

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

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

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

## Regulation der Synaptopodinexpression durch Calciumtransienten in hippocampalen Neuronen

---

### Dissertation

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

vorgelegt von:  
Christiana Ossig  
geboren in Marburg

Hamburg 2010

**Meinen Eltern gewidmet**

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.05.10**

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

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

**Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Eckart Förster**

**Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp**

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
3.1 Spines und Synapsen .....	7
3.1.1 Struktureller Aufbau von Synapsen im ZNS .....	8
3.1.2 Struktur und Funktion dendritischer Spines .....	9
3.1.3 Aufbau des Spineapparats und seine Funktion .....	9
3.1.4 Neurotransmitter und Rezeptoren der Nervenzelle.....	11
3.2 Der Hippocampus .....	13
3.2.1 Entwicklung des Hippocampus .....	13
3.2.2 Aufbau und Funktion des Hippocampus .....	13
3.2.3 Estradiolsynthese des Hippocampus.....	15
3.3 Die Aromatase .....	16
3.3.1 Funktions- und Regulationsmechanismen der Aromatase.....	16
3.3.2 Beeinflußung der Spinogenese durch die Aromatase .....	17
3.4 Synaptopodin: Ein Aktin assoziiertes Protein .....	18
3.4.1 Molekularer Aufbau von Synaptopodin.....	18
3.4.2 Lokalisation von Synaptopodin .....	20
3.5 Calcium im ZNS .....	21
3.5.1 Funktion und Regulation in der Nervenzelle.....	21
3.5.2 Bedeutung des Calciums für die Estrogensynthese und für Synaptopodin .....	22
3.6 Fragestellung.....	23
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
4.1 Material.....	24
4.1.1 Arbeitsmaterialien, Geräte und Software.....	24
4.1.2 Chemikalien .....	25
4.1.3 Lösungen.....	26
4.2 Methoden .....	29
4.2.1 Präparation der Hippocampi .....	29
4.2.2 Hippocampale Dispersionskultur.....	29
4.2.3 Stimulation und Inhibition .....	31
4.2.4 Quantitative Estrogenbestimmung mittels Radio-Immunoassay (RIA) .....	32
4.2.5 Fixierung der hippocampalen Dispersionskultur.....	33
4.2.6 Immunocytochemie der Dispersionskulturen .....	33
4.2.7 Mikroskopische Messung und Bildanalyse .....	34
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
5.1 Auswertung der Immunzytochemie.....	36
5.2 Der Synaptopodin- Antikörpers.....	36
5.3 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern reguliert die Synaptopodinexpression...36	
5.3.1 Blockade der IP3 Rezeptoren durch U73122 .....	37
5.3.2 Blockade der Ryanodinrezeptoren durch 8-Brom-cADP Ribose .....	37
5.3.3 Auswirkungen auf die Synaptopodinexpression nach Abpufferung des extrazellulären Calciums .....	40
5.3.4 Die Inhibition der IP3 Rezeptoren nach Abpufferung des extrazellulären Calciums .....	40
5.3.5 Die Inhibition der Ryanodinrezeptoren nach Abpufferung des extrazellulären Calciums.....	41
5.3.6 Synaptopodinexpression nach glutamaterger Stimulation.....	42
5.3.7 Blockade der Calciumkanäle bei gleichzeitiger glutamaterger Stimulation.....	43

5.3.8	Quantitative Estrogenbestimmung im Medium.....	45
5.4	Der Einfluss von Estrogenrezeptorantagonisten auf die Expression von Synaptopodin.....	46
5.4.1	Synaptopodinexpression unter Estrogenrezeptorantagonisten und glutamaterger Stimulation.....	46
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
6.1	Estradiol in der Nervenzelle.....	48
6.2	Synaptopodin - Lokalisation und Funktion .....	49
6.3	Die Regulation von Synaptopodin.....	51
6.4	Die Funktion von Calcium.....	52
6.4.1	Inhibition der Calciumfreisetzung führt zur gesteigerten Synaptopodinexpression .....	54
6.4.2	Extrazelluläres Calcium hat keinen Einfluß auf die Calciumfreisetzung .....	54
6.4.3	Verminderte Synaptopodinexpression durch glutamaterge Stimulation der Nervenzellen .....	55
6.5	LTP und Synaptopodin .....	56
6.6	Unsere Ergebnisse im aktuellen wissenschaftlichen Kontext.....	59
6.7	Unsere Ergebnisse im aktuellen klinischen Kontext .....	62
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>84</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>85</b>

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMP	Adenosin Monophosphat
ADP	Adenosin Diphosphat
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionacid
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
aro	Aromatase
Aufl.	Auflage
bfGf	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i> (ungefähr)
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
cADP	zyklisches Adenosin Diphosphat
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)
CICR	Calcium induzierte Calciumfreisetzung (calcium induced calcium release)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Indocarbocyanin 3
d	day/ days (Tag/ Tage)
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dest.	<i>destillata</i> (destilliert)
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
d. h.	das heißt
DPN	Diarylpropionitril

## Abkürzungsverzeichnis

---

EDTA	Ethylendiamintetraacetat (ethylenediaminetetraacetic acid)
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Estrogenrezeptor $\beta$
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
G-Protein	G für Guanylnukleotid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde / Stunden (hour / hours)
HCl	Salzsäure
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphat
IP3-R	Inositol 1,4,5-triphosphat Rezeptor
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
l	Liter
LSM	laser scanning microscope
LTP	Langzeitpotenzierung (long term potentiation)
M	Molar
MAP2	microtubule-associated protein 2
mg	Milligramm
min	Minute/ Minuten
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol (1 mol = 6,023 x 10 <sup>23</sup> Moleküle)
mRNA	messenger ribonucleic acid
mV	Millivolt
n	Anzahl

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

NaOH	Natriumhydroxid (Natriumlauge)
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	normal goat serum
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
Nr.	Nummer
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> , pH-Wert, Maß für die Aktivität von Protonen einer wässrigen Lösung
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PPT	Propylpyrazole Triol
PSD	postsynaptische Dichte (post-synaptic density)
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
RYR	Ryanodinrezeptoren
s.	siehe
S.	Seite
SA	Spineapparat
scc	side chain cleavage enzyme
sd	Standartabweichung (standard deviation)
SEM	Durchschnittsfehler der Standartabweichung (Standard Error of the Mean)
SERCA	Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase)
sER	glattes endoplasmatisches Retikulum (smooth endoplasmic reticulum)
s.o.	siehe oben
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

## Abkürzungsverzeichnis

---

StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
s.u.	siehe unten
z.B.	zum Beispiel
U	Umdrehung
u.a.	unter anderem
VSCC	spannungsgesteuerte Calciumkanäle (voltage gated calcium channels)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

## 3. Einleitung

### 3.1 Spines und Synapsen

„Ich denke, also bin ich.“ Dieses Zitat des französischen Philosophen und Mathematikers René Descartes (31.03.1596-11.02.1650) beschreibt etwas Naheliegendes. Doch es beinhaltet das Komplexeste, was uns als Mensch ausmacht – das Denken. Der abstrakte Begriff des Denkens ist gebunden an die organische Struktur des Gehirns und kann als Ausdruck seiner höheren kortikalen Funktion gesehen werden. Neben diesen höheren kortikalen Funktionen gibt es Prozesse, die die Vielseitigkeit unseres Gehirns darstellen. Sie reichen von der Fähigkeit, einfachste Bewegungen auszuführen, z.B. das Heben eines Armes, über die Möglichkeit, kompliziertere Bewegungsabläufe wie das Gehen zu realisieren, über das Wahrnehmen sensibler und sensorischer Impulse bis zum Speichern von differenzierten Informationen, wie beim Auswendig lernen eines Gedichtes. Diese gesamthafte Komplexität ermöglicht es uns, unsere Umwelt wahrzunehmen und uns ihr anzupassen.

Die Synapse, als Schaltstelle zwischen den Neuronen, könnte für die Übermittlung von Informationen ein wichtiges Korrelat auf zellulärer Ebene sein. Ein konkreter Hinweis hierfür ist die Fähigkeit von chemischen Synapsen, aber auch Nervenzellen oder ganzen Hirnarealen, sich in Abhängigkeit von der Verwendung in ihren Eigenschaften zu verändern, das heißt ihre Übertragungseffizienz zu ändern, unterzugehen oder selbst neu zu entstehen. Man spricht hierbei von synaptischer Plastizität.

Angesichts einer geschätzten Gesamtzahl von  $10^{10}$  Neuronen im menschlichen Gehirn und mehr als  $10^{13}$  synaptischen Kontakten sind die Prozesse der Synaptogenese nicht vollständig genetisch determiniert, sondern abhängig von lokalen Faktoren und Interaktionen. Dies steht im Fokus der Forschung, da man sich hiervon u.a. klinische Erkenntnisse, z.B. für die Therapie der Demenzen, erhofft.

### 3.1.1 Struktureller Aufbau von Synapsen im ZNS

Als Synapse bezeichnet man eine umschriebene Kontaktstelle, die Signale vom Axon einer Nervenzelle zum Dendriten bzw. dem Soma einer anderen Nervenzelle überträgt. Dabei gibt es zwei Mechanismen der Erregungsübertragung: zum einen handelt es sich um elektrische Synapsen, zum anderen um chemische Synapsen.

Die elektrischen Synapsen sind phylogenetisch älter. Hierbei wird die Erregung direkt über einen Membranverbund auf die Folgezelle übertragen, das heißt elektrotonisch gekoppelt. Im Vergleich zu den chemischen Synapsen haben sie eine geringe Bedeutung für den Menschen. Chemische Synapsen benutzen Neurotransmitter zur Signalweiterleitung. Im Folgenden soll besonders auf diesen Synapsentyp eingegangen werden.

Eine Synapse besteht aus einer präsynaptischen Membran, einem synaptischen Spalt und einer postsynaptischen Membran. Die prä- und die postsynaptische Membran liegen sich gegenüber und sind durch den 20 nm breiten synaptischen Spalt voneinander getrennt. Die präsynaptische Membran befindet sich am Ende eines Axons, in dessen Zytoplasma die Transmitter gefüllten Vesikel liegen. Erreicht nun ein Aktionspotential die präsynaptische Membran, öffnen sich die Calciumkanäle und es kommt zu einem Einstrom von Calciumionen in das Axonende. Das führt zur Freisetzung der mit Transmitter gefüllten Vesikel in den synaptischen Spalt. Man bezeichnet diesen Vorgang als Exocytose. Durch Diffusion erreichen die Botenstoffe die postsynaptische Membran und binden Rezeptoren, womit das chemische Signal wieder in ein elektrisches umgewandelt wird.

Chemische Synapsen lassen sich weiterhin durch verschiedene Differenzierungsmerkmale unterteilen. Erstens durch die Position des Axons am postsynaptischen Neuron (axodendritisch, axosomatisch und axoaxonal), zweitens durch die Art des Signals (exzitatorisch bzw. inhibitorisch) und drittens durch den Überträgerstoff (Glutamat, Acetylcholin, Noradrenalin *etc.*).

Gray unterschied 1959 nach der Breite des synaptischen Spalts und dem Aussehen der Verdichtungszone an der prä- und postsynaptischen Membran die Synapsentypen I und II. Beim Synapsentyp I ist der synaptische Spalt breiter und die Membranverdichtungen sind an der postsynaptischen Membran dicker. Man nennt diesen Typ auch asymmetrische Synapse. Typ I wirkt exzitatorisch. Der Synapsentyp II hingegen weist einen schmalen synaptischen Spalt auf. Die Membranverdickungen sind nur

stellenweise vorhanden, allerdings symmetrisch auf prä- und postsynaptischer Membran verteilt. Typ II wirkt inhibitorisch.

Der Synapsentyp I wird in über 90% zwischen Axonen und dendritischen Spines gebildet, wobei es sich bei letzteren um spezielle Ausstülpungen der Zellmembran handelt, die erstmals 1891 von Ramón y Cajal beschrieben wurden. Synapsen vom Typ II sind dagegen meist an Zellsomata und an proximalen Dendriten lokalisiert.

### **3.1.2 Struktur und Funktion dendritischer Spines**

Spines haben eine Länge von etwa 1-3  $\mu\text{m}$  und lassen sich in einen Kopf mit einem Volumen von 0,001-1  $\mu\text{m}^3$  und einen dünnen Hals mit einem Durchmesser von weniger als 0,1  $\mu\text{m}$  einteilen. Dieser verbindet den Spine mit dem Dendriten (Harris und Kater, 1994; Sorra und Harris, 2000; Nimchinsky *et al.*, 2002). Dendritische Spines können aufgrund ihres speziellen Zytoskeletts mit einer hohen Dynamik ihre Morphologie verändern (Matus, 1988; Matus, 2005; Segal, 2005).

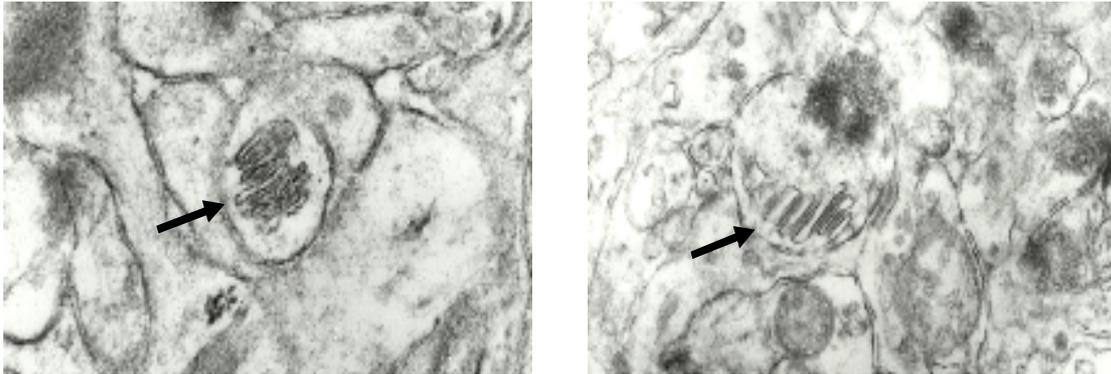
Im Kopf des Spines findet sich eine ca. 30 nm breite Verdickung, die dem postsynaptischen elektronendichten Anteil entspricht (post-synaptic density (PSD)). Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus verschiedenen Rezeptormolekülen, Teilen des Membranskeletts zur Verankerung von Rezeptoren, Second Messenger Molekülen und weiteren Proteinen, die an der Signalverarbeitung der synaptischen Aktionspotentiale beteiligt sind. (Ziff, 1997; Walikonis *et al.*, 2000; Kennedy, 2000). Das Zytoskelett, das die PSD verankert, besteht hauptsächlich aus Aktin (Fifková *et al.*, 1982; Matus *et al.*, 1982; Fifková, 1989). Dies ist für die Motilität des Spines von großer Bedeutung (Fischer *et al.*, 1998).

Spines befinden sich, neben Zellkörpern und Axonhügel, überwiegend auf den Dendriten der Nervenzellen und führen dadurch zu einer enormen Vergrößerung der dendritischen Oberfläche. Man kann sie morphologisch in kurz (stubby), dünn (thin), pilzförmig (mushroom shaped) oder verzweigt (branched) unterteilen. An reifen Synapsen findet man vor allem pilzförmige Spines mit einem deutlich ausgeprägten Spinekopf.

### **3.1.3 Aufbau des Spineapparats und seine Funktion**

In etwa 20% aller Spines befindet sich glattes endoplasmatisches Retikulum (smooth endoplasmatic reticulum (sER)). Dies kann entweder in Form von einzelnen Tubuli oder als eigene Organelle vorliegen. Die Organelle wird als Spineapparat bezeichnet,

den Gray 1959 aus gestapelten Schichten glatten endoplasmatischen Retikulums und elektronendichten Platten beschrieb (s. Abb. 1). Die Ausbildung der elektronendichten Platten zwischen den Lamellen des Spineapparates ist an das Protein Synaptopodin gekoppelt, was Untersuchungen der Arbeitsgruppe Deller zeigen (Deller *et al.*, 2003; Bas Orth *et al.*, 2005). Hier sieht man, dass 95% der Spines mit Spineapparat Synaptopodin aufweisen.



**Abb. 1:** gezeigt ist ein Spineapparat im Stratum radiatum, CA1-Region des Hippocampus der Ratte, der Pfeil kennzeichnet den Spineapparat.

Der Spineapparat kommt in mehr als 80% aller pilzförmigen Spines vor, die man besonders an reifen Synapsen findet (s.o.). Dies führt zur Auffassung, dass der Spineapparat eine wichtige Rolle für die synaptische Plastizität spielt (Spacek und Harris, 1997; Harris, 1999). In der Literatur wird diskutiert, ob eine wesentliche Funktion des Spineapparates in der Calciumspeicherung und -regulation liegt (Fifková *et al.*, 1983; Broadwell und Cataldo, 1984; Villa und Meldolesi, 1994; Vlachos *et al.*, 2009).

### 3.1.4 Neurotransmitter und Rezeptoren der Nervenzelle

Neurotransmitter können sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirken. Erreicht ein Aktionspotential das Axon, werden die Neurotransmitter, die in Vesikel gefüllt im Zytoplasma des Axons liegen, in den synaptischen Spalt entleert und binden an den Zielstrukturen der postsynaptischen Membran. Diese Zielstrukturen können Rezeptoren, Second Messenger oder sonstige Membrankanäle sein. Entscheidend ist also nicht nur der spezifische Transmitter, sondern auch das individuelle Zielobjekt für die Bearbeitung des Signals und dessen Weiterleitung. Die Änderung des Membranpotentials spiegelt die Aktivität der Nervenzelle wieder. Wenn keine Aktivität vorhanden ist, stellt sich zwischen dem intra- und extrazellulären Raum ein Gleichgewichtspotential ein. Das sogenannte Ruhepotential liegt bei circa -70 mV. Kommt es nach der Bindung des Transmitters an die Zielstruktur zu einem Einstrom von positiv geladenen Ionen in die postsynaptische Membran, führt dies zu einer Depolarisation, was auch exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) genannt wird. Dies hat ein Absinken des Ruhepotentials zur Folge. Durch eine Summe von Potentialen kann ein Schwellenwert erreicht werden, was zur Öffnung aller Ionenkanäle führt. In der Zelle entsteht ein Aktionspotential, was von dort aus weitergeleitet werden kann (Benninghoff und Drenckhahn, 2004a).

Überträgerstoff und Zielstruktur können neben dem Membranpotential auch den zelleigenen Metabolismus und die genetische Expression der Zielzellen verändern.

Wie oben bereits erwähnt, unterscheidet man zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Transmittern. Als wichtigster exzitatorischer Botenstoff ist die Aminosäure Glutamat zu nennen. Glutamat bindet an ionotrope Rezeptoren, wovon es drei verschiedene Haupttypen gibt, den NMDA-, den AMPA- und den Kainat-Rezeptor. Die ionotropen Rezeptoren sind Liganden gekoppelte Ionenkanäle.

Der NMDA-Rezeptor wird bei ruhendem Membranpotential von einem Magnesiumion blockiert und benötigt somit neben seiner Aktivierung durch Glutamat bzw. durch seinen spezifischen Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) auch noch eine Vordepolarisation durch die Aktivierung von AMPA- oder Kainatrezeptoren auf der gleichen Zellmembran (Mayer und Westbrook, 1987; Boron und Boulpaep, 2005). Das Magnesiumion diffundiert somit vom Rezeptor, der Transmitter kann binden und den Kanal für Natrium- und Calciumionen freimachen, welches dann zur vollständigen Depolarisation führt. Der NMDA-Rezeptor vermittelt hauptsächlich die Induktion

verschiedener Formen von synaptischer Plastizität und von Langzeitpotenzierung (LTP, s.u.) (Bliss *et al.*, 1993; Cull-Candy *et al.*, 2001).

Glutamat kann allerdings auch an metabotrope Rezeptoren binden, die ihre Wirkung über G-Proteine entfalten. Metabotrope Rezeptoren haben langsamere Effekte auf die Zelle als ionotrope Rezeptoren.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren verfügen über sieben Transmembranhelices zur Verankerung in der Membran. Die G-Proteine befinden sich in der Innenseite der Membran und lassen sich ihrem Aufbau nach in drei verschiedene Gruppen unterteilen, wovon wir allerdings hier nur auf die heterotrimeren G-Proteine eingehen wollen (Boron und Boulpaep, 2005). Diese G-Proteine bestehen aus den Untereinheiten alpha, beta und gamma, welche nach Zerfall und mit Hilfe eines Austausches von GDP in GTP die Phospholipase C (PLC) aktivieren. PLC führt zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in zwei Second Messenger: Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). IP<sub>3</sub> erhöht die Calciumkonzentration in der Zelle durch Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Calciumspeichern und dem endoplasmatischen Retikulum (ER). DAG erhöht die Aktivität der Proteinkinase C (PKC), die wiederum Membrankanäle und verschiedene Enzyme phosphoryliert.

An inhibitorischen Neurotransmittern müssen vor allem  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin genannt werden. Diese Botenstoffe binden an Rezeptoren, die Kalium- oder Chloridionenkanäle öffnen, was somit zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran führt und dadurch ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) auslöst.

Die Zielstrukturen des Botenstoffes GABA sind wie bei Glutamat metabotrope und ionotrope Rezeptoren. Bei den ionotropen Rezeptoren werden der GABA<sub>A</sub>- und der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor unterschieden. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist sensitiv gegenüber Benzodiazepinen, Barbituraten und Steroiden, der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor nicht. Strukturell unterscheiden sie sich nicht (Drew *et al.*, 1984). Wird der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor aktiviert, führt dies zu einem Einstrom von Chloridionen, was ein IPSP auslöst und die Weiterleitung des Aktionspotentials verhindert. Der metabotrope GABA<sub>B</sub>-Rezeptor wirkt G-Protein gekoppelt und führt über die Öffnung von Kaliumkanälen zur Hyperpolarisation und schließlich zum IPSP (Bowery, 1989; Hill und Bowery, 1981).

Glycin bindet ausschließlich an einen metabotropen Rezeptor. Hier werden Chloridionenkanäle geöffnet, was zu einer Hyperpolarisation und somit zu einem inhibitorischen, postsynaptischen Potential (IPSP) führt.

## **3.2 Der Hippocampus**

### **3.2.1 Entwicklung des Hippocampus**

Das Telencephalon besteht aus zwei lateralen Ausstülpungen des vordersten Hirnbläschens, den späteren Großhirnhemisphären, und einem medialen Anteil, der Lamina terminalis. Ein Teil der Hemisphärenwand ist die Großhirnrinde, die als Pallium bezeichnet wird. Direkt oberhalb der Fissura choroidea verdickt sich die Wand des Palliums und bildet den Hippocampus, einen Rindenbezirk des Archipalliums. Der Hippocampus ist ein wichtiger Teil des limbischen Systems. Mit der Ausweitung des Telencephalons und der Ausbildung des Corpus callosum wird die Hippocampusformation in den Temporallappen verlagert (Benninghoff, 2002). Als hippocampale Formation werden das Cornu ammonis, bestehend aus CA1-CA4, der Gyrus dentatus, das Subiculum, das Präsubiculum und das Parasubiculum zusammengefasst.

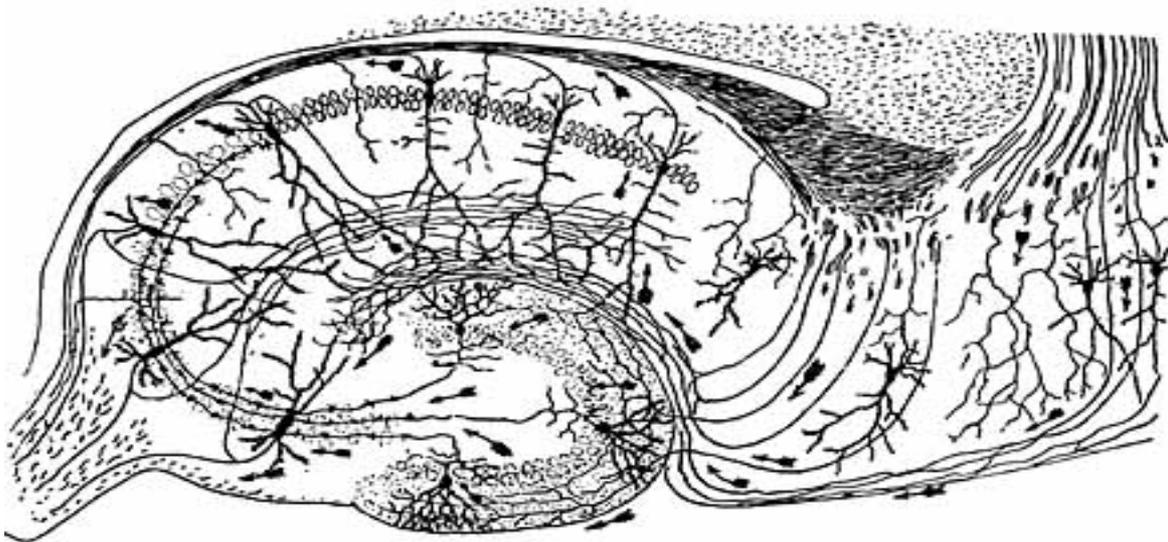
Der menschliche Hippocampus liegt in der medialen Randzone des Temporallappens. Bei der Ratte durchzieht er C-förmig, von rostral nach kaudal, beide Hemisphären (Amaral und Witter, 1989).

### **3.2.2 Aufbau und Funktion des Hippocampus**

Die wichtigen Anteile des Hippocampus sind der Gyrus dentatus, das Cornu ammonis und das Subiculum. Sie bilden die hippocampale Formation, was durch die räumliche Anordnung zueinander zur Ausbildung eines Schaltkreises führt. Die Besonderheit des Hippocampus liegt im dreischichtigen Aufbau der axonalen Verbindungen. Das Cornu ammonis wird transversal in vier Sektoren eingeteilt: CA1-CA4 (Lorente de Nó 1933, 1934). Allerdings sind nur CA1 und CA3 von anatomischer und funktioneller Bedeutung. Der mikroskopische Aufbau des Hippocampus ist komplex, da sich das Cornu ammonis einrollt und dabei noch zusätzlich den Gyrus dentatus mit einschließt, so dass zum Teil mehrere Schichten des Archikortex übereinander liegen. Oberflächlich liegt dem Cornu ammonis der Alveus auf, eine Faserschicht, die afferente und efferente Fasern führt. Nach innen schließen sich die drei klassischen Archikortexschichten an: das Stratum oriens (Korbzellschicht), gefolgt von dem großzelligen Stratum pyramidale (Pyramidenzellschicht) mit großen glutamatergen Neuronen und schließlich das

zellarme Stratum moleculare (Molekularschicht), welches man wiederum in ein Stratum radiatum und in ein Stratum lacunosum unterteilt. Diese Schichten dienen vorwiegend der Verschaltung zwischen Pyramiden- und Korbzellen.

Der Gyrus dentatus weist auch einen dreischichtigen, histologischen Aufbau auf. Das Stratum pyramidale ist hier durch das Stratum granulare ersetzt. Hier befinden sich kleinere Körnerzellen anstelle von Pyramidenzellen. Diese Dendriten sind im Stratum moleculare zu finden, welches auch noch einmal in eine innere und eine äußere Schicht aufgeteilt wird (Benninghoff und Drenckhahn, 2004b). Zahlreiche lokale Interneurone sind in allen Schichten vertreten.



**Abb. 2:** Zeichnung der neuronalen Verbindungen des Nagetier-Hippocampus von Santiago Ramón y Cajal, 1911.

Das Subiculum kennzeichnet den Übergang zum sechsschichtig aufgebauten Neokortex. Die 1911 durchgeführten Golgi- Studien von Ramón y Cajal und die Untersuchungen von Lorente de Nó (1933, 1934) gaben Auskunft über die Projektionen in die hippocampale Formation. Weitere Arbeiten von Blackstad *et al.* (1970), Hjorth-Simonsen (1973) und Amaral und Witter (1989) trugen zum Verständnis der hippocampalen Formation und dem zellulären Aufbau sowie den axonalen Verbindungen bei.

Über die Regio entorhinalis, die im Gyrus parahippocampalis liegt, erhält der Hippocampus Afferenzen aus dem Riechhirn, dem Neokortex und dem Corpus amygdaloideum. Dort werden die somato-sensiblen, visuellen, auditorischen und

olfaktorischen Informationen konvergiert. Weitere Afferenzen erreichen den Hippocampus vom Gyrus cinguli, dem Thalamus und dem Septum.

Nahezu alle Efferenzen des Hippocampus verlaufen über den Fornix cerebri, der selbst Ausgänge in Richtung Septum, Hypothalamus und Corpus amygdaloideum besitzt und mit dem Hauptteil seiner Fasern in den Corpora mamillaria endet.

Auf diese Weise kommt der Papez Neuronenkreis zustande, wovon der Hippocampus einen wichtigen Teil bildet:

Der Hippocampus projiziert über den Fornix in die Corpora mamillaria, die wiederum über das Vicq-d'Azyr-Bündel den Nucleus anterior des dorsalen Thalamus erreichen. Der Nucleus anterior, welcher der spezifische Thalamuskern für das limbische Kortexareal ist, projiziert von dort aus über den Gyrus cinguli wieder zurück in den Hippocampus. Dieser Neuronenkreis hat wesentliche Bedeutung bei der Überführung von Informationen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis.

Diese Vermutung wird gestützt durch einige klinische Studien. Scoville und Miller (1957) berichten über eine anterograde Amnesie, die nach beidseitiger Hippocampusentfernung aufgrund von chirurgischen Eingriffen zum Versuch der Epilepsiebehandlung auftrat. Selbst bei unilateraler Temporallappenentfernung konnte gezeigt werden, dass topographische und episodische Gedächtnisverluste auftreten (Spiers *et al.*, 2001). Ausserdem steht die hippocampale Sklerose in engem Zusammenhang zur Entwicklung von Epilepsien (Meencke *et al.*, 1996; Düzel *et al.*, 2004). Auch bei der Demenz vom Alzheimerstyp kommt es bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung zur Rezeptorveränderung und zum Untergang von hippocampalen Neuronen (Hampel *et al.*, 1998; Csernansky *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

Ein besonderer Aspekt des Hippocampus ist seine Fähigkeit zur Neurogenese, die anhand von glutamatergen Körnerzellen bei Ratten entdeckt wurde (Altman *et al.*, 1965). Hiermit konnte endgültig widerlegt werden, dass von Geburt an alle Neurone vorhanden sind.

Als Teil des limbischen Systems spielt der Hippocampus ausserdem eine wichtige Rolle bei endokrinen, viszeralen und emotionalen Vorgängen.

### **3.2.3 Estradiolsynthese des Hippocampus**

Die Estradiolsynthese beginnt, wie die Synthese aller Steroide mit der Bereitstellung des Cholesterols. Dieses wird durch das Enzym StAR (steroidogenic acute regulatory

protein) zur inneren Mitochondrienmembran transportiert. Cytochrom P450<sub>scc</sub> befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran und wandelt Cholesterol in Pregnenolon um. Die zwei nun folgenden Syntheseschritte werden irreversibel vom Enzym Cytochrom P450<sub>c17</sub> (17 $\alpha$  Hydrolase, c17, 20 Lyase) katalysiert, wodurch Pregnenolon über den Zwischenschritt 17-Hydroxy-Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) umgewandelt wird. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid- Oxidoreduktase und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysieren den reversiblen Schritt vom DHEA zum Androstendiol und den irreversiblen Syntheseschritt zum Testosteron. Zuletzt katalysiert das Enzym Cytochrom P450<sub>aro</sub> (CYP19A1, Aromatase) die Abspaltung der C19-Methylgruppe und die Aromatisierung des Ringes A. Das Ergebnis ist 17 $\beta$ -Estradiol.

Es konnte gezeigt werden, dass die Neurosteroidsynthese mit der gonadalen Steroidsynthese identisch ist (Furukawa *et al.*, 1998; Stoffel-Wagner, 2001; Wehrenberg *et al.*, 2001).

Mukai *et al.* konnten nachweisen, dass die Dichte von dünnen Spines 2 h nach Applikation von 1 nM Estradiol bei Pyramidenzellen signifikant zunimmt. Dies führt zu der Annahme, dass Estradiol und somit auch die Aromatase eine entscheidende Rolle für die synaptische Plastizität spielen (Mukai, 2006).

### **3.3 Die Aromatase**

#### **3.3.1 Funktions- und Regulationsmechanismen der Aromatase**

Wie bereits zuvor dargestellt, ist die Aromatase ein Schlüsselenzym der Estradiolsynthese. Sie ist dafür zuständig, dass Testosteron in Estradiol umgewandelt wird. Das Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 15 und die kodierende Sequenz ist 1511 Basenpaare lang.

Die Aromatase ist im endoplasmatischen Retikulum der Zelle lokalisiert und in verschiedenen Geweben nachweisbar. Interessanterweise kann die Aromatase auch in der prä- und postsynaptischen Region von Pyramiden- und Körnerzellen in hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden (Sanghera *et al.*, 1991; Abdelgadir *et al.*, 1994; Naftolin *et al.*, 1996; Garcia-Segura *et al.*, 1999; Wehrenberg *et al.*, 2001). Die Arbeitsgruppe um Naftolin hatte bereits 1971 erste Untersuchungen veröffentlicht, nach denen das Gehirn über eine eigenständige lokale Steroidbiosynthese verfügt, da nach Entfernung der Gonaden Estrogene im ZNS nachgewiesen werden konnten (Naftolin *et al.*, 1971).

2003 konnte erstmals die Aktivität der hippocampalen Aromatase bestätigt und eine Estrogenabgabe *in vitro* beobachtet werden (Prange-Kiel *et al.*, 2003; Hojo *et al.*, 2004; Mukai *et al.*, 2006). Für die Funktionalität der Aromatase im Hippocampus spricht die Konzentration von Estradiol in hippocampalen Gewebe, die mit 1 nM höher ist als die im Blut (Mukai *et al.*, 2006).

Die Aktivität der Aromatase wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Erstens besteht die Regulation auf genomischer Ebene. Hier binden Steroide an intrazelluläre Rezeptoren, die somit aktiviert werden und durch Regulation der Gentranskription die Aromataseaktivität beeinflussen (Harada *et al.*, 1992; Roselli *et al.*, 1985). Bei diesem Vorgang dauert die Anpassung der Regulation allerdings länger als bei der, in neueren Studien nachgewiesenen, Phosphorylierung der Aromatase (Balthazart *et al.*, 2003, 2006).

Die Aromatase ist im phosphorylierten Zustand inaktiv, im dephosphorylierten Zustand aktiv. Begünstigt wird die Phosphorylierung durch ATP, Calcium und Magnesium. Die Phosphorylierung ist primär abhängig von Calcium und umfasst die Proteinkinasen A und C. Balthazart zeigte, dass durch Inhibitoren dieser Kinasen die Phosphorylierung der Aromatase aufgehoben werden kann und die Enzymaktivität dadurch erneut ansteigt (Balthazart *et al.*, 2006). Desweiteren haben Neurotransmitter regulatorische Einflüsse auf die Aktivität der Aromatase. Es wird davon ausgegangen, dass eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration, die über einen Neurotransmitter bzw. durch Stimulierung eines Rezeptors, z.B. des NMDA-Rezeptors, reguliert wird, zur Phosphorylierung des Enzyms und somit zu seiner Inaktivierung führt (Balthazart *et al.*, 2006).

### **3.3.2 Beeinflußung der Spinogenese durch die Aromatase**

Viele Studien sprechen dafür, dass dendritische Spines höchst motile Elemente sind, die eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Synapsen spielen (Fischer *et al.*, 1998; Dailey und Smith, 1996). Filopodien gelten als Vorstufen von Spines. Sie sind dünne, motile Zellmembranausstülpungen, die wahrscheinlich aktiv Kontakt zu Axonen suchen (Ziv und Smith, 1996). Bei erfolgter Kontaktaufnahme werden verschiedene Prozesse induziert, um die prä- und postsynaptischen Strukturen zu stabilisieren und weiter reifen zu lassen (Zhang und Benson, 2000; Okabe *et al.*, 2001). Es wurde jedoch auch schon gezeigt, dass Spines direkt aus dem Dendriten wachsen oder sich an den Stellen

entwickeln, wo sich Filopodien zurückgebildet haben (Papa *et al.*, 1995; Fiala *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit ist von besonderem Interesse, welche Rolle die endogene Estrogensynthese und damit die Aktivität der Aromatase für die Spinogenese spielt. Estrogene am Hippocampus bewirken u.a. einen Zuwachs der Spinedichte und der Spineanzahl (Segal und Murphy, 1999, 2001; McEwen, 2001, 2004). Diese These konnten auch weitere Studien belegen (McEwen *et al.*, 2002; Rune und Frotscher 2005, Rune *et al.*, 2006). Mukai konnte zeigen, dass die Anzahl der Spines nach Behandlung mit Estradiol in hippocampalen Schnittkulturen zunahm (Mukai *et al.*, 2006, 2007). Auch durch eine systemische Behandlung mit Estradiol bei ovariectomierten Mäusen konnte ein spezifischer Anstieg von pilzförmigen Spines gezeigt werden (Lee *et al.*, 2005) Bei Inaktivierung der Aromatase durch Inhibitoren, wie Letrozol (Mitropoulou *et al.*, 2003), wurde eine Abnahme der Spine- und Spinesynapsenanzahl festgestellt (Kretz *et al.*, 2004).

Es besteht kein Zweifel, dass das im Hippocampus synthetisierte Estradiol eine bedeutende Rolle für die synaptische Plastizität spielt, und sich somit funktionell von dem in den Gonaden produzierten Estrogen unterscheidet (Prange-Kiel *et al.*, 2003, 2006; Kretz *et al.*, 2004; Rune und Frotscher, 2005; Rune *et al.*, 2006).

### **3.4 Synaptopodin: Ein Aktin assoziiertes Protein**

#### **3.4.1 Molekularer Aufbau von Synaptopodin**

Synaptopodin wurde erstmals 1997 von Mundel *et al.* beschrieben, der das Aktin assoziierte Protein in Podozyten der Niere und zeitgleich in dendritischen Spines des Telenzephalons gefunden hatte. Die zu der Zeit veröffentlichte humane Proteinsequenz umfasste ein 685-aa prolinreiches Polypeptid mit einer berechneten molekularen Masse von 73,7 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 9,38.

Die murine Proteinsequenz besteht aus einem 690-aa Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 74,0 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 9,27. Zwischen der humanen und der murinen Sequenz ergab sich eine 84%ige Übereinstimmung. Inzwischen konnte man nachweisen, dass das damals beschriebene offene Leseraster nicht vollständig war und die codierende Sequenz in ein tatsächliches Protein von 903 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 96,3 kDa translatiert wird. Der isoelektrische Punkt liegt bei 9,5.

Neben der hier beschriebenen langen Variante von Synaptopodin besteht allerdings auch noch eine kurze Form des Proteins. Sie besteht aus 685 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 73,7 kDa. Die Aminosäuren 1 bis 676 sind allerdings bei beiden Formen identisch, womit sich die Frage stellt, ob die unterschiedliche Größe einen Rückschluss auf die Funktion in unterschiedlichen Geweben zulässt. Die Arbeitsgruppe um Mundel vermutete, dass die lange Variante in der Niere und die kurze im Telenzephalon zu finden sei. Die Arbeitsgruppe um Kremerskothen widersprach dieser These. Hier wurde davon ausgegangen, dass gerade die Aminosäure 752 bis 903 wichtiger Bestandteil der Synaptopodinform der Synapsen ist (Mundel *et al.*, 1997; Kremerskothen *et al.* 2005). Auffällig ist der hohe Anteil an Prolin mit 20%, welcher gleichmässig über das gesamte Protein verteilt ist. Dies lässt auf eine gestreckte dreidimensionale Struktur von Synaptopodin schließen, ohne Bildung von globulären Domänen.

Synaptopodin verfügt über zwei PPxY Motive (P steht für Prolin, x für eine beliebige Aminosäure und Y für Tyrosin) (Mundel *et al.*, 1997a). Mit Hilfe dieser Motive können Proteine mit hohem Prolingehalt mit den WW-Domänen ihrer Bindungspartner in Interaktion treten (Einbound und Sudol, 1996). WW-Domänen befinden sich zum Beispiel auch in Dystrophin und Utrophin, welche Proteine des postsynaptischen Zytoskeletts sind (Bork und Sudol, 1994). Synaptopodin kann also mit Aktin und verschiedenen Proteinen des dendritischen Zytoskeletts interagieren (Mundel *et al.*, 1997). Interessanterweise sind Synaptopodin und Aktin in der postsynaptischen Dichte und in dendritischen Spines identisch verteilt (Matus *et al.*, 1982).

Des Weiteren verfügt Synaptopodin über mehrere Phosphorylierungsstellen. Unter anderen auch für die Proteinkinase C, welche an der postsynaptischen Dichte in hohen Mengen vorliegt (Naisbitt *et al.*, 2000). Es stellt sich also die Frage, ob die Aktivität von Synaptopodin von der Proteinkinase C reguliert sein könnte.

### 3.4.2 Lokalisation von Synaptopodin

Synaptopodin ist hauptsächlich im Telenzephalon, z.B. im cerebralen Cortex, im Striatum, im Hippocampus und im Bulbus olfactorius vorhanden, wird aber auch in anderen Geweben wie in den Podozyten der Niere, dem Herz, der Lunge und dem Skelettmuskel gefunden (Yamazaki *et al.*, 2001). In weiteren Strukturen des ZNS, d.h. außerhalb des Telenzephalons, z.B. im Cerebellum, ist Synaptopodin nicht nachzuweisen (Mundel *et al.*, 1997a).

Sowohl die messengerRNA (mRNA) von Synaptopodin, als auch das Protein selbst, findet sich in der postsynaptischen Dichte und in den dendritischen Spines. Andere dendritischen Proteine, wie MAP2, kommen jedoch nur im Soma von Neuronen und nicht im Dendriten vor (Garner *et al.*, 1988). Elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, dass Synaptopodin hauptsächlich im Spinehals lokalisiert ist und dort in engem Zusammenhang zum Spineapparat steht (Deller *et al.*, 2000). Mundel hatte schon früher zeigen können, dass weder Synaptopodin noch seine mRNA in Purkinjenzellen zu finden sind, die interessanterweise auch über keinen Spineapparat verfügen (Spacek *et al.*, 1985). Synaptopodin ist für die Bildung des Spineapparates von äußerst wichtiger Bedeutung (Deller *et al.*, 2000). Diese These wurde in Experimenten mit der Synaptopodin-knockout Maus gestützt. In den Spines der Synaptopodin-knockout Mäuse konnte kein Spineapparat nachgewiesen werden. Außerdem hatten die Mäuse ein schlechteres Ortsgedächtnis und eine verminderte hippocampale Langzeitpotenzierung (LTP), die im weiteren Verlauf näher erklärt werden soll (Deller *et al.*, 2003).

In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass Synaptopodin und die LTP miteinander assoziiert sind (Deller *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2001; Deller *et al.*, 2003).

Die Langzeitpotenzierung ist ein neurophysiologisches Modell, wobei es zu einer Verstärkung synaptischer Effektivität bei wiederholter Reizdarbietung kommt. LTP kann langanhaltende Veränderungen der synaptischen Stärke auslösen und somit zu einer Stabilisierung von aktiven Synapsen führen, sowie zu einer Zunahme ihrer Dichte in umschriebenen Regionen (Hoskova *et al.*, 1995; Collin *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 2000; O'Malley *et al.*, 2000). Der hauptsächliche Mechanismus zur Auslösung von LTP im Hippocampus läuft über die assoziative Verknüpfung, d.h. die gleichzeitige Aktivierung von zwei nacheinander geschalteten exzitatorischen Neuronen mit der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Murphy *et al.*, 1997). Weitere Untersuchungen

deuten darauf hin, dass die synaptische Plastizität über Calcium vermittelt wird (Bardo *et al.*, 2006; Deller *et al.*, 2007).

### 3.5 Calcium im ZNS

#### 3.5.1 Funktion und Regulation in der Nervenzelle

Calcium ist das fünfthäufigste Element der Erde. 1808 wurde durch Sir Humphry Davy zum ersten Mal elementares Calcium durch Abdampfen von Quecksilber aus Calciumamalgam gewonnen. Heute weiß man um die vielfältigen Funktionen des Calciums, zum Beispiel bei der Reizüberleitung in Neuronen. Schwankungen des intrazellulären Calciums haben Einfluss auf fast jeden physiologischen, chemischen und biologischen Prozess des Neurons. Im Speziellen halten besonders zwei gegensätzliche Prozesse die Zelle am Leben. Auf der einen Seite wird Calcium in die Zelle eingeschleust, um zum Beispiel für mehr Wachstum zu sorgen. Andererseits wird Calcium davon abgehalten, d.h. inhibiert, um Apoptose zu verhindern (Choi 1992; Berridge *et al.*, 1998; Hölscher 2005).

Calcium ist unabdingbar für das Erhalten und Senden von Signalen in der neuronalen Erregungsleitung, für die Veränderungen auf zellulärer Ebene beim Lernen und für die Entwicklung eines Gedächtnisses (Berridge *et al.*, 1998, 2003).

Lange wurde Calciumeinstrom von außen durch Erhöhung des Membranpotentials, aber auch durch Neurotransmitterfreisetzung als die hauptsächliche Quelle für die intrazelluläre Calciumkonzentrationen angesehen. Allerdings gibt es auch die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, wie vermutlich dem, aus endoplasmatischem Retikulum bestehenden Spineapparat. Eine äußerst wichtige Rolle spielen die Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptoren (IP3-R) und die Ryanodinrezeptoren (RyR). Durch die Aktivierung dieser intrazellulären Calciumkanäle kann Calcium freigesetzt werden (Yuste *et al.*, 2000; Korkotian und Segal, 2006).

Die Rezeptoren regulieren Membrankanäle, die durch Liganden geöffnet werden. Es gibt drei Subtypen des Ryanodinrezeptors: RyR 1, RyR 2 und RyR 3. Typischerweise kommt RyR 1 im Skelettmuskel, RyR 2 im Herz und RyR 3 im Gehirn vor. Diese Vereinfachung stimmt allerdings nur teilweise. Den RyR 2 gibt es auch in neuronalen Zellkörpern (Kuwajima *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2000), genau wie der RyR 1 in den Purkinjezellen des Cerebellums (Furuichi *et al.*, 1994) vorliegt. Ryanodinrezeptoren sind Tetramere, bestehend aus vier Untereinheiten mit jeweils einer molekularen Masse

von 560.000 Da. Das Protein FKBP (FK506 binding protein) stabilisiert die tetramere Form von RyR 1 und RyR 2 (Marks *et al.*, 1997).

Auch von den IP3 Rezeptoren gibt es drei Isoformen. Typ 1 und 3 kommen im embryonalen und adulten Gehirn vor, das Vorkommen von Typ 2 ist beschränkt auf die Gliazellen (Sharp *et al.*, 1993; Sharp *et al.*, 1999). Wie die Ryanodinrezeptoren sind die IP3 Rezeptoren Tetramere, bestehend aus vier Untereinheiten mit jeweils einer molekularen Masse von 300.000 Da (Marks *et al.*, 1997).

Nach Untersuchungen von Sharp *et al.* sind IP3 Rezeptoren im Axon und im Dendriten von hippocampalen Neuronen präsent, genau wie die Ryanodinrezeptoren, die allerdings auch noch dazu in den dendritischen Spines vorkommen. In der CA1 Schicht des Hippocampus kommen überwiegend IP3 Rezeptoren vor, in der CA3 Schicht hingegen dominieren die Ryanodinrezeptoren (Sharp *et al.*, 1993).

Die intrazellulären Calciumkanäle können spezifisch blockiert werden. Um die verschiedenen Angriffspunkte erläutern zu können, muß man sich, wie bereits oben beschrieben, noch einmal die Signalkaskade vor Augen führen. Die Phospholipase C (PLC) wird, durch den Zerfall eines G-Proteins in seine Untereinheiten, aktiviert. Daraufhin kommt es zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in zwei unterschiedliche Second- Messenger: Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). IP3 erhöht die Calciumkonzentration in der Zelle durch Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Calciumspeichern und dem endoplasmatischen Retikulum (ER). DAG erhöht die Aktivität der Proteinkinase C (PKC), die wiederum Membrankanäle und verschiedene Enzyme phosphoryliert.

U73122 ist ein Inhibitor von Phospholipase C abhängigen Prozessen. Desweiteren kann es durch U73122 zur Inhibition der durch Thrombin oder Kollagen verursachten Plättchenaggregation kommen, sowie zur hemmenden Aktivität der HIV-1 Integrase (Smith *et al.*, 1990; Bleasdale *et al.*, 1990; Burke *et al.*, 1995).

8-Brom-Cyclic Adenosin Diphosphat Ribose (8-Br-cADPR) ist ein cADPR Antagonist. Walseth *et al.*, konnten zeigen, dass durch die Blockade des Ryanodinrezeptors die Calciumfreisetzung verhindert werden kann (Walseth *et al.*, 1993)

### **3.5.2 Bedeutung des Calciums für die Estrogensynthese und für Synaptopodin**

Wie bereits schon erwähnt, kann Calcium über Calcium abhängige Kinasen zur Phosphorylierung der Aromatase und somit zur Inaktivierung dieses Enzyms führen.

Dadurch greift Calcium aktiv in die Estrogensynthese ein (Balthazart *et al.*, 2001, 2006). Dies könnte über eine Heraufregulation von bestimmten Estrogenrezeptoren, wie ER  $\beta$ , zum Absinken der Synaptopodinexpression führen .

### **3.6 Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle des Spineapparates als Calciumspeicher für die Regulation der Estradiolsynthese untersucht werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Aluminiumfolie	Lager UKE
Brutschrank WTC	Binder
Cutfix Surgical Disposable Scalpel, Skalpell	Braun
Deckgläser, 24x32mm	Marienfeld
Einmalspritzen, verschiedene Größen	Braun
EP TIPS Standard, verschiedene Größen	Eppendorf AG
Excel 2003 (Software)	Microsoft
Falcon Cell Strainer, 40 µm Nylon	Becton Dickinson Labware
Falcon Tissue Culture Plate, 24 Well	Becton Dickinson Labware
Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson Labware
Handschuhe	Kimberly-Clark
Heidemannspatel	Aesculap
Hettrich zentrifuge EBAIR	Hettrich
Hettrich Zentrifuge Universal 32R	Hettrich
Histobond Adhäsions-Objektträger	Marienfeld
ImageTool 3.0 (Software)	University of Texas Health Science Center/ San Antonio
Instrumentenkasten	Merck
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axioskop 2, HBO100, MC80, EBQ100	Zeiss
Mikroskop: Axiovert 100, HBO50, MC100, MBG52ac	Zeiss
Mikroskopische Deckgläser, rund, Ø12mm	Assistent
Neubauer-Zählkammer: Tiefe 0,1mm; 0,0025mm <sup>2</sup>	Brand Germany
Openlab 3.1.5 (Software)	Improvision
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25 cm	Merck
Phasenkontrastmikroskop	Leitz
Pinzette nach Dumont	Merck
Pipetten, verschiedene Volumina	Gilson
Pipettenspitzen 5 ml, 10 ml und 25 ml	Becton Dickinson Labware

Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf AG
Rüttler	Bühler, Labortechnik
Schere	Aesculap de (Braun)
Sicherheitswerkbank der Stufe 2	Heraeus
SPSS für Windows (Software)	SPSS GmbH Software
Tissue Culture Dishes, 35x10 mm	Becton Dio
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad mit Schüttler	GFL
Windows XP (Software)	Microsoft
Word 2003/2007 (Software)	Microsoft
Zellstofftücher	Wepa
Zentrifuge Universal 32R und EBA1R	Hettrich

#### **4.1.2 Chemikalien**

8-Brom-cADP Ribose	Biomol
Albumin, bovine serum (BSA), A7906	Sigma
Alexa Fluor 488, polyklonal	Molecular Probes, Invitrogen
Aqua ad iniectabilia, 1 Liter	Baxter Deutschland
B27 Supplement	Gibco/Invitrogen
Barrycidal 36, Desinfektionsmittel	Helmut Schröder
basic fibroblast growth factor (bFGF), Human Rekombinat	Strahtmann
Cy3, monoklonal, goat anti-mouse	Jackson Immuno Research
DAKO, fluorescent free mounting medium	Dako
DAPI	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol 70% und 96%	Apotheke UKE
Formaldehydlösung 37%	Merck
ICI 182,780	Tocris
L-Glutamin, 200 mM	Gibco/Invitrogen
MAP2 (Microtubule-associated protein 2) polyklonal	Chemicon
Neurobasal A Medium mit und ohne Phenolrot	Gibco/Invitrogen

NMDA	Sigma
NGS	Sigma
NGF	Sigma
PBS Tabletten	Gibco/Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen
Poly-d-Lysin	Sigma
Synaptopodin, monoklonal U73122	Progen Biotechnik
Trypsin/EDTA, L2163	Biomol
	Biochrom

### 4.1.3 Lösungen

#### 8-Brom-cADP Ribose:

- in Aqua dest. lösen
- weiter verdünnen mit Aqua dest. bis eine Konzentration von  $10^{-6}$  M erreicht wird

#### Beschichtung der Kulturplatten:

- 600  $\mu$ l 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:

- 50  $\mu$ g bFGF in 2,5 ml Aqua Dest lösen und in 50  $\mu$ l Tubes aliquotieren
- 50  $\mu$ l aliquotiertes bFGF in 50 ml Neurobasal lösen
- bei  $-25^{\circ}\text{C}$  lagern

#### BSA:

- 3% BSA in PBS
- suspendieren

**EDTA:**

- in 500 ml Aqua dest. 93,06 g EDTA geben
- bei pH 7,5 mit NAOH Plätzchen lösen
- auf pH 8,0 einstellen
- weiter verdünnen mit Aqua dest. bis eine Konzentration von  $10^{-3}$  M erreicht wird

**ICI 182,780:**

- in Ethanol lösen
- 500  $\mu$ l B27
- 125  $\mu$ l L-Glutamin (200 mM)
- 500 mit Aqua dest. verdünnen bis eine Konzentration von  $10^{-7}$  M erreicht wird

**Kulturmedium für Dispersionkulturen:**

- 50 ml Neurobasal A
- 500  $\mu$ l Penicillin/Streptomycin
- 50  $\mu$ l bFGF
- 125  $\mu$ l L-Glutamin
- 500  $\mu$ l B27

**NMDA:**

- in Aqua dest. lösen
- weiter verdünnen mit Aqua dest. bis eine Konzentration von  $10^{-8}$  M erreicht wird

**NGS:**

- 2% NGS in PBS

**PBS:**

- 8 g NaCl
- 0,2 g KaCl
- 1,44 Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
- in 1 l Aqua dest.

alternativ:

- 500 ml Aqua dest.
- 1 PBS Tablette
- Titration mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

**U73122:**

- Stammlösung 1 mg/ml in Ethanol gelöst
- 2 min Ultraschall (2 mM)
- weiter verdünnen mit Aqua dest. bis eine Konzentration von  $10^{-7}$  M erreicht wird

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Präparation der Hippocampi

Die Präparation der Hippocampi fand unter semisterilen Bedingungen statt. In den Experimenten wurden ausschließlich 5 Tage alte Ratten (P5) des Zuchtstammes WISTAR verwendet. Die Experimente fanden unter Berücksichtigung der geltenden gesetzlichen Bestimmungen statt.

Zuerst wurden die Ratten mit einer Schere dekapitiert, anschließend wurde die Haut des Schädeldaches entfernt. Das Schädeldach wurde mit Hilfe einer feinen, geraden Schere median-sagittal eröffnet, so dass die Schädeldachhälften mit einer Pinzette zur Seite geklappt werden konnten. Somit konnte das Gehirn schadlos von den äußeren Strukturen befreit werden. Mittels eines Heidemannspatels entnahmen wir das vollständige Gehirn und legten es zunächst auf einen mit PBS getränkten Schwamm.

Im Anschluss wurde zuerst das Kleinhirn mit einem Skalpell entfernt und durch einen weiteren median-sagittalen Schnitt erfolgte die Trennung der beiden Hemisphären. Aus den beiden nun offen liegenden Hemisphären wurde jeweils der Hippocampus mit Hilfe des Heidemannspatels „herausgeschält“. Die Hippocampi wurden danach sofort in Eis gekühltes steriles PBS gegeben, um eventuellen Zelluntergang durch den ischämischen Zustand gering zu halten.

### 4.2.2 Hippocampale Dispersionskultur

Die Präparation der Dispersionskulturen aus hippocampalen Neuronen wurde nach der Methode von G.J. Brewer (Brewer, 1997) durchgeführt, jedoch mit einigen Modifikationen nach J. Prange-Kiel (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Ziel dieser Durchführung ist die Entstehung einer Dispersionskultur, um Zellen für Stimulationen zu gewinnen. Wie von Schassen *et al.* 2006 zeigen konnten, bestehen Dispersionskulturen zu 80% aus Neuronen und zu 12% aus Astrozyten.

Einen Tag vor der Präparation der Hippocampi wurde in einer Zellkulturplatte mit 24 Wells jede Kavität mit einem Glasplättchen bestückt. Pro Kavität wurde 600 µl Poly-D-Lysin hinzugegeben, welches nach einer Stunde wieder abgesaugt wurde. Im Anschluß wurden die Glasplättchen mit 1 ml Neurobasal A befüllt, welches kurz danach wieder entfernt wurde, um es bei Raumtemperatur unter dem Abzug der Sicherheitswerkbank über Nacht trocknen zu lassen.

Am Tag der Präparation wurden die entnommenen Hippocampi weiter aufbereitet. Unter sterilen Bedingungen erfolgte eine mehrmalige Spülung mit PBS, um nicht-hippocampales Gewebe und vorhandene Erythrozyten zu entfernen. Mit einer Klinge konnten die Hippocampi grob zerkleinert werden, so dass der dadurch entstandene „Zellbrei“ mit 25 ml PBS in ein 50 ml Falconröhrchen überführt werden konnte. Diese Zellsuspension wurde dann 5 min lang bei 4°C mit 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet mit jeweils 500 µl Trypsin/EDTA pro präpariertem Gehirn für 2,5 min unter Schütteln in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> angedaut wurde. Dieser Verdau der extrazellulären Matrixproteine wurde anschließend mit 25 ml Neurobasal A geblockt.

Im Folgenden wurde die entstandene Zellsuspension über ein 40 µM Zellsieb gegeben, wodurch hierbei größere unverdaute Bestandteile der Zellsuspension entfernt werden konnten. Daraufhin wurden zwei weitere Male bei 4°C mit 5000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand des Falconinhaltes verworfen, so dass nur das Pellet übrig blieb. Vor der zweiten Zentrifugation sowie auch in der weiteren Verarbeitung der Zellkultur wurde nur noch phenolrotfreies Neurobasal verwendet.

Nach dem wiederholten Verwerfen des Überstandes wurde eine definierte Menge Neurobasal A in das Falconröhrchen hinzugegeben und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. In den Experimenten wurde immer mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen pro ml gearbeitet. Die Zellen mussten nach der entsprechenden Auffüllung und vor der Umsetzung in die Zellkulturplatten gründlich resuspendiert werden, um diesem Idealwert nahezukommen.

Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde auf die mit Poly-D-Lysin beschichteten Glasplättchen pro Kavität gegeben. Die Zellkulturplatte wurde danach für eine Stunde in einen Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gestellt, um eine Sedimentation und Anhaftung der Zellen an dem beschichteten Glasplättchen zu gewährleisten.

Nach einer Stunde wurden die Glasplättchen in eine neue Zellkulturplatte mit 24 Wells überführt und pro Kavität wurde 1 ml Kulturmedium für die Dispersionskulturen (s.o.), welches bereits zuvor auf 37°C erwärmt worden war, hinzugegeben. Der erste Wechsel des Kulturmediums erfolgte 24 h später, danach in einem Rhythmus von 48 h. Das Kulturmedium wurde teilweise für RIA-Estradiol Messung gesammelt und bei -25°C eingefroren.

Schon nach viertägiger Vorkultur hatten die Zellen bereits Fortsätze gebildet und ein vollständiger Zellverband *in vitro* war entstanden. Wenn eine Langzeitstimulation durchgeführt wurde, konnte man ab diesem Zeitpunkt mit den jeweiligen Substanzen alle 48 h die Zellen stimulieren und nach sechs Tagen fixieren. Bei einer Kurzzeitstimulation hingegen wurden die Zellen erst nach zehn Tagen für einen bestimmten Zeitraum kurz vor dem Fixieren stimuliert.

#### **4.2.3 Stimulation und Inhibition**

Stimulation und Inhibition beziehen sich immer auf die Substanz, die auf die Zellen appliziert wurde und was es bei diesen auslöste. Beim Standardprotokoll wurde nach viertägiger Vorkultur insgesamt drei Mal im Abstand von 48 h mit den spezifischen Substanzen stimuliert bzw. inhibiert.

Um den Einfluss der Calciumtransienten in den hippocampalen Neuronen auf die Expression von Synaptopodin zu untersuchen, wurde mit 8-Brom-cADP Ribose und U73122 in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Einige Versuche wurden mit vorheriger Abpufferung des extrazellulären Calciums durch EDTA und nachfolgender Stimulierung durch die Calciumkanalblocker durchgeführt. Auch der Zusammenhang zwischen zuerst durchgeführter, vermutlicher inhibierender Applikation von NMDA auf die Zellen und anschließender Stimulation durch U73122 beziehungsweise 8-Brom-cADP Ribose wurde studiert. In weiteren Experimenten wurde auch mit ICI 182,780, einem Estrogenrezeptorantagonist und NMDA stimuliert beziehungsweise inhibiert.

Es wurde bei jeder Stimulationsreihe Kulturen ohne Behandlung gelassen, welche für die Auswertung das Kontrollniveau lieferten. Hierdurch wurden Unterschiede durch Behandlungen interpretierbar und, bei Wiederholung des Experiments, vergleichbar.

Bei einigen Experimenten wurde nicht nach dem Standardprotokoll gearbeitet, sondern die Kultur wurde als bereits oben beschriebene Kurzzeitstimulation durchgeführt. Um zum Beispiel Effekte auf genomischer Ebene auszuschließen, stimulierte man für einen bestimmten Zeitraum, der zwischen 30 min und 24 h je nach Experiment lag. Der Wechsel des Kulturmediums fand wie beim Standardprotokoll statt. Für die einmalige Stimulation wurden die Kulturen in den Brutschrank gestellt und nach Ablauf der Zeit direkt fixiert (siehe unten).

#### 4.2.4 Quantitative Estrogenbestimmung mittels Radio-Immunoassay (RIA)

Durch den Radio-Immunoassay können Hormone bis zu einer Konzentration von  $10^{-18}$  mol/l nachgewiesen werden. Aufgrund dessen ist er ideal für eine quantitative Messung des Estrogengehaltes im Kulturmedium geeignet.

Bei jedem Mediumwechsel der Dispersionskulturen, die für den RIA bestimmt waren, wurden mindestens 8 ml Kulturmedium gesammelt und eingefroren. Die Proben wurden fortlaufend nummeriert und in einem Blindversuch mit diesem Verfahren ausgewertet.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurde das unbehandelte Kulturmedium verwendet. Durch stufenweise Erhöhung der  $17\beta$ -Estradiol Konzentration (X-Achse) konnte mit Hilfe des Radio-Immunoassays ein Responsewert (Y-Achse) ermittelt werden. Diese Standardkurve diente als Grundlage für alle folgenden Messungen.

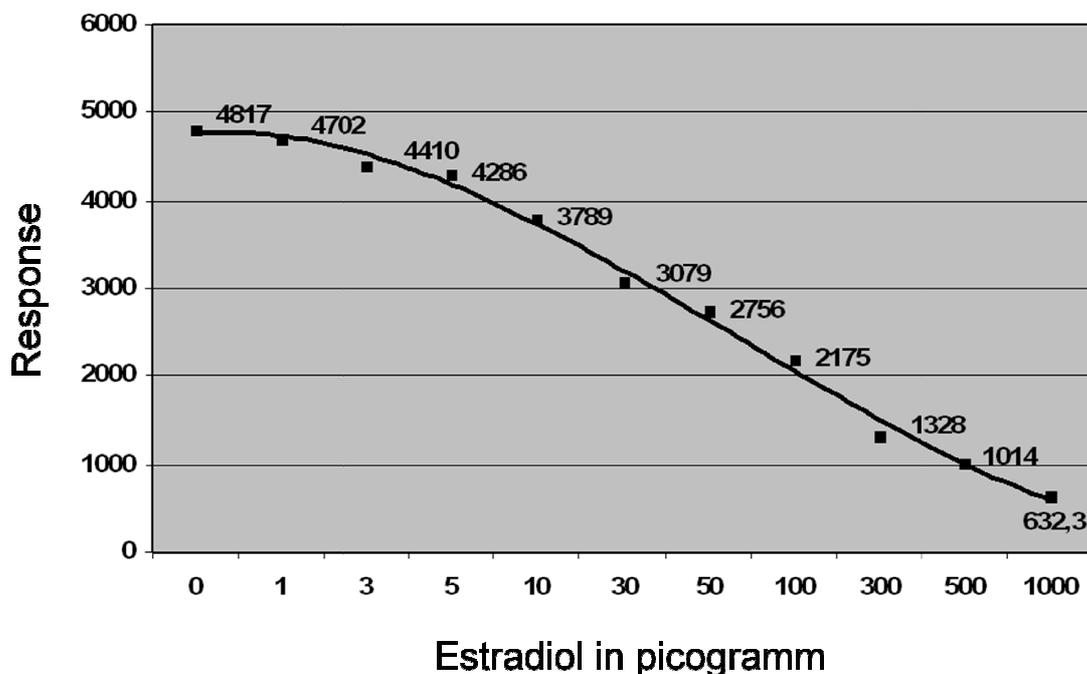


Abb. 3: Standardkurve als Grundlage für die weiteren quantitativen Estrogenwertbestimmungen.

5 ml Kulturmedium jeder Probe wurden zunächst getrocknet und danach mit 250  $\mu$ l Peptidpuffer versetzt. Mit Hilfe einer SEP-PAK  $C_{18}$  Säule wurde dem Medium  $17\beta$ -Estradiol entzogen und mit Methanol versetzt. Im Anschluß daran konnte das Medium quantifiziert werden. Der RIA wurde unter Verwendung des Standardprotokolls durchgeführt und mit einem Gamma Counter analysiert.

#### **4.2.5 Fixierung der hippocampalen Dispersionskultur**

Für die Fixierung der Dispersionskultur wurde eine 3,7%ige Formaldehydlösung benutzt. Zuerst wurde das Kulturmedium aus den Kavitäten entnommen, ggf. gesammelt und für 5 min durch PBS ersetzt. Nach dem Absaugen des PBS wurden mit der 3,7%igen Formaldehydlösung die Zellen für 10 min fixiert. Im Anschluss wurde jede Kavität dreimal für jeweils 5 min mit sterilem PBS gespült. Es erfolgte ein Verschluss der Zellkulturplatte mit Parafilm. Die Platten konnten zur weiteren Behandlung bei 4°C gelagert und bis zu drei Monate nach Fixierung weiterbehandelt werden.

#### **4.2.6 Immuncytochemie der Dispersionskulturen**

Die bei 4°C im Kühlschrank gelagerten Kulturen wurden zuerst mit PBS zweimal für 5 min gespült und anschließend bei Raumtemperatur mit 3%igem bovine serum albumin (BSA) blockiert, um unspezifische Immunreaktionen zu unterbinden. Hierzu wurde jeweils 500 ml für 30 min in jede Kavität gegeben. Nach Ablauf der halben Stunde wurden die beschichteten Glasplättchen mit Hilfe einer Nadel und einer Pinzette aus den Kavitäten entnommen und auf einen zuvor beschrifteten Objektträger gegeben. Die Objektträger mit den Glasplättchen wurden in einer feuchten Kammer positioniert.

Als Primärantikörper wurden bei den Experimenten Synaptopodin [monoklonal] unverdünnt und MAP2 [polyklonal] im Verhältnis 1:500 eingesetzt. Wir benutzten das Microtubuli-associated protein 2 (MAP2), um ausschließlich neuronale Zellen anzufärben. Hierbei wurde der MAP2-Antikörper zum Synaptopodin-Antikörper hinzugegeben. Danach wurde auf jedes Glasplättchen 50 µl des gelösten Primärantikörpers gegeben. Es folgte eine mindestens 12-stündige Inkubation bei 4°C im Kühlschrank.

Mittels einer Pinzette konnten die Plättchen nach Ablauf dieser Zeitspanne wieder in eine 24er Zellkulturplatte umgesetzt werden. Die Glasplättchen wurden dort wiederum dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und somit vom Primärantikörper restlos entfernt. Nach dem Spülen wurde der immunfluoreszierende Sekundärantikörper unter Abdunkelung des Raumes hinzugegeben. Hierbei handelte es sich um einen Cy3-markierten Antikörper [monoklonal] im Verhältnis 1:700, sowie um Alexa Fluor 488 [polyklonal] im Verhältnis 1:500. Die beiden Sekundärantikörper wurden in PBS verdünnt und somit konnten jeweils 300 µl in eine Kavität gegeben werden. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur unter Abdunkelung des Raumes.

Danach wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Zellen wiederum dreimal 5 min lang mit PBS gespült.

Hiernach folgte die Kernfärbung, bei der DAPI mit einer Konzentration von 1:100.000, gelöst in PBS, verwendet wurde. In jede Kavität wurden 300 µl für 3 min unter abgedunkelten Lichtverhältnissen gegeben. Nach einem letzten Spülvorgang (dreimal für 5 min mit PBS) wurden die Plättchen aus den Kavitäten entnommen und auf einen Objektträger gelegt. Sie wurden mit einigen Tropfen DAKO, einem fluoreszenzfreiem Eindeckmedium, versehen und mit einem Deckglas eingedeckt. Die bestückten Objektträger wurden in einer Mappe zum Trocknen gelagert. Die Lagerung fand bei 4°C im Kühlschrank statt. Bis zur Bildanalyse konnten die Objektträger etwa drei Monate im Kühlschrank gelagert werden.

#### **4.2.7 Mikroskopische Messung und Bildanalyse**

Zur Intensitätsmessung der Immuncytochemie fotografierten wir die Kultur mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskops (LSM, Meta 5, Carl Zeiss, Inc.) mit einem 63x/1.4NA Objektiv (Öl Immersion). Die Objektträger wurden jeweils verblindet fotografiert, um subjektive Beeinflussungen ausschließen zu können. Durch die Kontrollgruppen konnte die optimale Einstellung zur Bilderfassung für das Scannen der Zellen ermittelt werden. Diese Einstellungen wurden im weiteren Verlauf für alle anderen behandelten Gruppen beibehalten. So konnte auch hier sichergestellt werden, dass die mit Fluorochrom markierten Antikörper immer bei gleicher Intensität und Wellenlänge des Lasers gemessen wurden. Pro Untersuchungsgruppe wurden 50 Zellen gescannt (n=50).

Die so gewonnen Daten wurden mit dem Improvisation Programm Openlab 3.1.5 semiquantitativ ausgewertet. Hierbei wurde die Anzahl der Pixel der Fläche eines Signals mit der jeweiligen Intensität, gemessen auf einer Grauskala, verrechnet, wodurch sich der „relative staining index“ ergab. Bei der Auswertung wurde eine konstant große Fläche gewählt und diese willkürlich fünfmal pro Zelle platziert. So konnten Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Zellgrößen vermieden und Inhomogenitäten der Zellfärbung berücksichtigt werden.

Mit Hilfe von Excel 2003 konnten wir den Mittelwert der errechneten Staining indizes pro fotografiertes Zelle berechnen.

Für die statistische Auswertung bedienten wir uns dem Programm SPSS einfaktoriell nach ANOVA. Hiermit konnte für die Versuchsreihen der jeweilige Mittelwert, die Standardabweichung und das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) nach Dunnett (zweiseitig) im

Vergleich zur Kontrolle berechnet werden. Diese Daten wurden als Mittelwerte mit SEM mit Excel (2003) und Power Point (2003) graphisch dargestellt.

## 5. Ergebnisse

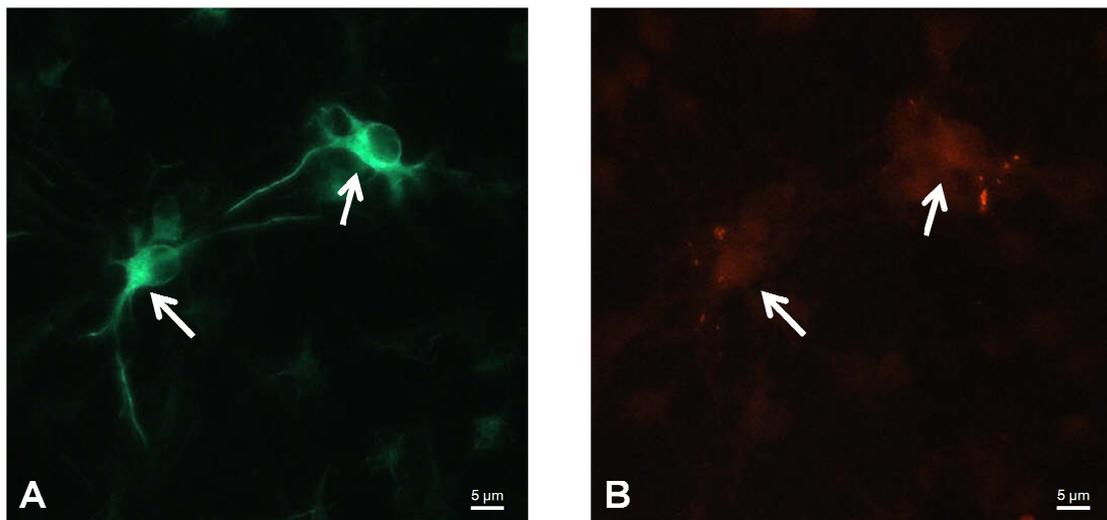
### 5.1 Auswertung der Immunzytochemie

An per Zufall ausgewählten MAP2 positiven Neuronen wurde in allen Auswertungen der „relative staining index“ als Maß für die Expression von Synaptopodin bestimmt.

Die „staining indices“ aller gemessenen Zellen wurde durch die Anzahl aller gemessenen Neurone dividiert. Der sich dadurch ergebende Mittelwert wird in Prozent in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

### 5.2 Der Synaptopodin- Antikörpers

Der von uns verwendete monoklonale Synaptopodinantikörper zeigt die Lokalisation des Proteins Synaptopodin im Zellkörper und in den Dendriten von hippocampalen Neuronen. Durch MAP2 wurden ausschließlich neuronale Zellen angefärbt (s. Abb. 4, Bild A). In Abb. 4, Bild B sind dichte rote Punkte in den Dendriten zu sehen. Hierbei handelt es sich um Spineapparate in den MAP2-positiven Neuronen.



**Abb. 4:** MAP2- (A) und Synaptopodin-Signale (B) zweier Pyramidalneurone (weiße Pfeile) einer unbehandelten Dispersionskultur.

### 5.3 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern reguliert die Synaptopodinexpression

Nach derzeitigem Wissensstand wird vermutet, dass der Spineapparat in hippocampalen Spines als Calciumspeicher fungiert, aus dem Calcium durch spezifische Stimulantien freigesetzt werden kann (Korkotian und Segal, 2006 Vlachos *et al.*, 2009). Die Aromatase wird durch frei werdendes Calcium phosphoryliert und im Gegensatz zu

anderen Enzymen dadurch in ihrer Aktivität gehemmt (Balthazart *et al.*, 2003). Dies hat wiederum einen bedeutenden Einfluß auf die Expression von Synaptopodin, wie wir in unseren Experimenten feststellen konnten.

### **5.3.1 Blockade der IP3 Rezeptoren durch U73122**

Bei U73122 handelt es sich um einen Calciumblocker, dessen Wirkmechanismus über die Blockade Phospholipase C abhängiger Prozesse sekundär zu einer Inhibition der IP3 Rezeptoren führt. Werden diese Rezeptoren inhibiert, so kann kein Calcium mehr aus dem Speicher in die Zelle freigesetzt werden. Das Calcium bleibt somit im Spineapparat.

In unseren Experimenten führten wir sowohl Kurzzeitstimulationen als auch Langzeitstimulationen durch. Bei der Kurzzeitstimulation werden die Zellen für 1 h mit anschließender Fixierung, jedoch erst zehn Tagen nach der Präparation, behandelt. Bei der Langzeitstimulation werden die Zellen alle 48 h stimuliert und nach sechs Tagen fixiert.

Mit U73122 wurden sowohl Kurz- als auch Langzeitstimulationen, mit jeweils einer Konzentration von  $10^{-7}$  M, durchgeführt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konnte nach Behandlung bei beiden Stimulationsschemata eine stark signifikante Heraufregulation der Synaptopodinexpression im Soma der Zellkörper nachgewiesen werden (s. Abb. 5).

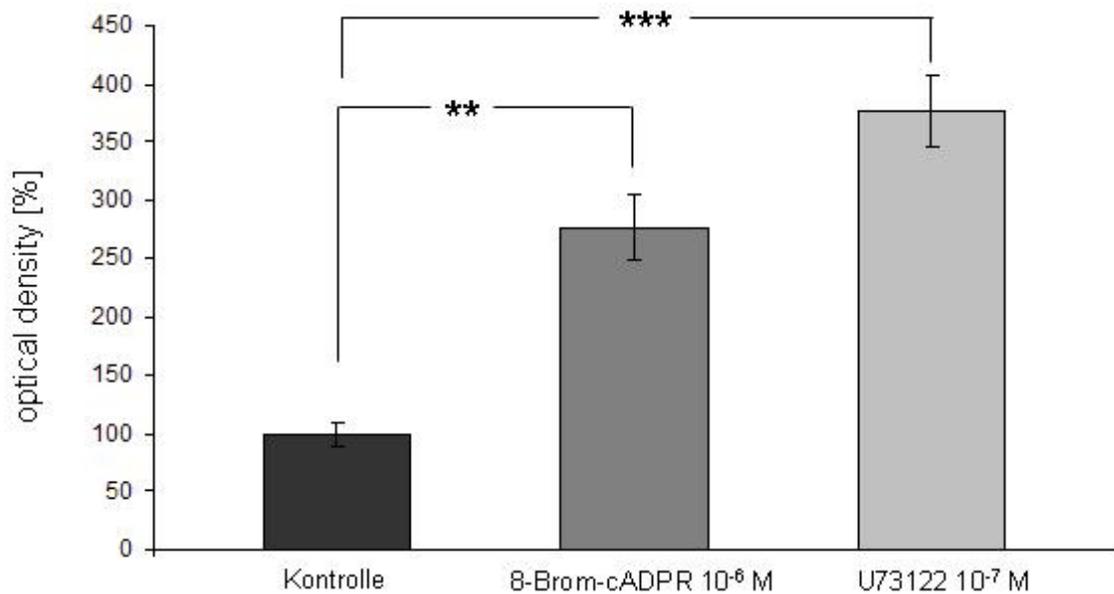
### **5.3.2 Blockade der Ryanodinrezeptoren durch 8-Brom-cADP Ribose**

8-Brom-cADP Ribose ist ein Inhibitor, der an den Ryanodinrezeptor am intrazellulären Calciumspeicher bindet und diesen verschließt, so dass kein Calcium aus dem Speicher in das Zytosol austreten kann. 8-Brom-cADP Ribose wendeten wir in den Konzentrationen  $10^{-6}$  M und  $10^{-7}$  M an. Eindeutigere Ergebnisse ließen sich allerdings in der Konzentration  $10^{-6}$  M feststellen, welche wir somit im weiteren Verlauf verwendeten (Guse *et al.*, 2005).

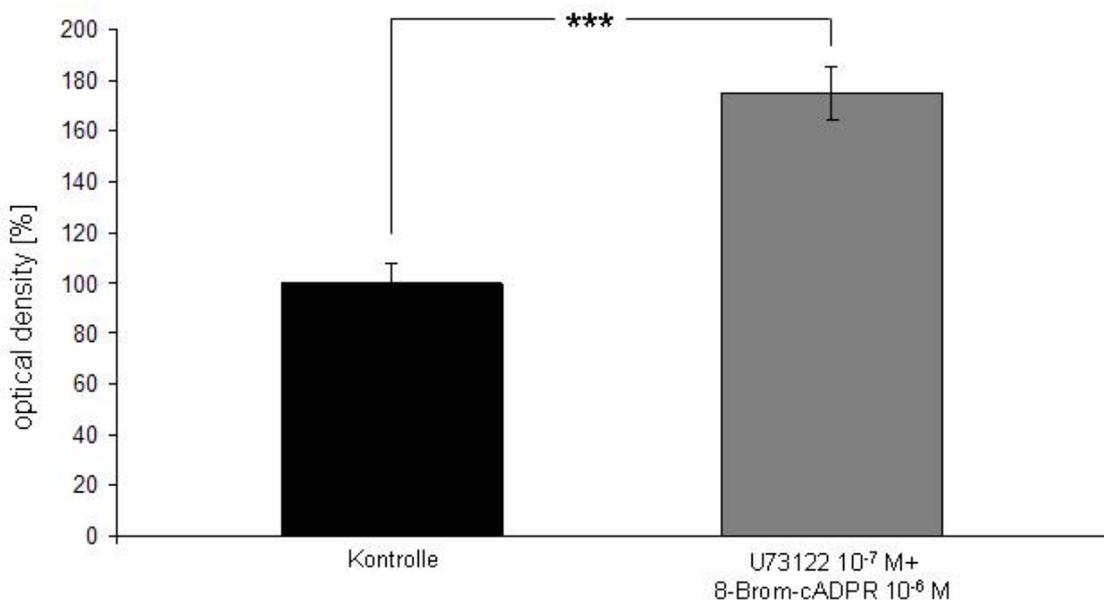
Auch hierbei wurden Kurz- und Langzeitstimulationen durchgeführt. Wir konnten zeigen, dass es nach Behandlung mit dem Inhibitor der Ryanodinrezeptoren zu einer signifikanten Heraufregulation der Synaptopodinexpression gekommen war. Jedoch war diese Heraufregulation nicht so stark wie bei der Behandlung mit U73122 (s. Abb. 5).

Auch bei der Behandlung der hippocampalen Dispersionskulturen mit beiden Calciumkanalblockern zusammen konnte ein signifikantes Ergebnis, wie bei der

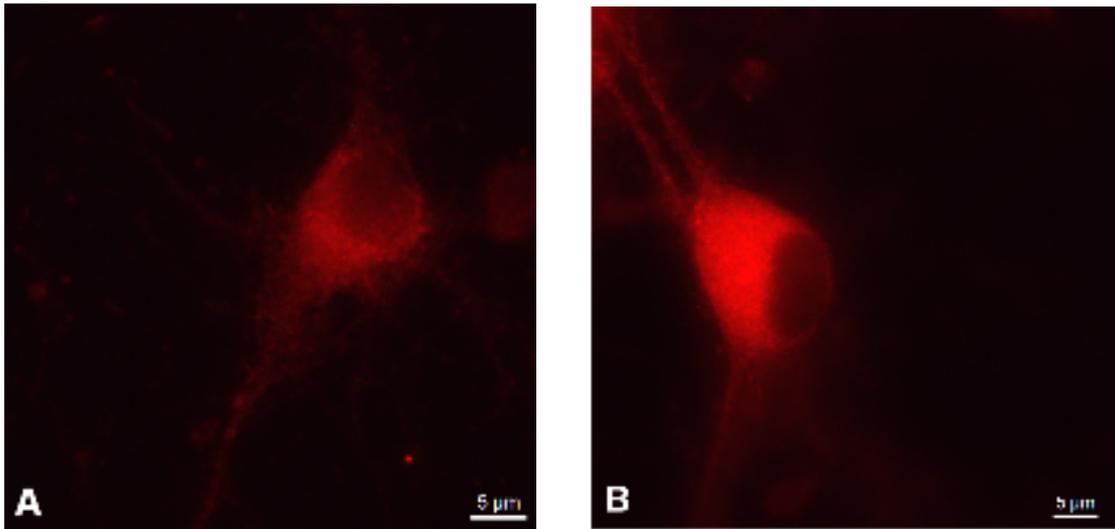
Stimulation mit den Calciumkanalinhhibitoren alleine, gezeigt werden (s. Abb. 6 und Abb. 7).



**Abb. 5:** Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit U73122 10<sup>-7</sup> M und 8-Brom-cADPR 10<sup>-6</sup> M. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001).



**Abb. 6:** Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit einer Kombination von U73122 10<sup>-7</sup> M und 8-Brom-cADPR 10<sup>-6</sup> M. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001).



**Abb. 7:** Synaptopodin-Signale hippocampaler Zellen der Dispersionskultur unter der Kombination von U73122  $10^{-7}$  M und 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M (B). Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (A).

### **5.3.3 Auswirkungen auf die Synaptopodinexpression nach Abpufferung des extrazellulären Calciums**

Durch diese ersten Experimente liess sich eindeutig feststellen, dass die Synaptopodinexpression nach der Inhibition der Calciumkanäle hochreguliert wird.

Dies untermauert eine Verbindung zwischen den Calciumtransienten in den Spines und der Existenz eines Spineapparates.

Als weitere Kontrolle und um einen möglichen Calciumeinstrom aus dem Medium auszuschließen, bestimmten wir in einem weiteren Schritt die Synaptopodinexpression nach Abpufferung des extrazellulären Calciums durch EDTA. Mit Hilfe des frei im Internet verfügbaren Softwareprogrammes Webmaxc Standard bestimmten wir die benötigte Konzentration von EDTA in Bezug auf das Kulturmedium, so dass weder Calcium noch Magnesium, die beide zweibindig sind, darin vorhanden waren. Diese Experimente wurden als Kurzzeitstimulationen durchgeführt, da die Zellen eine Langzeitstimulation aufgrund des fehlenden Calciums nicht überlebt hätten.

### **5.3.4 Die Inhibition der IP3 Rezeptoren nach Abpufferung des extrazellulären Calciums**

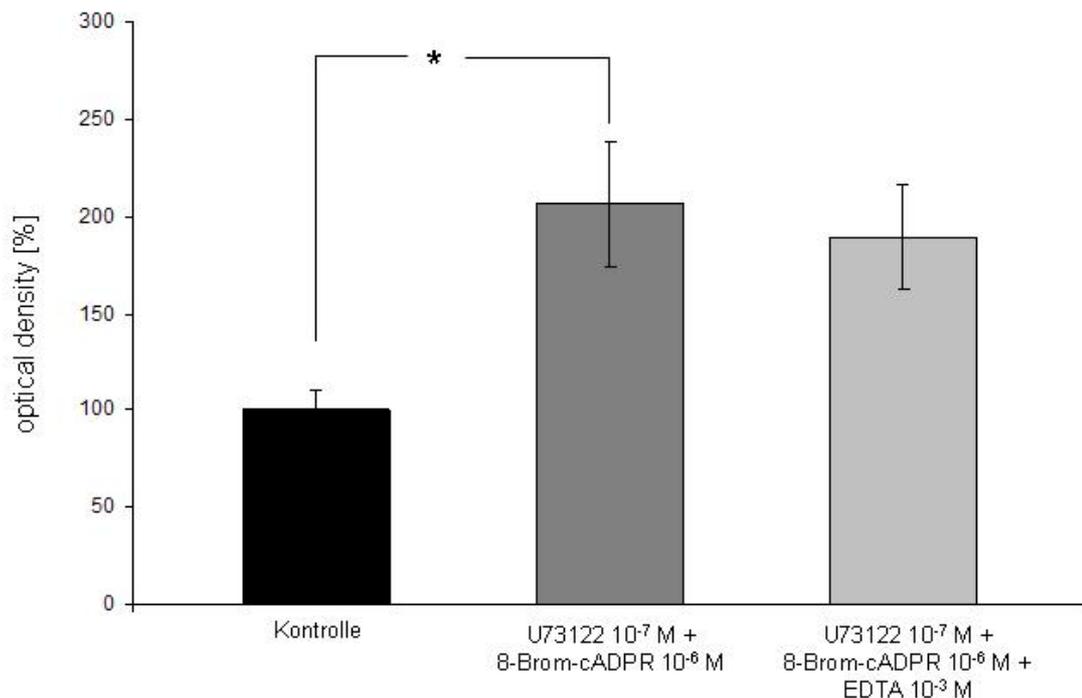
Das extrazelluläre Calcium wurde mit Hilfe von EDTA in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M abgepuffert. Dann fügten wir zu diesen schon vorbehandelten Zellen den Calciumkanalinhibitor U73122 in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M hinzu. Die Inkubationszeit betrug 15 min.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konnte auch hier ein Anstieg von Synaptopodin nachgewiesen werden.

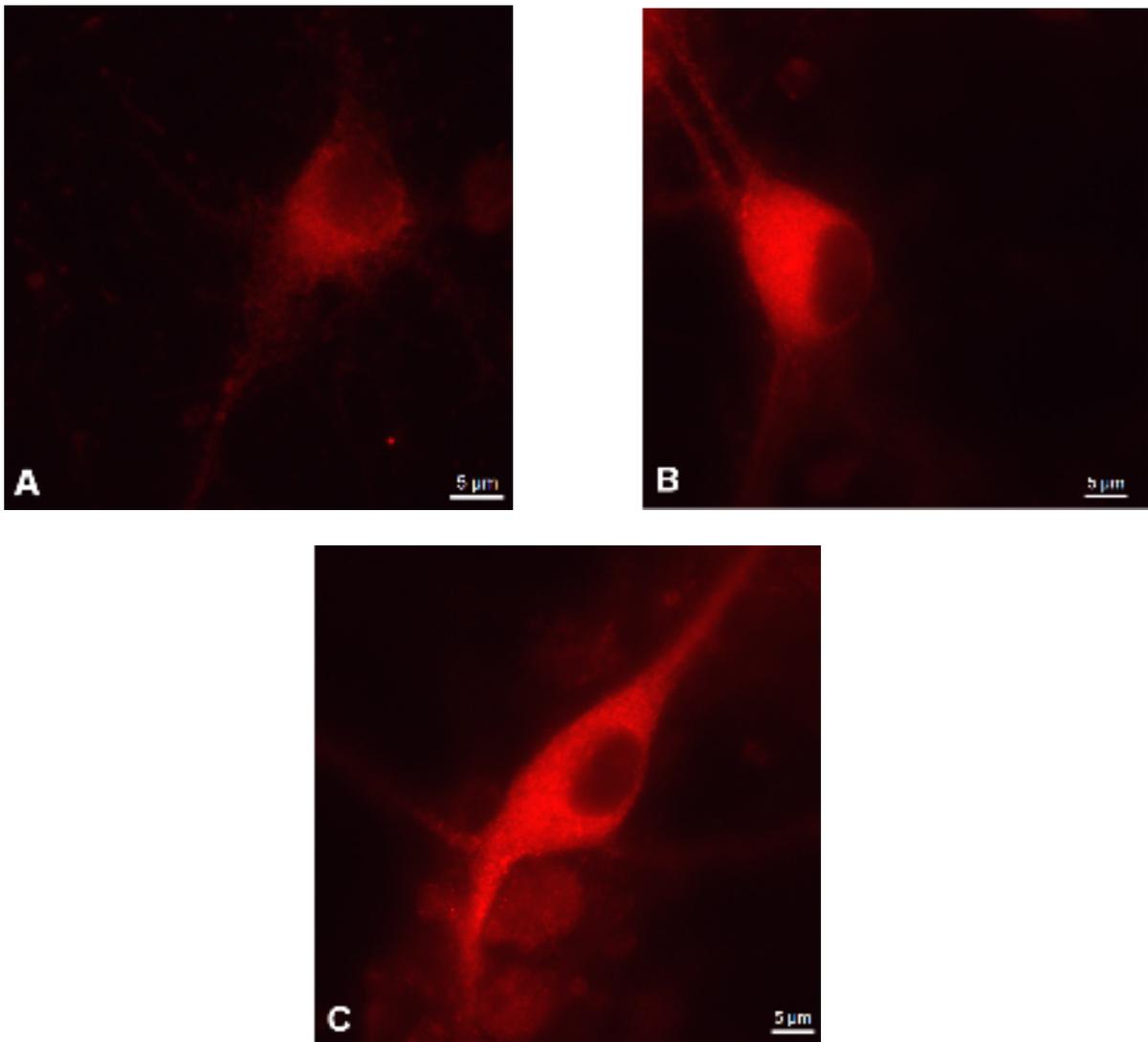
### 5.3.5 Die Inhibition der Ryanodinrezeptoren nach Abpufferung des extrazellulären Calciums

Im Folgenden pufferten wir wiederum das extrazelluläre Calcium mit EDTA in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M ab, um dann den Calciumkanalinhibitor 8-Brom-cADP Ribose mit einer Konzentration von  $10^{-7}$  M hinzuzufügen. Auch hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Synaptopodinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Allerdings wieder nicht so stark wie bei der Versuchsdurchführung mit U73122.

Abschließend testeten wir bei zuvor abgepuffertem extrazellulärem Calcium des Mediums durch EDTA ( $10^{-3}$  M) die Kombination beider Calciumkanalinhibitoren. Auch hier konnte eine schwach signifikante Heraufregulation der Synaptopodinexpression gezeigt werden ( $p$ -Wert  $\leq 0.05$ ) (s. Abb. 8 und Abb. 9).



**Abb. 8:** Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit U73122  $10^{-7}$  M und 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M nach Abpufferung des extrazellulären Calciums mit EDTA  $10^{-3}$  M. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin ( $*p \leq 0,05$ ).



**Abb. 9:** Synaptopodin-Signale hippocampaler Zellen der Dispersionskultur unter der Kombination von U73122  $10^{-7}$  M und 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M (B) und unter der Kombination von U73122  $10^{-7}$  M und 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M mit EDTA  $10^{-3}$  M (C). Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (A).

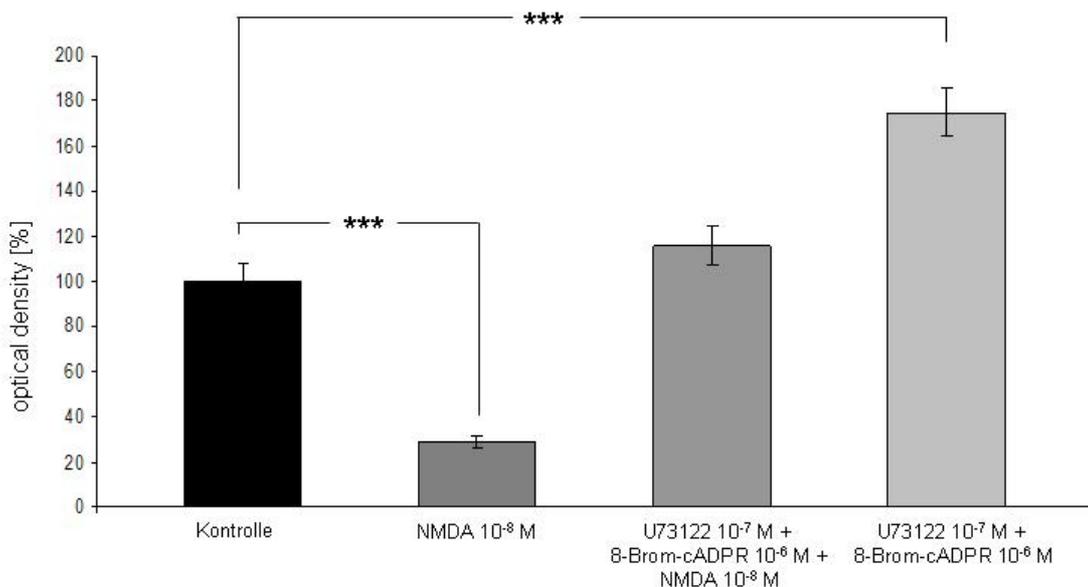
### 5.3.6 Synaptopodinexpression nach glutamaterger Stimulation

Um einen Calciumausstrom aus den intrazellulären Speichern zu provozieren, stimulierten wir unsere Zellen mit dem glutamatergen Agonisten NMDA. Vorherige Studien haben bereits zeigen können, dass neuronale glutamaterge Stimulation zu einem Calciumeinstrom führt, welcher eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nach sich zieht. Hierauf begründet sich das Modell der Calcium induzierten Calciumfreisetzung, des „calcium induced calcium release“ (CICR), in Nervenzellen (Emptage *et al.*, 1999).

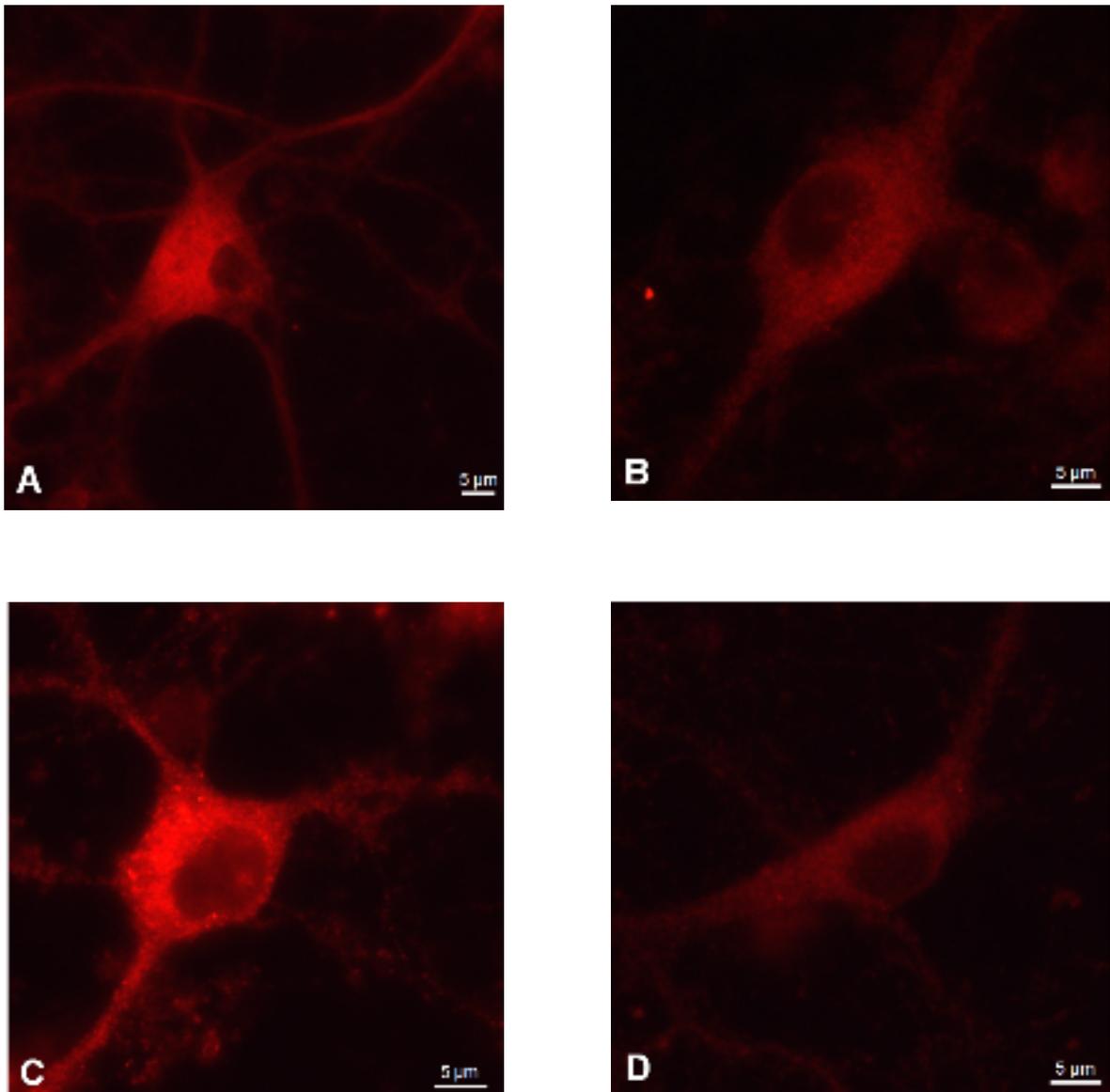
Wir konnten zeigen, dass es bei einer Kurzzeitstimulation zu einer stark signifikanten Herunterregulation von Synaptopodin kommt, wenn die Neurone alleine mit NMDA in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M behandelt werden (s. Abb. 10).

### 5.3.7 Blockade der Calciumkanäle bei gleichzeitiger glutamaterger Stimulation

Bei dieser Langzeitstimulation wurden die hippocampalen Dispersionskulturen zuerst mit NMDA in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M inkubiert und sofort darauf mit der Kombination der beiden Calciumkanalblocker, U73122 ( $10^{-7}$  M) und 8-Brom-cADP Ribose ( $10^{-6}$  M), versehen. Hier konnte festgestellt werden, dass das Niveau der Synaptopodinexpression wieder auf Höhe der unbehandelten Kontrollgruppe zu liegen kommt (s. Abb. 10 und Abb. 11). Man spricht hierbei von einem sogenannten Rescue-Effekt, der deutlich macht, dass die durch NMDA ausgelöste Calcium induzierte Calciumfreisetzung die Herunterregulation der Synaptopodinexpression bewirkt. Bei gleichzeitiger Blockade der Calciumkanäle am Spineapparat bleibt die Herunterregulation des Synaptopodins jedoch aus.



**Abb. 10:** Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit U73122  $10^{-7}$  M und 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M bei gleichzeitiger glutamaterger Stimulation durch NMDA  $10^{-8}$  M. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .



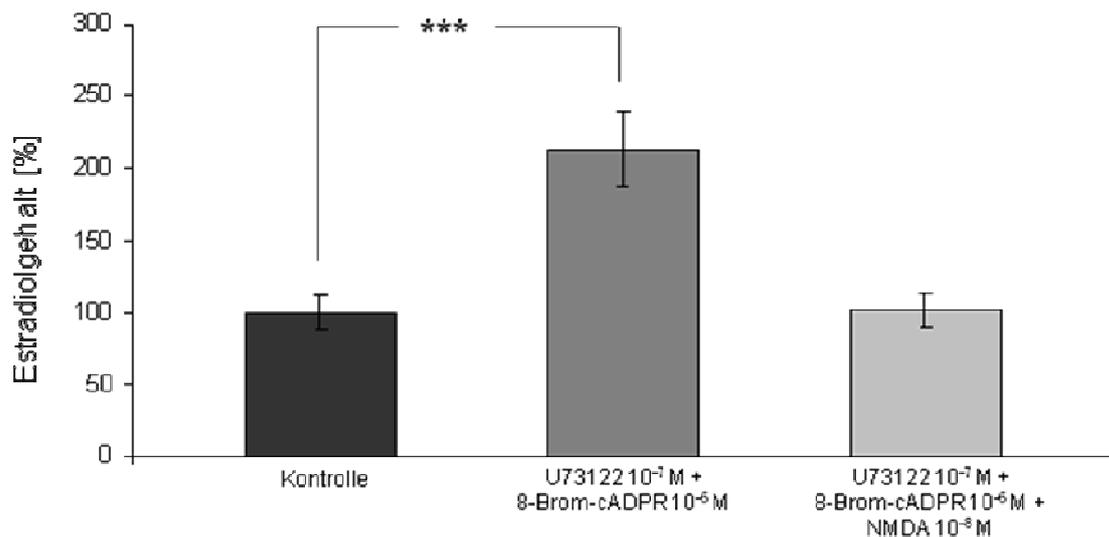
**Abb. 11:** Synaptopodin-Signale hippocampaler Zellen der Dispersionskultur unter neuronaler Stimulation mit NMDA  $10^{-8}$  M (B), unter der Kombination von U73122  $10^{-7}$  M und 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M (C) und unter der Kombination von U73122  $10^{-7}$  M und 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M mit NMDA  $10^{-8}$  M (C). Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (A).

### 5.3.8 Quantitative Estrogenbestimmung im Medium

Zur quantitativen Estrogenbestimmung im Medium wurde ein Radioimmunoassay verwendet.

Bei jedem Wechsel des Kulturmediums, der mit den Calciumkanalinhibitoren U73122 ( $10^{-7}$  M) und 8-Brom-cADP Ribose ( $10^{-6}$  M) und mit dem glutamatergen Agonisten NMDA ( $10^{-8}$  M) behandelten Dispersionkulturen, wurde mindestens 8 ml davon gesammelt. Die Proben wurden fortlaufend nummeriert und verblindet. Der RIA wurde unter Verwendung des Standardprotokolls durchgeführt und mit einem Gamma Counter analysiert.

Konsistent zu unseren vorherigen Experimenten zeigte sich ein signifikant erhöhter Estrogengehalt im Kulturmedium der Zellen, die mit den Calciumkanalinhibitoren stimuliert worden waren. Die gleichzeitige Applikation der Calciumkanalinhibitoren in Kombination mit dem glutamatergen Agonisten zeigte einen Estrogengehalt auf Kontrollniveau (s. Abb. 12).



**Abb. 12:** Estrogenbestimmung im Kulturmedium hippocampaler Dispersionskulturen nach Behandlung mit U73122  $10^{-7}$  M, 8-Brom-cADPR  $10^{-6}$  M und NMDA  $10^{-8}$  M, mittels RIA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

## 5.4 Der Einfluss von Estrogenrezeptorantagonisten auf die Expression von Synaptopodin

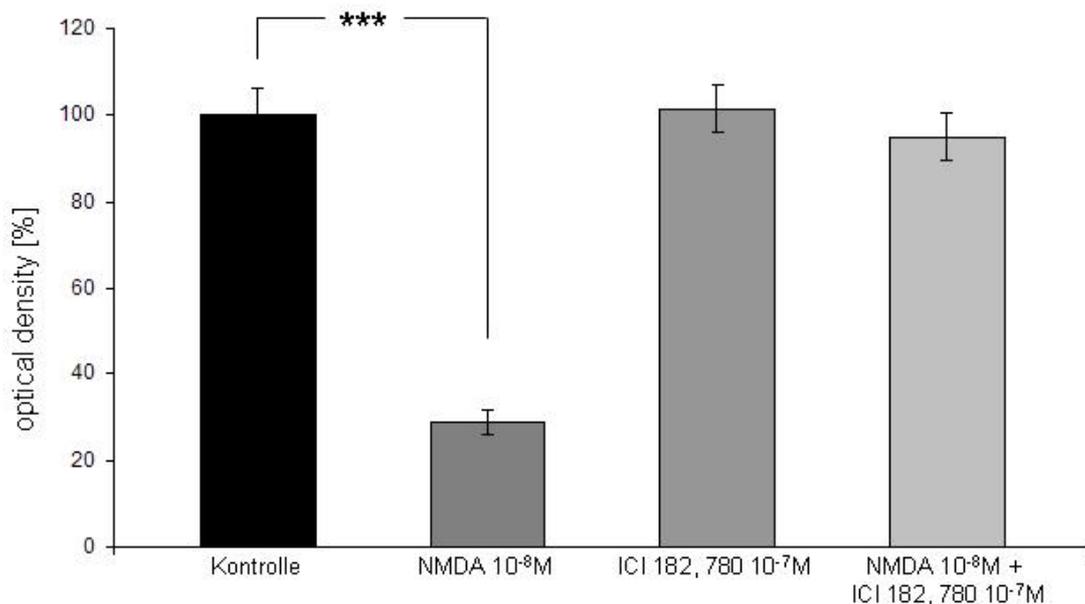
ICI 182,780 ist ein Inhibitor des genomischen Estrogenrezeptors. Bei alleiniger Gabe von ICI 182,780 in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M blieb die Synaptopodinexpression auf Kontrollniveau (s. Abb. 13).

### 5.4.1 Synaptopodinexpression unter Estrogenrezeptorantagonisten und glutamaterger Stimulation

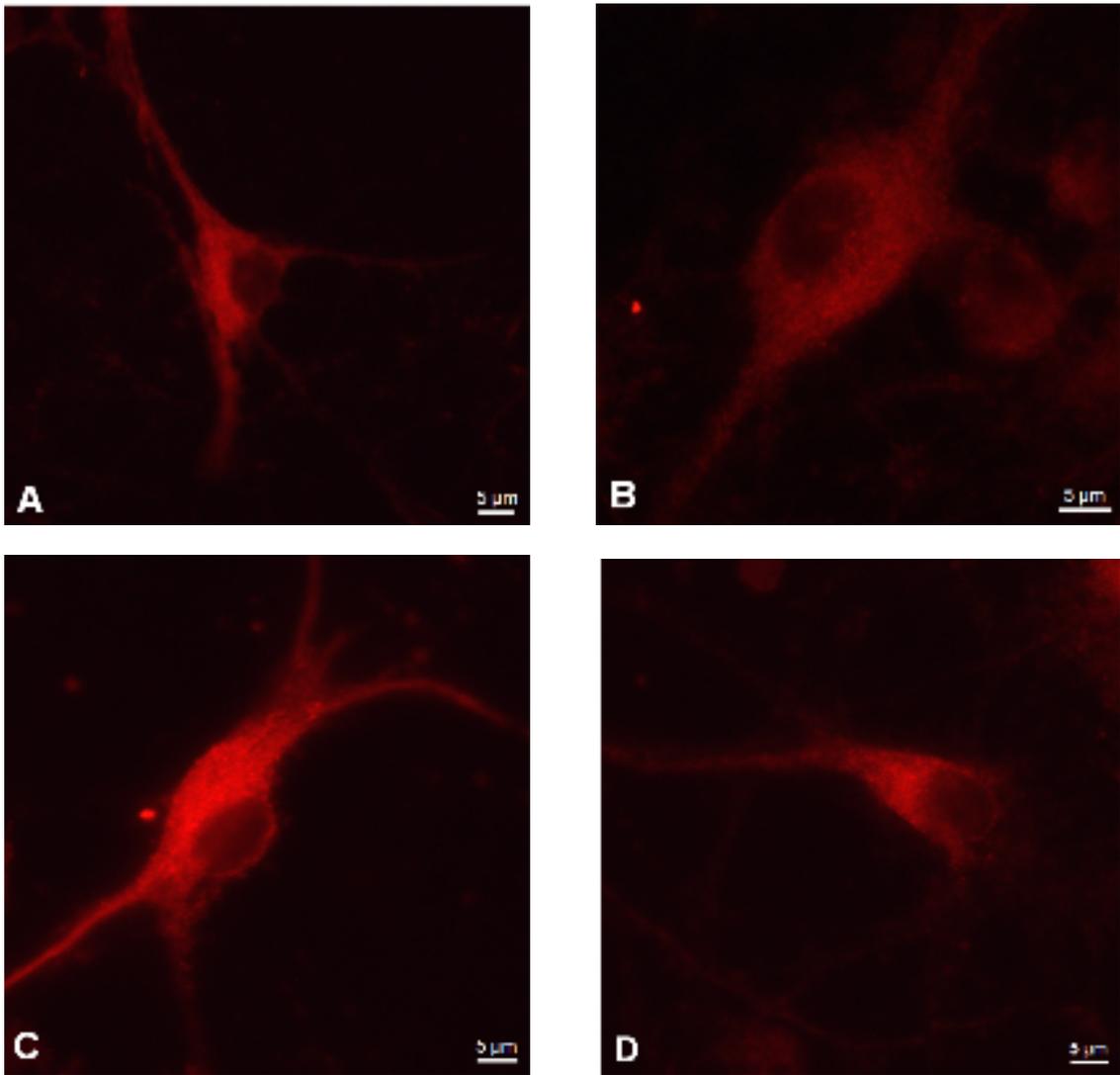
Bei dieser Kurzzeitstimulation wurden die Zellen wiederum mit ICI 182,780 mit einer Konzentration von  $10^{-7}$  M für 24 h inkubiert und im Anschluss daran für weitere 30 min mit NMDA mit einer Konzentration von  $10^{-8}$  M versehen.

Wie bereits oben erwähnt, führt NMDA zu einer Calcium induzierten Calciumfreisetzung. Diese Calciumfreisetzung führt wahrscheinlich über eine Inhibition der Aromatase zu einer Absenkung des Estradiolspiegels.

In diesem Versuch konnten wir zeigen, dass die Blockade des Estrogenrezeptors bei gleichzeitiger Induktion einer Calciumfreisetzung dazu führt, dass sich die Synaptopodinexpression nicht verändert, sondern auf Kontrollniveau bleibt.



**Abb. 13:** Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit ICI 182,780  $10^{-7}$  M, einem Estrogenrezeptorantagonisten und NMDA  $10^{-8}$  M. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .



**Abb. 14:** Synaptopodin-Signale hippocampaler Zellen der Dispersionskultur unter NMDA  $10^{-8}$  M (B), unter ICI 182,780  $10^{-7}$  M (C) und in Kombination von NMDA  $10^{-8}$  M und ICI 182,780  $10^{-7}$  M (D). Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (A).

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass die Calciumtransienten und die Synaptopodinexpression in einem engen Zusammenhang stehen. Als Bindeglied fungiert die Aromatase, die als das wichtigste Enzym der Steroidbiosynthese Testosteron in Estradiol umwandelt. Estradiol bestimmt entscheidend die Expression des Aktin assoziierten Proteins Synaptopodins.

### 6.1 Estradiol in der Nervenzelle

Wie mehrfach in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, sind hippocampale Neurone in der Lage, Estradiol *de novo* zu synthetisieren (Prange-Kiel *et al.*, 2003; Fester *et al.*, 2006). Aber wofür brauchen die Nervenzellen Estradiol?

Es konnte beobachtet werden, dass Estradiol die Ausbildung und Entwicklung von Spines reguliert (Bruce *et al.*, 1999; McEwen, 2002; Rune und Frotscher, 2005; Rune *et al.*, 2006). Weitere Untersuchungen wurden mit Letrozol, einem potenten Inhibitor der Aromatase, durchgeführt. Wird die Aromatase inhibiert, kommt es zur Abnahme der Spineanzahl und der Spineapparate (Kretz *et al.*, 2004; Disteldorf, Med. Dissertation, 2009). Glassmeier *et al.* (2009 in Revision) zeigen in neusten Studien, dass unter Aromataseinhibitoren keine LTP in hippocampalen Sliceulturen induziert werden kann (Glassmeier *et al.*, 2009). Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass Estradiol eine bedeutende Rolle für die synaptische Plastizität darstellt. Dieses im Hippocampus synthetisierte Estradiol reguliert auch durch einen auto- und paracrinen Mechanismus die Ausbildung von Estrogenrezeptoren (Prange-Kiel *et al.*, 2003, 2006, 2008; Kretz *et al.*, 2004; Rune und Frotscher, 2005; Rune *et al.*, 2006; Fester *et al.*, 2009a).

Es lassen sich mehrere Typen von Spines differenzieren. Die pilzförmigen Spines gelten als die Ausdifferenziertesten. In 80% dieser Art lassen sich Spineapparate finden (Spacek und Harris *et al.*, 1997). Lee *et al.* konnten 2005 zeigen, dass die Gabe von Estradiol bei ovariectomierten Mäusen im Cerebellum ausnahmslos zu einer Zunahme der Anzahl dieser reifen, pilzförmigen Spines führt. Inhibiert man die Aromatase, kommt es jedoch überwiegend zu einem Verlust dieser Spines.

Eine wichtige Funktion des Calciums ist die Fähigkeit, das Enzym Aromatase zu phosphorylieren, was zu seiner Inaktivierung führt (Balthazart *et al.*, 2003). Somit lässt sich hier eine Verbindung ziehen, zwischen dem Spineapparat, der vermutlich die

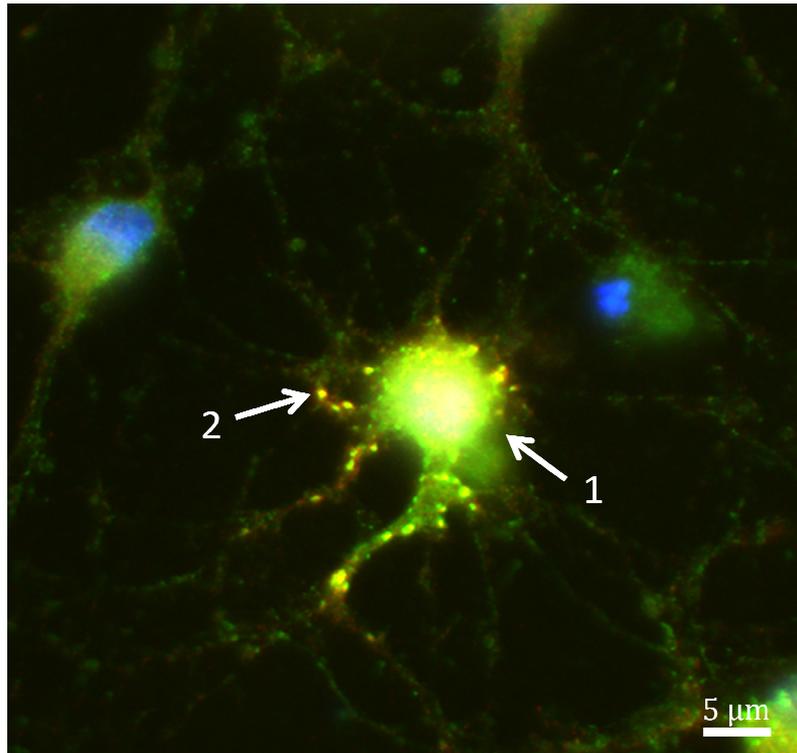
Fähigkeit zur Calciumspeicherung besitzt, und der Aromatase, deren Aktivität über Calcium reguliert wird.

## 6.2 Synaptopodin - Lokalisation und Funktion

Eine weitere wichtige Bedeutung kommt dem Protein Synaptopodin zu, welches in enger Verbindung zu dem Spineapparat steht (Deller *et al.*, 2003). Synaptopodin-Antikörper können benutzt werden, um den Spineapparat zu markieren und ihn im Anschluß mit licht- und elektronenmikroskopischen Verfahren zu untersuchen. Synaptopodin gilt als Parameter des Spineapparates.

Im Hippocampus findet man Synaptopodin vor allem entlang der dendritischen Spines des Cornu ammonis und des Gyrus dentatus. Dort ist es überwiegend im Spinehals lokalisiert und mit dem Spineapparat assoziiert (Mundel *et al.*, 1997; Deller *et al.*, 2000). In geringerem Maße findet sich Synaptopodin auch in den Köpfen der Spines und in dendritischen Schäften, wo es meistens neben Anteilen des glatten endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Mundel *et al.*, 1997; Deller *et al.*, 2000). Desweiteren ist Synaptopodin mit der cisternalen Organelle assoziiert (Bas Orth *et al.*, 2007). Diese liegt im Axon Initial Segment von kortikalen Prinzipalneuronen und weist strukturelle Ähnlichkeiten zum Spineapparat auf (Palay *et al.*, 1968; Benedeczky *et al.*, 1994). Beide Organellen gehören zum erweiterten Netzwerk des endoplasmatischen Retikulums, welches u.a. Calciumsignalwege reguliert (Berridge, 1998).

Synaptopodin mRNA kommt ausschließlich in Soma prinzipaler Neuronen vor, wohingegen das Protein sowohl in dendritischen Schichten als auch in den Zellkörpern dissoziierter Neurone lokalisiert ist. Dies widerspricht zwar der von den meisten Instituten gängigen Auffassung, konnte aber von unserer Arbeitsgruppe eindeutig nachgewiesen werden. Zur Untermauerung dieser These behandelten wir Neurone mit einem polyklonalen Synaptopodin-Antikörper der u.a. von der Arbeitsgruppe Deller benutzt wird und mit einem monoklonalen Synaptopodin-Antikörper, den wir in unserer Arbeitsgruppe verwenden (s. Abb. 15). Hier zeigt sich eindeutig ein Signal des monoklonalen Synaptopodin-Antikörpers in den Dendriten der Neurone.



**Abb. 15:** Behandlung von Neuronen mit Synaptopodin-Antikörper, polyklonal der Arbeitsgruppe Deller (Pfeil 1) und mit Synaptopodin-Antikörper, monoklonal der Arbeitsgruppe Rune (Pfeil 2).

Die Funktion von Synaptopodin bleibt jedoch vorerst noch unklar. Sicher ist, dass die Ausbildung des Spineapparates wesentlich von Synaptopodin abhängt (Deller *et al.*, 2003). Kremerskothen *et al.* konzentrierten sich 2005 überwiegend auf die zellulären Aufgaben von Synaptopodin, so zum Beispiel seine Interaktion mit dem postsynaptischen Zytoskelett. Hier konnten sie zeigen, dass Synaptopodin nicht nur direkt an F-Aktin bindet, sondern auch in Zusammenhang zu  $\alpha$ -Aktinin steht, welches in der Nähe des Spineapparats besonders angereichert ist. Synaptopodin reguliert die Aktivität von  $\alpha$ -Aktinin, das wichtig für die Bündelung und Vernetzung von Aktinfilamenten ist (Kremerskothen *et al.*, 2005; Asanuma *et al.*, 2005; 2006).

Weiterhin konnte Yamazaki *et al.* 2001 zeigen, dass die synaptische Aktivität zu einer erhöhten Synaptopodinsynthese im Hippocampus führt. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Protein große Bedeutung für die synaptische Plastizität hat (Yamazaki *et al.*, 2001; Fukazawa *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Synaptopodin knock-out Maus deutlich verminderte LTP und Lerndefizite aufweist (Deller *et al.*, 2003; Jedlicka *et al.*, 2008).

### 6.3 Die Regulation von Synaptopodin

Wir konnten in Versuchen mit Letrozol, dem Inhibitor der Aromatase, eine verminderte Expression von Synaptopodin zeigen (Arbeitsgruppe Rune *et al.*, unveröffentlichte Daten). Erstaunlicherweise führt die Behandlung mit Estradiol auch zu einer Herunterregulation von Synaptopodin (Fester *et al.*, 2009b; Labitzke, Med. Dissertation, 2009). Durch Estradiol kommt es wahrscheinlich zu einer Calciumfreisetzung aus Ryanodinrezeptoren und IP3 Rezeptoren (Zhao *et al.*, 2005). Wir nehmen an, dass Estradiol hierbei an membranständige Rezeptoren bindet und dadurch die Calciumfreisetzung bewirkt, da unsere Arbeitsgruppe die Ergebnisse auch mit an bovines Serumalbumin gebundenes Estradiol reproduzieren konnte (Arbeitsgruppe Rune *et al.*, unveröffentlichte Daten). Diese Calciumfreisetzung vermindert wahrscheinlich über eine Phosphorylierung der Aromatase deren Aktivität (s.u.). Auch durch die Behandlung mit NMDA konnte eine Calciumfreisetzung aus den Ryanodinrezeptoren und IP 3 Rezeptoren beobachtet werden. Hier zeigt sich auch eine Verminderung der Synaptopodinexpression. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich auch hier um eine Calcium induzierte Calciumfreisetzung (s.u.).

Der Inhibitor des SERCA 4, Thapsigargin, (Yuste *et al.*, 2000) der für eine völlige Entleerung des Calciums aus dem Spineapparat sorgt, führt zu einer Heraufregulation der Expression von Synaptopodin lässt (Voets, Med. Dissertation, 2009), genau wie die Blockade der Calciumkanäle durch U73122 und 8-Brom-cADP-Ribose. Durch Blockierung bzw. durch vollständige Entleerung des Calciums aus seinem Speicher kann es nicht zu einer schnellen Calciumfreisetzung kommen. Die Aromatase bleibt somit aktiv.

Prange-Kiel *et al.* konnten zeigen, dass die Behandlung mit Letrozol zu einer Heraufregulation des ER  $\beta$  und zu einer Herunterregulation des ER  $\alpha$  führt (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Die Behandlung mit Estradiol zeigte interessanterweise gegenteilige Effekte. NMDA führt zur Herunterregulation des ER  $\alpha$  (Prange-Kiel *et al.*, unveröffentlichte Daten). Abschliessende Untersuchungen zum Verhalten von NMDA auf ER  $\beta$  stehen noch aus. Die bisherigen Erkenntnisse geben allerdings zum jetzigen Zeitpunkt Grund zur Vermutung, dass die beiden Estrogenrezeptoren in einem balancierten Verhältnis zueinander stehen und stets entgegengesetzt verlaufen. Vorstellbar ist z.B. die Existenz eines Synthesewegs, der über die Heraufregulation des ER  $\beta$ , die Expression von Synaptopodin herunterreguliert.

Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe wurden mit dem spezifischen ER  $\alpha$  Agonisten PPT und dem ER  $\beta$  Agonisten DPN durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass PPT keinen Einfluss auf die Synaptopodinsynthese hat, DPN hingegen Synaptopodin herunterreguliert (Hinz, Med. Dissertation, 2009). Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese einer Regulation von Synaptopodin durch den ER  $\beta$ .

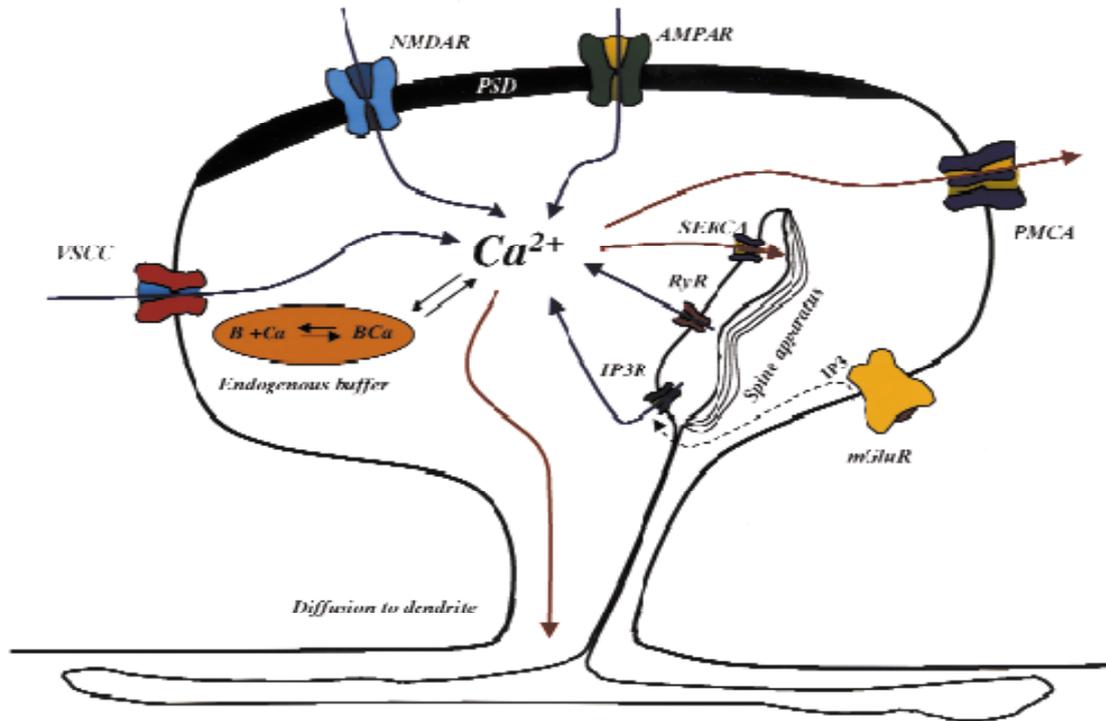
Wie oben bereits erwähnt, kommt es durch den Aromataseinhibitor Letrozol zur Inaktivierung dieses Enzyms und zum Anstieg des ER  $\beta$ . Durch die Calciumfreisetzung wird die Aromatase inhibiert (Balthazart *et al.*, 2006) und denkbar ist auch, dass parallel der ER  $\beta$  aktiv wird. Diese Überlegungen führten uns zur Frage, ob die experimentell induzierte Calciumfreisetzung durch glutamaterge Agonisten in Anwesenheit von einem Estrogenrezeptorantagonisten zunichte gemacht werden kann. Hierfür verwendeten wir ICI 182,780. Es handelt sich um einen Antagonist an zytosolischen und membranständigen Estrogenrezeptoren, (Fitzpatrick *et al.*, 2002) der eine 100fach höhere Affinität zum zytosolischen Estrogenrezeptor als Estradiol hat (Howell *et al.*, 2002). Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass die alleinige Behandlung mit ICI 182,780 dazu führt, dass die Expression von Synaptopodin auf Kontrollniveau bleibt. Weiterführend konnten wir zeigen, dass Zellen, die mit ICI 182,780 inkubiert waren und danach mit NMDA stimuliert wurden, nicht die typische Herunterregulation nach NMDA Inkubation zeigten, sondern auch auf Kontrollniveau blieben. Diese Ergebnisse bestätigen unsere Vermutung, dass die Synaptopodinexpression über Estrogenrezeptoren reguliert sein könnte. Weitergehende Untersuchungen in diese Richtung werden zur Zeit in der Arbeitsgruppe Rune durchgeführt.

Diese Ergebnisse ergeben ein komplexes Bild, wie sich u.a. die Calciumtransienten auf die Synaptopodinexpression auswirken. Aufgrunddessen soll im Folgenden noch einmal gesondert auf die Rolle des Calciums eingegangen werden.

#### **6.4 Die Funktion von Calcium**

Die besondere Bedeutung von Calcium und seine Funktion innerhalb der Zelle und mit ihrer Umgebung stehen im Vordergrund dieser Arbeit. Die Calciumsignalwege in dendritischen Spines stehen in spezifischen Interaktionen miteinander und mit anderen Signalkaskaden. Yuste *et al.* wiesen 2000 auf die Kompartimentierung von  $\text{Ca}^{2+}$  innerhalb des Spines hin. In ihrem Review unterstreichen sie die enge Verbindung zwischen Calcium und der Morphologie und Funktion des Spines. Schon in einigen vorherigen Studien wurde vermutet, dass der Spineapparat die Funktion eines

Calciumspeichers hat (Fifková *et al.*, 1983; Broadwell und Cataldo 1984; Villa und Meldolesi 1994; Spacek und Harris 1997). Aktuellen Untersuchungen zufolge ist der Spineapparat insbesondere für zwei wichtige Prozesse, im Hinblick auf die synaptische Plastizität von Bedeutung: Zum einen für die bereits zuvor erwähnte lokale Calciumregulation (Fifková *et al.*, 1983; Korkotian und Segal, 1998), und zum anderen für die lokale Proteinsynthese und die posttranslationale Modifikation von Proteinen (Pierce *et al.*, 2000, 2001; Steward und Schuman, 2001; Sytnyk *et al.*, 2004).



**Abb. 16:** Calciumkompartimentierung innerhalb eines Spines (Quelle: Yuste *et al.*, 2000).

Wie man aus der Abbildung 16 erkennen kann, gibt es zwei wichtige Rezeptoren, die in der Wand des Spineapparates lokalisiert sind. Der Ryanodinrezeptor (RYR) und der Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor (IP3R) kontrollieren die Calciumfreisetzung. Daneben sieht man die Calcium ATPase des glatten endoplasmatischen Retikulums (SERCA), die dafür zuständig ist, dass das freie Calcium innerhalb des Spines in den Speicher zurückgeführt wird.

#### **6.4.1 Inhibition der Calciumfreisetzung führt zur gesteigerten Synaptopodinexpression**

Um die Rolle des Spineapparates als Calciumspeicher weiter zu verdeutlichen, wurden die intrazellulären Calciumspeicher mit Hilfe von U73122 und 8-Brom-cADP Ribose blockiert (Guse *et al.*, 2005). Wir konnten zeigen, dass durch die Inhibition der IP<sub>3</sub>- und Ryanodinrezeptoren sowohl in Kurz- als auch in Langzeitstimulation eine Hochregulation von Synaptopodin erfolgt. Da es durch Inhibition der Calciumkanäle nicht zu einer Calciumfreisetzung aus dem Spineapparat kommen kann, wird die Aromatase nicht inaktiviert. Elektronenmikroskopisch konnte auch eine Vergrößerung der Spineapparate in den dendritischen Spines gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden durch die Bestimmung des Estrogengehaltes im Medium bestätigt. Mit Hilfe des RIA wurde unter Verwendung des Standardprotokolls und Analyse mit dem Gamma Counter, eine quantitative Bestimmung des Estrogengehaltes im Kulturmedium bei hippocampalen Dispersionskulturen unter Behandlung mit U73122 und 8-Brom-cADP Ribose durchgeführt. Es zeigte sich ein erhöhter Estrogengehalt nach Stimulation.

Auffällig ist hierbei, dass die Blockade der Phospholipase C abhängigen Prozesse, d.h. die Inhibition der IP<sub>3</sub> Rezeptoren durch U73122, eine verstärkte Expression von Synaptopodin zeigt (p-Wert  $\leq 0.001$ ), als bei der Inhibition von Ryanodinrezeptoren durch 8-Brom-cADP Ribose (p-Wert  $\leq 0.01$ ). Dies lässt sich möglicherweise durch ein geringeres Vorkommen der Ryanodinrezeptoren im Verhältnis zu den IP<sub>3</sub> Rezeptoren erklären, so dass weiterhin ein genügend großer Calciumausstrom den Spineapparat passieren kann. Bei der gemeinsamen Applikation der beiden intrazellulären Calciumkanalblocker konnte allerdings wiederum ein stark signifikantes Ergebnis erzielt werden (p-Wert  $\leq 0.001$ ).

#### **6.4.2 Extrazelluläres Calcium hat keinen Einfluß auf die Calciumfreisetzung**

Als Kontrolle und um einen potentiellen Calciumeinstrom von extrazellulär aus dem Medium auszuschließen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Hierbei wurde das extrazelluläre Calcium mit Hilfe von EDTA abgepuffert, so dass ein Calciumeinstrom ausgeschlossen werden konnte. In einem weiteren Schritt wurden die Calciumkanäle intrazellulär geblockt. Auch hierbei zeigten unsere Ergebnisse eine Hochregulation der Synaptopodinexpression. Dieses Ergebnis stützt unsere oben beschriebene Vermutung, dass das Calcium, das zur Phosphorylierung der Aromatase führt, aus dem intrazellulären Calciumspeicher, dem Spineapparat, stammt.

### **6.4.3 Verminderte Synaptopodinexpression durch glutamaterge Stimulation der Nervenzellen**

Wie in Abbildung 16 dargestellt, kann es auch von extrazellulär zu einem Calciumeinstrom kommen. So kann Calcium über NMDA-Rezeptoren in die Zelle gelangen. Dieser Calciumeinstrom führt dann im weiteren Verlauf zu einer Calciumfreisetzung über die intrazellulär gelegenen IP3- und Ryanodinrezeptoren. Dieser Mechanismus wird „calcium induced calcium release“ (CICR) genannt (Emptage *et al.*, 1999).

Wir stimulierten unsere Zellen mit dem glutamatergen Agonisten NMDA in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M in Kurz- und Langzeitversuchen. Hierbei konnten wir eine stark signifikante Herunterregulation der Synaptopodinexpression beobachten. Diese Ergebnisse erklären wir uns durch das Modell der Calcium induzierten Calciumfreisetzung (CICR) in Nervenzellen (Emptage *et al.*, 1999). Durch NMDA kommt es zu einem Calciumeinstrom, der dazu führt, dass im Folgenden vermehrt Calcium aus intrazellulären Speichern, wie wahrscheinlich dem Spineapparat, freigesetzt wird. Dies wird als Calciumfreisetzung bezeichnet. Dieses Calcium kann dann in weiteren Signalkaskaden wirken.

Besonderes Interesse unsererseits liegt hierbei auf dem Mechanismus der Aromatasephosphorylierung. Die Phosphorylierung der Aromatase durch das freigesetzte Calcium führt zur Inaktivität des Enzyms. Die Inaktivität der Aromatase hat zur Folge, dass die Konzentration von Estradiol sinkt, dass die Anzahl der Spines mit den Spineapparaten abnimmt und dass die Expression von Synaptopodin, welches eng mit dem Spineapparate assoziiert ist, herunterreguliert wird. Durch die Inaktivierung der Aromatase könnte es auch zur Heraufregulation des ER  $\beta$  kommen, der wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Regulation der Synaptopodinexpression spielt.

Aber sind alle diese Konsequenzen durch die Inhibition der Aromatase wirklich durch glutamaterge Stimulation und das Modell des CICR zu erklären?

Um in dieser Richtung weiter zu arbeiten, inhibierten wir, wie in den vorherigen Experimenten die Ryanodin- und die IP3 Rezeptoren und gaben in einem zweiten Schritt NMDA als glutamatergen Agonisten hinzu. Hierbei ließ sich ein sogenannter Rescue-Effekt zeigen, der im Weiteren erklärt werden soll:

Durch die Bindung von NMDA an seinen Rezeptor führt der Calciumeinstrom zu einer enormen Calciumfreisetzung. Durch Blockierung der Calciumkanäle wird genau diese

Aktion unterdrückt. Das heißt, durch die Blockade kann es nicht zur starken Calciumfreisetzung und damit zur Inaktivierung der Aromatase kommen, die Expression von Synaptopodin bleibt auf Kontrollniveau.

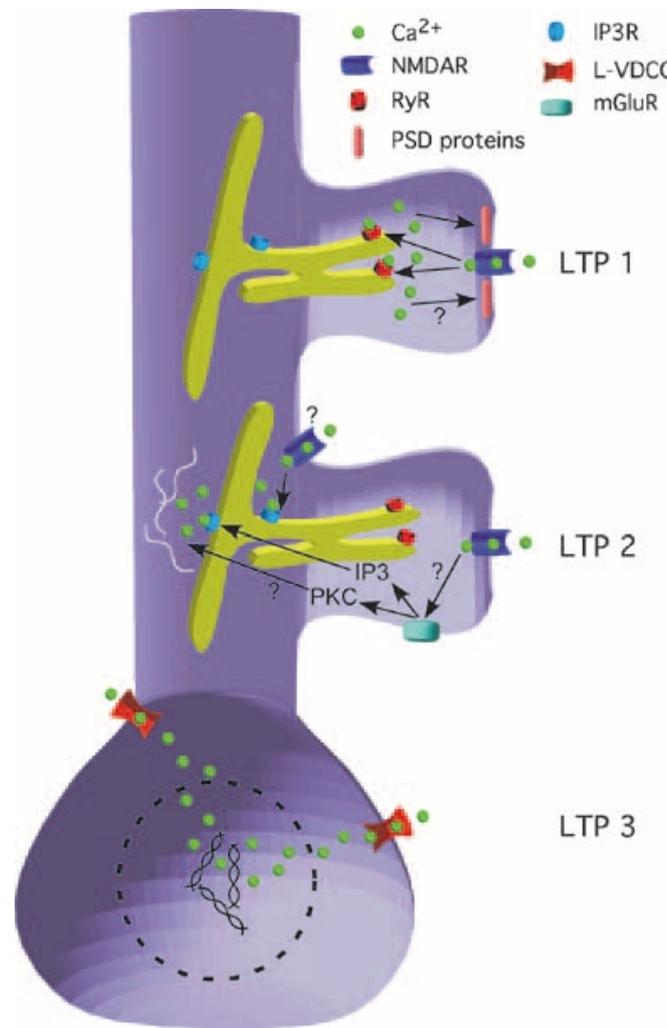
Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass neuronale Aktivität die Expression von Synaptopodin herunterreguliert, bei gleichzeitiger Blockade der Calciumkanäle die Herrunterregulation des Synaptopodins allerdings ausbleibt.

## 6.5 LTP und Synaptopodin

Die Langzeitpotentierung (long-term-potential, LTP) beruht auf wiederholten Reizdarbietungen, die zu einer Verstärkung der synaptischen Effektivität und schließlich zu strukturellen Veränderungen führt. Bereits im Jahre 1949 beschrieb Hebb, dass die Speicherung von Gedächtnisinhalten auf einer Veränderung der Stärke synaptischer Verbindungen und auf Bildung neuer Synapsen beruhen muss. Nach dieser Erkenntnis folgten weitere Experimente und Untersuchungen, die die LTP als Lern- und Gedächtnismechanismus des Gehirns betrachteten (Bliss und Collingridge, 1993; Martin *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2004). Es existieren mindestens drei Formen der LTP nebeneinander, was im Gegensatz zu dem zuvor postulierten Vorkommen von nur zwei Formen, nämlich dem frühen „early“-LTP (eLTP) und dem späten „late“-LTP (lLTP) steht. Diese Klassifikation basierte auf der Aktivierung verschiedener biochemischer Signalwege (Raymond *et al.*, 2002). Die heute übliche LTP 1, LTP 2 und LTP 3 Nomenklatur hat sich durchgesetzt (Racine *et al.*, 1983; Abraham und Otani, 1991; Bliss und Collingridge, 1993; Raymond und Redman, 2002), aber wird auch zum Teil in Anlehnung an die vorher übliche Unterteilung, early-, intermediate-, und late-Langzeitpotenzierung benannt.

LTP 1 hat nur eine kurze Dauer und ist abhängig von posttranslationalen Modifikationen durch synaptische Proteine (Lovinger *et al.*, 1987; Malinow *et al.*, 1988). LTP 2 hat eine mittlere Dauer und benötigt neu synthetisierte Proteine, jedoch keine Gentranskription (Otani *et al.*, 1989; Raymond *et al.*, 2000; Kelleher *et al.*, 2004). LTP 3 verfügt über eine lange Verweildauer, eventuell sogar von permanenter Form und ist abhängig von Gentranskription (Nguyen *et al.*, 1994; Frey *et al.*, 1996). Bis heute ist wenig über die Vorgänge der Induktion der verschiedenen LTP Formen bekannt. 2002 vermuteten Raymond und Redman, dass die Aktivierung der Induktion verschiedene Calciumquellen benötigt. Hierbei gingen sie von Ryanodinrezeptoren (RyR), Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptoren (IP3R) und L-Typ spannungsabhängigen

Calciumkanälen aus (Raymond und Redman, 2002). Vier Jahre später konnten sie jedoch zeigen, dass eine spezielle Kompartimentierung von Calcium im Spine, die abhängig von verschiedenen Signalen Calcium freisetzen kann, für den Erhalt der einzelnen Formen der Langzeitpotentierung sorgt.



**Abb. 17:** Induktionswege von LTP1-3 (Quelle Raymond & Redman, Journal of Physiology 2006).

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, konnten verschiedene LTP induzierende Stimulationswege von Raymond und Redman beschrieben werden. Ryanodinrezeptoren sind allein für LTP 1 durch die Calciumfreisetzung aus dem Spine verantwortlich. IP3 Rezeptoren produzieren Calciumsignale innerhalb des Dendriten und sind verantwortlich für die Induktion von LTP 2. Für LTP 3 sind die spannungsabhängigen Calciumkanäle zuständig, die überwiegend an den Zellkörpern und den proximalen Dendriten lokalisiert sind (Westenbroek *et al.*, 1990; Hell *et al.*, 1996), jedoch auch an proximalen dendritischen Spines vorkommen (Davare *et al.*, 2001). Diese generieren eine somatische Calciumantwort und greifen somit in die Gentranskription ein. Diese Erkenntnisse unterstützen die Unterteilung von Calcium in verschiedene

Kompartimente. Auch immunhistochemische Studien unterstützen diese Vorstellung einer Kompartimentierung von Calcium.

Die derzeitige Studienlage gibt wenig Auskunft zur genauen Lokalisation von Ryanodin- und IP3 Rezeptoren. 1993 beschrieb Sharp in seiner Untersuchung, dass Ryanodinrezeptoren überwiegend an den Spines und den dendritischen Schäften in der Nähe der Spines repräsentiert sind, wo hingegen IP3 Rezeptoren ausschließlich auf dendritischen Schäften zu finden sein sollen (Sharp *et al.*, 1993). Eine nachfolgende Untersuchung steht diesen Erkenntnissen gegenüber. Sie besagt, dass die IP3 Rezeptoren genauso im Spine vorhanden sind wie die Ryanodinrezeptoren (Sala *et al.*, 2001). Das Review von Jedlicka *et al.* beruft sich auf die Arbeit von Sharp *et al.* von 1993. Daraus ergibt sich jedoch in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Synaptopodin und der Langzeitpotenzierung ein Problem. Wenn IP3 Rezeptoren ausschließlich im Dendriten vorkommen und nicht auch im Spineapparat wie die Ryanodinrezeptoren, dann kann LTP2, das IP3 Rezeptor abhängig ist, nicht im Zusammenhang mit Synaptopodin stehen; denn Synaptopodin ist eng mit dem Spineapparat assoziiert. Diese Überlegungen führen zu einer berechtigten Skepsis an der Arbeit von Sharp *et al.* (1993) zur Lokalisation der Calciumkanäle.

Weiterhin scheint auch die Aktivierung von postsynaptischen NMDA Rezeptoren während der Induktion eine große Rolle zu spielen. So ist wahrscheinlich die Calcium induzierte Calciumfreisetzung durch den NMDA Rezeptor und den Ryanodinrezeptoren eine Art Schlüsselfigur für die Einleitung von LTP 1.

LTP 2 ist abhängig von der NMDA Rezeptoraktivierung. Hierbei führt der CICR zu einer Calciumfreisetzung aus den IP3 Rezeptoren. Nakamura *et al.* hatten bereits ein mGlutamat Rezeptor/IP3 Rezeptor abhängiges dendritisches Calciumsignal, dass durch Calciumeinstrom nach Depolarisation aktiviert wird, beschrieben (Nakamura *et al.*, 1999, 2000, 2002).

Auch die Induktion von LTP 3 ist abhängig von L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanälen und NMDA-Rezeptoren. NMDA spielt hier eher eine untergeordnete Rolle (Raymond und Redman, 2006). Daraus ergibt sich, dass alle drei Formen nebeneinander in der gleichen Nervenzelle existieren und ihre eigenen Calciumquellen zur Verfügung haben. Dies spricht für eine Calciumkompartimentierung innerhalb des Spines.

In welchem Zusammenhang stehen nun die Langzeitpotenzierung und Synaptopodin?

Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Synaptopodin-knockout Maus zu einer Reduktion hippocampaler Langzeitpotenzierung (LTP) kommt (Deller *et al.*, 2003; Jedlicka *et al.*, 2008). Die Mäuse schnitten bei Lern- und Verhaltenstests schlechter ab als ihre Kontrollgruppe. Synaptopodin scheint somit durch seine Assoziation zum Spineapparat wichtig für die Ausbildung von LTPs zu sein. Diese Beobachtungen werden durch Untersuchungen von Spacek gestützt. Hier wurde beschrieben, dass sich im Kleinhirn keine LTPs induzieren lassen, was auf die dortig fehlende Synaptopodinexpression und damit auch auf das Fehlen eines Spineapparates zurück zu führen sein könnte (Spacek *et al.*, 1985).

2001 konnten in Versuchen von Yamazaki *et al.* nach Induktion einer LTP im Hippocampus eine verstärkte Expression von Synaptopodin sowie eine *de novo* Ausbildung dendritischer Spines beobachtet werden (Yamazaki *et al.*, 2001; Fukazawa *et al.*, 2003; Engert und Bonhoeffer, 1999). Hierbei konnte auch eine verstärkte Expression von Aktin beobachtet werden.

Die Verteilung von Synaptopodin im Spine entspricht den Regionen mit hohem Aktin Gehalt (Mundel *et al.*, 1997; Kaech *et al.*, 2001; Asanuma *et al.*, 2005). Der Spineapparat ist über Aktin mit NMDA verbunden (Wyszynski *et al.*, 1998; Racca *et al.*, 2000). Wenn dieser Rezeptor aktiviert wird, kommt es über einen intrazellulären Calciumeinstrom und weiteren Second Messenger Prozessen zu einer Steigerung der Proteinbiosynthese und, daraus folgend, zu einer Synapsenveränderung. Diese strukturellen Veränderungen sind das morphologische Korrelat der Langzeitpotenzierung. Daraus folgern wir, dass die Veränderungen von Synaptopodin, des Spineapparats, der LTP und der synaptischen Plastizität abhängig von Calcium sind.

Diese Überlegungen führten uns zu weiteren Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe. Gegenstand aktueller Untersuchungen ist der Einfluß von Letrozol auf die LTP: Nach bisherigen Erkenntnissen kommt es durch die Inhibierung der Aromatase zu einer Herunterregulation der LTP (Glassmeier, unveröffentlichte Daten).

## **6.6 Unsere Ergebnisse im aktuellen wissenschaftlichen Kontext**

Es gibt unterschiedliche Ansichten bezüglich der Lokalisation von Synaptopodin im Spine. In einem aktuellen Review vertreten Jedlicka *et al.* die These, dass das Protein Synaptopodin ausschließlich in den dendritischen Schichten, nicht aber im Zellkörper lokalisiert ist (Jedlicka *et al.*, 2008). Dies steht im Gegensatz zu unseren

Untersuchungen. Wir konnten feststellen, dass sowohl mRNA als auch das Protein Synaptopodin sich im Soma des Spines befinden (Fester *et al.*, 2009). Von dort aus folgt wahrscheinlich ein Transport von Synaptopodin entlang des Dendriten zum Spinehals, zum Spinekopf und zu den dendritischen Schäften.

Desweiteren gibt es verschiedene Ansichten, inwiefern Synaptopodin eine Rolle bei der synaptischen Plastizität spielt. Es ist, ausgehend von vorherigen Studien, unter anderem mit der Synaptopodin-knockout Maus, eine Verbindung zwischen Synaptopodin und der Langzeitpotenzierung nicht von der Hand zu weisen. Allerdings scheint noch kein plausibler Zusammenhang zu bestehen und die zurzeit vorgebrachten Lösungsvorschläge sind unvollständig und ungenügend aussagekräftig.

Wie bereits oben erwähnt sind strukturelle Veränderungen der Spinemorphologie im Aktinzytoskelett das morphologische Korrelat der Langzeitpotenzierung. In reifen Podozyten und im ZNS, besonders im Telenzephalon, treten Synaptopodin und Aktin kolokalisiert in Spines und an der postsynaptischen Dichte (PSD) auf (Matus *et al.*, 1982). Synaptopodin verfügt dazu weiterhin über zwei Bindungsstellen für Aktin und eine Bindungsstelle für  $\alpha$ -Aktinin (Kremerskothen *et al.*, 2005).

Während der LTP kommt es zu einer Hochregulation des Synaptopodins (Inokuchi *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1997; Matsuo *et al.*, 1998, 2000). Synaptopodin mRNA wird im Soma hochreguliert und das Protein Synaptopodin steigt dann in der aktivierten synaptischen Schicht an (Fukazawa *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2001). Man kann also sagen, dass Synaptopodin auf noch ungeklärte Weise daran beteiligt ist, dass die Proteinsynthese abhängige Langzeitpotenzierung stattfinden kann.

Neben Synaptopodin konnten Krucker *et al.* 2000 feststellen, dass die LTP im Hippocampus mit einer Veränderung des Aktinzytoskeletts und einem erhöhten Aktin Gehalt einhergeht. Eine Depolymerisation von Aktin führt zur Aufhebung der Spinemotilität und zum Verlust synaptischer Strukturen (Fischer *et al.*, 1998). Aktin wirkt somit wahrscheinlich stabilisierend auf Synapsen. Aufgrund der wie bereits oben erwähnten räumlich engen Lokalisation von Synaptopodin und Aktin scheint Synaptopodin regulativ in das Aktinzytoskelett einzugreifen und somit Prozesse der synaptischen Plastizität zu induzieren. Eine neue Veröffentlichung unterstreicht dies: Hier wurde eine LTP in Spines induziert, die Synaptopodin exprimieren. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte es dabei nicht zu einem Abbau des Aktinzytoskeletts kommen (Okubo-Suzuki *et al.*, 2008).

Die regulative Funktion liegt nach unseren Untersuchungen beim Calcium. Calcium wird durch den CICR aus dem Spineapparat via der Ryanodin- und der IP3 Rezeptoren freigesetzt. Die Freisetzung von Calcium führt im Folgenden zur Phosphorylierung der Aromatase, wodurch das Enzym inaktiv wird. Gleichzeitig kommt es zur Hochregulation des ER  $\beta$  was zu einem Stopp des Synaptopodinsynthesewegs führt. Die Synaptopodinexpression wird herunterreguliert.

In weiteren Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe darlegen, dass das neuroprotektive Estrogen einen Einfluss auf die Profilinexpression hat (Stephanie Strohbücker, Diplomarbeit 2007). Profilin ist ein ubiquitäres Protein, dass beteiligt ist an Wachstums- und Stabilisierungseffekten von Aktinfilamenten. Weiterhin dient es als Austauschfaktor von ADP zu ATP in G-Aktin. Im Hippocampus ist Profilin überwiegend in den Dendriten lokalisiert (Neuhoff, 2005).

Kommt es nun in dem oben beschriebenen Kreislauf zur einer Herunterregulation von Synaptopodin, führt dies im Verlauf zu einer Inhibition von Profilin. Die Spines sind instabil und das Aktinzytoskeletts ist unzureichend funktionsfähig.

Diesen Ergebnissen müssen weiterführende Untersuchungen folgen, um die genaue Funktion dieses durch Calcium regulierten Kreislaufes aufzuklären. Es ist jedoch bereits anhand unserer jetzigen Erkenntnisse auszuschließen, dass Synaptopodin einen direkten Effekt auf die Langzeitpotenzierung hat, wie die neusten Arbeiten suggerieren wollen (Jedlicka *et al.*, 2008).

## 6.7 Unsere Ergebnisse im aktuellen klinischen Kontext

Im Mittelpunkt künftiger klinischer Auswirkungen unserer Grundlagenforschung stehen die Demenzen, allen voran die Alzheimer-Demenz. Bei dieser Erkrankung kommt es durch eine Aktivitätsänderung Calcium abhängiger Proteasen und Proteinkinasen zu einer Erhöhung des A $\beta$ -Peptides und zu Phosphorylierungen des Tau-Proteins (Querfurth und Selkoe, 1994).

Eine erhöhte Calciumionenkonzentration zieht dendritische Degeneration, Verlust von Synapsen, Änderungen im Zytoskelett und Apoptosen nach sich (Khachaturian, 1989). Die pathologischen Hauptmerkmale des Morbus Alzheimer sind Apoptose sowie Plaques und Fibrillen mit hyperphosphorylierten Neurofilamentproteinen. Diese könnten nun im Zusammenhang mit der gestörten Calciumregulation gesehen werden.

An Alzheimer erkrankte Patienten zeigen auch häufig depressive Symptome. Einige Studien geben Hinweise darauf, dass bei depressiven Erkrankungen eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration vorliegt (Dubovsky *et al.*, 1994; Yamawaki *et al.*, 1996). Vielleicht kann man sich diesen Punkt in Zukunft diagnostisch zur Hilfe nehmen, so dass bei der Diagnose Morbus Alzheimer und depressive Verstimmung Calciumantagonisten eingesetzt werden könnten (De Vry *et al.*, 1997).

## 7. Zusammenfassung

Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass der Spineapparat, bestehend aus gestapelten Schichten glatten endoplasmatischen Retikulums und elektronendichten Platten in 80% der reifen Spines vorhanden ist. Synaptopodin, ein Aktin assoziiertes Protein, bindet spezifisch an den Spineapparat und kann als Parameter für sein Vorhandensein benutzt werden. Der Spineapparat wird als Calciumspeicher in der Literatur diskutiert.

Die Zellen wurden mit Calciumkanalinhibitoren (U73122 und 8-Brom-cADP Ribose), einem glutamatergen Agonisten (NMDA) und mit einem Estrogenrezeptorantagonisten (ICI 182,780) behandelt.

Die Untersuchungen zeigten eine signifikante Heraufregulation der Synaptopodinexpression nach Inhibition der Calciumkanäle. Um einen Einstrom des extrazellulären Calciums ausschließen zu können, verwendeten wir EDTA, welches keinen Einfluss auf die Synaptopodinexpression zeigt. Umgekehrt ist ein CICR durch glutamaterge Agonisten z.B. NMDA induzierbar. Nach NMDA zeigte sich eine konsistente Herunterregulation, die durch U73122 und 8-Brom-cADP Ribose aufhebbar war. Die Regulation der Synaptopodinexpression korrelierte positiv mit der neuronalen Estradiolsynthese. Die Blockierung der Estrogenrezeptoren durch ICI 182,780 zeigte keinen Effekt auf die Synaptopodinexpression; eine simultane Behandlung mit ICI 182,780 und NMDA blockierte die NMDA- induzierte Herunterregulation.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Synaptopodinexpression durch Calciumtransienten reguliert wird. Da bekannt ist, dass die Aromatase durch Calciumfreisetzung aus internen Speichern über Calcium abhängige Kinasen phosphoryliert und damit inaktiviert wird, ist die korrespondierende Regulation der Estradiolsynthese konsistent. Die durch ICI 182,780 aufhebbare Herunterregulation der Synaptopodin- und der Estradiolsynthese lässt den Schluß zu, dass die Abhängigkeit der Synaptopodinexpression nach synaptischer Aktivierung Aromatase vermittelt ist.

## 8. Literaturverzeichnis

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

Abraham WC, Otani S (1991) Macromolecules and the maintenance of long-term potentiation. In kindling and synaptic plasticity. The legacy of Graham Goddard (Morrell F, ed, pp. 92-109).

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

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

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

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

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

Balthazart J, Baillien M, Ball GF (2006) Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology* 147: 359-366.

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

Bas Orth C, Deller T (2005) Lamina-specific distribution of Synaptopodin, an actin-associated molecule essential for the spine apparatus, in identified principal cell dendrites of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 487: 227-239.

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

Benedeczky I, Molnár E, Somogyi P (1994) The cisternal organelle as a  $Ca^{2+}$ -storing compartment associated with GABAergic synapses in the axon initial segment of hippocampal pyramidal neurons. *Exp Brain Res* 101: 216-230.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2004a) Aufl. 16 Anatomie Band 1. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsevier S.181-187.

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

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

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

Blackstead TW, Brink K, Hem J, Jeune B (1970) Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 138: 433-449.

Bleasdale JE, Thakur, NR, Gremban, RS (1990) Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 756-768.

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

Boron WF, Boulpaep EL (1989) The electrogenic Na/HCO<sub>3</sub> cotransporter. *Kidney Int* 36: 392-402.

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

Brewer GJ (1997) Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 71: 143-155.

Broadwell RD, Cataldo AM (1984) The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals. *J Comp Neurol*. 230: 231-248.

Bruce S, McEwen BS, Stephen E (1999) Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocr Rev* 20: 279-307.

Burke TR Jr., Fesen M., Mazumder A (1995) Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J Med Chem* 38: 4171-4178.

Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23: 1261-1276.

Collin C, Miyaguchi K, Segal M (1997) Dendritic spine density and LTP induction in cultured hippocampal slices. *J Neurophysiol* 77: 1614-1623.

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

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

Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2. *Science* 293: 98-101.

Deller T, Merten T, Roth SU, Mundel P, Frotscher M (2000) Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J Comp Neurol* 418: 164-181.

Deller T, Mundel P (2000) Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus* 10: 569-581.

Deller T, Mundel P, Frotscher M (2002) Laminar Distribution of Synaptopodin in normal and reeler mouse brain depends on the position of spine-bearing neurons. *J comp Neurol* 453: 33-44.

Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P (2003) Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci* 100: 10494-10499.

Deller T, Bas Orth C, Frotscher M (2007) A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Ann Anat* 189: 5-16.

De Vry J, Fritze J, Post RM (1997) The management of coexisting depression in patients with dementia: potential of calcium channel antagonists. *Clin Neuropharm* 20: 22-35.

Disteldorf E (2009) Stereologische Untersuchung des Spineapparates in hippocampalen Spines unter dem Einfluss von Estradiol. *Med. Dissertation. Universität Hamburg.*

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

Dubovsky SL, Thomas M, Hijazi A, Murphy J (1994) Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 243: 229-234.

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

Emptage N, Bliss TV, Fine A (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22: 115-24.

Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399: 66-70.

Fester L, Rune GM (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 GM (2009a) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19: 692-705.

Fester L, Zhou L, Voets C, Ossig C, Disteldorf E, Peters C, Bläute F, Prange-Kiel J, Dudzinski D, Jarry H, Rune GM (2009b) The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology* 34: 123-129.

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

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

Fifková E., Delay R.J (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res* 266: 163-168.

Fifková E, Morales M (1989) Calcium-regulated contractile and cytoskeletal proteins in dendritic spines may control synaptic plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 568: 131-137.

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

Fitzpatrick JL, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM (2002) Estrogen-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor alpha or beta and activation of the MAPK pathway. *J Neurochem* 82: 674-682.

Frey U, Frey S, Schollmeier F, Krug M (1996) Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons *in vivo* and *in vitro*. *J Physiol* 490: 703-711.

Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K. (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance *in vivo*. *Neuron* 38: 447-460.

Furuichi T, Furutama D, Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Mikoshiba K (1994) Multiple types of ryanodine receptor/ $Ca^{2+}$  release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci* 14: 4794-4805.

Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450<sub>SCC</sub> (CYP11A1), and 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 71: 2231-2238.

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

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

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

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

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

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

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

Hill DR, Bowery NG (1981) 3Hbaclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290: 149-152.

Hinz R (2009) Die Rolle der Estrogenrezeptoren bei estrogeninduzierter Regulation von Synaptopodin. Med. Dissertation, Universität Hamburg.

Hjorth-Simonsen A (1973) Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis *J Comp Neurol* 147: 145-161.

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017a and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci* 101: 865-870.

Hölscher C (2005) Development of beta-amyloid-induced neurodegeneration in Alzheimer's disease and novel neuroprotective strategies. *Rev Neurosci* 16: 181-212.

Hoskova T, Rusakov DA, Bliss TV, Fine A (1995) Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J Neurosci* 15: 5560-5573.

Howell A, Robertson JF, Quaresma Albano J, Aschermannova A, Mauriac L, Kleeberg UR, Vergote I, Erikstein B, Webster A, Morris C (2002) Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol* 20: 3396-403.

Inokuchi K, Kato A, Hiraia K, Hishinuma F, Inoue M, Ozawa F (1996a). Increase in activin beta A mRNA in rat hippocampus during long-term potentiation. *Febs Lett* 382: 48-52.

Inokuchi K, Murayama A, Ozawa F (1996) mRNA differential display reveals Krox-20 as a neural plasticity-regulated gene in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 430-436.

Jedlicka P, Schwarzacher SW, Winkels R, Kienzler F, Frotscher M, Bramham CR, Schultz C, Bas Orth C, and Deller T (2008) Impairment of In Vivo Theta-Burst Long-Term Potentiation and Network Excitability in the Dentate Gyrus of Synaptopodin-Deficient Mice Lacking the Spine Apparatus and the Cisternal Organelle. *Hippocampus* 19: 130-140.

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

Kaech S, Parmar H, Roelandse M, Bornmann C, Matus A (2001) Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci* 98: 7086-7092.

Kagaya Y, Hajjar RJ, Gwathmey JK, Barry WH, Lorell BH (1996) Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with fosinopril improves depressed responsiveness to  $Ca^{2+}$  in myocytes from aortic-banded rats. *Circulation* 94: 2915-2922.

Kato A, Ozawa F, Saitoh Y, Hirai K, Inokuchi K, (1997) Vesl, a gene encoding VASP/Ena family related protein, is upregulated during seizure, long-term potentiation and synaptogenesis. *FEBS Lett* 412: 183-189.

Kelleher RJ (2004) Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44: 59-73.

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

Korkotian E, Segal M (1998) Fast confocal imaging of calcium released from stores in dendritic spines. *Eur J Neurosci* 10: 2076-2084.

Korkotian E, Segal M (1999) Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci* 96: 12068-12072.

Korkotian E, Segal M (2006) Spatially confined diffusion of calcium in dendrites of hippocampal neurons revealed by flash photolysis of caged calcium. *Cell Calcium* 40: 441-449.

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

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

Krucker T, Siggins GR, Halpain S (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 97: 6856-6861.

Kuwajima G, Futatsugi A, Niinobe M, Nakanishi S, Mikoshiba K (1992) Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons *Neuron* 9: 1133-42.

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

Lee KJ, Kim H, Rhyu IJ (2005) The roles of dendritic spine shapes in Purkinje cells. *Cerebellum*.4: 97-104.

Li S, Shi F, Pu F, Li X, Jiang T, Xie S & Wang Y (2007) Hippocampal shape analysis of Alzheimer disease based on machine learning methods. *Am J Neuroradiol* 28: 1339-1345.

Lorento de Nó R (1933). Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The area entorhinalis. *Journal of Psychology and Neurology* 45: 381-438.

Lorento de Nó, R (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal of Psychology and Neurology* 46: 113-177

Lovinger DM, Wong KL, Murakami K, Routtenberg A (1987) Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 436:177-183.

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

Malinow R, Madison DV, Tsien RW (1988) Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation *Nature* 335: 820-824.

Marks AR (1997) Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* 272: H597-605.

Martin SJ, Grimwood PD & Morris RGM (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23: 649-711.

Matsuo R, Kato A, Sakaki Y, Inokuchi K (1998) Cataloging altered gene expression during rat hippocampal long-term potentiation by means of differential display. *Neurosci Lett* 244: 173-176.

Matsuo R, Murayama A, Saitoh Y, Sakaki Y, Inokuchi K (2000) Identification and cataloging of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats. *J Neurochem* 74: 2239-2249.

Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci* 79: 7590-1594.

Matus A (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci*. 11: 29-44.

Matus A (2005) Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol*. 15: 67-72.

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

McEwen BS (2001) Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci* 98: 7093-7100.

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

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

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

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

Meencke HJ, Veith G, Lund S. (1996) Bilateral hippocampal sclerosis and secondary epileptogenesis. *Epilepsy Res Suppl* 12: 335-342.

Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Kletsas D, Kalofonos HP, Karamanos NK (2003) Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer* 104: 155-160.

Mueller D, Toni N, Buchs PA (2000) Spine changes associated with long-term potentiation. *Hippocampus* 10: 596-604.

Mukai H, Takata N, Ishii HT, Tanabe N, Hojo Y, Furukawa A, Kimoto T, Kawato S (2006) Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology. *Neurosci* 138: 757-764.

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

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

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

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

Murphy KJ, Reid GP, Trentham DR, Bliss TVP (1997) Activation of NMDA receptors is necessary for the induction of associative long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampal slice. *J Physiol* 504: 379-385.

Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z (1971) Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human fetuses. *J Endocrinol* 51: 795-796.

Naftolin F, Ryan KJ (1975) The metabolism of androgens in central neuroendocrine tissues. *J Steroid Biochem* 6: 993-997.

Naftolin F, Horvath TL, Jakab RL, Leranath C, Harada N, Balthazart J (1996) Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinolog* 63: 149-55.

Naisbitt S, Valtschanoff J, Allison DW, Sala C, Kim E, Craig AM, Weinberg RJ, Sheng M (2000) Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *J Neurosci* 20: 4524-4534.

Nakamura T (1999) Synergistic release of  $Ca^{2+}$  from IP<sub>3</sub>-sensitive stores evoked by synaptic activation of m GluRs paired with backpropagating action potentials. *Neuron* 24: 727-737.

Nakamura T (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)-mediated  $Ca^{2+}$  release evoked by metabotropic agonists and backpropagating action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 20: 8365-8376.

Nakamura T (2002) Spatial segregation and interaction of calcium signalling mechanisms in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 543, 465-480.

Neuhoff H, Sassoè-Pognetto M, Panzanelli P, Maas C, Witke W, Kneussel M (2005) The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *J Neurosci* 21: 15-25.

Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265: 1104-1107.

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

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

Okubo-Suzuki R, Okada D, Sekiguchi M, Inokuchi K (2008) Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons *Mol.Cell. Mol Cell Neurosci* 38: 266-276.

O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, Regan CM (2000) Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neurosci* 99: 229-232.

Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM (1968) The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38: 193-201.

Pierce JP, van Leyen K, McCarthy JB (2000) Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3: 311-313.

Pierce JP, Mayer T, McCarthy JB (2001) Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr Biol* 11: 351-355.

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

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

Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008) Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180: 417-426.

Querfurth HW, Selkoe DJ (1994) Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry* 33: 4550-4561.

Racca C, Stephenson FA, Streit P, Roberts JD, Somogyi P (2000) NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 20: 2512-2522.

Racine RJ, Milgram NW & Hafner S (1983) Long- term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. *Brain Res* 260: 217-231.

Ramón y Cajal S (1891) Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères. *La Cellule* 7:125-176.

Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes*. Vols. 1 and 2. A. Maloine. Paris. 1911.

Raymond CR, Redman SJ (2002) Different calcium sources are narrowly tuned to the induction of different forms of LTP. *J Neurophysiol* 88: 249-255.

Raymond CR, Redman SJ (2006) Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *J Physiol* 570: 97-111.

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

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

Rune GM, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M (2006) Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res* 31: 145-155.

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

Sabatini BL, Oertner TG, Svoboda K. (2002) The life cycle of Ca<sup>(2+)</sup> ions in dendritic spines. *Neuron* 33: 439-452.

Sala C, Piëch V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31. 115-130.

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

Scoville WB and Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12: 103-113.

Segal M, Murphy D (2001) Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm Behav* 40: 156-159.

Segal M (2004) Dynamic regulation of spine-dendrite coupling in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 20: 2649-2663.

Segal M (2005) Dendritic spines and long term plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6: 277-284.

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  $Ca^{2+}$  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.

Smith, RJ, Sam, LM, Justen, JM (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils. Effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 688-697.

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

Spacek J (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat Embryol* 171: 235-243.

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

Spiers HJ, Burgess N, Maguire EA, Baxendale SA, Hartley T, Thompson P, O'Keefe J (2001) Unilateral temporal lobectomy patients show lateralized topographical and episodic memory deficits in virtual town. *Brain* 124: 2476-2489.

Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24: 299–325.

Stoffel-Wagner B (2001) Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145: 669-679.

Strohbücker, S (2007) Untersuchungen zur Bedeutung der Aromatase für das Aktinzytoskelett in hippocampalen dendritischen Dornen. Diplomarbeit Biochemie, Universität Hamburg.

Svoboda K, Mainen ZF (1999) Synaptic  $[Ca^{2+}]$ : intracellular stores spill their guts. *Neuron* 22: 427-430.

Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Dityatev A, Schachner M (2004) Trans-golgi network delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *J Cell Sci* 117: 381-388.

Villa A, Meldolesi J (1994) The control of  $Ca^{2+}$  homeostasis: role of intracellular rapidly exchanging  $Ca^{2+}$  stores. *Cell Biol Int* 18: 301-307.

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

Voets C (2009) Zur Rolle des Calciums bei Estrogen vermittelter synaptischer Plastizität. Med. Dissertation, Universität Hamburg.

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

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

Walseth, TF and Lee, HC (1993) Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced  $Ca^{2+}$ -release. *Biochim Biophys Acta* 1178: 235–242.

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

Westenbroek RE, Ahlijanian MK, Catterall WA (1990) Clustering of L-type  $Ca^{2+}$  channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 347: 281-284.

Wyszynski M, Kharazia V, Shangvi R, Rao A, Beggs AH, Craig AM, Weinberg R, Sheng M (1998) Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* 18: 1383-1392.

Yamawaki S, Kagaya A, Okamoto Y, Shimizu M, Nishida A, Uchitomi Y (1996) Enhanced calcium response to serotonin in platelets from patients with affective disorders. *J Psych Neurosci* 21: 321-324.

Yamazaki M (2001) Regulated expression of an actin-associated protein, synaptopodin, during long-term potentiation. *J Neurochem* 79: 192-199.

Yuste R, Majewska A, Holthoff K (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3: 653-659.

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

Zhao W, Meiri N, Xu H, Cavallaro S, Quattrone A, Zhang L, Alkon D (2000) Spatial learning induced changes in expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus. *FASEB J* 14: 290-300.

Zhao X, MacBride MM, Peterson BR, Pfaff DW, Vasudevan N (2005) Calcium flux in neuroblastoma cells is a coupling mechanism between non-genomic and genomic modes of estrogens. *Neuroendocrinology* 81: 174-182.

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

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

## 9. Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich an erster Stelle bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken. Neben der ausgezeichneten fachlichen Unterstützung habe ich erst durch Sie einen Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten gefunden.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. rer. nat. Lars Fester bedanken, der mich in die Laborarbeit einwies und immer einen guten Ratschlag bei Problemen hatte.

Ein besonderer Dank gilt Frau Helga Herbort, die mir durch ihre langjährige Erfahrung stets bei der praktischen Arbeit zur Seite stand.

Meinen Mitdoktoranden Jan Labitzke, Corinna Voets, Thomas Kornek, Theresa Bernard danke ich für die tolle Zeit und die positive Kritik, die es nur von wahren Freunden gibt.

Meinem Freund, Benedikt Franke, danke ich für seine Geduld und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt, die weit über die Erstellung dieser Arbeit hinausgeht.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, ohne deren Liebe und fortwährende Unterstützung ich niemals so weit gekommen wäre.

## 10. Lebenslauf

Name: Christiana Dorothee Monika Ossig  
Geboren am: 30.10.1982, in Marburg/Lahn (D)  
Eltern: Dr. med. Werner Ossig  
Stephanie Zingler, geb. Hübscher

### Ausbildung

voraussichtlich Juni 2010 **2. Ärztliche Prüfung (Staatsexamen)**  
seit Januar 2007 Aufnahme der Forschungsarbeit für die Promotion, Institut für Anatomie I – Zelluläre Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg

WS 2005/2006 Beginn der klinischen Ausbildung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg

August 2005 **1. Ärztliche Prüfung (Physikum)**  
WS 2003/2004 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg

Juni 2002: Abitur  
2000 – 2002 Evangelisches Gymnasium, Siegen  
1999 – 2000 Internatsaufenthalt in den USA: „The Hill School“, Pottstown, PA  
1994 – 1999 katholisches Gymnasium „Liebfrauenschule“, Köln  
1990 – 1994 Grundschule „Obenstruthschule am Wellersberg“, Siegen

**Praktisches Jahr**  
16.02.2009 – 07.06.2009: Chirurgie: Kantonsspital Luzern, Schweiz  
08.06.2009 – 27.09.2009: Neurologie: University College London (UCL), Queens Square, UK  
28.09.2009 – 17.01.2009: Innere Medizin: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Wissenschaftliche Arbeiten**  
März 2008: Poster auf dem Jahrestreffen der Anatomischen Gesellschaft, Innsbruck, Österreich:  
„Auto/paracrine regulation of aromatase activity in hippocampal neurons“, Christiana Ossig, Theresa Bernard, Jan Labitzke, Lars Fester, Gabriele M. Rune

Dezember 2009: Publikation:  
“The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures”,  
Fester L, Zhou L, Voets C, Ossig C, Disteldorf E, Peters C, Bläute F, Prange-Kiel J, Dudzinski D, Jarry H, Rune GM, Psychoneuroendocrinology.

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

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

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

Unterschrift: \_\_\_\_\_  
Christiana Ossig