

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der Abteilung Anatomie I:
Zelluläre Neurobiologie
des Zentrums für experimentelle Medizin

Direktorin: Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune

**Die Expression synaptischer Proteine
in hippocampalen Neuronen nach Knock down des
Steroidogenic Acute Regulatory Proteins**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Cornelia Eva Huber
geboren in Salzburg

Hamburg 2009

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Bottner M, Rune G M (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinology* 18: 847–856.

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

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 03.03.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/-in: PD Dr. R. Bender

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/-in: PD Dr. H.-J. Kreienkamp

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1	
Abkürzungsverzeichnis	3	
Abbildungsverzeichnis.....	5	
I	Einleitung	6
1	Der Hippocampus	7
	1.1 Struktur und Verschaltung.....	7
	1.2 Funktion	8
2	Cholesterol.....	9
	2.1 Aufbau und Funktion	9
	2.2 Wirkung im Gehirn.....	10
3	Östrogen	11
	3.1 Synthese	11
	3.2 Östrogenwirkung im Gehirn.....	12
	3.3 Östrogenrezeptoren im Hippocampus.....	12
4	Synaptische Aktivität.....	13
	4.1 Synaptische Marker.....	13
	4.2 Marker für axonales Wachstum.....	14
5	Wege der Beeinflussung der Expression synaptischer Proteine.....	15
	5.1 Pharmakologische Hemmung der Östrogensynthese	15
	5.2 Molekularbiologische Hemmung der Östrogensynthese	15
	5.3. StAR.....	16
6	Fragestellung und Zielsetzung.....	17
II	Material und Methoden	18
1	Material und Geräte	18
2	Chemikalien	19
3	Lösungen	20
4	Methoden.....	21
	4.1 Tiere.....	21
	4.2 Präparation des Hippocampus aus der Ratte.....	21
	4.3 Dispersionskultur neuronaler Zellen.....	21
	4.4 siRNA StAR <i>knock down</i>	23
	4.5 Behandlung der Kulturen.....	23
	4.6 Immunhistochemie der Dispersionskulturen.....	23
	4.7 Bildanalyse.....	24

4.8	Statistische Analyse	25
III	Ergebnisse	26
1	Spinophilinexpression nach <i>knock down</i> von StAR	27
2	Synaptophysinexpression nach <i>knock down</i> von StAR	30
3	GAP43-Expression nach <i>knock down</i> von StAR.....	33
IV	Diskussion	35
V	Zusammenfassung	41
VI	Literaturverzeichnis.....	42
VII	Danksagung.....	52
VIII	Versicherung an Eides statt.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	<i>Alzheimer disease</i> (Alzheimer-Krankheit)
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
Aufl.	Auflage
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Cornu ammonis
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
Chol	Cholesterol
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Co-A	Coenzym A
Cy3	Indocarbocyanin 3
d	<i>day/ days</i> (Tag/ Tage)
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
dest.	<i>destillata</i> (destilliert)
DG	Gyrus dentatus
d. h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DIV	<i>days in vitro</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EC	entorhinaler Kortex
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
GAP43	<i>growth associated protein 43</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	<i>hora/ horae</i> (Stunde/ Stunden)
HC	Hippocampus
HCl	Salzsäure

HMG-CoA	Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
LTP	<i>long-term potentiation</i> (Langzeitpotenzierung)
M	molar
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
mg	Milligramm
min	Minute/ Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mol	Mol
MOSP	<i>myelin/ oligodendrocyte-specific protein</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Proteinbiosynthese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI	Propidiumiodid
PKN	Proteinkinase
RT	Raumtemperatur
scc	<i>side chain cleavage enzyme</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
u.a.	unter anderem
U/ min	Umdrehung pro Minute
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hippocampus einer adulten Ratte; In-situ-Hybridisierung des ER α im Hippocampus (aus: Rune et al., 2002).....	8
Abbildung 2: Östrogensynthese im menschlichen Körper, (L. Fester).....	12
Abbildung 3: <i>RNA interference</i> (aus N. R. Wall und Y. Shi, Lancet, 2001).....	16
Abbildung 4: Transfektion einer Zelle mit siRNA gegen StAR.....	26
Abbildung 5: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von StAR in Neuronen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR nach 12 h...	27
Abbildung 6: Immunreaktivität von Spinophilin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR.	28
Abbildung 7: Quantitative Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Spinophilin-Antikörpern in siRNA-transfizierten Kulturen	29
Abbildung 8: Immunhistochemie von Synaptophysin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR.	31
Abbildung 9: Quantitative Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptophysin-Antikörpern in siRNA-transfizierten Kulturen nach Behandlung mit 17 β -Östradiol und Cholesterol	32
Abbildung 10: Immunhistochemie mit GAP43-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR	33
Abbildung 11: Expression von GAP43 in siRNA-transfizierten Kulturen.....	34

I Einleitung

Östrogen wurde lange ausschließlich als Sexualhormon zur Regulation der Geschlechtsdifferenzierung und -reifung betrachtet. Woolley und Mitarbeiter demonstrierten bereits 1990, dass die Dichte der Spinesynapsen während des gonadalen Zyklus weiblicher Ratten variiert. Die höchste Spinedichte war während des Proöstrus zu beobachten, wenn der Östrogengehalt im Serum seinen Maximalwert erreicht hat. Bei ovariectomierten Ratten kam es umgekehrt zu einer Abnahme der Spinesynapsendichte. Durch anschließende Östrogensubstitution dieser Ratten konnte ein Wiederanstieg der Synapsendichte erzielt werden (Gould et al., 1990). Östrogen beeinflusst somit die synaptische Plastizität (Woolley und McEwen, 1992; Bisagno et al., 2003; Katja und Beyer, 2003; Saunders-Pullman, 2003) und besitzt darüber hinaus antioxidative Eigenschaften (Behl und Manthey, 2000). Zahlreiche Studien belegen zudem neuroprotektive Funktionen von Östrogen, wie zum Beispiel beim apoplektischen Insult (Garcia-Segura et al., 2001, Azcoitia et al., 2002). Östrogen wird *de novo* in hippocampalen Neuronen gebildet (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004; Hojo et al., 2004) und ist für die Aufrechterhaltung von Spinesynapsen essenziell (Kretz et al., 2004; Rune et al., 2006; Zhou et al., 2007). Eine entscheidende Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Aromatase, das finale Enzym der Östrogensynthese (Fester et al., 2009). Nach Verletzungen des Gehirns wird die Aromatase vielfach aktiviert und Östrogen vermehrt gebildet. Dies konnte im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit gezeigt werden (Schaeffer et al., 2008). Umgekehrt führt Überexzitation von neuronalem Gewebe zu einer Reduktion der Östrogensynthese und in Folge davon zu Synapsenverlust (Zhou et al., 2007). Dieser Zusammenhang könnte im Rahmen der Epilepsie eine Rolle spielen. Somit bietet die lokale Östrogensynthese als Folge der Aromataseaktivität ein interessantes therapeutisches Ziel bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

1 Der Hippocampus

1.1 Struktur und Verschaltung

Bereits 1878 beschrieb Broca das limbische System als einen Gürtel (Limbus) von Rindengebieten, gegliedert in einen inneren Ring, der vom Hippocampus (archikortikaler Allokortex) gebildet wird, und einen äußeren Ring, bestehend aus Gyrus parahippocampalis und Gyrus cinguli. Die zwei parallel nebeneinander liegenden Ringsysteme der Hippocampusformation bilden am Boden des Seitenventrikelunterhornes die mediale Randzone des Temporallappens und münden am Splenium corporis callosi in das Indusium griseum ein.

Im Gegensatz zum sechsschichtigen Neokortex ist der Aufbau dieser phylogenetisch älteren Region auf drei Schichten reduziert (Stephan, 1975). Im Frontalschnitt werden die zwei ineinander verschränkten, u-förmigen Neuronenstreifen sichtbar, bestehend aus dem Gyrus dentatus (Fascia dentata) und dem Ammonshorn (Cornu ammonis).

Im Ammonshorn liegt das Pyramidenzellband (Stratum pyramidale) eingebettet zwischen Stratum oriens und Stratum moleculare und kann aufgrund seiner Struktur und Verschaltung in drei Bereiche CA1-CA3 unterteilt werden. Während die CA1 Region überwiegend aus kleinen Pyramidenzellen aufgebaut ist, befinden sich in den anderen beiden Regionen große Pyramidenzellen. Das Pyramidenzellband wird vom Gyrus dentatus, dessen Körnerzellen ein sichtbares Neuronenband bilden, umfasst. Die Axone dieser kleinen, erregenden, glutamatergen Neuronen ziehen als Moosfasern zu den Pyramidenzellen der CA3-Region des Ammonshornes.

Über den Tractus perforans erreichen den Hippocampus sensorische Informationen aller Sinnesmodalitäten aus der Regio enterorhinalis, wie z. B. Afferenzen aus Gyrus cinguli, Corpus amygdaloideum, Septum und Thalamus.

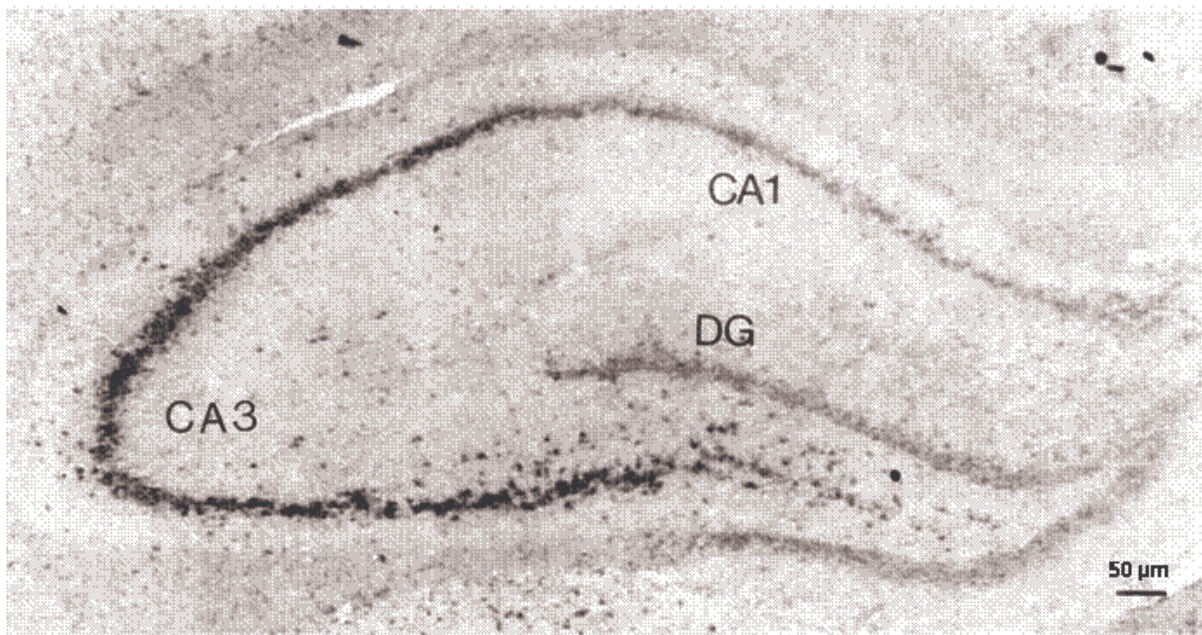


Abbildung 1: Hippocampus einer adulten Ratte; Mittels In-situ-Hybridisierung ist die Expression des ER α im Hippocampus gezeigt. Zellen der CA3 Region zeigen eine deutlich stärkere Expression als die hippocampalen Regionen CA1 und Gyrus dentatus (aus: Rune et al., 2002).

Efferenzen ziehen im Fornix hauptsächlich zu den Corpora mamillaria und geben im Verlauf Fasern an das Septum, das Corpus amygdaloideum und den Hypothalamus ab. Die sogenannten Schaffer-Kollateralen verbinden die CA3-Neurone mit den Pyramidenzellen der CA1-Region (Akert, 1994).

1.2 Funktion

Der Hippocampus und seine angrenzende Struktur, der entorhinale Kortex, spielen eine wichtige Rolle für das episodische und kontextuale Gedächtnis, die Entdeckung von Neuem, die sprachliche Informationsverarbeitung und die räumliche Erinnerung. Werden beide Seiten des Hippocampus beschädigt oder sogar zerstört, führt dies zum Gedächtnisverlust, sowohl in Form einer zeitlich begrenzten retrograden Amnesie, d. h. Verlust von Teilen des Altgedächtnisses, als auch in Form einer anterograden Amnesie, also der Unfähigkeit, Neues zu erlernen (Spiers et al., 2001).

Als morphologisches Korrelat dieser funktionellen Prozesse ist seit Langem bekannt, dass die Speicherung der Gedächtnisinhalte auf Veränderung und Neubildung synaptischer Verbindungen beruht (Hebb, 1949; Morris und Frey, 1999). Über die Projektion des Fornix in die Corpora mamillaria zu den Nuclei anteriores des dorsalen Thalamus und weiter zum Gyrus cinguli und parahippocampalis spielt der Papez-Kreis (Papez, 1937) eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Langzeit-Potenzierung (*long-term potentiation*, LTP). Werden die afferenten Fasern stimuliert, führt dies zu einer lang anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung (Bliss und Lomo, 1973). Dies wird als zellulärer Mechanismus bei der Entstehung neuer Synapsen gesehen (Yuste und Bonhoeffer, 2001). In den Schaffer-Kollateralen, der axonalen Verbindung zwischen CA3 und CA1, befinden sich spezielle Glutamat-Rezeptoren, die an der Langzeit-Potenzierung, also der Überführung von Gelerntem in das Langzeitgedächtnis, beteiligt sind. Östrogen steigert die Ausschüttung von Glutamat und die Expression synaptischer Vesikelproteine in hippocampalen Kulturen (Yokomaku et al., 2003). Rune und Mitarbeiter (2002) konnten die Heraufregulation des Proteins Synaptophysin, das bei synaptischen Vorgängen eine Rolle spielt, in der CA1-Region nach Östrogen-gabe nachweisen.

Ebenso hat der Hippocampus bei der Orientierung in Zeit und Raum eine wichtige Bedeutung, denn Menschen, deren Hippocampus geschädigt ist, können z. B. keine Wegbeschreibungen geben. Zudem scheint ein Zusammenhang mit der Pathogenese von Morbus Parkinson, Schizophrenie und Epilepsie zu bestehen (Kurz et al., 2003; Cyr et al., 2002).

2 Cholesterol

2.1 Aufbau und Funktion

Das Lipid Cholesterol ist Hauptbestandteil der Plasmamembran und ist für deren Stabilität sowie zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität (Brown, 1998) verantwortlich. Zusammen mit anderen Proteinen in der Zellmembran ist es an der Ein-

und Ausschleusung von Signalstoffen beteiligt. Im Blut wird es an Lipoproteine gebunden und transportiert. Es ist die Vorstufe der Gallensäuren sowie aller Steroidhormone. Aus drei Molekülen aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) entsteht über das Zwischenprodukt Acetoacetyl-CoA das β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (β -HMG-CoA). Mithilfe des Enzyms HMG-CoA-Reduktase und NADPH wird das β -HMG-CoA zu Mevalonat reduziert. Der letzte Schritt gilt als geschwindigkeitsbestimmend bei der gesamten Synthese. Die HMG-CoA-Reduktase, als ein integrales Enzym im endoplasmatischen Retikulum, kann pharmakologisch durch Statine gehemmt werden und wird derzeit therapeutisch zur Senkung des Cholesterolspiegels eingesetzt.

2.2 Wirkung im Gehirn

Etwa 25 % des im menschlichen Körper gebildeten Cholesterols sind im Gehirn lokalisiert (Björkhem und Meany, 2004). Das Gehirn, das neben Eierstöcken, Nebennieren und Hoden den höchsten Bedarf an diesem Hormon aufweist, synthetisiert das von ihm benötigte Cholesterin vollständig selbst. Cholesterin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und wird daher *de novo* im Gehirn aus Acetyl-CoA gebildet (Pfrieger, 2003). Sowohl Neurone als auch Gliazellen können Cholesterin synthetisieren (Mauch et al., 2001) und stellen so den Rohstoff zum Aufbau synaptischer Strukturen und Funktionen zur Verfügung (Suzuki et al., 2007). Das von Neuronen produzierte Cholesterin deckt aber nur den Eigenbedarf der Zellen ab. Zur Synaptogenese bedarf es der Gliazellen, die Cholesterin im Überschuss produzieren und die Nervenzellen damit versorgen. Im Vergleich zu anderen Geweben befindet sich im Gehirn bis zu zehnmal mehr Cholesterin, das in den präsynaptischen Enden angereichert ist (Pfrieger, 2003). Cholesterin verbessert die Expression synaptischer Proteine, erhöht die neuronale Aktivität und ist für die Ausdifferenzierung von Dendriten und Synapsen im ZNS verantwortlich (Koudinov und Koudinova, 2001; Goritz et al., 2005).

3 Östrogen

3.1 Synthese

Die natürlich auftretenden Östrogene 17β -Östradiol (E2), Östron (E1) und Östriol (E3) sind alle C-18-Steroid-Derivate von Cholesterol. Der initiale Schritt der eigentlichen Östrogensynthese ist der Transfer von Cholesterol aus dem Zytosol zur inneren Mitochondrienmembran, bei der das Transportprotein, das *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR), eine entscheidende Rolle einnimmt und als *rate limiting step* gilt (Arakane et al., 1996; Kallen et al., 1998). Das Enzym Cytochromoxidase P450_{scc} wandelt hier Cholesterol in Pregnenolon um. Im endoplasmatischen Retikulum wird Pregnenolon durch das Enzym P450c-17 zunächst in 17-Hydroxy-Pregnenolon umgewandelt. Die 17α -Hydroxylase, die ebenfalls zur Cytochrom-P450-Familie gehört, wandelt es zu Dehydroepi-androsteron (DHEA) um. DHEA wird durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxydo-reduktase (17β -HOR) zu Androstendion und schließlich irreversibel mittels der 3β -Hydrosteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) zu Testosteron umgewandelt. In einem nächsten Schritt kann aus Testosteron dann 17β -Östradiol entstehen. Alternativ kann aus Androstendion auch Östron synthetisiert werden, das im Gleichgewicht mit 17β -Östradiol steht. Die Aromatase ist das Schlüsselenzym, welches für den letzten Schritt der Kaskade der Östrogensynthese verantwortlich ist. Es katalysiert die Abspaltung der C19-Methylgruppe und bewirkt eine Ringbildung des Rings A mit den C-Atomen 1 bis 5 und 10 des Sterangerüsts in eine aromatische Struktur, wodurch 17β -Östradiol entsteht.

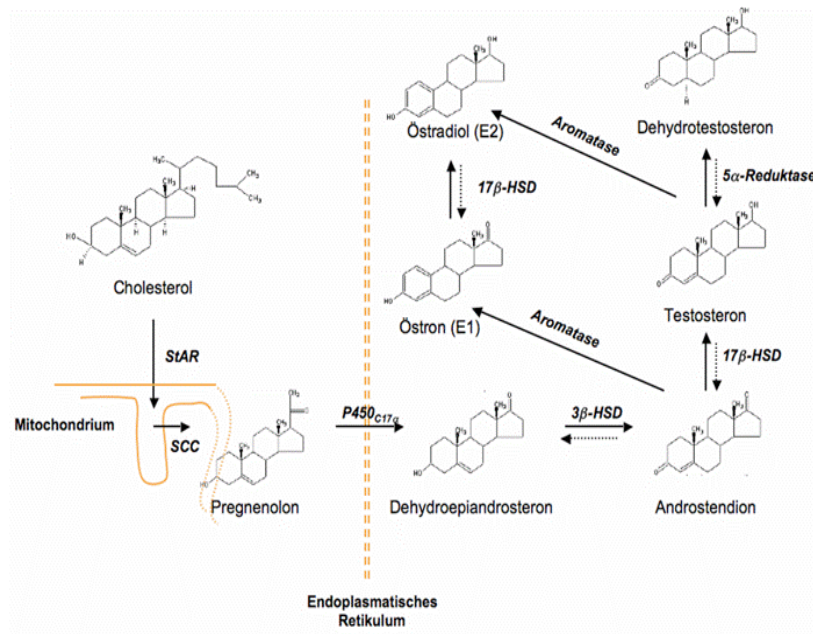


Abbildung 2: Östrogensynthese im menschlichen Körper (L. Fester).

3.2 Östrogenwirkung im Gehirn

Es wurden zahlreiche Wirkungsmechanismen und Funktionen im Gehirn beschrieben. Östrogen hat neuroprotektive Funktion (Garcia-Segura et al., 2001), moduliert die synaptische Plastizität (Woolley und McEwen, 1992; Bisagno et al., 2003; Katja und Beyer, 2003; Saunders-Pullman, 2003) und beeinflusst den GABA-Stoffwechsel. Es erhöht das Ausmaß der LTP (Foy et al., 1999; Mukai et al., 2007) und steigert die Expression von NMDA-Rezeptoren (Adams et al., 2004; Jelks et al., 2007).

3.3 Östrogenrezeptoren im Hippocampus

Östrogenrezeptoren sind nukleäre Hormonrezeptoren und gehören der Familie ligandengesteuerter Transkriptionsfaktoren an, wie z. B. auch die Rezeptoren für Schilddrüsenhormone. Um ihre Wirkung entfalten zu können, müssen Steroidhormone in die Zellen gelangen. Dort setzen sie sich an spezifische Rezeptoren, induzieren eine Aktivierungskaskade und bilden einen Rezeptor-Hormon-Komplex, der in den Zellkern wandert. Nach Bindung des Komplexes an spezifische Stellen

der DNA, die sogenannten *estrogen responsive elements* (EREs), erfolgt die Transkription bestimmter Gene. Folglich tritt die Wirkung der Steroide in einem Zeitraum von Stunden ein, da die benötigten Proteine zur Steroidsynthese erst synthetisiert werden müssen. Neben dem bereits seit längerer Zeit bekannten Östrogenrezeptor ER α (Green et al., 1986) wurde ein weiterer Rezeptor ER β entdeckt (Kuiper et al., 1996; Tremblay et al., 1997). In ihrer Struktur unterscheiden sich die Subtypen, die codierenden Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen. Beide Rezeptortypen konnten auch in primären neuronalen Kulturen immunhistochemisch nachgewiesen werden (Hösli und Hösli, 1999).

Neben dem klassischen Weg, der durch eine lange Latenzzeit gekennzeichnet ist, konnten auch schnelle Effekte des Östrogens gezeigt werden, die über membranständige Rezeptoren vermittelt werden (Toran-Allerand et al., 1999; Lee und McEwen, 2002). Dies gibt einen Hinweis auf die vielfältigen Signalwege von Östrogen.

4 Synaptische Aktivität

4.1 Synaptische Marker

Synaptophysin: Dieses 38 kDa schwere Protein wird in synaptischen Vesikeln in großer Anzahl exprimiert (Jahn und Südhof, 1999; Leube et al., 1989) und ist ein essenzieller Bestandteil der Vesikelmembran. Synaptophysin assoziiert direkt mit Synaptobrevin, indirekt mit anderen Vesikelproteinen, und steht im Zusammenhang mit plastischen Veränderungen im Gehirn (Janz et al., 1999). Rune und Mitarbeiter (2002) konnten nachweisen, dass es nach Östrogenapplikation im Hippocampus vor allem in der CA1-Region zu einer vermehrten Expression von Synaptophysin kommt. Die Hemmung der Östrogensynthese mit dem Aromatasehemmer Letrozol führte zu einer signifikanten Abnahme von Synaptophysin (Rune et al., 2002; Yokomaku et al., 2003).

Spinophilin: Spinophilin gilt als indirekter Marker für Spines, da es vorwiegend in Spines und Dendriten vorkommt und die Bildung und Funktion der Spines reguliert

(Feng et al., 2000; Hao et al., 2003; Muly et al., 2004). Bisher konnten über 30 Proteine nachgewiesen werden, mit denen Spinophilin interagiert, darunter Membranrezeptoren, Ionenkanäle, Zelladhäsionsmoleküle und Tumorsuppressor-Proteine. Zudem bindet es F-Actin und die katalytische Untereinheit der Protein-Phosphatase 1, einem Enzym, welches Rezeptoren und Transmitterkanäle an dendritischen Spines reguliert (Sarrouilhe et al., 2006).

4.2 Marker für axonales Wachstum

GAP43: An der Reifung von Nervenzellen ist das Membranprotein GAP43, *growth-associated protein* oder Neuromodulin (Benowitz und Routtenberg, 1997), als wichtiger Faktor beteiligt. Es hat ein molekulares Gewicht von 43 kDa und ist beim Menschen auf dem Chromosom 3 lokalisiert.

Das wachstums- und plastizitätsassoziierte Protein GAP43, ein calmodulin-bindendes Phosphoprotein, wird durch eine phospholipidabhängige Protein-Kinase C (PKC) phosphoryliert (Gispén et al., 1991; Schaechter und Benowitz, 1993). Phosphoryliertes GAP43 hat erstens eine stabilisierende Wirkung auf das Zytoskelett und dient in dieser Weise dem Axonwachstum, zweitens wird die Ausschüttung von Neurotransmittern erhöht (Dekker et al., 1989).

Während das Protein in der Phase des neuronalen Wachstums und der frühen Synaptogenese in Neuronen stark exprimiert wird (Skene und Willard, 1981), zeigt sich eine Abnahme der Aktivität im Laufe der postnatalen Entwicklung (Skene et al., 1989). In Neuronen des Hypothalamus wird die Expression durch Steroide reguliert (Singer et al., 1996). Lustig et al. (1991) wiesen nach, dass Östrogen die Expression von GAP43 im Gehirn steigert. In einigen Teilen des Neokortex und im limbischen System bleibt die Expression während des gesamten Lebens bestehen (Meberg et al., 1991). Regionen, die weiterhin GAP43 enthalten, sollen ein hohes Potenzial an Plastizität besitzen (Benowitz et al., 1991). Da das Protein speziell in Axonen und dort vorwiegend im Wachstumskegel exprimiert wird (Meiri et al., 1998), gilt es als etablierter Marker für axonales Wachstum.

5 Wege der Beeinflussung der Expression synaptischer Proteine

5.1 Pharmakologische Hemmung der Östrogensynthese

Die pharmakologische Hemmung kann z. B. mittels Inhibierung des Schlüsselenzyms der Cholesterolsynthese, der HMG-CoA-Reduktase, erfolgen. Als Folge der Hemmung nimmt der Gesamtgehalt von Cholesterol in den Zellen ab, wodurch der Ausgangsstoff der Steroidbiosynthese nicht mehr zur Verfügung steht. Durch Letrozol, einem potenten Aromatasehemmer, kann die Verstoffwechslung von Testosteron zu Östrogen unterbunden werden. Der Einfluss der Aromatase auf die synaptische Plastizität wurde bereits in zahlreichen Studien behandelt (Kretz et al., 2004; Fester et al., 2006). Die Hemmung des Enzyms in hippocampalen Zellkulturen resultierte in einer Abnahme der Synapsendichte, der dendritischen Spines und der Expression synaptischer Proteine. Diese Vorgänge konnten durch Östrogengabe wieder aufgehoben werden (Kretz et al., 2004; Zhou et al., 2007).

5.2 Molekularbiologische Hemmung der Östrogensynthese

Durch Inhibierung eines Gens (oder dessen korrespondierender mRNA) ist es möglich, die Genfunktion in Zellen zu untersuchen. Hierbei arbeitet man mit Antisense-Oligonukleotiden, Aptameren und Ribozymen. Weiter kann zur Inhibierung der Genexpression eine sogenannte *small interference RNA* (siRNA) eingesetzt werden. SiRNA kommt in Organismen wie *C. elegans* und *Drosophila*, aber auch in Säugetierzellen vor (Fire, 1999; Elbashir et al., 2001). Bei dem Einsatz von langen dsRNA-Molekülen zeigte sich in den meisten Säugetierzellen eine unspezifische Toxizität. Auslöser dafür ist eine dsRNA-abhängige Proteinkinase, die einen Translationsfaktor inaktiviert und somit zu einer generalisierten Suppression der PBS der Zelle führt.

Es konnte gezeigt werden, dass die PKN längenabhängig aktiviert wird (Caplen et al., 2001). So entsteht mithilfe der Ribonuclease III aus längeren dsRNA's eine zwischen 21 und 22 Nukleotide (nt) lange siRNA (Hamilton und Beaulcombe, 1999; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001). Das Prin-

zip beruht darauf, dass diese synthetisch hergestellten Moleküle, sogenannte *small interfering RNAs*, in die Zelle eingebracht werden. In ihrer Struktur sind sie spiegelbildlich zum Ziel-Gen und bilden mit dessen Abbild, der mRNA, einen Komplex, der anschließend abgebaut wird (Hammond et al., 2001; Tuschl et al., 2001).

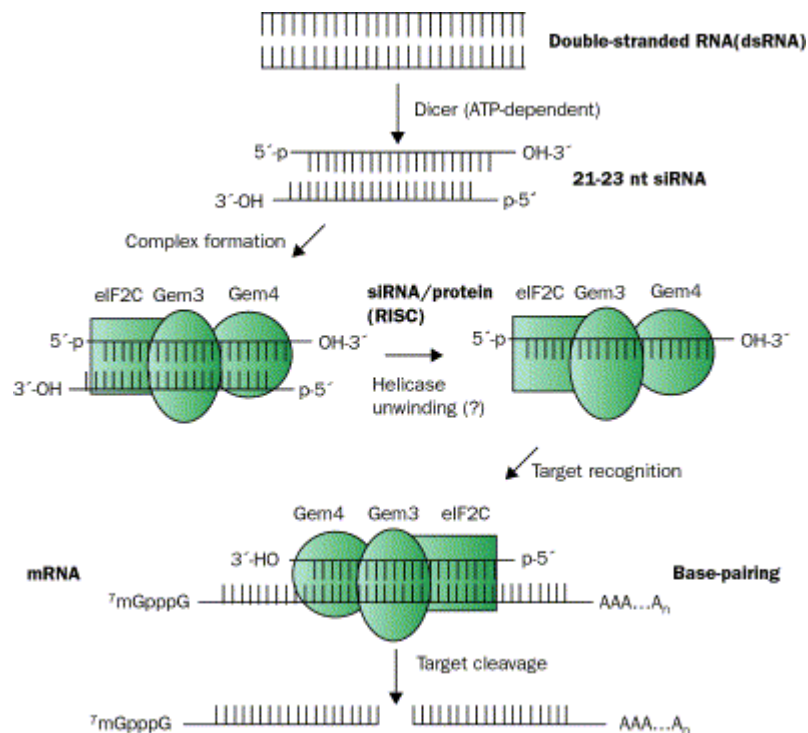


Abbildung 3: *RNA interference*, aus N. R. Wall und Y. Shi, *Lancet*, 2001.

5.3. StAR

StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) ist ein Protein, das Cholesterin zur inneren Mitochondrienmembran transportiert, wo die Steroidsynthese startet (Clark et al., 1994). Neben dem Vorkommen im Ovar und den Nebennieren konnte das Enzym auch im Gehirn nachgewiesen werden, u. a. im Hippocampus (Wehrenberg et al., 2001). Das an der inneren Mitochondrienmembran gelegene Enzym P450_{scc} katalysiert die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon.

Ein Beispiel für die Bedeutung des Proteins liefert die Betrachtung der Vorgänge im Gehirn von Alzheimer-Patienten. Morbus Alzheimer ist charakterisiert durch Gedächtnisverlust, Verhaltensauffälligkeiten sowie Verlust von sprachlichen Fähigkeiten und führt schließlich zum Tod. Epidemiologische Studien zeigen eine Prädisposition von postmenopausalen Frauen, bei denen die Hormone der hypothalamisch-hypophysär-gonadalen Achse rückläufig sind, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Verglichen mit gesundem Gewebe war StAR, welches durch das Hormon LH über den zyklischen AMP-*second-messenger*-Weg reguliert wird, u. a. in den hippocampalen Neuronen von Erkrankten hochreguliert (Webber et al., 2006).

6 Fragestellung und Zielsetzung

Cholesterol, als ein essenzieller Baustein von Membranen und synaptischen Strukturen, galt lange als der elementare Baustein für die Synaptogenese. Es erhöht die Expression synaptischer Proteine, steigert neuronale Aktivität und verbessert die Differenzierung von Dendriten und Synapsen (Mauch et al., 2001; Pfrieger, 2003; Goritz et al., 2005; Koudinov und Koudinova, 2001; Suzuki et al., 2007).

Seit der Erkenntnis, dass Neurone *de novo* Östrogen produzieren (Prange-Kiel et al., 2003), stellt sich die Frage, ob Cholesterol-induzierte Synapsenbildung nicht *de facto* einer Östrogen-induzierten Synaptogenese zugrunde liegt, weil Cholesterol das Substrat für Östrogenbildung im Gehirn ist. In der vorliegenden Arbeit soll durch den *knock down* von StAR dieser Frage nachgegangen werden und die Wirkung von Cholesterol und Östrogen auf synaptische Proteine in siRNA gegen StAR transfizierten Neuronen untersucht werden.

II Material und Methoden

1 Material und Geräte

- Adhäsions-Objektträger, Histobond, ca. 75 x 25 x 1 mm, MARIENFELD
- Aluminiumfolie, LAGER UKE
- Brutschrank, WTC, BINDER
- Cryogenic Vials, NALGENE BRAND PRODUCTS
- Cutfix Scalpell, BRAUN
- Deckgläser, verschiedene Größen, MARIENFELD
- Einmalspritzen, verschiedene Größen, BRAUN
- epT.I.P.S. Standard, 500–1000 µl, EPPENDORF AG
- Falcon Cell Stainer, 40 µm Nylon, BECTON DICKINSON
- Falcon Tissue Culture Plate, 24 *well*, BECTON DICKINSON
- Falcon Tubes, 50 ml, 15 ml, BECTON DICKINSON
- Handschuhe, KIMBERLY-CLARK
- Heidemann-Spatel, AESCULAP DE
- Hettrich Zentrifuge, EBA1R, HETTRICH
- Hettrich Zentrifuge, Universal 32R, HETTRICH
- Instrumentenkasten, 216F1383, MERCK
- Mikroskop LSM 4.1, ZEISS
- Mikroskop, LSM Meta 5.1, ZEISS
- mikroskopische Deckgläser, rund, Ø 12 mm, ASSISTENT
- Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm², BRAND GERMANY
- Nunclon Surface, 24 Well-Platte, NUNC BRAND PRODUCTS
- Openlab 3.1.5 (Software) IMPROVISION
- Parafilm, PECHINEY PLASTIC PACUAGING
- Pasteurpipetten, 25 cm, MERCK
- PCR-Tubes, 0,5 ml, BIOZYM
- Pinzette nach Dumount, 232F1230, MERCK
- Pipetten, verschiedene Volumen, GILSON
- Reaktionsgefäße, 3810X, 1,5 ml, EPPENDORF AG
- Schere, AESCULAP DE
- Sicherheitswerkbank, Klasse 2, HERAEUS
- Spritzenvorsatzfilter, 022 µm, MILLEX GP
- SSPS 13.0 für Windows, SSPS GMBH SOFTWARE
- Tissue Culture Dish, 35 x 10 mm, BECTON DICKINSON
- Vortex-Gene, 2, SCIENTIFIC INDUSTRIES

- Waage, SARTORIUS
- Wasserbad mit Schüttler GFC, 1086, GFC
- Zellstofftücher, WEPA

2 Chemikalien

- Albumin, Bovine, BSA, SIGMA-ALDRICH
- Aqua ad injectabilia, 1 Liter, BAXTER
- Alexa Fluor 488, monoclonal, JACKSON
- Alexa Fluor 488, polyclonal, JACKSON
- Anti-GAP43, polyclonal, SIGMA-ALDRICH
- B27 Supplement, GIBCO
- BARRYCIDAL 36, Desinfektionsmittel, HELMUT SCHRÖDER
- β -Östradiol-Water soluble, 100 mg, SIGMA-ALDRICH
- Cholesterol, SIGMA-ALDRICH
- Cy3, monoclonal, JACKSON
- Cy3, polyclonal, JACKSON
- DAKO, DAKO CYTOMATION
- DAPI, SIGMA-ALDRICH
- Ethanol, 70 %, 96 %, Apotheke UKE
- Formaldehydlösung min. 37 %, MERCK
- Human bFGF-basic, STRATHMANN
- 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin, SIGMA-ALDRICH
- L-Glutamin, 200 mM, SIGMA-ALDRICH
- LipofektaminTM 2000 INVITROGEN
- Natronlauge, 1N, MERCK
- Neurobasal A Medium, GIBCO
- Neurobasal A Medium ohne Phenolrot, GIBCO
- Normal goat serum 2 % (NSG), SIGMA-ALDRICH
- Oligonukleotide Eurofins MWG/ OPERON
- Paraformaldehyd reinst, 4005, MERCK
- PBS Tablets, GIBCO
- Penicillin/ Streptomycin, GIBCO
- Poly-d-Lysin, SIGMA-ALDRICH
- Salzsäure, MERCK
- SilencerTM siRNA Construction Kit, AMBION
- SilencerTM siRNA Labeling Kit, AMBION
- Synaptophysin, monoklonal, CHEMICON
- Spinophilin, monoklonal, UPSTATE

- StAR, CHEMICON
- Testosteron, T6147, SIGMA-ALDRICH
- Tris (Trishydroxymethylaminomethan), INVITROGEN
- Trypsin/ EDTA, L 2163, BIOCHROM

3 Lösungen

Beschichtung der Kulturplatten

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

bFGF

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

Fixierung

- 5 ml 37 % Formaldehydlösung
- 45 ml PBS, pH 7,4, 3 x spülen
- 10 min RT

Kulturmedium für Dispersionskultur

- 50 ml Neurobasal A
- 500 µl B27
- 125 µl L-Glutamin (200 mM)
- 500 µl Penicillin/ Streptomycin bis zum 5. Tag
- Transfektion mit Lipofektamin 2000 für 4 h im Brutschrank
- 50 ml Neurobasal KM ohne Penicillin/ Streptomycin am 7. Tag
- Zusätze: 17β-Östradiol (10^{-7} M), Testosteron (10^{-7} M) und Cholesterol (10^{-7} M)

PBS

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
- 1 Liter Aqua dest.
- pH = 7,4 bei RT

4 Methoden

4.1 Tiere

WISTAR-Ratten (Anatomisches Institut I: Zelluläre Neurobiologie, Universität Hamburg) wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten, Wasser und Futter standen zur freien Verfügung.

4.2 Präparation des Hippocampus aus der Ratte

Pro Experiment, Untersuchung der GAP43-Expression und Untersuchung der Expression synaptischer Proteine, wurden die je fünf bis sieben Tage alten Ratten mit CO₂ anästhesiert und dekapitiert. Nach Öffnung des Schädels wurde das Gehirn vorsichtig mithilfe eines Heidemann-Spatels entnommen und auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt. Das Kleinhirn wurde entfernt und die Hemisphären voneinander getrennt. Anschließend wurden aus den Hirnhälften nacheinander die beiden Hippocampi herauspräpariert und in gekühltes PBS gegeben.

4.3 Dispersionskultur neuronaler Zellen

Die Präparation erfolgte nach der Methode von G. J. Brewer (1997). Zunächst wurde in einer 24-*well*-Titerplatte in jede Kavität ein Glasplättchen gelegt und diese für eine Stunde mit 600 µl Poly-d-Lysin beschichtet, welches anschließend wieder abgesaugt wurde. Nach Spülen mit Neurobasal A trocknete die Titerplatte über Nacht im Inkubator bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde das Poly-d-Lysin mit

einer Pipette abgesaugt und die Kavitäten mit Neurobasal A Medium gespült. Anschließend trocknete die Titerplatte unter der Sicherheitswerkbank.

Die Hippocampi wurden am Präparationstag unter semisterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank weiterbehandelt. Um überschüssiges Gewebe zu entfernen, erfolgte das mehrmalige Spülen mit PBS. Anschließend wurden die Hippocampi mit einer scharfen Klinge zerkleinert und in ein Falcon-Röhrchen mit 25 ml PBS überführt. Der Zellbrei wurde für zehn Minuten bei 4 °C und 5000 U/ min zentrifugiert, der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Durch Zusatz von 37 °C warmem Trypsin/ EDTA (500 µl/ Hippocampus, 3 min) erfolgte der Verdau der extrazellulären Proteine, welcher nach zweieinhalb Minuten durch Neurobasal A gestoppt wurde. Um unverdautes Gewebe zurückzuhalten, filterte man die Zellsuspension durch ein Nylon-Sieb in ein neues Falconröhrchen. Anschließend erfolgte ein weiteres, fünfminütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 5000 U/ min. Der Überstand wurde verworfen. Vor der nächsten Zentrifugation wurden 25 ml phenolrotfreies Neurobasal A Medium zugesetzt, da Phenolrot im Verdacht steht, eine östradiolähnliche Wirkung zu haben. Erneut wurde für fünf Minuten bei 4 °C und 5000 U/ min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurde 20 ml Neurobasal A Medium hinzugefügt. Die Zellzahl wurden anschließend mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Pro Kavität einer 24-*well*-Titerplatte wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension (entspricht 100 000 Zellen) auf die mit Poly-d-Lysin beschichteten Deckgläschen gegeben. Während der folgenden, einstündigen Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) konnten sich die Zellen absetzen und hafteten an den Deckgläschen. Danach wurden die Deckgläschen in eine neue Kulturplatte übertragen. Jedem *well* wurden 1 ml Kulturmedium mit 1 µl Wachstumsfaktor bFGF zugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Wechsel des Kulturmediums, weiterhin erfolgte ein Wechsel alle 48 Stunden. Nach viertägiger Vorkultur hatten sich die Zellen von der Präparation erholt und es erfolgte die Transfektion mit siRNA gegen StAR.

4.4 siRNA StAR *knock down*

Es wurden spezifische Oligonukleotide von MWG-Biotech (Eurofins MWG/Operon) eingesetzt:

- Antisense Strang: 5'-AAA GCT TGA TGC CTC AGT CCT CCT GTC TC- 3'
- Sense Strang: 5' –AAA GGA CTG AGG CAT CAA GCT CCT GTC TC- 3'
- Kontrolle siRNA, Antisenses Strang: 5`- AAA GCT TGA TGC CTC AGT CCT CCT GTC TC- 3' Sense Strang: 5' –AAA GGA CTG AGG CAT CAA GCT CCT GTC TC- 3'

Um die StAR-mRNA der Tiere zu degradieren, wurde der Silencer™ siRNA Construction Kit (Ambion) verwendet.

Die siRNA wurde mit Fluorescein gelabelt (Silencer™ siRNA Labeling Kit, Ambion), die hippocampalen Zellen wurden nach sieben bis neun DIV durch vier- bis sechsstündige Zugabe von Lipofektamin™ 2000 transfiziert. Der *knock down* wurde anhand des immunhistochemischen Färbeindex der transfizierten Zellen für StAR (1:1000, Chemicon) und mittels quantitativer Immunhistochemie (siehe dort) überprüft.

4.5 Behandlung der Kulturen

Die Zellen wurden nach einer Vorkultur im Abstand von 48 Stunden dreimal stimuliert. Den neuronalen Kulturen wurden Cholesterol, Testosteron und 17 β -Östradiol (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 10⁻⁷ M für sieben Tage zugesetzt. Bei der Stimulation mit Cholesterol wurde 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin zugegeben, um das Cholesterol wasserlöslich zu machen. Unbehandelte Kontrollkulturen wurden jeweils mit neuem Kulturmedium versorgt. Die Inkubation fand bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank statt.

4.6 Immunhistochemie der Dispersionskulturen

Nach Herstellung einer Formaldehydlösung (3,7 % in PBS) wurde das Nährmedium aus jedem *well* abgesaugt und durch die Formaldehydlösung ersetzt. Nach

zehn Minuten wurde die Fixierung abgesaugt und es wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gespült. Schließlich wurde je 1 ml PBS in jede Kavität gegeben und die Kulturplatte bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Zu Beginn der Immunhistochemie, die unter semisterilen Bedingungen stattfand, wurden die fixierten Zellen wiederum 3 x 5 min in PBS gespült. Im nächsten Schritt erfolgte das Blockieren mit 2 % NSG in PBS, je 1 ml pro Kavität für 30 Minuten bei Raumtemperatur, um unspezifische Immunreaktionen zu vermindern. Nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung durch die Primärantikörper-Lösung ersetzt.

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: GAP43-Antikörper (monoklonal, 1:1000), Synaptophysin-Antikörper (monoklonal, 1:1000) und Spinophilin-Antikörper (polyklonal, 1:750) in PBS gelöst. Nach Entfernen der NSG-Lösung wurden je 250 µl der jeweiligen Lösung in jede Kavität gegeben und bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach zwölf Stunden wurde die Lösung mit dem Primärantikörper abgesaugt, anschließend wurde die Kultur 3 x 5 min mit PBS gespült. Nun folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers, wobei hier ein Cy3-Antikörper (monoklonal, 1:350) für Synaptophysin und GAP43 sowie ein Cy3-Antikörper (polyklonal, 1:500) oder ein Alexa Fluor 488 (polyklonal 1:500) bei Spinophilin eingesetzt wurde. Die Kulturen wurden mit der Sekundärantikörper-Lösung für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte wieder ein 3-mal fünfminütiges Spülen mit PBS. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI 1:100 000 (Sigma-Aldrich). Nach dreiminütiger Inkubation wurde die Färbung entfernt und gründlich mit PBS (3 x 5 min) gespült. Anschließend wurden die Plättchen auf einen Objektträger überführt, je mit ein bis zwei Tropfen DAKO (fluoreszenzfreies Eindickmedium) überschichtet, mit einem Deckglas versehen und im Kühlschrank aufbewahrt.

4.7 Bildanalyse

Um systematische Fehler zu vermeiden, wurde die Auswertung der Bilder verblindet. Die Auswertung der Proben erfolgte durch die Laserscanmikroskope LSM 4.1 und LSM Meta 5.1 (Zeiss). Die Fluorochrom-markierten Antikörper wur-

den bei gleicher Intensität und Wellenlänge gemessen und fotografiert. Die Bilder wurden digitalisiert und dann durch ein Zellbildsystem (Openlab 3.1.5) analysiert. Es wurden jeweils fünf Areale pro Nervenzelle ausgeschnitten. Die Fläche (dargestellt durch die Anzahl der Pixel) bestimmte den Färbeindex pro Zelle sowie die Intensität der Färbung, die in einer Grauskala ausgedrückt wurde. Dabei wurde durch Multiplikation von Fläche und Intensität ein relativer *staining index* (Färbungsintensität) ermittelt.

4.8 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS 13.0 für Windows verwendet. Für jede Versuchsreihe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und das Signifikanzniveau bestimmt und mithilfe einfaktorieller ANOVA (*analysis of variants for repeat measurements*), gefolgt von einem *Post-hoc*-Test nach Dunnett (zweiseitig), ausgewertet. Hierbei wurde * $p < 0,05$ als signifikant, * * $p < 0,01$ festgelegt.

III Ergebnisse

Bei diesem molekularbiologischen Ansatz wird der Transport von Cholesterin zur inneren Mitochondrienmembran durch Transfektion der hippocampalen Neurone mit siRNA gegen StAR unterbunden. Es konnte bereits in vorangehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Transfektion mit siRNA gegen StAR die Qualität der Zellen nicht beeinflusst (Fester et al., 2006). So konnten bei morphologischer Betrachtung in Bezug auf PI-Staining, LDH-Messung und Tunelstaining keine Unterschiede der mit siRNA gegen StAR transfizierten Kulturen zu siRNA-Kontrollgruppen aufgezeigt werden. Messungen von Östrogen im Medium der Kulturen nach 7 DIV ergaben eine um etwa 20 % verminderte Synthese in der mit siRNA gegen StAR behandelten Gruppe (Fester 2006, 2009). Um die transfizierten Zellen zu identifizieren, wurde die siRNA mit Fluorescein inkubiert. Nach 12 h waren in erfolgreich transfizierten Somata und Neuriten unter dem Fluoreszenzmikroskop kleine, leuchtende Punkte (siehe Pfeil in Abbildung 4) zu erkennen. So konnte verhindert werden, dass nichttransfizierte Zellen in die Auswertung einbezogen wurden. Die Transfektionsrate belief sich in unseren Versuchen auf ca. 40 bis 60 % der Zellen.

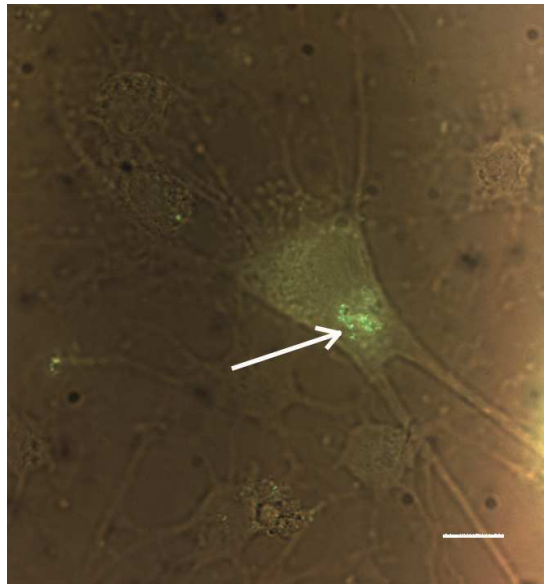


Abbildung 4: Die erfolgreiche Transfektion der Zelle mit siRNA gegen StAR ist durch die grüne Fluoreszenz indiziert (Pfeil). Der Skalierungsbalken entspricht 5 µm.

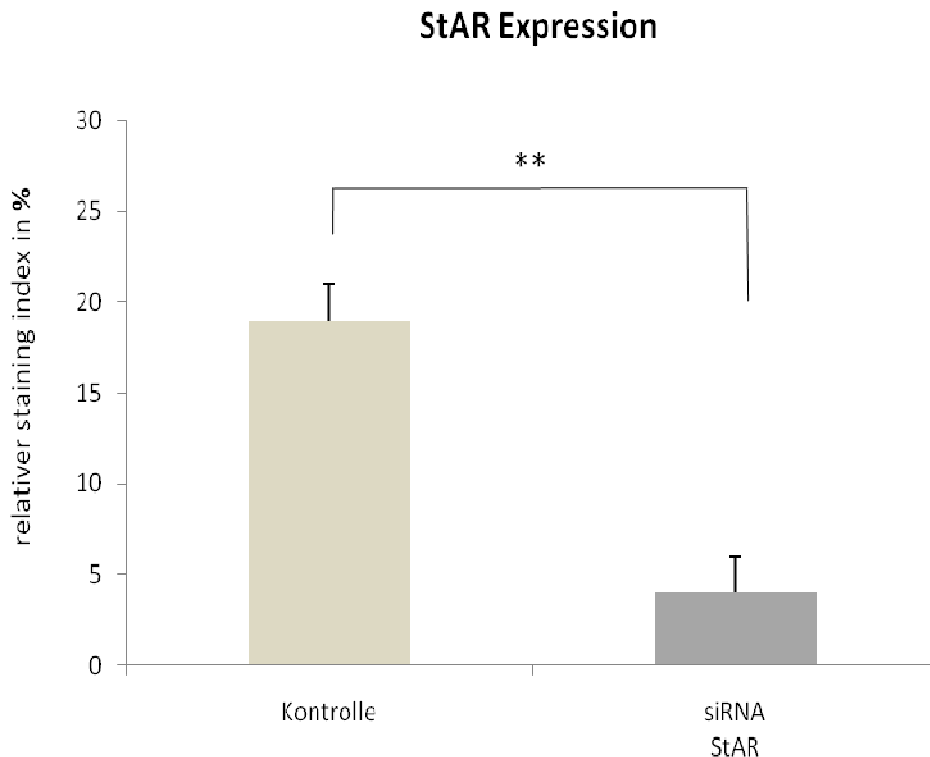


Abbildung 5: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von StAR in Neuronen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR nach 12 h. ($n = 3$ Kulturen pro Gruppe; Mittelwert \pm SEM; $**p \leq 0,01$).

Abbildung 5 zeigt die Expression von StAR in hippocampalen Dispersionskulturen als *staining index*. Durch die Transfektion mit siRNA gegen StAR kommt es nach ca. 12 h zu einer deutlichen Herunterregulation des Proteins.

1 Spinophilinexpression nach *knock down* von StAR

Zur Messung der Expression von Spinophilin wurden hippocampale Dispersionskulturen, wie im Methodenteil beschrieben, mit siRNA gegen StAR transfiziert. Durch die Transfektion konnte Cholesterin nicht zur inneren Mitochondrienmembran gelangen, um weiter verstoffwechselt zu werden. Die transfizierten Kulturen wurden mit Cholesterin und 17β -Östradiol in einer Dosisierung von 10^{-7} M behandelt. Dabei sollte getestet werden, ob die unterdrückte Ex-

pression wieder angehoben werden kann, also ein sogenannter „Rescue“ stattfindet.

In jedem der drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente wurden jeweils drei Kulturen pro Gruppe angelegt. Aus jeder Gruppe wurden 20 Zellen nach dem Zufallsprinzip fotografiert und analysiert. Anschließend wurde ein Mittelwert für jede Gruppe gebildet. Die Auswertung des Färbeindex erfolgte mithilfe des Laserscanmikroskops.

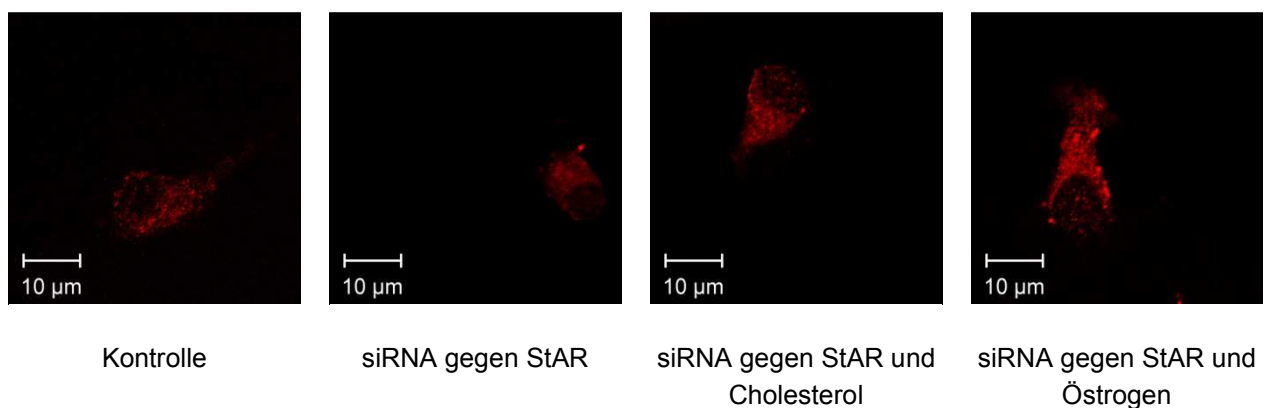


Abbildung 6: Immunreaktivität von Spinophilin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR.

Die Abbildung 6 zeigt in den hippocampalen Zellen nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-Spinophilin unterschiedliche Signale durch die Intensität der Rotfärbung (Kontrolle, siRNA gegen StAR transfizierte Kulturen, transfizierte Kulturen nach Cholesterol- oder Östrogengabe). In siRNA gegen StAR transfizierten Zellen stellt sich eine deutlich verminderte Reaktion dar. Die Zugabe von Cholesterol in einer Dosierung von 10^{-7} M zu siRNA gegen StAR transfizierten Zellen konnte die geminderte Expression nicht signifikant beeinflussen, während Östrogen (10^{-7} M) zu einem deutlichen „Rescueeffekt“ führte.

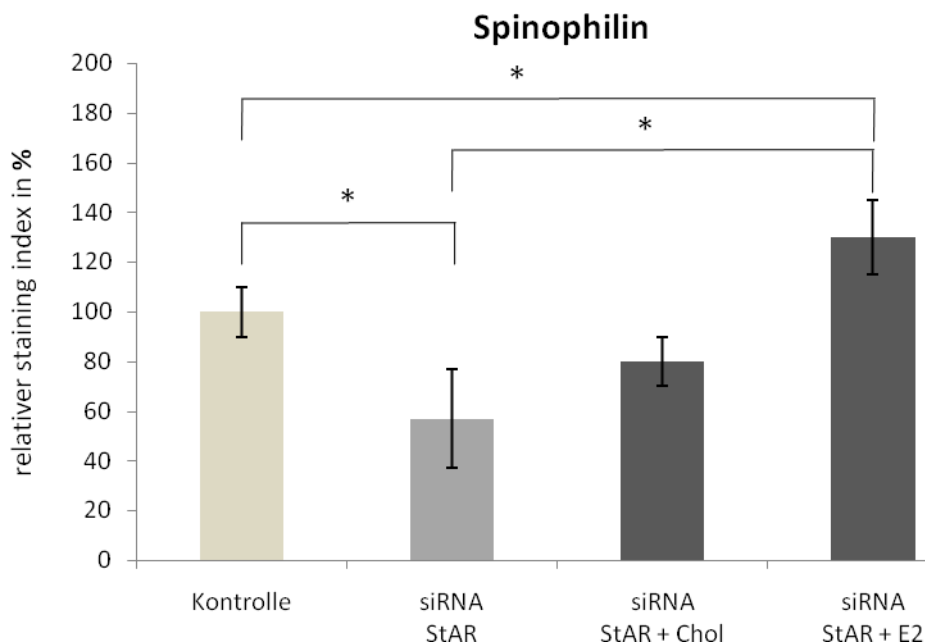


Abbildung 7: Quantitative Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Spinophilin-Antikörper in siRNA-transfizierten Kulturen nach Behandlung mit 17 β -Östradiol und Cholesterol (n = jeweils 3 Kulturen pro Gruppe; Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

Das Diagramm in Abbildung 7 zeigt die Intensität der Spinophilin-Immunreaktion als *staining index* in Prozent. Die Kontrolle wurde gleich 100 % und die jeweils behandelten Kulturen wurden prozentual in Beziehung gesetzt. Bei mit Östrogen behandelten Kulturen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Spinophilinexpression im Vergleich zu Kulturen nach *knock down* von StAR. Ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg konnte auch nach Cholesterolgabe verzeichnet werden. Möglicherweise kann dieser Effekt durch einen inkompletten *knock down* oder eine Instabilität der siRNA hervorgerufen werden. Darüber hinaus waren transfizierte Zellen in den Kulturen weiterhin in der Lage, aus Cholesterol Östrogen zu synthetisieren. Wesentlich ist jedoch, dass Östrogen die Herunterregulation aufheben kann.

2 Synaptophysinexpression nach *knock down* von StAR

Die immunhistologische und statistische Auswertung des Synaptophysins, eines präsynaptischen Markers, erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei Spinophilin. Wiederum wurden hippocampale Dispersionskulturen, wie im Methodenteil beschrieben, mit siRNA gegen StAR transfiziert, nach Transfektion und Stimulation mit Cholesterol oder 17β -Östradiol immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper inkubiert.

Wiederum wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und jeweils drei Kulturen pro Gruppe angelegt. Aus jeder Gruppe wurden je 20 Zellen nach dem Zufallsprinzip fotografiert und analysiert. Wie bei Spinophilin zeigt sich eine signifikante Herunterregulation der mit siRNA gegen StAR transfizierten Kulturen. Stimulation mit Cholesterol zeigte keinen signifikanten Anstieg, während die Stimulation mit Östrogen zu einem signifikanten „Rescueeffekt“ führte.

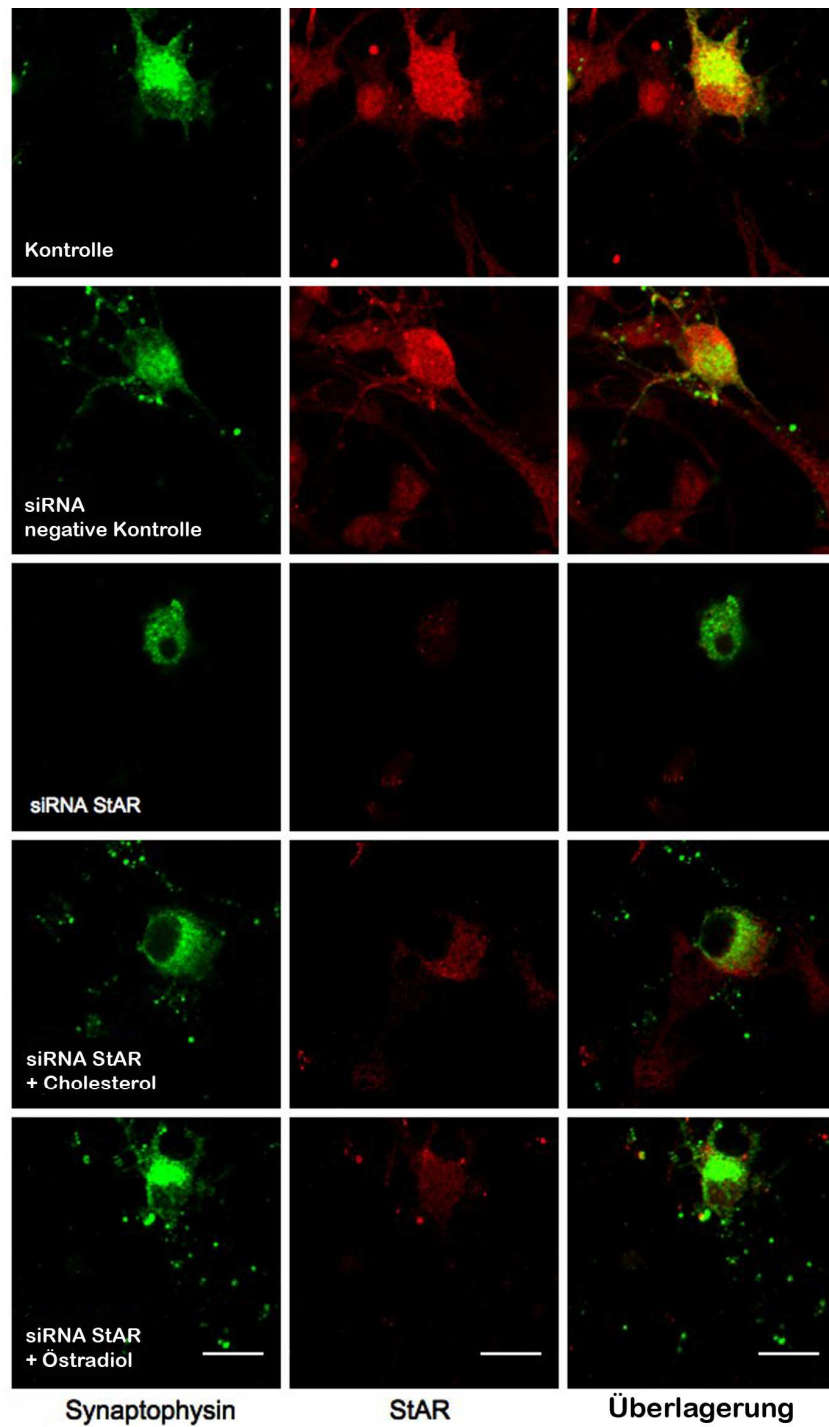


Abbildung 8: Immunhistochemie von Synaptophysin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR. Der Skalierungsbalken entspricht

Die Abbildung 8 zeigt Aufnahmen hippocampaler Neurone unter dem Laserscanmikroskop, bei der nach immunhistochemischer Färbung StAR (rot) und

Synaptophysin (grün) dargestellt ist. Die siRNA-negativen Kontrollen dienen dem Ausschluss unerwünschter Effekte durch die siRNA. In den mit siRNA gegen StAR transfizierten Kulturen ist Synaptophysin herunterreguliert. Diese Herunterregulation konnte durch Östrogensubstitution in einer Dosierung von 10^{-7} M wieder aufgehoben werden, während dieser „Rescueeffekt“ bei Cholesterol in einer Dosierung von 10^{-7} M nicht eingetreten ist.

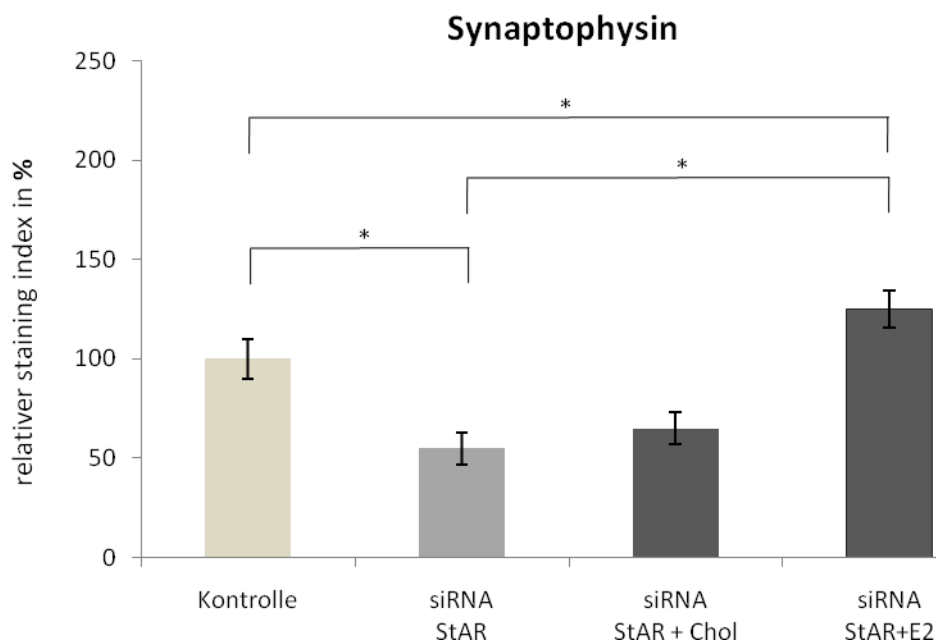


Abbildung 9: Quantitative Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptophysin-Antikörper in siRNA-transfizierten Kulturen nach Behandlung mit 17β -Östradiol und Cholesterol ($n =$ jeweils 3 Kulturen pro Gruppe; Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

Das Diagramm in Abbildung 9 stellt die Immunreaktion von Synaptophysin wiederum als *staining index* dar. Nach Östrogengabe ist analog zu Spinophilin die Expression des Proteins signifikant heraufreguliert. Cholesterol führt zu keinem signifikanten Anstieg.

3 GAP43-Expression nach *knock down* von StAR

In drei unabhängigen Experimenten erfolgte nach Transfektion und Inkubation mit GAP43-Antikörpern die immunhistochemische Darstellung der GAP43-Expression. Aus jeder Kultur wurden 20 Axone pro *well* analysiert und ein Mittelwert für jede Gruppe gebildet. Als Maß für die Expression von GAP43 wurde bei GAP43-positiven Axonen in 400-facher Vergrößerung der Färbeindex (*staining index*) digital festgehalten. Wiederum wurden die mit siRNA gegen StAR transfizierten Zellen durch Doppelinkubation mit grün fluoreszierendem Farbstoff im Zellkörper kenntlich gemacht. Durch die Gabe von Östrogen in einer Dosierung von 10^{-7} M zeigte sich eine signifikante Heraufregulation der GAP43-Expression. Auch eine Testosteronapplikation in einer Dosierung von 10^{-7} M führte zu einem Wiederanstiegen der GAP43-Expression in den mit siRNA gegen StAR transfizierten Kulturen.

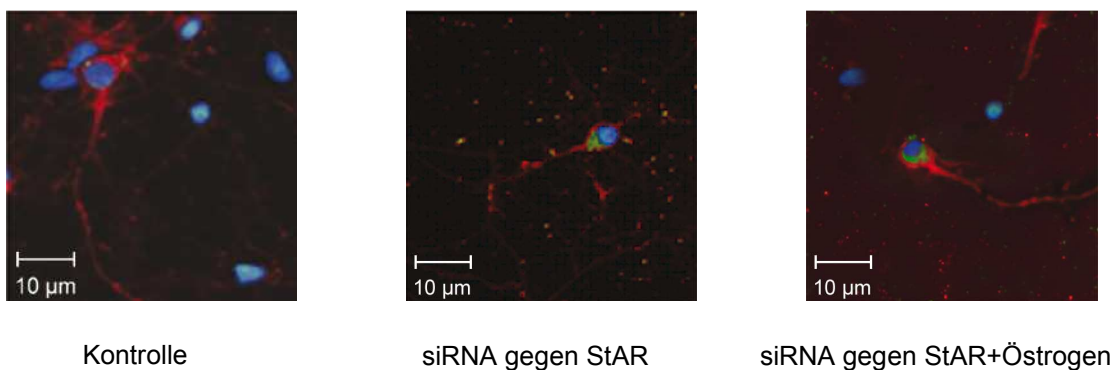


Abbildung 10: Immunhistochemie mit GAP43-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Transfektion mit siRNA gegen StAR.

Die Abbildung 10 zeigt Aufnahmen vor und nach Behandlung mit 17β -Östradiol. Die Immunreaktivität stellt sich in transfizierten Kulturen als verminderte Farbreaktion im Axon (rot) dar. Nach Gabe von Östrogen ist eine vermehrte Farbtintensität zu erkennen. Die Zellkerne wurden durch DAPI als blaue Punkte kenntlich gemacht.

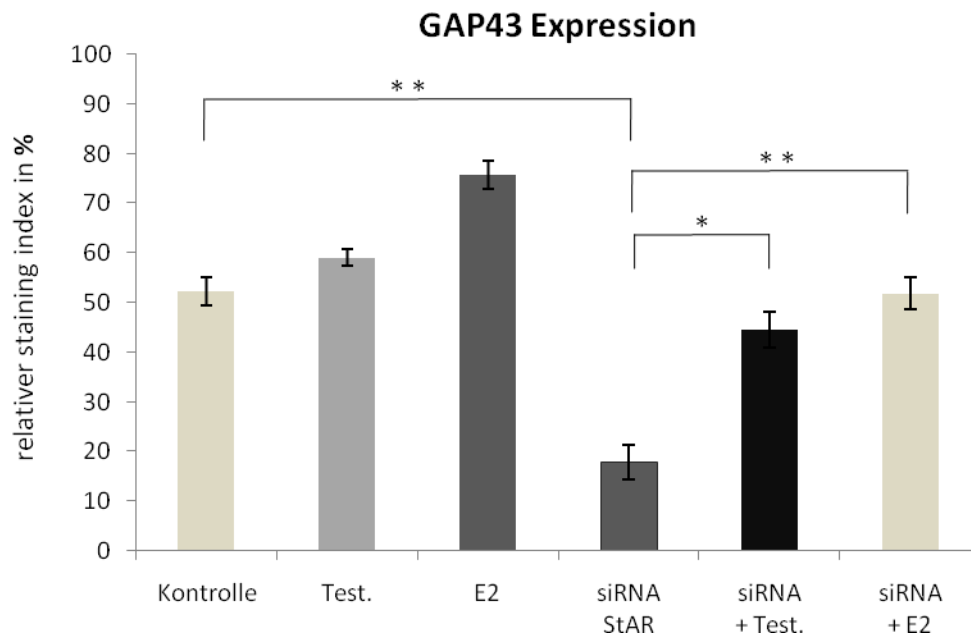


Abbildung 11: Expression von GAP43 in siRNA-transfizierten Kulturen. ($n =$ jeweils 3 Kulturen pro Gruppe; Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Das Diagramm in Abbildung 11 zeigt die deutliche Herunterregulation der siRNA gegen *StAR-knock-down*-Zellen. Sowohl Testosteron- als auch Östrogenstimulation verursachen eine signifikante Zunahme der GAP43-Expression. Somit ist bei diesem Protein, im Gegensatz zu Spinophilin und Synaptophysin, die Aromatasewirkung weniger spezifisch.

IV Diskussion

Seit mehr als einem Jahrzehnt ist bekannt, dass Östrogen Einfluss auf die synaptische Plastizität im Hippocampus hat. Woolley und Mitarbeiter zeigten, dass die Dichte der Spines in den Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus weiblicher Ratten mit dem Östrogenzyklus und somit dem Östrogenlevel im Serum variiert (Woolley et al., 1990). Bei ovariectomierten Ratten konnte eine Abnahme der Spinedichte der CA1-Region beobachtet werden, die durch Östrogen-substitution wieder anstieg (Gould et al., 1990). Östrogen induziert die Expression synaptischer Vesikelproteinen wie z. B. Synaptophysin (Yokomaku et al., 2003) und postsynaptischer Proteine wie Spinophilin (Amateau und McCarthy, 2002). Darüber hinaus fördert es Neuritenwachstum (Dominguez et al., 2004), beeinflusst den GABA Stoffwechsel und verbessert die LTP an den CA3–CA1- Synapsen im Hippocampus (Warren et al., 1995; Smith and McMahon, 2006; Mukai et al., 2007). Weiter stimuliert Östrogen die rezeptorvermittelte NMDA-Transmission (Foy et al., 2001; Jelks et al., 2007) und erhöht die Expression der NMDA-Rezeptoren. All diese Effekte zeigen, dass Östrogen in die Kontrolle synaptischer Aktivität involviert und somit sehr wahrscheinlich an Prozessen der Gedächtnisbildung beteiligt ist.

Seit der Entdeckung, dass Östrogen *de novo* von hippocampalen Neuronen im Kulturmedium synthetisiert und freigesetzt wird (Prange-Kiel et al., 2003) und die hippocampalen Neurone von der eigenen Östrogensynthese abhängen (Kretz et al., 2004), kann man nachvollziehen, warum physiologische Konzentrationen im Serum wenig Einfluss auf die Synapsenplastizität haben. Übereinstimmend mit dieser These konnten Hojo und Mitarbeiter (2004) eine sechsfach höhere Östrogenkonzentration im Hippocampus männlicher Ratten als im Serum feststellen.

Da auch Cholesterol die Synaptogenese fördert, stellt sich die Frage, ob diese Effekte direkt oder durch seine Umwandlung zu Östrogen vermittelt werden. Pfrieger postulierte 2003, dass die Cholesteroldosis, die eine effektive Synaptogenese nach sich zieht, höher sein muss als die Dosis der Metaboliten.

Diese These ist insoweit nachvollziehbar, betrachtet man die Doppelfunktion von Cholesterol: Das Steroidhormon spielt nicht nur bei der Synaptogenese eine Rolle, sondern wird auch zum Aufbau von Membranen benötigt. So enthalten die Membranen synaptischer Vesikel wesentlich mehr Cholesterol als andere intrazelluläre Organellen (Breckenridge et al., 1973; de Vries et al., 1981). Cholesterol interagiert sehr spezifisch mit einzelnen integralen Membranproteinen und bestimmt dadurch deren Funktionen und Interaktionen. SNARE-abhängige Exozytose erfolgt hauptsächlich in cholesterolreichen Domänen von Plasmamembranen. Als *lipid rafts* werden cholesterolreiche Subdomänen bezeichnet, die möglicherweise die Membran synaptischer Vesikel strukturieren (Huttner et al., 2000). Entzieht man Neuronen Cholesterol, beeinflusst das die Aktivität von Rezeptoren und somit die synaptische Übertragung und Plastizität (Frank et al., 2008). Hierbei wird auf die essenzielle Rolle von durch Gliazellen gebildetem Cholesterol bei der Synaptogenese hingewiesen (Mauch et al., 2001).

Wie bereits beschrieben, können hippocampale Neurone adulter Ratten unter Abwesenheit von Gliazellen Östrogen synthetisieren (Prange-Kiel et al., 2003). Im Hippocampus konnten die für die Neurosteroidsynthese wichtigen Proteine nachgewiesen werden, wie z. B. das *steroidogenic acute regulatory protein*, das Cytochrom P-450_{scc} und die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Furukawa et al., 1998; Wehrenberg et al., 2001). Die Aromatase, welche die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen induziert, konnte auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Abdelgadir et al., 1994; Garcia-Segura et al., 1999; Wehrenberg et al., 2001). Diesem Enzym wird eine Schlüsselrolle in Bezug auf die neuroprotektive Funktion zugesprochen (Leranth et al., 2004; Frotscher und Rune, 2005).

Die Dispersionskulturen, die in der aktuellen Versuchsreihe verwendet wurden, stammten von postnatalen Ratten. Im Gegensatz zur Aufarbeitung adulter Rattenhippocampi wurde auf Dichtegradientenzentrifugation verzichtet, um eine höhere Ausbeute zu erhalten. Es ist davon auszugehen, dass in den hier untersuchten Dispersionskulturen Prinzipalneurone des hippocampalen Pyramidenzellbandes, Körnerzellen des Gyrus dentatus, Astrozyten, Oligodendrozyten und

Mikroglia zu einem höheren Anteil als in den Kulturen adulter Tiere vorhanden waren (Prange-Kiel et al., 2003).

Um die Reinheit der Kulturen zu bestimmen, wurden sie in Vorversuchen auf die einzelnen Zelltypen mittels Immunhistochemie getestet und mit spezifischen Antikörpern inkubiert (Fester et al., 2006). Folgende Antikörper wurden hierbei eingesetzt: GFAP als Astrozytenmarker (Raff et al., 1979), MAP-2 als neuronaler Marker (Ferreira et al., 1987) und MOSP als Oligodendrozytenmarker. Es zeigte sich ein Anteil von 85 % Neuronen, 8 % Astrozyten und ein vernachlässigbar kleiner Anteil Oligodendrozyten und Mikroglia (2 %). Somit konnte durch die relative Reinheit der Kulturen der versorgende Aspekt der Gliazellen mit Cholesterol (Mauch et al., 2001) bei der Untersuchung neuronenspezifischer Proteine weitgehend unterbunden werden. In den Versuchen wurde mit wasserlöslichem Cholesterol gearbeitet, welches durch Behandlung mit Methyl- β -cyclodextrin (Daniel et al., 2004; Daniel et al., 2007) die Plasmamembran ungehindert passieren konnte und nicht auf Lipoproteine angewiesen war.

Um die essenzielle Rolle des endogenen Östrogens gegenüber seiner Vorstufen aufzuzeigen, wurde in dieser Arbeit durch den *knock down* von StAR Cholesterol der Zugang zur inneren Mitochondrienmembran neuronaler Zellen unmöglich gemacht. Die Wirkung von Cholesterol auf die Synapsenbildung war somit aufgehoben und resultierte in einer Herunterregulation synaptischer Proteine. In unseren Versuchen zeigte sich in den Kulturen sieben Tage nach Östrogenapplikation eine signifikante Heraufregulation der synaptischen Proteine. Dabei benutzten wir eine pharmakologische Dosis von 10^{-7} M. Diese Konzentration wurde von Rune und Mitarbeitern (2006) als nicht toxische Dosis ermittelt und liegt über der physiologischen Dosis von 10^{-10} M. Die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen war in den transfizierten Kulturen etwas höher, was als unerwünschte Nebenwirkung bereits in vorangegangenen Studien bei dieser Methode auftrat (Bell et al., 1998). Die verblindete, bildanalytische Auswertung verhinderte, dass nicht transfizierte Zellen in die Auswertung miteinbezogen wurden. Eine Östrogengabe in einer Dosierung von 10^{-7} M führte zu einem signifikanten Wiederanstiegen der Proteinexpression. Cholesterolgabe in gleicher Dosierung führte, wenn auch nicht signifi-

kant, ebenfalls zu einer Heraufregulation synaptischer Proteine. Dieser Effekt ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass nicht transfizierte Zellen weiterhin in der Lage waren, aus Cholesterol Östrogen zu synthetisieren.

Die Ergebnisse dieses molekularbiologischen Ansatzes zeigen große Übereinstimmungen mit pharmakologischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Auch hier konnte demonstriert werden, dass die Proteinexpression der betrachteten Marker Spinophilin und Synaptophysin in hippocampalen Dispersionskulturen sowohl durch Östrogen als auch durch seine Vorläufer Testosteron und Cholesterol signifikant erhöht werden konnte (Fester et al., 2009). Zugaben von Mevastatin, einem HMG-Reduktaseinhibitor, und Trilostan, einem Hemmstoff der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Enzym zur Testosteron-synthese), führten zu einer Abnahme der Proteinexpression. Kombinierte Gaben der Steroide und deren Inhibitoren führten zu einem „Rescue“, also zu einem Wiederanstiegen der Proteinexpression. Nach simultaner Inhibition der Cholesterol-, Testosteron- und Östrogensynthese durch eine kombinierte Gabe aller genannten Hemmstoffe konnte jedoch nur durch Östrogen ein signifikanter Wiederanstieg der Proteinexpression erreicht werden (Fester et al., 2009).

Obwohl die synaptischen Marker Spinophilin und Synaptophysin durch Östrogen hochreguliert werden, führte dies nicht zu einer Erhöhung der Spinesynapsendichte. Dies wirft die Frage auf, ob die von uns untersuchten Proteine tatsächlich zur Untersuchung synaptischer Plastizität und Synaptogenese herangezogen werden können. Möglicherweise dient die Heraufregulation der Proteine nur der Stabilisierung der Synapsen und führt nicht zu einem zahlenmäßigen Anstieg. In der Vergangenheit wurden östrogeninduzierte Spinebildung und eine Zunahme der präsynaptischen Boutons in der CA1-Region des Hippocampus beschrieben (Murphy und Segal, 1996). Dies konnte in der aktuellen Studie nicht bestätigt werden. Die Applikation von Östrogen bewirkte zwar eine verstärkte Aktivierung von ER α , beeinflusste aber nicht die Synapsendichte. Im Gegensatz dazu erhöht Cholesterol die Dichte der Spinesynapsen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die exogene Wirkung von Östrogen limitiert ist. Es wird angenommen, dass Östrogen über einen aktiven Mechanismus durch die Plasmamembran

transportiert wird (Hammes et al. 2005; Lin und Scalan, 2005). Die Aufnahme von externem Östrogen könnte durch intrazelluläre Konzentrationen limitiert sein. Diskutiert wird auch ein verstärkter Kalziumeinfluss über membrangebundene Rezeptoren, verursacht durch hohe Östrogenkonzentrationen, welche ihrerseits eine Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher zur Folge haben. Dies führt letztlich zu einer Hemmung der Aromatase durch kalziumabhängige Kinasen (Zhao et al., 2005).

Die aktuellen Forschungsergebnisse deuten somit darauf hin, dass Östrogen keine direkten Effekte hervorruft, sondern auf die Verfügbarkeit seiner Substrate angewiesen ist. Darüber hinaus bestätigen die Untersuchungen die bedeutende Rolle der Aromatase, dem Schlüsselenzym der Östrogensynthese. Unabhängig vom Geschlecht, korreliert in hippocampalen Kulturen die Expression der Östrogenrezeptoren, der synaptischen Proteine und auch die LTP positiv mit der Aktivität dieses Enzyms (Prange-Kiel et al., 2009). Aromatasehemmung durch Letrozol führte in hippocampalen Slicekulturen zu einer verringerten Spinedichte, Spinesynapsendichte sowie der Herunterregulation synaptischer Proteine (Zhou et al., 2007). Alle Effekte, welche durch Aromatasehemmung verursacht werden, konnten durch Östrogengabe aufgehoben werden.

Die Inaktivierung der Aromatase im Rahmen neurogenerativer Prozesse zeigt, dass die Induktion dieses Enzyms eine neuroprotektive Rolle spielen kann und gegebenenfalls die Möglichkeit eines pharmakologischen Einsatzes besteht (Azcoitia et al., 2002). Das Enzym moduliert Stimmung und Affekt (Dalla et al., 2004, 2005; Kravitz et al., 2006). Ein Mangel an Aromatase führte bei weiblichen Mäusen zu einem depressiven Verhalten und hatte Auswirkungen auf das Aggressionsverhalten und andere kognitive Funktionen (Soma, 2006). Zur Therapie des Mammakarzinoms mit positivem Östrogen-Rezeptorstatus werden derzeit Antiöstrogene und Enzyminhibitoren eingesetzt. Bei ca. 70% der erkrankten Patientinnen konnte eine erhöhte Aromataseaktivität nachgewiesen werden. Aromatasehemmer gelten als ein neuer Standard für die adjuvante, endokrine Brustkrebstherapie. In prospektiv-randomisierten Studien konnte bei postmenopausalen Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom durch den Einsatz

von Aromatasehemmern die Ansprechrate gesteigert und das progressionsfreie Intervall verlängert werden. Darüber hinaus wurde eine Verbesserung der Gesamtüberlebensrate nachgewiesen. Als unerwünschte Nebenwirkung verschlechterte sich das verbale und visuelle Lernen der Patientinnen (Jenkins et al., 2002). Hier bleibt es eine individuelle Entscheidung, ob die intellektuellen Einschränkungen - gemessen an der gewonnenen Lebenszeit – tolerabel sind. Die Zusammenhänge und Mechanismen der zerebralen Östrogen- und Aromatasewirkung sind bei Weitem noch nicht geklärt und es bedarf noch einer Reihe weiterer Untersuchungen in diesem Zusammenhang, um eventuelle Therapien für neurodegenerative Erkrankungen zu entwickeln.

V Zusammenfassung

Sowohl für Östradiol als auch Cholesterol ist eine Synapsen-induzierende Wirkung im Hippocampus nachgewiesen worden. Da hippocampale Neurone in der Lage sind, Östrogen selbst zu synthetisieren, stellte sich die Frage, ob Cholesterol direkt eine Zunahme der Anzahl der Spinesynapsen bewirkt oder ob es indirekt als Substrat der Östrogensynthese wirkt und somit der Cholesteroleffekt letztlich ein östrogenen Effekt ist. Um diese Frage zu klären, wurden hippocampale Dispersionskulturen mit siRNA gegen StAR transfiziert und die Expression synaptischer Proteine nach Behandlung mit entweder Cholesterol oder Östrogen untersucht. Nach quantitativer Bildanalyse der Immunhistochemie, zeigte sich in den siRNA gegen StAR transfizierten Zellen eine herunterregulierte Expression der prä- und postsynaptischen Marker Spinophilin und Synaptophysin. Diese Herunterregulation wurde durch Östrogen nicht hingegen durch Cholesterol aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass die Vorläuferstufen der Östrogensynthese nicht in der Lage sind, die synaptischen Proteine Synaptophysin und Spinophilin direkt zu beeinflussen, sondern es einer Umwandlung zu Östrogen bedarf. Zudem wurden in dieser Arbeit die GAP43-Expression in siRNA gegen StAR transfizierten Kulturen untersucht. Bei der GAP43-Expression zeichnete sich nach Behandlung mit siRNA gegen StAR eine signifikante Herunterregulation ab, die ähnlich wie bei den synaptischen Proteinen durch die zusätzliche Gabe von Östrogen wieder aufgehoben werden konnte. Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die spezifische Rolle der Aromatase bei der Synapsenbildung im Hippocampus.

VI Literaturverzeichnis

- Abdelgadir S E, Resko J A, Ojeda S R, Lephart E D, McPhaul M J, Roselli C E (1994) Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinol* 135: 395-401.
- Adams M M, Fink S E, Janssen W G, Shah R A, Morrison J H (2004) Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *J Comp Neurol* 474 (3): 419-26.
- Akert K (1994) Limbisches System. In: Benninghoff Anatomie, D. Drenckhahn and W. Zenker. Band 2, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- Amateau S K, McCarthy M M (2002) A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. *J Neurosci* 22 (19): 8586–8596.
- Arakane F, Sugawara T, Nishino H, Liu Z, Holt J A, Pain D, Stocco D M, Miller W L, Strauss J F (1996) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action. *V Proc Natl Acad Sci* 93 (24): 13731-13736.
- Azcoitia I, DonCarlos L L, Garcia-Segura L M (2002) Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res* 4: 235–245.
- Behl C, Manthey D (2000) Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol* 29: 351–358.
- Bell H, Kimber W L, Li M, Whittle I R (1998) Liposomal transfection efficiency and toxicity on glioma cell lines: in vitro and in vivo studies. *Neuroreport* 9: 793–798.
- Benowitz L I, Routtenberg A (1997) GAP43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in Neurosci* 20 (2): 84 – 91.
- Benowitz L I, Perrone-Bizzozero N I (1991) The expression of GAP43 in relation to neuronal growth and plasticity: when, where, how, and why? *Prog Brain Res* 89: 69–87.
- Bisagno V, Bowman R, Luine V (2003) Functional aspects of estrogen in neuroprotection. *Endocrine* 21: 33–41.

- Björkhem I, Meaney S (2004) Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. Karolinska Institute, Huddinge University Hospital, Stockholm, Sweden: 141–186.
- Bliss T V, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232 (2): 331–356.
- Breckenridge W C, Morgan I G, Zanetta J P, Vincendon G (1973) Adult rat brain synaptic vesicles. II. Lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 320: 681–686.
- Brewer G J (1997) Isolation und culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Meth* 71: 143-155.
- Brown P D (1998) Matrix metalloproteine inhibitors. *Breast cancer Res Treat* 52: 125–136.
- Caplen N J, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan R A (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17): 9742–9747.
- Clark B J, Wells J, King S R, Stocco D M (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269: 28314–28322.
- Cyr M, Calon F, Morissette M, Di Paolo T (2002) Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Psychiatry Neurosci* 27: 12-27.
- Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J (2004) Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit depressive-like symptomatology. *Eur J Neurosci* 20 (1): 217–228.
- Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J (2005) Male aromatase-knockout mice exhibit normal levels of activity, anxiety and “depressive-like” symptomatology. *Behav Brain Res* 163 (2): 186–93.
- Daniel E E, Bodie G, Mannarino M, Boddy G, Cho W J, (2004) Changes in membrane cholesterol affect caveolin-1 localization and ICC-pacing in mouse jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G 202–210.
- Daniel S, Diaz A J, Martinez K M, Bench B J, Albertorio F, Cremer P S (2007) Separation of membrane-bound compounds by solid-supported bilayer electrophoresis. *J Am Chem Soc* 129: 8072–8073.

- de Vries G H, Zetusky W J, Zmachinski C, Calabrese V P (1981) Lipid composition of axolemma-enriched fractions from human brains. *J Lipid Res* 22: 208–216.
- Dekker L V, de Graan P N, Versteeg D H, Oestereicher A B, Gispen W H (1989) Phosphorylation of B-50 (GAP43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices. *L Neurochem* 54: 24–30.
- Dominguez R, Jalali C, de Lacalle S (2004) Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci* 24 (4): 982–90.
- Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498.
- Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomozawa K, Liauw J A, Zhuo M, Allen P B, Quimet C C, Greengard P (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9287–9296.
- Ferreira A, Busciglio J, Cáceres A (1987) An immunocytochemical analysis of the ontogeny of the microtubule-associated proteins MAP-2 and Tau in the nervous system of the rat. *Brain Res* 431 (1): 9–31.
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Jarry H, Rune G M (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* 97: 1136–1144.
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune G M (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocamp* 19: 692-705.
- Fire A (1999) RNA-triggered gene silencing (for review). *Trends Genet* 15: 358–363.
- Foy M R, Xu J, Xie X, Brinton R D, Thompson RF, Berger T W (1999) 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81 (2): 925-929.
- Foy M R (2001) 17beta-estradiol: Effect on CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 76: 239- 252.
- Frank C, Rufini S, Tancredi V, Forcina R, Grossi D, D`Arcangelo G (2008) Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity. *Exp Neurol* 212 (2): 407–414.

- Frotscher M, Rune G M (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neurosci* 136 (3): 833–842.
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in adult rat central nervous system: Colocalization of StAR, cytochrome P-450 SCC (Cyp XIA1) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *Journal Neurochem* 71: 2231–2238.
- Garcia-Segura L M, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez J R, Hutchison R E, Hutchison J B (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neurosci* 89(2): 567–578.
- Garcia-Segura L M, Azcoitia I, DonCarlos L (2001) Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiol* 63: 29–60.
- Gispen W H, Nielander H B, De Graan P N, Oestreicher A B, Schrama L H, Schotman P (1991) Role of the growth-associated protein B-50/GAP-43 in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* 5 (2-4): 61–85.
- Goritz C, Mauch D H, Pfrieder F W (2005) Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci* 29: 190–201.
- Gould E, Woolley C S, Frankfurt M, McEwen B S (1990) Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10: 1286–1291.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J M, Argos P, Chambon P (1986) Human estrogen receptors cDNA: sequence, expression und homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134–139.
- Hamilton A J, Baulcombe D C (1999) A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952.
- Hammond S M, Bernstein E, Beach D, Hannon G J (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293–296.
- Hammond S M, Bernstein E, Caudy A A, Hannon G J (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363–366.

- Hammes A, Andreassen T K, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert F J, Luppia P B, Nykjaer A, Willnow T E (2005) Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 122: 751-762.
- Hao J, Janssen W G, Tang Y, Roberts J A, McKay H, Lasley B, Allen B P, Greengard P, Rapp P R, Kordower J H, Hof P R, Morrison J H (2003) Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 465: 540–550.
- Hebb D O (1949) The organization of behavior. Wiley, New York.
- Hösli E, Hösli L (1999) Cellular localization of estrogen receptors on neurones in various regions of cultured rat CNS: coexistence with cholinergic and galanin receptors. *Neurosci* 17 (4): 317–330.
- Hojo Y, Hattori T A., Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H T, Mukai H, Morrison J H, Janssen W G, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017a and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci* 101: 865–870.
- Huttner W B, Röper K, Corbeil D (2000) Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2 (9): 582–592.
- Jahn R, Südhof T C (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Ann Rev Biochem* 68: 219–246.
- Janz R, Südhof T C, Hammer R E, Unni V, Siegelbaum S A, Bolshakov V Y (1999) Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24: 687–700.
- Jelks K B, Wylie R, Floyd C L, McAllister A K, Wise P (2007) Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: Critical role of estrogen receptor-alpha. *J Neurosci* 27: 6903–6913.
- Jenkins V A, Fallofield L I, Schilling V, Howell A (2002) Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? *Breast Cancer Res Treat* 76: 137.
- Kallen C B, Billheimer J T, Summers S A., Stayrook S E, Lewis M (1998) Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Is a sterol transfer protein. *J Biol Chem* 41: 273.

- Kajta M, Beyer C (2003) Cellular strategies of estrogen-mediated neuroprotection during brain development. *Endocrine* 21: 3–9.
- Koudinov A R, Koudinova N V (2001) Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *Faseb J* 15: 1858–1860.
- Kravitz H M, Janssen I, Lotrich F E, Kado D M, Bromberger J T (2006) Sex steroid hormone gene polymorphisms and depressive symptoms in women at mid-life. *Am J Med* 119: 87–93.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune G M (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24: 5913–5921.
- Kuiper G G, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J A (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925–5930.
- Kurz J E, Rana A, Parsons J T, Churn S B (2003) Status epilepticus-induced changes in the subcellular distribution and activity of calcineurin in rat fore-brain. *Neurobiol Dis* 14: 483–493.
- Lee S J, McEwen B S (2001) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 569–591.
- Leranth C, Hajszan T, MacLusky N J (2004) Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *J Neurosci* 24: 495–499.
- Leube R E, Wiedenmann B, Franke W W (1989) Topogenesis and sorting of synaptophysin: synthesis of a synaptic vesicle protein from a gene transfected into nonneuroendocrine cells. *Cell* 59: 13488–13492.
- Lin B C, Scalan T S (2005) Few things in life are “free”: Cellular uptake of steroid hormones by an active transport mechanism. *Mol Interv* 5: 338–340.
- Lustig R H, Sudol M, Pfaff D W, Federoff H J (1991) Estrogenic regulation and sex dimorphism of growth-associated protein 43 kDa (GAP43) messenger RNA in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 125–132.
- Mauch D H, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller E C, Otto A, Pfrieger F W (2001) CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science* 294: 1354–1357.

- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen W G, Rose J A, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007) Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100 (4): 950-967.
- McEwen B S (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57: 357-384.
- Meberg P J, Routtenberg A (1991) Selective expression of protein F1/ (GAP-43) mRNA in pyramidal but not granule cells of the hippocampus. *Neuroscience* 45: 721-733.
- Meiri K F, Saffell J L, Walsh F S, Doherty P (1998) Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) phosphorylation in growth cones. *J Neurosci* 18: 10429-10437.
- Morris R G, Frey U (1999) Tagging the Hebb synapse. *Neurosci* 22: 255-256.
- Muly E C, Allen P, Mazloom M, Aranbayeva Z, Greenfield A T, Greengard P (2004) Subcellular distribution of neurabin immunolabeling in primate prefrontal cortex: comparison with spinophilin. *Cereb Cortex* 14 (12): 1398-1407.
- Murphy D, Segal M (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16: 4059-4068.
- Pfriefer F W (2003) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 60: 1158-1171.
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune G M (2003) Para/ autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocamp* 13: 226-234.
- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Jarry H, Rune G M (2009) Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm* 116 (11): 1417-1425.
- Raff M C, Kennedy P G, Lisak R P (1979) Cell type-specific markers for human glial and neuronal cells in culture. *Lab Invest* 43 (4): 342-351.
- Rune G M, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002) Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neurosci* 113 (1): 167-175.

- Rune G M, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M (2006) Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res* 31: 145–155.
- Sarrouilhe D, diTommaso A, Métayé T, Ladeveze V (2006) Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie* 88 (9): 1099–1113.
- Saunders-Pullman R (2003) Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both? *Endocrine* 21: 81–87.
- Schaechter J D, Benowitz L I (1993) Activation of protein kinase C by arachidonic acid selectively enhances the phosphorylation of GAP-43 in nerve terminal membranes. *J Neurosci* 13 (10): 4361–4371.
- Schaeffer V, Meyer L, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan A G (2008) Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 52(6): 948-955.
- Skene J H (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 12: 127–156.
- Skene J H, Willard M (1981) Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J Cell Biol* 89 (1): 96–103.
- Singer C A, Pang P A, Dobie D J, Dorsa D M (1996) Estrogen increases GAP-43 (Neuromodulin) mRNA in the preoptic area of aged rats. *Neurobiol Aging* 17: 661–663.
- Smith C C, McMahon L L (2006) Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci* 26: 8517-8522.
- Soma K K (2006) Testosterone and aggression: berthold, birds and beyond. *J Neuroendocrinol* 18: 543–551.
- Spiers S (2001) Hippocampal amnesia. *Neurocase* 7: 357–382.
- Stephan H (1975) Allocortex. In: Möllendorffs Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Vol. IV/ 9 Springer-Verlag, Berlin 998.
- Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, Ogura A, Kashihara M, Hara T, Koshimizu H, Kojima M (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci* 27: 6417–6427.

- Toran-Allerand C D, Singh M, Sétáló G Jr (1999) Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* 20(2): 97–121.
- Tremblay G B, Tremblay A, Copeland N G, Gilbert D J, Jenkins N A (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11 (3): 353–365.
- Tuschl T (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *Chem Biochem* 2: 239–245.
- von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Bottner M, Rune G M (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18: 847–856.
- Warren S G, Humphreys A G, Juraska J M, Greenough W T (1995) LTP varies across the estrus cycle: Enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 703: 26-30.
- Webber K M, Stocco D M, Casadesus G, Bowen R L, Atwood C S, Prebill L A, Harris P L, Zhu X, Perry G, Smith M A (2006) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR): evidence of gonadotropin-induced steroidogenesis in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 1: 14.
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune G M (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: Co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76: 1879–1886.
- Woolley C S, Gould E, Frankfurt M, McEwen B S (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density during the oestrus cycle: enhances synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 703: 26-30
- Woolley C S, McEwen B S (1992) Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci* 12: 2549–2554.
- Yokomaku D, Numakawa T, Numakawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Adachi N, Nishio C, Taguchi T, Hatanaka H (2003) Estrogen enhances depolarization-induced glutamate release through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in cultured hippocampal neurons. *Mol Endocrinol* 17: 831–844.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24: 1071–1089.

-
- Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, Bartel D P (2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25–33.
- Zhou L, Lehan N, Wehrenberg U, Disteldorf E, von Lossow R, Mares U, Jarry H, Rune G M (2007) Neuroprotection by estradiol: A role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. *Exp Neurol* 203:72–81.

VII Danksagung

Prof. Dr. Gabriele Rune danke ich herzlich für die Übernahme und Betreuung meiner thematischen Fragestellung und die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe am Institut Anatomie der Universitätsklinik Eppendorf durchführen zu können. Sie war stets für mich erreichbar, sehr geduldig und motivierte mich mit ihrer engagierten Betreuung.

Ganz besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Lars Fester, der nicht nur immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Fragen hatte, sondern mich darüber hinaus bei der experimentellen Arbeit in höchster Weise unterstützte.

Ein großes Dankeschön auch an das freundliche und hilfsbereite Laborteam und alle medizinisch-technischen Assistenten. Weiterhin möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die guten Ratschläge und das Korrekturlesen der Arbeit danken.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Großmutter Rosine Emmerich danken, der diese Arbeit gewidmet ist – für ihre unermüdliche Unterstützung, Liebe und Motivation.

VIII Versicherung an Eides statt

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Angabe (Auflage und Erscheinungsjahr), Band und Seite des benutzten Werken kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Cornelia Eva Huber