

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut Anatomie I

Zelluläre Neurobiologie

Direktorin: Frau Prof. Dr. Rune

**Die Aromatase mRNA Expression im Hippocampus der Ratte
im Verlauf der Ontogenese**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Thomas Kornek
aus Hildesheim

Hamburg 2012

Meinen Großeltern

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.03.2012**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. J. Prange-Kiel

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

2.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
3.	EINLEITUNG	5
3.1	Einführung	5
3.2	Steroidbiosynthese	5
3.3	Aromatase.....	6
3.4	Hippocampus.....	9
3.5	Funktion von Estradiol im Hippocampus.....	12
4.	FRAGESTELLUNG	16
5	MATERIAL UND METHODEN	17
5.1	Material	17
5.2	Methoden.....	23
5.3	„Real-time“ PCR Verfahren.....	27
5.4	Durchführung der „real time“ PCR.....	28
5.5	Auswertung der „real time PCR“ Ergebnisse	31
5.6	Durchführung der <i>in situ</i> -Hybridisierung	33
6.	ERGEBNISSE	36
6.1	„Real time“ PCR Analyse.....	36
6.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung im Laufe der Ontogenese.....	40
7.	DISKUSSION	44
7.1	Altersabhängige Aromatase-Expression.....	44
7.2	Bedeutung der hippocampalen Aromatase Expression	47
7.3	Regulation des Estradiol-Gehalts im Hippocampus	49
7.4	Unterschiedliche Regulationsmechanismen bestimmen den Estradiolgehalt im Hippocampus.....	50
8.	ZUSAMMENFASSUNG	54
9.	LITERATURVERZEICHNIS	55
10.	DANKSAGUNG.....	64
11.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	65

2. Abkürzungsverzeichnis

17-β-HSD	17-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3-β-HSD	3-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARO	Aromatase
AS	<i>antisense</i>
AMPA	„α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionacid“
Aufl.	Auflage
bact	Beta-Actin
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
CA1	Cornu ammonis 1
CA3	Cornu ammonis 3
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
Ct	„Cycle threshold“
d	Tag
DABCO	Diazabicyclooctan
dest.	destilliert
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dehydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E	embryonal
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
GAP-43	<i>Growth-associated protein-43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyddehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing hormone</i>
GnRH-R	<i>Gonadotrophin-releasing hormone-</i> Rezeptor
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HKG	<i>house keeping</i> Gen
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl- Transferase 1
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
kDa	Kilodalton
Ki-67	Kiel-67
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LRH-1	„liver receptor homolog-1“
M	Molar (1 mol = $6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute / Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
nM	Nanomolar
NaOH	Natriumhydroxid
Ncl.	Nucleus
NiCl ₂	Nickelchlorid
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nr.	Nummer
NRE	nukleäre Rezeptorbindungsstellen
P	postnatal
P450 _{ARO}	Cytochrom P450 Aromatase
P450 _{c17}	Cytochrom P450 17- α -Hydrolase, c17,20-Lyase
P450 _{scc}	Cytochrom P450 <i>side chain cleavage enzyme</i>

Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S	<i>sense</i>
SE	„standard error“
SEM	„standard error of mean“
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
SRY	“Sex determining region Y”
StAR	“steroidogenic acute regulatory protein”
T	Temperatur
Taq	Thermo aquaticus
UV	Ultraviolett
VCR	„vocal control region“
V	Volt

3. Einleitung

3.1 Einführung

Die Aromatase ist ein Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Testosteron zu Estradiol. Ihr Vorkommen wird in verschiedenen Geweben beschrieben (Nelson und Bulun 2001, Carreau 2001). Heute weiß man, dass Estradiol auch endogen im Gehirn, speziell im Hippocampus, synthetisiert wird (Prange-Kiel et al. 2003) und dass dieser über alle zur Steroidbiosynthese befähigten Enzyme verfügt (Naftolin et al. 1971, Furukawa et al. 1998). Das von der Aromatase im Hippocampus synthetisierte Estradiol hat vielfältige Funktionen (Garcia-Segura et al. 1999 a,b, Kretz et al. 2004, Prange-Kiel et al. 2006), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Interessanterweise scheint die Expression der Aromatase mRNA im Hippocampus im Laufe der Entwicklung zu variieren. Einige Arbeiten belegen eine Abnahme der Expression der Aromatase mRNA im Laufe der Ontogenese bei Nagern (Lauber und Lichtensteiger 1994, Ivanova und Beyer 2000, Zhao et al. 2007). Vergleichende Untersuchungen im Laufe der Ontogenese bei Ratten, insbesondere die Herausarbeitung geschlechterspezifischer Unterschiede in der Expression der Aromatase mRNA, lagen bis zur Erstellung dieser Arbeit nicht vor. Die Untersuchung der geschlechterspezifischen Estradiolsynthese im Hippocampus ist daher Ziel dieser Arbeit. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der geschlechterspezifischen Kognition und Verhalten von besonderer Bedeutung.

3.2 Steroidbiosynthese

Die Estradiolsynthese ist der letzte Schritt der Steroidbiosynthese (Abb.1). Ausgangssubstrat für die Synthese aller Steroidhormone ist Cholesterol, welches vom „Steroidogenic acute regulatory protein“ (StAR) durch die innere Mitochondrienmembran transportiert wird. Dieser Schritt ist gleichzeitig der limitierende Schritt in der Steroidbiosynthese. Das „Cytochrom P450 side chain cleavage enzyme“ (P450_{scc}) befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran und wandelt Cholesterol in Pregnenolon um. Die folgenden Syntheseschritte werden vom Enzym „Cytochrom P450_{c17}“ (17- α -Hydrolase, c17,20-Lyase) irreversibel katalysiert. Dabei entsteht aus Pregnenolon über den Zwischenschritt 17-Hydroxy-Pregnenolon Dehydroepiandrosteron (DHEA). 17- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17- β -HSD) katalysiert den Schritt vom DHEA zum Androstendiol und 3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3- β -HSD) vom Androstendiol zum Testosteron. Die beiden

letztgenannten Schritte sind reversibel. Zuletzt entsteht aus Testosteron durch die Abspaltung der C19-Methylgruppe und durch die Aromatisierung des Ringes A das Endprodukt 17- β -Estradiol. Dieser Schritt wird durch Aromatase, auch als Cytochrom P450_{ARO} bezeichnet, irreversibel katalysiert.

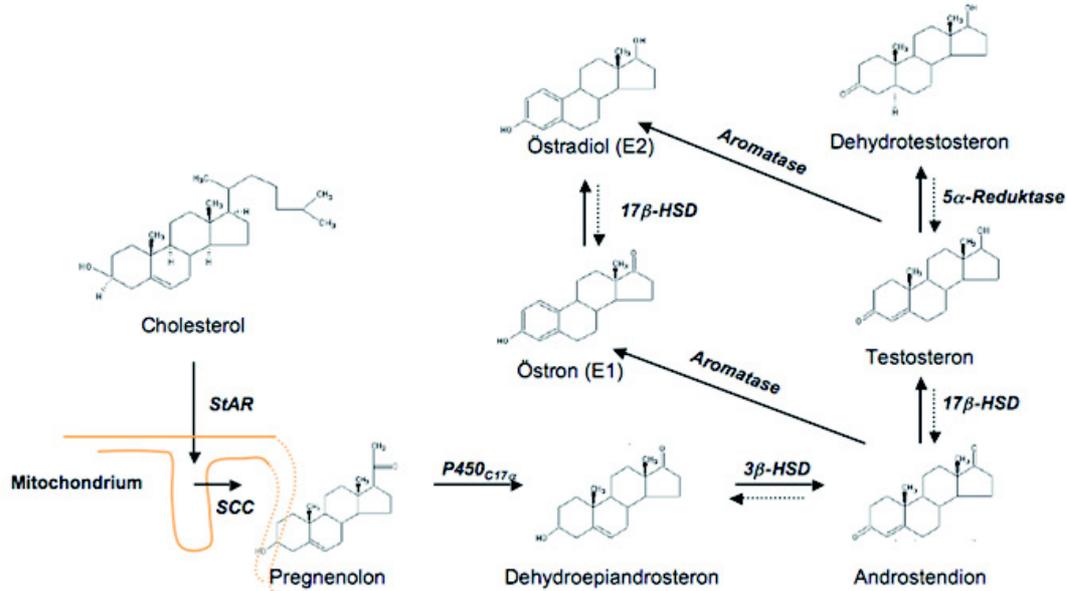


Abb. 1: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese (modifiziert nach: Fester et al. 2007).

3.3 Aromatase

Das Aromatase-Gen (CYP19a1) hat eine Länge von 123 kb und ist beim Menschen auf Chromosom 15q21.1 lokalisiert. Das CYP19a1 Gen besteht beim Menschen aus zehn Exons, von denen Exon zwei bis zehn die proteinkodierende Region beinhalten. Exon 1 kodiert für einen untranslatierten Bereich der Aromatase mRNA. Vom Exon 1 gibt es verschiedene gewebespezifische Varianten, denen jeweils ein gewebespezifischer Promotor vorangestellt ist (Bulun et al. 2003). Die Aromatase gehört in die Gruppe der Cytochrom P450 Familie und ist als integrales Membranprotein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Der hydrophobe N-Terminus ist in der Membran des ER verankert und der Hauptbestandteil des Moleküls ist an der zytoplasmatischen Oberfläche der Membran lokalisiert (Shimozawa et al. 1993).

In humanem Gewebe wird die Aromatase in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta, den Granulosazellen der Ovarien, den Leydigzellen des Hoden, den Nebennieren, im Fettgewebe, im Gehirn, in Knochen und in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (Simpson et al. 1999). Bei Nagern ist die Expression der Aromatase am besten im weiblichen Reproduktionstrakt untersucht. Wie beim Menschen wird auch bei Nagern die Aromatase in den Granulosazellen

präovulatorischer Follikel und in den Gelbkörpern exprimiert (Hickey et al. 1988). Eine entscheidende Funktion des von der Aromatase synthetisierten ovariellen Estradiols ist die Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation und Gravidität. Zu Beginn der Schwangerschaft stimuliert das Estradiol die Durchblutung und das Wachstum des Uterus, während es gegen Ende der Schwangerschaft unter Estradioleinfluß zu einer Erhöhung des Aktinomyosin-Gehaltes der Uterusmuskulatur kommt, wodurch dessen Kontraktilität verstärkt wird. Estradiol ist somit Voraussetzung für einen physiologischen Ablauf von Schwangerschaft und Geburt (Huszar und Robert 1982).

Im männlichen Reproduktionstrakt spielt das von der Aromatase synthetisierte Estradiol in der Spermienproduktion eine wichtige Rolle. Die Inhibierung der Estradiolsynthese beim männlichen Affen zeigte eine Reduktion männlicher Keimzellen, was wiederum zu einer deutlichen Abnahme der Spermienproduktion führte (Shetty et al. 1997). Im Reproduktionstrakt männlicher Ratten kann eine altersabhängige Aromataseverteilung beschrieben werden. In der Ontogenese nimmt die Expression der Aromatase mRNA in den Gonaden zunächst vom zehnten postnatalen (P) Tag bis zum 30. postnatalen Tag zu, ehe sie dann auf einem konstanten Niveau bleibt (Bois et al. 2010). Bis zum P20 wird die Aromatase hauptsächlich von den Sertolizellen exprimiert, ehe im weiteren Verlauf der Entwicklung die Expression von den Keimzellen in den Tubuli seminiferi übernommen wird (Bois et al. 2010). Gründe für den Wechsel in der Expression sind bisher nicht bekannt. Demnach lässt sich in den Gonaden eine altersabhängige Expression der Aromatase nachweisen. Ob eine altersabhängige Expression der Aromatase auch im Hippocampus von Nagern vorliegt, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.3.1 Regulation der Aromatase-Aktivität

Die Regulation der Aromatase-Aktivität erfolgt auf unterschiedliche Art und Weise. Auf Ebene der Transkription, in Form post-translationaler Modifikation, durch neuronale Aktivität und durch Substratverfügbarkeit (Behl und Manthey 2000, Roselli und Resko 1984, Balthazart et al. 2005, Balthazart und Ball 2006).

Über die Transkription der Aromatase mRNA wird die Synthese des Enzyms reguliert, wobei sich Veränderungen auf Ebene der Transkription sehr langsam vollziehen und einige Stunden benötigen (Behl und Manthey 2000). Im Gegensatz dazu ist die Regulation auf post-translationaler Ebene relativ schnell und reagiert innerhalb weniger Sekunden bis Minuten (Genissel und Carreau 2001).

Für die menschliche Aromatase sind mindestens zehn gewebespezifische Promotoren bekannt. Im menschlichen Ovar induziert cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) die Transkription (Bulun et al. 2004). Außerdem besitzt der Ovar-spezifische Aromatasepromotor mindestens zwei nukleäre Rezeptorbindungsstellen (NREa, NREb) an die „Steroidogenic factor 1“ (SF-1) und „liver receptor homolog-1“ (LRH-1) binden und so die Transkription induzieren (Lynch et al. 1993, Hinshelwood et al. 2003).

Die Aktivität der Aromatase kann daneben auch durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration bestimmt werden. Im Hypothalamus der Wachtel werden durch den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionacid (AMPA) vermittelten Calciumeinstrom in die Zelle die Calcium-abhängigen Kinasen stimuliert und aktiviert. Die Aktivierung der Kinasen führt zu einer reversiblen Phosphorylierung der Aromatase, was eine Abnahme der Aromatase-Aktivität zur Folge hat (Balthazart et al. 2005, Balthazart und Ball 2006).

In vivo Versuche an adulten Ratten im Hypothalamus können zeigen, dass die Aromatase-Aktivität vom Substratangebot abhängt. So induziert die Kastration männlicher Ratten eine Abnahme der Aromatase-Aktivität, die nach Zugabe von Androgenen wieder zunimmt (Roselli und Resko 1984). Im Einklang hiermit stehen Befunde, die eine Zunahme an Estradiol Konzentration nach Behandlung hippocampaler Zellkulturen mit Testosteron und Cholesterol nachweisen können (Fester et al. 2009).

3.3.2 Aromatase im Gehirn

Der erste Nachweis von Aromatase-Aktivität im Gehirn erfolgte bereits 1971 durch Naftolin. Diese Studie weist die Aktivität im fetalen limbischen System des Menschen und im Hypothalamus der Ratte nach (Naftolin et al. 1971, Naftolin et al. 1972, Naftolin et al. 1975). Sanghera et al. (1991) erbrachten den Protein-Nachweis der Aromatase unter anderem im ventralen Pallidum, Tractus olfactorius und im Cortex piriformis adulter Ratten beider Geschlechter mittels Immunohistochemie (IHC). Interessanterweise zeigen sich im Hypothalamus der Ratte geschlechter- und entwicklungsabhängige Unterschiede in der Aromatase mRNA Expression. So findet sich je am 19. embryonalen Tag (E19) und am zweiten postnatalen Tag (P2) ein Peak in der Aromatase Expression im Hypothalamus, während sich bei Männchen eine vermehrte Expression gegenüber Weibchen zeigt (Peruffo et al. 2008).

Postnatal nimmt die Expression bei Männchen im Ncl. präopticus paraventricularis deutlich ab, während im „Bed nucleus“ der Stria terminalis und in der medialen Amygdala eine

Zunahme der Aromatase Expression postnatal beschrieben wird, die auch noch bei adulten Tieren deutlich nachweisbar ist (Lauber und Lichtensteiger 1994). Diese Hirnareale sind untereinander verschaltet und kontrollieren das männliche Sexualverhalten (Simerly und Swanson 1986, Cohen und Wade 2011). Das lokal synthetisierte Estradiol scheint dieses Sexualverhalten zu beeinflussen. Beispielsweise führt die Injektion von Fadrozol, einem Aromatase-Inhibitor, in den Ncl. präopticus medialis zu einer Abnahme des männlichen Sexualverhaltens (Clancy et al. 1995).

Seit einigen Jahren spricht man auch von einem geschlechterspezifischen Unterschied in der Hirnmorphologie. Estradiol ist hierbei von Bedeutung (George und Ojeda 1982). Untersuchungen beim Zebrafinken können eine Regulation von Hirnmorphologie und Sexualverhalten durch Estradiol nachweisen. Die „vocal control region“ (VCR) steuert den Balzgesang der Männchen und ist bei diesen mehr als fünfmal so groß wie bei Weibchen. Die Behandlung weiblicher Vögel mit Testosteron, das in der VCR von der dort vorhandenen Aromatase in Estradiol umgewandelt wird, führt zu einem verstärkten Wachstum des Kerngebietes, also zu einer Maskularisierung dieser Kernregion. Werden adulte, maskularisierte Weibchen erneut mit Testosteron behandelt, wächst der VCR weiter an (Schlinger und Arnold 1991).

Auch beim Menschen gibt es Geschlechterunterschiede im Verhalten beziehungsweise bei kognitiven Fähigkeiten. Es kann belegt werden, dass Frauen und Mädchen ein besseres Sprachverständnis und bessere Schreibfähigkeiten aufweisen als Jungen und Männer (McCarthy und Konkle 1995). Letztere zeigen dagegen ein besseres räumliches Orientierungsvermögen (Woolley et al. 2010). Eine Hirnregionen, die dieses Verhalten maßgeblich beeinflusst, der Hippocampus, weist auch beim Menschen Aromatase Expression auf (Naftolin et al. 1971). Wie dargestellt, gehen geschlechterspezifischer Unterschiede in der Expression der Aromatase im Hypothalamus der Ratte im Laufe der Entwicklung mit funktionellen Änderungen einher. Vor diesem Hintergrund wäre es denkbar, dass vergleichbare Änderungen in der Expression auch im Hippocampus der Ratte im Laufe der Entwicklung vorliegen.

3.4 Hippocampus

Der Hippocampus ist als Teil des limbischen System an allen neuronalen Vorgängen, die das Verhalten bestimmen, beteiligt. Als Struktur des Papez-Kreises ist er für das Lernen und das Gedächtnis unerlässlich (Benninghoff et al. 2004 a). Sowohl bei Nagern als auch bei Menschen wird im Hippocampus Aromatase exprimiert (Naftolin et al. 1971, Naftolin et al.

1972, 1975, Lauber und Lichtensteiger 1994, MacLusky et al. 1994, Zhao et al. 2007). Das von der Aromatase lokal synthetisierte Estradiol beeinflusst diese Hirnregion auf vielfältige Weise (Lephard et al. 1996, Garcia-Segura et al. 1999 a, b, Fester et al. 2006, Zhou et al. 2010). Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Estradiolsynthese in dieser Hirnregion in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht. Bevor auf die bisher bekannte Bedeutung des Estradiols im Hippocampus eingegangen wird, erfolgt an dieser Stelle zunächst eine Beschreibung des Aufbaus dieser Hirnregion.

3.4.1 Entwicklung und Lage des Hippocampus

Der Hippocampus befindet sich im Telencephalon. Er ist Teil des limbischen Systems, zu dem auch der Gyrus cinguli, der Gyrus parahippocampalis, das Corpus amygdaloideum und die Corpora mamillaria gehören. Der Hippocampus setzt sich zum größten Teil aus allokortikalen Strukturen zusammen. Während der embryonalen Entwicklung vollzieht sich in den Hemisphären eine rotierende Wachstumsbewegung. Dabei wachsen die Hemisphärenbläschen um eine Achse, die horizontal durch die Inselregion und das Putamen verläuft. Dadurch entstehen der Frontallappen, Okzipitallappen und der Temporallappen. Da auch die im Inneren der Hemisphären befindlichen Strukturen an der Rotation teilnehmen, lässt sich die Lage des Hippocampus im Temporallappen auf diese Art und Weise erklären. Die laterale Begrenzung des Hippocampus entspricht der medialen Wand des Seitenventrikels. Entsprechend des Rotationswachstums der Hemisphären reicht der Hippocampus in einem Bogen bis zum kaudalen Ende des Corpus callosum. Unterhalb des Balkens setzt er sich dann in den Faserstrukturen des Fornix fort (Benninghoff und Drenckhahn 2004 a).

3.4.2 Aufbau und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus ist Teil des Archikortex. Man unterscheidet drei Abschnitte des Hippocampus: den Gyrus dentatus (DG), das Cornu ammonis (CA) und das Subiculum (Abb. 3). Diese werden auch als Hippocampusformation bezeichnet.

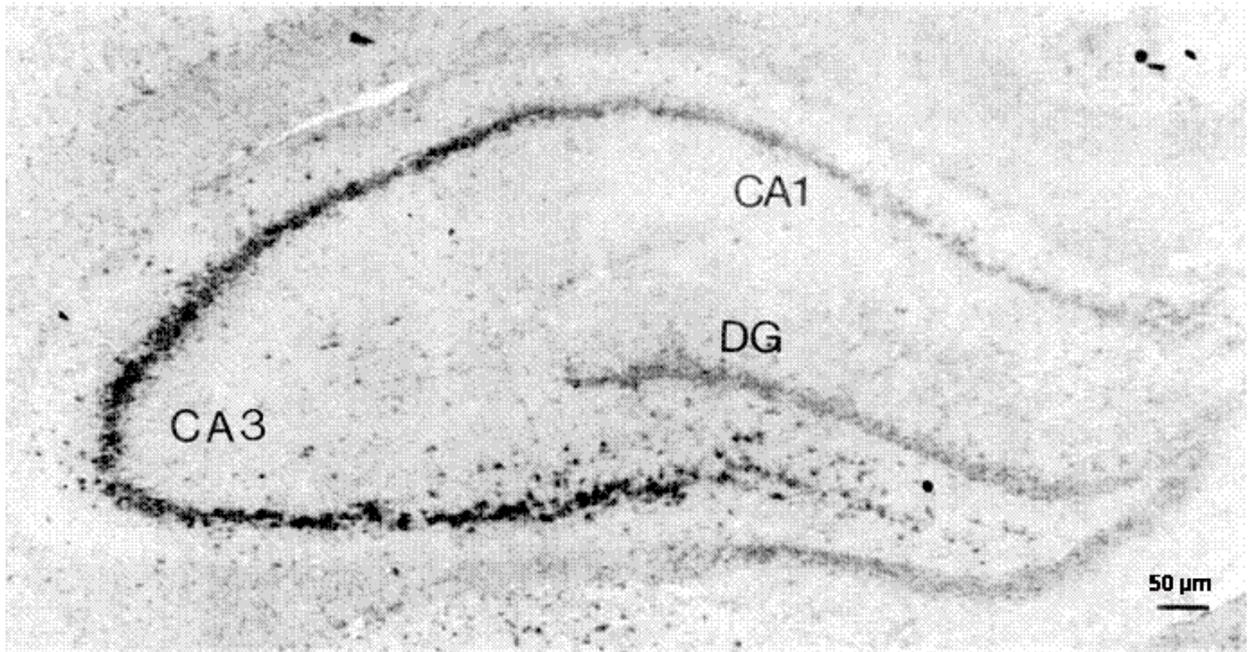


Abb. 3: Übersichtsabbildung der Hippocampus-Formation bei der Ratte. Dargestellt ist eine *in situ*-Hybridisierung von Estradiolrezeptor alpha. (Rune et al. 2002).

Das Besondere am Archikortex ist seine mikroskopische Rindenstruktur, die im Gegensatz zum sechsschichtigen Neokortex dreischichtig ist. Da sich der Archikortex im Bereich des Ammonshorn einrollt und noch zusätzliche Teile des Gyrus dentatus mit einbezieht, liegen in diesem Bereich mehrere Dreierschichten übereinander. Deshalb ist die Archikortexstruktur im Gyrus dentatus und im Ammonshorn schwer zu erfassen. Das Ammonshorn und der Gyrus dentatus setzen sich aus jeweils einer Schicht Prinzipalneuronen zusammen. Die Prinzipalneurone der CA Region sind die Pyramidenzellen. Daher wird diese Schicht Stratum pyramidale genannt. Die Prinzipalneurone im Gyrus dentatus sind die Körnerzellen. Die entsprechende Schicht heißt deswegen Stratum granulare (Benninghoff und Drenckhahn, 2004 b). Pyramidenzellen schütten den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat aus, während Körnerzellen sich des inhibitorischen Neurotransmitters GABA bedienen. In den zellarmen Schichten, die sich ober- und unterhalb der Strata pyramidale und granulare befinden, verlaufen Dendriten und Axone. Die meisten Afferenzen erhält der Hippocampus von Neuronen aus dem entorhinalen Kortex. Über den Tractus perforans erreichen Neurone aus dem entorhinalen Kortex Körnerzellen im Gyrus dentatus (1. Synapse). Diese projizieren über sog. Moosfasern zu Pyramidenzellen in CA3 (2. Synapse). Über Schaffer-Kollateralen geben die Pyramidenzellen aus CA3 Efferenzen zu Pyramidenzellen in CA1 ab (3. Synapse). Weitere Afferenzen erhält der Hippocampus aus dem medialen Septum, dem vorderen Thalamus und dem Gyrus cinguli. Diese erreichen über den Fornix die Dendriten der Körnerzellen in der Molekularschicht. Fast alle Efferenzen des Hippocampus verlaufen im

Fornix. Der Fornix gibt Faserzüge an das Septum, Corpus amygdaloideum und den Hypothalamus ab. Mit dem Hauptteil der Fasern endet der Fornix in den Corpora mamillaria. Letztere sind Teile des sogenannten Papez-Neuronenkreises. Die Neurone der Corpora mamillaria projizieren in den Ncl. thalamicus anterior, der als spezifischer Thalamuskern für limbische Kortexareale in den Gyrus cinguli zurückprojiziert. Indem der Gyrus cinguli seine Fasern wieder zurück zum Hippocampus sendet, schließt sich der Neuronenkreis. Dieser trägt maßgeblich dazu bei, Inhalte von dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis zu überführen. Zudem ist der Hippocampus als Teil des limbischen Systems an allen neuronalen Vorgängen, die das Verhalten bestimmen und bei emotionalen Zuständen ablaufen, beteiligt. Als wichtige Schaltstelle nimmt er Einfluss auf vegetative Funktionen, wie z.B. Wachsein, Schlafen, Erregung und Aufmerksamkeit (Trepel 2004).

3.5 Funktion von Estradiol im Hippocampus

3.5.1 Estradiolsynthese im Hippocampus

Prange-Kiel et al. (2003) konnten erstmalig zeigen, dass hippocampale Neurone Estradiol *de novo* synthetisieren und im Hippocampus männlicher Ratten wird eine vielfach höhere Konzentration an Estradiol als im Plasma der Ratte gemessen (Hojo et al. 2004). Dies weist auf eine erhebliche Syntheseleistung von Estradiol im Hippocampus hin. Auf mRNA- und auch auf Protein Ebene kann gezeigt werden, dass der Hippocampus über alle notwendigen Enzyme zur Steroidbiosynthese verfügt (Furukawa et al. 1998, Kimoto et al. 2010). Dabei kann Aromatase-Immunreaktivität sowohl in Pyramidenzellen in der CA1-CA3 Region als auch im Gyrus dentatus mittels IHC und sogar elektronenmikroskopisch mit Immunogold-Färbung nachgewiesen werden (Hojo et al. 2004, Kimoto et al. 2010).

Aus Entwicklungsstudien an Mäusen wissen wir, dass die Expression der Aromatase mRNA im Laufe der Entwicklung im Hippocampus bei Mäusen abnimmt (Ivanova und Beyer 2000). Jedoch fehlen bislang vergleichende Untersuchungen der Aromatase mRNA Expression innerhalb der Geschlechter im Laufe der Ontogenese bei Ratten. Ebenso ist ungeklärt, ob sich das Expressionsmuster der zur Aromatase mRNA befähigten Zellen innerhalb der Ontogenese verändert. Die Aromatase und ihre geschlechterspezifische ontogenetische Expression ist aus dem Grund von besonderem Interesse, weil das endogen synthetisierte Estradiol vielfältige Funktionen im Hippocampus hat, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

3.5.2 Neuroprotektive Effekte durch Estradiol

Mehrere Studien weisen eine neuroprotektive Wirkung der Aromatase im Gehirn nach (Garcia-Segura et al. 1999 a, b). So kann nach mechanisch induzierten Verletzungen im Ratten-Gehirn eine veränderte Expression und Aktivität der Aromatase beobachtet werden (Garcia-Segura et al. 1999 a, b). Die hierdurch induzierte erhöhte Aromatase-Aktivität geht mit einem erhöhten Estradiol-Gehalt im Gehirn einher (Garcia-Segura et al. 1999 b). Bei Ratten und Mäusen zeigt sich sowohl nach mechanischer Läsion im Hippocampus als auch nach Gabe von Glutamat-Rezeptor Agonisten, wie Kainat oder Domoinsäure, die durch gesteigerte Exzitation an der Nervenzelle neurotoxisch wirken, eine Induktion der Aromatase mRNA Expression in Astrozyten. In der Kontrollgruppe ist in Astrozyten keine Aromatase-Expression nachweisbar (Garcia-Segura et al. 1999 b). Eine neuroprotektive Wirkung der Aromatase kann auch in Knockout (KO)- Mäusen belegt werden. Männliche Aromatase-(ArKO)-Mäuse zeigen nach Gabe von Domoinsäure einen signifikanten Neuronenverlust, wohingegen die Substanz bei Wild-Typ Mäusen keine toxischen Effekte verursacht (Azcoitia et al. 2001). Auch ovariectomisierte Ratten, die mit dem Aromatase-Inhibitor Fadrozol behandelt wurden, zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Kainat, verglichen mit Ratten, die lediglich kastriert wurden (Veiga et al. 2005). Diese Befunde deuten daraufhin, dass extragonadal synthetisiertes Estradiol sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen neuroprotektiv wirkt. Gestützt wird diese These durch Untersuchungen an weiblichen ArKO-Mäusen im Tiermodell. So induziert ein Verschluss der Arteria cerebri media in ArKO-Mäusen einen größeren ischämischen Schaden als im Gehirn ovariectomierter Wild-Typ Mäuse (McCullough und Hurn 2003). Nach Zugabe physiologischer Mengen an Estradiol sind, weder bei der ArKO- noch bei der Wild-Typ Maus, Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber neurotoxischen Substanzen zu beobachten. Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass extragonadal synthetisiertes Estradiol eine neuroprotektive Wirkung hat.

3.5.3 Neuronale Proliferation und Neuritenwachstum durch Estradiol

Um die Proliferation durch Estradiol zu untersuchen, wurden Experimente in Zellkulturen durchgeführt. Da Pyramidenzellen und Interneurone im Hippocampus post-mitotisch sind und daher nicht proliferieren können, wurden Dispersionskulturen von Körnerzellen aus dem Gyrus dentatus neonataler Ratten untersucht. In diesen spezifischen Neuronensubpopulationen kann gezeigt werden, dass Estradiol neuronale Proliferation im Hippocampus beeinflusst (Fester et al. 2006). Die Inhibierung der Estradiolsynthese mittels

StAR-siRNA transfizierten Zellen führt zu einer 50-prozentigen Abnahme (Ki-67-positiver) proliferativer Neurone im Hippocampus (Fester et al. 2006). Ki-67 ist ein nukleäres Protein, dessen Nachweis nur bei proliferativen Zellen möglich ist (Del Bigio 1999). Behandlungen der Zellkulturen mit Letrozol in verschiedenen Dosen führen zu einer dosisabhängigen Abnahme Ki-67 positiver Zellen. In „rescue“ Experimenten, in denen Letrozol gleichzeitig mit sehr hohen Dosen an Estradiol von 100 nM verabreicht wird, kann die Abnahme von Ki-67 positiven Zellen verhindert werden. Nur hohe Dosen, wie sie vermutlich *in vivo* im Gehirn lokal durch endogene Estradiol-Synthese erreicht werden können, sind in der Lage, diesen Effekt zu erzielen. Serum-Konzentrationen von 100 pM dagegen zeigen keinen Effekt, was die Funktion gonadalen Estradiols im Hippocampus unwahrscheinlich erscheinen lässt (Fester et al. 2006).

Auch das neuronale Wachstum wird durch Estradiol im Hippocampus beeinflusst. Die Inhibierung der lokalen Estradiolsynthese in neonatalen Zellkulturen mit dem Aromatase-Inhibitor Letrozol bzw. mittels StAR-siRNA Transfektion führt zu einer verminderten Expression von „Growth associated protein-43“ (GAP-43), einem Axonwachstumsmarker, und damit zu einem verminderten Axonwachstum. Behandlungen der Zellkulturen mit physiologischen Serumkonzentrationen (100 pM) erzielen keine Effekte. Nur die Behandlung mit sehr hohen Dosen von Estradiol in einer Konzentration von 100 nM kann zu einer vermehrten Expression GAP-43 positiver Neurone gegenüber nicht behandelten Kulturen führen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Funktion hippocampal synthetisierten Estradiols im Neuritenwachstum im Hippocampus (von Schassen et al. 2006).

Das von der Aromatase synthetisierte Estradiol hat somit entscheidende Funktionen auf das Axonwachstum im Hippocampus. Denkbar wäre demnach, dass postnatal im Vergleich zum Adulten eine gesteigerte Expression der Aromatase zu verzeichnen ist. Vor diesem Hintergrund ist die Untersuchung der Aromatase mRNA Expression im Laufe der Ontogenese von Interesse.

3.5.4 Estradiol vermittelte synaptische Plastizität

Unter synaptischer Plastizität versteht man dynamische Auf- und Umbauprozesse neuronaler Synapsen. Sie ermöglichen dem Gehirn auf veränderte Reizintensitäten zu reagieren. Synaptische Proteine werden prä- oder postsynaptisch im Spine exprimiert und geben Auskunft über plastische Veränderungen im Gehirn. Dazu gehört Spinophilin, ein Zytoskelettprotein, das im Spine der Postsynapse lokalisiert ist und als postsynaptischer Marker genutzt werden kann (Feng et al. 2000). Spines sind dornenähnliche Protrusionen und

finden sich an Dendriten hippocampaler Neurone. Sie vergrößern die neuronale Oberfläche erheblich, die für synaptische Kontakte zur Verfügung stehen (Gray 1959). Synaptophysin wird in synaptischen Membranvesikeln exprimiert und kann als präsynaptischer Marker verwendet werden (Wiedenmann und Franke 1985). Im Hippocampus synthetisiertes Estradiol reguliert synaptische Plastizität (Kretz et al. 2004, Rune und Frotscher 2005, Prange-Kiel et al. 2006). An hippocampalen Schnittkulturen (HC), die mit dem Aromatase-Inhibitor Letrozol behandelt wurden, zeigt sich eine herunterregulierte Expression von Synaptophysin und Spinophilin. Behandlungen der Schnittkulturen mit hohen Mengen an Estradiol (100 μ M) zeigen keine Zunahme von Spines. Bei einer Behandlung der Kulturen mit Letrozol in einer Konzentration von 100 μ M, bei der die Estradiolsynthese maximal gehemmt ist, kann eine Abnahme von Synaptophysin und Spinophilin beobachtet werden. Eine gleichzeitige Gabe von Letrozol und physiologischen Serumkonzentrationen von Estradiol – 1 pM bei männlichen und 100 pM bei weiblichen Ratten – führt ebenfalls zu einer Abnahme präsynaptischer Proteine. Lediglich die Behandlung mit Letrozol und Estradiol in hohen Dosen (100 nM) kann die induzierte Abnahme an synaptischen Proteinen wieder aufheben (Kretz et al. 2004). Diese hohe Konzentration an Estradiol könnte der lokalen Konzentration im Hippocampus entsprechen, die durch hippocampal synthetisiertes Estradiol erzielt wird. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung endogen synthetisierten Estradiols im Hippocampus für die synaptische Plastizität.

4. Fragestellung

Das von der Aromatase gebildete Estradiol hat bedeutende Funktionen in Bezug auf Neuroprotektion, synaptische Plastizität und Synaptogenese im Hippocampus (Garcia Segura et al. 1999 a, b, Prange-Kiel et al. 2003, Kretz et al. 2004, von Schassen et al. 2006). In Entwicklungsstudien im Hippocampus von Nagern wird mit zunehmenden Alter eine Abnahme der Expression der Aromatase mRNA mittels PCR belegt (Lauber und Lichtensteiger 1994, Ivanova und Beyer 2000). Im Laufe der Ontogenese sind bislang weder vergleichende Untersuchungen der regionalen Expression innerhalb der Geschlechter noch Messungen des Aromatase mRNA-Gehalts im Hippocampus erfolgt. Dies ist vor dem Hintergrund kognitiver geschlechterspezifischer Unterschiede von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit soll daher im Hippocampus der Ratte beider Geschlechter im Laufe der Ontogenese die Menge an Aromatase mRNA quantitativ mittels „real time“ PCR bestimmt und die regionale Verteilung der mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht werden. Unterschiede in dem Expressionsmuster der Aromatase mRNA in Abhängigkeit vom Geschlecht und vom Alter sollen untersucht werden.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Aluminiumfolie	LAGER UKE
Einwegskalpelle	BRAUN
Ep T.I.P.S. Standard verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Falcon Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	BECTON DICKINSON LABWARE
Gefrierschrank	LIEBHERR
GeneAmp PCR System 2400	PERKIN ELMER, USA
Handschuhe	KIMBERLY-CLARK
Heidemannspatel M	AESFULAP
Heizplatte HI1220	LEICA
Heizblock VLM2Q	GEFRAN
Hettrich Zentrifuge EBA1R	HETTRICH
Hettrich Zentrifuge Universal 32R	HETTRICH
<i>in situ</i> - Rahmen	EPPENDORF AG
<i>Cryo-Star</i> HM 560	MICROM
Kryotec -80°C	KRYOSAFE GMBH
Kühlschrank	BOSCH
Light Cycler 480	ROCHE
Axioskop 2, HBO100, MC80, EBQ100	ZEISS
Office 2008	MICROSOFT
OS X	MACINTOSH
Parafilm M	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
PCR-Reaktionsgefäße	SARSTEDT/EPPENDORF
Pinzette nach Dumount	MERCK
Pipettenspitzen mit Filter	STARLAB
Pipetten, verschiedene Volumina	GILSON
Reaktionsgefäße, 1,5ml	EPPENDORF AG
RNase freie Objektträger SuperFrost Plus	KARL HECHT AG
RotorGene 3000	CORBETT

Schere	AESULAP
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Waage	SARTORIUS
Wärmeplatte MR3001	HEIDOLPH
Wasserbad mit Schüttler	GFC
6-well-Platte	BECKTON DICKINSEN LABWARE
Zellstofftücher	WEPA

5.1.2 Chemikalien

Agarose	INVITROGEN
alkalische Phosphatase	BIOMOL
Aqua ad iniectabilia	BAXTER, DEUTSCHLAND
BCIP (Bromochloroindolylphosphat)	ROCHE
BSA (bovines Serumalbumin)	SIGMA
Blockier Reagens	ROCHE
DABCO (Diazabicyclooctan)	ROTH
DEPC (Diethyldicarbonat)	ROCHE
Denhardt	SIGMA
Dextransulfat	ROCHE
Entellan [®]	MERCK
Ethanol 100%	BAKER
Ethidiumbromid	APPLICHEM
exACTGene 100bp DNA Leiter	FISHER HEALTH CARE, USA
Ficoll	SIGMA
Formamid 50% deionisiert	ROCHE
Formamid 50 %	ROCHE
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	APOTHEKE, UKE
HCl (Salzsäure)	MERCK
Heringsperm-DNA	SIGMA
KCl (Kaliumchlorid)	MERCK
Ketamin	ALBRECHT
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	SIGMA

Mercaptoethanol	APOTHEKE, UKE
NaCl (Natriumchlorid)	MERCK
Natrium-Citrat	SIGMA
NaOH (Natriumhydroxid)	MERCK
Nickelchlorid	ROSS-CHEMIE
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	ROCHE
Paraformaldehyd	MERCK
Polyvinylpyrolidon	MERCK
Proteinase K	ROCHE
Rompun 2%	BAYER
Saccharose	INVITROGEN
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SIGMA
<i>Tissue Tek</i>	SAKURA
tRNA (<i>transfer</i> RNA)	SIGMA
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	INVITROGEN
Trizol	INVITROGEN

5.1.3 Kits

QIAquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Power SYBR Green PCR Master MIX	Applied Biosystems, USA
Dynabeads mRNA Purification Kit	Invitrogen, USA
DirectPCR Lysis Reagens	Viagen Biotech, USA
SuperScript III First Strand Synthesis Kit	Invitrogen

5.1.4 Lösungen

Agarose Gel

- 1 g Agarose bei 1% igen Gelen bzw. 3 g bei 3% igen Gelen in 100 ml 0,5X TE Puffer unter Rühren erhitzen bis die Lösung klar wird
- Abkühlen der Lösung und Zugabe von Ethidiumbromid (10 µl, 5µg/ml Stammlösung)
- Gießen in einen mit Kamm vorbereiteten Gelträger
- Aushärten der Lösung bei RT und Entfernung des Kamms

20x SSC pH 7,0

- 175,3 g NaCl
- 88,2 g Na-Citrat lösen in
- 1000 ml Aqua dest., dann pH einstellen auf 7,0 bei RT

50x Denhardt

- 5 g Polyvinylpyrolidon
- 5 g Ficoll
- 5 g BSA in 500 ml DEPC-H₂O lösen

Blockierlösung 2 %

- 2 g Magermilchpulver in 100 ml DIG 1 Puffer auf Wärmeplatte unter Rühren lösen
- Abkühlen lassen

DEPC-H₂O

- 1 ml DEPC in 1000 ml Aqua dest. geben, kräftig schütteln. Über Nacht stehen lassen
- Autoklavieren am folgenden Tag

DIG 1 Puffer pH 7,4

- 100 ml 1M TRIS-HCl pH 7,5
- 30 ml 5 M NaCl
- ad 1000 ml, dann Titration mit HCl oder NaOH bei RT bis pH 7,4 erreicht ist

DIG 2 Puffer, pH 9,5

- 100 ml 1M TRIS-HCl pH 9,5
- 20 ml 5M NaCl
- 50 ml 1M MgCl₂
- ad 1000 ml auffüllen, Titration mit NaOH oder HCl bei RT bis pH 9,5 erreicht ist

Färbelösung für die *in situ*-Hybridisierung

- 150 µl NBT
- 150 µl BCIP

- in 50 ml DIG 2 Puffer lösen

Hybridisierungs-Puffer

- 1g Dextransulfat in 4,9 ml DEPC-H₂O in einem autoklavierten Messbecher auf der Wärmeplatte lösen
- Zugabe von 4 ml 20x SSC, 0,4 ml 50x Denhardt, 0,5 ml Heringsperm-DNA und 0,2 ml tRNA

Ketamin-Lösung

- 2,4 ml Ketamin
- 1,6 ml Rompun
- ad 0,9 % NaCl lösen

NaCl 0,9 %

- 9 g NaCl in
- 1000 ml Aqua dest. lösen

PFA 4%

- 900 ml Aqua dest. auf 65-70 °C erhitzen
- 4 g Paraformaldehyd zugeben und unter Rühren lösen
- Zugabe von 1N NaOH (ca. 500 µl)
- Bei ca. 65 °C rühren bis die Lösung klar wird
- Abkühlen auf Raumtemperatur
- Zugabe von 100 ml 10x PBS
- Titration von NaOH oder HCl bis pH 7,4

PBS

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Dinatriumhydrogensulfat
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
- in 1000 ml Aqua dest. bei RT lösen

Saccharose-PBS- Lösung 25%

- 25 g Saccharose
- in 100 ml PBS pH 7,4 lösen

Tris-HCl 1 M pH 9,5, pH 7,5

- 60,55 g Tris in 300 ml Aqua dest. lösen
- pH 9,5 bzw. pH 7,5 einstellen
- mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

10x TBE Puffer

- 10 x TBE-Pulver (Invitrogen) in
- 200 ml Aqua dest. nach Angaben des Herstellers unter Rühren lösen

0,5x TE Puffer

- 100 ml 10x TBE Puffer in
- 2000 ml Aqua dest. lösen

5.2 Methoden

5.2.1 Verwendung von Versuchstieren

Für die vorliegende Arbeit wurden WISTAR Ratten aus der Tierzucht des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) verwendet. Alle Tiere wurden unter Standardlaborbedingungen mit frei zugänglichem Futter und Wasser gehalten. Für die „real time“ PCR-Analyse wurden pro Altersstufe und Geschlecht je 3 Tiere verwendet. Zusätzlich wurden je drei Tiere am 18. Embryonaltag (E18) für die erste experimentelle Serie mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und vier embryonale Tiere für die zweite experimentelle Serie mit Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) als interner Standard verwendet. Für die *in situ*-Studien wurden je drei Tiere beider Geschlechter für die Altersstudien (postnatal Tag 5 (P5), postnatal Tag 18 (P18) und 10 Wochen (10W) alte Tiere) verwendet. Die Experimente fanden unter Berücksichtigung der geltenden gesetzlichen Bestimmungen statt.

5.2.2 RNA-Extraktion und Gewebeaufbereitung für die „real time“ PCR

Versuchstiere am P5, P18 und an 10W wurden mit CO₂ narkotisiert. Im Anschluss an die Dekapitation wurden die Gehirne entnommen. Entlang der Fissura longitudinalis cerebri erfolgte die Auftrennung in zwei Teile. Die Hippocampi wurden mit Hilfe eines Heidemannspatels frei präpariert und in eine auf Eis ruhende, mit PBS gefüllte Petrischale überführt.

Die Gewinnung der Hippocampi der embryonalen Tiere (E18) für die „real time“ PCR Analyse gestaltete sich wie folgt: Das Muttertier wurde mit CO₂ narkotisiert und dekapitiert, der Uterus durch einen Bauchhöhlenschnitt freigelegt und vorsichtig herauspräpariert. Die Embryonen wurden dem Uterus entnommen und in eine auf Eis gelagerte PBS Lösung überführt. Unter Mikroskopsicht wurden die Hippocampi, wie oben beschrieben, präpariert. Die RNA-Extraktion erfolgte gemäß den Anweisungen des RNeasy Mini Handbooks von QIAGEN. Nach erfolgter Präparation des embryonalen Hippocampus wurden von jedem Tier beide Hippocampi unter Zugabe von 0,3 ml Trizol bei -20 °C eingefroren.

Bei den Hippocampi am P5, P18 und 10W wurde beide Hippocampi eines Tieres mit 1 ml Trizol eingefroren. Zuvor wurde bei den Tieren am E18, P5 und P18 Schwanzproben zur Geschlechterbestimmung entnommen. Nach Geschlechterbestimmung (siehe 5.2.6) wurden diese, wie alle weiteren Proben, zusätzlich aufbereitet. Die RNA-Extraktion erfolgte gemäß

den Anweisungen des Originalprotokoll TRIZOL von Invitrogen. Im Anschluss daran wurde die RNA-Konzentration der Proben Ultraviolett (UV)-spektrometrisch bestimmt.

5.2.3 Qualitätskontrolle der RNA-Extraktion

Die UV-Spektroskopie diente zur Bestimmung der Konzentration sowie des Reinheitsgrades der isolierten RNA. Zunächst erfolgte der Nullabgleich mit Wasser in Quarzküvetten bei 260 nm und 280 nm. Dann wurde die RNA im Verhältnis zu je 1:100 und 1:50 in Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette pipetiert. Bei 260 nm und 280 nm erfolgte die photometrische Messung mit UV-Absorption gegen Wasser als Leerwert. Eine Absorption bei 260 nm ist charakteristisch für die RNA Struktur. Bei reiner RNA Probe sollte die Ratio von 260 nm zu 280 nm zwischen 1,8 und 2,1 betragen. Eine Ratio kleiner 1,8 spricht für eine Verunreinigung mit Proteinen. Eine UV-Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA Konzentration von 40 µg/ml. Entsprechend der Formel

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40\mu\text{g/ml},$$

wobei E = Extinktion

ist die Extinktion auf die einzelnen Verdünnungen umzurechnen.

Um zu überprüfen, ob die unter Punkt 5.2.2 aufgereinigte RNA intakt war, erfolgte eine Agarosegelelektrophorese. Dazu wurde ein 2% Agarose Gel mit 0,5X TE-Puffer und 0,07 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. 2 µl von der gereinigten RNA wurden mit 10 µl RNase freiem Wasser und 5 µl Laufpuffer gemischt, auf das Gel aufgetragen und mit einer Spannung von 80V aufgetrennt. Eine 100 bp Leiter zur Identifizierung der Fragmentgröße wurde mit auf das Gel aufgetragen. Unter UV-Licht wurde das Gel nach Abschluss der Elektrophorese fotografiert.

5.2.4 Isolierung der mRNA aus Gesamt-RNA

Um gereinigte mRNA einzusetzen (Messung mit HPRT1 als Referenzgen), wurde die mRNA mit Hilfe von magnetischen Polystyren-Kügelchen („Dynabeads“), an die Oligo-Nukleotide kovalent binden, isoliert. Hierzu wurden 15 µg Gesamt-RNA in 50 µl DEPC-H₂O verdünnt. Anschließend erfolgte die mRNA Isolierung gemäß dem Handbuch des Dynabeads[®] mRNA Purification Kits von Invitrogen. Acht µl der gereinigten RNA wurden bei der cDNA Synthese eingesetzt, was einer Menge von 300 ng mRNA entspricht.

5.2.5 Aufbereitung der Schwanzproben zur Geschlechterbestimmung

Um das Geschlecht bei den Tieren am E18, P5 und P18 zu bestimmen, wurde gleichzeitig mit der Entnahme des Hippocampus bei jedem Tier eine 0,5 cm lange Schwanzprobe entnommen und diese gemäß dem Protokoll mit dem Direct PCR Lysis Reagens (Viagen Biotech) weiter aufbereitet. Zuvor wurde die Proteinase K wie folgt aufbereitet: Die lyophilisierte Proteinase K wurde mit 10 ml sterilen Aqua dest. in einem Falconröhrchen gelöst. Die Endkonzentration hierbei betrug 10 mg/ml. Diese Lösung wurde zu je 500 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung des Lysis Mix wurde die Proteinase K im Direct PCR Lysis Reagens in einer Konzentration von 0,4 mg/ml gelöst. Gemäß den Herstelleranweisungen des Direct PCR Lysis Reagens wurden 300 µl Lysis mix für 0,5 cm Rattenschwanz benötigt.

Für die Rattenschwanzlyse wurde das Gewebe in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 300 µl des Lysis Mix hinzugefügt. Auf einem Rüttler wurden die Reaktionsgefäße bei 55 °C 6 h lang inkubiert bis keine Gewebestücke mehr erkennbar waren. Zur Inhibierung der Proteinase K Aktivität wurde das Lysat 45 min. bei 85 °C im Wasserbad inkubiert. Das gewonnene Lysat wurde bei -20 °C tiefgefroren.

5.2.6 Geschlechterbestimmung mit PCR

Die Genotypisierung der Ratten am E18, P5 und am P18 wurde mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Als Positivkontrolle für das Vorliegen eines männlichen Geschlechts wurde der Nachweis von der „Sex determining region Y“ (SRY), welches auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist, verwendet. Als PCR-Kontrolle diente beta-Actin (bact).

Die Primer-Sequenzen wurden bei Poletti et al. (1998) publiziert.

SRY *forward* : 5'-TAC AGC CTG AGG ACA TAT TA-3'

SRY *reverse*: 5'-GCA CTT TAA CCC TTC GAT GA-3'

bact *forward*: 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3'

bact *reverse*: 5'-TGT GGT GGT GAA GCT GTA GC-3'

Die entsprechenden Sequenzen wurden bei der Firma Integrated DNA Technologies (München, Deutschland) bestellt und hergestellt. 2,5 µM eines jeden Primers wurden angesetzt, aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

5.2.6.1 DNA Isolierung und PCR basierte Genotypisierung mittels PCR

Die PCR ist ein Verfahren, welches die *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten ermöglicht. Die PCR gliedert sich in folgende Reaktionszyklen: Denaturierung-, Annealing- und Extensionsphase. In der Denaturierungsphase wird der DNA Doppelstrang bei 95 °C in Einzelstränge getrennt. In der Annealingphase bindet der Oligonukleotid Primer an den DNA-Einzelstrang. Als letzter Schritt eines jeden Zyklus schließt sich die Extensionsphase bei 72 °C an. In dieser Phase komplettiert die Taq-Polymerase die einsträngige DNA unter Verwendung von dNTP zu Doppelsträngen. Der Ablauf der drei Schritte erfolgt zyklisch (34 Zyklen). Dabei sollte bei jedem Zyklus eine Verdopplung der Zielsequenz zu beobachten sein. Da jedes Produkt wiederum als Zielsequenz neuer Amplifikationen dient, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung. Die gesamte Reaktion wird durch den Verbrauch von dNTP und Primern sowie einer Abnahme der *Thermo aquaticus* (Taq)-Polymerase-Aktivität limitiert (Mullis et al. 1986). Die PCR wurde im GeneAmp PCR System 2400 der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Folgender Ansatz wurde angesetzt:

INHALT	Volumen
10x PCR Puffer	2 µl
dNTP (2,5 mM)	2 µl
SRY <i>forward</i> (2,5 µM)	2 µl
SRY <i>reverse</i> (2,5 µM)	2 µl
bact <i>forward</i> (2,5 µM)	2 µl
bact <i>reverse</i> (2,5 µM)	2 µl
Taq Polymerase (TAKARA)	0,1 µl
Wasser	6,9 µl
Gesamtvolumen	19 µl

Die Lösung wurde auf Eis gelagert. Je 19 µl des Ansatzes wurden in ein 500 µl Reaktionsgefäß pipettiert und 1 µl Lysat hinzugefügt.

Folgendes Temperaturprogramm wurde für die PCR gewählt:

Initiale Denaturierung: 95 °C für 2 min; 34 Zyklen: Denaturierung/Annealing/Elongation:
 Denaturierung: 95 °C für 1 min.; Annealing: 52° C für 1 min; Elongation 72 °C für 1 min;
 Endelongation 72 °C für 5 min.

Im Anschluss wurden die Proben auf ein 3% Agarose Gel mit einem 100 bp Marker aufgetragen. SRY hat eine PCR-Produkt Größe von 317 bp; bact von 220 bp.

5.3 „Real time“ PCR Verfahren

5.3.1 Grundlagen der „real time“ PCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR wird mit der „real time“ PCR die Anzahl der entstandenen DNA-Kopien mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe (z.B. SYBR-Green) nach jedem Zyklus im direkten Anschluss sofort gemessen. Dieser Farbstoff bindet ausschließlich an doppelsträngige DNA und ändert dadurch sein Emissionsmaximum. Bei einer Wellenlänge von 530 nm kann die Zunahme doppelsträngiger DNA gemessen werden.

Die gesamte PCR gliedert sich in eine frühe Phase, in eine exponentielle Phase und in eine Plateauphase. In der frühen Phase übertreffen die Hintergrundsignale diejenigen des PCR Produktes. Hintergrundsignale entstehen durch Bildung unspezifischer Produkte. Nach einer gewissen Zyklenzahl, abhängig von der Ausgangsmenge an eingesetzter cDNA, übertreffen die Fluoreszenzsignale des PCR Produktes die Hintergrundsignale. Der Zyklus, an dem die spezifische Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt, wird als „Cycle threshold“ (Ct) bezeichnet. Er kennzeichnet den Beginn der exponentiellen Phase (Pfaffl 2004). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich in allen Proben die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA (Pfaffl 2004). Der Ct kann Software-gestützt oder manuell festgelegt werden. Quantifiziert wird die Expression des Zielgens in Bezug auf ein „Housekeeping“-Gen (HKG), d.h. einem ubiquitär vorkommenden und nicht regulierten Gen.

5.3.2 Primer Design zur Herstellung von GAPDH und HPRT1

Bei der Herstellung von Primern müssen verschiedene Kriterien beachtet werden. Die Primersequenz muss spezifisch für das zu amplifizierende Produkt sein und der zu untersuchenden Spezies entsprechen. Dabei sollte die Länge der Primer 20 Nukleotide nicht überschreiten. Die Schmelztemperaturen für *forward* und *reverse* sollten bei 60 °C liegen, das Amplifikationsprodukt sollte dabei eine Länge von ungefähr 100 bp aufweisen.

Die entsprechende Gensequenz wurde über:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>

gesucht.

Die „Accession Number“ für GAPDH lautet NM_017008.

Nachdem die geeigneten Sequenzen gefunden wurden, wurden entsprechende Primer mit Hilfe des Primersuchprogrammes, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, ermittelt.

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer ergaben sich folgende Sequenzen:

GAPDH *forward*: 5' - TGCCACTCAGAAGACTGTGG - 3'

GAPDH *reverse*: 5' - TTCAGCTCTGGGATGACCTT - 3'

Die Sequenz für die Herstellung von HPRT1 wurde bereits von van Wijngaarden et al. (2007) publiziert. Die entsprechende Sequenz lautet:

HPRT1 *forward*: 5' - TTGTTGGATATGCCCTTGACT - 3'

HPRT1 *reverse*: 5' - CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG - 3'

Die Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) bestellt.

5.3.3 Aromatase Primer

Bei den Aromatase Primern handelte es sich um von der Firma QIAGEN hergestellte Primer. Die amplifizierte Region umfasst 99 bp (Abb. 6). Die entsprechende Sequenz lautet:

ARO-*forward*: 5' - CCATGGCAGATTCTTGTGGA- 3'

ARO-*reverse* : 5' - TGCTGTGCTTCATCACATGG- 3'

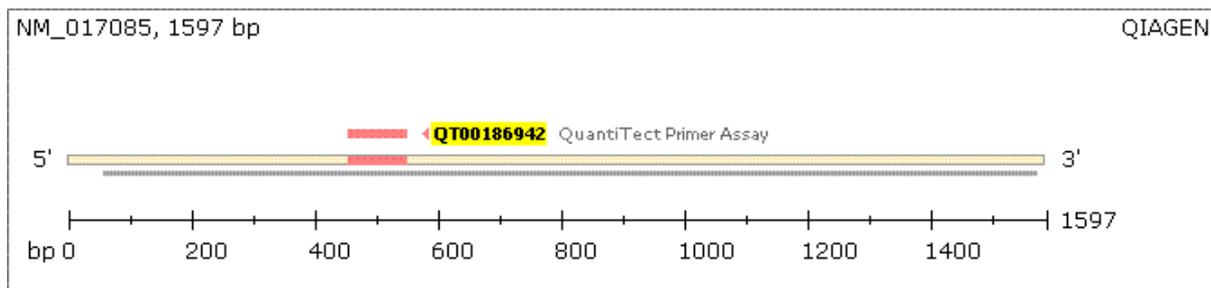


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aromatase Primersequenz. Der rot markierte Bereich entspricht dem Amplifikationsbereich (<https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/QTPrimerView.aspx?ID=QT00186942>).

5.4 Durchführung der „real time“ PCR

5.4.1 „Real time“ PCR mit GAPDH als Referenzgen

Bei der Durchführung der „real time“ PCR mit GAPDH als Referenzgen wurde das QuantiTect SYBR-Green RT-PCR Kit von QIAGEN verwendet. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe ergaben ein optimales Gesamt-RNA Einsatzvolumen von 5 µg/µl, was einer

Menge von ca. 100 ng mRNA entspricht. Ein MasterMix mit einem Gesamtvolumen von 25 µl wurde angesetzt und alle Ansätze in Dreifachbestimmung gemessen. Bei dem Kit handelte es sich um ein sog. „One step“ System, d.h. die verwendete RNA wird zunächst in cDNA umgeschrieben, ehe der PCR Zyklus beginnt. Die „real time“ PCR wurde im RotorGene 3000 (Corbett, Australien) durchgeführt.

MasterMix der „real time“ PCR mit Aromatase- und GAPDH- Primer:

INHALT	ARO	GAPDH
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR MasterMix	12,5 µl	12,5 µl
QuantiTect RT Mix	0,25 µl	0,25 µl
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i> GAPDH 0,8 µM		2,0 µl
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i> ARO 0,6 nmol	1,0 µl	
RNase freies H ₂ O	6,25 µl	5,25 µl
Gesamt-RNA (1µg/µl)	5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	25 µl	25 µl

Das PCR Programm mit GAPDH - und Aromatase Primern sah folgenden Ablauf vor:
Reverse Transkription: 30 min bei 50 °C, initiale Denaturierung: 15 min bei 95 °C, 45 Zyklen: Denaturierung/Annealing/Elongation: Denaturierung: 15 Sekunden bei 94 °C, Annealing: 30 Sekunden bei 52 °C, Elongation 30 min bei 72 °C.

5.4.2 „Real time“ PCR mit HPRT1 als Referenzgen

Die „real time“ PCR mit HPRT1 als Referenzgen wurde mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix von Applied Biosystems durchgeführt, welches ein „two step“- System darstellt. Dies bedeutet, dass zunächst die aufgereinigte mRNA in *copy*-DNA (cDNA) umgeschrieben werden muss.

Die cDNA Synthese wurde mit dem SuperScriptIII First-Strand Synthese Kit von Invitrogen durchgeführt.

Hierfür wurden 8 µl der unter 5.2.4 isolierten RNA (ca. 300 ng mRNA), 1 µl *random*-Hexamer Oligonukleotide und 1 µl dNTP mix für 5 min lang bei 65 °C inkubiert, ehe sie für mindestens eine Minute auf Eis gestellt wurden.

Der folgende cDNA Synthese Mix sah wie folgt aus (aus: SuperScriptIII First-Strand Synthese Kit von Invitrogen):

INHALT	Volumen pro Probe
10x RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT	1 µl
SuperScript III	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Danach wurden je 10 µl des cDNA Synthese Mix zu jeder Reaktion hinzugefügt, vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Es folgten Inkubationsvorgänge für 10 min bei 25 °C, 50 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C, ehe die Proben auf Eis gelagert wurden. Zur Abtrennung der RNA wurde die Proben kurz zentrifugiert, 1 µl RNaseH zu jeder Probe hinzugefügt und dann bei 37 °C 20 min inkubiert, ehe die cDNA auf Eis gelagert wurde.

Zur Durchführung der „real time“ PCR wurde ein Einsatzvolumen des *Templates* von 2 µl verwendet. Es wurden für alle Messungen Dreifachbestimmungen durchgeführt und ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 15 µl angesetzt. Die Versuche wurden im LightCycler 480 (Roche) durchgeführt.

Ansatz der „real time“ PCR mit Aromatase- und HPRT1-Primern:

INHALT	ARO	HPRT1
2X Power SYBR® Green PCR Master Mix	7,5 µl	7,5 µl
DEPC-H ₂ O	4 µl	3,7 µl
Primer, forward/reverse ARO (0,6 nmol)	1,5 µl	
Primer forward/reverse HPRT1 (2,5 µM)		1,8 µl
cDNA (<i>Template</i>)	2 µl	2 µl
Gesamtvolumen	15 µl	15 µl

Das PCR-Protokoll mit Aromatase- und HPRT1 als Referenzgen sah folgenden Ablauf vor:

1. Vorinkubation für 10 min bei 95° C, anschließend folgten 45 Zyklen: Denaturierung für 15 Sekunden bei 95° C, Annealing 60 Sekunden bei 60 °C, Elongation eine Sekunde bei 72 °C.

5.5 Auswertung der „real time PCR“ Ergebnisse

5.5.1 Relative Quantifizierung mittels der „Housekeeping“ Gene GAPDH und HPRT1

Die relative Quantifizierung vergleicht die Expression des Zielgens mit der eines „Housekeeping“ Gens (HKG). Bei der relativen Quantifizierung wird nicht die absolute Startkopienzahl berechnet. Vielmehr wird die Expression des Zielgens auf ein zweites, ubiquitär und nicht reguliertes Referenzgen bezogen, ein sog. HKG. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden die HKG GAPDH und HPRT1 gewählt. Ersteres katalysiert in der Glycolyse und Gluconeogenese die Umwandlung von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Diphospho-D-glycerat und HPRT1 ist ein Enzym im Purin-Stoffwechsel bei Eukaryoten.

5.5.2 Mathematische Grundlagen zur relativen Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein Referenzgen bezogen.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgt über die $\Delta\Delta$ Ct Methode, welche im Folgenden erläutert wird. Zur Normierung der Proben wird von jeder untersuchten Probe der Ct Wert des Referenzgens vom Ct Wert des Zielgens abgezogen:

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen},$$

wobei Δ = Delta

Nach der Normierung wird vom Δ Ct Wert der zu untersuchten Probe der Δ Ct Wert der standardisierten Gruppe abgezogen. Dieses Vorgehen wird als $\Delta\Delta$ Ct Berechnungsmodell beschrieben.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ standardisierte Gruppe}$$

Der relative Expressionsunterschied des zu untersuchenden Gens ergibt sich aus der arithmetischen Formel von Pfaffl (2004).

$$R: 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

wobei R = Ratio

Der reziproke Wert der Ratio der Ct Werte zwischen Referenz- und Zielgen ergibt den Faktor der Hoch- bzw. Herunterregulation des Zielgens.

Bei dem theoretischen Ansatz des Berechnungsmodells von Pfaffl (2004) wird eine Verdopplung der DNA Menge in jedem Zyklus angenommen, so dass eine PCR Effizienz von 2 zugrunde gelegt wurde.

5.5.3 Statistische Analyse der Expressionsunterschiede

Die statistische Auswertung der Expressionsunterschiede der ersten experimentellen Serie erfolgte sowohl mittels parametrischer einfaktorieller Varianzanalyse als auch in nicht parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis. Für die zweite experimentelle Serie wurden ausschließlich nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Tests und U-Tests nach Mann-Whitney durchgeführt. Eine statistische Signifikanz liegt bei einem p-Wert $\leq 0,05$ vor. Die Expressionsunterschiede und der Standard error of mean \pm SEM wurden grafisch dargestellt.

5.6 Durchführung der *in situ*-Hybridisierung

5.6.1 Perfusionsbedingungen für die *in situ*-Hybridisierung

Zur Narkotisierung erhielten die Ratten eine intraperitoneale Injektion eines Ketamincocktails (3 ml/kg KG). Nach Eintreten der Betäubung wurde das Peritoneum bis zum Diaphragma eröffnet. Nach Durchtrennung der Rippen mit einer Schere und nach Ablösen des Diaphragmas von der Brustwand, wurde das Herz aufgesucht und das rechte Atrium durch einen Schnitt eröffnet. Anschließend wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt und der Systemkreislauf mit 0,9 % isotoner Kochsalzlösung je nach Körpergröße perfundiert (P5: 30 ml in 3 min, P18: 50 ml in 5 min und 10W: 75 ml in 8 min). Anschließend erfolgte die Fixierung mit Hilfe von 4 % Paraformaldehyd abhängig von der Körpergröße (P5: 50 ml in 5 min; P18: 75 ml in 8 min; 10W: 100 ml in 10 min).

Nach Eintreten der Fixierung wurden die Tiere dekapitiert und die Gehirne mit Hilfe einer Knochenzange und einem Heidemannspatel aus dem Schädel präpariert.

Im Anschluss daran erfolgte die Nachfixierung der Gehirne mit Paraformaldehyd über Nacht bei 4 °C. Am darauf folgenden Tag wurden die Gehirne in eine 25 % Saccharose-PBS-Lösung überführt, nach 24 h in flüssigem Stickstoff in Methylbutan eingefroren und bei -80 °C gelagert. Mittels eines Kryostats wurden Gefrierschnitte mit einer jeweiligen Dicke von 12 µm angefertigt. Hierzu wurden die fixierten Gehirne mit *Tissue-Tek* auf die Probenhalter aufgefroren und so ausgerichtet, dass der Anschnitt frontal erfolgen konnte. Die angefertigten Frontalschnitte wurden auf RNase-freie Objektträger aufgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.6.2 Grundlagen der Aromatase *in situ*-Hybridisierungssonde

Grundlage für die Aromatase-Hybridisierungssonde war die von Zhao et al. (2007) publizierte Sonde. Als *Template* für die PCR wurde ein „full-length“ Ratten Aromatase cDNA Klon verwendet. Das 1140 Basenpaare (bp) lange PCR Produkt wurde in den Expressionsvektor pCR-Blunt II TOPO kloniert und in One Shot TOP10 kompetente Zellen transfiziert.

So konnte bei Linearisierung des Vektors mit Acc65I (oder mit HindIII) bei T7-Transkription eine *antisense*-Sonde, bei Linearisierung des Vektors mit EcoRV (oder mit NotI) bei SP6-Transkription, eine *sense*-Sonde generiert werden. Die Sonde wurde freundlicherweise von Dr. Christian Peters, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

5.6.3 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription mit dem Ziel der Digoxigenin Markierung erfolgte mit Hilfe der SP 6 Polymerase für die *sense*-Sonde (S) und mit Hilfe von T7 Polymerase für die *antisense*-Sonde (AS) gemäß den Herstelleranweisungen des DIG RNA Labeling Kit (Roche). Dazu wurden Digoxigenin-markierte Nukleotide (DIG) verwendet. Vor Ansetzen der Proben wurde die Plasmid DNA 5 min bei 80 °C inkubiert. Der Ansatz enthielt 4 µl Plasmid DNA, 2 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) (10x), 2 µl SP 6 oder T7 Polymerase1, 1 µl RNase Inhibitor und 2 µl 10x Pufferkonzentrat und wurde 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µl DNase und eine weitere Inkubation für 15 min bei 37 °C. Durch Zugabe von 2 µl 0,2 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) wurde die Reaktion gestoppt und mit 7,5 µl 4 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach 24 Stunden wurde die Probe für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und dann bei 14 000 rpm bei 4 °C für 10 min nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, in 100 µl Diethyldicarbonat (DEPC) Wasser aufgenommen und über die RNeasy Mini Spin Säule (QIAGEN) laut Protokoll des Herstellers gereinigt. Das Pellet wurde in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert.

5.6.3.1 Dot Blot Analyse zur Überprüfung der Sonden-Konzentration

Zu Bestimmung der Sonden-Konzentration wurde eine Dot Blot Analyse durchgeführt. Eine RNA Verdünnung (1:10, 1:100) wurde nach Vorschrift (DIG RNA Labeling Kit) angesetzt und je 1 µl der verdünnten Sonden sowie 1 µl einer Digoxigenin-markierten Kontroll RNA auf eine Nylonmembran aufgetragen. Danach wurde die Membran bei 1200 Volt (V) einem Ultraviolett (UV) „cross-linking“ unterzogen. Im Anschluss wurde die Membran für 30 min in einer Blockierlösung blockiert. Es folgten zwei Spülvorgänge mit DIG 1 Puffer. Anschließend wurde diese Membran 1 Stunde lang mit alkalischer Phosphatase in Blockierlösung inkubiert, ehe zwei Spülvorgänge mit DIG 1 Puffer für je 10 min und ein Spülvorgang mit DIG 2 Puffer für 10 min folgten. Mit Hilfe der Färbung durch Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und Bromochloroindolyolphosphat (BCIP) erfolgte der Sondennachweis. Da sowohl die Kontrolllösung als auch die *antisense*- und *sense*- Lösung jeweils in den Verhältnissen 1:10 und 1:100 verdünnt wurden, konnte die Sondenkonzentration anhand der Färbeintensität ermittelt werden. Für die AS- Probe ergab sich eine Endkonzentration von 10 ng/µl; für die S- Probe eine Endkonzentration von 100 ng/µl.

5.6.4 Durchführung der *in situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH) erlaubt die Detektierung zytoplasmatisch lokalisierter Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) in Gewebeschnitten. Da mRNA besonders anfällig für RNasen ist, muss bis zum Abschluss der Hybridisierungsreaktion unbedingt auf RNase freies Vorgehen geachtet werden. Aus diesem Grund müssen alle Glaswaren Hitze-sterilisiert und alle Lösungen, die man bis zum Abschluss der Hybridisierungsreaktion verwendet, mit DEPC Wasser angesetzt und autoklaviert werden.

Für die Entwicklungsstudien wurden Tiere der Altersstufen P5, P18 und 10W verwendet. Nach Auftauen der Schnitte wurden die Präparate bei Raumluft vollständig getrocknet (ca. 30 min). Danach erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 5 min (50 %, 60 %, 80 %, 96 %, 100 %). Nach Trocknung der Schnitte wurden *in situ*-Rahmen auf die Objektträger geklebt und die Gehirnschnitte mit 2xSSC 15 min inkubiert. Es erfolgte eine Inkubation mit 2xSSC und Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1 für 15 min. Im Anschluss erfolgte die Vorhybridisierung 1 h bei 50 °C mit Zugabe von 0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS). Mit Digoxigenin markierten S- bzw. AS- Sonden (Verdünnung im Verhältnis 1:400 im Hybridisierungspuffer mit Zugabe von 0,2 % SDS bei 50 °C) fand die Hybridisierung über Nacht statt. Die hergestellten und DIG-markierten Sonden wurden entsprechend den Vorgaben aus der Publikation von Zhao et al. (2007) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Die Inkubationskammern wurden nach Zugabe der Hybridisierungslösung luftdicht verschlossen. Am folgenden Tag wurden die Gehirnschnitte in 2xSSC (20 min Raumtemperatur), 2xSSC und 50 % Formamid (30 min 60 °C), 0,1x SSC und 50% Formamid (30 min 60°C), 0,1 SSC (30 min 60 °C) gewaschen. Danach wurden sie mit 2 % Blockierlösung 30 min inkubiert, ehe sie mit anti-Digoxigenin-Antikörper im Verhältnis von 1:1500 in DIG 1 Puffer in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 3 h inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Objektträger zweimal 10 min in DIG 1 Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Der dritte Spülvorgang wurde mit DIG 2 Puffer bei Raumtemperatur 5 min vorgenommen, ehe die Gehirnschnitte in die Färbesubstrate NBT und BCIP (3 µl/ml DIG 2 Puffer) zur kolorimetrischen Detektion überführt wurden. Die Detektion fand unter Lichtausschluss auf einem Schüttler bei Raumtemperatur statt, wobei die Färbelösung alle 8 h erneuert wurde, bis sich nach 24 h Signale zeigten. Dem anschließenden Spülen in DIG 2 Puffer und Aqua dest. je 5 min folgte die Einbettung unter Deckgläschen mit Diazabicyclooctan (DABCO) (fluoreszenzfreies Eindeckmedium). Nachdem die Deckgläschen getrocknet waren, wurden die Bilder mit einer Digitalkamera (Axioskop 2) fotografiert.

6. Ergebnisse

6.1 „Real time“ PCR Analyse

6.1.1 Qualitätskontrolle der extrahierten RNA

Um die Qualität der aus dem hippocampalen Gewebe isolierten RNA zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Material und Methoden 5.3.2). Hierbei wurden 5 µl Probe in 15 µl H₂O aufgenommen und pro Probe 10 µl auf ein 2 % iges Gel aufgetragen. Dabei waren keine RNA Degradationsprodukte in Form von niedermolekularem Schmier nachweisbar. Lediglich die ribosomale (r) 28S RNA und die 18 S rRNA waren als eindeutige, scharfe Banden zu erkennen und weisen darauf hin, dass die verwendete RNA intakt und nicht degradiert war (Abb. 7).

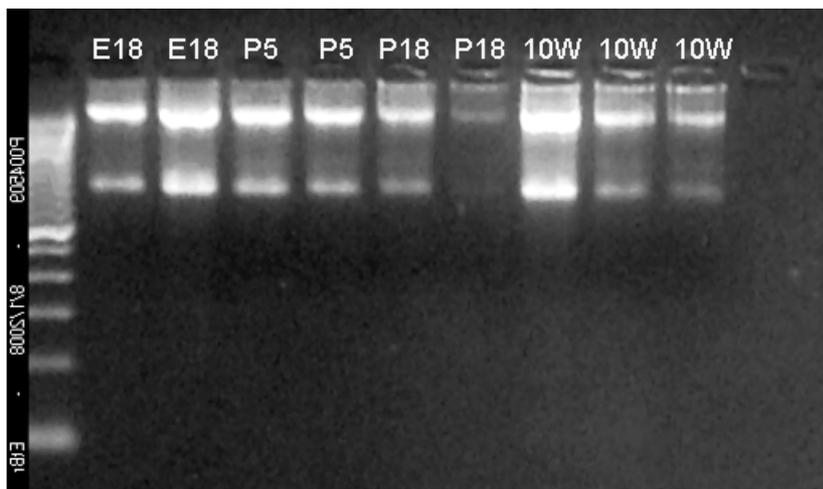


Abb. 7: Agarosegelelektrophorese ribosomaler RNA. Ein 100 bp Marker wurde aufgetragen (links). Pro Spur wurden 5 µl Probe in 15 µl H₂O verdünnt und 10 µl in jede Tasche aufgetragen.

Diese RNA wurde für die erste Serie der nachfolgenden „real time“ PCR Analysen verwendet, bei welcher GAPDH als interner Standard diente.

6.1.2 Quantitativer Nachweis der Aromatase mRNA im Hippocampus mittels „real time“ PCR

Es wurden in zwei von einander unabhängigen experimentellen Serien die Aromatase mRNA Menge im hippocampalen Gewebe von männlichen und weiblichen Ratten untersucht. Bei der ersten Serie wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt (entspricht 100 ng mRNA), revers transkribiert und mittels ausgewählter Primer (siehe 5.3.2) amplifiziert. Die Abb. 8 zeigt einen typischen Verlauf einer solchen „real time“ PCR Analyse. An dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, dass Aromatase mRNA in nur sehr geringen Mengen im Gewebe vorliegt, so dass ihr Nachweis erst bei einer relativ hohen Zyklenzahl (35-40 Zyklen) möglich ist. Da aus der ersten experimentellen Serie ersichtlich wurde, dass extrem geringe mRNA Mengen im hippocampalen Gewebe vorliegen, wurde eine zweite experimentelle Serie durchgeführt. In dieser wurde die aus 15 µg Gesamt RNA isolierte mRNA eingesetzt, was eine Menge von 300 ng mRNA entspricht. Diese wurde revers transkribiert und mittels ausgewählter Primer amplifiziert (siehe 5.3.2). Im hippocampalen Gewebe werden für GAPDH geringe Regulationen beschrieben und HPRT1 wird eher als Referenzgen im Hippocampus empfohlen (Bonefeld et al. 2008). Daher wurde in der zweiten experimentellen Serie HPRT1 als Referenzgen verwendet. Die in der zweiten Serie zur Amplifikation notwendigen Zyklenzahlen am E18 betragen 32. Bei allen anderen untersuchten Alterstufen lagen sie unter 30. Die Analyse der Schmelzkurve der aufgeführten Fragmente zeigt deutliche symmetrische Peaks ohne Schultern oder Vorpeaks. Dies ist ein Hinweis auf die Qualität der Primer und der gewählten Amplifikationsbedingungen (Abb. 9). Eine Primer-Effizienz-Analyse wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, so dass in nachfolgenden Berechnungen eine Effizienz von 2 zugrunde gelegt wurde (Pfaffl 2004).

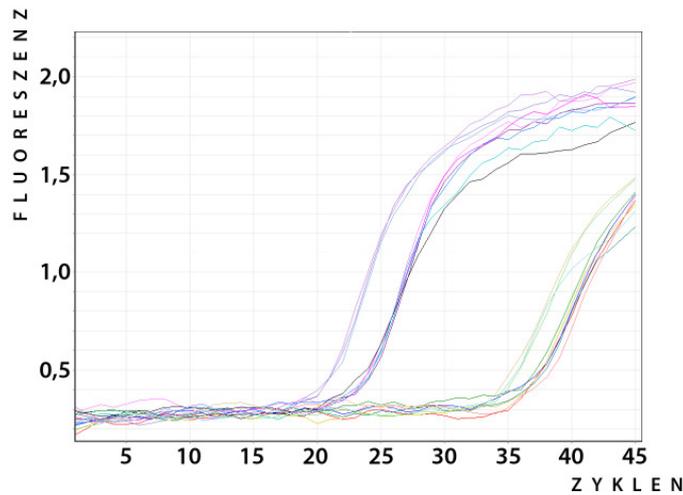


Abb. 8: „Real time“ PCR Amplifikationskurve von GAPDH und Aromatase: links 10W, 2 v.li. P5 und E18 GAPDH, 3v.l P18 GAPDH, 2 v.r 10W ARO, 4 v.r P18 ARO, ganz rechts P5 und E18 ARO.

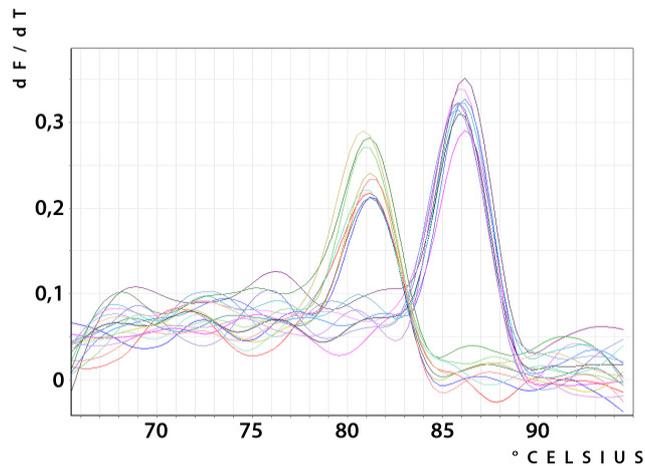


Abb. 9: Darstellung der Schmelzkurven von ARO (links) und GAPDH (rechts).

6.1.3 Aromatase mRNA Mengen männlicher und weiblicher Ratten mit GAPDH als Standard

Die vorliegenden Berechnungen der Expressionsunterschiede beziehen sich auf eine Standardisierung auf männliche Tiere am P5 und GAPDH als interner Standard. Bei männlichen Ratten fanden sich am P18 und P5 annähernd gleiche Mengen an mRNA, wohingegen der mRNA Gehalt bei adulten Tieren deutlich abnahm.

Bei weiblichen Tieren war die gemessene Menge an Aromatase mRNA am P5 leicht erhöht, nahm dann aber deutlich ab und hatte am P18 und nach 10W etwa vergleichbare geringe mRNA Mengen. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden.

Am P5 hatten weibliche Ratten tendenziell höhere Aromatase mRNA Mengen als männliche Tiere, am P18 wiesen männliche Tiere deutlich mehr Aromatase mRNA auf. Bei 10W alten

Tieren fanden sich bei Männchen und Weibchen keine Unterschiede in der Expression (Abb. 10).

Nicht dargestellt sind die mRNA Mengen am E18, da die Zyklenzahl größer als 40 waren und sich hier zu große Schwankungen innerhalb der Ct Werte zeigten. Statistisch signifikante Unterschiede, sowohl innerhalb der Geschlechter als auch innerhalb der Altersgruppen, konnten in der ersten experimentellen Serie nicht ermittelt werden.

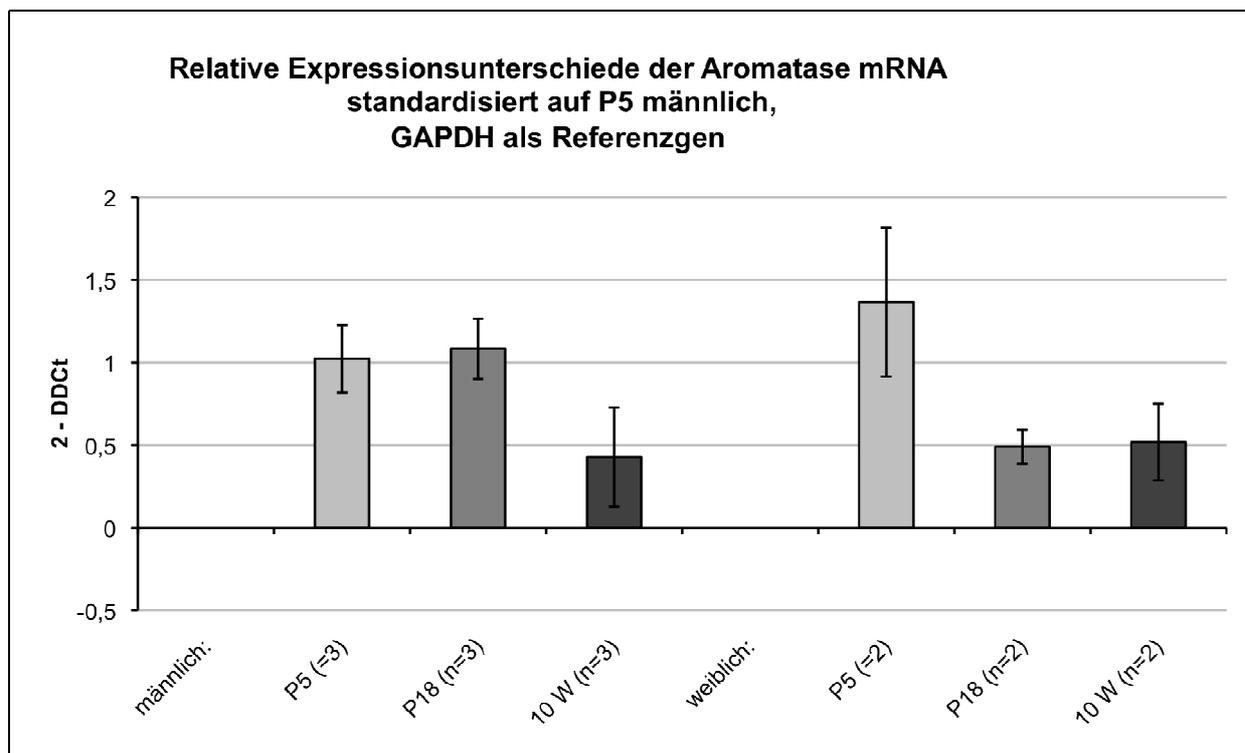


Abb. 10: Relative Expressionsunterschiede der Aromatase mRNA bei männlichen und weiblichen Ratten im Verlauf der Ontogenese standardisiert auf P5 männlich. Als Referenzgen dient GAPDH. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM).

6.1.4 Aromatase mRNA Mengen männlicher und weiblicher Ratten mit HPRT1 als interner Standard

Da aus der ersten experimentellen Serie ersichtlich ist, dass extrem geringe Mengen an mRNA im Gewebe vorliegen, wurde eine zweite Serie durchgeführt. Da in der Literatur eher HPRT1 als interner Standard für hippocampales Gewebe empfohlen wird (Bonefeldt et al. 2008), wurde im nachfolgenden Experiment HPRT1 als interner Standard verwendet (Lossi et al. 2004, Yang et al. 2007, Liu et al. 2008). Die folgenden Analysen der Aromatase mRNA Menge beziehen sich auf eine Standardisierung auf männliche Tiere am P5. Die Expression der Aromatase mRNA nahm sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren vom E18 zum P5 statistisch signifikant um das ca. 3-fache zu. Im Verlauf vom P5 zum P18 lag bei Männchen und Weibchen 1,3-fach mehr Aromatase mRNA im Hippocampus vor, wobei sich keine statistisch signifikanten

Unterschiede ergeben. Bei adulten Tieren nahm der mRNA Gehalt der Aromatase gegenüber P18 bei Männchen und bei Weibchen um das ca. 3-fache signifikant ab. Tendenziell fanden sich bei männlichen Tieren am P5 und am P18 mehr Aromatase mRNA als bei Weibchen, wobei die Unterschiede nicht statistisch signifikant waren. Bei adulten Tieren (10W) lagen bei männlichen und weiblichen Ratten annähernd gleiche Mengen an mRNA vor (Abb. 11).

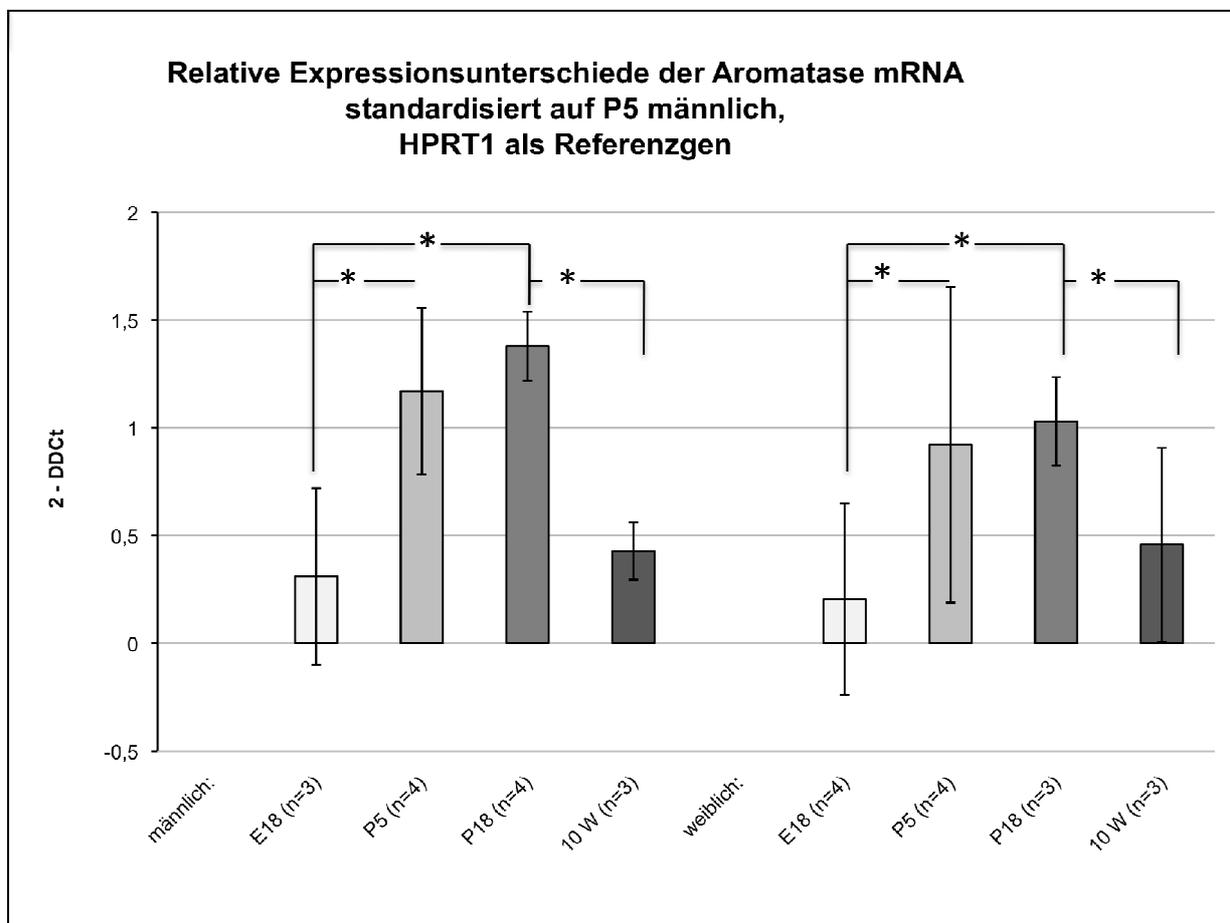


Abb. 11: Relative Expressionsunterschiede der Aromatase mRNA bei männlichen und weiblichen Ratten im Verlauf der Ontogenese standardisiert auf P5 männlich. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (* $p \leq 0,05$).

6.2 *In situ*-Hybridisierung im Laufe der Ontogenese

6.2.1 Nachweis einer *in situ*-Hybridisierung im hippocampalen Schnitt am postnatal Tag fünf (P5) männlicher und weiblicher Ratten

Um die Spezifität der Aromatase-Sonde zu überprüfen, wurde eine *in situ*-Hybridisierung (ISH) am P5 durchgeführt, da mittels „real time“ PCR gezeigt werden konnte, dass der mRNA-Gehalt im Hippocampus am P5 im Verlauf der Ontogenese am höchsten war. Bei fünf Tage alten

weiblichen und männlichen Ratten (P5) ließen sich in der Übersichtsaufnahme in der *antisense* (AS)-Färbung mittels ISH mit der „full-length“ P450 Aromatase-Ratten-Sonde deutliche Aromatase Signale detektieren (Abb. 12 A, C). Die *sense* (S)-Sonde als Negativkontrolle zeigte kein Signal (Abb. 12 B, D).

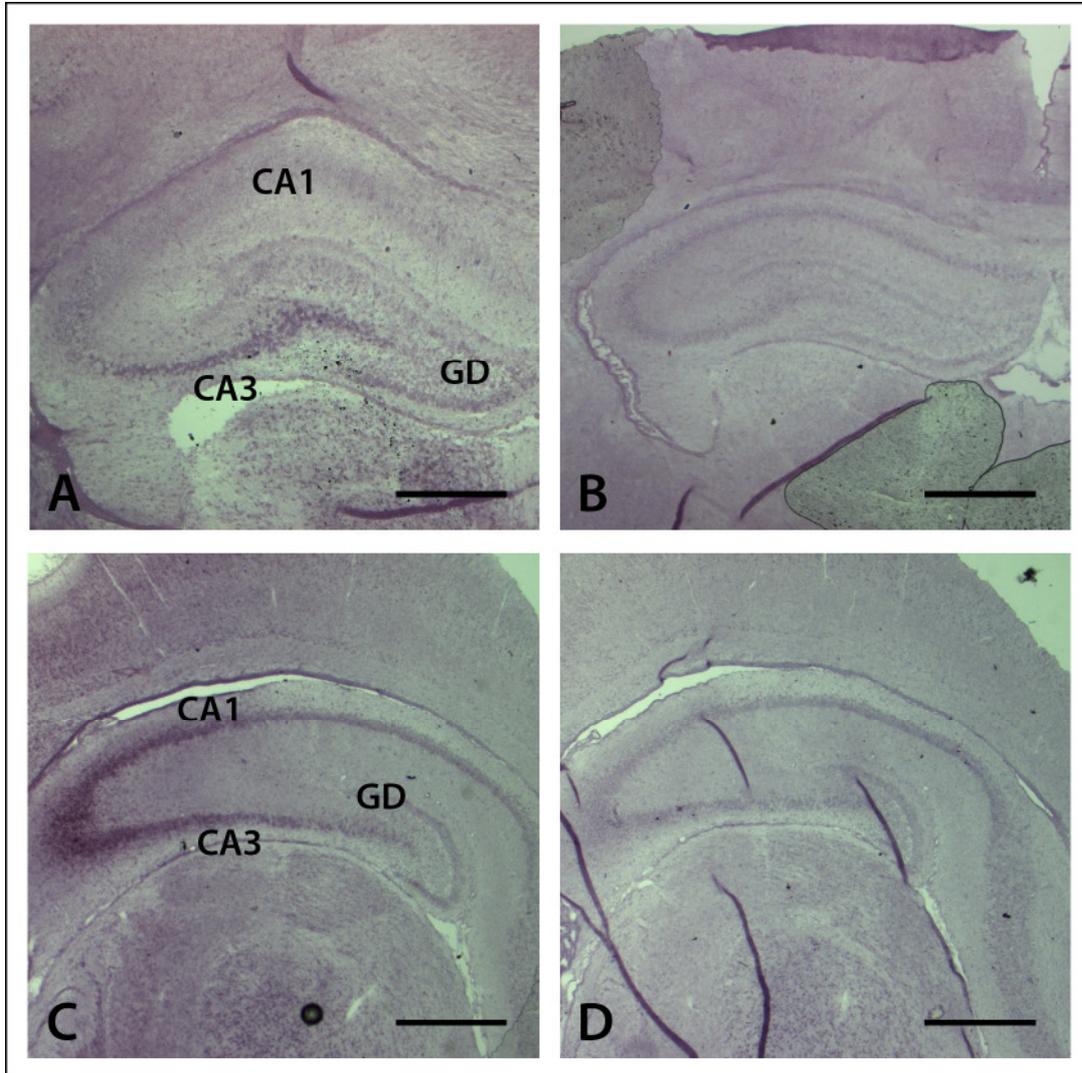


Abb. 12 (A-D): Übersichtsaufnahme einer ISH mit einer „full length“ P450 Ratten-Aromatase-Sonde in 5-facher Vergrößerung am P5 im Hippocampus weiblicher (A, B) und männlicher Ratten (C, D). A, C: *antisense*; B, D: *sense*. Maßstab entspricht 200 μ m.

6.2.2 Nachweis der Aromatase mRNA Expression im Laufe der Ontogenese bei männlichen und weiblichen Ratten

Um die regionale Aromatase mRNA Verteilung im Hippocampus zu untersuchen, wurden perfusionsfixierte Gehirne männlicher und weiblicher Ratten verschiedener Altersstufen (P5, P18, 10W) mittels ISH analysiert. In der Ontogenese fanden sich im Hippocampus weiblicher (Abb. 13 A) und männlicher Ratten (Abb. 13 B) am P5 deutliche Aromatase mRNA Signale. Im weiteren Verlauf der Ontogenese konnten weder am P18 weiblicher (Abb. 13 C) und männlicher

Ratten (Abb. 13 D) noch bei adulten Weibchen und Männchen Aromatase mRNA Signale im Hippocampus gefunden werden (Abb. 13 E, F). Während sich in der CA1-Region weiblicher Ratten kein Signal zeigte (Abb. 13 A), konnte bei männlichen Ratten am P5 ein starkes Signal in der CA1-Region detektiert werden (Abb. 13 B). Am P5 weiblicher und männlicher Ratten fanden sich im Hippocampus deutliche Signale in der CA3 Region. Im Gyrus dentatus ließen sich bei beiden Geschlechtern Signale nachweisen, jedoch schwächer als in der CA3-Region (Abb. 13 A,B).

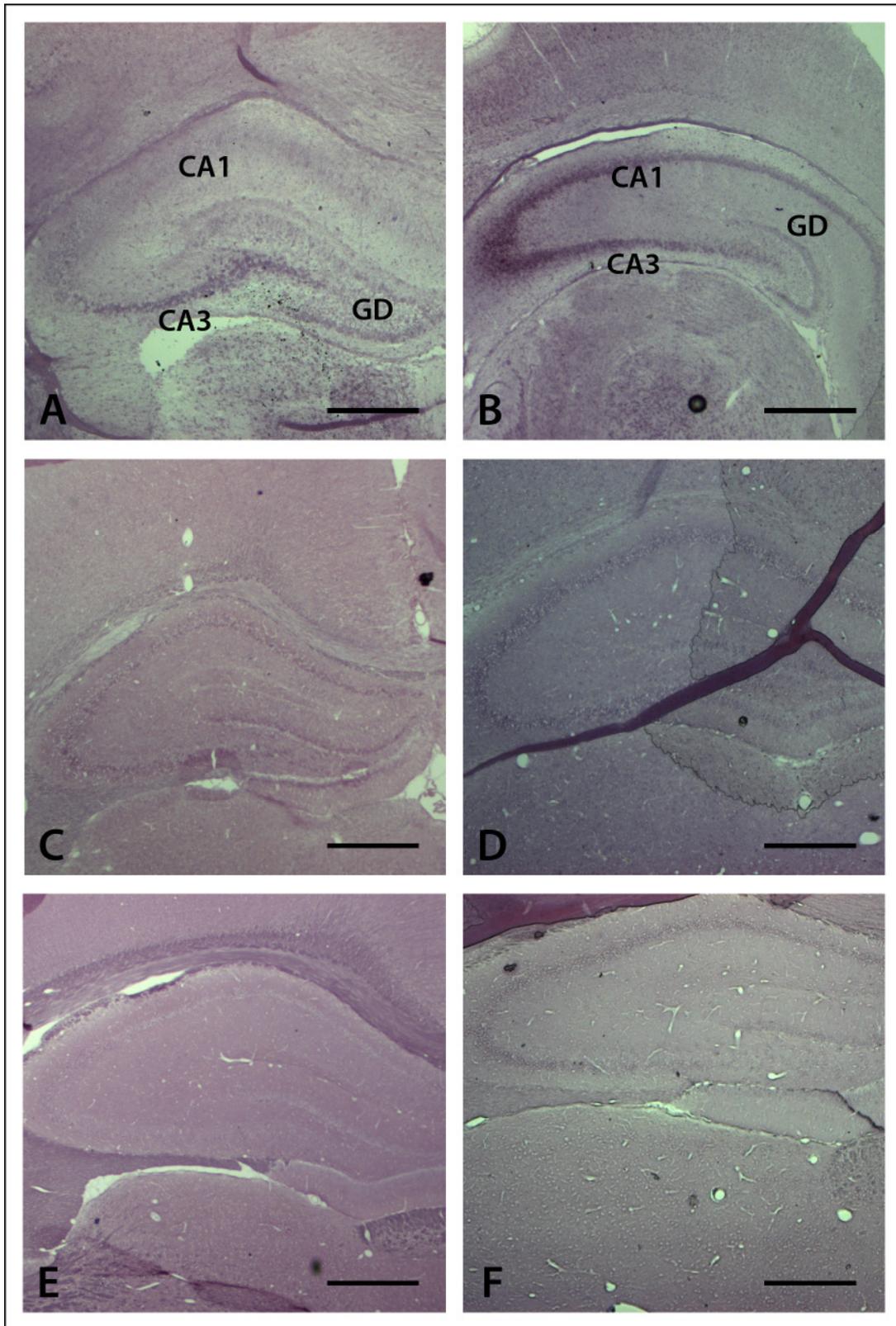


Abb. 13 (A-F): Übersichtsaufnahme einer ISH im Laufe der Ontogenese in 5-facher Vergrößerung. P5 weiblich (A) und männlich (B). P18 weiblich (C) und männlich (D) und 10W weiblich (E) und männlich (F). Dargestellt sind antisense-Färbungen. Maßstab entspricht 200 μ m.

7. Diskussion

Estradiol gehört zu den Neurosteroiden, da es in verschiedenen Hirnregionen endogen synthetisiert wird (Naftolin et al. 1971, Roselli und Resko 1984). Die Funktionen von Estradiol im Gehirn sind vielfältig. Im Hippocampus synthetisiertes Estradiol hat neuroprotektive Effekte (Garcia Segura et al. 1999 a, b). Darüber hinaus ist es wichtig für die synaptische Plastizität (Prange-Kiel et al. 2006). Es vermittelt ferner die Proliferation von Körnerzellen im Gyrus dentatus (Fester et al. 2006).

Im Hypothalamus spielt das von Aromatase synthetisierte Estradiol eine wichtige Rolle bei der Geschlechterdifferenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Estradiolspiegel zur Entwicklung eines männlichen Geschlechts führen (George und Ojeda 1982). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern sich die Expression der Aromatase in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter im Hippocampus verändert.

7.1 Altersabhängige Aromatase-Expression

7.1.1 „Real time“ PCR

Methodische Aspekte der „real time“ PCR

Zur Charakterisierung der Aromatase mRNA in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht, wurde Aromatase im hippocampalen Gewebe männlicher und weiblicher Ratten am E18, P5, P18 und an adulten Tieren (10W) mittels „real time“ PCR untersucht.

In einer ersten experimentellen Serie fiel auf, dass eine extrem hohe Zyklenzahl von mehr als 40 Zyklen notwendig war, um Aromatase mRNA nachzuweisen, was auf einen sehr geringen mRNA Gehalt im Gewebe hinweist (Abb. 8). Diese hohe Zyklenzahl ist aufgrund der exponentiellen Amplifizierung sicher auch Ursache für die hohen Standardabweichungen, die insbesondere am E18, P5 und an 10W auftraten.

Aus diesem Grund wurde eine zweite experimentelle Serie durchgeführt, in der dreimal so viel mRNA eingesetzt wurde. In dieser Serie konnte mit einer geringeren Zyklenzahl (unter 30 Zyklen) als in der ersten Serie mRNA nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen in der zweiten Serie sind am E18, P5 und an 10W immer noch vergleichsweise groß, aber es konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden.

In dieser zweiten experimentellen Serie wurde ausserdem anstelle des Referenzgens GAPDH das „Housekeeping“-Gen HPRT1 verwendet. Während GAPDH offenbar ab P7 aufgrund

apoptotischer neuronaler Zelluntergänge hochreguliert wird (Lossi et al. 2004, Yang et al. 2007, Liu et al. 2008), sind derartige Änderungen für HPRT1 nicht beschrieben (Bonfeldt et al. 2008).

Männliche und weibliche hippocampale Aromatase-Expression im Verlauf der Ontogenese

Bei männlichen und weiblichen Ratten nahm der mRNA Gehalt vom E18 bis zum P5 statistisch signifikant um das 3-fache zu und blieb bis zum P18 auf einem konstanten Niveau. Bei adulten Tieren (10W) fiel der mRNA Gehalt vom P18 statistisch signifikant um das 3-fache ab, wobei tendenziell mehr mRNA als bei embryonalen Tieren vorlag. Dieser Expressionsverlauf stimmt im Wesentlichen mit bereits publizierten Daten überein. Auch in der Literatur ist bei männlichen und weiblichen Ratten und Mäusen eine signifikant ansteigende Expression vom E17 bis P7 bei Mäusen und bis P4 bei Ratten beschrieben. Diese nahm danach bis P15 bei Mäusen und bis P7 bei Ratten diskret ab, wobei auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression nachgewiesen werden konnten (Ivanova und Beyer 2000, Kimoto et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit war das Expressionsniveau von P5 bis P18 leicht ansteigend. Hervorzuheben ist, dass weder bei den in der Literatur noch in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der exprimierten mRNA Mengen am P5 und P18 gefunden wurden. An 10W alten Tieren zeigten alle bisher erhobenen Daten eine deutliche Abnahme der Expression (Ivanova und Beyer 2000, Kimoto et al. 2010). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten belegten darüber hinaus eine statistische Signifikanz der Abnahme.

Innerhalb der Geschlechter wiesen männliche Ratten am E18, am P5 und am P18 einen höheren mRNA Gehalt im hippocampalen Gewebe auf als weibliche Tiere. An 10W alten Tieren waren keine Unterschiede nachweisbar. Diese Befunde bestätigen publizierte Ergebnisse an Mäusen, die bis zum P15 bei männlichen Tieren höhere Mengen an Aromatase mRNA im hippocampalen Gewebe zeigten, aber keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in 10W alten Tieren (Ivanova und Beyer 2000).

7.1.2 *In situ*-Hybridisierung

Da die „real time“ PCR keine Aussagen über die regionale Verteilung erlaubt, wurde mittels ISH untersucht, welche Regionen im Hippocampus zur mRNA Expression befähigt sind, und ob sich das Expressionsmuster im Verlauf der Ontogenese verändert.

Aromatase-positive Zellen konnten nur am P5 im männlichen und weiblichen Hippocampus detektiert werden. Am P18 und bei adulten Tieren (10W) waren keine Signale nachweisbar, so dass über eine Änderung des Expressionsprofils keine Aussagen gemacht werden können.

Auch in einer bereits publizierten Arbeit konnte am P6 bei männlichen Ratten Aromatase mRNA detektiert werden, wobei in dieser Arbeit auch am P15 männlicher Ratten mittels ISH wenige Aromatase-positive Zellen im Pyramidenzelleband und im Gyrus dentatus nachgewiesen werden konnten (Lauber und Lichtensteiger 1994). Die unterschiedlichen Befunde am P18 in der vorliegenden Arbeit und der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse am P15 sind vermutlich am ehesten durch die verschiedenen Altersstufen bedingt.

Interessanterweise konnten Wehrenberg und Mitarbeiter in adulten weiblichen Ratten mittels ISH Aromatase-positive Zellen im Pyramidenzellband von CA1-CA3 und in Körnerzellen des Gyrus dentatus nachweisen (Wehrenberg et al. 2001). Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erzielten „Negativ-Ergebnissen“. Die Ursache für diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, dass die Aromatase-Expression zyklusabhängig reguliert wird und dass sich die untersuchten Tiere in unterschiedlichen Zyklusphasen befanden. Zu beachten ist, dass weder im Rahmen dieser Studie noch in der publizierten Arbeit auf die Zyklusphase geachtet wurde.

Unterschiedliches regionales Verteilungsmuster der Aromatase mRNA bei männlichen und weiblichen Ratten

Bei beiden Geschlechtern zeigte die ISH am P5 Aromatase mRNA Signale in der CA3 Region und im Gyrus dentatus, wohingegen die CA1-Region geschlechtsspezifische Unterschiede aufwies. Während in der CA1-Region männlicher Ratten Aromatase-positive Zellen nachweisbar waren, war die CA1-Region der weiblichen Tiere negativ.

Die erhobenen Befunde bestätigen zum Teil die in der Literatur beschriebenen Befunde (Lauber und Lichtensteiger 1994, Zhao et al. 2007). Bei jungen männlichen Ratten (P2 und P6) wurde die Aromatase mRNA in der CA3 Region und im Gyrus dentatus nachgewiesen (Zhao et al. 2007, Lauber und Lichtensteiger 1994). Eine CA1-spezifische Aromatase-Expression am P5, die nur bei männlichen, und nicht bei weiblichen Ratten zu beobachten ist, wurde zuvor noch nicht beschrieben und könnte auch zyklusabhängig reguliert sein.

Das Vorhandensein von Aromatase mRNA in der CA1-Region weiblicher Tiere ist zu fordern, da in zahlreichen immunhistochemischen Untersuchungen das Vorliegen von Aromatase-Protein gezeigt werden konnte. Dies gilt sowohl in der CA1-Region von Weibchen als auch von Männchen (Hojo et al. 2004, Prange-Kiel et al. 2006, Yague et al. 2008, Higo et al. 2009). Die

im Vergleich erhöhten Aromatase mRNA Spiegel in der CA1-Region männlicher Tiere könnten durch erhöhte Testosteron-Spiegel bei männlichen Ratten bedingt sein. Untersuchungen mit Testosteron behandelten Ratten zeigten eine Zunahme des Signals in der ISH in Abhängigkeit von einer Testosteron-Behandlung im Hypothalamus (Roselli et al. 1997).

Methodische Aspekte beider Techniken

Die Expression der Aromatase mRNA im Verlauf der Ontogenese wurde in der vorliegenden Arbeit mittels „real time“ PCR und ISH untersucht. Während die „real time“ PCR eine Bestimmung des mRNA Gehalts im Gewebe erlaubt, ist mittels ISH eine regionale Verteilung der zur mRNA Expression befähigten Zellen möglich.

Mittels „real time“ PCR konnte in allen Altersstufen Aromatase mRNA nachgewiesen werden. In der ISH konnte, trotz Zunahme des mRNA Gehalts vom P5 zum P18 in der „real time“ PCR, nur am P5 bei beiden Geschlechtern Aromatase mRNA detektiert werden.

Gründe für Abweichungen innerhalb der Befunde sind vermutlich durch die unterschiedliche Sensitivität der beiden Methoden begründet. Die „real time“ PCR detektiert bereits eine geringe Anzahl an mRNA Transkripten und weist somit eine Sensitivität auf, wie sie von keiner anderen Methode erreicht wird. Geringe mRNA Transkript Mengen, wie sie am E18 und an 10W vorliegen (Wehrenberg et al. 2001, Kimoto et al. 2010) und sich erst nach 35 bis 40 Zyklen amplifizieren lassen, generieren in der ISH vermutlich kein Signal. Theoretisch wäre ein Signal dann zu erwarten, wenn die Expression nur in vereinzelt Zellen auf hohem Niveau stattfindet. Laut den „real time“ PCR Ergebnissen lagen im Hippocampus am P18 ausreichende Mengen an Aromatase mRNA Transkripten vor, deren Nachweis eigentlich wie am P5 Gewebe gelingen müsste. Offenbar lag die Aromatase mRNA in einer größeren Neuronenpopulation auf einem geringeren Expressionsniveau vor, so dass deren Nachweis mittels ISH nicht möglich war.

7.2 Bedeutung der hippocampalen Aromatase-Expression

7.2.1 Lokale Bedeutung der hippocampalen Aromatase-Expression bis zum P18

Mehrere Studien an Ratten belegten die essentielle Bedeutung des von der Aromatase im Hippocampus endogen synthetisierten Estradiols bei der Aufrechterhaltung von Synapsen, bei der Vermittlung synaptischer Plastizität und beim Axonwachstum (Kretz et al. 2004, Prange-Kiel et al. 2006, von Schassen et al. 2006, Zhou et al. 2010).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, wird die Aromatase mRNA in der CA1-Region männlicher Ratten und in der CA3-Region und im Gyrus dentatus beider Geschlechter exprimiert, wobei die Signale in der CA3-Region am stärksten waren. Da in der Literatur der Nachweis von Aromatase auch in CA1 bei Weibchen gelang (Wehrenberg et al. 2001), muss davon ausgegangen werden, dass Aromatase in der CA1-Region weiblicher Tiere nicht stabil oder konstant exprimiert wird. Die Bedeutung der Aromatase und des von ihr endogen synthetisierten Estradiols auf die synaptische Plastizität konnte in der Literatur belegt werden (Prange-Kiel et al. 2006). Eine Hemmung der Estradiolsynthese mittels Letrozol führte zu einer signifikanten Abnahme synaptischer Proteine, ein Hinweis auf Synapsenverlust, wobei die Abnahme in CA1 und im Gyrus dentatus stärker war als in CA3 (Prange-Kiel et al. 2006).

Im Verlauf der Entwicklung bis P18 konnte in Studien gezeigt werden, dass nicht nur der Gehalt der Aromatase mRNA im Hippocampus bis P18 hoch ist. Bis P14 wurden auch für andere Steroid-metabolisierende Enzyme, die für die Estradiolsynthese notwendig sind, hohe mRNA Transkripte nachgewiesen (Kimoto et al. 2010). Da am P14 die Synaptogenese größtenteils abgeschlossen ist, scheint die gleichbleibende Expression der Aromatase mRNA bis zum P18 einen gesteigerten Bedarf an Estradiol für den Aufbau der neuronalen Zytoarchitektur widerzuspiegeln.

7.2.2 Die Bedeutung der hippocampalen Aromatase-Expression im adulten Hippocampus

In mehreren Untersuchungen konnte belegt werden, dass der Hippocampus adulter Ratten extrem geringe Aromatase mRNA Transkripte aufweist (Hojo et al. 2004, Kimoto et al. 2010).

Auf Protein-Ebene konnte im 10 Wochen alten Hippocampus sowohl immunhistochemisch als auch elektronenmikroskopisch das Protein Aromatase nachgewiesen werden (Hojo et al. 2004, Mukai et al. 2006). Im Vergleich zum P5 war in adulten Tieren auch die Enzymaktivität der adulten Aromatase reduziert (Higo et al. 2009), was vermutlich auf dem geringen mRNA Gehalt im adulten Hippocampus beruht. Dennoch spielt auch im adulten Hippocampus das endogen synthetisierte Estradiol eine bedeutende Rolle, denn bei dessen Hemmung kommt es zu einer Abnahme von Synapsen (Zhou et al. 2010). Vor allem in Bezug auf Neuroprotektion scheint der Aromatase im adulten Hippocampus eine besondere Bedeutung zuzukommen. Eine Hemmung der Aromatase, mittels Knockout oder durch Letrozol, führte zu einer erhöhten Vulnerabilität der Neuronen gegenüber induzierten Traumata (Garcia-Segura 1999 a, b, Azcoitia et al. 2001). Demnach scheint das von der Aromatase im adulten Hippocampus synthetisierte Estradiol unter anderem bei der Synapsenplastizität und für Neuroprotektion notwendig zu sein.

7.2.3 Die Bedeutung der Aromatase mRNA Expression auf die Geschlechterdifferenzierung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen geschlechterspezifischen Unterschiede der Aromatase mRNA Gehalte erreichten keine statistische Signifikanz, waren jedoch bei männlichen Ratten am P5 und am P18 tendenziell höher als bei Weibchen.

Ein möglicherweise erhöhter Aromatase mRNA Gehalt bei männlichen Tieren am P5 und am P18 könnte durch ein gesteigertes Substratangebot aus den Gonaden bedingt sein. Messungen im Hypothalamus der Ratte belegten in den ersten vier postnatalen Tagen einen höheren Testosteron-Gehalt im Hypothalamus bei Männchen als bei Weibchen (George und Ojeda 1982). Dieser erhöhte Testosteron-Gehalt führte im Hypothalamus vom Kanarienvogel und der Ratte zu einer Zunahme der Aromatase mRNA Expression (Roselli et al. 1997, Fusani et al. 2001). In der Literatur konnte belegt werden, dass hohe Estradiol-Spiegel zur Entwicklung eines männlichen Geschlechts beitragen (George und Ojeda 1982, Lephardt et al. 1996). Der Anstieg der Aromatase-Transkriptmenge könnte ein Mechanismus sein, der zu den erhöhten Estradiolgehalten bis zum P5 in der Entwicklung beiträgt. Zur Steigerung des Estradiolgehaltes spielt aber sicher auch die Regulation der Enzymaktivität auf Proteinebene eine wichtige Rolle.

Der am P18 aufgrund der anhaltend erhöhten Aromatase mRNA Mengen vermutlich ebenfalls höhere Estradiol-Gehalt bei männlichen Ratten könnte zur Ausbildung eines männlichen Verhaltens beitragen. Untersuchungen des Balzgesangs bei Zebrafinken wiesen geschlechterspezifische Unterschiede in Abhängigkeit von Estradiol nach (Schlinger und Arnold 1991). Interessanterweise wies die für Verhalten und Gedächtnis verantwortliche Region – der Hippocampus – auch bei Menschen geschlechterspezifische Unterschiede auf (McCarthy und Konkle 1995, Woolley et al. 2010). An adulten Ratten (10W) konnte in der vorliegenden Arbeit, wie auch in der gängigen Literatur, belegt werden, dass männliche und weibliche Ratten nahezu konstante Mengen an Aromatase mRNA aufweisen (Ivanova und Beyer 2000). Da bei adulten Tieren die Geschlechterdifferenzierung abgeschlossen ist, sind die für die Ausbildung männlicher Kernstrukturen hohen Estradiolspiegel vermutlich nicht mehr nötig, was in einer annähernd gleichbleibenden Expression der Aromatase mRNA innerhalb der Geschlechter zum Ausdruck kommt.

7.3 Regulation des Estradiol-Gehalts im Hippocampus

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels „real time“ PCR und ISH eine Abnahme der Aromatase mRNA Expression im Verlauf der Ontogenese nachgewiesen werden. Auf Protein-

Ebene ließ sich in allen Altersstufen immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch das Protein nachweisen, wobei Messungen des Protein-Gehalts im Verlauf der Ontogenese nicht beschrieben sind (Hojo et al. 2004, Prange-Kiel et al. 2006, Yague et al. 2008, Higo et al. 2009). Aromatase-spezifische Färbungen konnten im Zellsoma und in den Dendriten der Pyramidenzellen gefunden werden, wobei sie nicht nur im endoplasmatischen Retikulum, sondern auch im dendritischen Spine lokalisiert sind. Dies unterstreicht die Bedeutung von Estradiol in Hinsicht auf die synaptische Plastizität (Hojo et al. 2004).

Der positiven Aromatase-Immunreaktivität stehen mehrere RNA-basierte Studien (RT-PCR, ISH) sowie die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde gegenüber. Diese belegten die Abnahme der Aromatase-Expression im Verlauf der Entwicklung bzw. die fehlende Expression der Aromatase bei männlichen und weiblichen adulten Ratten und Mäusen (Lauber und Lichtensteiger 1994, Ivanova und Beyer 2000, Kimoto et al. 2010).

Ein entsprechender Expressionsverlauf wurde auch für andere Steroid-metabolisierende Enzyme im Hippocampus beschrieben (Kimoto et al. 2010). Neben der Aromatase konnte auch für 17- α -Hydrolase, c17,20-Lyase (P450c17), welches aus Pregnenolon Dehydroepiandrosteron synthetisiert, eine altersabhängige Expression nachgewiesen werden. Wie auch in der vorliegenden Arbeit für die Aromatase, wurde für P450c17 bis P14 eine relative konstante bis leicht zunehmende Expression beschrieben, die ab P14 wieder abnahm (Kimoto et al. 2010). Trotz abnehmender Expression der mRNA im Verlauf der Entwicklung, konnte auch für P450c17 mittels Immunhistochemie, Immunelektronenmikroskopie und Westernblot eine Immunreaktivität des Proteins im adulten Hippocampus nachgewiesen werden (Hojo et al. 2004). Obwohl die Aktivität der adulten Aromatase im Vergleich zu Ratten am P5 deutlich geringer ist (Higo et al. 2009), ist das im adulten Hippocampus synthetisierte Estradiol essentiell bei der Synapsenhomöostase und für die Neuroprotektion (Zhou et al. 2010).

Demnach scheint der Estradiolgehalt im hippocampalen Gewebe nicht nur von der Aromatase mRNA Transkription beeinflusst zu werden. Weitere Faktoren, wie die Protein-Stabilität und der Aktivitätszustand, scheinen den Estradiolgehalt mit zu bestimmen.

7.4 Unterschiedliche Regulationsmechanismen bestimmen den Estradiolgehalt im Hippocampus

Wie in 7.3 beschrieben, wird der Estradiolgehalt im hippocampalen Gewebe nicht nur durch die mRNA Expression beeinflusst. Um ausreichend Estradiol zu synthetisieren, stehen umfangreiche Regulationsmechanismen zur Verfügung.

7.4.1 Regulation der Aromatase auf Transkriptionsebene

Die Transkription der Aromatase mRNA kann im Hippocampus, wie auch in anderen zur Steroidbiosynthese befähigten Gewebe, durch Bindung von SF-1 an nukleäre Rezeptorbindungsstellen, induziert werden (Lynch et al. 1993, Wehrenberg et al. 2001).

Untersuchungen mittels ISH und Doppelinkubation in hippocampalen Gewebe konnten zeigen, dass StAR- und Aromatase-positive Pyramidenzellen zu 100 % auch SF-1 exprimierende Zellen sind (Wehrenberg et al. 2001). Diese Befunde unterstreichen die regulatorische Funktion von SF-1 in der Steroidbiosynthese im Hippocampus.

Auch für SF-1 konnte eine Abhängigkeit der Expression im Verlauf der Entwicklung beschrieben werden. In den ersten vier postnatalen Tagen stieg die Expression deutlich an, ehe sie danach um 30 % abnahm, um dann auf diesem Niveau konstant zu bleiben (Kimoto et al. 2010). Auf Ebene der Transkription wird durch die gesteigerte Expression von SF-1 bis P4 der vor allem bis P5 gesteigerte Bedarf an Estradiol im Hippocampus widerspiegelt.

7.4.2 Neuronale Aktivität beeinflusst die Aktivität der Aromatase

Innerhalb von Minuten kann die Estradiolsynthese im Hippocampus durch neuronale Aktivität und über eine Calcium-abhängige Phosphorylierung der Aromatase posttranslational reguliert werden (Balthazart et al. 2003).

Hohe Estradiolkonzentration in hippocampalen Slicekulturen führten zu einem Calcium-induzierten Calcium-Einstrom in die Zelle. Durch Phosphorylierung der Aromatase über eine Calcium-abhängige Kinase im Hypothalamus der Wachtel konnte eine Abnahme der Enzym-Aktivität beobachtet werden. Zehn bis 15 min Inkubation unter diesen phosphorylierenden Bedingungen führten zu einer reversiblen Herunterregulation der Aromatase-Aktivität (Balthazart et al. 2005). Obwohl diese Studien an Wachteln durchgeführt wurden, sind die Mechanismen vermutlich auch auf Nager übertragbar (Balthazart et al. 2003). Dem gegenüber stehen Befunde von Hojo, die in hippocampalen Slicekulturen adulter männlicher Ratten nach 30 min Inkubation mit NMDA in sehr hohen Dosen eine gesteigerte Estradiolsynthese im Hippocampus verzeichnen konnten (Hojo et al. 2004). Die extrem hohen Dosen von NMDA können die unterschiedlichen Befunde von Balthazart und Hojo erklären. Der durch die Stimulation des NMDA Rezeptors massive Calcium-Einstrom in die Zelle könnte das in der Zelle verfügbare Cholesterin an die innere Mitochondrienmembran treiben, welches dadurch die Kaskade der Steroidbiosynthese induziert (Mukai et al. 2007). Cholesterin dient hierbei als Ausgangssubstrat bei der Synthese von Steroidhormonen und wird mit Hilfe von StAR über die

innere Mitochondrienmembran transportiert. Blockierte man den Cholesteroltransport in hippocampalen Neuronen mittels StAR-siRNA-Transfektion, kam es zu einer Abnahme der Estradiolkonzentration im Medium. Hierbei induzierte nicht das Cholesterol selbst die Synaptogenese, sondern diente lediglich als Substrat (Fester et al. 2006, 2009).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Aktivität der Aromatase posttranslational durch neuronale Aktivität innerhalb von Minuten reguliert wird und somit Estradiol bereitstellen kann. Zusätzlich bestimmt Estradiol den Aktivitätszustand der Aromatase. Durch diesen Feedback-Mechanismus kann das von der Aromatase synthetisierte notwendige Estradiol im Hippocampus sehr schnell reguliert werden.

7.4.3 Regulation der Estradiolsynthese durch den Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Regelkreis

Im Reproduktionstrakt unterliegt die Estradiolsynthese dem Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Regelkreis (Parinaud et al. 1988, Janssens et al. 2000). Untersuchungen in hippocampalen Kulturen konnten zeigen, dass die Aromatase-Aktivität und damit die hippocampale Estradiolsynthese auch diesem Regelkreis unterliegt (Prange-Kiel et al. 2008).

Das endogen synthetisierte Estradiol, welches nach Stimulation des „Gonadotrophin-Releasing Hormon Rezeptor“ (GnRH-R) durch seinen Liganden vermehrt gebildet wird, vermindert über einen Feedback-Mechanismus die überschüssige Estradiolsynthese im Hippocampus, indem es die Expression des GnRH-R auf einem niedrigen Niveau hält (Kohlmann, med. Dissertation, 2009). Die Hemmung der endogenen Aromatase mittels Letrozol führte wiederum zur einer Hochregulation von GnRH-R.

Der für die Synapsenhomöostase von der Aromatase synthetisierte und nötige Estradiolgehalt wird über einen fein abgestimmten Mechanismus der „Gonadotrophin-Releasing Hormon“ (GnRH) Wirkung reguliert.

7.4.4 Einfluss des Substratangebots auf die Aromatase

Auch der Testosteron-Gehalt beeinflusst die Aktivität der Aromatase. An adulten Ratten konnte gezeigt werden, dass 15 Tage nach Gonadektomie die Estradiolkonzentration im Hippocampus deutlich abnimmt (Barker und Galea 2009). Im Einklang damit stehen Befunde im Hypothalamus von Ratten, die nach Kastration eine verminderte Expression der Aromatase mRNA nachweisen konnten (Roselli et al. 1997). Auffällig war im Hippocampus jedoch, dass nach Kastration adulter Ratten die Serumtestosteronkonzentration um 1% abfiel, die Testosteronkonzentration im Hippocampus hingegen nur um 18%. Interessanterweise nahm die

Estradiolkonzentration im Hippocampus nur geringfügig ab (Hojo et al. 2009). Das zur Verfügung stehende Substrat scheint ein Faktor zu sein, der die Expression und die Aktivität der Aromatase im Hippocampus und somit die Estradiolkonzentration beeinflusst.

8. Zusammenfassung

Bisherige Arbeiten zur Expression der Aromatase im Hippocampus von Nagern zeigten eine Abnahme der Aromatase mRNA Expression im Laufe der Entwicklung (Lauber und Lichtensteiger 1994, Ivanova und Beyer 2000, Kimoto et al. 2010).

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Fragestellung, wie sich die Expression der Aromatase mRNA in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht verhält. Dazu wurden Hippocampi von Ratten mehrerer Altersstufen (E18, P5, P18, 10W) und beider Geschlechter mittels „real time“ PCR und ISH untersucht.

In der „real time“ PCR konnte nachgewiesen werden, dass im embryonalen und adulten Gewebe nur sehr geringe Aromatase mRNA Mengen vorliegen. Bis zum P18 stieg der mRNA Gehalt der Aromatase bis um das 3-fache bei beiden Geschlechtern statistisch signifikant an, ehe der Gehalt bei 10W wieder abfiel. Hierbei war in männlichen Tieren am E18, P5 und P18 tendenziell mehr Aromatase mRNA nachweisbar als bei weiblichen Tieren. Die Unterschiede innerhalb der Geschlechter erreichten keine statistische Signifikanz.

In der ISH konnten sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren nur am P5 Aromatase-positive Signale in der CA3-Region und im Gyrus dentatus detektiert werden. Neu ist der Befund in CA1, der bei männlichen Tieren Aromatase-positiv, bei weiblichen Tieren Aromatase-negativ war. Der positive Befund in CA1 männlicher Tiere ist vermutlich sowohl zyklusabhängig als auch durch einen höheren Testosterongehalt im männlichen Hippocampus bedingt, der bei männlichen Tieren zu einer Zunahme des Signals in der ISH führen könnte.

Der Anstieg der Aromatase mRNA im hippocampalen Gewebe bis P18, also dem Abschluss der Synaptogenese, scheint einem vermehrten Bedarf an Estradiol gerecht zu werden, welches für synaptische Plastizität, Axonwachstum und Neuroprotektion notwendig ist.

9. Literaturverzeichnis

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol.* 47: 318-29.

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

Balthazart J, Baillien M, Ball GF (2005) Interactions between kinases and phosphatases in the rapid control of brain aromatase. *J Neuroendocrinol.* 17: 553-9.

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

Barker JM, Galea LA (2009) Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *Gen Comp Endocrinol.* 164: 77-84.

Behl C, Manthey D (2000) Neuroprotective activities of Estradiol: an update. *J Neurocytol.* 29: 351-8.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2004a) Aufl. 16 Anatomie Band 2. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsevier, München.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2004b) Aufl. 16 Anatomie Band 1. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsevier, München.

Bois C, Delalande C, Nurmio M, Parvinen M, Zanatta L, Toppari J, Carreau S (2010) Age- and cell related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *J Mol Endocrinol.* 45: 147-159.

Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302-309.

Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M (2003) The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86: 219-24.

Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S (2004) Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Semin Reprod Med.* 22: 5-9.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *J Mol Endocrinol.* 25: 69-193.

Carreau S (2001) Germ cells: a new source of Estradiols in the male gonad. *Mol Cell Endocrinol.* 178 pp. 65-72.

Clancy AN, Zumpe D, Michael RP (1995) Intracerebral infusion of an aromatase inhibitor, sexual behavior and brain Estradiol receptor-like immunoreactivity in intact male rats. *Neuroendocrinology* 61: 98-111

Cohen RE, Wade J (2011) Aromatase mRNA in the brain of adult green anole lizards: effects of sex and season. *J Neuroendocrinol.* 23: 254-60.

Corbier P, Edwards DA, Roffi J (1992) The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 100: 127-31.

Del Bigio MR (1999) Proliferative status of cells in adult human dentate gyrus. *Microsc Res Tech.* 45: 353-8.

Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 9287-92.

Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M, Jarry H, Rune GM (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local Estradiol synthesis. *J Neurochem.* 97: 1136-44.

Fester L, Prange-Kiel J, Rune GM (2007) Hippocampale Estrogensynthese und synaptische Plastizität. *Neuroforum* 1-8.

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

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-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem.* 71: 2231-8.

Fusani L, Hutchison JB, Gahr M (2001) Testosterone regulates the activity and expression of aromatase in the canary neostriatum. *J Neurobiol.* 49: 1-8.

Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM (2005) Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Rev.* 48: 273-86.

Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchinson JB, Azcoitia I, Chowen JA (1999 a). Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol.* 40: 567-584.

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

Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 30: 503-512.

George FW, Ojeda SR (1982) Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology* 111: 522-9.

Genissel C, Carreau S (2001) Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig cells. *Moll Cell Endocrinol.* 178: 141-6.

Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat.* 93: 420-33.

Hickey GJ, Chen SA, Besman MJ, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D, Richards JS (1988) Hormonal regulation of tissue distribution and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzymes in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology* 122: 1426-1436.

Higo S, Hojo Y, Ishii H, Kominami T, Nakajima K, Poirier D, Kimoto T, Kawato S (2009) Comparison of sex-steroid synthesis between neonatal and adult rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 385: 62-6.

Hinshelwood MM, Repa JJ, Shelton JM, Richardson JA, Mangelsdorf DJ, Mendelson CR (2003) Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function. *Mol Cell Endocrinol.* 207: 39-45.

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 P450 17 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 865-70.

Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, Kominami T, Kimoto T, Honma S, Poirier D, Kawato S (2009) Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* 150: 5106-12.

Huszar G, Roberts JM (1982) Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: regulation at the cellular and molecular levels. *Am J Obstet Gynecol.* 142: 225-37.

Hutchison JB, Wozniak A, Beyer C, Karolczak M, Hutchison RE (1999) Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69: 85-96.

Ivanova T, Beyer C (2000) Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and Estradiol receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell Tissue Res.* 300: 231-237.

Janssens RMJ, Brus L, Cahill DJ, Huirne JAF, Schoemaker J, Lambalk CB (2000) Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum. Reprod. Update.* 6: 505-518.

Kimoto T, Ishii H, Higo S, Hojo Y, Kawato S (2010) Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus. *Endocrinology* 151: 5795-806.

Kohlmann P (2009) Einfluss von exogenem und endogenem Estradiol auf die Expression hippocampaler GnRH- und LH-Rezeptoren *in vitro*. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.

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 Estradiol synthesis. *J Neurosci.* 24: 5913-5921.

Lauber ME, Lichtensteiger W (1994) Pre- and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in the male rat brain studied by *in situ*-hybridization. *Endocrinology.* 135: 1661-8.

Lephart ED, Ladle DR, Jacobson NA, Rhees RW (1996) Inhibition of brain 5 alpha-reductase in pregnant rats: effects on enzymatic and behavioral activity. *Brain Res.* 739: 356-60.

Liu JP, Chang LR, Gao XL, Wu Y (2008) Different expression of caspase-3 in rat hippocampal subregions during postnatal development. *Microsc Res Tech.* 71: 633-8.

Lossi L, Tamagno I, Merighi A (2004) Molecular morphology of neuronal apoptosis: analysis of caspase 3 activation during postnatal development of mouse cerebellar cortex. *J Mol Histol.* 35: 621-9

Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA (1993) Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol.* 7: 776-86.

McCarthy MM, Konkle AT (2005) When is a sex difference not a sex difference? *Front Neuroendocrinology* 26: 85-102.

McCullough LD, Hurn PD (2003) Estradiol and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab.* 14: 228-35.

MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD (1994) Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Mol Cell Neurosci.* 5: 691-8.

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: 255-63.

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.

Mullis K, Floyda F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Publications Symp Quant. Biol 51: 263-73.

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, Petro Z (1972) Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology* 90: 295-298.

Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Petro Z, Kuhn M (1975) The formation and metabolism of Estradiols in brain tissues. *Adv Biosci.* 15: 105-121.

Nelson LR, Bulun SE (2001) Estradiol production and action. *J Am Acad Dermatol* 45: 116-24.

Parinaud J, Beaur A, Bourreau E, Vieitez G, Pontonnier G (1988) Effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells. *Fertil. Steril.* 50: 597-602.

Peruffo A, Cozzi B, Ballarin C (2008) Ontogenesis of brain aromatase P450 expression in the bovine hypothalamus. *Brain Res Bull.* 75: 60-5.

Pfaffl MW (2004) Real time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR* 10: 92-95.

Poletti A, Negri-Cesi P, Rabuffetti M, Colciago A, Celotti F, Martini L (1998) Transient expression of the 5alpha-reductase type 2 isozyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. *Endocrinology* 139: 2171-8.

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrine regulation of Estradiol receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13: 226-34.

Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carretero J, Rune GM (2006) Inhibition of hippocampal Estradiol synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16: 464-471.

Prange-Kiel J, Jarry H, Schön M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008) Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal Estradiol synthesis. *J Cell Biol.* 180: 417-26.

Roselli CE, Resko JA (1984) Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism. *Endocrinology* 114: 2183-9.

Roselli CE, Abdelgadir SE, Resko JA (1997) Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. *Brain Res Bull* 44: 351-7

Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002) Estradiol up-regulates Estradiol receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113: 167-75.

Rune GM, Frotscher M (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 136: 833-42.

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: 2834-44.

Schlinger BA, Arnold AP (1991) Androgen effects on the development of the zebra finch song system. *Brain Res.* 561: 99-105.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 285: 194-204.

Shetty G, Krishnamurthy H, Krishnamurthy HN, Bhatnagar AS, Moudgal RN (1997) Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61: 157-66.

Shimozawa O, Sakaguchi M, Ogawa H, Harada N, Mihara K, Omura T (1993) Core glycosylation of cytochrome P450(arom). Evidence for localization of N terminus of microsomal cytochrome P-450 in the lumen. *J Biol Chem.* 268: 21399-21402.

Simerly RB, Swanson LW (1986) The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 246: 312-342.

Simpson EG, Rubin CC, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M (1999) "Local estrogen biosynthesis in males and females." *Endocr Relat Cancer* 6: 131-7.

Trepel M (2004) Auflage 3, Neuroanatomie, Struktur und Funktion. Urban & Fischer bei Elsevier, München.

van Wijngaarden P, Brereton HM, Coster DJ, Williams KA (2007) Stability of housekeeping gene expression in the rat retina during exposure to cyclic hyperoxia. *Mol Vis.* 29: 1508-15.

Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2005) Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *Neuroreport* 16: 1599-603.

von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006) Estradiol synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol.* 18: 847-56.

Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem.* 76: 1879-86.

Wiedenmann B, Franke WW (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell.* 41: 1017-28.

Woolley DG, Vermaercke B, de Beeck HO, Wagemans J, Gantois I, D'Hooge R, Swinnen SP, Wenderoth N (2010) Sex differences in human virtual water maze performance: Novel measures reveal the relative contribution of directional responding and spatial knowledge. *Behav Brain Res.* 208: 408-414.

Yague JG, Munoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2006) Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 138: 389-401.

Yang MH, Yoo KH, Yook YJ, Park EY, Jeon JO, Choi SH, Park SY, Woo YM, Lee MJ, Park JH (2007) The gene expression profiling in murine cortical cells undergoing programmed cell death (PCD) induced by serum deprivation. *J Biochem Mol Biol.* 40: 277-85.

Zhao C, Fujinaga R, Tanaka M, Yanai A, Nakahama K, Shinoda K (2007) Region-specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain: immunohistochemical and in situ- hybridization analyses. *J Comp Neurol.* 500: 557-73.

Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM (2010) Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology* 151: 1153-60.

Zhu L-J, Altmann SW (2005) mRNA and 18S-RNA coapplication reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Anal Biochem.* 345: 102-109.

10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Rune für die freundliche Aufnahme im Institut und die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit dort erstellen zu können, bedanken.

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Prange-Kiel für die Überlassung des Themas und für die Hilfestellung bei der Einarbeitung und Durchführung der Methoden.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Prof. Dr. Proels für die konstruktiven Anmerkungen beim Verfassen der Schrift.

Danken möchte ich Prof. Dr. Roland Bender, Dr. Lars Fester, PD Dr. Evita Mohr und Dr. Christian Peters für die geduldige Einweisung in die Methoden, sowie für den fachlichen Beistand bei der Durchführung der Methoden.

Bei dem Erlernen histologischer und molekularbiologischer Techniken standen mir Frau Herbort, Frau Kruck und Frau Hamann mit ihrer großen Hilfsbereitschaft und langjährigen Erfahrung stets zur Seite. Hierfür ein herzliches Dankeschön. Frau Steglich danke ich für die freundliche Einweisung in der Humangenetik.

Henning Heinzig und Jasmin Al-Samir danke ich für die freundliche Hilfestellung bei der Bildbearbeitung sowie Tipps zur grafischen Gestaltung.

Katrin Kornek und Jasmin Al-Samir danke ich für das freundliche Korrekturlesen.

Anna Katharina Langenbruch gilt mein Dank für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Stephanie Ruppert, Susanne Jungwirth und Sandra Purwins danke ich für die freundliche Hilfe beim Formatieren der Schrift und beim Umsetzen in eine druckfähige Datei.

Von ganzem Herzen möchte ich Dr. Kais Al-Samir danken für seine schier endlose Geduld, seine aufbauenden Worte und für seine Unterstützung, die weit über das Erstellen der Dissertation hinausgeht.

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, die mir die Möglichkeit dieses Studiums geschaffen haben und meinen Geschwistern Katrin und Matthias, die mich in allen Lebenslagen stets unterstützt hatten.

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: _____
Thomas Kornek