

Aus dem  
Institut Anatomie I-Zelluläre Neurobiologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

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

# **Einfluß von $17\beta$ -Östradiol auf die Expression des Neuronalen Wachstumsfaktors BDNF und seines Rezeptorproteins TrkB**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von  
Marc Nottebohm,  
geboren in Heidelberg, Baden-Württemberg

Hamburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 26.09.2012

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Bender

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. M. Jücker

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Pröls

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Einführung.....</b>	<b>6</b>
3.1. Hintergrund der Studie: Östrogene und neuronale Plastizität .....	6
3.2. BDNF als potenzieller Vermittler von Östrogen-Effekten.....	7
3.3. Aufbau des Hippokampus .....	8
3.4. Hippokampale 17 $\beta$ -Östradiol-Synthese durch Aromatase.....	10
3.5. Experimentelles Modell und Fragestellungen.....	11
<b>4. Methoden.....</b>	<b>13</b>
4.1. Tiere .....	13
4.2. Gewebefixierung von Rattengehirnen durch Perfusion .....	13
4.3. Anlage von organischen Gewebekulturen.....	14
4.4. Herstellung von Gefrierschnitten am Kryostat.....	16
4.5. Immunhistochemie .....	17
4.5.1. Immunhistochemie an Schnitten von Gewebekulturen .....	17
4.5.2. Immunhistochemie an Schnitten von Rattengehirnen.....	18
4.6. Western Blot.....	19
4.6.1. Proteinaufbereitung aus Gewebe.....	19
4.6.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
4.6.3. SDS-PAGE .....	20
4.6.4. Blottechnik .....	21
4.6.5. Entwicklung der Blots.....	22
4.7. Konfokale Mikroskopie .....	22
4.8. Auswertung .....	23
4.8.1. Auswertung Immunhistochemie .....	23
4.8.2. Auswertung Western Blot.....	24
4.8.3. Statistik .....	24
<b>5. Materialien.....</b>	<b>26</b>
5.1. Chemikalien.....	26
5.2. Antikörper.....	27
5.4. Software .....	30
5.5. Lösungen.....	30

<b>6. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
6.1. Analyse der BDNF-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels Western Blot .....	34
6.2. Analyse der TrkB-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels Western Blot .....	36
6.3. Analyse der regionalen TrkB-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels quantitativer Immunhistochemie .....	39
6.3.1. Vergleich der regionalen Expression <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	39
6.3.2. Analyse der regionalen TrkB-Expression nach E2- bzw. Letrozol- behandlung <i>in vitro</i> .....	41
6.3.2.1. CA1, Stratum radiatum .....	41
6.3.2.2. Gyrus dentatus, Stratum moleculare .....	43
<b>7. Diskussion</b> .....	<b>45</b>
7.1. BDNF und E2 als Vermittler von synaptischer Plastizität im Hippokampus....	45
7.2. Wirkung von E2 auf den BDNF-Rezeptor TrkB .....	48
7.3. Relevanz für die Medizin .....	49
<b>8. Zusammenfassung</b> .....	<b>51</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>52</b>
<b>10. Danksagung</b> .....	<b>59</b>
<b>11. Curriculum Vitae</b> .....	<b>60</b>
<b>12. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>62</b>

# 1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1:** Schematische Darstellung des Hippokampus.
- Abb. 2:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Präparation des Hippokampus.
- Abb. 3:** Schematische Darstellung der Anordnung innerhalb der *Semidry*-Transfer-Zelle.
- Abb. 4:** Veranschaulichung der Vorgehensweise bei der Auswertung mit dem Programm *Openlab 3.1.5*.
- Abb. 5:** Darstellung der Western-Blot-Ergebnisse (BDNF).
- Abb. 6:** Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Western Blot-Analyse für TrkB.
- Abb. 7:** Graphische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse für TrkB (95 kDA-Form).
- Abb. 8:** Graphische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse für TrkB (155 kDA-Form).
- Abb. 9:** Vergleich der TrkB-Expression im Hippokampus von 16 Tage alten Ratten (A, C, E) und in Gewebekulturen, die am 5. postnatalen Tag präpariert und für 11 Tage kultiviert wurden (B, D, F).
- Abb. 10:** Vergleich der TrkB-Expression (rot) in der CA1-Region einer unbehandelten Gewebekultur (A) bzw. nach Letrozol- (B) oder 17 $\beta$ -Östradiol -Gabe (C).
- Abb. 11:** Quantitative Darstellung der Messergebnisse aus dem Stratum radiatum der CA1-Region.
- Abb. 12:** Vergleich der TrkB-Expression (rot) im Stratum moleculare (SM) einer unbehandelten Gewebekultur (A), und nach Letrozol- (B) bzw. 17 $\beta$ -Östradiol-Gabe (C).
- Abb. 13:** Quantitative Darstellung der Messergebnisse aus dem Stratum moleculare.
- Tab. 1:** Einstellungen am LSM.

## 2. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMPA	<i><math>\alpha</math>-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionacid</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (dt. Varianzanalyse)
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ETOH	Ethanol
E2	17 $\beta$ -Östradiol
ER $\alpha$	Estrogen Rezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Estrogen Rezeptor $\beta$
ERE	<i>Estrogen response element</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
HCL	Hydrogenchlorid
HBSS	<i>Hank`s Balanced Salt Solution</i>
Ktl.	Kontrolle
Let	Letrozol
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i> (dt. Langzeit-Potenzierung)
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>

---

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP40	Tergitol NP 40
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline-Tween</i>
Pi	Protease Inhibitoren-Mix complete
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
P	postpartal
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TrkB	Tyrosin-Rezeptor-Kinase B
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 3. Einführung

### 3.1. Hintergrund der Studie: Östrogene und neuronale Plastizität

Das menschliche Gehirn ist Schaltzentrale des menschlichen Körpers und reguliert das Zusammenwirken von über  $10^{10}$  Neuronen, die essentiell sind für eine korrekte Funktion der Motorik, der Sensibilität und, unter anderem, auch für die Gedächtnisbildung. Eine zentrale Aufgabe bei der Gedächtnisbildung fällt dem Hippokampus zu, der im Temporallappen des Großhirns lokalisiert ist. Dabei spielen Neurotransmitter, Synapsenkontakte und die resultierenden elektrischen Potentiale eine wichtige Rolle, denn erst durch ihr optimales Zusammenwirken kommt es zu einer Speicherung und Konsolidierung der Informationen, mit denen der Mensch im täglichen Leben konfrontiert wird. Zentral für die Gedächtnisfunktion des Hippokampus ist die ausgeprägte Fähigkeit seiner Neurone zu neuronaler Plastizität. Darunter versteht man die Fähigkeit der Neurone, synaptische Kontakte mit anderen Neuronen zu verändern, d. h. nach Bedarf zu verstärken oder abzuschwächen. Diese Fähigkeit zur neuronalen Plastizität wird durch viele Faktoren reguliert. Wie sich zunehmend zeigt, spielen hierbei auch Hormone, wie das Sexualhormon  $17\beta$ -Östradiol (E2), eine große Rolle (McEwen et al., 2001; Rune & Frotscher, 2005).

Östrogene sind überwiegend bekannt als Hormone, die in den Gonaden, d. h. bei Frauen in den Ovarien (im Follikel und im Gelbkörper) und bei Männern zu einem geringen Teil im Hoden gebildet werden. Allerdings ist seit einiger Zeit erwiesen, dass Östrogene auch in anderen Körpergeweben (z. B. Fettgewebe, Knochen, Immunzellen) an Stoffwechselprozessen, die nicht vorrangig mit der Reproduktion in Verbindung stehen, beteiligt sind und dort auch gebildet werden können. Besonderes Aufsehen erregte der Befund, dass Östrogene (wie z. B. E2) auch im Gehirn, und dabei vorrangig im Hippokampus, an Funktionen wie der Regulation der Synapsendichte – also an neuronaler Plastizität – beteiligt sind (Gould et al., 1990; Kretz et al., 2004). Dies wurde zuerst auf eine Synapsen-modulierende Funktion gonadal gebildeter Östrogene zurückgeführt (Woolley & McEwen, 1992). Die Entdeckung, dass die Aromatase, das finale Enzym der Östradiolsynthese, auch in hippokampalen Neuronen exprimiert wird (Wehrenberg et al., 2001; Hojo et al., 2004) und dass hippokampale Neurone selbst zur Synthese von E2 in der Lage sind

(Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004), führte hier jedoch zu einem Umdenken. Es spricht nun vieles dafür, dass vorwiegend hippokampal gebildetes E2, und nicht das gonadale, als neuronaler Modulator im Hippokampus aktiv ist (Rune et al., 2006). Die Östrogen-Produktion im Hippokampus unterliegt dabei jedoch weiterhin der zyklischen Regulation durch *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH), was die Zyklusabhängigkeit der Effekte im Hippokampus erklärt (Prange-Kiel et al., 2008).

Es stellt sich jedoch die Frage, über welche Mechanismen das im Hippokampus gebildete E2 die neuronale Plastizität beeinflusst. Bekannt ist, dass E2 an Rezeptoren binden und darüber genomische, sowie nicht-genomische Effekte auslösen kann (Adams et al., 2002; McEwen, 2002; Foster, 2005; Balthazart et al., 2006). Es existieren mindestens zwei Formen von Östrogen-Rezeptoren (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ). Als Mitglieder der Steroidhormonrezeptoren befinden sie sich im Zytoplasma der Zelle, können jedoch über lipophile „Anker“ auch in der Membran verankert sein (Levin, 2005). Die Rezeptoren liegen als inaktive Form vor und dimerisieren nach Bindung von E2. Die Dimere wandern beim genomischen Signalweg anschließend in den Nukleus und binden an sog. *Estrogen Response Elements* (ERE) auf der DNA. Durch diese Bindung stimuliert das Rezeptor-Dimer die Genexpression des betroffenen Gens. Bei der nicht-genomischen Wirkungsweise interagieren die Östrogenrezeptoren mit anderen Signaltransduktionswegen (Levin, 2005).

### **3.2. BDNF als potenzieller Vermittler von Östrogen-Effekten**

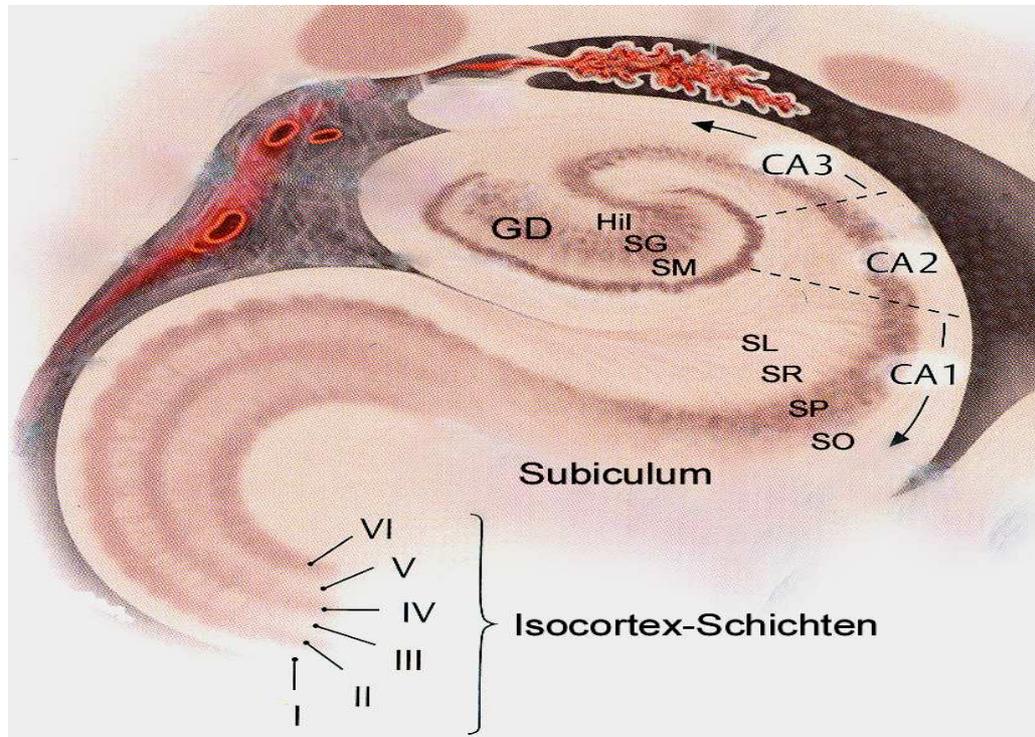
Ein bekanntes Gen mit ERE-Sequenz in der Promotorregion ist das Gen für den *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Sohrabji et al., 1995). BDNF ist ein neuronaler Wachstumsfaktor (Barde et al., 1982; Leibrock et al., 1989), der insbesondere während der hippokampalen Entwicklung (Davies, 1994; Enokido et al., 1999; Martin et al., 2008; Cohen-Cory et al., 2010), aber auch noch im adulten Hippokampus, von Neuronen exprimiert wird (Binder & Scharfman, 2004). BDNF wird in Neuronen als ca. 32 kDa großes Vorläufer-Protein gebildet und anschließend proteolytisch prozessiert (Mowla et al., 2001). Nach seiner Freisetzung bindet das aktive BDNF (ca. 14 kDa) an seinen Rezeptor, TrkB. Dieser verfügt über Tyrosinkinase-Aktivität, die nach BDNF-Bindung über Autophosphorylierung aktiviert wird (Klein et al., 1989; Middlemas et al., 1991). Dies führt zur Auslösung von intrazellulären Signalkaskaden (z. B. über Ras, PLC oder PI3 Kinase), an deren

Ende jeweils eine Änderung der Expression von Genen steht, die die Effekte von BDNF vermitteln. Funktionell konnte für BDNF unter anderem eine Stimulation der Neurogenese (Larsson et al., 2002; Scharfman et al., 2005), sowie verschiedene differenzierungsfördernde Wirkungen auf hippocampale Neurone (Eide et al., 1993) nachgewiesen werden. Interessanterweise spielt BDNF auch eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität (Segal & Murphy, 2001; Lu, 2003; Scharfman & MacLusky, 2006; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). Die Effekte von BDNF und Östrogen im Hippokampus sind dabei hinsichtlich Wirkung und Signaltransduktionsweg sehr ähnlich (Scharfman & MacLusky, 2005). So wurden beispielsweise sowohl nach BDNF- als auch nach E2-Gabe vergleichbare Veränderungen der Aktivität oder Expression von NMDA-Rezeptoren (Foy et al., 1999; Levine & Kolb, 2000; Sun et al., 2001; Smith & McMahon, 2005; Zhou et al., 2010) und von Calcium-modulierten Kalium-Kanälen beobachtet (Carrer et al., 2003; Kramar et al., 2004). Ähnlichkeiten fanden sich auch in den Wirkungen von BDNF und E2 auf die Synapsendichte im Hippokampus (Gould et al., 1990; Woolley & McEwen, 1992; Alonso et al., 2004; Kretz et al., 2004; Ji et al., 2005; Kramar et al., 2010; Zhou et al., 2010). Da außerdem gezeigt werden konnte, dass E2 auf die Transkription von BDNF stimulierend wirkt (Ivanova et al., 2001; Solum & Handa, 2002; Scharfman et al., 2007), stellt sich die Frage, ob das im Hippokampus gebildete E2 seine Wirkung auf die neuronale Plastizität nicht - zumindest teilweise - über die Expression von BDNF vermittelt. Diese Frage ist Gegenstand und Motivation der vorliegenden Arbeit.

### **3.3. Aufbau des Hippokampus**

Der Hippokampus ist ein Bestandteil des limbischen Systems und evolutionär eine der ältesten Regionen des Wirbeltiergehirns. Im Gegensatz zum phylogenetisch jüngeren, sechschichtigen Isocortex besteht der Hippokampus aus einem dreischichtigen Allocortex. Er liegt im Temporallappen des Telencephalons und ist maßgeblich an der Gedächtniskonsolidierung, d. h. der Überführung von Inhalten des Kurzzeitgedächtnisses in das Langzeitgedächtnis beteiligt. In diesem Zusammenhang ist der Hippokampus ein wichtiges Schaltglied des Papez-Neuronenkreislaufs, an dem auch der Gyrus cinguli, der Thalamus und die Corpora mamillaria beteiligt sind. Eine enge Verbindung besteht außerdem zur Amygdala, die für das emotionale Verhalten des Menschen bedeutsam ist.

Die in den Experimenten verwendeten Hippokampi der Ratte sind hinsichtlich ihres mikroskopisch-anatomischen Aufbaus dem menschlichen vergleichbar. Der Hippokampus wird wie folgt untergegliedert:



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Hippokampus

GD - Gyrus dentatus

SM - Stratum moleculare

SG - Stratum granulare

Hil - Hilus

SO - Stratum oriens

SP - Stratum pyramidale

SR - Stratum radiatum

SL - Stratum lacunosum

Quelle: Schünke et al., Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 2006, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Seite 375.

Der Gyrus dentatus erhält seine Afferenzen vom entorhinalen Kortex und kann als Tor zum Hippokampus betrachtet werden. Er wird unterteilt in a) das Körnerzellband (Stratum granulare), das aus glutamatergen Körnerzellen besteht (Altman & Das, 1965), b) eine Molekularschicht (Stratum moleculare), die sich hauptsächlich aus den

Dendriten der Körnerzellen, ihren Afferenzen und interneuronalen Verbindungen zusammensetzt, und c) den Hilus, der neben hemmenden Interneuronen hauptsächlich die Axone der Körnerzellen (sog. Moosfasern), die in der CA3 Region enden, enthält.

Der Hauptanteil des Hippokampus besteht aus dem dreischichtigen Ammonshorn (Cornu ammonis, CA), das in die Regionen CA1, CA2 und CA3 eingeteilt wird. Jede dieser Regionen wird von ventrikulär nach pial in Schichten untergliedert: das Stratum oriens (SO), das Stratum pyramidale (SP), das Stratum radiatum (SR), sowie das Stratum lacunosum (SL). Die Axone der glutamatergen Pyramidenzellen in CA3 verlaufen durch den Fornix und enden in anderen wichtigen Regionen wie z.B. den Corpora mamillaria. Sie geben weiterhin die sog. Schaffer-Kollateralen ab, die an den apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen enden. Die an ihren Synapsen stattfindende Langzeitpotenzierung (LTP) ist von großer Bedeutung für die Gedächtniskonsolidierung. Die CA1-Region erhält neben den Schaffer-Kollateralen auch Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex. Ihre Efferenzen ziehen u. a. zum Fornix und zum Subiculum (siehe unten).

Als letzter wichtiger Abschnitt ist das Subiculum zu nennen, das Afferenzen aus der CA1-Schicht erhält und seinerseits Projektionen zum entorhinalen und perirhinalen Cortex, sowie zu Hypothalamus-Kernen, Nucleus accumbens und zur Amygdala ausbildet.

### **3.4. Hippokampale $17\beta$ -Östradiol-Synthese durch Aromatase**

Die Aromatase ist ein Enzym, welches die Bildung von  $17\beta$ -Östradiol aus Testosteron katalysiert und zur Familie der P450-Enzyme gezählt wird. Es ist das einzige Enzym im menschlichen Körper, das die Bildung eines aromatischen Rings bewirken kann. Lokalisiert ist die Aromatase im endoplasmatischen Retikulum von Zellen, die Östrogene produzieren. Im Hippokampus wird das Enzym besonders stark in den Pyramidenzellen der CA1-CA3 Region exprimiert. Weiterhin findet man es auch in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (Yague et al., 2008; Bender et al., 2010).

Die Aromatase ist auf Grund ihres unmittelbaren Einflusses auf die Östrogensynthese von erheblicher Bedeutung für die synaptische Plastizität (Kretz et al., 2004). Dies unterstreichen auch Beobachtungen im medizinischen Kontext: so wird beispielsweise nach einer Hirnschädigung die Expression des Enzyms hoch reguliert (Saldanha et al., 2009).

Zur Regulation der Aromatase trägt weiterhin die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration wesentlich bei. So kommt es z.B. nach Aktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle, der weiteres Calcium aus intrazellulären Speichern freisetzt (Fester et al., 2011). In der Folge werden Kinasen aktiviert, die die Aromataseaktivität mittels spezifischer Phosphorylierung hemmen (Balthazart et al., 2005), möglicherweise ein homöostatischer Rückkopplungsmechanismus.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde die Aromatase blockiert, um damit die lokale Östrogenproduktion im Hippokampus zu hemmen. Für diese Blockade wurde Letrozol verwendet, ein nicht-steroidaler Inhibitor des finalen Enzyms der  $17\beta$ -Östradiolsynthese. Die Hemmung erfolgt dabei über eine kompetitive Bindung an die Zytocrom P450-Einheit der Aromatase. Diese wird dadurch reversibel blockiert. Diese Blockade wirkt selektiv nur auf die Aromatase, so dass die Produktion von Kortikosteroiden unbeeinträchtigt bleibt.

### **3.5. Experimentelles Modell und Fragestellungen**

Als experimentelles Modell für diese Untersuchungen wurden hippokampale Gewebekulturen verwendet, die gegenüber dissoziierten Neuronenkulturen einerseits und *in vivo* Experimenten (d. h. dem intakten Tier) andererseits den Vorteil besitzen, dass wesentliche neuronale Verbindungen innerhalb des Hippokampus erhalten bleiben und dennoch experimentelle Manipulationen *in vitro* möglich sind. Speziell wurden mit diesem Modell folgende Fragen untersucht:

- 1) Wie wirkt sich die Zugabe von E2 zu den hippokampalen Kulturen auf die Expression von BDNF und seines Rezeptors TrkB aus?

- 2) Wie wirkt sich eine Inhibierung der endogenen, hippocampalen Östrogen-Synthese mittels Letrozol auf die Expression von BDNF und TrkB aus?

Verwendet wurden für diese Untersuchungen 2 Bestimmungsansätze: a) die Proteinanalyse mittels Western Blot und b) die Quantifizierung immunhistochemischer Signale mit Hilfe der optischen Intensitäts-Analyse. Letztere Methode wurde vor allem deswegen angewendet, weil sie neben allgemein-quantitativen Aussagen auch eine Lokalisation möglicher Expressionsunterschiede zulässt. Ausgewählt wurden für diese Bestimmung das Stratum radiatum der CA1-Region und das Stratum moleculare des Gyrus dentatus, weil in diesen Regionen zuvor deutliche Effekte von E2 auf die neuronale Plastizität nachgewiesen wurden (Woolley & McEwen, 1992; Warren et al., 1995; Kretz et al., 2004; Smith & McMahon, 2005; Bender et al., 2010; Zhou et al., 2010).

## 4. Methoden

### 4.1. Tiere

Für die Experimente wurden 56 Ratten (*Rattus norvegicus*) des Zuchtstamms Wistar verwendet. Sie stammten aus der Tierhaltung des UKEs. Es wurden verschiedene Alterstufen eingesetzt. Für die Herstellung der Gewebekulturen für Western Blots und Immunhistochemie wurden 5 Tage alte (P5) Ratten verwendet (40 für Immunhistochemie, 13 für Western Blots). Des Weiteren wurden zum Vergleich mit der *in vitro*-Situation (Nachweis einer altersgemäßen Expression; siehe 6.3.1) 16 Tage alte Ratten (n = 3) eingesetzt. Die Tiere (d. h. die Mütter) wurden in der Tierhaltung unter kontrollierten Bedingungen gehalten: bei einem Dunkel-Helligkeitsrhythmus von jeweils 12 h und Futter und Wasser *ad libitum*. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Richtlinien für Tierhaltung und Tierversuche durchgeführt.

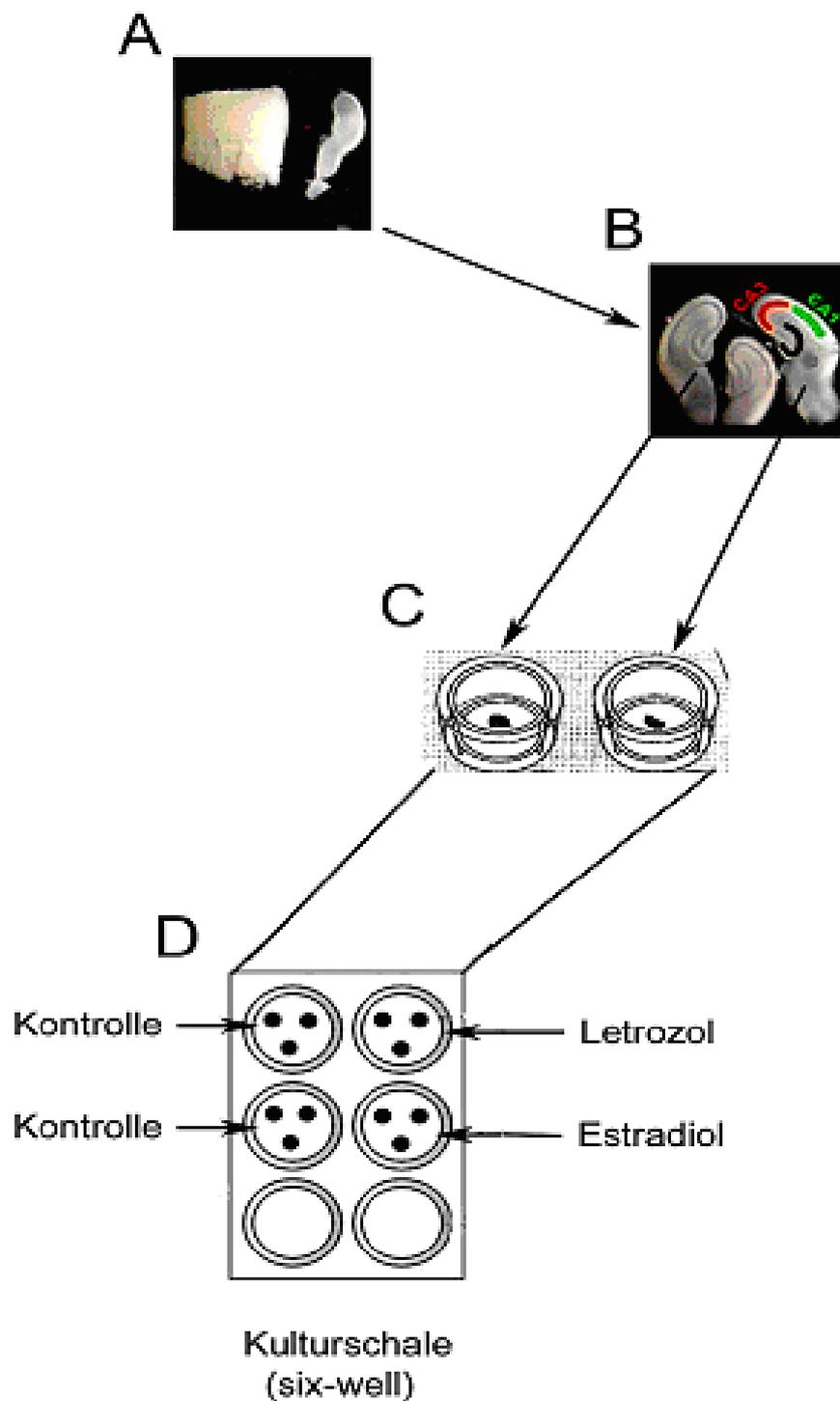
### 4.2. Gewebefixierung von Rattengehirnen durch Perfusion

Den 16 Tage alten Ratten wurde zuerst ein Anästhetikum (Ketamin/Rompun, Zusammensetzung: siehe 5.5.) intraperitoneal injiziert. Nach einsetzender Betäubung wurden sie auf dem Rücken liegend befestigt. Nun wurde das Peritoneum und die Bauchdecke mittels einer Schere eröffnet und eine Kanüle in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Durch diese Kanüle pumpte ein Perfusor zuerst eine 0,9%ige NaCl-Lösung zur Spülung des Gefäßsystems, d. h. Entfernung des Blutes aus den Gefäßen, das durch eine Inzision im rechten Vorhof entweichen konnte. Nach Abschluss des Spülvorgangs wurde die 0,9%ige NaCl-Lösung im Perfusor gegen die Perfusionslösung (2,5%iges Paraformaldehyd) ausgetauscht und der Rattenkörper mit dieser Lösung für weitere 10 min durchgespült. Dadurch wurde eine Fixierung des Rattengehirns „von innen“ erreicht. Danach wurde die Ratte dekapitiert und die Kalotte durch einen median-sagittalen Schnitt eröffnet. Das Gehirn wurde mit einem Heidemannspatel entnommen und für 4 h in 2,5% PFA-Lösung nachfixiert. Danach wurde es für 24 h in eine 25%ige Saccharose-Lösung eingelegt und abschließend in Isopentan eingefroren.

### **4.3. Anlage von organischen Gewebekulturen**

Die Präparation hippokampaler Kulturen wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt: 5 Tage alte Ratten wurden mittels einer Schere dekapitiert und im darauf folgenden Arbeitsschritt wurde ihnen die Kopfhaut aufgeschnitten. Diese wurde dann mit einer Pinzette zur Seite gezogen, so dass die Schädeldecke zum Vorschein kam. Die Schädeldecke wurde ebenfalls mit der Schere eröffnet, anschließend wurde das Gehirn mit einem Heidemannspatel aus der Kalotte entnommen und in Präparationsmedium (Zusammensetzung: siehe 5.5.) überführt. Nach Entfernung zuerst des Frontal-, dann des Kleinhirns mit Hilfe eines Skalpells wurden die beiden Hirnhemisphären durch einen Mediansagittalschnitt getrennt. Der Hippokampus wurde daraufhin gemeinsam mit dem entorhinalen Cortex unter der Stereolupe mit Hilfe von Pinzette und Heidemannspatel vom Rest des Gehirns getrennt, auf die Plattform eines Gewebehäckslers (*Tissue Chopper*) gelegt und transversal in 10-12 400 µm dicke Scheiben geschnitten (siehe Abb. 2A). Nach Überführung dieser Scheiben in das Präparationsmedium wurden unter der Stereolupe zwei zueinander passende Hippokampusscheiben (Schwesterkulturen) ausgewählt, um morphologisch einheitliche Voraussetzungen der zu vergleichenden Kulturen zu schaffen (siehe Abb. 2B und C).

Die Kultivierung der organotypischen Gewebekulturen erfolgte nach der Methode von Stoppini (Stoppini et al., 1993). Die Hippokampusscheiben wurden dabei zusammen mit Präparationsmedium auf Bio-Mikro-Membranen aufgetragen, deren Poren einen Durchmesser von 0,4 µm besaßen. Nach Absaugung des Präparationsmediums wurden die Hippokampusscheiben, auf der Bio-Mikro-Membran liegend, unter sterilen Bedingungen in Kulturschalen (siehe Abb. 2D) mit Kulturmedium (Zusammensetzung: siehe 5.5.) übertragen; das Kulturmedium konnte durch die Poren der Bio-Mikro-Membran durchfließen, um so die Hippokampusscheiben zu ernähren. In dieser Vorkultur verblieben die Präparate für die Dauer von 4 Tagen bei 37°C, bevor einer Gruppe der Schwesterkulturen entweder Letrozol oder E2 für 7 Tage zugegeben wurde. Die Vergleichsgruppe blieb unbehandelt und diente als Kontrolle (siehe Abb. 2D).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Präparation des Hippokampus

A) Hippokampus-Scheibe (400 µm) unter dem Tissue Chopper

B) Querschnitt zweier benachbarter Gewebeschnitte (Schwesterkulturen)

C) Platzierung der Gewebeschnitte auf der Mikromembran

D) Kulturschale (Six-well) mit experimenteller Anordnung der Gewebeschnitte

Während des Inkubations-Zeitraums wurde jeden zweiten Tag das Kulturmedium gewechselt. Betroffen davon war auch das hinzugegebene Letrozol bzw. E2, welches beseitigt und bei jedem Mediumwechsel in der Konzentration von  $10^{-7}$ M in die Kulturschalen neu hinzugegeben wurde. Diese Konzentration orientierte sich an vorangegangenen Studien (Prange-Kiel et al., 2003), die zeigten, dass die Aromatase bei einer Konzentration von  $10^{-7}$ M Letrozol ohne toxische Effekte maximal inhibiert wird. Zu erwähnen ist, dass diese Arbeitsschritte von einer Labortechnischen Assistentin vorgenommen wurden, um so eine Durchführung der Experimente auf der Basis einer Blindstudie zu gewährleisten. Durch die Blindstudie wurde erreicht, dass keine subjektiven Eindrücke des Verfassers Einfluss auf das Ergebnis der Studie nehmen konnten.

Nach sieben Tagen wurden die Kulturen jeweils 2x abwechselnd in 4°C kaltem PBS-Medium und 37°C warmem PBS-Medium kurz gewaschen und anschließend für 4 h bei 4°C in PFA fixiert. Es folgten zwei weitere Waschgänge mit PBS von jeweils 10 min Dauer, gefolgt von einem abschließenden Waschgang von 30 min Dauer.

Die Kulturen wurden danach mit 25%iger Saccharose-Lösung (in PBS) überschichtet und darin für vier Stunden inkubiert. In dieser Zeit wurde die Saccharose-Lösung einmal ausgetauscht. Zwei Gewebeschnitte (jeweils die Schwesterkulturen, d. h. die experimentell behandelte Kultur und die zugehörige Kontrolle) wurden dann von der Membran losgelöst, gemeinsam auf ein Deckgläschen übertragen und als Gruppe A bzw. B bezeichnet. Dem Verfasser blieb während der weiteren Bearbeitung der Präparate die Kodierung unbekannt (Blindstudie).

Nach vorsichtigem Absaugen überschüssiger Saccharose wurde auf jede Kultur ein Tropfen Gefriermedium gegeben. Die Deckgläschen mit den Kulturen wurden dann auf Trockeneis aufgelegt, wodurch das Gefriermedium festfror und die Kulturen dabei einschloss. Bis zum Erstellen der Schnitte am Kryostat wurden die eingefrorenen Kulturscheiben im Gefrierschrank bei -25°C gelagert.

#### **4.4. Herstellung von Gefrierschnitten am Kryostat**

Im Kryostat wurden die eingefrorenen Kulturen mit einem Tropfen Gefriermedium auf eine Halterungsplatte geklebt und bei -18°C in horizontaler Richtung von ventral nach

dorsal in 20 µm-dicke Scheiben geschnitten. Die noch gefrorenen Schnitte wurden anschließend mit Hilfe eines Spatels vorsichtig in eine Kulturschale mit PBS-Puffer überführt. In dieser wurden sie langsam an die Raumtemperatur äquilibriert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden jeweils zwei Kultur-Schnitte der Gruppe A und der Gruppe B mit Hilfe eines Pinsels und etwas Aqua dest. auf einen Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden dann zum Trocknen sicher gelagert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -25°C aufbewahrt.

Für die Herstellung von Gewebeschnitten aus ganzen Rattengehirnen wurden diese komplett mittels eines Tropfens Gefriermedium auf die Halterungsplatte im Kryostat aufgeklebt. Die Platte wurde danach in die Microtom-Halterung eingespannt. Die Gehirne wurden in horizontaler Richtung geschnitten (20 µm-dicke Schnitte). Gehirnschnitte, die die Hippokampusformation enthielten, wurden mittels eines Spatels in eine Kulturschale mit PBS überführt. Für das weitere Vorgehen wurden diese Schnitte nicht auf Objektträger aufgezogen und gelagert, sondern direkt anschließend mittels der *Free Floating*-Technik immunhistochemisch (siehe 4.5.2.) weiter behandelt.

#### **4.5. Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis der Proteinexpression in Gewebeschnitten mittels spezifischer Antikörper.

In der vorliegenden Studie wurde speziell die Expression des TrkB-Rezeptors untersucht. Dazu wurden folgende immunhistochemische Verfahren angewendet:

##### **4.5.1. Immunhistochemie an Schnitten von Gewebekulturen**

Die noch tiefgefrorenen Objektträger mit Kulturschnitten wurden aus der Kühltruhe geholt und zur Äquilibration für ca. 1 h bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurden sie zur Nachfixierung für 20 min in eine Küvette mit 2,5%iger PFA-Lösung eingestellt. Es folgten zwei Waschungen (jeweils 5 min) in 1x PBS. Daran schloss sich die Präinkubation an. Hierfür wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mit jeweils 500 µl einer Lösung von 5% Ziegen Serum (NGS) überschichtet und für 45 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Der Zweck dieser Behandlung ist die Neutralisierung elektrostatischer Ladungen im Gewebe, die zu

einer unspezifischen Bindung des TrkB-Antikörpers führen könnten. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Präinkubationslösung von den Objektträgern entfernt und im Austausch gegen die Inkubationslösung (ebenfalls 500 µl pro Objektträger) ersetzt, die aus Kaninchen gewonnene polyklonale Antikörper gegen TrkB enthielt (ca. 2 µg/ml bzw. 1:200 Verdünnung der Antikörperstammlösung). Mit dieser Lösung wurden die Schnitte über einen Zeitraum von 24 h in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgten 2 Waschungen in mit 1x PBS gefüllten Küvetten (jeweils 10 min). Daran schloss sich die Inkubation mit dem gegen Kaninchen-Immunglobuline (IgGs) gerichteten und mit Fluorochrom (Cy3) markierten Zweitantikörper an. Dieser Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 1:800 (entspricht 1,25 µg/ml) eingesetzt. Nach 3 h Inkubation mit dieser Lösung in der abgedunkelten Feuchtkammer wurden die Objektträger erneut mit 1x PBS gewaschen (2 x 10 min in einem abgedunkelten Raum) und danach für 1 min mit 500 µl einer DAPI-Lösung (1 µg/ml) zum Zweck der Kerngegenfärbung überschichtet. Dies diente einer besseren Orientierung bzw. Erleichterung beim Auffinden der darzustellenden Regionen im Fluoreszenz-Mikroskop. Abschließend wurden die Präparate in eine Küvette mit Aqua dest. eingetaucht, danach abgedunkelt getrocknet, mit Einbettmedium (DAKO) beschichtet (2 Tropfen) und mit einem Deckglas eingedeckelt.

#### **4.5.2. Immunhistochemie an Schnitten von Rattengehirnen**

Bei der *Free-floating*-Technik werden die Gewebeschnitte vor der Immunhistochemie nicht auf Objektträgern fixiert, sondern sie flottieren in Lösung, werden dabei von einer Inkubationslösung zur nächsten transportiert und erst nach Abschluss der Immunhistochemie auf Objektträger gebracht.

Die aufeinander- folgenden Inkubationslösungen befanden sich in den Vertiefungen einer Kulturschale (*six-well*), wobei jeweils pro Vertiefung 1,5 ml Inkubationslösung verwendet wurden. Der Transport der Schnitte erfolgte mit Hilfe einer gekrümmten Glaspipette. Es wurden stets ca. 4-6 Schnitte gleichzeitig pro Vertiefung einer Kulturschale inkubiert. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

Die im Kryostat angefertigten Gewebeschnitte wurden zuerst in 1x PBS-Medium gesammelt. Danach wurden sie zur Präinkubation in 1,5 ml einer 5%igen NGS-Lösung (in PBS) überführt. Die Inkubationszeit betrug 45 min. Dieser Lösung wurde dann der Primärantikörper (Konzentrationsverhältnisse siehe 4.5.1.) zugegeben; die Schnitte wurden damit für 48 h bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschgänge in 10 ml PBS für die Dauer von jeweils 10 min. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 3 h mit dem Zweit-Antikörper (Cy3-markiert; Konzentrationsverhältnisse siehe 4.5.1.; 1,5 ml Inkubationsvolumen) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschgänge in jeweils 10 ml 1x PBS, sowie eine 1-minütige Inkubation in DAPI-Lösung (Konzentrationsverhältnisse siehe 4.5.1.; 10 ml Inkubationsvolumen). Erst danach wurden die Schnitte mit Aqua dest. auf Objektträger aufgezogen, nach dem Trocknen mit Einbettmedium (DAKO) beschichtet (2 Tropfen) und mit einem Deckglas eingedeckelt.

## **4.6. Western Blot**

### **4.6.1. Proteinaufbereitung aus Gewebe**

Um Proteine für SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse verwenden zu können, musste zunächst einmal eine Proteinaufbereitung stattfinden, bei der Bestandteile der Zelle, die nicht von Interesse waren, beseitigt wurden.

Das Gewebe wurde dazu gewogen, anschließend mit der 6-fachen Menge RIPA-Puffer (Zusammensetzung: siehe 5.5.) versetzt, welchem zuvor Proteaseinhibitor (Protease Inhibitorenmix complete) zugesetzt worden war, und dann in einem Potterröhrchen mit einem Glasstab auf Eis homogenisiert. Nach 20-minütiger Kühlung auf Eis wurde das Gewebe bei maximaler Leistung und 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Präzipitat (Zelltrümmer, DNA) wurde verworfen. Die Protein enthaltende Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **4.6.2. Proteinbestimmung nach Bradford**

Um zu gewährleisten, dass im späteren Verlauf einheitliche Proteinmengen eingesetzt wurden, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Dazu wurden zunächst 8-10 µl Proteinlösung aus der Proteinaufbereitung 1:5 mit Aqua

dest. verdünnt. Dann wurde am Photometer 2x eine Standardreihe 0-2,5-5-10-15-20 (Angaben in  $\mu\text{l}$ ) zur Eichung durchgeführt, wobei das Medium eine BSA-Lösung (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) war, das von den in der Standardreihe angegebenen Mengen mit Aqua dest. auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wurde. Zudem wurden pro Küvette 800  $\mu\text{l}$  Aqua dest. und 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz hinzugefügt. Zum Vergleich wurden drei Küvetten mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung besetzt, ebenfalls mit Aqua dest. ad 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und 800  $\mu\text{l}$  Aqua dest., 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz sowie 1  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer beigefügt. Die Extinktionswerte dieser Lösungen wurden im Photometer ermittelt und im Vergleich mit den Werten aus der Standardreihe wurde die Proteinmenge errechnet.

#### **4.6.3. SDS-PAGE**

Bei diesem Verfahren werden Gele hergestellt, in denen die Proteine eines Proteingemisches nach Anschluss an eine elektrische Stromquelle bezüglich ihrer Ladung bzw. Größe aufgetrennt werden.

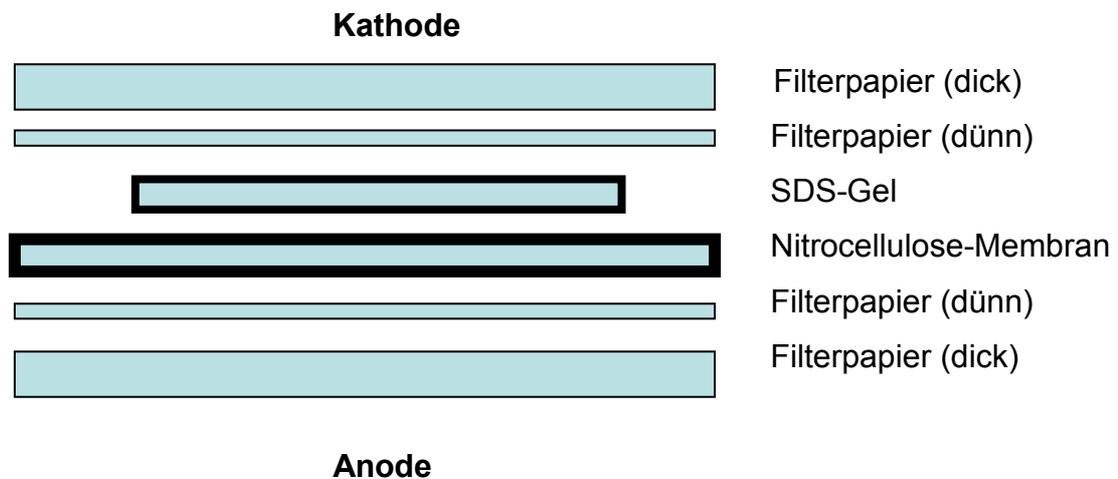
Es wurden zunächst eine große und eine kleine Glasplatte so in die Gelhalterung eingespannt, dass zwischen ihnen ein dicht verschlossener Spalt entstand, in den zunächst das Trenngel (Zusammensetzung: siehe 5.5.) und Aqua dest. sowie nach Auspolymerisierung des Trenngels (30 min) und Verwerfen des Aqua dest. das Sammelgel (Zusammensetzung: siehe 5.5.) eingefüllt wurde. Dabei war das Mengen-Verhältnis Trenngel zu Sammelgel ca. 2:1.

Nach Einführen der Kämme wurde auch das Sammelgel für 30 min auspolymerisiert. Anschließend wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer transferiert und die Kammer mit Lämmli-Laufpuffer aufgefüllt. Für die Analysen wurden weiterhin jeweils 25  $\mu\text{g}$  Protein (Letrozol- oder E2-behandelt bzw. Kontrolle) mit 8  $\mu\text{l}$  Lämmli-Probenpuffer versetzt und mit Aqua dest. (Menge abhängig von Proteinmenge pro  $\mu\text{l}$  Proteinlösung) auf 40  $\mu\text{l}$  verdünnt. Die Proteinlösungen wurden dann in die Geltaschen einpipettiert. Die Reihenfolge dabei war wie folgt: 0-0-Kontrolle-Laufpuffer-Letrozol-E2-Marker-0-0-0. Bei 200 V und 150 mA für 55 min liefen die Proteine nun aus dem Sammelgel in das Trenngel und wurden hier aufgetrennt.

#### 4.6.4. Blottechnik

Beim Verfahren des Western-Blots werden durch das Anlegen eines elektrischen Feldes die Proteine aus dem Elektrophoresegel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

In vorliegender Arbeit wurde ein *Semidry*-Blot in der *Semidry-Transfer*-Zelle durchgeführt. Dicke und dünne Filterpapierstreifen wurden dabei für 2-3 min in *Semidry*-Blot-Puffer (Zusammensetzung: siehe 5.5.) eingeweicht und anschließend zusammen mit der Nitrocellulose-Membran und dem SDS-Gel aus der Gelelektrophorese (beides kurz mit *Semidry*-Blot-Puffer gespült), wie im Schema der Abbildung 3 dargestellt, in der *Semidry-Transfer*-Zelle übereinanderliegend angeordnet. Dabei war darauf zu achten, dass die Nitrocellulosemembran auf der Seite des Anode und das SDS-Gel auf der Seite des Kathode lagen, denn nur so wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Anordnung innerhalb der *Semidry-Transfer*-Zelle.

Bei 35 V und 150 mA wurden die Proteine für 55 min (bei einem SDS-Gel) bzw. 60 min (bei zwei SDS-Gelen) „geblottet“. Dem Blot folgte die Färbung mit Ponceau-Rot für 1 min und die Blockierung mit Milchpulver in PBS-T für 60 min auf dem *MACS-Mix-Tube-Rotator*. Danach wurde die eine Hälfte (> 50 kD) der Membran (horizontale Durchtrennung auf Höhe der 50 kD Bande) bei RT für 3 h mit 3 ml des durch MP/PBS-T 1:400 verdünnten TrkB-AK (aus Kaninchen) inkubiert und die andere Hälfte (< 50 kD) bei RT für 3 h auf dem *MACS-Mix-Tube-Rotator* mit 3 ml 1:20.000

verdünntem GAPDH-AK (aus Maus) inkubiert. Anschließend wurden diejenigen AKs, die nicht gebunden hatten, durch 3-maliges Waschen der Membranen in PBS-T (für jeweils 10 min) entfernt und die Membranen für 50 min auf dem *MACS-Mix-Tube-Rotator* mit dem 2. AK inkubiert (TrkB-Membran: 3 ml *donkey anti rabbit* 1:2.500 mit MP/PBS-T verdünnt; GAPDH-Membran: 3 ml *goat anti mouse* 1:5.000 mit MP/PBS-T verdünnt). Es folgten 3 Waschungen für jeweils 10 min.

#### **4.6.5. Entwicklung der Blots**

Hierbei werden die Proteinbanden mittels Kopplung an eine lichtsensible Substanz (ECL) in einer Photoentwicklungsmaschine auf einem Film sichtbar gemacht.

Beide Membranen wurden dafür mit jeweils 2 ml ECL-Lösung (1:1) für 4 min auf dem *MACS-Mix-Tube-Rotator* inkubiert. Anschließend wurde jede der beiden Membranhälften in eine eigene Foto-Kassette zwischen zwei Plastikfolien gelegt. Das Filmpapier wurde eingelegt und nach einiger Zeit (zwischen 10 sec und 5 min) entnommen und in der Entwicklermaschine entwickelt.

#### **4.7. Konfokale Mikroskopie**

In diesem Arbeitsschritt wurden mit Hilfe des konfokalen *Laser Scanning Microscope* (LSM) Aufnahmen von den mit Antikörpern behandelten Gewebekulturschnitten gemacht. Dabei wurde so vorgegangen, dass jeder der auf dem Objektträger vorhandenen Kultur-Schnitte nur einmalig zur Dokumentation der Immunreaktivität (= Fluoreszenz-Intensität) in einer Region (Stratum radiatum von CA1 oder Stratum moleculare des Gyrus dentatus) herangezogen wurde. Dadurch wurde verhindert, dass durch Intensitätsbestimmung an durch vorherige Verwendung bereits ausgebleichten Gewebestellen fehlerhafte Messungen in die Auswertung miteinbezogen wurden.

Auf Grund unterschiedlicher Färbeintensitäten in den einzelnen Regionen mussten für jede Region vor den Aufnahmen eigene Einstellungen für Helligkeit, Kontraststärke sowie Blende eingerichtet werden. Verwendet wurden folgende Parameter:

**Tab. 1:** Einstellungen am LSM.

	<b>Gyrus dentatus, Stratum moleculare</b>	<b>CA1, Stratum radiatum</b>
<b>Helligkeit</b>	8949	8932
<b>Kontrast</b>	350	331
<b>Pinholder (Blende)</b>	35	50

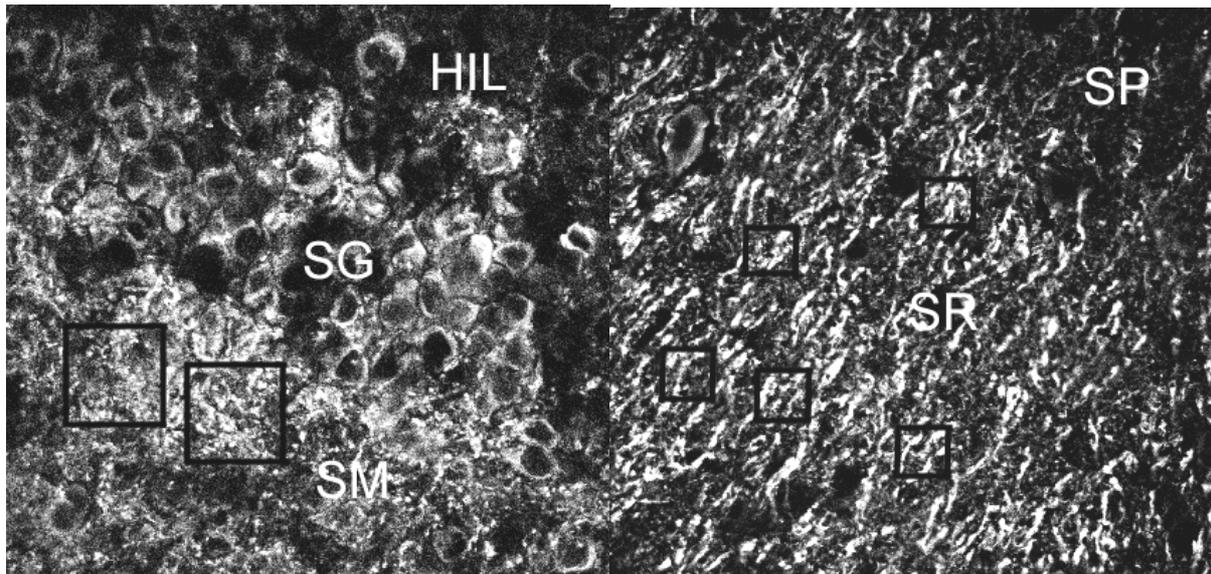
Waren diese Parameter einmal eingestellt, so wurden sie für alle Aufnahmen aus der jeweiligen Region verwendet. Die Regionen wurden zuerst mit Hilfe eines DAPI-Filters (370 nm) aufgesucht und anschließend mit der Cy3-Anregungswellenlänge gescannt. Die Anzahl der Bilder war für jede Region unterschiedlich:

Im Stratum radiatum von CA1 wurden zwei Übersichtsaufnahmen nebeneinanderliegender Bereiche gemacht. Im Stratum moleculare wurde jeweils nur ein Bild pro Kulturschnitt angefertigt. Hier wurde bei der Auswahl so vorgegangen, dass imaginär eine Verlängerungslinie des CA3-Pyramidenzellbandes gezogen wurde. Der Abschnitt, in dem diese imaginäre Linie die Molekularschicht schnitt, wurde per Übersichtsaufnahme festgehalten.

## **4.8. Auswertung**

### **4.8.1. Auswertung Immunhistochemie**

Die Auswertung der Immunreaktivität wurde mit Hilfe des Programms *Openlab 3.1.5* (Improvision) auf einem Macintosh-PC (OS 9.1.) durchgeführt. Dabei wurden die Intensitätssignale der Bilder, die zuvor am konfokalen LSM aufgenommen worden waren, gemessen und in einen Zahlenwert (*Staining Index*) transformiert. Dazu wurden aus den Übersichtsaufnahmen aus dem Stratum radiatum (CA1) jeweils fünf 50×50 Einheiten große Felder bzw. dem Stratum moleculare (Gyrus dentatus) zwei 90×90 Einheiten große Felder ausgewählt, in denen die Bereiche, in denen das Immunsignal am stärksten erschien, enthalten waren. Die Zahlenwerte wurden tabellarisch angelegt und mit Microsoft Excel ausgewertet.



**Abb. 4:** Veranschaulichung der Vorgehensweise bei der Auswertung mit dem Programm Openlab 3.1.5.

links: Darstellung der zwei 90×90 Einheiten großen Felder im Stratum moleculare (SM) des Gyrus dentatus.

rechts: Darstellung der fünf 50×50 Einheiten großen Felder im Stratum radiatum (SR) der CA1-Region.

#### 4.8.2. Auswertung Western Blot

Die Auswertung des Western Blot-Experiments erfolgte mit Hilfe des Programms *Image J* an einem PC der Firma Dell. Dabei wurden die Bilder der Proteinbanden (BDNF, TrkB, GAPDH) eingescannt, über *Image J* die Grau-Intensitäten berechnet und in einen Zahlenwert transformiert. Alle BDNF- und TrkB-Werte wurden über eine Division durch die korrespondierenden GAPDH-Werte normalisiert. Die resultierenden Zahlenwerte wurden danach tabellarisch angelegt und mit Microsoft Excel und *GraphPad Prism* statistisch ausgewertet.

#### 4.8.3. Statistik

Für die immunhistochemische Analyse wurde der *paired Student's t-test* zur statistischen Bewertung der Daten eingesetzt, da in diesen Experimenten stets Paare (experimentell behandelte vs. nicht behandelte „Schwesterkulturen“) miteinander verglichen wurden. Die Resultate der Western Blot-Analysen (jeweils 3 Gruppen) wurden mit Hilfe einer *Analysis of variance (ANOVA)* und anschließendem Tukey's-

Test statistisch auf ihre Signifikanz untersucht. Zusätzlich wurden einzelne Experimentgruppen mit Hilfe des *unpaired Student's t-tests* statistisch verglichen. Dargestellt werden die Ergebnisse jeweils als „Prozent von der Kontrolle“. Als Signifikanzkriterium wurde  $p < 0,05$  festgesetzt.

## 5. Materialien

### 5.1. Chemikalien

Produkt	Hersteller
APS	SIGMA
Bio-Rad Protein Assay	BIO-RAD
BPB	MERCK
BSA	SIGMA
DAPI	SIGMA
DAKO Einbettmedium	DAKO
ECL-Substrat	THERMO SCIENTIFIC
EDTA	MERCK
17 $\beta$ -Estradiol (wasserlöslich)	SIGMA
Ethanol (96%)	APOTHEKE UKE
Gefriereinbettmedium ( <i>Tissue Tek</i> )	SAKURA
Gel-Kämme	BIO-RAD
Glucose	FRESENIUS
Glutamin	SIGMA
Glycerin	SIGMA
Glycin	APOTHEKE UKE
HBSS	INVITROGEN
Ketamin	GRÄUB
Kryostat (HM 560)	MICROM
Letrozol	APOTHEKE UKE
Methanol	J.T.BAKER
Milchpulver	HEIRLER
<i>Minimal Essential Medium</i>	INVITROGEN
Molekulargewichtsmarker für Gele ( <i>Prestained Page Ruler</i> )	FERMENTAS
Natriumbicarbonat-Lösung	SIGMA

<i>Normal Goat Serum</i>	SIGMA
NP40 Alternative	CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM
PBS-Tabletten	MERCK
Penicillin-Streptomycin	INVITROGEN
PFA	MERCK
Pferdeserum	INVITROGEN
Ponceau-Rot	MERCK
Protease Inhibitoren-Mix complete	ROCHE
Rompun	BAYER
Rotiphorese Gel 30	ROTH
Saccharose	MERCK
SDS	FLUKA
Sterilium	BODE CHEMIE
Stickstoff	APOTHEKE UKE
TEMED	SIGMA
Tris	ROTH
Trockeneis	TMG
Tween	SIGMA

## 5.2. Antikörper

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BDNF, <i>mouse monoclonal IgG</i>	SIGMA
<i>Donkey-anti-rabbit IgG</i> (HRP-gekoppelt)	PIERCE
GAPDH	AMBION APPLIED BIOSYSTEMS
<i>Goat-anti-mouse IgG</i> (HRP-gekoppelt)	PIERCE
<i>Goat-anti-rabbit IgG</i> (Cy3-gekoppelt)	JACKSON IMMUNORESEARCH
TrkB, <i>rabbit polyclonal IgG</i> (sc-8316)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

### 5.3. Technische und apparative Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
Analysen-Waage	SARTORIUS
Axioskop 2, HBO 100	ZEISS
Bio-Photometer	EPPENDORF
Blot-Aparatur ( <i>Semidry-Transfer-Cell</i> )	BIO-RAD
Boxen für Objektträger	VWR
Deckgläser, 24x46 mm, 24x60 mm	MARIENFELD
Eppendorf Tube transparent, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF
Erlenmeyer Kolben, Duranglas	SCHOTT
Feuchtkammer	LABOR ANATOMIE UKE
Film	AGFA
Filterpapier (dick, dünn)	SCHLEICHER & SCHÜLL
Foto-Kassette	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH
Foto-Entwicklungs-Maschine (Optimax)	PROTEC
Gefrierschrank, -25C°, -80C°	LIEBHERR
GEL-Aparatur ( <i>Mini-Protean 3 cell</i> )	BIO-RAD
Gewebe-Zerteiler ( <i>Tissue Chopper</i> )	MCILWAIN
Glaspipette, 5ml, 10ml	BD-FALCON
Heidemannspatel	FST
Kühlschrank	BOSCH
Küvetten, Färbekästen nach Helledahl	VWR
Laborflaschen, 0,5l, 1l, Duranglas	SCHOTT
LSM Axiovert 100 Microsystem	ZEISS
Magnetrührstäbchen, Standard	VWR
Magnetrührer	HEIDOLPH INSTRUMENTS
Mikro-Homogenisator Potter 0,1 ml	NOVODIRECT
Mikroliter-Pipetten, 2 , 20, 200, 1000 ul	EPPENDORF
Mikrotommesser (S35)	FEATHER
Millicell-Kulturmembranen	MILLIPORE

Multiwell-Zellkulturplatten ( <i>Six-wells</i> )	BD-FALCON
Nitrocellulose-Membran	MILLIPORE
20er Objektiv	ZEISS
40er Objektiv	ZEISS
60er Objektiv	UPLAN SAPO
Objektträger	HECHT-ASSISTENT
Parafilm	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
PC (Optilex GX 280)	DELL
PC (Macintosh, OS 9.1.)	APPLE
Perfundiergerät (Masterflex L/S)	COLE-PARMER
pH-Meter	KNICK
Pinsel	DA VINCI
Pinzette, feine Spitze	FST
Pinzette, gebogen	FST
Pipettenspitzen (EpT.I.P.S. Standard)	EPPENDORF
Pipettierhelfer ( <i>Accu-Jet</i> )	BRAND
Plastik-Pipetten, 10 ml	EPPENDORF
15 ml-, 50 ml-Röhrchen ( <i>Cellstar</i> )	GREINER BIO-ONE
Röhrchen-Rotations-Gerät ( <i>MACS-Mix-Tube-Rotator</i> )	MILTENYI BIOTECH
Sauger	MILLIPORE
Scanner ( <i>Scanjet 8300</i> )	HP
Schere, groß und klein	FST
Schüttler, groß (Svip)	JOHANNA OTTO
Skalpell	BRAUN
Spatel	MILLIPORE
Spritzflasche	VWR
Stereolupe (Stemi SV11)	ZEISS
Sterile Werkbank	HERAEUS INSTRUMENTS
Stromversorgungsgerät für Elektrophorese	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

( <i>Electrophoresis constant power supply</i> ECPS 3000/150)	
Wärmeschrank	MEMMERT
Zentrifuge 5417R	EPPENDORF

#### 5.4. Software

Produkt	Hersteller
AxioVision	ZEISS
Excel 2004	MICROSOFT
<i>GraphPad Prism 4.0</i>	GRAPHPAD SOFTWARE
<i>Image J</i>	WAYNE RASBAND (NIH)
LSM Carl Zeiss	ZEISS
<i>Openlab 3.1.5</i>	IMPROVISION
<i>Photoshop CS3 Extended</i>	ADOBE
Windows XP	MICROSOFT
Word 2004	MICROSOFT

#### 5.5. Lösungen

##### Inkubationsmedium (pH 7,25) (Kulturmedium)

Zur Herstellung von 100 ml:

- 25 ml MEM (*minimal essential medium*), steril
- 1 ml Glutamin (200 mM), steril
- 580 µl Natriumbicarbonat-Lösung (7,5%), steril
- 20 ml Aqua dest.
- 25 ml HBSS (*Hank`s Balanced Salt Solution*)
- 25 ml Pferdeserum, steril
- 1 ml Penicillin/Streptomycin, steril
- 1,56 ml Glucose, steril
- Titration bis pH = 7,25 mit NaOH (1 mol/ l) bzw. HCl (1 mol/ l)
- Aqua dest., steril, *ad* 100 ml

### 17 $\beta$ -Östradiol-Lösung

- 2,72 mg 17 $\beta$ -Östradiol in 1 ml Aqua dest., steril = Konzentration
- Konzentration mit Aqua dest., steril, 1:100 verdünnen = Stammlösung ( $10^{-4}$ M)
- 1  $\mu$ l Stammlösung in 1 ml Inkubationsmedium (siehe oben)

### Letrozol-Lösung

- 2,85 mg Letrozol in 1 ml ETOH = Konzentration
- Konzentration mit Aqua dest. (steril) 1:100 verdünnen = Stammlösung ( $10^{-4}$ M)
- 1  $\mu$ l Stammlösung in 1 ml Inkubationsmedium (siehe oben)

### Perfusionslösung

- 4% PFA -Lösung (siehe unten).

### Präparations-Medium (pH 7,35)

Zur Herstellung von 100 ml:

- 50 ml MEM, steril
- 1 ml Glutamin (200 mM), steril
- 48 ml Aqua dest., steril
- Titration bis pH = 7,35 mit NaOH (1 mol/ l) bzw. HCl (1 mol/ l)
- Aqua dest., steril, *ad* 100 ml

### PBS-Lösung

- 1 PBS Tablette (5g) in 500 ml Aqua dest., steril, lösen
- Titration bis pH = 7,4 mit NaOH (1 mol/ l) bzw. HCl (1 mol/ l)

### PFA-Lösung (4%)

- 20 g PFA in 400 ml Aqua dest., steril, lösen
- Aqua dest., steril, *ad* 500 ml

### RIPA-Puffer

- 1,5 ml 150 mM NaCl
- 2,5 ml 50 mM Tris pH 7,5
- 5 ml 1% NP40
- 250  $\mu$ l 0,1% SDS

- 2,5 ml 0,5% Natriumdesoxycholat
- 0,5 ml 5 mM EDTA
- *Pi ad* 50 ml

#### Lämmli-Probenpuffer

- 1,54 g DTT
- 2 g SDS
- 8 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
- 10 ml Glycerin
- 250 mg BPB

#### Lämmli-Laufpuffer

- 30,3 g TrisBase
- 144,2 g Glycin
- 10 g SDS
- Aqua dest., steril, *ad* 1000 ml

#### Semi-Dry-Blot-Puffer

- 3,03 g TrisBase
- 14,4 g Glycin
- 100 ml 10% Methanol
- Aqua dest., steril, *ad* 1000ml

#### Sammelgel

- 5,5 ml Aqua dest.
- 1,7 ml 30% Acrylamid
- 2,5 ml 0,5 M Tris pH 6,8
- 100 µl 10% SDS
- 100 µl BPB-Lösung
- 100 µl 10% APS
- 8 µl TEMED

Trenngel

- 8 ml Aqua dest., steril
- 6,6 ml 30% Acrylamid
- 5 ml 1,5 M Tris pH 8,8
- 200 µl 10% SDS
- 200 µl 10% APS
- 8 µl TEMED

PBS-Tween

- 100 ml PBS
- 30 ml Tween-20
- Aqua dest., steril, *ad* 1000ml

Milchpulver(5%)-PBS-Tween

- 2 g Milchpulver
- 38 ml PBS-Tween

Ketamin-Rompun

- 2,4 µl Ketamin
- 1,6 µl Rompun
- 2 ml 0,9% NaCl
- Anwendung: 900 µl pro Tier

## 6. Ergebnisse

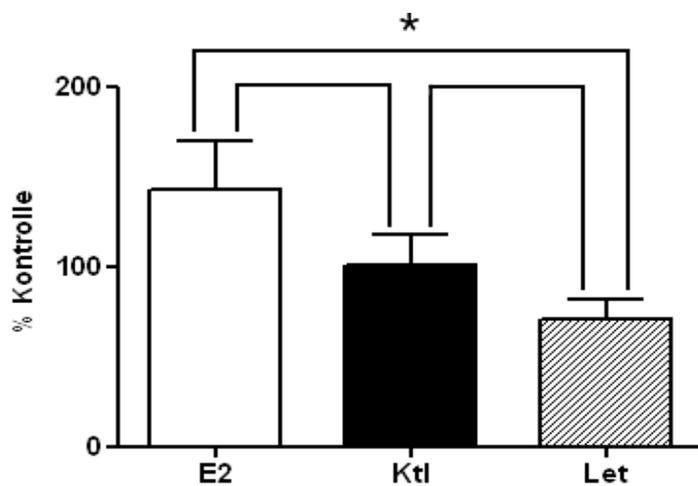
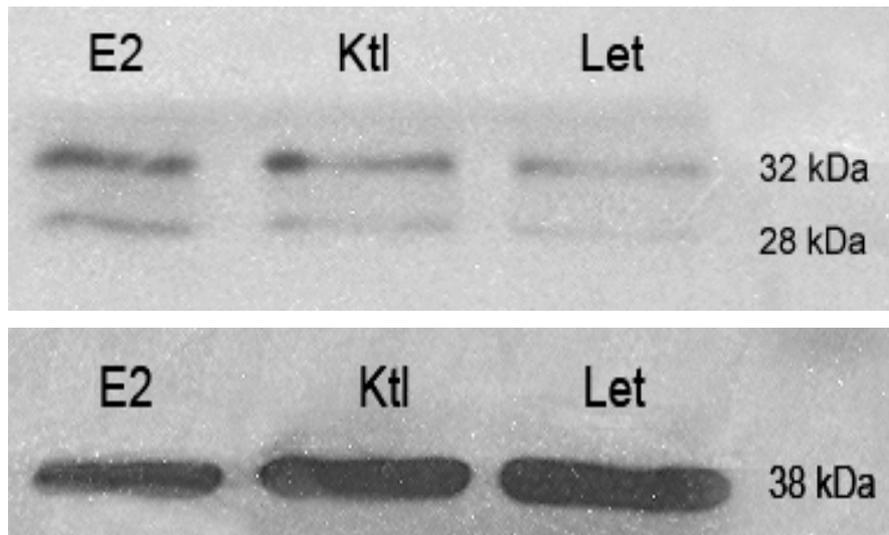
Die Proteine BDNF und TrkB sind für die neuronale Plastizität im Hippokampus von großer Bedeutung. Um die Effekte von  $17\beta$ -Östradiol auf die Expression der beiden Proteine zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst mittels Western Blot-Analysen der Einfluss von E2 bzw. Letrozol auf die Gesamtexpression von BDNF und TrkB im Hippokampus untersucht. Für eine regionsspezifische Untersuchung der Expression (hier nur TrkB) in der CA1-Region und im Gyrus dentatus wurde anschließend das immunhistochemische Verfahren angewandt.

### 6.1. Analyse der BDNF-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels Western Blot

Frühere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Veränderungen der E2-Konzentration auf die Expression von BDNF im Hippokampus regulierend wirken (Solum & Handa, 2002). In Betracht gezogen wurde hier jedoch stets nur gonadal gebildetes E2. Eine Untersuchung der Rolle des im Hippokampus selbst – d.h. endogen – gebildeten E2 (Prange-Kiel et al., 2003) liegt bislang noch nicht vor. In unseren Experimenten wurde mit Hilfe des Aromatase-Inhibitors Letrozol die Produktion des endogen gebildeten E2 in organotypischen Gewebekulturen des Hippokampus verhindert und danach die Auswirkung dieser Behandlung auf die BDNF-Expression mittels Western Blot-Analysen untersucht. Zum Vergleich wurden unbehandelte sowie mit E2 stimulierte Kulturen herangezogen.

Die Ergebnisse legen eine regulierende Wirkung auch des endogen im Hippokampus gebildeten E2 auf die BDNF-Expression nahe (siehe Abb. 5): Western Blot-Analysen mit dem verwendeten BDNF-Antikörper ergaben regelmäßig zwei charakteristische Banden auf Höhe von ca. 32 und 28 kDa. Bei der 32 kDa-Bande handelt es sich um das unprozessierte Vorläuferprotein von BDNF, während die kleinere Bande ein Zwischenprodukt der BDNF-Prozessierung wiedergibt (Mowla et al., 2001). Interessanterweise war die BDNF-Expression (32 kDa-Bande) nach Letrozol-Gabe im Hippokampus deutlich reduziert ( $71 \pm 11\%$  des Kontrollwertes), während E2-Gabe eine Erhöhung der BDNF-Expression bewirkte ( $143 \pm 26\%$  des Kontrollwertes). Eine einfaktorische ANOVA mit nachfolgendem Tukey's-Test ergab, dass die experimentelle Behandlung zu nahezu signifikanten Unterschieden in der BDNF-

Expression geführt hatte ( $n = 6$ ;  $p = 0,057$ ;  $F = 3,5$ ). Ein separater Vergleich experimenteller Gruppen mit Hilfe des *unpaired Student's t-tests* zeigte deutliche Trends im Vergleich von E2 und Kontrolle ( $p = 0,21$ ) bzw. Letrozol und Kontrolle ( $p = 0,17$ ). Ein signifikanter Unterschied war jedoch nur im Vergleich zwischen E2- und Letrozol-behandelten Kulturen ( $p = 0,03$ ) nachweisbar.



	E2	Kontrolle	Letrozol
<b>Mittelwert</b>	142,5	100	70,5
<b>Standardabweichung</b>	65,8	41,9	26,4
<b>Standardfehler</b>	26,8	17,1	10,7
<b>p-Wert (ANOVA)</b>	0,057		
<b>N</b>	6	6	6

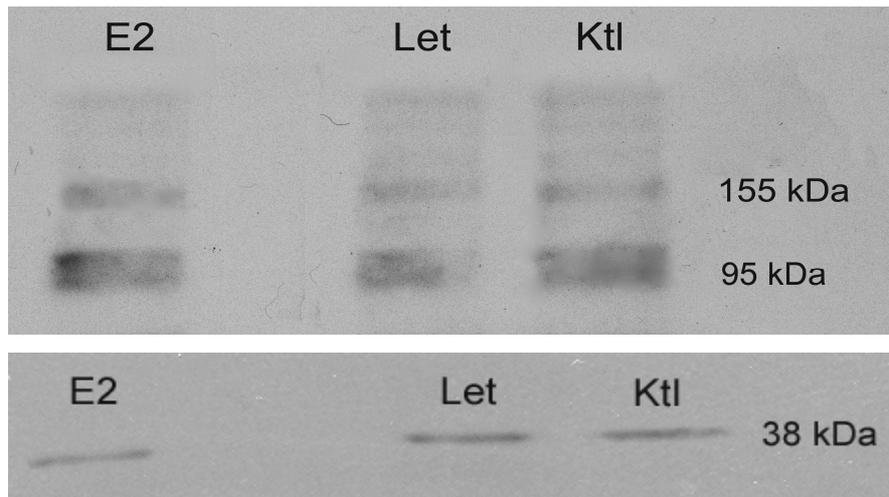
**Abb. 5** (vorherige Seite): Darstellung der Western-Blot-Ergebnisse (BDNF)

Oben: Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis einer Western-Blot-Analyse für BDNF (32 kDa-Bande) im Vergleich zu GAPDH (38 kDa), das als Ladekontrolle bestimmt wurde. Unten: Graphische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse: Die Signifikanzangabe (\*) im Balkendiagramm wurde durch Student's t-test ermittelt (Vergleich E2 zu Letrozol:  $p = 0,03$ ). Der p-Wert in der Tabelle wurde mittels ANOVA errechnet.

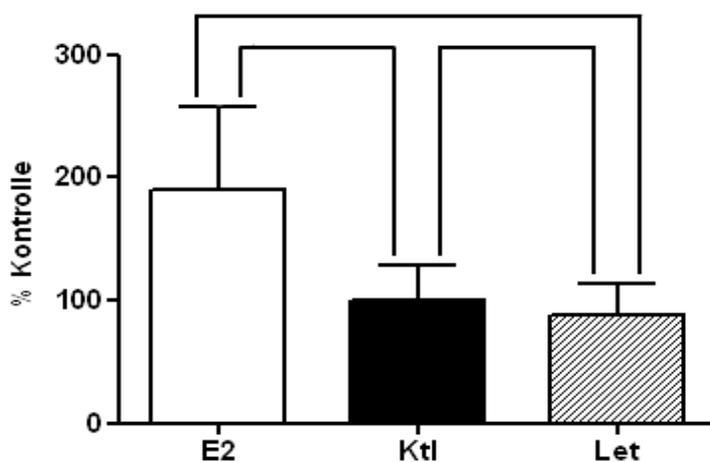
## **6.2. Analyse der TrkB-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels Western Blot**

Nach dem Befund einer Regulation von BDNF durch exogen zugegebenes sowie endogen gebildetes E2 stellte sich die Frage, ob auch der BDNF-Rezeptor TrkB einer Regulation durch E2 unterliegt.

Auch hier ergaben Western Blot-Analysen der TrkB-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Gabe regelmäßig 2 deutlich zu unterscheidende, immunreaktive Banden, die Proteinen mit der Molekularmasse von ca. 95 und 155 kDa entsprechen (siehe Abb. 6). Wie aus der Literatur bekannt, handelt es sich bei der 155 kDa-Variante um den vollständigen und zur Signaltransduktion fähigen TrkB-Rezeptor, während die 95 kDa-Variante einem verkürzten und funktionell nicht aktiven TrkB-Protein entspricht (Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991; Kleene et al., 2010). Eine getrennte Analyse beider Varianten erbrachte nicht signifikante Trends, die auf eine veränderte Expression der 95 kDa-Variante nach E2- oder Letrozol-Gabe hindeuteten (siehe Abb. 7;  $n = 5$ ;  $p = 0,26$ ;  $F = 1,5$ ; einfaktorielle ANOVA). Für die 155 kDa-Variante war jedoch ein signifikanter Einfluss nachweisbar (siehe Abb. 8). So war hier die Expression nach E2-Behandlung auf  $203 \pm 45\%$  von der Kontrolle erhöht und nach Letrozol auf  $89 \pm 9\%$  der Kontrolle erniedrigt ( $n = 5$ ;  $p = 0,0369$ ;  $F = 4,4$ ). Dies deutet darauf hin, dass auch die Regulation des Rezeptors für BDNF, TrkB, durch  $17\beta$ -Östradiol reguliert wird.



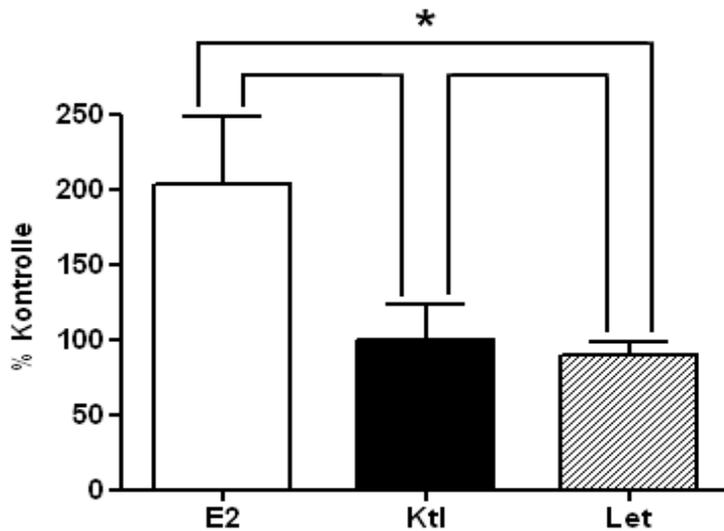
**Abb. 6:** Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Western Blot-Analyse für *TrkB*. Es resultierten stets 2 Banden in Höhe von 155 kDa (vollständiger, funktioneller *TrkB*) und 95 kDa (truncated *TrkB*). Zum Vergleich: GAPDH (38 kDa), die zur Ladekontrolle bestimmt wurde.



	E2	Kontrolle	Letrozol
<b>Mittelwert</b>	189,6	100	88,0
<b>Standardabweichung</b>	153,2	63,7	56,4
<b>Standardfehler</b>	68,5	28,5	25,2
<b>p-Wert (ANOVA)</b>	0,26		
<b>N</b>	5	5	5

**Abb. 7:** Graphische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse für *TrkB* (95 kDa-Form): Keine signifikanten Unterschiede in der *TrkB*-

(Fortsetzung von Seite 34) Expression wurden festgestellt (ANOVA:  $p = 0,26$ ), obgleich im Student's *t*-test ein Trend zu einem Einfluss von E2 ( $p = 0,26$ ) erkennbar war.



	E2	Kontrolle	Letrozol
<b>Mittelwert</b>	203,2	100	89,4
<b>Standardabweichung</b>	101,2	53,2	20,2
<b>Standardfehler</b>	45,3	23,8	9,0
<b>p-Wert (ANOVA)</b>	0,03		
<b>n</b>	5	5	5

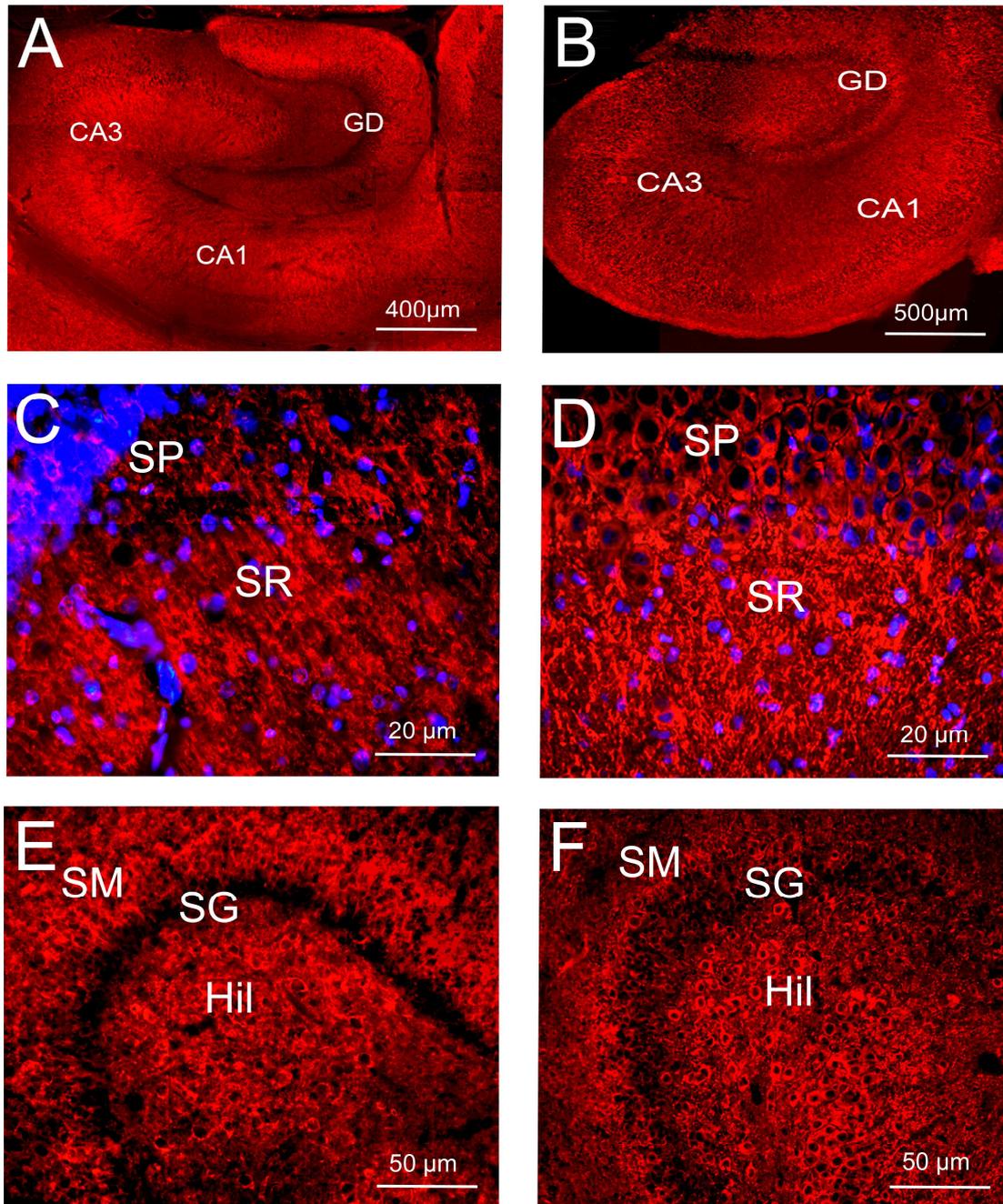
**Abb. 8:** Graphische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse für TrkB (155 kDa-Form): Im Gegensatz zur 95 kDa-Form war die Expression des funktionellen TrkB-Rezeptors nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung signifikant verändert (ANOVA: 0,03). E2-Gabe führte zu einer deutlichen Erhöhung ( $p = 0,07$  im Vergleich zur Kontrolle;  $p = 0,04^*$  im Vergleich zu Letrozol; unpaired Student's *t*-test), Letrozol zu einer leichten Erniedrigung ( $p = 0,7$ ) der 155 kDa TrkB-Expression.

### **6.3. Analyse der regionalen TrkB-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels quantitativer Immunhistochemie**

Die Befunde der Western Blot-Analysen warfen als nächstes die Frage auf, ob es regionale Unterschiede hinsichtlich der BDNF- bzw. TrkB-Regulation durch E2 im Hippokampus gibt. Von besonderem Interesse sind hier das Stratum radiatum der CA1-Region und das Stratum moleculare des Gyrus dentatus, da insbesondere in diesen Regionen regulative Effekte von Östradiol auf die Synapsendichte (Kretz et al., 2004; Bender et al., 2010) und die Funktionalität von Synapsen nachgewiesen werden konnten (Smith & McMahon, 2005; Vierk et al., 2012). Mittels quantitativer Immunhistochemie wurde daher die Wirkung von E2 bzw. Letrozol auf die regionsspezifische Expression untersucht. Da sich die eingesetzten Antikörper gegen BDNF für eine derartige Untersuchung leider als nicht tauglich erwiesen, musste diese Analyse auf die Expression von TrkB beschränkt werden.

#### **6.3.1. Vergleich der regionalen Expression *in vivo* und *in vitro***

Als Vorversuch für die immunhistochemische Untersuchung der E2- bzw. Letrozol-Wirkung auf die TrkB-Expression wurde untersucht, ob die hippokampale TrkB-Expression *in vitro* der Expression *in vivo* entspricht, d.h., ob das Gewebekulturmodell für diese Untersuchung geeignet ist. Zu diesem Zweck wurden die hippokampalen Expressionsmuster von TrkB *in vitro* und *in vivo* verglichen. Dabei wurden Hippokampi von Ratten immunhistochemisch untersucht, deren Entwicklungsstand dem der Gewebekulturen zum Zeitpunkt der Untersuchung (ca. postnataler Tag 16) entsprach. Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigte die Immunhistochemie für TrkB in 16 Tage alten Ratten und in Gewebekulturen (Präparation P5, dann 11 Tage *in vitro*) eine vergleichbare Expression. Starke immunhistochemische Signale waren in beiden Präparaten im Stratum radiatum (SR) der CA1 (siehe Abb. 9C, D), im Stratum moleculare (SM) des Gyrus dentatus (GD) und in der Hilusregion (Hil) zu erkennen (siehe Abb. 9E, F). Im Stratum radiatum war dabei insbesondere eine Expression in Dendriten erkennbar (siehe Abb. 9C, D; auch Abb. 10). In der Hilusregion beschränkte sich die Expression weitgehend auf die Zellsomata (siehe Abb. 9E, F).



**Abb. 9:** Vergleich der *TrkB*-Expression im Hippokampus von 16 Tage alten Ratten (A, C, E) und in Gewebekulturen, die am 5. postnatalen Tag präpariert und für 11 Tage kultiviert wurden (B, D, F). In beiden wurden ähnliche Expressionsmuster vorgefunden.

A, B: Übersicht über den Hippokampus *in vivo* (A) und *in vitro* (B).

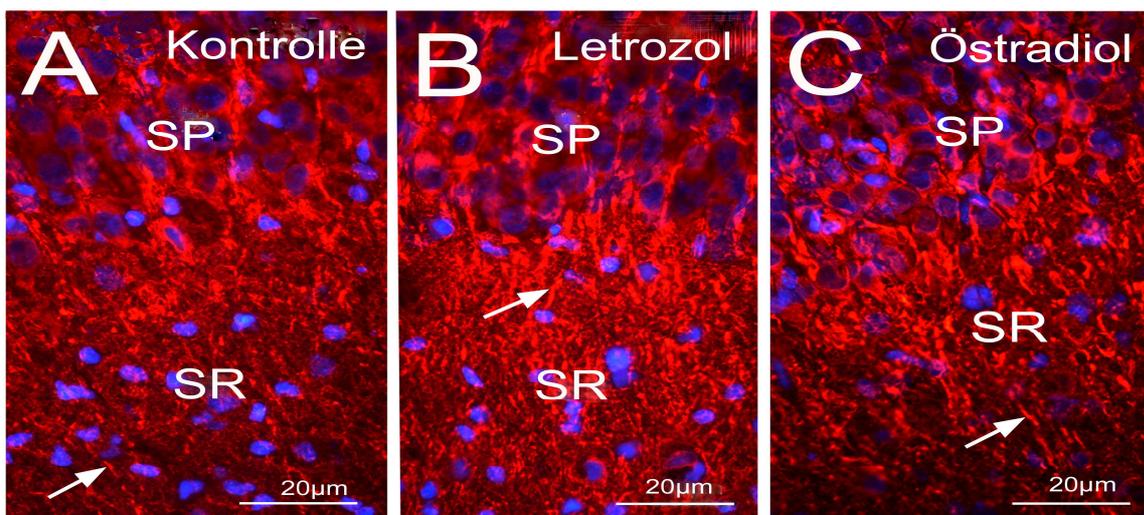
C, D: CA1-Region *in vivo* (C) und *in vitro* (D) (SP = Stratum pyramidale; SR = Stratum radiatum).

E, F: Gyrus dentatus *in vivo* (E) und *in vitro* (F) (SM = Stratum moleculare; SG = Stratum granulosum; Hil = Hilusregion).

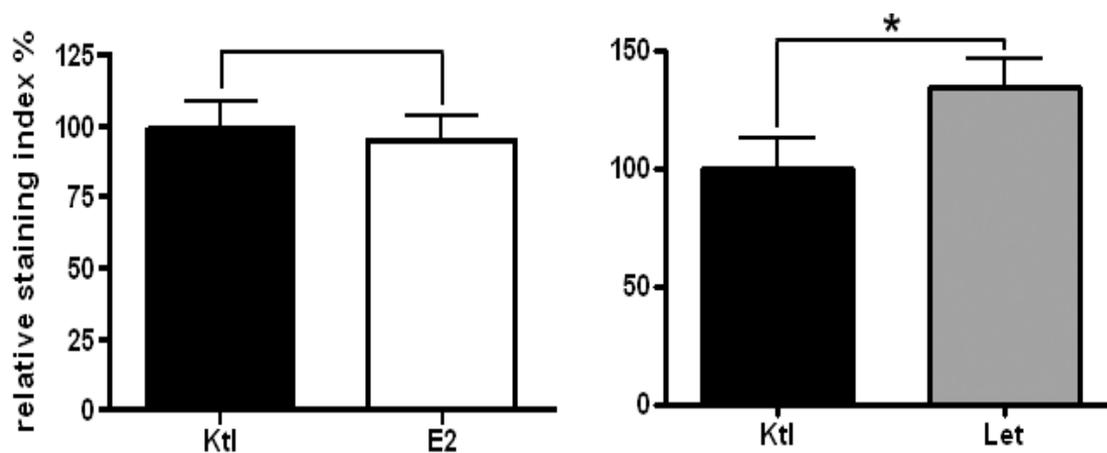
### 6.3.2. Analyse der regionalen TrkB-Expression nach E2- bzw. Letrozol-behandlung *in vitro*

#### 6.3.2.1. CA1, Stratum radiatum

Für die Auswertung der TrkB-Immunreaktivität im Stratum radiatum wurden pro Kultur zwei benachbarte Bildausschnitte mit dem konfokalen LSM photographisch dokumentiert und mit Hilfe des *Open-Lab*-Programms (siehe 4.8.1.) quantitativ ausgewertet. Diese Auswertung ergab ein unerwartetes Ergebnis (siehe Abb. 10 und 11): So fiel die TrkB-Immunreaktivität in mit Letrozol behandelten Kulturen deutlich stärker aus als in den unbehandelten Kontrollkulturen ( $135 \pm 12\%$ ), und dieser Unterschied erwies sich nach statistischer Betrachtung als signifikant ( $n = 28$ ;  $p = 0,02$ , *paired Student's t-test*). Hingegen war nach E2-Gabe kein signifikanter Expressionsunterschied nachweisbar ( $95 \pm 9\%$ ;  $n = 19$ ;  $p > 0,05$ ; *paired Student's t-test*).



**Abb. 10:** Vergleich der TrkB-Expression (rot) in der CA1-Region einer unbehandelten Gewebekultur (A) bzw. nach Letrozol- (B) oder  $17\beta$ -Östradiol -Gabe (C). In dem von den deutlich erkennbaren Dendriten der Pyramidenzellen durchzogenen Stratum radiatum (SR) ist eine stärkere Färbung nach Letrozol auffallend. (SP = Stratum pyramidale; blau markiert sind die Zellkerne durch DAPI-Färbung). Die Pfeile zeigen jeweils auf einen Dendrit.



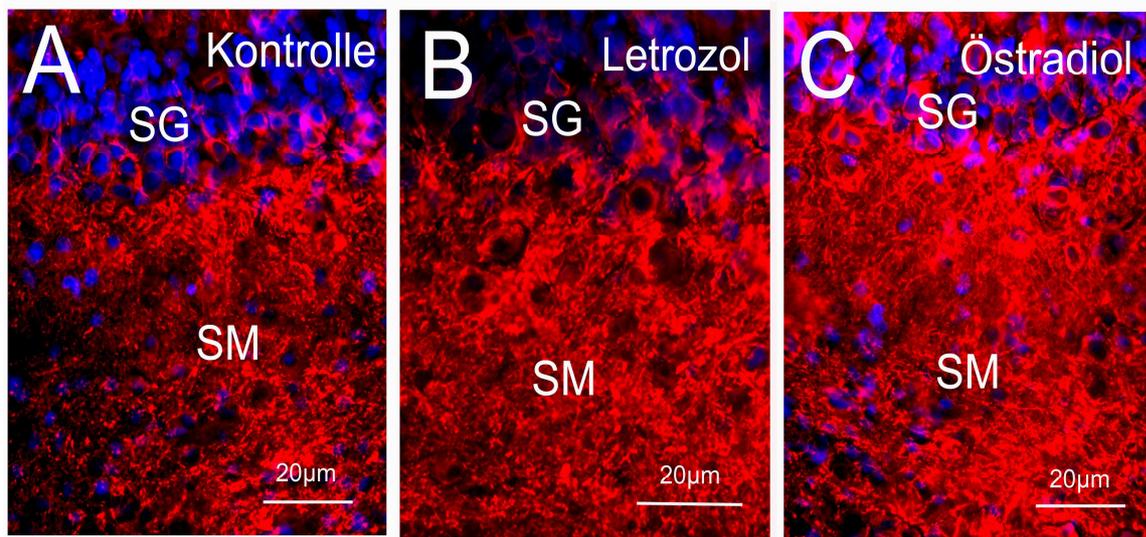
	E2	Kontrolle
Mittelwert	95,2	100,0
Standardabweichung	38,9	44,1
Standardfehler	8,9	10,1
p-Wert (paired t-test)	0,7	
n	19	19

	Letrozol	Kontrolle
Mittelwert	135	100,0
Standardabweichung	65,7	69,1
Standardfehler	12,4	13,1
p-Wert (paired t-test)	0,02*	
n	28	28

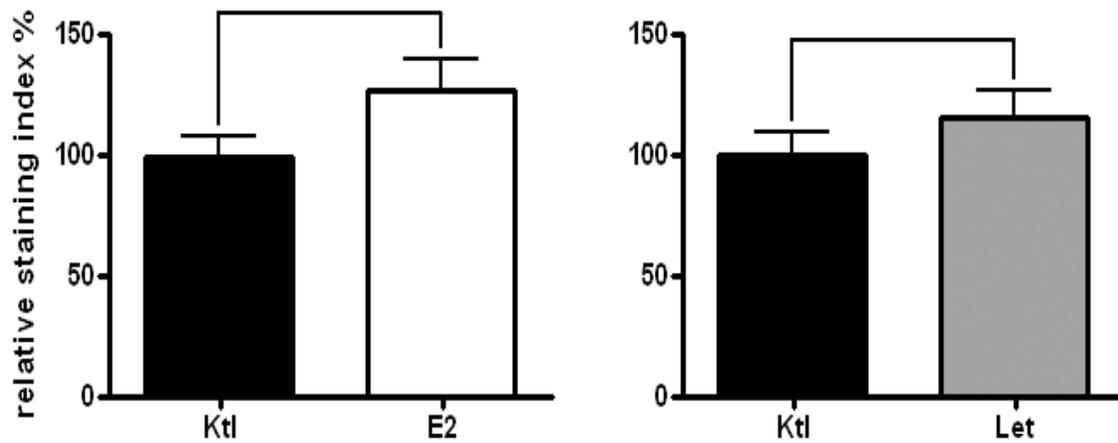
**Abb. 11:** Quantitative Darstellung der Messergebnisse aus dem Stratum radiatum der CA1-Region: Beim Vergleich unbehandelter und Letrozol-behandelter Kulturen wurde ein signifikanter Expressionsunterschied (Erhöhung nach Letrozol) festgestellt. Kein signifikanter Unterschied war jedoch nach E2-Behandlung nachweisbar.

### 6.3.2.2. Gyrus dentatus, Stratum moleculare

Bei der Analyse der TrkB-Expression im Stratum moleculare wurde pro Gewebekultur jeweils nur ein Bildausschnitt aus der mittleren Molekularschicht, zentral über der Körnerzellschicht gelegen, mit dem konfokalen LSM aufgenommen und anschließend quantitativ ausgewertet. Diese Auswertung ergab ein, von der Auswertung in CA1 unterschiedliches Resultat (siehe Abb. 12 und 13). Zwar war auch hier die Immunreaktivität für TrkB nach Letrozolbehandlung etwas erhöht. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $115 \pm 11\%$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 26$ ;  $p > 0,05$ ; *paired Student's t-test*). Außerdem war in diesen Experimenten auch eine leichte, jedoch ebenfalls nicht signifikante Erhöhung nach E2-Gabe feststellbar ( $126 \pm 13\%$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 24$ ;  $p > 0,05$ ; *paired Student's t-test*).



**Abb. 12:** Vergleich der TrkB-Expression (rot) im Stratum moleculare (SM) einer unbehandelten Gewebekultur (A), und nach Letrozol- (B) bzw.  $17\beta$ -Östradiol-Gabe (C). Sowohl nach Letrozol als auch nach E2 schien die TrkB-Expression im Vergleich zu den Kontrollen etwas erhöht. Der Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant. (SG = Stratum granulosum; blau markiert sind Zellkerne, durch DAPI-Färbung).



	<b>E2</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Mittelwert</b>	126,8	100
<b>Standardabweichung</b>	63,1	39,9
<b>Standardfehler</b>	12,9	8,1
<b>p-Wert (paired t-test)</b>	0,08	
<b>N</b>	24	24

	<b>Letrozol</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Mittelwert</b>	115,4	100
<b>Standardabweichung</b>	58,5	49,3
<b>Standardfehler</b>	11,5	9,7
<b>p-Wert (paired t-test)</b>	0,3	
<b>n</b>	26	26

**Abb. 13:** Quantitative Darstellung der Messergebnisse aus dem Stratum moleculare:  
Es waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

## 7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, die Rolle von 17 $\beta$ -Östradiol (E2) bei der Regulation des Neurotrophins BDNF und seines Rezeptorproteins TrkB im Hippokampus zu beschreiben. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein *in vitro*-Modell – die organotypische hippocampale Gewebekultur – eingesetzt, in dem die E2-Konzentration durch exogene Zugabe oder durch Inhibierung der hippocampalen (endogenen) Synthese von E2 durch den Aromatase-Inhibitor Letrozol verändert werden konnte. Die Resultate nach Western Blot-Analyse ergaben eindeutige Hinweise auf eine Regulation der BDNF- wie der TrkB-Expression durch sowohl exogen zugegebenes als auch endogen im Hippokampus produziertes E2. Eine quantitativ immunhistochemische Analyse der TrkB-Expression im Stratum radiatum der CA1-Region ergab jedoch ein unerwartetes und den Western-Blot-Ergebnissen widersprüchliches Resultat. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

### 7.1. BDNF und E2 als Vermittler von synaptischer Plastizität im Hippokampus

Die Fähigkeit des Hippokampus zur assoziativen Gedächtnisbildung beruht zu einem großen Teil auf der Fähigkeit seiner Neurone, die Aktivität ihrer Synapsen gemäß ihrer Beanspruchung zu verändern. Dieses „synaptische Plastizität“ genannte Phänomen ist eine wesentliche Grundlage unseres Lernvermögens (Morris, 2003). Physiologisch äußert sich diese Plastizität unter anderem im Phänomen der sog. Langzeitpotenzierung (LTP), bei dem durch verschiedene molekulare Signale die Stärke der synaptischen Erregungsbildung in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität reguliert wird. BDNF wird bereits seit langem als modulierender Faktor dieser Langzeitpotenzierung diskutiert. So konnte bereits 1996 an BDNF-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass das Vorhandensein von BDNF für die Ausbildung von LTP essentiell ist (Korte et al., 1996). Im Hippokampus ist BDNF vor allem an den Synapsen der Schaffer-Kollateralen (Verbindung CA3→CA1) im Stratum radiatum der CA1-Region (Kang & Schuman, 1995; Figurov et al., 1996; Rex et al., 2007) und an den Synapsen des Tractus perforans im Stratum moleculare des Gyrus dentatus (Messaoudi et al., 1998) aktiv. Diese Regionen enthalten auch zahlreiche TrkB-Rezeptoren (Yan et al., 1997; Drake et al., 1999; vorliegende Studie). Neuere

Erkenntnisse weisen darauf hin, dass BDNF seine LTP-fördernde Wirkung u.a. über erhöhten postsynaptischen Calcium-Einfluss (Kovalchuk et al., 2002) und Veränderungen des Zytoskeletts (Rex et al., 2007) ausübt. Weiterhin wurden BDNF-Wirkungen auf die Aktivität von NMDA-Rezeptoren (Levine & Kolb, 2000; Sun et al., 2001) und von Calcium-modulierten Kalium-Kanälen (Kramar et al., 2004) nachgewiesen.

Ähnliche Wirkungen wurden auch für E2 beschrieben. So ist seit einiger Zeit bekannt, dass die Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung an CA3→CA1-Synapsen durch die E2-Konzentration beeinflusst wird (Warren et al., 1995; Good et al., 1999). Exogene Zugabe von E2 steigert die LTP (Cordoba Montoya & Carrer, 1997; Smith & McMahon, 2005) vermutlich über eine verstärkte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Foy et al., 1999; Smith & McMahon, 2005). Umgekehrt bewirkt eine Inhibierung der endogenen E2-Synthese im Hippokampus eine deutliche Reduktion der LTP (Vierk et al., 2012), einhergehend mit einer Reduktion der NMDA-Rezeptor-Expression (Zhou et al., 2010), was darauf hindeutet, dass das im Hippokampus gebildete E2 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der LTP spielt. Neueste Erkenntnisse weisen daraufhin, dass auch E2 seine Wirkung an den Synapsen unter anderem über Veränderungen des Zytoskeletts ausübt (Srivastava et al., 2008; Kramar et al., 2009a, 2010) und, dass Calcium dabei eine wesentliche Rolle spielt (Fester et al., 2011).

Nimmt man noch die Tatsache hinzu, dass das BDNF-Gen eine ERE-Sequenz enthält (Sohrabji et al., 1995), so liegt der Gedanke nahe, dass E2 seine Wirkung, mindestens zum Teil, über die Vermittlung durch BDNF ausüben könnte. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. In unabhängigen Untersuchungen kamen Aguirre und Baudry (Aguirre & Baudry, 2009) zu ähnlichen Ergebnissen. Über die Wirkung von exogenem E2 hinaus lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch auch auf eine Wirkung von endogen im Hippokampus gebildetem E2 schließen, da sowohl die BDNF- als auch die TrkB-Expression nach Inhibierung der endogenen, hippokampalen E2-Synthese durch Letrozol erniedrigt waren (siehe 6.1. und 6.2.). Das hippokampal gebildete E2 wird, wie Untersuchungen vermuten lassen (Prange-Kiel et al., 2003; Mukai et al., 2006),

direkt an den zu modulierenden Synapsen synthetisiert und kann somit lokal begrenzt, d.h. sehr spezifisch, auto- bzw. parakrin wirken.

Allerdings besteht ein Widerspruch zu den Ergebnissen von Murphy (Murphy et al., 1998), die in dissoziierten Neuronenkulturen aus dem fetalen Hippokampus von Ratten nach 24-48-stündiger Östradiolbehandlung eine Herunterregulation von BDNF beobachteten. Über eine nachfolgend verminderte GABA-Freisetzung und dadurch erhöhte Erregbarkeit der Neurone führte dies ebenfalls zu einer Erhöhung der Synapsendichte in den Kulturen. Die Autoren kommen dadurch zu dem Schluss, dass E2 über eine Reduktion und nicht über eine Erhöhung der BDNF-Freisetzung die Synapsen beeinflusst. Diese Interpretation ist angesichts der beschriebenen Funktionen einer E2-Bindung an die ERE-Sequenz etwas verwunderlich. Soweit bisher erforscht, fördert diese Bindung die Transkription von BDNF eher als dass sie sie hemmt (Sohrabji et al., 1995; Aguirre & Baudry, 2009; vorliegende Studie). Sie steht auch in Widerspruch zu den Ergebnissen von Zhou (Zhou et al., 2007), die in neonatalen hippokampalen Dispersionskulturen nach 1-wöchiger Letrozolgabe, d.h. Reduzierung der endogenen E2-Synthese, eine signifikante Reduktion der GABA-Synthese und nicht Erhöhung – wie nach Murphy (Murphy et al., 1998) zu erwarten war – gefunden haben. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in bestimmten Situationen, wie z. B. nach Kurzzeitbehandlung oder in dissoziierten Neuronen eines frühen Entwicklungsstadiums wie im Modell von Murphy (Murphy et al., 1998), auch eine Hemmung der BDNF-Transkription durch E2 erfolgen kann. Denkbar wäre auch, dass das Zusammenwirken verschiedener Faktoren nötig ist, um eine Stimulierung der Transkription zu erreichen (Fuller, 1991), sowie, dass diese Faktoren in den dissoziierten Neuronenkulturen nicht, oder noch nicht ausreichend, vorhanden sind.

Trotz der Entdeckung, dass eine erhöhte E2-Konzentration im Sinne einer gesteigerten Expression Einfluß auf BDNF nimmt (Aguirre & Baudry, 2009; vorliegende Studie), muss weiterhin in Betracht gezogen werden, dass viele Wirkungen von E2 nicht über BDNF vermittelt werden, sondern dass beide Faktoren ähnliche Effekte auch über jeweils eigene Signaltransduktionskaskaden hervorrufen. So lässt beispielsweise die Geschwindigkeit einiger E2-induzierter Effekte vermuten, dass es sich dabei nicht um genomisch vermittelte Wirkungen handelt, sondern dass nicht-genomische Signalkaskaden, wie die RhoA – LIM-Kinase – Cofilin –Kaskade,

dabei aktiviert werden (Levin, 2005; Kramar et al., 2009b). In diesem Fall wären die ähnlichen Wirkungen von E2 und BDNF als unabhängige, sich jedoch möglicherweise synergistisch ergänzende Wirkungen zu betrachten (Kramar et al., 2009b, 2010). Wie die vorliegende Untersuchung belegt, bietet die organotypische, hippocampale Gewebekultur jedoch ein gutes Experimentiermodell, um die Frage, welche der beschriebenen E2-Wirkungen über BDNF vermittelt werden und welche nicht, in zukünftigen Studien zu klären.

## **7.2. Wirkung von E2 auf den BDNF-Rezeptor TrkB**

Die Analysen der E2- bzw. Letrozol-Wirkung auf die Expression des TrkB-Rezeptors ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Während die Western Blot-Analyse im hippocampalen Gesamtprotein eine Hochregulation der vollständigen 155 kDa-Form von TrkB nach E2 und eine leichte Herunterregulation nach Letrozol aufzeigte, erbrachten regionsspezifische Analysen der TrkB-Expression mittels quantitativer Immunhistochemie ein teilweise gegenläufiges Ergebnis. So war im Stratum radiatum der CA1-Region, der Terminationszone der Schaffer-Kollateralen, TrkB nach Letrozol-Gabe erhöht und nicht erniedrigt, wie es anlässlich der Western Blot-Ergebnisse zu erwarten gewesen wäre. Ebenso war im Stratum moleculare des Gyrus dentatus, der Eingangszone des Tractus perforans, nach Letrozol-Gabe keine Erniedrigung der TrkB-Expression feststellbar. Mehrere Faktoren könnten dieses widersprüchliche Ergebnis erklären:

1) Es wäre denkbar, dass eine Reduktion von E2 im Hippokampus, wie sie nach Letrozol-Gabe eintritt, zwar zu einem allgemeinen Abfall der TrkB-Expression im Hippokampus führt, dass an den Stellen, an denen normalerweise hohe BDNF-Aktivität vorherrscht, eine starke TrkB-Expression jedoch beibehalten wird, wenn BDNF abfällt. Die Neurone könnten somit bei BDNF-Abfall in einer Art homöostatischer Kompensation die TrkB-Rezeptoren an diesen Stellen konzentrieren, und dies würde sich in einer regionsspezifischen Analyse als gleichbleibende oder sogar erhöhte Präsenz der TrkB-Rezeptoren bemerkbar machen. Die Existenz einer solchen homöostatischen Regulation wird durch Beobachtungen von Haapasalo (Haapasalo et al., 2002) unterstützt, die umgekehrt in primären hippocampalen Neuronenkulturen zeigen konnten, dass nach einer Erhöhung des BDNF-Spiegels die TrkB-Rezeptor-Konzentration abnahm bzw. die

Rezeptoren von der Membran internalisiert wurden. Allerdings müsste sich eine solche Regulation in der hippokampalen Gewebekultur in einer deutlich verminderten TrkB-Expression in anderen Regionen niederschlagen und eine solche war in den mit Letrozol behandelten Kulturen nicht offenkundig erkennbar.

2) Es sind weiterhin technische Gründe denkbar, die zum beobachteten Ergebnis führen könnten. So erkennt beispielsweise der verwendete TrkB-Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne des humanen TrkB-Rezeptors gerichtet ist, sowohl die vollständige 155 kDa-Form von TrkB, als auch, wie in den Western Blot-Resultaten ersichtlich, die verkürzte ca. 95 kDa-Form. Eine signifikante Veränderung der Expression durch E2 war jedoch nur bei der 155 kDa-Form von TrkB feststellbar (siehe Abb. 8). Durch Einbeziehung der mengenmäßig überwiegenden 95 kDa-Form in die immunhistochemische Analyse könnten somit die Expressions-Unterschiede verwischt worden sein. Allerdings würde dies allein noch nicht die signifikante Zunahme von TrkB im Stratum radiatum der CA1-Region erklären. Mehrere Faktoren, die im Ergebnis zusammen wirken, sind also denkbar.

Unterstützt werden die Resultate der vorliegenden Untersuchung weiterhin durch die Beobachtungen von Sohrabji (Sohrabji et al., 2000), die zeigen konnten, dass auch im Bulbus olfactorius die TrkB-Rezeptordichte nach Zugabe von E2 ansteigt.

### **7.3. Relevanz für die Medizin**

Die Rolle der Östrogene im Gehirn gerät vermehrt auch in das Interesse der klinischen Forschung. So werden verminderte Östrogenspiegel zunehmend mit kognitiven Defiziten in Verbindung gebracht, die insbesondere im Alter auftreten. Hoffnung besteht auch, dass sich über eine genauere Erforschung der Östrogen-BDNF-Interaktion neue therapeutische Ansätze, beispielsweise bei der Behandlung der Alzheimer-Erkrankung, ergeben (Kramar et al. 2010).

Die Alzheimer-Erkrankung ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der es zu fortschreitendem Gedächtnisverlust kommt. Klinisch offenbart sich dieser in einer zunehmenden Einschränkung der Merkfähigkeit und einer sowohl räumlichen, als auch zeitlichen Desorientierung der betroffenen Patienten. Die Erkrankungsinzidenz

von mehr als 6% der über 65-Jährigen zeigt die große sozioökonomische Bedeutung dieser Erkrankung und die Notwendigkeit, therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Verantwortlich für die Symptomatik ist vermutlich die Ausbildung sog. extrazellulär befindlicher seniler Plaques im Hippokampus, die sich aus Ablagerungen von  $\beta$ -A4-Amyloid-Proteinen zusammensetzen. Daneben kommt es ebenfalls zu einem Auftreten von intrazellulären fibrillären Veränderungen, die aus sog. Tau-Proteinen bestehen. Bei der Ätiogenese des pathologischen phosphorylierten Tau-Proteins spielt vermutlich BDNF eine wesentliche Rolle, denn seine Anwesenheit bewirkt eine Dephosphorylierung des Proteins (Elliott et al., 2005). Im Einklang damit zeigte sich in weiteren Studien, dass bei Alzheimer Patienten ein Abfall von BDNF zu beobachten ist (Fahnestock et al., 2002; Lee et al., 2005). Berücksichtigt man weiterhin die Tatsache, dass bei Frauen nach der Menopause und einem damit einhergehenden Serum-Östradiolabfall Defizite der kognitiven Funktion beobachtet wurden (Henderson, 2000), so lässt dies den Schluss zu, dass die Alzheimer-Krankheit durch einen Verlust der Östrogen-induzierten hippokampalen BDNF-Synthese mindestens gefördert werden könnte (Kramar et al. 2010).

Ebenfalls von Interesse ist der Befund, dass das  $\beta$ -A4-Amyloid-Protein die durch BDNF ausgelöste Signalkaskade unterbricht und damit dessen Effekte auf die neuronale Plastizität unterbindet (Poon et al., 2009). Bedenkt man, dass eine Aktivierung von TrkB zu einer Steigerung der neuronalen Plastizität im Hippokampus führt, so sind die Konsequenzen einer derartigen Inhibierung augenscheinlich: Eine Neubildung von synaptischen Kontakten würde erschwert und die Gedächtnisleistung dadurch in wachsendem Maße behindert.

Die weitere Erforschung der Östrogen-BDNF-Interaktion enthält somit vermutlich auch klinisch bedeutsames Potenzial.

## 8. Zusammenfassung

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass  $17\beta$ -Östradiol (E2) für die neuronale Plastizität im Hippokampus eine bedeutende Funktion einnimmt und dass darüber hinaus im Hippokampus eine endogene *de novo* Östradiolbildung stattfindet. Dieses endogen gebildete Östradiol ist wesentlich an Prozessen der synaptischen Plastizität im Hippokampus beteiligt (Rune & Frotscher, 2005). Ebenfalls an der Regulation synaptischer Plastizität beteiligt sind der neuronale Wachstumsfaktor BDNF und sein Rezeptor TrkB. Zwischen beiden Faktoren, Östradiol und BDNF/TrkB, bestehen möglicherweise enge funktionelle Wechselwirkungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluß von  $17\beta$ -Östradiol auf die Expression sowohl von BDNF als auch seines Rezeptorproteins TrkB untersucht. Dazu wurden einerseits organotypische Gewebekulturen verwendet, deren endogene Östradiol-Synthese mittels der Aromatase-inhibierenden Substanz Letrozol unterbunden wurde, und auf der anderen Seite Kulturen, denen  $17\beta$ -Östradiol exogen zugeführt wurde. Zur Analyse wurden die Western Blot-Technik und die quantitative Immunhistochemie an Gewebeschnitten der organotypischen Kulturen eingesetzt.

Die Resultate deuten auf einen Einfluss sowohl von exogen zugeführtem als auch endogen gebildetem Östradiol auf die BDNF- und TrkB-Expression im Hippokampus hin. So konnten in den Western Blot-Analysen signifikante Veränderungen der Expression von BDNF und seinem Rezeptor, TrkB, nach Veränderung der Östradiol-Konzentrationen im Kulturmedium festgestellt werden. Eine Erhöhung der E2-Konzentration führte dabei zur Steigerung, eine Reduktion der endogenen E2-Produktion zur Verminderung der hippokampalen BDNF und TrkB-Synthese. Regionsspezifische Analysen der TrkB-Expression mittels quantitativer Immunhistochemie ergaben jedoch davon abweichende Resultate, deren Widersprüchlichkeit derzeit noch nicht vollständig erklärt werden kann.

## 9. Literaturverzeichnis

- Adams, M. M., S. E. Fink, et al. (2002). "Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats." J Neurosci **22**(9): 3608-14.
- Aguirre, C. C. and M. Baudry (2009). "Progesterone reverses 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and BDNF induction in cultured hippocampal slices." Eur J Neurosci **29**(3): 447-54.
- Alonso, M., J. H. Medina, et al. (2004). "ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons." Learn Mem **11**(2): 172-8.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." J Comp Neurol **124**(3): 319-35.
- Balthazart, J., M. Baillien, et al. (2005). "Interactions between kinases and phosphatases in the rapid control of brain aromatase." J Neuroendocrinol **17**(9): 553-9.
- Balthazart, J., C. A. Cornil, et al. (2006). "Rapid changes in production and behavioral action of estrogens." Neuroscience **138**(3): 783-91.
- Barde, Y. A., D. Edgar, et al. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." Embo J **1**(5): 549-53.
- Bender, R. A., L. Zhou, et al. (2010). "Roles of 17{beta}-Estradiol Involve Regulation of Reelin Expression and Synaptogenesis in the Dentate Gyrus." Cereb Cortex.
- Binder, D. K. and H. E. Scharfman (2004). "Brain-derived neurotrophic factor." Growth Factors **22**(3): 123-31.
- Carrer, H. F., A. Araque, et al. (2003). "Estradiol regulates the slow Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons." J Neurosci **23**(15): 6338-44.
- Cohen-Cory, S., A. H. Kidane, et al. (2010). "Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity." Dev Neurobiol **70**(5): 271-88.
- Cordoba Montoya, D. A. and H. F. Carrer (1997). "Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats." Brain Res **778**(2): 430-8.
- Davies, A. M. (1994). "The role of neurotrophins in the developing nervous system." J Neurobiol **25**(11): 1334-48.

- Drake, C. T., T. A. Milner, et al. (1999). "Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity." J Neurosci **19**(18): 8009-26.
- Eide, F. F., D. H. Lowenstein, et al. (1993). "Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease." Exp Neurol **121**(2): 200-14.
- Elliott, E., R. Atlas, et al. (2005). "Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism." Eur J Neurosci **22**(5): 1081-9.
- Enokido, Y., S. Wyatt, et al. (1999). "Developmental changes in the response of trigeminal neurons to neurotrophins: influence of birthdate and the ganglion environment." Development **126**(19): 4365-73.
- Fahnestock, M., D. Garzon, et al. (2002). "Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule?" J Neural Transm Suppl(62): 241-52.
- Fester, L., J. Prange-Kiel, et al. (2011) "Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: Sexual dimorphism in vivo but not in vitro." J Steroid Biochem Mol Biol.
- Figurov, A., L. D. Pozzo-Miller, et al. (1996). "Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus." Nature **381**(6584): 706-9.
- Foster, T. C. (2005). "Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span." Front Neuroendocrinol **26**(2): 51-64.
- Foy, M. R., J. Xu, et al. (1999). "17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation." J Neurophysiol **81**(2): 925-9.
- Fuller, P. J. (1991). "The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity." Faseb J **5**(15): 3092-9.
- Gomez-Palacio-Schjetnan, A. and M. L. Escobar (2008). "In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers." Neurosci Lett **445**(1): 62-7.
- Good, M., M. Day, et al. (1999). "Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region." Eur J Neurosci **11**(12): 4476-80.
- Gould, E., C. S. Woolley, et al. (1990). "Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood." J Neurosci **10**(4): 1286-91.

- Haapasalo, A., I. Sipola, et al. (2002). "Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms." J Biol Chem **277**(45): 43160-7.
- Henderson, V. W. (2000). "Oestrogens and dementia." Novartis Found Symp **230**: 254-65; discussion 265-73.
- Hojo, Y., T. A. Hattori, et al. (2004). "Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 865-70.
- Ivanova, T., E. Kupperts, et al. (2001). "Estrogen stimulates brain-derived neurotrophic factor expression in embryonic mouse midbrain neurons through a membrane-mediated and calcium-dependent mechanism." J Neurosci Res **66**(2): 221-30.
- Ji, Y., P. T. Pang, et al. (2005). "Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons." Nat Neurosci **8**(2): 164-72.
- Kang, H. and E. M. Schuman (1995). "Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus." Science **267**(5204): 1658-62.
- Kleene, R., C. Cassens, et al. (2010). "Functional consequences of the interactions among the neural cell adhesion molecule NCAM, the receptor tyrosine kinase TrkB, and the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel KIR3.3." J Biol Chem **285**(37): 28968-79.
- Klein, R., D. Conway, et al. (1990). "The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain." Cell **61**(4): 647-56.
- Klein, R., L. F. Parada, et al. (1989). "trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development." Embo J **8**(12): 3701-9.
- Korte, M., V. Staiger, et al. (1996). "The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments." J Physiol Paris **90**(3-4): 157-64.
- Kovalchuk, Y., E. Hanse, et al. (2002). "Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation." Science **295**(5560): 1729-34.
- Kramar, E. A., L. Y. Chen, et al. (2009a). "Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity." J Neurosci **29**(41): 12982-93.
- Kramar, E. A., L. Y. Chen, et al. (2010). "BDNF upregulation rescues synaptic plasticity in middle-aged ovariectomized rats." Neurobiol Aging.

- Kramar, E. A., L. Y. Chen, et al. (2009b). "Estrogen's Place in the Family of Synaptic Modulators." Mol Cell Pharmacol **1**(5): 258-262.
- Kramar, E. A., B. Lin, et al. (2004). "A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor." J Neurosci **24**(22): 5151-61.
- Kretz, O., L. Fester, et al. (2004). "Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis." J Neurosci **24**(26): 5913-21.
- Larsson, E., R. J. Mandel, et al. (2002). "Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor." Exp Neurol **177**(1): 1-8.
- Lee, J., H. Fukumoto, et al. (2005). "Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms." Exp Neurol **194**(1): 91-6.
- Leibrock, J., F. Lottspeich, et al. (1989). "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor." Nature **341**(6238): 149-52.
- Levin, E. R. (2005). "Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen." Mol Endocrinol **19**(8): 1951-9.
- Levine, E. S. and J. E. Kolb (2000). "Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons." J Neurosci Res **62**(3): 357-62.
- Lu, B. (2003). "BDNF and activity-dependent synaptic modulation." Learn Mem **10**(2): 86-98.
- Martin, M. G., S. Perga, et al. (2008). "Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro." Mol Biol Cell **19**(5): 2101-12.
- McEwen, B. (2002). "Estrogen actions throughout the brain." Recent Prog Horm Res **57**: 357-84.
- McEwen, B., K. Akama, et al. (2001). "Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7093-100.
- Messaoudi, E., K. Bardsen, et al. (1998). "Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus." J Neurophysiol **79**(1): 496-9.
- Middlemas, D. S., R. A. Lindberg, et al. (1991). "trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors." Mol Cell Biol **11**(1): 143-53.
- Morris, R. G. (2003). "Long-term potentiation and memory." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 643-7.

- Mowla, S. J., H. F. Farhadi, et al. (2001). "Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor." J Biol Chem **276**(16): 12660-6.
- Mukai, H., T. Tsurugizawa, et al. (2006). "Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory." Neuroendocrinology **84**(4): 255-63.
- Murphy, D. D., N. B. Cole, et al. (1998). "Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11412-7.
- Poon, W. W., M. Blurton-Jones, et al. (2009). "beta-Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking." Neurobiol Aging.
- Prange-Kiel, J., H. Jarry, et al. (2008). "Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis." J Cell Biol **180**(2): 417-26.
- Prange-Kiel, J., U. Wehrenberg, et al. (2003). "Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons." Hippocampus **13**(2): 226-34.
- Rex, C. S., C. Y. Lin, et al. (2007). "Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus." J Neurosci **27**(11): 3017-29.
- Rune, G. M. and M. Frotscher (2005). "Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity." Neuroscience **136**(3): 833-42.
- Rune, G. M., C. Lohse, et al. (2006). "Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus?" Neurochem Res **31**(2): 145-55.
- Saldanha, C. J., K. A. Duncan, et al. (2009). "Neuroprotective actions of brain aromatase." Front Neuroendocrinol **30**(2): 106-18.
- Scharfman, H., J. Goodman, et al. (2005). "Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats." Exp Neurol **192**(2): 348-56.
- Scharfman, H. E., T. M. Hintz, et al. (2007). "Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge." Eur J Neurosci **26**(9): 2595-612.
- Scharfman, H. E. and N. J. MacLusky (2005). "Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue?" Trends Neurosci **28**(2): 79-85.
- Scharfman, H. E. and N. J. MacLusky (2006). "Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-

- growth factor interactions in the adult CNS." Front Neuroendocrinol **27**(4): 415-35.
- Segal, M. and D. Murphy (2001). "Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates." Horm Behav **40**(2): 156-9.
- Smith, C. C. and L. L. McMahon (2005). "Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased." J Neurosci **25**(34): 7780-91.
- Sohrabji, F., R. C. Miranda, et al. (1995). "Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11110-4.
- Sohrabji, F., K. W. Peeples, et al. (2000). "Local and cortical effects of olfactory bulb lesions on trophic support and cholinergic function and their modulation by estrogen." J Neurobiol **45**(2): 61-74.
- Solum, D. T. and R. J. Handa (2002). "Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus." J Neurosci **22**(7): 2650-9.
- Srivastava, D. P., K. M. Woolfrey, et al. (2008). "Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14650-5.
- Stoppini, L., P. A. Buchs, et al. (1993). "Lesion-induced neurite sprouting and synapse formation in hippocampal organotypic cultures." Neuroscience **57**(4): 985-94.
- Sun, J. H., X. Q. Yan, et al. (2001). "Restoration of decreased N-methyl-d-aspartate receptor activity by brain-derived neurotrophic factor in the cultured hippocampal neurons: involvement of cAMP." Arch Biochem Biophys **394**(2): 209-15.
- Vierk, R., G. Glassmeier, et al. (2012). "Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice" J Neurosci, im Druck.
- Warren, S. G., A. G. Humphreys, et al. (1995). "LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats." Brain Res **703**(1-2): 26-30.
- Wehrenberg, U., J. Prange-Kiel, et al. (2001). "Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase." J Neurochem **76**(6): 1879-86.
- Woolley, C. S. and B. S. McEwen (1992). "Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat." J Neurosci **12**(7): 2549-54.
- Yague, J. G., A. C. Wang, et al. (2008). "Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus." Brain Res **1209**: 115-27.

Yan, Q., M. J. Radeke, et al. (1997). "Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat." J Comp Neurol **378**(1): 135-57.

Zhou, L., L. Fester, et al. (2010). "Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice." Endocrinology **151**(3): 1153-60.

Zhou, L., N. Lehan, et al. (2007). "Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors." Exp Neurol **203**(1): 72-81.

### **Weitere Literatur**

Schünke et al., Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 2006, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 375.

Rassow et al., Duale Reihe Biochemie, 2006, Georg Thieme Verlag Stuttgart

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Roland Bender, meinem Doktorvater. Über den gesamten Zeitraum der Studien stand er mir stets geduldig mit gutem Rat zur Seite, nahm sich die Zeit für Gespräche und unterstützte mich in schwierigen Situationen der Arbeit. Dafür möchte ich ihm ganz herzlich danken.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune, die mir die Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Roland Bender ermöglicht hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Bettina Kruck, die mir besonders in der Anfangsphase bei technischen Unklarheiten gute Ratschläge zuteil werden ließ und mich in die Herstellung von Gewebeschnitten am Kryostat einführte.

Herrn Dr. Lars Fester möchte ich für die Unterstützung bei computer-technischen Problemen danken. Bei Frau Diplom-Pharmazeutin Wiebke Wilkars und Herrn cand. med. Claas Kruse bedanke ich mich für die Einführung in die Technik des Western Blot-Verfahrens und die Hilfsbereitschaft sich bei aufgetretenen Unklarheiten die Zeit für ausführliche Erklärungen zu nehmen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für den freundlichen Umgang und die aufgeschlossene Atmosphäre, die z.B. durch die eine oder andere spannende Tischtennispartie etwas Entspannung von der Arbeit brachte.

Als letztes möchte ich hier die Möglichkeit nutzen meinen Eltern zu danken, die mir sowohl während der Dissertation, als auch im Verlauf des Studiums emotionalen Rückhalt gegeben haben und es schafften mich in schwierigen Situationen zu motivieren.

# 11. Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Nachname	Nottebohm
Vorname	Marc Johannes
Geburtsdatum	29.09.1984
Geburtsort	Heidelberg, Baden-Württemberg
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig
Wohnort	Geschwister-Scholl-Str.91, 20251 Hamburg
email	<a href="mailto:marc.nottebohm@gmx.de">marc.nottebohm@gmx.de</a>

## Schul-Ausbildung

09/1991-07/1995	Mönchhof-Grundschule, Heidelberg
09/1995-06/2004	St. Raphael-Gymnasium, Heidelberg
08/2001-06/2002	Auslandsschuljahr an der St.Stephens Episcopal School in Austin, Texas, USA
06/2004	Abitur am St. Raphael-Gymnasium, Heidelberg, (Note 1,7)

## Praktika

08/2004-11/2004	Krankenpflege-Praktikum im Krankenhaus Antonio Lorena, Cusco, Peru
12/2004-05/2005	Freiwilliger sozialer Dienst im Kinderprojekt Puririsun, Cusco, Peru

## Hochschul-Studium

10/2005-04/2012	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
09/2007	1. Staatsexamen (Note 2,0)
08/2008	Beginn der experimentellen Dissertation auf dem Gebiet

	der Hippokampusforschung im neuroanatomischen Institut des Universitätsklinikums Eppendorf
09/2009-07/2010	Auslandsstudium an der Universität Sevilla, Spanien
04/2012	2. Staatsexamen (Note 1,5)

### **Famulaturen**

09/2008	Neurologie in der Asklepios Klinik Altona, Hamburg
08/2009	Kardiologie in der Asklepios Klinik Altona, Hamburg
08/2010	Allgemeinchirurgie im St.Josefs-Krankenhaus, Heidelberg
09/2010	Notaufnahme in der Asklepios Klinik Altona, Hamburg

### **Praktisches Jahr (PJ)**

02/2011-06/2011	Anästhesie an der <i>University of California San Diego</i> (UCSD), Kalifornien, USA
06/2011-10/2011	Inneren Medizin in der Asklepios Klinik Altona, Hamburg
10/2011-11/2011	Orthopädische Chirurgie in der Balgrist Klinik, Zürich
11/2011-01/2012	Viszeralchirurgie in der Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg

## 12. Eidesstattliche Versicherung

Hiemit versichere ich ausdrücklich, dass ich die vorliegende 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 übernommenen 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: \_\_\_\_\_

gez. Marc Nottebohm