologische Funktionen der Inositolphosphate. So ist  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  für Lernen und Gedächtnis von entscheidender Bedeutung, während  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  in Stresssituationen hochreguliert wird.  $\text{InsP}_6$  scheint in die Kontrolle beider Prozesse involviert zu sein. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um die generellen Mechanismen aufzuklären.

#### 4.3.3.2 Rolle der Inositolphosphate bei der motorischen Aktivität der Ratte

An der Regulation der motorischen Aktivität der Ratte sind die motorische Region des parietalen Kortex, das laterale Striatum [Rogers *et al.*, 2001] und der Thalamus [Herrero *et al.*, 2002] beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{InsP}_6$  nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad in der motorischen Region des parietalen Kortex, im laterale Striatum und im Thalamus bestimmt.

In der motorischen Region des parietalen Kortex sind die Konzentrationen aller untersuchten Inositolphosphate nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad erhöht (Abschnitt 3.3). Dagegen bewirkt erlerntes Laufen im Laufrad im lateralen Striatum eine Konzentrationszunahme von  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  (Abb. 3.3.3-2E),  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  (Abb. 3.3.2-2E),  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  (Abb. 3.3.5-2E) und  $\text{InsP}_6$  (Abb. 3.3.6-2E), während die Spiegel von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Abb. 3.3.1-2E) und  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  (Abb. 3.3.4-2E) erniedrigt sind. Der Thalamus zeigt eine Konzentrationssteigerung von  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  (Abb. 3.3.3-2K) und eine Abnahme aller anderen untersuchten InsP Isomere. Erzwungenes Laufen im Laufrad führt im lateralen Striatum zu einer Konzentrationssteigerung von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  (Abb. 3.3.2-2F),  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  (Abb. 3.3.3-2F),  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  (Abb. 3.3.4-2F),  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  (Abb. 3.3.5-2F) und  $\text{InsP}_6$  (Abb. 3.3.6-2F), gleichzeitig zeigt  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Abb. 3.3.1-2F) eine Konzentrationsverminderung. Erzwungene körperliche Bewegung im Laufrad verursacht im Thalamus eine Steigerung des Spiegels von

Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>/Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> (Abb. 3.3.5-2L) und eine Konzentrationsabnahme aller anderen untersuchten InsP Isomere.

Das Striatum und der Thalamus haben eine bedeutende Rolle als zentrale Schaltstellen motorischer Impulse. Die divergierenden Konzentrationen der InsP Isomere im lateralen Striatum und im Thalamus zeigen, dass die Regulation der motorischen Aktivität ein komplexer Prozess ist, in dem scheinbar alle Inositolphosphate involviert sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Inositolphosphate eine wichtige modulatorische Funktion ausüben. Für die Beurteilung der Inositolphosphate bei der motorischen Aktivität der Ratte sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

#### 4.4 Ausblick

In der hier vorgestellten Arbeit wurde erstmals eine *ex vivo* Technologie etabliert, die eine hochaufgelöste Darstellung der Inositolphosphate im Gehirn der Ratte ermöglicht, in der die komplexen Signal- und Stoffwechselgeschehen der Inositolphosphate dargestellt werden können. Hierdurch konnten die dynamischen Veränderungen des InsP Systems erstmals kontextdual im ganzen Gehirn für die Paradigmen körperliche Aktivität im Laufrad sowie Stress als zeitnahe „Nachleuchten“ des *in vivo* Geschehens dargestellt werden. Es sind hierdurch zahlreiche Antworten zur Benutzung dieses Systems für Ca<sup>2+</sup>-*signalling*, zelluläre Flüssigkeitsregulierung und Gedächtnisbildung möglich. Das System sollte auf Grund seiner multiplen Parameter für die Visualisierung von Psychopharmakawirkungen und für neuropathologische Krankheitsmodelle geeignet sein. Es stellt damit eine Erweiterung von *in vivo* Systemen der tomographischen Funktionsdarstellung wie NMR und PET dar. Hierdurch können Funktionsgrößen wie biochemische Signaltransduktionsparameter, die bisher nicht dargestellt werden konnten, spezifisch visualisiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Inositolphosphate sind essentielle Zellbestandteile, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Sie besitzen eine breite Gewebeverteilung und eine Vielzahl von biologischen Funktionen.

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels Micro-MDD-HPLC Technik die Inositolphosphate im Gehirn von Wistar-Ratten untersucht werden. Es wurde eine konservierende Fixierungstechnik etabliert, bei der ausreichend gehärtetes Gehirngewebe erhalten wird. Dies ermöglicht exakte Gehirnpräparationen in definierte Regionen und Nuklei innerhalb einer Stunde und zeigt nur geringe, für differenzielle Analysen akzeptable Veränderungen in den InsP Konzentrationen. Die Fixierungstechnik eignet sich für räumlich hoch aufgelöste Studien zur Untersuchung von regionalen Unterschieden und funktionellen Veränderungen der InsP Konzentrationen.

In definierten Gehirnregionen der Ratte konnten die Konzentrationen von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ , und  $\text{InsP}_6$  jeweils als vollständiger Datensatz mit hoher Auflösung bestimmt werden. Es konnten regionale Unterschiede in den InsP Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei im cingulären Kortex, Thalamus, Hypothalamus und Hippocampus Gradienten der InsP Konzentrationen beobachtet wurden. Zusätzlich haben die Untersuchungen Unterschiede in den InsP Konzentrationen in der linken und rechten Gehirnhälfte der Ratte gezeigt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt zudem die biologische Rolle der Inositolphosphate in definierten Gehirnregionen der Ratte, induziert durch erlerntes und erzwungenes Laufen im Laufrad. In den Untersuchungen konnten veränderte InsP Konzentrationen nach beiden Bedingungen nachgewiesen werden, welche auf eine Beteiligung der Inositolphosphate an der Regulation der motorischer Aktivität, Lern- und Gedächtnisprozessen sowie Stress hinweisen. Darüber hinaus erwies sich das  $\text{InsP}_4$  Gemisch,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ , als Stressindikator, während  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  für Lernen und Gedächtnis von entscheidender Bedeutung ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten veränderte Aktivitäten der PLC<sub>anabol</sub>,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase und  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase in definierten Gehirnregionen der Ratte identifiziert werden. In Korrelationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase durch die Aktivität der PLC und der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase in den verschiedenen Gehirnregionen reguliert wird. Desweiteren folgt die  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase passiv der PLC und der  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -5-Phosphatase.

## 6 Literaturverzeichnis

Abel K, Anderson RA, Shears SB (2001). Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *J Cell Sci.* 114:2207-2208.

Agranoff BW (1978). Cyclitol confusion. *Trends Biochem Sci.* 3:N283-N285.

Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spaniel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG (2007). *Duale Reihe – Anatomie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage. 1131-1140.

Barker CJ, Berggren PO (1999). Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling. *Anticancer Res.* 19:3737-3741.

Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361:315-325.

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

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature.* 395:645-648.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:517-529.

Bertsch U, Haefs M, Moller M, Deschermeier C, Fanick W, Kitzerow A, Ozaki S, Meyer HE, Mayr GW (1999). A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from chicken erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates. *Gene.* 228:61-71.

Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ (2001). The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci.* 114:2213-2222.

Brehm MA, Schreiber I, Bertsch U, Wegner A, Mayr GW (2004). Identification of the actin-binding domain of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase isoform B (IP3K-B). *Biochem J.* 382:353-362.

Byrum J, Jordan S, Safrany ST, Rodgers W (2004). Visualization of inositol phosphate-dependent mobility of Ku: depletion of the DNA-PK cofactor InsP<sub>6</sub> inhibits Ku mobility. *Nucleic Acids Res.* 32:2776-2784.

Caffrey JJ, Safrany ST, Yang X, Shears SB (2000). Discovery of molecular and catalytic diversity among human diphosphoinositol-polyphosphate phosphohydrolases. An expanding Nudt family. *J Biol Chem.* 275:12730-12736.

Chang SC, Miller AL, Feng Y, Wentz SR, Majerus PW (2002). The human homolog of the rat inositol phosphate multikinase is an inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate 5-kinase. *J Biol Chem.* 277:43836-43843.

Chang SC, Majerus PW (2006). Inositol polyphosphate multikinase regulates inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:209-216.

Chapman ER (2002). Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:498-508.

- Cullen PJ, Lockyer PJ (2002). Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:339-348.
- Deleu S, Choi K, Pesesse X, Cho J, Sulis ML, Parsons R, Shears SB (2006). Physiological levels of PTEN control the size of the cellular Ins(1,3,4,5,6)P(5) pool. *Cell Signal.* 18:488-498.
- De Smedt F, Verjans B, Mailleux P, Erneux C (1994). Cloning and expression of human brain type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. High levels of mRNA in cerebellar Purkinje cells. *FEBS Lett.* 347:69-72.
- De Smedt F, Boom A, Pesesse X, Schiffmann SN, Erneux C (1996). Post-translational modification of human brain type I inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase by farnesylation. *J Biol Chem.* 271:10419-10424.
- Dewaste V, Pouillon V, Moreau C, Shears S, Takazawa K, Erneux C (2000). Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C. *Biochem J.* 352:343-351.
- Dewaste V, Roymans D, Moreau C, Erneux C (2002). Cloning and expression of a full-length cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:400-405.
- Dewaste V, Moreau C, De Smedt F, Bex F, De Smedt H, Wuytack F, Missiaen L, Erneux C (2003). The three isoenzymes of human inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase show specific intracellular localization but comparable Ca<sup>2+</sup> responses on transfection in COS-7 cells. *Biochem J.* 374:41-49.
- Eckmann L, Rudolf MT, Ptasznik A, Schultz C, Jiang T, Wolfson N, Tsien R, Fierer J, Shears SB, Kagnoff MF, Traynor-Kaplan AE (1997). D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to Salmonella invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14456-14460.
- Efanov AM, Zaitsev SV, Berggren PO (1997). Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca<sup>2+</sup>-mediated and primes Ca<sup>2+</sup>-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4435-4439.
- Egorov AV, Heinemann U, Muller W (2002). Differential excitability and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> signalling in two types of medial entorhinal cortex layer V neurons. *Eur J Neurosci.* 16:1305-1312.
- Erneux C, Govaerts C, Communi D, Pesesse X (1998). The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 1436:185-199.
- Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001). Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Br J Nutr.* 86:225-231.
- Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Perello J, Prieto RM, Shamsuddin AM (2002). Effects of exogenous inositol hexakisphosphate (InsP(6)) on the levels of InsP(6) and of inositol trisphosphate (InsP(3)) in malignant cells, tissues and biological fluids. *Life Sci.* 71:1535-1546.

- Guse AH, Goldwisch A, Weber K, Mayr GW (1995). Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 672:189-198.
- Hanakahi LA, West SC (2002). Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *EMBO J.* 21:2038-2044.
- Heacock AM, Seguin EB, Agranoff BW (1990). Developmental and regional studies of the metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate in rat brain. *J Neurochem.* 54:1405-1411.
- Herrero MT, Barcia C, Navarro JM (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst.* 18:386-404.
- Hilton JM, Plomann M, Ritter B, Modregger J, Freeman HN, Falck JR, Krishna UM, Tobin AB (2001). Phosphorylation of a synaptic vesicle-associated protein by an inositol hexakisphosphate-regulated protein kinase. *J Biol Chem.* 276:16341-16347.
- Ho MW, Kaetzel MA, Armstrong DL, Shears SB (2001). Regulation of a human chloride channel. a paradigm for integrating input from calcium, type ii calmodulin-dependent protein kinase, and inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J Biol Chem.* 276:18673-18680.
- Hourez R, Azdad K, Vanwalleghem G, Roussel C, Gall D, Schiffmann SN (2005). Activation of protein kinase C and inositol 1,4,5-triphosphate receptors antagonistically modulate voltage-gated sodium channels in striatal neurons. *Brain Res.* 1059:189-196.
- Hoy M, Berggren PO, Gromada J (2003). Involvement of protein kinase C-epsilon in inositol hexakisphosphate-induced exocytosis in mouse pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 278:35168-35171.
- Irvine RF, Schell MJ (2001). Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:327-338.
- Ito M (2001). Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev.* 81:1143-1195.
- Ives EB, Nichols J, Wentz SR, York JD (2000). Biochemical and functional characterization of inositol 1,3,4,5, 6-pentakisphosphate 2-kinases. *J Biol Chem.* 275:36575-36583.
- Jun K, Choi G, Yang SG, Choi KY, Kim H, Chan GC, Storm DR, Albert C, Mayr GW, Lee CJ, Shin HS (1998). Enhanced hippocampal CA1 LTP but normal spatial learning in inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase(A)-deficient mice. *Learn Mem.* 5:317-330.
- Kim H, Ko JP, Kang UG, Park JB, Kim HL, Lee YH, Kim YS (1994). Electroconvulsive shock reduces inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase mRNA expression in rat dentate gyrus. *J Neurochem.* 63:1991-1994.
- Kim IH, Park SK, Sun W, Kang Y, Kim HT, Kim H (2004). Spatial learning enhances the expression of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A in the hippocampal formation of rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 124:12-19.
- Klejbor I, Ludkiewicz B, Domaradzka-Pytel B, Wojcik S, Morys J (2005). Open field stress and neurons containing calcium-binding proteins in the piriform cortex of the rat. *J Physiol Pharmacol.* 56:223-331.

Larsson O, Barker CJ, Sjöholm A, Carlqvist H, Michell RH, Bertorello A, Nilsson T, Honkanen RE, Mayr GW, Zwiller J, Berggren PO (1997). Inhibition of phosphatases and increased Ca<sup>2+</sup> channel activity by inositol hexakisphosphate. *Science*. 278:471-474.

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sotdt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 445:168-176.

Liau J, Wu LJ, Zhuo M (2005). Calcium-stimulated adenylyl cyclases required for long-term potentiation in the anterior cingulate cortex. *J Neurophysiol*. 94:878-882.

Lockyer PJ, Vanlingen S, Reynolds JS, McNulty TJ, Irvine RF, Parys JB, Cullen PJ (1999). Tissue-specific expression and endogenous subcellular distribution of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding proteins GAP1(IP4BP) and GAP1(m). *Biochem Biophys Res Commun*. 255:421-426.

Lorke DE, Lauer M (1990). Gliogenesis and myelination in the optic nerve of trisomy 19 mice. A quantitative electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)*. 137:222-233.

Luo HR, Saiardi A, Nagata E, Ye K, Yu H, Jung TS, Luo X, Jain S, Sawa A, Snyder SH (2001). GRAB: a physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase. *Neuron*. 31:439-451.

Macbeth MR, Schubert HL, Vandemark AP, Lingam AT, Hill CP, Bass BL (2005). Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science*. 309:1534-1539.

Mailleux P, Takazawa K, Erneux C, Vanderhaeghen JJ (1991). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase distribution in the rat brain. High levels in the hippocampal CA1 pyramidal and cerebellar Purkinje cells suggest its involvement in some memory processes. *Brain Res* 539:203-210.

Mailleux P, Takazawa K, Erneux C, Vanderhaeghen JJ (1991). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase mRNA: high levels in the rat hippocampal CA1 pyramidal and dentate gyrus granule cells and in cerebellar Purkinje cells. *J Neurochem*. 56:345-347.

Mailleux P, Takazawa K, Erneux C, Vanderhaeghen JJ (1992). Comparison of neuronal inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase and receptor mRNA distributions in the adult rat brain using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. 49:577-590.

Majerus PW, Kisseleva MV, Norris FA (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol Chem*. 274:10669-10672.



- Martin JB, Foray MF, Klein G, Satre M (1987). Identification of inositol hexaphosphate in  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra of *Dictyostelium discoideum* amoebae. Relevance to intracellular pH determination. *Biochim Biophys Acta*. 931:16-25.
- Mayr GW (1990) Mass determination of inositol phosphates by high-performance liquid chromatography with postcolumn complexometry (metal-dye-detection). In Irvine RF (ed.), *Methods in Inositide Research*, Raven Press, New York. 82-105.
- Mayr GW, Windhorst S, Hillemeier K (2005). Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J Biol Chem*. 280:13229-13240.
- McCoy AN, Platt ML (2005). Expectations and outcomes: decision-making in the primate brain. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 191:201-211.
- Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H (2004). Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci*. 24:1478-1485.
- Miller GJ, Wilson MP, Majerus PW, Hurley JH (2005). Specificity determinants in inositol polyphosphate synthesis: crystal structure of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. *Mol Cell*. 18:201-212
- Nagata E, Luo HR, Saiardi A, Bae BI, Suzuki N, Snyder SH (2005). Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J Biol Chem*. 280:1634-1640.
- Nalaskowski MM, Deschermeier C, Fanick W, Mayr GW (2002). The human homologue of yeast ArgR111 protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization. *Biochem J*. 366:549-556.
- Nalaskowski MM, Bertsch U, Fanick W, Stockebrand MC, Schmale H, Mayr GW (2003). Rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C is enzymatically specialized for basal cellular inositol trisphosphate phosphorylation and shuttles actively between nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem*. 278:19765-19776.
- Nalaskowski MM, Mayr GW (2004). The families of kinases removing the  $\text{Ca}^{2+}$  releasing second messenger  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . *Curr Mol Med*. 4:277-290.
- Neveu PJ, Liege S, Sarrieu A (1998). Asymmetrical distribution of hippocampal mineralocorticoid receptors depends on lateralization in mice. *Neuroimmunomodulation*. 5:16-21.
- Nilius B, Prenen J, Voets T, Eggermont J, Bruzik KS, Shears SB, Droogmans G (1998). Inhibition by inositol tetrakisphosphates of calcium- and volume-activated  $\text{Cl}^-$  currents in macrovascular endothelial cells. *Pflugers Arch*. 435:637-644.
- Nogimori K, Hughes PJ, Glennon MC, Hodgson ME, Putney JW Jr, Shears SB (1991). Purification of an inositol (1,3,4,5)-tetrakisphosphate 3-phosphatase activity from rat liver and the evaluation of its substrate specificity. *J Biol Chem*. 266:16499-16506.
- Norris FA, Ungewickell E, Majerus PW (1995). Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. *J Biol Chem*. 270:214-217.

- Oliver KG, Putney JW Jr, Obie JF, Shears SB (1992). The interconversion of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate and inositol tetrakisphosphates in AR4-2J cells. *J Biol Chem.* 267:21528-21534.
- Orchiston EA, Bennett D, Leslie NR, Clarke RG, Winward L, Downes CP, Safrany ST (2004). PTEN M-CBR3, a versatile and selective regulator of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate (Ins(1,3,4,5,6)P5). Evidence for Ins(1,3,4,5,6)P5 as a proliferative signal. *J Biol Chem.* 279:1116-1122.
- Palczewski K, Pulvermuller A, Buczylo J, Gutmann C, Hofmann KP (1991). Binding of inositol phosphates to arrestin. *FEBS Lett.* 295:195-199.
- Palczewski K, Rispoli G, Detwiler PB (1992). The influence of arrestin (48K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction. *Neuron.* 8:117-126.
- Palkovits M, Brownstein MJ (1988). Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier Science Publishing Co., New York. 82-168.
- Parent A, Quirion R (1994). Differential localization and pH dependency of phosphoinositide 1,4,5-IP3, 1,3,4,5-IP4 and IP6 receptors in rat and human brains. *Eur J Neurosci.* 6:67-74.
- Piccolo E, Vignati S, Maffucci T, Innominato PF, Riley AM, Potter BV, Pandolfi PP, Brogginini M, Iacobelli S, Innocenti P, Falasca M (2004). Inositol pentakisphosphate promotes apoptosis through the PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene.* 23:1754-1765.
- Popik P, Nalepa I, Mamczarz J, Vetulani J (1994). Retrieval associated cholinergic activity and its inhibition by memory updating. *Life Sci.* 54:1251-1257.
- Puljak L, Kilic G (2006). Emerging roles of chloride channels in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1762:404-413.
- Qian X, Mitchell J, Wei SJ, Williams J, Petrovich RM, Shears SB (2005). The Ins(1,3,4)P3 5/6-kinase/Ins(3,4,5,6)P4 1-kinase is not a protein kinase. *Biochem J.* 389:389-395.
- Ragozzino ME, Choi D (2004). Dynamic changes in acetylcholine output in the medial striatum during place reversal learning. *Learn Mem.* 11:70-77.
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 21:267-271.
- Riley AM, Trusselle M, Kuad P, Borkovec M, Cho J, Choi JH, Qian X, Shears SB, Spiess B, Potter BV (2006). scyllo-Inositol Pentakisphosphate as an Analogue of myo-Inositol 1,3,4,5,6-Pentakisphosphate: Chemical Synthesis, Physicochemistry and Biological Applications. *Chembiochem.* 7:1114-1122.
- Rodrigo J, Suburo AM, Bentura ML, Fernandez T, Nakade S, Mikoshiba K, Martinez-Murillo R, Polak JM (1993). Distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P400, in adult rat brain. *J Comp Neurol.* 337:493-517.
- Rogers RD, Baunez C, Everitt BJ, Robbins TW (2001). Lesions of the medial and lateral striatum in the rat produce differential deficits in attentional performance. *Behav Neurosci.* 115:799-811.
- Romeis B (1989). Mikroskopische Technik. In Böck P (ed.), Urban & Schwarzenberg, München. 71-111.

- Saiardi<sup>a</sup> A, Caffrey JJ, Snyder SH, Shears SB (2000). Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 468:28-32.
- Saiardi<sup>b</sup> A, Caffrey JJ, Snyder SH, Shears SB (2000). The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J Biol Chem.* 275:24686-24692.
- Saiardi<sup>a</sup> A, Nagata E, Luo HR, Sawa A, Luo X, Snowman AM, Snyder SH (2001). Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:2306-2311.
- Saiardi<sup>b</sup> A, Nagata E, Luo HR, Snowman AM, Snyder SH (2001). Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *J Biol Chem.* 276:39179-39185.
- Sarmah B, Latimer AJ, Appel B, Wente SR (2005). Inositol polyphosphates regulate zebrafish left-right asymmetry. *Dev Cell.* 9:133-145.
- Schell MJ, Erneux C, Irvine RF (2001). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A associates with F-actin and dendritic spines via its N terminus. *J Biol Chem.* 276:37537-37546.
- Schünke M, Schult E, Schumacher U (2006). *Prometheus: Kopf und Neuroanatomie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1. Auflage. 198-375.
- Sharp AH, McPherson PS, Dawson TM, Aoki C, Campbell KP, Snyder SH (1993). Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in rat brain. *J Neurosci.* 13:3051-3063.
- Sharp AH, Nucifora FC Jr, Blondel O, Sheppard CA, Zhang C, Snyder SH, Russell JT, Ryugo DK, Ross CA (1999). Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-triphosphate receptors in neurons and glia in brain. *J Comp Neurol.* 406:207-220.
- Shears SB (1998). The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim Biophys Acta.* 1436:49-67.
- Shears SB (2001). Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signal.* 13:151-158.
- Shears SB (2003). Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, a signal transduction hub. In Bradshaw R, Dennis E (eds), *The Handbook of Cell Signaling Vol. 2*, Academic Press, San Diego. 233-235.
- Shears SB (2004). How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochem J.* 377:265-280.
- Smith RE, MacQuarrie RA, Jope RS (1991). Ion chromatographic determination of inositol tri- and tetrakisphosphates in rat brain. *J Chromatogr Sci.* 29:528-531.
- Soriano S, Banting G (1997). Possible roles of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-Kinase B in calcium homeostasis. *FEBS Lett.* 403:1-4.
- Stephens LR, Hawkins PT, Barker CJ, Downes CP (1988). Synthesis of myo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate from inositol phosphates generated by receptor activation. *Biochem J.* 253:721-733.

- Sullivan RM, Gratton A (1998). Relationships between stress-induced increases in medial prefrontal cortical dopamine and plasma corticosterone levels in rats: role of cerebral laterality. *Neuroscience*. 83:81-91.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983). Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 306:67-69.
- Szostak C, Jakubovic A, Phillips AG, Fibiger HC (1989). Neurochemical correlates of conditioned circling within localized regions of the striatum. *Exp Brain Res*. 75:430-440.
- Szwergold BS, Graham RA, Brown TR (1987). Observation of inositol pentakis- and phosphates in mammalian tissues by <sup>31</sup>P NMR. *Biochem Biophys Res Commun*. 149:874-881.
- Takazawa K, Erneux C (1991). Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem J*. 280:125-129.
- Takazawa<sup>a</sup> K, Perret J, Dumont JE, Erneux C (1991). Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 174:529-535.
- Takazawa<sup>b</sup> K, Perret J, Dumont JE, Erneux C (1991). Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme. *Biochem J*. 278:883-886.
- Tang AC, Zou B (2002). Neonatal exposure to novelty enhances long-term potentiation in CA1 of the rat hippocampus. *Hippocampus*. 12:398-404.
- Tang AC, Reeb BC, Romeo RD, McEwen BS (2003). Modification of social memory, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and brain asymmetry by neonatal novelty exposure. *J Neurosci*. 23:8254-8260.
- Thiel CM, Schwarting RK (2001). Dopaminergic lateralisation in the forebrain: relations to behavioural asymmetries and anxiety in male Wistar rats. *Neuropsychobiology*. 43:192-199.
- Thinschmidt JS, Webb B, Martin DE, Feldman DH, King MA, Walker DW (1999). The development and pharmacological characterization of calcium channel currents in cultured embryonic rat septal cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 118:13-21.
- Thomas S, Brake B, Luzio JP, Stanley K, Banting G (1994). Isolation and sequence of a full length cDNA encoding a novel rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1220:219-222.
- Trepel M (1999). Neuroanatomie. In Urban & Fischer, München·Stuttgart·Jena·Lübeck·Ulm, 2. Auflage. 123-139.
- Vanweyenberg V, Communi D, D'Santos CS, Erneux C (1995). Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase isoenzymes. *Biochem J*. 306:429-435.
- Verbsky JW, Wilson MP, Kisseleva MV, Majerus PW, Wente SR (2002). The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase. *J Biol Chem*. 277:31857-31862.

- Verbsky<sup>a</sup> J, Lavine K, Majerus PW (2005). Disruption of the mouse inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene, associated lethality, and tissue distribution of 2-kinase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8448-8453.
- Verbsky<sup>b</sup> JW, Chang SC, Wilson MP, Mochizuki Y, Majerus PW (2005). The pathway for the production of inositol hexakisphosphate in human cells. *J Biol Chem.* 280:1911-1920.
- Verstynen T, Tierney R, Urbanski T, Tang A (2001). Neonatal novelty exposure modulates hippocampal volumetric asymmetry in the rat. *Neuroreport.* 12:3019-3022.
- Voglmaier SM, Keen JH, Murphy JE, Ferris CD, Prestwich GD, Snyder SH, Theibert AB (1992). Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 187:158-163.
- Watanabe M, Nakamura M, Sato K, Kano M, Simon MI, Inoue Y (1998). Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C $\beta$  in mouse brain. *Eur J Neurosci.* 10:2016-2025.
- Worley PF, Baraban JM, Snyder SH (1989). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding: autoradiographic localization in rat brain. *J Neurosci.* 9:339-346.
- Xia HJ, Yang G (2005). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases: functions and regulations. *Cell Res.* 2:83-91.
- Xu ZC, Ling G, Sahr RN, Neal-Beliveau BS (2005). Asymmetrical changes of dopamine receptors in the striatum after unilateral dopamine depletion. *Brain Res.* 1038:163-170.
- Yang X, Rudolf M, Carew MA, Yoshida M, Nerreter V, Riley AM, Chung SK, Bruzik KS, Potter BV, Schultz C, Shears SB (1999). Inositol 1,3,4-trisphosphate acts in vivo as a specific regulator of cellular signaling by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J Biol Chem.* 274:18973-18980.
- Yang SN, Yu J, Mayr GW, Hofmann F, Larsson O, Berggren PO (2001). Inositol hexakisphosphate increases L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity by stimulation of adenylyl cyclase. *FASEB J.* 15:1753-1763.
- Ye W, Ali N, Bembenek ME, Shears SB, Lafer EM (1995). Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem.* 270:1564-1568.
- Yu J, Leibiger B, Yang SN, Caffery JJ, Shears SB, Leibiger IB, Barker CJ, Berggren PO (2003). Cytosolic multiple inositol polyphosphate phosphatase in the regulation of cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem.* 278:46210-46218.
- Yuan Q, Mutoh H, Debarbieux F, Knopfel T (2004). Calcium signaling in mitral cell dendrites of olfactory bulbs of neonatal rats and mice during olfactory nerve Stimulation and beta-adrenoceptor activation. *Learn Mem.* 11:406-411.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
bzw.	beziehungsweise
cADPR	zyklische Adenosindiphosphat-Ribose
Calcium	Ca <sup>2+</sup>
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin Kinase II
DAG	Diacylglycerol
DIPP	Diphosphoinositol-Polyphosphat Diphosphatase
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fg	Feuchtgewicht
Gq	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (chemotaktisch)
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
i.p.	intraperitoneal

---

InsP	Inositolphosphat
Ins(1,4)P <sub>2</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 1,4-bisphosphat
Ins(1,3,4)P <sub>3</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 1,3,4-trisphosphat
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 1,4,5-trisphosphat
Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat
Ins(3,4,5,6)P <sub>4</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 3,4,5,6- tetrakisphosphat
Ins(1,4,5,6)P <sub>4</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 1,4,5,6- tetrakisphosphat
Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>	D- <i>myo</i> -Inositol 1,3,4,5,6- pentakisphosphat
InsP <sub>6</sub>	Inositolhexakisphosphat
InsP <sub>3</sub> R	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> Rezeptoren
IPMK	Inositolpolyphosphat-Multikinase
KDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LTP	Langzeit-Potenzierung
MDD	<i>metal dye detection</i>
m	Meter
mGluR1	metabotroper Glutamatrezeptor Typ 1
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor Typ 5
M	molar
min	Minute
MIPP	Multiple Inositolpolyphosphat Phosphatase
mg	Milligramm
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
n	nano
NAADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid

---

p	Wahrscheinlichkeit
5-Phosphatase	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> /Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> -5-Phosphatase
PAR	4-(2-pyridylazo)resorcinol
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasen
PLC	Phospholipase C
PP	Polypropylen
[PP]-InsP <sub>4</sub>	Diphosphotetrakisphosphat (entspricht InsP <sub>7</sub> )
[PP]-InsP <sub>5</sub>	Diphosphoinositolpentakisphosphat (entspricht InsP <sub>8</sub> )
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PTEN	InsP <sub>6</sub> /Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> 3-Phosphatase
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptoren
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	sarkoplasmatische/endoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPasen
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
w/v	Gewicht/Volumen
YCl <sub>3</sub>	Yttriumchlorid
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem



## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	InsP Nomenklatur.....	4
Abb. 1.1-1	Zusammenfassung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ Signaltransduktion....	6
Abb. 1.2-1	Der InsP Metabolismus in tierischen Zellen.....	9
Abb. 2.2.1.5-1	Schematische Darstellung des Geräteaufbaus der Micro-MDD-HPLC.....	21
Abb. 3.1.1-1	Micro-MDD-HPLC Chromatogramm vom unfixiertem Kleinhirngewebe.....	27
Abb. 3.1.1-2	Verteilung der Inositolphosphate in den verschiedenen unfixierten Kleinhirnregionen.....	28
Abb. 3.1.2.1-1	Einfluss der Immersionsfixierung auf die InsP Konzentrationen im Kleinhirn.....	29
Abb. 3.1.2.2-1	Einfluss der Perfusionsfixierung bei Raumtemperatur auf die InsP Konzentrationen im Kleinhirn.....	30
Abb. 3.1.2.2-2	Einfluss der Perfusionsfixierung bei 4 °C auf die InsP Konzentrationen im Kleinhirn.....	31
Abb. 3.1.2.2-3	Präparationsschema des Striatums.....	32
Abb. 3.1.2.2-4	Verteilung der Inositolphosphate im Striatum.....	33
Abb. 3.2-1	Zeitabhängige Veränderungen der InsP Konzentrationen.....	34
Abb. 3.3-1	Ausschnitt aus dem InsP Metabolismus in tierischen Zellen.....	35
Abb. 3.3-2	Micro-MDD-HPLC Chromatogramm im Bulbus olfactorius.....	36
Abb. 3.3-3	Darstellung der Frontalschnitte im Gehirn der Ratte.....	37
Abb. 3.3.1-1	Verteilung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	39
Abb. 3.3.1-2	Delta Veränderung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.....	41
Abb. 3.3.1-3	$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Konzentration im frontopolaren Kortex.....	42
Abb. 3.3.1-4	$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Konzentrationen im lateralen Striatum und im Tuberculum olfactorium.....	43
Abb. 3.3.1-5	$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Konzentration im temporalen Kortex, im Fornix und im Thalamus.....	43
Abb. 3.3.1-6	$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Konzentration im entorhinalen Kortex.....	44
Abb. 3.3.1-7	$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Konzentration im okzipital Pol.....	44
Abb. 3.3.2-1	Verteilung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	47
Abb. 3.3.2-2	Delta Veränderung der $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.....	48
Abb. 3.3.2-3	$\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ Konzentration im Hippocampus und im cingulären Kortex.....	49
Abb. 3.3.2-4	$\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ Konzentration im okzipital Pol.....	49

Abb. 3.3.3-1	Verteilung von $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	51
Abb. 3.3.3-2	Delta Veränderung der $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.....	52
Abb. 3.3.3-3	$\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ Konzentration im frontopolaren Kortex.....	53
Abb. 3.3.3-4	$\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ Konzentration im cingulären Kortex.....	54
Abb. 3.3.3-5	$\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ Konzentration im okzipitalen Kortex.....	54
Abb. 3.3.4-1	Verteilung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	57
Abb. 3.3.4-2	Delta Veränderung der $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.....	58
Abb. 3.3.4-3	$\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ Konzentration im okzipital Pol.....	59
Abb. 3.3.5-1	Verteilung von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	61
Abb. 3.3.5-2	Delta Veränderung der $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.....	62
Abb. 3.3.5-3	$\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ Konzentration im Bulbus olfactorius und im frontopolaren Kortex.....	63
Abb. 3.3.5-4	$\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ Konzentration in der weißen Substanz, im lateralen Striatum, im parietalen, piriformen und cingulären Kortex.....	64
Abb. 3.3.5-5	$\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ Konzentration im okzipitalen, cingulären und temporalen Kortex.....	65
Abb. 3.3.5-6	$\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ Konzentration im okzipital Pol.....	66
Abb. 3.3.6-1	Verteilung von $\text{InsP}_6$ in der Kontrollgruppe sowie nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	68
Abb. 3.3.6-2	Delta Veränderung der $\text{InsP}_6$ Konzentration nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Gehirn der Ratte.....	69
Abb. 3.3.6-3	$\text{InsP}_6$ Konzentration im frontopolaren Kortex und im Nukleus olfactorius mit Tuberculum olfactorium.....	70
Abb. 3.3.6-4	$\text{InsP}_6$ Konzentration im Septum und in der somatosensorischen Region des parietalen Kortex.....	70
Abb. 3.3.6-5	$\text{InsP}_6$ Konzentration im cingulären Kortex.....	71
Abb. 3.3.6-6	$\text{InsP}_6$ Konzentration im okzipitalen Kortex.....	71
Abb. 3.3.7-1	Veränderung der $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ Konzentrationen in der Brücke bis Medulla, im Kleinhirn, in der Medulla oblongata und im Mittelhirn.....	72
Abb. 3.3.7-2	Veränderung der $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen.....	73
Abb. 3.3.7-3	Veränderung der $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen.....	75

Abb. 3.3.7-4	Veränderung der InsP <sub>7</sub> Konzentrationen in der Brücke bis Medulla, im Bulbus olfactorius, im Kleinhirn, in der Medulla oblongata und im Mittelhirn.....	76
Abb. 3.4-1	Verteilung der Inositolphosphate im cingulären Kortex, im Thalamus, im Hypothalamus und im Hippocampus.....	77
Abb. 3.5.1-1	Veränderung von $\Delta$ PLC <sub>anabol</sub> nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	79
Abb. 3.5.2-1	Veränderung der $\Delta$ Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> -3-Kinase nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	81
Abb. 3.5.3-1	Veränderung der $\Delta$ Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> -5-Phosphatase nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	83
Abb. 3.5.4-1	Veränderung der $\Delta$ Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> -2-Kinase nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	85
Abb. 4.1-1	Ausschnitt aus dem InsP Metabolismus in tierischen Zellen.....	90
Abb. 4.3.1-1	Ausschnitt aus dem InsP Stoffwechsel.....	102
Abb. 4.3.2.1-1	Korrelationsanalysen zwischen den InsP metabolisierenden Enzymen nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad im Gehirn der Ratte.....	103
Abb. 4.3.2.2-1	Zusammenfassung der Veränderung der InsP Konzentrationen und ihrer metabolisierenden Enzyme im rechten Thalamus des Frontalschnitts 4 nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	105
Abb. 4.3.2.2-2	Zusammenfassung der Veränderung der InsP Konzentrationen und ihrer metabolisierenden Enzyme im rechten Hypothalamus des Frontalschnitts 3 nach erlerntem und erzwungenem Laufen im Laufrad.....	108

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.2.1.1-1	Biochemische Charakteristika der Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> -3-Kinase Isoformen.....	10
Tab. 1.2.1.4-1	Biochemische Charakteristika der InsP <sub>6</sub> Kinase Isoformen.....	13
Tab. 2.2.1.5-1	HPLC-Gradient für die Trennung der verschiedenen Inositolphosphate.....	22
Tab. 2.2.2.1-1	Zusammenstellung der einzelnen Frontalschnitte.....	25
Tab. 2.2.2.3-1	HPLC-Gradient für die Trennung der verschiedenen Inositolphosphate.....	26
Tab. 3.3.1-1	Bezeichnung der Gehirnregionen und Nuklei.....	40

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. G.W. Mayr für die Überlassung des interessanten Themas, seine wissenschaftliche Betreuung und für die hilfreiche Diskussion über die verschiedenen Aspekte dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Bretting für die Übernahme des Gutachtens im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Lorke für die gute Kooperation und die Unterstützung bei der Gewebepräparation sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktiven Arbeitsvorschläge.

Ich danke Frau Bettina Thiel für die Hilfestellung bei allen technischen Aspekten der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Frau Kornelia Babista für die geduldige Unterstützung beim tierexperimentellen Arbeiten.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I für die gute Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. N. Nehmann danke ich dafür, dass ich meine Nerven behalten habe und für die kreativen Diskussionen.

Dem Graduiertenkolleg 255 „Neurale Signaltransduktion und deren pathologische Störungen“ danke ich für die finanzielle Förderung der Arbeit.

Insbesondere danke ich meiner Freundin Uta Rickert, die mich immer unterstützt hat und es immer wieder geschafft hat, mich zu motivieren, meine Arbeit in einem anderen Blickwinkel zu sehen.

Bei meinem Freund Sascha Ochs möchte ich mich für die Geduld und die Einsicht bedanken, mit der er die Höhen und Tiefen während der Schlussphase meiner Arbeit mitgetragen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit stets unterstützt haben. Besonders ihr Vertrauen hat mich immer wieder ermutigt und darin bestärkt diesen Weg zu gehen. Daher ist diese Arbeit vor allem ihnen gewidmet.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Gustke  
Vorname Heike  
Geburtsdatum 19.02.1978  
Geburtsort Bergen/Rügen

### Schulbildung

09/1984 – 07/1991 POS, Samtens/Rügen  
08/1991 – 06/1996 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium, Bergen/Rügen  
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulstudium

09/1996 Aufnahme des Humanbiologiestudiums an der  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald  
09/1999 Ablegung der Diplomvorprüfung  
09/2000 Ablegung der Diplomprüfung  
11/2000 – 07/2001 Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Pharmakologie an der  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald  
Thema: Untersuchungen zur Funktion der Promotorregion des  
Myeloperoxidase-Gens  
08/2001 Abschluss des Humanbiologiestudiums mit dem Diplom

### Promotion

09/2001 – 02/2007 Anfertigung der Doktorarbeit im Institut für Biochemie und  
Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion am  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg  
Thema: Verteilung und biologische Rolle von Inositolphosphaten im  
Gehirn von *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769)  
09/2001 – 08/2004 Stipendiatin im Graduiertenkolleg 255 „Neurale Signaltransduktion  
und deren pathologische Störungen“

### Berufliche Tätigkeit

seit 07/2005 wissenschaftliche Angestellte im Institut für Anatomie II –  
Experimentelle Morphologie am Universitätsklinikum Hamburg-  
Eppendorf, Hamburg

## Publikationen

Aus dieser Arbeit sind während der Promotionszeit folgende Publikationen hervorgegangen:

### Originalarbeiten

**2004** Lorke DE, **Gustke H**, Mayr GW. An optimized fixation and extraction technique for high resolution of inositol phosphate signals in rodent brain. *Neurochem Res.* 29:1887-1896.

### Posterpräsentationen

**2003** Nalaskowski M, Brehm M, Bischoff N, **Gustke H**, Windhorst S, Fanick W, Mayr GW. Intracellular distribution of inositol phosphate metabolizing enzymes in mammalian cells. ELSO Meeting. Dresden

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich gemäß §7 (d), dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen sowie verwendeten Quellen angegeben habe.

Alle Personen, die mich bei der Anfertigung des Manuskripts unterstützt haben, sind namentlich benannt.

Heike Gustke

Hamburg, Februar 2007