UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Einfluss von 17- ß-Estradiol auf die Expression von AMPA- und NMDA-Rezeptoren im Hippocampus

Dissertation

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

vorgelegt von:

Martin Mechsner
aus Hamburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Roland Bender

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Manfred Jücker

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Rune

Termin der mündlichen Prüfung: 25.11.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **3**
1. EINLEITUNG **5**
1. 1. Gegenstand der Arbeit 5
1. 2. Der Hippocampus 7
1. 3. Östrogene im Hippocampus 9
1. 4. Glutamatrezeptoren 10
1.4.1. AMPA Rezeptoren 11
1.4.2. NMDA Rezeptoren 12
1.4.3. Kainat-Rezeptoren 15
1. 5. Experimentelle Vorgehensweise 15
2. Material und Methoden **17**
2.1 Material 17
2.1.1 Chemikalien 17
2.1.2 Antikörper 18
2.1.3 Geräte und technische Hilfsmittel 19
2.1.4 Software 21
2.1.5 Lösungen und Kulturmedien 22
2.2 Methoden 24
2.2.1 Organotypische Gewebekulturen und Immunhistochemie 24
2.2.1.1 Präparation des Hippocampus und Herstellung der organotypischen Gewebekulturen 24
2.2.1.2 Inkubation der Gewebekulturen 24
2.2.1.3 Herstellung von Gefrierschnitten am Kryostat 26
2.2.1.4 Immunhistochemie 26
2.2.1.5 Mikroskopische Messung und Auswertung 26
2.2.2 Western Blot 28
2.2.2.1 Behandlung der Gewebekulturen für die Western Blot-Analyse 28
2.2.2.2 Proteinaufbereitung aus Gewebe 28
2.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford 29
2.2.2.4 SDS-PAGE 29
2.2.2.5. Blottechnik 30
2.2.2.6 Entwicklung der Blots 31
2.2.2.7 Auswertung Western Blot 31
3. Ergebnisse **32**
3.1. Analyse der NR1- und GluR1-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels Western Blot 32
3.1.1. Analyse der GluR1-Expression im Western Blot 32
3.1.2. Analyse der NR1 Expression im Western-Blot 34
3.2. Analyse der regionalen GluR1 und NR1 Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels quantitativer Immunhistochemie 36
3.2.1. Vergleich der regionalen Expression *in vivo* und *in vitro* 36
3.2.2. GluR1 Expression in hippocampalen Gewebekulturen, immunhistochemische Auswertung 38
3.2.3. NR1 Expression in hippocampalen Gewebekulturen, immunhistochemische Auswertung 40
4. Diskussion **43**
4.1. Synaptische Plastizität und Glutamatrezeptoren 43
4.2. Der Einbau bereits im Cytoplasma vorliegender Rezeptoruntereinheiten in ruhende („*silent*“) Synapsen 45
4.3. Entwicklungsspezifische Aspekte der Glutamatrezeptorexpression 47
4.4. Methodische Aspekte 48
5. Zusammenfassung **51**
6. Literaturverzeichnis **52**
6.1 Wissenschaftiche Publikationen 52

6.2 Ergänzende Fachliteratur: 60
6.3 Abbildungen und Tabellen 60
7. Danksagung **64**
8. Eidesstattliche Versicherung **65**

1. EINLEITUNG

1. 1. Gegenstand der Arbeit

Die Fähigkeiten des Menschen werden maßgeblich davon beeinflusst, dass er Informationen in sein Gedächtnis aufnehmen und sie bei Bedarf wieder abrufen kann. Die Region im Gehirn, die für Lernen und Gedächtnisbildung von zentraler Bedeutung ist, heißt Hippocampus und liegt im Temporallappen beider Gehirnhälften. Neuronale Verknüpfungsbahnen des Hippocampus, wie der Papez-Neuronenkreis und die Schaffer-Kollateralen, werden als anatomische Netzwerke angesehen, die eine Gedächtnisbildung ermöglichen. Beobachtet man die einzelnen Neurone des Hippocampus, kann man eine besondere Fähigkeit zur neuronalen Plastizität feststellen. Das bedeutet, dass einzelne Nervenzellen, je nach Intensität der Kommunikation untereinander, die Anzahl und Stärke ihrer Kontaktstellen (Synapsen) regulieren können.

Im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnisbildung ist zusätzlich eine besonders nachhaltige Form der Kommunikation zwischen den Nervenzellen vonnöten: die Langzeitpotenzierung (*long term potentiation* = LTP). Bei der LTP wird durch kurze, hochfrequente Reizung der präsynaptischen Neurone eine lang anhaltende Erhöhung der Effizienz der exzitatorischen Signalübertragung auf die nachgeschalteten, postsynaptischen Neurone erzeugt, die über Stunden und Tage hinweg beobachtet werden kann. Die LTP im Hippocampus gehört zu den am besten untersuchten molekularen Vorgängen an der Synapse und wird mittlerweile als ein etabliertes zelluläres Modell für synaptische Plastizität und Langzeitgedächtnis angesehen (Bliss und Collingridge, 1993; Malenka und Nicoll, 1999; Lisman, 1989). Zahlreiche Faktoren, die an der Etablierung und Regulation der LTP beteiligt sind, wurden in den letzten Jahren beschrieben und werden bis heute intensiv untersucht (Abraham und Williams, 2003).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass zu den LTP-beeinflussenden Faktoren auch das Sexualhormon Östrogen gerechnet werden muss. So konnten Foy et al. (1999) zeigen, dass eine Applikation von 17-β-Estradiol (E2) in hippocampalen Gewebeschnitten die Ausbildung einer LTP an exzitatorischen Synapsen der CA1-Region

(den Schaffer-Kollateralen) fördert. Smith und McMahon (2005, 2006) unterstützten diese Befunde, indem sie zeigten, dass die LTP in CA1 auch nach systemischer Gabe von E2 in Ratten erhöht ist. Darüberhinaus war die hippocampale LTP auch in ovariektomierten Ratten, denen also die gonadalen Östrogene fehlten, beeinträchtigt (Cordoba-Montoya und Carrer, 1997; Kramar et al., 2009).

Östrogene werden jedoch nicht nur in den Gonaden gebildet, sondern können auch im Hippocampus selbst synthetisiert werden (Prange-Kiel et al., 2003; Amateau et al., 2004; Kretz et al., 2004), da die Aromatase, das finale Enzym der Östrogensynthese, das E2 aus Testosteron bildet (Löffler et al., 1998), in hippocampalen Neuronen exprimiert wird (Wehrenberg et al., 2001; Hojo et al., 2004). Tatsächlich deuten quantitative Untersuchungen darauf hin, dass die Konzentration des endogen gebildeten E2 im Hippocampus die des Serum-Östrogens um ein Vielfaches übersteigt (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004). Neueste Arbeiten der Arbeitsgruppe Rune konnten weiterhin nachweisen, dass das endogen produzierte E2 auch an der Regulation der hippocampalen LTP beteiligt ist (Vierk et al., 2012). Wurde die hippocampale E2-Synthese durch den reversiblen Aromatase-Inhibitor Letrozol unterbunden, führte dies zeitabhängig (und geschlechtsabhängig) zu einer fast vollständigen Eliminierung der Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung an den Synapsen der Schaffer-Kollateralen in CA1 (Vierk et al., 2012). Hippocampal gebildetes E2 muss daher als ganz wesentlicher Regulator der Langzeitpotenzierung im Hippocampus angesehen werden.

Der Mechanismus, über den E2 die LTP im Hippocampus beeinflusst, ist bislang jedoch noch nicht geklärt. Verschiedene Ansätze werden derzeit untersucht. Einer dieser Ansätze - die Hypothese, dass E2 die Expression von Glutamatrezeptoren beeinflusst - ist Gegenstand dieser Arbeit. Diese Hypothese beruht auf der Erkenntnis, dass die Ausbildung von LTP mit massiven Veränderungen der Glutamatrezeptorexpression und/oder -lokalisation einhergeht (siehe Abschnitt 1. 4.). Gestützt wird diese Hypothese unter anderem durch die Befunde von Foy et al. (1999) und Smith und McMahon (2005, 2006), die Hinweise dafür fanden, dass die E2-induzierte Beeinflussung der hippocampalen LTP mit Veränderungen der NMDA-Rezeptor-Expression einhergeht. In dieselbe Richtung gehend fanden Zhou et al. (2010) nach systemischer Letrozol-

Applikation (d. h. Inhibition der E2-Synthese) in adulten Mäusen eine verringerte Expression des NMDA-Rezeptor-Subtyps NR1 im Hippocampus. Desweiteren gelang es Liu et al., 2008 durch Aktivierung des Estrogenrezeptors beta (ER-β) einen Anstieg des AMPA-Rezeptor-Subtyp GluR1 zu zeigen. Folglich kann eine Regulation der Expression von Glutamatrezeptoren durch E2 vermutet werden.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro*-Modell - die organotypische hippocampale Gewebekultur – etabliert, mit dessen Hilfe untersucht wurde, wie sich (1) eine exogene Gabe von E2 oder (2) die Inhibierung der hippocampalen E2-Synthese durch Letrozol auf die Expression von Glutamatrezeptoren auswirkt. Ausgewählt wurden für diese Untersuchung wegen ihrer vermuteten Bedeutung für die Etablierung von LTP (siehe Abschnitt 1. 4.) der NMDA-Rezeptor-Subtyp NR1 sowie der AMPA-Rezeptor-Subtyp GluR1.

1. 2. Der Hippocampus

Der Hippocampus ist ein phylogenetisch alter Anteil des Kortex und gehört zum limbischen System. Dieses wird für Gedächtnis, Emotionen und vegetative Körperfunktionen verantwortlich gemacht. Der Hippocampus bildet beim Menschen den medialen Rand des Temporallappens.

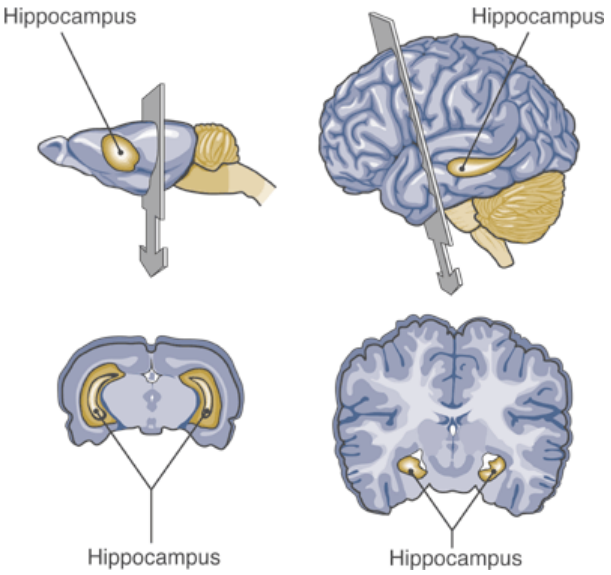


Abb. 1:
Ein Vergleich der anatomischen Lage des Hippocampus, bei der Ratte(li.) und bei dem Menschen(re.).
Ansicht oben von lateral, unten von frontal auf die Schnittebene.

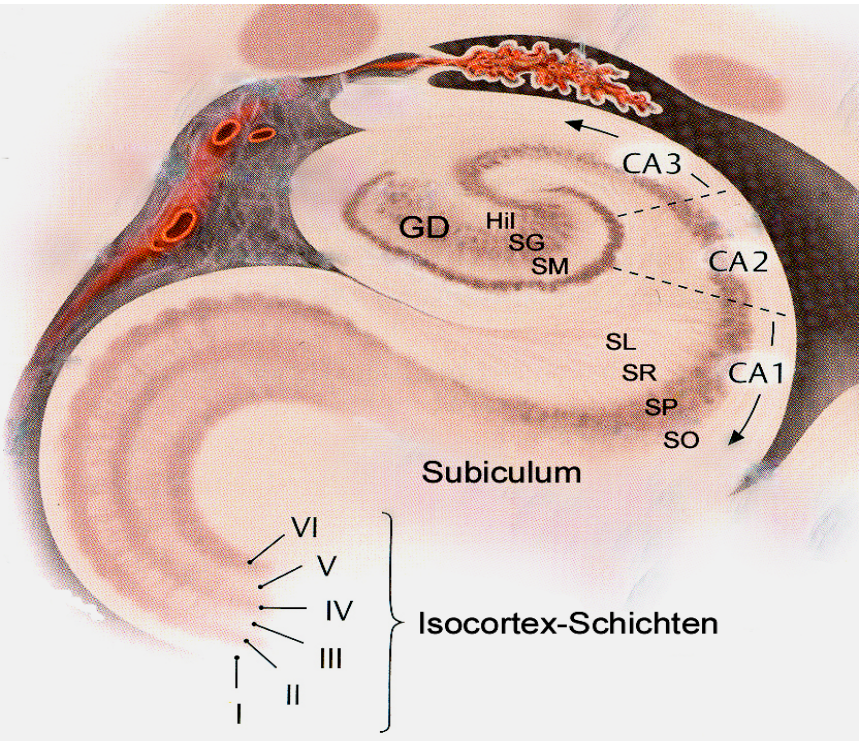


Abb. 2
Schematische Darstellung des Hippokampus
GD - Gyrus dentatus
SM - Stratum moleculare
SG - Stratum granulare
Hil - Hilus
SO - Stratum oriens
SP - Stratum pyramidale
SR - Stratum radiatum
SL - Stratum lacunosum

Die Hippocampusformation besteht aus dem Gyrus dentatus, dem Cornu ammonis (CA) und dem Subiculum. Manche Autoren zählen zusätzlich den entorhinalen Kortex, das Parasubiculum und das Präsubiculum zur Hippocampusformation. Die neuronale Information wird im Hippocampus im Wesentlichen in einem trisynaptischen Schaltkreis verarbeitet. Dieser beginnt mit dem Tractus perforans, über den Axone aus dem entorhinalen Kortex die Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus erreichen. Von den Körnerzellen ausgehend, projizieren die sog. Moosfasern zu Pyramidenzellen der CA3-Region. Axone dieser Neurone bilden dann die Schaffer-Kollateralen, die im Stratum radiatum von CA1 Synapsen mit den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen ausbilden. An diesen Synapsen wurde die LTP erstmals beschrieben (Bliss und Lomo, 1973) und an ihnen ist die neuronale Plastizität im Hippocampus besonders gut untersucht. Über den Tractus alveans wird die Information von der CA1-Region zum Neokortex und Subiculum weitergeleitet. Weiterhin erreichen Axone über den Fornix auch subkortikale Hirngebiete.

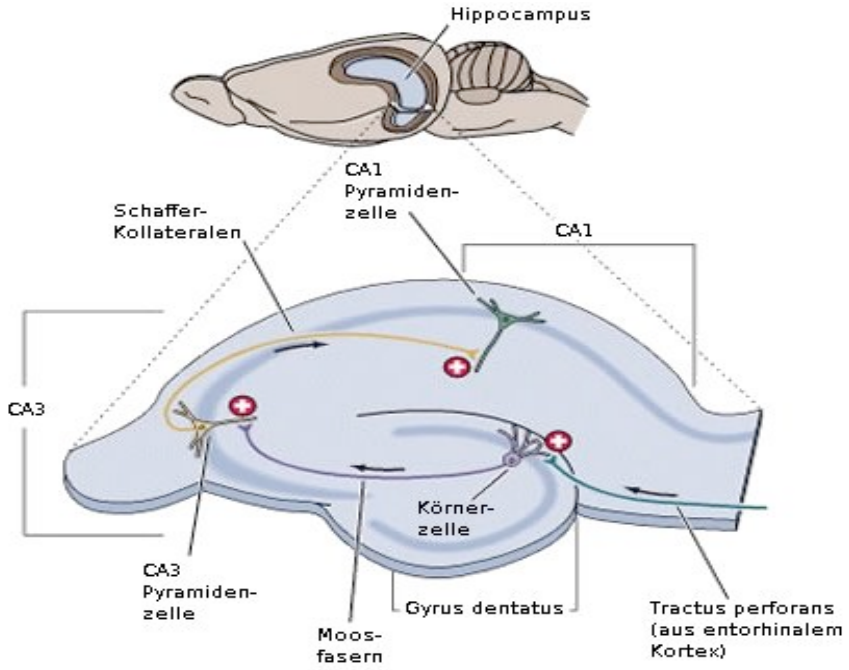


Abb. 3:
Schematische Darstellung des trisynaptischen Schaltkreises.

1. 3. Östrogene im Hippocampus

Östrogene zählen, neben den Mineralo- und Glukokortikoiden, zu den Steroidhormonen. Ihnen ist gemeinsam, dass sie aus Cholesterin gebildet werden. Dabei ist das wirksamste der Östrogene 17β-Estradiol (E2). Hauptsyntheseort der Östrogene sind die Ovarien. Jedoch findet man eine substantielle Östrogenproduktion auch in anderen Körpergeweben, wie im Fettgewebe, in Knochen, in Muskeln, in den Nebennieren und sogar im Hoden (Baulieu, 1997; Zwain et al., 1999; Leidenberger et al., 2009). Besonderes Aufsehen erregte der Befund, dass Östrogene, und insbesondere E2, auch von Neuronen produziert werden (Naftolin et al., 1975). Hauptsyntheseort ist hier neben dem Hypothalamus der Hippocampus (Wehrenberg et al., 2001; Prange-Kiel, 2003; Kretz et al., 2004). Wie nachfolgende Studien zeigen konnten, ist hippocampal gebildetes E2 an der Regulation zahlreicher neuronaler Funktionen beteiligt, wie z. B. der Synapsendichte (Kretz et al., 2004; Bender et al., 2010; Zhou et al., 2010), der Expression synaptischer Proteine (Wehrenberg et al., 2001, Prange-Kiel et al., 2006, Fester et al., 2009), der Neurogenese (Fester et al., 2006), dynamischen Veränderungen des Cytoskeletts (Vierk et al., 2012) und, wie bereits erwähnt, der Ausbildung von Langzeitpotenzierung (Vierk et al., 2012) und Langzeitdepression (Mukai et al., 2007). Vermittelt wird diese Wirkung über teils membranständige, teils cytoplasmatische und kerngängige Östrogenrezeptoren, von

denen zwei Subtypen - ER-α und ER-β - bekannt sind (Levin, 2005). Weitere Subtypen werden jedoch vermutet (Toran-Allerand, 2004).

Diese Befunde führten insgesamt zu einem Umdenken in der Betrachtung der im Gehirn durch Östrogene ausgelösten Wirkungen. Wurde bis dahin vermutet, dass Östrogen-Effekte auf die synaptische Plastizität im Hippocampus, vor allem durch die gonadal produzierten Hormone hervorgerufen wurden, wird nun davon ausgegangen, dass das im Hippocampus selbst synthetisierte 17-β-Estradiol maßgeblichen Einfluss auf die synaptische Plastizität im Hippocampus ausübt (Kretz et al., 2004; Rune et al., 2006; Hojo et al., 2008). Die hippocampale Östrogenproduktion unterliegt dabei jedoch einer zyklischen Regulation durch das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH; Prange-Kiel et al., 2008, 2009), wodurch die zuvor beobachtete Zyklus-Abhängigkeit des Östrogen-Einflusses auf die synaptische Plastizität (Woolley et al., 1990; Woolley und McEwen, 1992, 1993) erklärbar wird.

1. 4. Glutamatrezeptoren

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Nach seiner synaptischen Freisetzung wird es von Glutamatrezeptoren gebunden, die man unterteilt in metabotrope Glutamatrezeptoren, die über G-Proteine an intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden gekoppelt sind, und ionotrope Rezeptoren, die ligandengesteuerte Ionenkanäle für Natrium- oder Calciumionen bilden. Unter letzteren unterscheidet man folgende Gruppen:

1) AMPA- (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) Rezeptoren
2) NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren
3) Kainat-Rezeptoren

Beide Rezeptortypen (metabotrop wie ionotrop) sind an Mechanismen der synaptischen Plastizität beteiligt. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nur ionotrope Rezeptoren untersucht wurden, soll nur auf diese im Detail eingegangen werden.

1.4.1. AMPA Rezeptoren

AMPA Rezeptoren sind für die schnelle, exzitatorische, synaptische Übertragung im ZNS verantwortlich und beeinflussen maßgeblich die synaptische Plastizität. Es sind vier Untereinheiten bekannt (GluR1-4), die jeweils von unterschiedlichen Genen stammen. Aus ihnen können sowohl homo- wie heteromere, tetramere Rezeptoren gebildet werden. Im Hippocampus überwiegen heteromere Rezeptoren, bestehend aus GluR2- und entweder GluR1 oder GluR3-Untereinheiten, gegenüber einem sehr kleinen Anteil homomerer GluR1 Rezeptoren (Wenthold et al., 1996). Ihr Aufbau gleicht dem der NMDA Rezeptoren, der nachfolgend beschrieben wird. Sie haben alle einen extrazellulären N-Terminus, der die Ligandenbindungsstelle enthält und einen intrazellulären C-Terminus, der sich zwischen den Untereinheiten strukturell und funktionell unterscheidet. AMPA Rezeptoren bilden einen Ionenkanal für Natrium- und Kalium-Ionen.

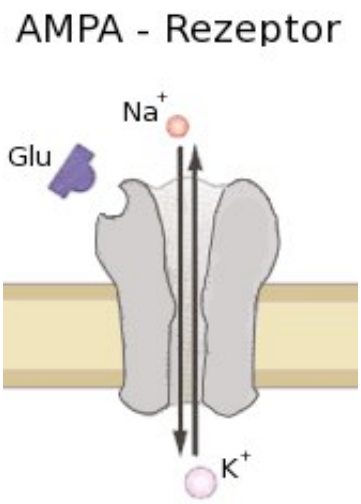


Abb. 4 : Schematische Darstellung eines aktiven AMPA Rezeptors.

Die Modulation von AMPA Rezeptoren ist der Hauptmechanismus zur Beeinflussung der Plastizität exzitatorischer Übertragung. Dabei kann die Leitfähigkeit einzelner Rezeptoren erhöht werden (Benke et al., 1998) oder es können vermehrt Rezeptoren in die Membran der Synapsen integriert werden (Shepherd und Huganir 2007; Malinow und Malenka 2002). Wie letzterer Mechanismus genau funktioniert, ist noch nicht vollständig geklärt. Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert (zur Übersicht Groc und Choquet, 2006):

1. Die Rezeptoren werden im Neurosoma synthetisiert, in die Zellmembran integriert und diffundieren daraufhin zu den Synapsen in den Dendriten (Adesnik et al., 2005).
2. Neugebildete Rezeptoren werden über cytoskelett-assoziierte Motorproteine, wie Dynein und Kinesin, im Zytoplasma zu den Synapsen transportiert (Washbourne et al., 2002).
3. Die Rezeptoren werden direkt vor Ort im dendritischen Kompartiment synthetisiert und in die Synapse inseriert (Passafaro et al., 2001).
Jeder dieser Mechanismen setzt eine Neubildung von AMPA-Rezeptoren voraus, die auf ein gegebenes Signal hin (in der Regel neuronale Aktivität), in die aktiven Synapsen integriert werden und dadurch die Exzitation verstärken. Ein 4. Mechanismus geht jedoch von einem konstant bleibenden AMPA-Rezeptor-Pool aus; d. h. nach diesem Modell liegen die Rezeptoren ruhend in Vesikeln im Cytoplasma bereit und werden auf ein Signal in die postsynaptische Membran eingebaut (Srivastava et al., 2008). Nach diesem Modell erfordert der Einbau von AMPA-Rezeptoren in plastisch veränderte Synapsen keine Neusynthese von Rezeptoruntereinheiten.
In jedem Fall erfordert die erhöhte synaptische Effizienz nach LTP Induktion den schnellen Einbau von GluR1-haltigen Rezeptoren in die postsynaptische Membran, die dann nach und nach durch GluR2/3 haltige Rezeptoren ausgetauscht werden (Malinow und Malenka, 2002).

1.4.2. NMDA Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren bestehen, ähnlich wie AMPA-Rezeptoren, aus einem tetrameren Komplex mit vier Membrandomänen. Anders als die AMPA-Rezeptoren leiten sie neben Natrium jedoch auch Calcium-Ionen.

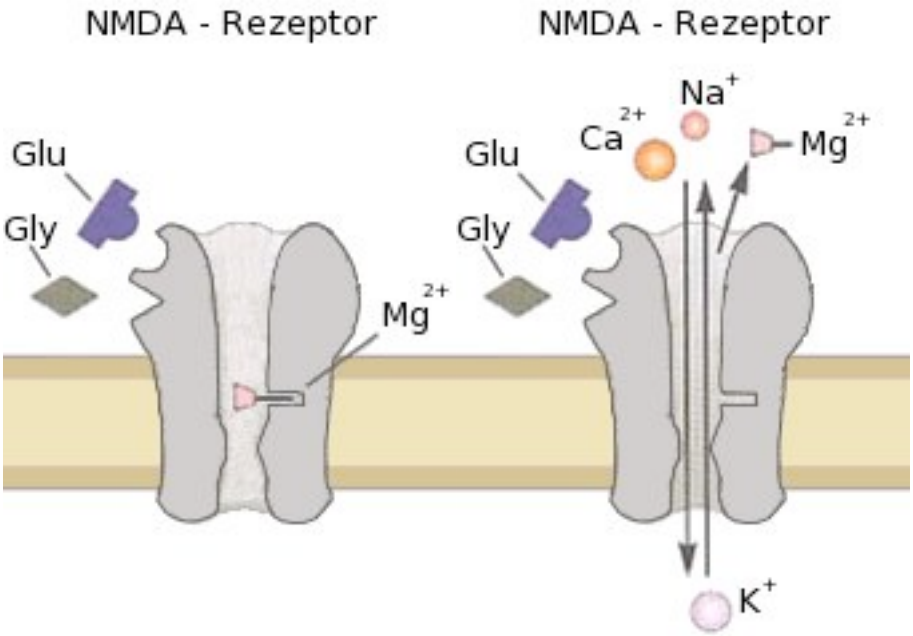


Abb. 5:
Schematische Darstellung eines NMDA-Rezeptors. Links: ohne Vordepolarisation der Zelle;
Rechts: mit Vordepolarisation der Zelle und dadurch abdiffundierten Mg^+-Block.

Auch bei den NMDA-Rezeptoren unterscheidet man verschiedene Untereinheiten:

1. die NR1 Untereinheit, die essentiell in jedem NMDA Rezeptorkomplex vorkommt. Sie existiert in verschiedenen Splicevarianten der mRNA eines Gens, die zu unterschiedlichen N- und C-Termini führen. Die Phosphorylierung der NR1-Untereinheit ist ein wichtiger Mechanismus, um die Kanalaktivität und die Verteilung auf der Zelloberfläche zu modulieren (Chen et al., 2006; Chen und Roche, 2007). Außerdem besitzt die NR1-Untereinheit eine Glycin-Bindungsstelle.

2. Verschiedene NR2 Untereinheiten (A-D), die den intrazellulären Signalweg eines NMDA-Rezeptors bestimmen, d. h. sie kommunizieren mit Proteinen wie der Ca-Calmodulin-dependent Kinase II (CaMKII) oder der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und sind somit für die Vermittlung synaptischer Plastizität verantwortlich (Sprengel et al., 1998). Durch die Kombination unterschiedlicher NR1 und NR2 Untereinheiten entstehen verschiedene NMDA-Rezeptortypen, die sich in ihrem physiologischen Verhalten unterscheiden (Cull-Candy et al., 2001).

3. Die NR3 Untereinheit (A-B). Schon vor 15 Jahren wurde noch eine weitere Untereinheit beschrieben: NR3 (vorher als NMDAR-L bekannt; Nilsson et al., 2007). Die Funktion dieser Untereinheit ist jedoch noch nicht völlig geklärt (Pachernegg et al., 2012). Sie besitzt wie NR1 auch eine Glycin Bindungsstelle, wodurch NR3 eventuell zum möglichen Ersatz für NR1 zur Verfügung steht (Eriksson et al., 2007).

NMDA-Rezeptoren sind für die LTP an CA1-Schaffer-Kollateral-Synapsen essentiell, denn sie werden liganden- und spannungsabhängig reguliert. Durch Bindung der Liganden Glutamat und Glycin alleine wird die Kanalpore noch nicht geöffnet, denn innerhalb dieser befindet sich ein blockierendes Magnesiumion, das erst bei starker Depolarisation der Membran (= spannungsabhängige Regulation) abdiffundiert und die Kanalöffnung freigibt. NMDA-Rezeptoren werden somit erst dann leitfähig, wenn über andere Mechanismen (z. B. AMPA-Rezeptoren) bereits eine Depolarisation der Membran eingetreten ist. Sind sie jedoch einmal aktiviert, kommt es zu einem massiven Calcium-Einstrom in die Zelle. Dieser führt zu einer Aktivierung der CaMKII und anderer Signalproteine, die über intrazelluläre Signalkaskaden den Reiz weiterleiten. Bewirkt wird dadurch unter anderem ein verstärkter Einbau von AMPA-Rezeptoren in die synaptische Membran (insbesondere GluR1; Nayak et al., 1998; Heynen et al., 2000; Malinow und Malenka, 2002). Es kommt durch die Signaltransduktion jedoch mittelfristig auch zur Induktion der Genexpression und Synthese neuer Proteine im Kern, die dann die synaptischen Veränderungen (d. h. die LTP) stabilisieren.

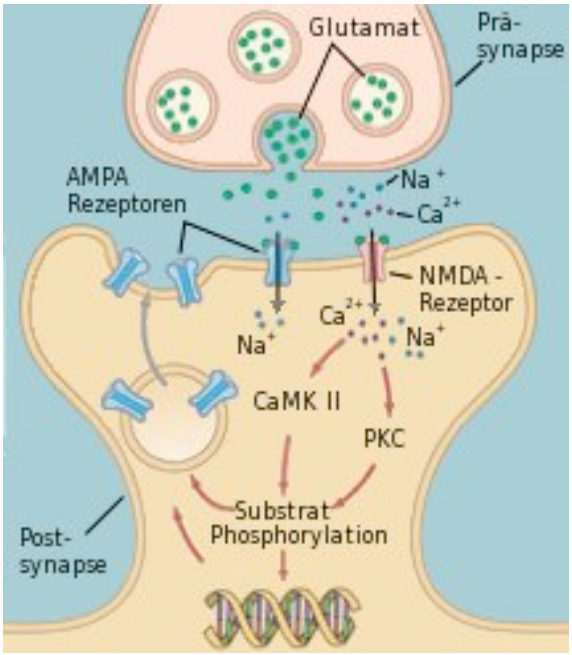


Abb. 6 :
Schematische Darstellung der Langzeit-potenzierung.
Nach Glutamatfreisetzung werden zuerst AMPA Rezeptoren aktiviert, die zu einer Membrandepolarisation führen. Dadurch kann der NMDA Rezeptor aktiviert werden. Es kommt zu einem massiven Calcium-Ionen Einstrom, der über unterschiedliche Signalkaskaden zu einer vermehrten AMPA Rezeptor Expression und Insertion führt.

NR2 ist in diesem Prozess vermutlich wichtig für die Aufrechterhaltung der LTP. Denn LTP-Induktion stimuliert die NR2-Expression, korrelierend zur Höhe der LTP (Foster et al., 2010). Im weiteren Verlauf nimmt jedoch auch die Anzahl der NR1-Untereinheiten zu; es stehen dadurch also insgesamt mehr Rezeptoren zur Verfügung (Williams et al., 1998).

Diese Regulation ist auch in die andere Richtung zu beobachten. Bei einer Niedrig-Frequenz-Stimulation mit folgender Langzeitdepression (LTD) sind Abnahmen der NR1- und NR2-Expression zu beobachten (Williams et al., 2003). An der Ausbildung von LTP sind somit Expressionsänderungen von NMDA-Rezeptoren sehr wahrscheinlich beteiligt.

1.4.3. Kainat-Rezeptoren

Kainat-Rezeptoren gehören, wie die AMPA und NMDA Rezeptoren zu der Familie der Glutamat-Rezeptoren. Sie sind ebenfalls in der Lage, als Ionenkanal zu fungieren und so zu einer Depolarisierung beizutragen. Ihre Aufgabe liegt aber eher darin, synaptische Übertragung zu modellieren, als sie auszulösen. Desweiteren scheinen sie auch über einen metabotropen Signalweg zu verfügen.
Insbesondere bei der LTP-Entstehung an den Moosfasern der CA3-Region scheinen sie daher erleichternd einzugreifen, indem sie nur langsam deaktivieren. (für eine Übersicht Contractor et al., 2011)
Da sie in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden, wird an dieser Stelle nicht weiter auf sie eingegangen.

1. 5. Experimentelle Vorgehensweise

Aus den zuvor dargestellten Erkenntnissen wird deutlich, dass Veränderungen der Glutamatrezeptorexpression einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung von LTP in der CA1-Region leisten. Andererseits mehren sich auch Hinweise, dass Östrogene (insbesondere E2) regulierend auf die Expression von Glutamatrezeptoren einwirken können (Foy et al., 1999; Smith und McMahon, 2005, 2006; Zhou et al., 2010; Liu et al., 2008). Es wäre somit eine Art „*priming*“-Effekt durch Östrogene denkbar, d. h. durch eine E2-induzierte Stimulierung der Glutamatrezeptorexpression könnte die Ausbildung der LTP vorbereitet bzw. erleichtert werden (Srivastava et al., 2008). Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Experimente durchgeführt: Es wurden von früh postnatalen Ratten (postnataler Tag 5) organotypische, hippocampale Gewebekulturen angelegt und diese nach einer kurzen Erholungsphase für den Zeitraum von 4 oder 7 Tagen mit entweder E2 oder dem Aromatase-Inhibitor Letrozol inkubiert. Danach wurde mit Hilfe von Western-Blot und quantitativer immunhistochemischer Analysen die

Expression von Glutamatrezeptor-Untereinheiten in der CA1-Region bestimmt. Auf Grund der Tatsache, dass GluR1-Untereinheiten für die LTP, und NR1-Untereinheiten für NMDA-Rezeptoren essentiell sind (d. h. eine Erhöhung der Gesamtrezeptorzahl immer mit einer Erhöhung dieser Untereinheiten einhergeht), wurden speziell diese Untereinheiten zur Analyse ausgewählt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acryl-Amid	ROTH
Ammonium Persulfat (APS)	SIGMA
Bio Rad Protein Assay	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Bromphenolblau (BPB)	MERCK
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Complete	ROCHE
Cyclodextrin-encapsulated 17ß-Estradiol	SIGMA
Glycerin	SIGMA
Glycin	APOTHEKE UKE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	SIGMA
DAKO Mounting Medium	DAKO
ECL (Pierce ECL Western Blotting substrate)	THERMO SCIENTIFIC
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	MERCK
Ethanol (96%)	APOTHEKE UKE
Gel-Kämme	BIO-RAD
Glutamin	SIGMA
Hanks balanced Salts (HBSS)	INVITROGEN
HM 560 (Kryostat)	MICROM
Horse serum (Pferdeserum)	INVITROGEN
Ketamin	GRÄUB
Letrozol	APOTHEKE UKE
Milchpulver	HEIRLER

Minimal Essential Medium	INVITROGEN
Methanol	J.T.BAKER
Normal Goat Serum (NGS, G9023)	SIGMA
Stickstoff (N2)	APOTHEKE UKE
NP40 Alternative	CALBIOCHEM
Phosphate Buffered Saline-Tbl. (PBS)	MERCK
Penicillin-Streptomycin	INVITROGEN
Paraformaldehyd (PFA)	MERCK
Ponceau-Rot	MERCK
Prestained Page Ruler (Marker)	FERMENTAS
Protease Inhibitorenmix complete	ROCHE
Rompun	BAYER
Rotiphoresegel 30	ROTH
Saccharose	MERCK
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	FLUKA
Solium Bicarbonte solution	SIGMA
Sterillium	BODE CHEMIE HAMBURG
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SIGMA
Tissue Tek	SAKURA
Tris	ROTH
Trockeneis	TMG
Tween	SIGMA

2.1.2 Antikörper

Produkt	**Hersteller**
GluR1, rabbit polyclonal Ig G	MILLIPORE
NMDAR1, mouse monoclonal Ig G	MILLIPORE

Goat-anti-rabbit IgG (Cy3-gekoppelt)	JACKSON IMMUNO RESEARCH
Goat-anti-mouse IgG (HRP-gekoppelt)	PIERCE
GAPDH, mouse monoclonal	AMBION APPLIED BIOSYSTEMS

2.1.3 Geräte und technische Hilfsmittel

Produkt	**Hersteller**
Accu-Jet	BRAND
Analysen-Waage	SARTORIUS
Bio-Photometer	EPPENDORF
Boxen für Objektträger	VWR
Centrifuge 5417R	EPPENDORF
Deckgläser, 24x46 mm, 24x60 mm	MARIENFELD
Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150	PHARMACIE
Electrophoresis constant power supply EPS 3501 XL	AMERSHAM PHARMACIE BIOTECH
EpT.I.P.S. Standard (Pipettenspitzen)	EPPENDORF
Erlenmeyer Kolben, Duranglas	SCHOTT
Feuchtkammer	LABOR ANATOMIE UKE
Film	AGFA
Filterpapier (dick, dünn)	SCHLEICHER-SCHÜLL
Foto-Kassette	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH
Optimax (Foto-Entwicklungs-Maschine)	PROTEC
Folienstifte	FABER-CASTELL
Gefrierschrank, -25C°, -80C°	LIEBHERR
Mini-Protean 3 cell (GEL-Aparatur)	BIO RAD
Glaspipette, 5ml, 10ml	FALCON
Heidemannspatel	FST

Mini-Protean 3 system	BIO RAD
Kühlschrank	BOSCH
Küvetten, Färbekästen nach Helledahl	VWR
Laborflaschen, 0,5l, 1l, Duranglas	SCHOTT
MACS-Mix-Tube-Rotator	MILTENYI BIOTECH GMBH
Magnetrührstäbchen, Standard	VWR
Magnetrührer	HEIDOLPH
Masterflex L/S (Perfundiergerät)	COLE PARMER
Mikroliter-Pipetten, 2 , 20, 200, 1000 ul	EPPENDORF
Microtome Blades, S35	FEATHER
Millicell-Kulturmembranen	MILLIPORE
Multiwell-Zellkulturplatten (Six-wells)	BD-FALCON
Nitrocellulose-Membran	MILLIPORE
20er Objektiv	ZEISS
40er Objektiv	ZEISS
60er Objektiv	UPLAN SAPO
Objektträger	HECHT-ASSISTENT
Parafilm	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
Plastik-Pipetten, 10 ml	EPPENDORF
Pinsel	DA VINCI
Pinzette, feine Spitze	FST
Pinzette, gebogen	FST
Protease Inhibitorenmix complete	ROCHE
Mikro-Homogenisator Potter 0,1 ml	NOVODIRECT
pH-Meter	KNICK
Eppendorf Tube transparent, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF
Sauger	MILLIPORE
Scanjet 8300	HP

Schere, groß und klein	FST
Schüttler, groß (Svip)	JOHANNA OTTO GMBH
Semidry-Transfer-Cell (Trans-Blot SD)	BIO-RAD
Skalpell	BRAUN
Spatel	MILLIPORE
Spritzflasche	VWR
Schaberlöffel	FST
Stemi SV11 (Stereolupe)	ZEISS
Sterile Werkbank	HERAEUS INSTRUMENTS
Tissue-Kosmetiktücher	WEPA
Tissue Chopper	MCILWAIN
Untersuchungs-Handschuhe, Peha-soft satin, powderfree	HARTMANN
Wärmeschrank	MEMMERT
Cellstar, 15 ml, 50 ml	GREINER BIO-ONE
LSM Axiovert 100 Microsystem	ZEISS
Axioskop 2, HBO 100	ZEISS
Macintosh-PC (OS 9.1.)	APPLE
Optilex GX 280	DELL

2.1.4 Software

Produkt	**Hersteller**
AxioVision	ZEISS
Excel 2000	MICROSOFT
Image J	WAYNE RASBAND (NIH)
LSM Carl Zeiss	ZEISS
Openlab 3.1.5	IMPROVISION

GIMP	GIMP TEAM
Graph Pad Prism 4.0	GRAPHPAD SOFTWARE INC
Windows XP	MICROSOFT
Word/Excel 2011	MICROSOFT
Mac OS X	APPLE INC.
Open Office	ORACLE

2.1.5 Lösungen und Kulturmedien

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Ansatz für 1000ml:

8g NaCl

0,2g KCL

1,44g Dinatriumhydrogenphosphat

0,2g Kaliumhydrogenphosphat

ad 1000 ml mit aqua dest. auffüllen

mit 1M HCl oder NaOH auf pH 7,4 bei Raumtemperatur einstellen

PFA (Paraformaldehyd) 4%

Ansatz für 1000ml:

40g PFA Pulver

750ml PBS

rühren und erhitzen auf 50-60°C

mit 1M HCl oder 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen

auf Eis bis Raumtemperatur kaltrühren und auf 1000ml mit PBS auffüllen .

Zur Lagerung auf -18°C einfrieren.

Präparationsmedium für Gewebekulturen:

Ansatz für 100ml (alle Komponenten steril):

50ml Minimal Essential Medium, 2-fach konzentriert

1ml Glutamin 200mM
49ml Gewebekulturwasser
durch Zugabe von steriler 1M NaOH oder 1M HCl wird das Präparationsmedium auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt.
Das Präparationsmedium wird im Kühlschrank aufbewahrt und sollte zur Präparation 4°C kühl sein.

Kulturmedium für Gewebekulturen:
Ansatz für 100ml (alle Komponenten steril):
25ml Minimal Essential Medium, 2-fach konzentriert
1ml Glutamin 200mM
580µl 7,5%ige Sodium Bicarbonat Lösung
21,17ml Gewebekulturwasser
25ml Hanks Balanced Salts (HBSS)
25ml Pferdeserum (hitzeinaktiviert)
1ml Penicillin/Streptomycin
Penicillin 10.000 U/ml
Streptomycin 10.000µg/ml
1250µl 50% Glukose
Der pH des Inkubationsmediums muß vor jedem Mediumwechsel neu eingestellt werden mit 1M NaOH oder 1M HCl, steril auf pH 7,25.

17β-Estradiol Ansatz:
2,72 mg 17 β-Estradiol in 100 ml Aqua dest (10^{-4}M),
anschließend 1:1000 mit Inkubationslmedium verdünnen (10^{-7}M Endkonzentration)

Letrozol Ansatz:
2,85 mg Letrozol in 1 ml 96% Ethanol (10^{-2} M),
anschließend mit 99ml Aqua dest verdünnen (10^{-4}M).
anschließend 1:1000 mit Inkubationsmedium verdünnen (10^{-7}M Endkonzentration)

2.2 Methoden

2.2.1 Organotypische Gewebekulturen und Immunhistochemie

2.2.1.1 Präparation des Hippocampus und Herstellung der organotypischen Gewebekulturen

Die Präparation organotypischer hippocampaler Gewebekulturen erfolgte unter semisterilen Bedingungen, an fünf Tage alten Ratten des Zuchtstammes WISTAR. Die Ratten wurden in der spezifisch pathogenfreien Einrichtung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes behandelt.

Zur Freilegung des Gehirns wurden die Ratten mit einer geraden Schere dekapitiert und das Schädeldach median-sagittal eröffnet. Die Entnahme des Gehirns erfolgte mit einem Heidemannspatel und es wurde anschließend auf einen sterilen, mit PBS getränkten Schwamm gelegt. Es folgte die Abpräparation des Hirnstamms und des Kleinhirns. Die übrig gebliebenen Hemisphären wurden sagittal getrennt und die nun sichtbaren Hippocampi wurden heraus präpariert. Nun folgte die transversale Zerteilung der einzelnen Hippocampi mit Hilfe eines Gewebehäckslers („Tissue Chopper“) in 400 µm dicke Scheiben. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgte in einer Glasschale mit 4°C kaltem Präparationsmedium eine paarweise Zuordnung benachbarter Scheiben. Danach wurden die Scheiben auf Biomembranen (Millicell CM) überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass stets die beiden Scheiben eines Paares („Schwesterkulturen“) auf unterschiedliche Membranen zu liegen kamen, die dann unterschiedlichen experimentellen Bedingungen unterworfen wurden, d. h. die eine Membran wurde der experimentellen Behandlung mit E2 oder Letrozol ausgesetzt, während die andere als unbehandelte Kontrollgruppe diente.

2.2.1.2 Inkubation der Gewebekulturen

Nun wurden unter sterilen Bedingungen die Zellkulturplatten mit je 1ml Inkubationsmedium befüllt und die Biomembranen mit den Hippocampusscheiben anschließend eingelegt.
Diese Vorkultur mit den Präparaten wurde für 4 Tage bei 37°C inkubiert, bevor der

Verumgruppe entweder Letrozol oder E2 in der Konzentration von 10^{-7}M für 4 oder 7 Tage zugegeben wurde. Der Kontrollgruppe wurde nur das Lösungsmittel zugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Betroffen davon war auch das hinzugegebene Letrozol bzw. E2, welches beseitigt und bei jedem Mediumwechsel erneut hinzugegeben wurde. Die gewählte Konzentration (10^{-7}M) 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 4-7 Tagen experimenteller Behandlung 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 -80°C gelagert.

2.2.1.3 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 equilibriert. 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. Vor der Weiterverarbeitung erfolgte ein einstündiges Auftauen und Trocknen bei Raumtemperatur.

2.2.1.4 Immunhistochemie

Die getrockneten Hippocampus-Schnitte wurden mit 4% PFA 20 Minuten lang nachfixiert. Es folgten zwei Waschgänge mit PBS à 5 Minuten. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte danach in einer Feuchtkammer 45 Minuten mit 5% NGS (in PBS) beschichtet. Es folgte die Inkubation über Nacht mit den Primärantikörpern (anti GluR1, 1: 2.000 verdünnt, bzw. anti-NR1, 1.1.000 verdünnt) und 3% NGS in PBS). Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut zweimal á 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die folgenden Schritte erfolgten weitestgehend in Dunkelheit. Nun wurden die Schnitte mit den fluoreszierenden CY3-markierten Sekundärantikörpern (goat anti rabbit IgG, 1:800 verdünnt) für 3 Stunden in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend erfolgten wieder zwei Waschgänge mit PBS á 10 Minuten. Zwischen den Waschgängen wurde eine Kernfärbung mit DAPI (0,5ug/ml) für eine Minute durchgeführt. Als letzter Schritt wurden die Objektträger in destilliertes Wasser getaucht und im Dunkeln getrocknet, um sie anschließend mit Dako Mounting Medium und einem Deckglas einzudeckeln.

2.2.1.5 Mikroskopische Messung und Auswertung

Nach abgeschlossener Immunhistochemie wurden von den Gewebekulturschnitten durch ein Laser Scanning Mikroskop (LSM Axiovert 100 Microsystem Carl Zeiss, Inc.) Aufnahmen gemacht. Der Fokus lag bei den Aufnahmen auf der CA1-Region, genauer

dem Stratum radiatum, in der sich die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen befinden. Diese Region wurde mit Hilfe eines um 63x vergrößernden Objektivs mit numerischer Apertur 1,4 unter Anregung der Wellenlänge 546 nm (für Cy3) photographiert. Zu Beginn einer Aufnahmeserie wurde eine optimale Belichtungszeit eingestellt und diese das gesamte Experiment hindurch beibehalten. Zur Auswertung der Aufnahmen wurde das Programm Openlab 3.1.5 von Improvision® eingesetzt. Dieses Programm verrechnet eine Fläche mit der enthaltenen Färbeintensität und ermittelt dadurch einen „relativen Färbeindex“ (relative staining index) für diese Fläche. Bei der Auswertung wurden immer definiert gleich große Flächen ausgewählt, d.h. es wurden in jeder Aufnahme zehn gleich große Quadrate (je 50x50 Pixel) über das Stratum radiatum gelegt und ausgewertet (Abb.7). Dadurch wurden Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Dendritenverteilung in einzenen Bereichen ausgeglichen.

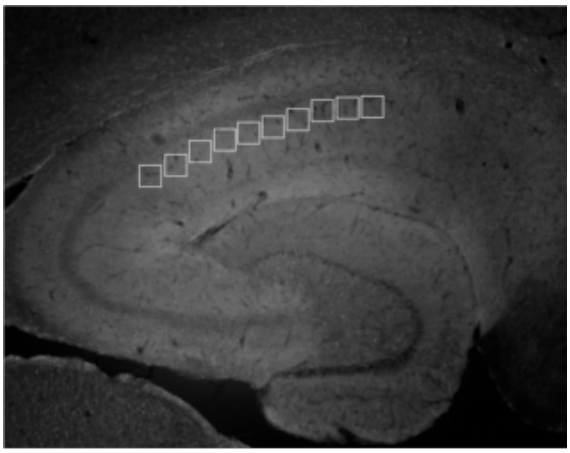


Abb. 7
Beispiel für die Flächenauswahl (weiße Quadrate) in der CA1 Region des Hippocampus. Jedes der 10 Quadrate hatte eine Größe von 50x50 Pixel.

Aus den relativen Färbeindices der zehn Quadrate eines Bildes wurde der Mittelwert errechnet. Standen von einer Gewebekultur mehrere (x; meist 2) Kryotomschnitte zur Auswertung zur Verfügung, gingen x- mal 10 Werte in diese Mittelwertberechnung ein, so dass am Ende ein repräsentativer Intensitätswert pro Gewebekultur resultierte (daraus folgt: n = Anzahl der unabhängig behandelten Gewebekulturen). Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2011 und Graph Pad, die für die Versuchsreihen den jeweiligen Mittelwert, die Standardabweichung und den Standardfehler berechneten. Erst dann erfolgte die Auflösung der Gruppen A und B, d. h. dem Untersucher wurde bekannt, welche dieser beiden Gruppen experimentell behandelt war und welche die entsprechende unbehandelte Kontrollgruppe dazu darstellte. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde danach als „100%“ gesetzt und alle anderen Werte in Relation dazu berechnet. Dadurch konnte eine Normierung verschiedener

Versuchsansätze erreicht werden. Die Ergebnisse sind daher nachfolgend als „Prozent von der Kontrolle“ mit Mittelwert und Standardfehler (SEM = standard error of the mean) angegeben und wurden graphisch mit Microsoft Excel 2011 und Open Office dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen paired-T-Test.

2.2.2 Western Blot

2.2.2.1 Behandlung der Gewebekulturen für die Western Blot-Analyse

Organotypische Gewebekulturen des Hippocampus wurden wie in 2.2.1.1 beschrieben präpariert und kultiviert. Es wurden jedoch 3-er-Gruppen gebildet, d. h. jeweils 3 benachbarte Gewebeschnitte (Schwesterkulturen) wurden auf verschiedene Biomembranen verteilt und anschließend entweder mit E2, Letrozol oder Kontrolllösung behandelt. Von jedem Tier wurde stets nur eine Membran pro Experimentgruppe belegt. Nach Ablauf der Inkubationsperiode (4 Tage Vorkultur + 7 Tage experimentelle Behandlung) wurden, da aus einer einzelnen Gewebekultur nicht ausreichend Protein für eine Analyse zu gewinnen ist, alle auf einer Biomembran befindlichen Kulturen (meist 6-7) „gepoolt“, d. h. unter lichtmikroskopischer Kontrolle mit einem kleinen Spatel von der Membran gekratzt, gemeinsam in ein Eppendorf-Röhrchen (1,5ml) überführt und in Stickstoff tiefgefroren. Somit steht in diesen Experimenten das „n“ für die Anzahl unabhängig untersuchter Biomembranen (d. h. die Gesamtheit aller Kulturen auf einer Membran), und nicht wie bei der immunhistochemischen Auswertung für einzelne Gewebekulturen. Verglichen wurden jedoch auch in dieser Versuchsreihe nur „Schwesterkulturen“.

2.2.2.2 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

versetzt, welchem zuvor Proteaseinhibitor (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 4C° zentrifugiert. Das dabei entstandene Präzipitat (Zelltrümmer, DNA) wurde verworfen. Die Protein enthaltende Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80C° gelagert.

2.2.2.3 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 µl) zur Eichung durchgeführt, wobei das Medium eine BSA-Lösung (0,5 µg/µl) war, das von den in der Standardreihe angegebenen Mengen mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt wurde. Zudem wurden pro Küvette 800 µl Aqua dest. und 200 µl Bradford-Reagenz hinzugefügt. Zum Vergleich wurden drei Küvetten mit jeweils 1 µl der Proteinlösung besetzt, ebenfalls mit Aqua dest. ad 20 µl aufgefüllt und 800 µl Aqua dest., 200 µl Bradford-Reagenz sowie 1 µl RIPA-Puffer (siehe 4.5) beigefügt. Die Extinktionswerte dieser Lösungen wurden im Photometer ermittelt und im Vergleich mit den Werten aus der Standardreihe wurde die Proteinmenge errechnet.

2.2.2.4 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 0,75mm Spalt entstand, in den zunächst das 12% Trenngel und Aqua dest. sowie nach Auspolymerisierung des Trenngels (30 min) und Verwerfen des Aqua dest. das Sammelgel eingefüllt wurde. Dabei war das Mengen-Verhältnis Trenngel zu Sammelgel ca. 5:1.

Nach Einführen der Kämme wurde auch das Sammelgel für 30 min auspolymerisiert. Anschließend wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer transferiert und die

Kammer mit 1% Lämmli-Laufpuffer aufgefüllt. Für die Analysen wurden weiterhin jeweils 20 µg Protein (Letrozol- oder E2-behandelt bzw. Kontrolle) mit 4 µl Lämmli-Probenpuffer versetzt und mit Aqua dest. (Menge abhängig von Proteinmenge pro µl Proteinlösung) auf 20 µl verdünnt. Die Proteinlösungen wurden dann in die Geltaschen einpipettiert. Bei 180 V, 150 W und 150 mA für 55 min liefen die Proteine nun aus dem Sammelgel in das Trenngel und wurden hier aufgetrennt.

2.2.2.5. 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 eingeweicht und anschließend zusammen mit der Nitrocellulose-Membran und dem SDS-Gel aus der Gelelektrophorese (beides kurz mit „Semidry"-Blot-Puffer equilibriert), wie im Schema der Abbildung 7 dargestellt, in der „Semidry-Transfer"-Zelle übereinanderliegend angeordnet. Dabei war darauf zu achten, dass die Nitrocellulosemembran auf der Seite der Anode und das SDS-Gel auf der Seite der Kathode lagen, denn nur so wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran.

Bei 35 V, 150W und 150 mA wurden die Proteine 60 min lang „geblottet". Dem Blot folgte die Färbung mit Ponceau-Rot für 1 min und die Blockierung mit Milchpulver (MP) in PBS-T für 60 min auf dem MACS-Mix-Tube-Rotator. Danach wurde die eine Hälfte (> 60 kD) der Membran (horizontale Durchtrennung auf Höhe der 60 kD Bande) bei RT über Nacht mit 3 ml des durch MP/PBS-T 1:200 verdünnten NR1-AK (aus Maus) bzw 1:1000 GluR1-AK inkubiert und die andere Hälfte (< 60 kD) bei RT über Nacht 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 5 min) entfernt und die Membranen für 50 min auf dem MACS-Mix-Tube-Rotator mit dem 2. AK inkubiert (NR1-Membran: 3 ml „goat anti mouse"-Ig-G 1:2.500 mit MP/PBS-T verdünnt; GluR1-Membran: 3 ml „donkey anti rabbit"-Ig-G

1: 2500 mit MP/PBS-T verdünnt; GAPDH-Membran: 3 ml „goat anti mouse“-Ig-G 1:2.500 mit MP/PBS-T verdünnt). Es folgten 3 Waschungen für jeweils 10 min.

2.2.2.6 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 Membran-Hälften 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.

2.2.2.7 Auswertung Western Blot

Die Auswertung der Western-Blot-Experimente erfolgte mit Hilfe des Programms „Image J“ an einem PC der Firma Dell. Dabei wurden die Bilder der Proteinbanden (GluR1, NR1, GAPDH) eingescannt, über „Image J“ die Grau-Intensitäten berechnet und in einen Zahlenwert transformiert. Alle GluR1- und NR1-Werte wurden über eine Division durch die korrespondierenden GAPDH-Werte normalisiert. Nach dieser Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrollen als „100%“ festgesetzt und alle anderen Werte in Relation dazu berechnet (siehe auch 2.2.1.5). Die resultierenden Zahlenwerte wurden danach tabellarisch angelegt und mit Open Office, Microsoft Excel und GraphPadPrism statistisch ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA (Analysis of variance) mit nachfolgendem Tukey´s-Test durchgeführt. Dargestellt sind die Resultate der experimentellen Behandlung im Folgenden als „Prozent von der Kontrolle“ (Mittelwert + Standardfehler).

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von E2 auf die Expression der Glutamatrezeptor-Untereinheiten GluR1 und NR1 *in vitro* untersucht. Dazu wurden organotypische Gewebekulturen des Hippocampus verwendet, deren endogene Estradiol-Synthese mittels des Aromatase-Inhibitors Letrozol entweder unterbunden (Reduktion von E2) oder denen das Hormon exogen zugeführt wurde (Erhöhung von E2). Zur Analyse wurden die Western-Blot-Technik und die quantitative Immunhistochemie an Gewebeschnitten eingesetzt.

3.1. Analyse der NR1- und GluR1-Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels Western Blot

Zur Überprüfung unserer Hypothese wählten wir, als orientierende Untersuchungsmethode, zuerst die Western-Blot-Technik. Dabei wurden Gewebekulturen nach 4 Tagen Vorkultur und 7 Tagen experimenteller Behandlung mit entweder E2, Letrozol oder unbehandelt als Kontrolle einer Proteinaufbereitung zugeführt (siehe 2.2.2). Anschließend wurde das Lysat auf Expression von GluR1- oder NR1-Rezeptoren untersucht.

3.1.1. Analyse der GluR1-Expression im Western Blot

In der Western-Blot Analyse mit dem GluR1-Antikörper war regelmäßig eine Bande zu erkennen, die mit ca. 108 kDa dem publizierten Molekulargewicht eines GluR1 Proteins entspricht (Wenthold et al., 1992, Abb. 8). Nach Relativierung der Intensität zur internen Expressionskontrolle von GAPDH (bei 36 kDa) ergab sich in dieser Auswertung, dass die Zugabe von E2 zum Medium einen Trend zu einer erhöhten GluR1 Expression auf 119%± 14 der Kontrollgruppe bewirkt hatte, der sich allerdings nach statistischen Auswertung als nicht signifikant erwies ($p = 0{,}24$, $n=7$, Abb. 8). Nach Letrozolbehandlung der Gewebekultur war die GluR-Expression fast unverändert (auf 108% ± 16 im Vergleich zur Kontrolle). Dieser Rückgang erwies sich ebenfalls als nicht signifikant ($p = 0{,}64$, $n=7$, Abb. 8).

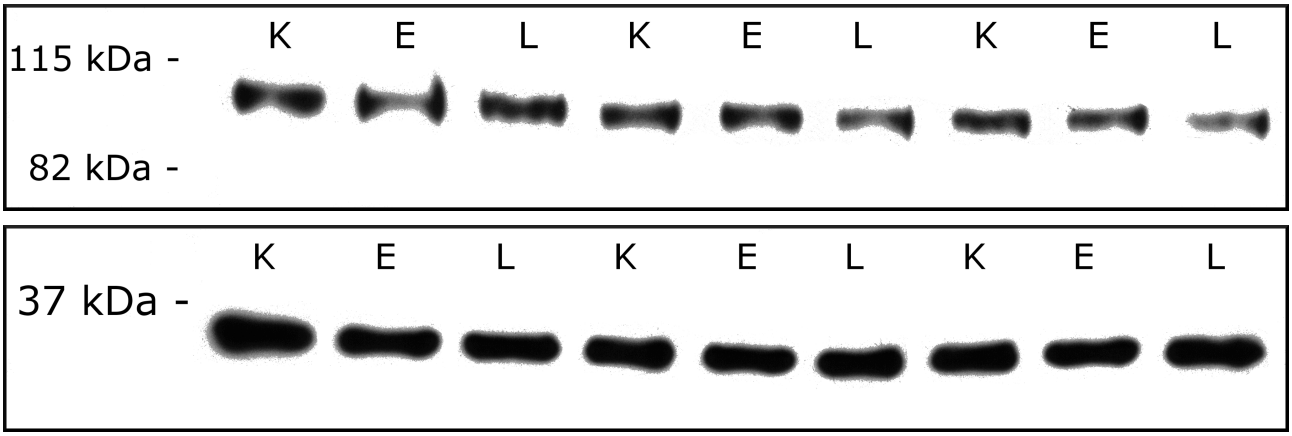


Abb. 8: Beispiel der GluR1 Western-Blot Analyse. GluR1-Bande bei ca 108 kDa, GAPDH-Bande bei ca 36kDa. K=Kontrolle, E=Behandlung mit 17-ß-Estradiol, L=Behandlung mit Letrozol

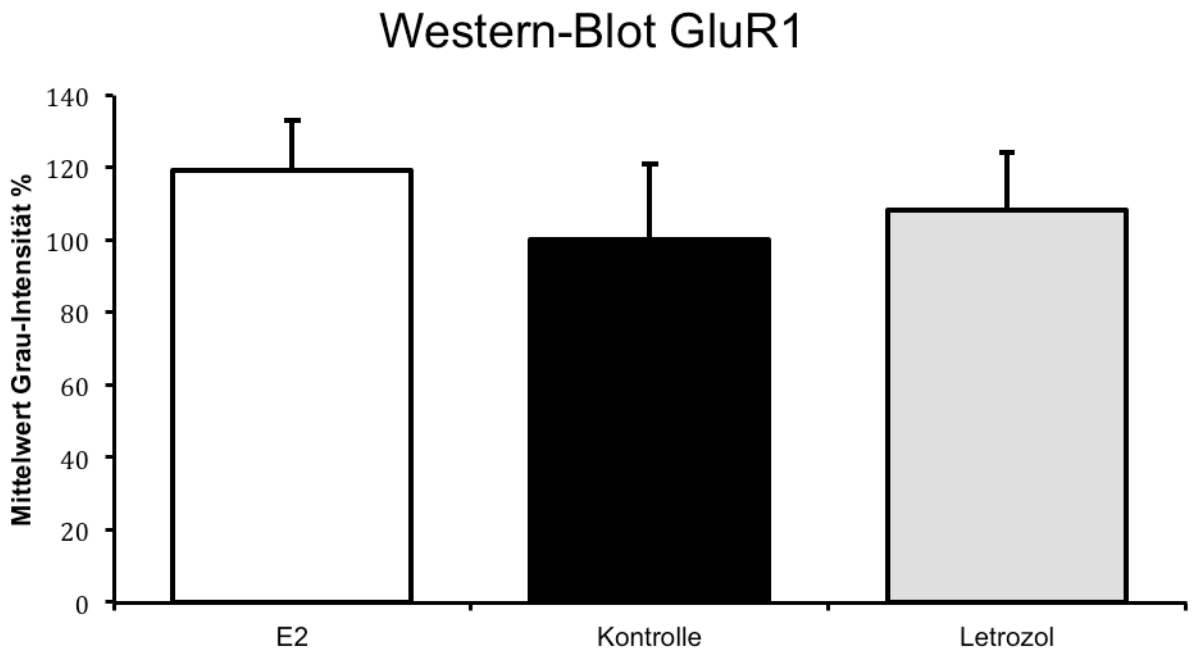


Abb. 9: Graphische Darstellung der GluR1 Western-Blot Auswertung, Berechnung der unterschiedlichen Grauwert-Intensitäten der Banden mittels ImageJ. Normalisierung durch korrespondierende GAPDH Banden. Dargestellt sind die Resultate der experimentellen Behandlung als „Prozent von der Kontrolle" (Mittelwert + Standardfehler). E2: 119% ± 14; Kontrolle: 100% ± 21; Let: 108% ± 16.

GluR1	E2	Kontrolle	Letrozol
Mittelwert	119	100	108
Standardabweichung	38	17	42
Standardfehler	14	21	16
n	7	7	7

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der GluR1 Western-Blot Ergebnisse: Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der GluR1 Expression festgestellt.

3.1.2. Analyse der NR1 Expression im Western-Blot

In der Western-Blot Analyse mit dem NR1-Antikörper zeigte sich durchgehend eine Bande bei ca. 116 kDa, die der des publizierten Molekulargewichtes von NR1 entspricht (Brose et al., 1993).

Die Ergebnisse der NR1 Western-Blots (n=7) zeigten nach E2-Behandlung einen ähnlichen Trend wie die der GluR1 Western-Blots. Es ergab sich eine vermehrte NR1 Expression unter Estradiol-Behandlung (119% ± 27 ; p = 0,43). Nach Letrozol-Behandlung fand sich allerdings eine leicht verminderte NR1 Expression unter Letrozol-Behandlung (79% ± 13 ; p = 0,42) gegenüber der Kontrollgruppe. Keiner dieser Unterschiede erreichte jedoch statistische Signifikanz.

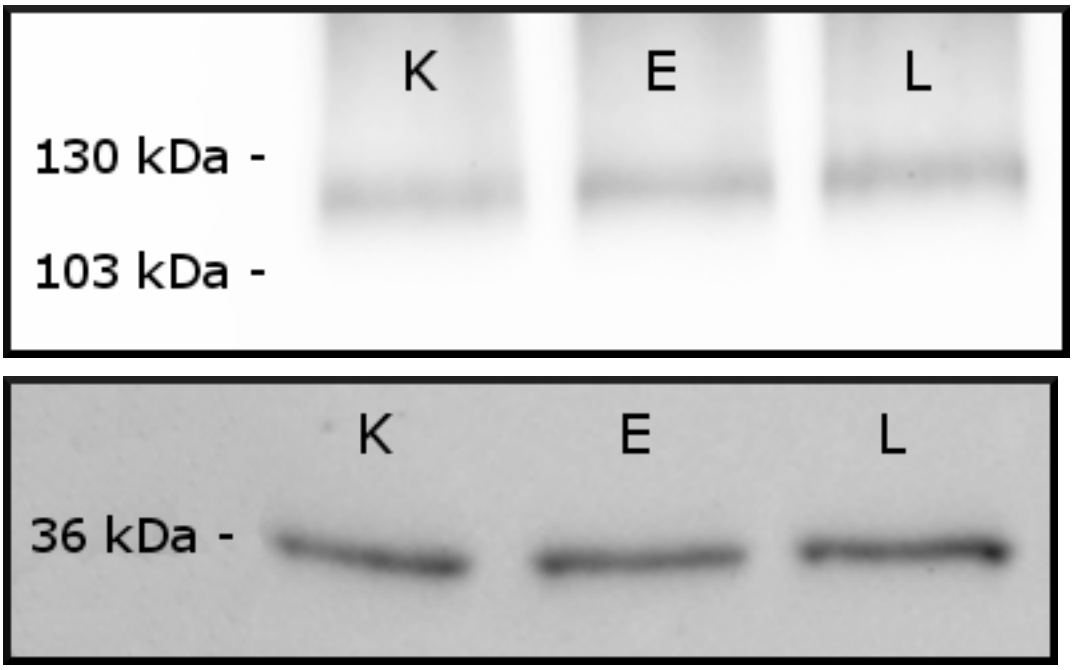


Abb. 10: Beispiel der NR1 Western-Blot Analyse. NR1-Bande bei ca 116 kDa, GAPDH-Bande bei ca 36kDa. K=Kontrolle, E=Behandlung mit 17-ß-Estradiol, L=Behandlung mit Letrozol.

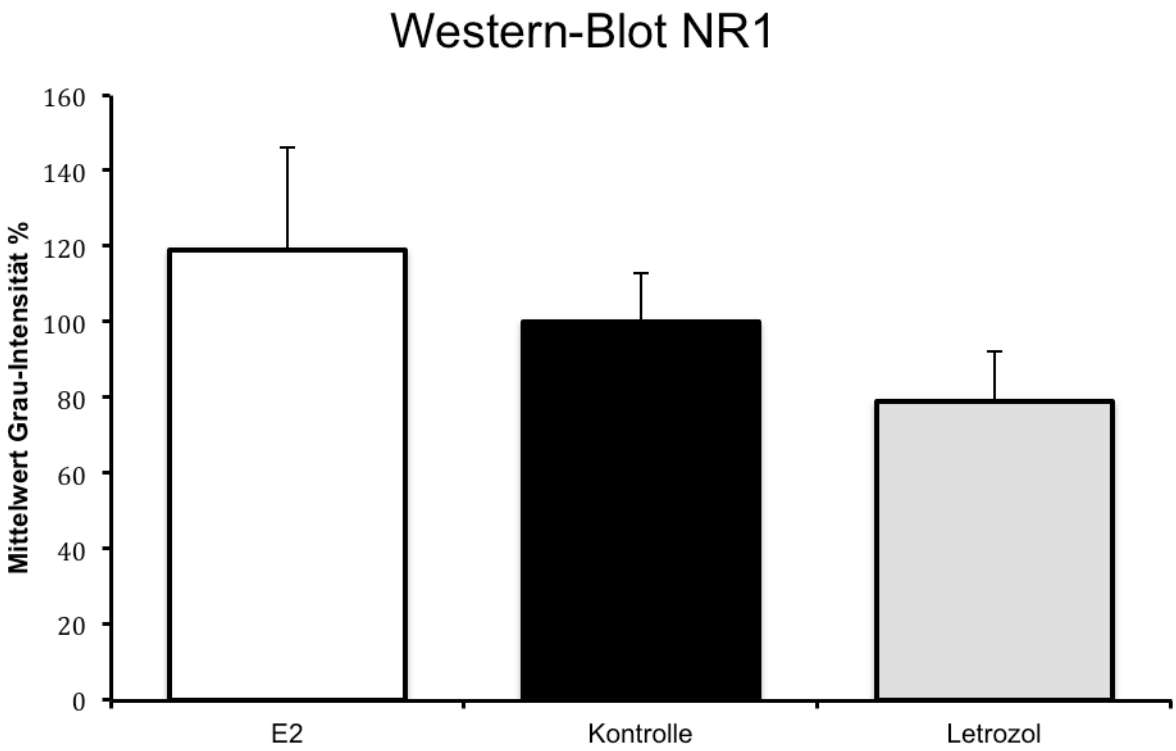


Abb. 11: Graphische Darstellung der NR1 Western-Blot Auswertung, Berechnung der unterschiedlichen Grauwert-Intensitäten der Banden mittels ImageJ. Normalisierung durch korrespondierende GAPDH Banden. Dargestellt sind die Resultate der experimentellen Behandlung als Prozent von der Kontrolle“ (Mittelwert + Standardfehler). E2: 119% ± 27; Kontrolle: 100% ± 13; Let: 79% ± 13.

NR1	E2	Kontrolle	Letrozol
Mittelwert	119	100	79
Standardabweichung	71	33	35
Standardfehler	27	13	13
N	7	7	7

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der NR1 Western-Blot Ergebnisse: Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der GluR1 Expression festgestellt.

3.2. Analyse der regionalen GluR1 und NR1 Expression nach E2- bzw. Letrozol-Behandlung mittels quantitativer Immunhistochemie

Da die Western-Blots-Analysen zwar Trends in Richtung einer Beeinflussung der Rezeptorexpression durch E2 erbrachten, jedoch zu keinen eindeutigen Resultaten führten, wurde als zweiter Schritt eine quantitative Analyse mittels Immunhistochemie durchgeführt..

3.2.1. Vergleich der regionalen Expression *in vivo* und *in vitro*

Um sicher zu gehen, daß die immunhistochemische Untersuchung der Gewebekulturen ein geeignetes Modell darstellt, wurden im Vorfeld zuerst die GluR1- und NR1-Expressionsmuster in der Gewebekultur (*in vitro)* mit den entsprechenden Expressionsmustern in Ratten vergleichbaren Alters (*in vivo)* verglichen. Dabei wurden Hippocampi von Ratten immunhistochemisch untersucht, deren Alter, dem der Gewebekulturen zum Zeitpunkt der Untersuchung (postnataler Tag 16) entsprachen.

Wie in den Abbildungen 10 A-F dargestellt, zeigte die Immunhistochemie für GluR1 und NR1 *in vitro* (Präparation p5 und 11 Tage *in vitro*, Abb. 12 E + F) und *in vivo* (p16, Abb. 12 A – D) eine vergleichbare Expression. Starke immunhistochemische Signale waren in beiden Gruppen vor allem in der CA1- und der CA3-Region zu erkennen.

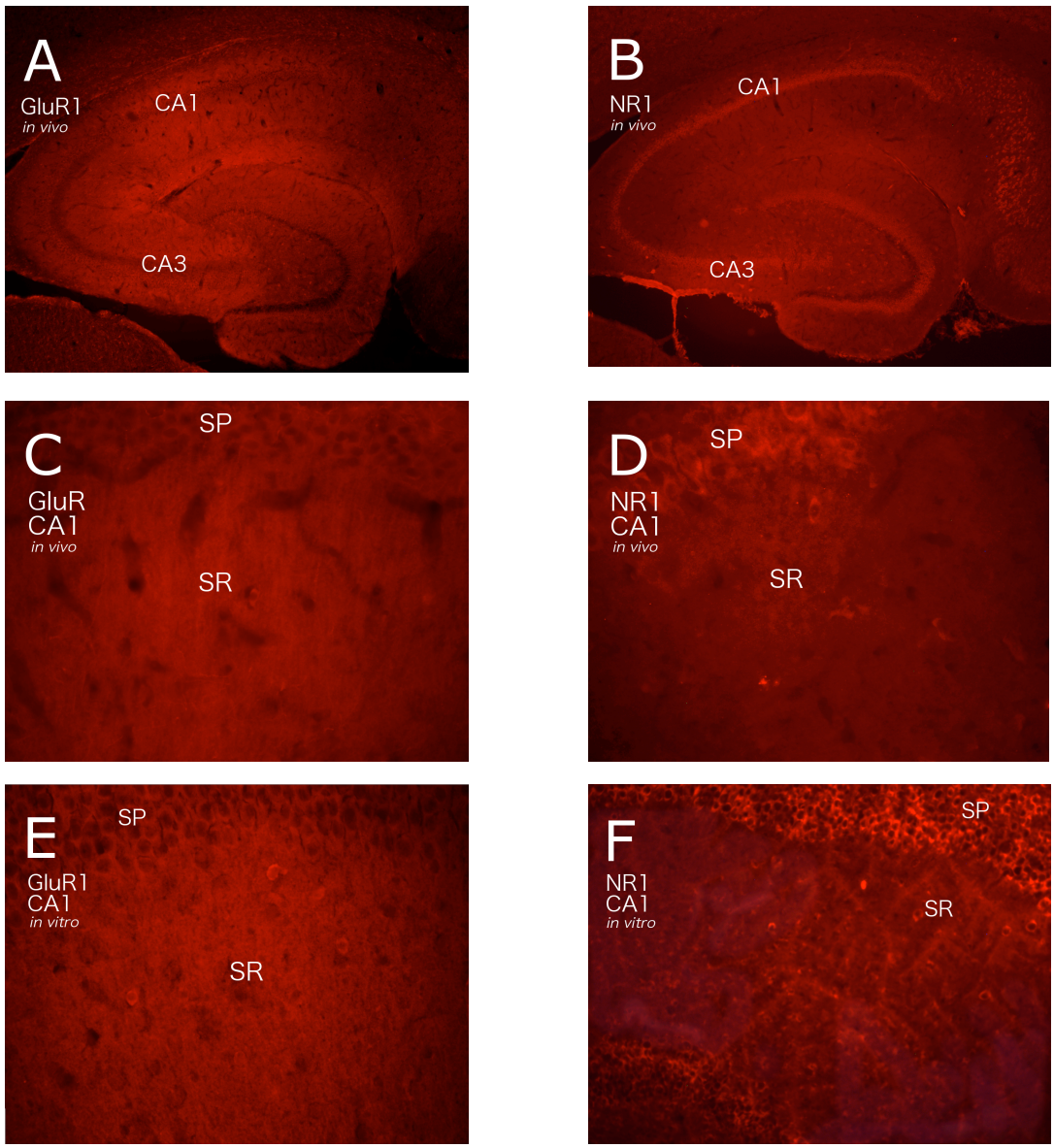
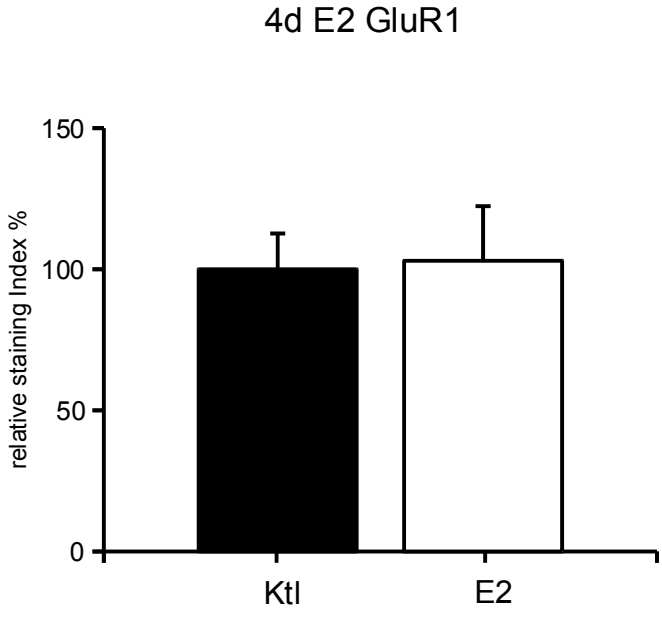


Abb. 12 : Vergleich hippocampaler Expression von GluR1 bzw. NR1 in Ratten (in vivo p16 und in vitro p5+11Tage Behandlung) :
A-D) Immunhistochemische Färbungen für GluR1 und NR1 *in vivo*, bei 50-facher Vergrößerung: GluR1-Färbung (A) und NR1-Färbung (B), bzw. bei 400-facher Vergrößerung (CA1-Region): GluR1 (C) und NR1 (D) . Beachte: GluR1 und NR1 waren stark in der CA1- und der CA3-Region exprimiert. GluR1 fand sich dabei insbesondere in der Dendritenregion der Pyramidenzellen (sr = stratum radiatum), während NR1 neben einer dendritischen Expression auch eine starke Expression in den Pyramidenzellkörpern aufwies (sp = stratum pyramidale).
E, F) Immunhistochemische Färbungen für GluR1 (E) und NR1 (F) *in vitro*, bei 400-facher Vergrösserung (CA1-Region): Wie *in vivo* zeigte GluR ein intensives Signal insbesondere in der dendritischen Region (sr), während NR1 - ebenfalls wie *in vivo* - außer in den Dendriten (Pfeile) auch stark in den Zellsomata (sp) zu sehen war.

3.2.2. GluR1 Expression in hippocampalen Gewebekulturen, immunhistochemische Auswertung

Durch die immunhistochemische Analyse der GluR-Expression in der CA1-Region wurden die Ergebnisse der Proteinanalyse durch Western Blots nur bedingt reproduziert. So war ähnlich der Western-Blot Ergebnisse nach 4 Tagen E2-Behandlung die GluR1 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nur unwesentlich erhöht (E2: 103% ± 19, Kontrolle: 100% ± 13, Abb. 13), und nach 7 Tagen E2-Stimulation sogar erniedrigt (E2: 72% ± 28, Kontrolle: 100% ± 13, Abb. 14). Mit Letrozol ergaben sich sowohl nach 4 Tagen Behandlung (Letrozol: 104% ± 9, Kontrolle: 100% ± 8, Abb. 15) als auch nach 7 Tagen Behandlung (Letrozol: 100% ± 21, Kontrolle: 100% ± 21, Abb. 16) fast unveränderte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

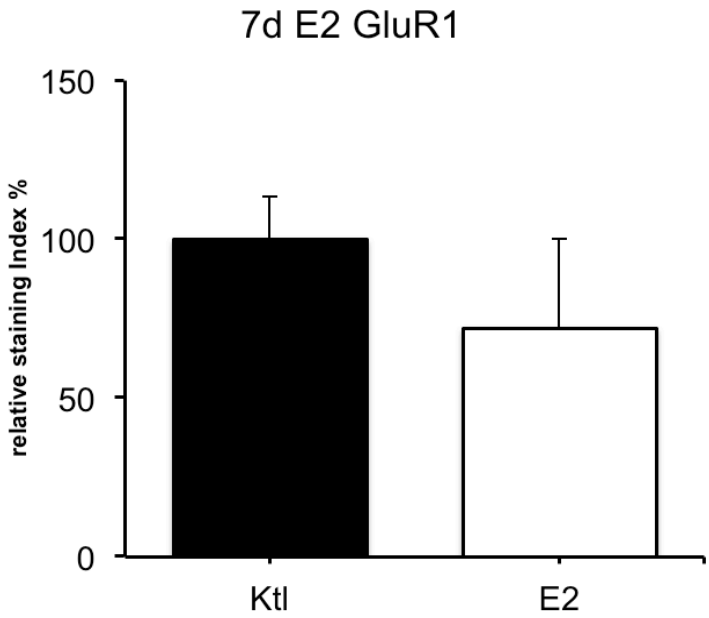
GluR1-Expressionsniveau unter Estradiol nach 4 Tagen:



GluR1, 4d E2	Kontrolle	E2
Mittelwert	100	103
Standardabweichung	45,73	69,86
Standardfehler	12,68	19,38
n	30	30

Abb. 13 und Tab. 3: Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen E2-Stimulation (MW = 103% ± 19,38; n=30) bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 12,68; n=30).

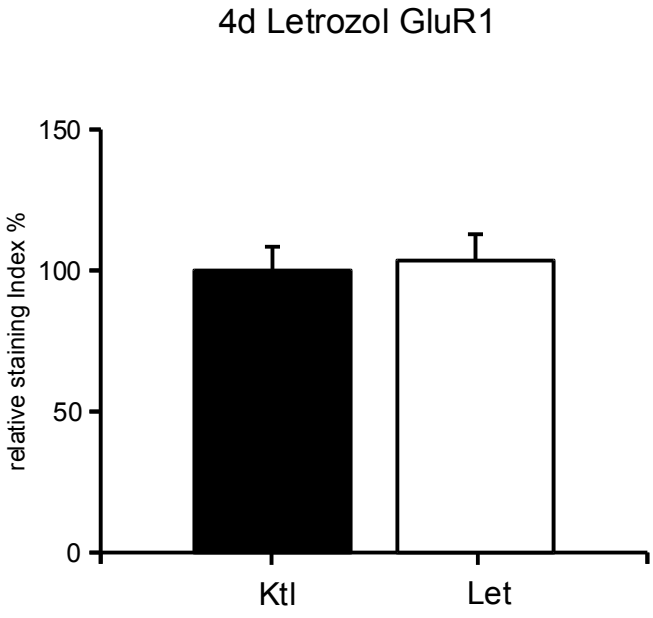
GluR1-Expressionsniveau unter Estradiol nach 7 Tagen:



GluR1, 7d E2	Kontrolle	E2
Mittelwert	100	71,8
Standardabweichung	33,6	63,5
Standardfehler	13,4	28,3
n	11	11

Abb. 14 und Tab.4: Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen E2-Stimulation (MW = 71,8% ± 28,3; n=11) bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 13,4; n=11).

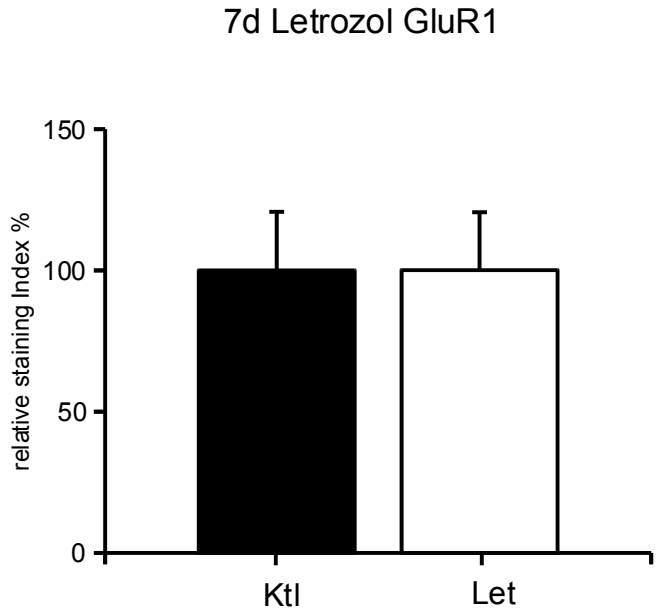
GluR1-Expressionsniveau unter Letrozol nach 4 Tagen:



GluR1, 4d Let	Kontrolle	Letrozol
Mittelwert	100	103,5
Standardabweichung	46,19	51,29
Standardfehler	8,433	9,364
n	30	30

Abb. 15 und Tab. 5: Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen Letrozol-Stimulation (MW = 103,5% ± 9,364; n=30) bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 8,433; n=30).

GluR1-Expressionsniveau unter Letrozol nach 7 Tagen:



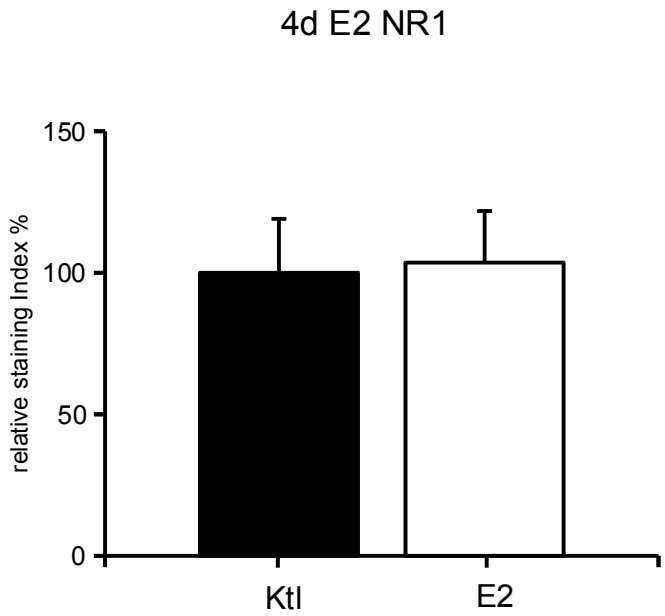
GluR1, 7d Let	Kontrolle	Letrozol
Mittelwert	100	100,1
Standardabweichung	80,43	79,46
Standardfehler	20,77	20,52
N	15	15

Abb. 16 und Tab. 6: Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen Letrozol-Stimulation (MW = 100,1% ± 20,52; n=15) bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 20,77; n=15).

3.2.3. NR1 Expression in hippocampalen Gewebekulturen, immunhistochemische Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach demselben Muster wie bei GluR1.
Es ließ sich jedoch auch hier weder eine Bestätigung der Trends aus der Western-Blot Analyse zeigen, noch eine signifikante Regulation von NR1 durch Estradiol oder Letrozol nachweisen. Nach E2 Behandlung blieb die NR1 Expression stets auf dem selben Niveau wie die Kontrollgruppe, sowohl nach 4 Tagen (E2: 104% ± 18, Kontrolle: 100% ± 19, Abb. 17) als auch nach 7 Tagen E2-Gabe (E2: 100% ± 18, Kontrolle: 100% ± 20; Abb. 18). Nach Letrozol Behandlung ergeben sich ebenfalls fast unveränderte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, sowohl nach 4 Tagen (Letrozol: 104% ± 18, Kontrolle: 100% ± 17, Abb. 19) als auch nach 7 Tagen (Letrozol: 102% ± 22, Kontrolle: 100% ± 19, Abb. 20).

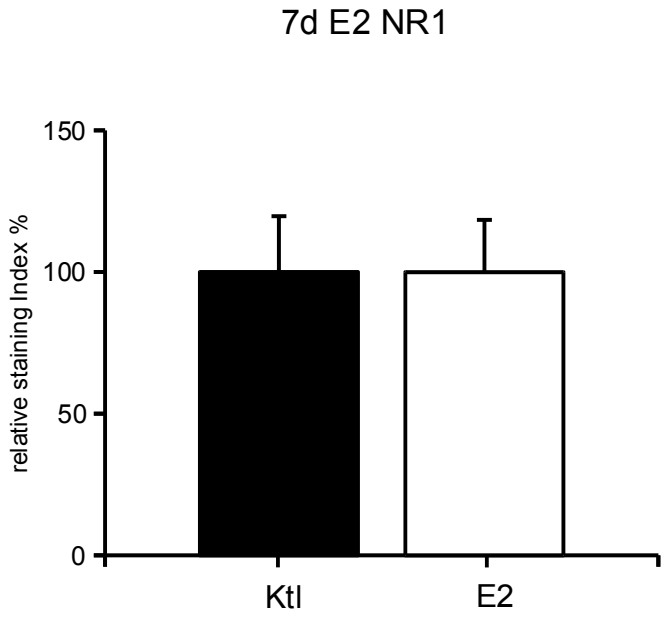
NR1-Expressionsniveau unter Estradiol nach 4 Tagen:



NR1, 4d E2	Kontrolle	E2
Mittelwert	100	103,6
Standardabweichung	71,25	68,23
Standardfehler	19,04	18,23
n	14	14

Abb. 17 und Tab. 7: Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen E2-Stimulation (MW = 103,6% ± 18,23; n=14 bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 19,04; n=14).

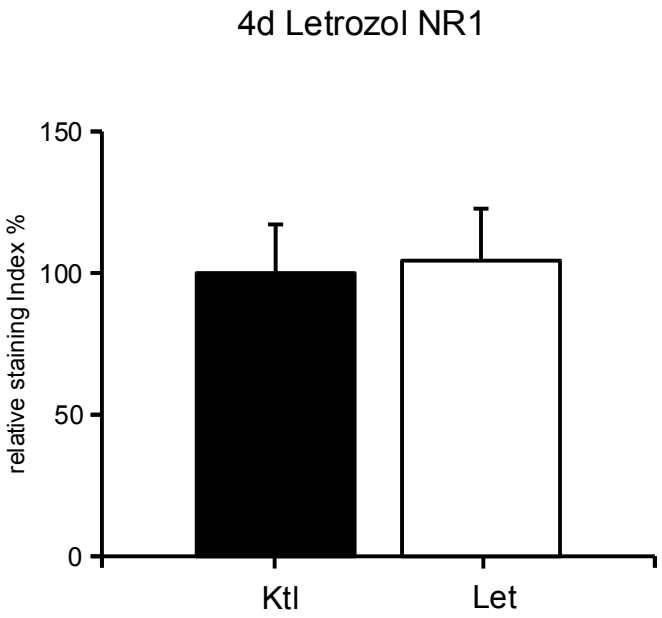
NR1-Expressionsniveau unter Estradiol nach 7 Tagen:



NR1, 7d E2	Kontrolle	E2
Mittelwert	100	99,94
Standardabweichung	83,65	78,42
Standardfehler	19,72	18,48
n	18	18

Abb. 18 und Tab. 8: Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region 7 Tagen E2-Stimulation (MW = 99,94% ± 18,48; n=18) bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 19,72; n=18).

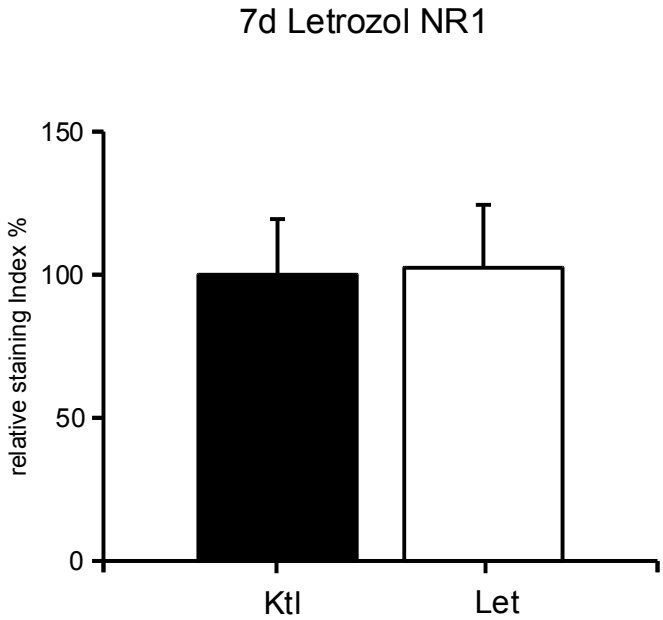
NR1-Expressionsniveau unter Letrozol nach 4 Tagen:



NR1, 4d Let	Kontrolle	Letrozol
Mittelwert	100	104,4
Standardabweichung	80,57	86,12
Standardfehler	17,18	18,36
n	22	22

Abb. 19 und Tab. 9: Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen Letrozol-Stimulation (MW = 104,4% ± 18,36; n=22) bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 17,18: n=22).

NR1-Expressionsniveau unter Letrozol nach 7 Tagen:



NR1, 7d Let	Kontrolle	Letrozol
Mittelwert	100	102,4
Standardabweichung	75,28	85,2
Standardfehler	19,44	22
n	15	15

Abb. 20 und Tab. 10:Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen Letrozol-Stimulation (MW = 102,4% ± 22; n=15) bzw. Kontroll-Lösung (MW = 100% ± 19,44; n=15).

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von 17β-Estradiol (E2) auf die Regulation der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 und der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1 im Hippocampus von Ratten zu untersuchen. Hintergrund der Fragestellung war dabei ein inzwischen mehrfach nachgewiesener Effekt von E2 auf die Ausbildung einer Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus (Cordoba Montoya & Carrer, 1997; Foy et al., 1999; Smith & McMahon, 2005; Vierk et al., 2012), bei der bekanntermaßen sowohl AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen (Malenka und Malinow, 2002; Shepherd und Huganir, 2007; Malenka und Nicoll, 1999). Zur Bearbeitung der Fragestellung wurde ein *in vitro*-Modell – die organotypische hippocampale Gewebekultur – eingesetzt, in dem die E2-Konzentration durch exogene Zugabe von E2 oder durch Inhibierung der hippocampalen (endogenen) Synthese von E2 durch den Aromatase-Inhibitor Letrozol verändert werden konnte. In den Kulturen wurde die Expression von GluR1 und NR1 nach 4 oder 7 Tagen Behandlung mittels quantitativer Western-Blot- und Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Die Resultate dieser Analysen waren jedoch nach E2- ebenso wie nach Letrozolbehandlung keine eindeutigen Hinweise auf eine veränderte Expression der beiden Rezeptoruntereinheiten.

4.1. Synaptische Plastizität und Glutamatrezeptoren

Die Langzeitpotenzierung von Neuronen im Hippocampus gilt mittlerweile als akzeptiertes Korrelat der Gedächtnisbildung (Bliss und Collingridge, 1993; Malenka and Nicoll, 1999; Lisman, 1989). Die Fähigkeit der Neurone, auf die Aktivität einzelner Synapsen zu reagieren, findet unter anderem Ausdruck in einer Erhöhung der AMPA- und NMDA-Rezeptoren und damit in einer Kapazitätserweiterung für postsynaptische Übertragung (Malenka und Malinow, 2002; Shepherd und Huganir, 2007; Malenka und Nicoll, 1999). Der Vorgang der LTP wird durch viele Faktoren beeinflusst und stellt ein großes Forschungsgebiet dar (Abraham und Williams, 2003). Inzwischen gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass auch 17β-Estradiol (E2) einer dieser Einflußfaktoren ist (Mukai et

al., 2007; Woolley, 2007). 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). Die experimentelle Erhöhung der E2 Konzentration steigert die LTP (Cordoba Montoya und Carrer, 1997; Smith und McMahon, 2005), vermutlich über eine verstärkte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Foy et al., 1999; Smith und McMahon, 2005). Im Gegensatz dazu konnte durch die Blockierung der hippocampalen E2-Synthese eine deutliche Reduktion der LTP gezeigt werden (Vierk et al., 2012), einhergehend mit einer Reduktion der NMDA-Rezeptor-Expression (Zhou et al., 2010), was darauf hindeutet, dass im Hippocampus gebildetes E2 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der LTP spielt. Neueste Erkenntnisse weisen daraufhin, daß E2 seine Wirkung an den Synapsen unter anderem über Veränderungen des Cytoskeletts ausübt (Srivastava et al., 2008; Kramar et al., 2009; Vierk et al., 2012).

Da es im Rahmen der LTP auch zu einer Zunahme der Glutamat-Rezeptoren (AMPA und NMDA) an der postsynaptischen Membran kommt, stellten wir die Hypothese auf, dass E2 eine Art „*priming*“-Effekt auf die Neurone haben könnte. Das heißt, dass es unter E2-Einfluss zu einer vermehrten *Expression* der Rezeptoren kommen könnte, die dann bei der LTP-Induktion für den schnellen Einbau in Synapsen zur Verfügung stehen. Um diese Hypothese zu testen, untersuchten wir die Expression der AMPAR-Untereinheit GluR1 und der NMDAR-Untereinheit NR1 nach E2-Zugabe oder -Reduktion. Wir entschieden uns für GluR1, da GluR1/GluR2- enthaltende AMPA-Rezeptoren durch LTP-induzierende Signale in größerem Ausmaß in die Synapse inseriert werden als z. B. aus GluR2- und GluR3-zusammen gesetzte Rezeptoren, welche ohne Zusammenhang zur LTP kontinuierlich und konstitutiv in die Membran eingebaut werden (Shi et al., 2001; Kopec et al., 2006). Im Falle der Untereinheit NR1 gab die Tatsache den Ausschlag, dass sie essentiell in jedem NMDA-Rezeptor vorkommt und daher im Fall einer erhöhten NMDA-Rezeptor-Expression zwangsläufig vermehrt exprimiert wird. Da unsere Hypothese eines Einflusses von E2 auf die *Expression* von GluR1- und NR1-Untereinheiten durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur bedingt gestützt wird, sollen im Folgenden auch alternative Erklärungsansätze diskutiert werden:

4.2. Der Einbau bereits im Cytoplasma vorliegender Rezeptoruntereinheiten in ruhende („*silent*“) Synapsen

Ein Erklärungsansatz für die teilweise widersprüchlichen Resultate innerhalb dieser Arbeit sowie im Vergleich zu anderen Studien, die E2-Effekte auf Glutamatrezeptoren beschreiben, liegt in der Möglichkeit, dass die Rezeptoren bei LTP-Induktion nicht erst durch Genexpression neu gebildet werden müssen, sondern bereits als fertige Proteine im Cytoplasma vorliegen und auf ein entsprechendes Signal hin nur noch in die Synapse verlagert werden müssen.

Der Weg der AMPA und NMDA Glutamatrezeptoren in Neuronen von der Synthese bis zur Synapse ist mittlerweile sehr gut beschrieben worden (zur Übersicht Groc und Choquet, 2006). Sie werden am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. Ihr Einbau in die Synapsen erfolgt dann entweder über bereits im Zellsoma stattfindende Exozytose in die Zellmembran, und von dort durch laterale Diffusion in die postsynaptische Membran. Oder der Weg verläuft über einen intrazellulären, vesikulären Transport in die Dendriten, wo die Rezeptoren wiederum über Exozytose in Synapsennähe in die Zellmembran eingebaut werden, von wo aus sie durch laterale Diffusion ebenfalls in die Synapsen eingegliedert werden können. Über Endo- und nachfolgende, erneute Exozytose können die Rezeptoren ihren Aufenthaltsort auch wechseln. Vieles spricht dafür, dass einige Glutamatrezeptoren, insbesondere des AMPA-Typs, dabei in der Nähe der Synapsen in Vesikeln „auf Abruf“ bereitgehalten werden und erst auf ein Signal hin (in der Regel synaptische Aktivität) in bis dahin ruhende (sogenannte „*silent*“) Synapsen eingebaut werden (Shi et al., 1999; Zhu et al., 2000; Liao et al., 2001; Malinow und Malenka, 2002; Makino und Malinow, 2009). Ein ähnlicher Ablauf könnte auch der veränderten Signalwirkung von AMPA-Rezeptoren nach E2-Gabe zu Grunde liegen. So beschrieben Srivastava et al. (2008) ein Zwei-Stufen-Modell, nach dem die E2-Gabe den Einbau von im Cytoplasma bereits vorliegenden AMPA-Rezeptoren in „*silent*“ Synapsen durch Veränderungen im Cytoskelett und die Zunahme von Dornfortsätzen („*spines*“) vorbereitet. Diese Veränderungen sind jedoch transient. Für den tatsächlichen Einbau der AMPA-Rezeptoren in die Synapsen ist zusätzlich noch eine

synaptische Aktivierung der NMDA-Rezeptoren nötig, die dann über die CaMKII den Einbau von GluR1 vermittelt. Bleibt diese aus, werden die zusätzlichen Dornfortsätze und die Cytoskelettveränderungen wieder zurückgebildet. In diesem Modell ist keine Expressionszunahme von GluR1-Untereinheiten notwendig, um E2-bedingte Effekte auf die synaptische Transmission zu erklären. So konnten verschieden Autoren (Shi et al., 1999; Malinow, 2003; Mack et al., 2001) nachweisen, dass AMPA Rezeptoren, die in der Umgebung von Synapsen nachgewiesen wurden, nach LTP Induzierung in die Synapsen diffundierten. Teilweise im Widerspruch dazu stehen jedoch die Resultate von Liu et al. (2008), die nach 5-stündiger *in vivo*-Perfusion mit E2 bzw. einem Östrogenrezeptor-Agonisten in adulten, ovariektomierten Mäusen einen Anstieg der GluR1- Expression, nicht jedoch der NR1- Expression, beobachteten.

In ähnlicher Weise wie GluR1-Untereinheiten können NMDA-Rezeptoren vermehrt in Synapsen integriert werden, ohne dass dafür eine gesteigerte Expression von NR1-Untereinheiten notwendig wäre. So fanden Smith und McMahon (2005), dass nach E2 Behandlung in CA1 Pyramidenzellen die durch NMDAR vermittelten, depolarisierenden Ströme erhöht waren. Snyder und Woolley (2011) nahmen sich daraufhin der Frage an, ob dies an vermehrter Expression oder Rekrutierung von NR-Untereinheiten lag. Im Einklang mit unseren Ergebnissen fanden sie keine Unterschiede in der Expression von NR1 nach E2-Behandlung und vermuteten, dass die vermehrten NMDA EPSPs (exitatorische postsynaptische Potentiale) auf Rekrutierung von bereits in der Zelle vorhandenen Rezeptoren, induziert beispielsweise durch Phosphorylierung (Chen et al., 2006), beruhen könnten (Snyder et al., 2011). Auch Jelks et al. (2007) konnten nach E2-Behandlung von dissoziierten hippocampalen Neuronen keinen allgemeinen Anstieg der NR1 Fraktion erkennen. Sie fanden jedoch eine Zunahme von NR1-Untereinheiten in der Synapsenregion. Auch dieses Resultat deutet eher auf eine Mobilisierung und den Einbau schon vorhandener NMDA-Rezeptoren in die Synapsen, als auf einen Expressionsanstieg hin.

Dem gegenüber stehen die Befunde von Gazzaley et al. (1996) und Adams et al. (2001, 2004), die nach E2-Behandlung jeweils einen Anstieg der NR1 Fraktion in CA1 Pyramidenzellen beobachtet haben. Allerdings wurden alle diese Untersuchungen -

ebenso wie die zuvor als kontrovers beschriebene Studie von Liu et al., 2008 - an adulten, ovariektomierten Mäusen oder Ratten durchgeführt, also in einem Entwicklungsstadium, das von dem Stadium des hier untersuchten Gewebes differiert (siehe nachfolgende Diskussion). Entwicklungsaspekte könnten hier also eine Rolle spielen. Tatsächlich fanden Adams et al., dass die NR1-Expression im Hippocampus adulter Tiere weit stärker auf E2-Applikation reagiert, als im Hippocampus von jungen Tieren (Adams et al., 2001).

4.3. Entwicklungsspezifische Aspekte der Glutamatrezeptorexpression

Eine weitere Erklärung für die, im Vergleich zu anderen Studien teilweise diskrepanten Befunde der vorliegenden Arbeit, bieten möglicherweise entwicklungsspezifische Aspekte der Glutamatrezeptorexpression. So wurden zur Durchführung dieser Studien organotypische Gewebekulturen des Hippocampus verwendet. Diese Kulturen bieten viele Vorteile. Sie erlauben eine gute Zugänglichkeit für eine pharmakologische Beeinflussung. Außerdem bleibt in ihnen der charakteristische hippocampale Gewebeverband, der insbesondere bei der Untersuchung von Vorgängen der neuronalen Plastizität wichtig ist, weitgehend erhalten (Heimrich und Frotscher, 1993). Gewebekulturen besitzen jedoch auch den Nachteil, dass sie nur in einer frühen Entwicklungsphase des Gehirns angelegt werden können (bei Ratten in der Regel während der ersten 10 Tage nach der Geburt) und nur begrenzt haltbar sind (Heimrich und Frotscher, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden die Kulturen daher aus 5 Tage alten Ratten präpariert, nach einer 4-tägigen Erholungsperiode für weitere 4 oder 7 Tage mit E2 oder Letrozol inkubiert und danach fixiert.

Glutamatrezeptoren werden jedoch entwicklungsabhängig exprimiert. So kommt es beispielsweise während der ersten Wochen der Hippocampusentwicklung in CA1 Pyramidenzellen zu einem graduellen Ersatz von NR2B- durch NR2A-Untereinheiten (Barria und Malinow, 2002; Gambrill und Barria, 2011). Die NR2A-Untereinheit ist im Vergleich zur NR2B-Untereinheit weniger responsiv auf Rezeptoraktivierung, in dem sie beispielsweise schwächer als die NR2B-Untereinheit mit der CaMKII interagiert (Barria und Malinow, 2005; Foster et al., 2010), die ihrerseits ein wichtiges Enzym bei der Vermittlung synaptischer Plastizität darstellt (Lisman et al., 2002). Im Laufe der

Entwicklung ist deshalb das Verhältnis der NMDAR Untereinheiten für die Fähigkeit der Neurone zu synaptischer Plastizität wichtig (Liu et al., 2004; Gambrill und Barria, 2011).

Die Situation in der Gewebekultur entspricht somit eher der früh-ontogenetischen (d. h. überwiegend NR2B) als der Situation in adulten Tieren (überwiegend NR2A), an denen die meisten Studien zur E2-Wirkung auf NMDA-Rezeptoren durchgeführt wurden. Der in einigen dieser Studien beobachtete Befund einer Zunahme der NR2B-Untereinheit nach E2-Gabe (Smith & McMahon, 2005) bzw. einer Abnahme nach Letrozol-Applikation (Zhou et al., 2010) ist somit in der Gewebekultur möglicherweise nicht reproduzierbar, da hier der NR2B-Gehalt bereits sehr hoch ist. Darüberhinaus muss eine Zunahme bzw. Abnahme der NR2B-Untereinheit nicht unbedingt mit einer gleichzeitig veränderten NR1-Expression einhergehen, da es sich ebenso um einen die Gesamtmenge der NMDA-Rezeptoren konstant haltende Ersetzung der NR2A- durch die NR2B-Untereinheit handeln könnte. Um zwischen diesen Möglichkeiten entscheiden zu können, war die gewählte Versuchsanordnung ungeeignet. Sie lässt nur die Aussage zu, dass die Expression der NR1-Untereinheit (und damit der Gesamtmenge der NMDA-Rezeptoren) nach 4- und 7-tägiger E2- bzw. Letrozolbehandlung in der Gewebekultur nicht signifikant verändert ist. Dies steht prinzipiell im Einklang mit den Befunden von Snyder & Woolley (2011), die in adulten weiblichen Ratten nach systemischer E2-Applikation im Hippocampus ebenfalls keine veränderte NR1-Expression fanden.
Ebenso wie bei den NMDA-Rezeptoren gibt es auch bei den AMPA-Rezeptoren Hinweise, dass während der Entwicklungsphase bestimmte Untereinheiten (z. B. GluR2 und GluR4) eine wichtigere Rolle als später im adulten Tier spielen (Zhu et al., 2000). Entwicklungsaspekte könnten also auch hier bei der Interpretation der Ergebnisse eine Rolle spielen, die beim derzeitigen Erkenntnisstand jedoch noch nicht bewertet werden kann. Weitere Untersuchungen zum Einfluss von E2 auf die Expression dieser Untereinheiten müssten dafür durchgeführt werden.

4.4. Methodische Aspekte

Sicherlich müssen auch methodische Aspekte bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse in Betracht gezogen werden. So war beispielsweise bei der Auswertung der

lokalen Expression mittels Immunfluoreszenz im Stratum radiatum der CA1-Region eine relativ hohe Variabilität der Messungen feststellbar, die teilweise auf eine unterschiedliche Verteilung der Rezeptoruntereinheiten im Stratum radiatum (1), teilweise aber auch auf Unterschiede in der Immunfärbung zwischen einzelnen Experimenten (2) zurückzuführen ist. Dieser Variabilität wurde auf verschiedene Weisen versucht zu begegnen. Der Variabilität der Rezeptorverteilung im Stratum radiatum wurde dadurch Rechnung getragen, dass 10 auszuwertende Kästchen willkürlich über das Blickfeld verteilt wurden, um somit möglichst jeden Bereich des Stratum abzudecken. Die gemessenen Werte wurden anschließend zu einem Einheitswert für jeden Gewebeschnitt gemittelt. Der Experiment-bedingten Variabilität (2) wurde dadurch Rechnung getragen, dass in jedem Experiment stets nur Gewebeschnitte von Schwesterkulturen (d. h. benachbarten Kulturpaaren) behandelt und die Resultate mittels paired t-test verglichen wurden. Abweichungen zwischen den Experimenten konnten darüber abgefangen werden. Dennoch blieb die Variabilität hoch, was die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigt. Allerdings hätten trotz der hohen Variabilität Effekte durch die E2- oder Letrozolbehandlung durch Abweichungen vom Mittelwert erkennbar sein müssen.

Ein methodischer Aspekt, der die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse ebenfalls einschränkt, ist die Dauer der Behandlung. Dies hat jedoch eine biologische Grundlage. Interessanterweise befinden sich Ribosomen, Translationfaktoren und mRNA nicht nur in den neuronalen Zellkörpern, sondern auch in Dendriten und dendritischen Dornfortsätzen (Steward und Schuman, 2001). Das bedeutet, dass die erforderlichen Ressourcen für die Proteinsynthese in den Dendriten vorhanden sind und eine Bildung neuer Rezeptoren „direkt vor Ort“ erfolgen kann. (Spacek and Harris, 1997; Gardiol et al., 1999; Kacharmina et al., 2000; Pierce et al., 2000; Job und Eberwine, 2001; Horton und Ehlers, 2003). Da die Aktivierung von Östrogenrezeptoren die Heraufregulierung synaptischer Schlüsselproteine, wie z. B. PSD-95, innerhalb von wenigen Stunden bewirkt (Srivastava et al., 2010), was einen nicht-genomischen Signaltransduktionsmechanismus vermuten lässt (Levin, 2005; Kramar et al., 2009; Matsuzaki et al., 2004), ist denkbar, dass akute Effekte einer ER-Aktivierung auf die GluR1- bzw. NR1-Expression nach 4 bzw. 7 Tagen, wie hier gewählt, nicht mehr nachweisbar waren. Allerdings bleibt die LTP z. B. nach Letrozolgabe langfristig beeinträchtigt (Vierk et al., 2012), was zur Wahl dieser Zeitpunkte

veranlasste. Dies könnte jedoch eine Folge nachgeschalteter Veränderungen, z. B. des Cytoskeletts (Kramar et al., 2009; Vierk et al., 2012), sein und schließt einen früh einsetzenden, jedoch transienten und somit hier nicht detektierbaren Einfluss von E2 bzw. Letrozol auf die Glutamatrezeptor-Expression nicht aus.

Zudem sind die teilweise mit anderen Studien im Widerspruch stehenden Ergebnisse eventuell auf unterschiedliche Zellkultivierung zurückzuführen. So ist bekannt, dass zum Beispiel in dissoziierten Zellkulturen GluR1 konstitutiv in die Synapsen gelangt, während dies in Gewebekulturen nicht geschieht (Shi et al.,1999). Desweiteren wurde die LTP seltener in dissoziierten Zellkulturen beobachtet als in Gewebekulturen (Bekkers und Stevens, 1990).

Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass bei den Western-Blot Analysen jeweils die Gesamtkultur in die Proteinauswertung gegangen ist. Bei der quantitativen Immunhistochemie wurde jedoch nur die CA1-Region auf Expressionsunterschiede untersucht. Somit könnten die Trends in der Proteinexpession der Western-Blot Analysen eventuell in anderen Regionen, wie zum Beispiel im Gyrus dentatus per quantitativer Immunhistochemie nachgewiesen werden.

Letztlich ist zu vermerken, dass neueste Erkenntnisse darauf hindeuten, dass das Geschlecht der Tiere bereits in sehr frühen Entwicklungsstadien einen signifikanten Einfluss auf die Regulation der neuronalen Plastizität durch E2 nimmt (Vierk et al., 2012). Da die endogene E2-Produktion im weiblichen und männlichen Hippocampus nicht signifikant differiert (Kretz et al., 2004), war man bislang davon ausgegangen, dass mindestens in prä- und früh-postnatalen Stadien, d. h. vor Eintreten der Pubertät, die Regulation der neuronalen Plastizität durch E2 nicht geschlechtsabhängig ist. Aus diesem Grunde wurden für diese Studie Gewebekulturen aus sowohl männlichen, wie weiblichen Ratten verwendet. Auf Grund der neuen Erkenntnisse kann jedoch ein Effekt des Geschlechts auf die Resultate nicht völlig ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass 17β-Estradiol (E2) für die neuronale Plastizität im Hippokampus eine bedeutende Funktion einnimmt und dass darüber hinaus im Hippokampus eine endogene *de novo* Estradiolbildung stattfindet. Dieses endogen gebildete Estradiol ist wesentlich an Prozessen der synaptischen Plastizität im Hippokampus beteiligt (Rune und Frotscher, 2005). Ebenfalls an der Regulation synaptischer Plastizität beteiligt sind die Glutamatrezeptoren vom AMPA und NMDA Typ. Zwischen beiden Faktoren – Estradiol und Glutamatrezeptoren – bestehen möglicherweise enge funktionelle Wechselwirkungen (Gazzaley et al., 1996; Srivastava et al., 2008; Liu et al., 2008; Waters et al., 2009).

In der vorliegender Arbeit wurde daher der Einfluß von 17β-Estradiol (E2) auf die Expression der Glutamatrezeptoruntereinheiten GluR1 und NR1 *in vitro* untersucht. Dazu wurden organotypische Gewebekulturen des Hippocampus verwendet, deren endogene Estradiol-Synthese mittels des Aromatase-Inhibitors Letrozol entweder unterbunden (Reduktion von E2) oder denen das Hormon exogen zugeführt wurde (Erhöhung von E2). Zur Analyse wurden die Western-Blot-Technik und die quantitative Immunhistochemie an Gewebeschnitten eingesetzt.

Die Resultate zeigen konnten keinen signifikanten Einfluss sowohl von exogen zugeführtem als auch endogen gebildetem E2 auf die GluR1- und NR1-Expression im Hippokampus bestätigen. So konnten weder in den Western-Blot-Analysen noch durch quantitative Immunhistochemie signifikante Veränderungen der Expression von GluR1 oder NR1 festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass eine, nach Veränderung der E2-Konzentration *in vivo* häufig beobachtete, veränderte Funktion von Glutamatrezeptoren im Hippocampus möglicherweise nicht durch direkte E2-Einflüsse auf die Rezeptorsynthese hervorgerufen wird. Modell-spezifische Aspekte (z. B. *in vitro* vs. *in vivo*) sowie Entwicklungsaspekte (früh-postnatal vs. adult) müssen bei der Interpretation der Resultate jedoch berücksichtigt werden.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Wissenschaftiche Publikationen

Abraham, W. C. and J. M. Williams (2003). "Properties and mechanisms of LTP maintenance." Neuroscientist **9**(6): 463-474.

Adams, M. M., S. E. Fink, W. G. Janssen, R. A. Shah and J. H. Morrison (2004). "Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus." J Comp Neurol **474**(3): 419-426.

Adams, M. M., R. A. Shah, W. G. Janssen and J. H. Morrison (2001). "Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 8071-8076.

Adesnik, H., R. A. Nicoll and P. M. England (2005). "Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking." Neuron **48**(6): 977-985.

Amateau, S. K., J. J. Alt, C. L. Stamps and M. M. McCarthy (2004). "Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon." Endocrinology **145**(6): 2906-2917.

Barria, A. and R. Malinow (2002). "Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses." Neuron **35**(2): 345-353.

Barria, A. and R. Malinow (2005). "NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII." Neuron **48**(2): 289-301.

Baulieu, E. E. (1997). "Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system." Recent Prog Horm Res **52**: 1-32.

Bekkers, J. M. and C. F. Stevens (1990). "Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus." Nature **346**(6286): 724-729.

Bender, R. A., L. Zhou, W. Wilkars, L. Fester, J. S. Lanowski, D. Paysen, A. Konig and G. M. Rune (2010). "Roles of 17ss-estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus." Cereb Cortex **20**(12): 2985-2995.

Benke, T. A., A. Luthi, J. T. Isaac and G. L. Collingridge (1998). "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." Nature **393**(6687): 793-797.

Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.

Brose, N., G.P. Gasic, D.E. Vetter, J.M. Sullivan, S.F. Heinemann (1993). "Protein chemical characterization and immunocytochemical localization of the NMDA receptor subunit NMDA R1." J Biol Chem. **268**(30): 22663-22671.

Chen, B. S., S. Braud, J. D. Badger, 2nd, J. T. Isaac and K. W. Roche (2006). "Regulation of NR1/NR2C N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by phosphorylation." J Biol Chem **281**(24): 16583-16590.

Chen, B. S. and K. W. Roche (2007). "Regulation of NMDA receptors by phosphorylation." Neuropharmacology **53**(3): 362-368.

Contractor, A., C. Mulle and G. T. Swanson (2011). "Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research." Trends Neurosci **34**(3): 154-163.

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): 430-438.

Cousins, S. L., M. Papadakis, A. R. Rutter and F. A. Stephenson (2008). "Differential interaction of NMDA receptor subtypes with the post-synaptic density-95 family of membrane associated guanylate kinase proteins." J Neurochem **104**(4): 903-913.

Cull-Candy, S., S. Brickley and M. Farrant (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 327-335.

Eriksson, M., A. Nilsson, H. Samuelsson, E. B. Samuelsson, L. Mo, E. Akesson, E. Benedikz and E. Sundstrom (2007). "On the role of NR3A in human NMDA receptors." Physiol Behav **92**(1-2): 54-59.

Fester, L., V. Ribeiro-Gouveia, J. Prange-Kiel, C. von Schassen, M. Bottner, H. Jarry and G. M. Rune (2006). "Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis." J Neurochem **97**(4): 1136-1144.

Fester, L., L. Zhou, C. Voets, C. Ossig, E. Disteldorf, F. Blaute, J. Prange-Kiel, D. Dudzinski, H. Jarry and G. M. Rune (2009). "The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures." Psychoneuroendocrinology **34 Suppl 1**: S123-129.

Foster, K. A., N. McLaughlin, D. Edbauer, M. Phillips, A. Bolton, M. Constantine-Paton and M. Sheng (2010). "Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation." J Neurosci **30**(7): 2676-2685.

Foy, M. R., J. Xu, X. Xie, R. D. Brinton, R. F. Thompson and T. W. Berger (1999). "17beta-

estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation." J Neurophysiol **81**(2): 925-929.

Frotscher, M., S. Zafirov and B. Heimrich (1995). "Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus." Prog Neurobiol **45**(2): 143-164.

Gambrill, A. C. and A. Barria (2011). "NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(14): 5855-5860.

Gardiol, A., C. Racca and A. Triller (1999). "Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery." J Neurosci **19**(1): 168-179.

Gazzaley, A. H., N. G. Weiland, B. S. McEwen and J. H. Morrison (1996). "Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus." J Neurosci **16**(21): 6830-6838.

Good, M., M. Day and J. L. Muir (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): 4476-4480.

Groc, L. and D. Choquet (2006). "AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse." Cell Tissue Res **326**(2): 423-438.

Heimrich, B. and M. Frotscher (1993). "Slice cultures as a model to study entorhinal-hippocampal interaction." Hippocampus **3 Spec No**: 11-17.

Heynen, A. J., E. M. Quinlan, D. C. Bae and M. F. Bear (2000). "Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo." Neuron **28**(2): 527-536.

Hojo, Y., T. A. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H. T. Ishii, H. Mukai, J. H. Morrison, W. G. Janssen, S. Kominami, N. Harada, T. Kimoto and S. Kawato (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): 865-870.

Hojo, Y., G. Murakami, H. Mukai, S. Higo, Y. Hatanaka, M. Ogiue-Ikeda, H. Ishii, T. Kimoto and S. Kawato (2008). "Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory." Mol Cell Endocrinol **290**(1-2): 31-43.

Horton, A. C. and M. D. Ehlers (2003). "Neuronal polarity and trafficking." Neuron **40**(2): 277-295.

Huh, K. H. and R. J. Wenthold (1999). "Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in

cultured cerebellar granule cells." J Biol Chem **274**(1): 151-157.

Jelks, K. B., R. Wylie, C. L. Floyd, A. K. McAllister and P. Wise (2007). "Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha." J Neurosci **27**(26): 6903-6913.

Job, C. and J. Eberwine (2001). "Localization and translation of mRNA in dendrites and axons." Nat Rev Neurosci **2**(12): 889-898.

Kacharmina, J. E., C. Job, P. Crino and J. Eberwine (2000). "Stimulation of glutamate receptor protein synthesis and membrane insertion within isolated neuronal dendrites." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11545-11550.

Kopec, C. D., B. Li, W. Wei, J. Boehm and R. Malinow (2006). "Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation." J Neurosci **26**(7): 2000-2009.

Kramar, E. A., L. Y. Chen, N. J. Brandon, C. S. Rex, F. Liu, C. M. Gall and G. Lynch (2009). "Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity." J Neurosci **29**(41): 12982-12993.

Kretz, O., L. Fester, U. Wehrenberg, L. Zhou, S. Brauckmann, S. Zhao, J. Prange-Kiel, T. Naumann, H. Jarry, M. Frotscher and G. M. Rune (2004). "Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis." J Neurosci **24**(26): 5913-5921.

Laurie, D. J. and P. H. Seeburg (1994). "Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA." J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3180-3194.

Levin, E. R. (2005). "Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen." Mol Endocrinol **19**(8): 1951-1959.

Liao, D., R. H. Scannevin and R. Huganir (2001). "Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors." J Neurosci **21**(16): 6008-6017.

Ling, W., L. Chang, Y. Song, T. Lu, Y. Jiang, Y. Li and Y. Wu (2012). "Immunolocalization of NR1, NR2A, and PSD-95 in rat hippocampal subregions during postnatal development." Acta Histochem **114**(3): 285-295.

Lisman, J. (1989). "A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9574-9578.

Lisman, J., H. Schulman and H. Cline (2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." Nat Rev Neurosci **3**(3): 175-190.

Liu, F., M. Day, L. C. Muniz, D. Bitran, R. Arias, R. Revilla-Sanchez, S. Grauer, G. Zhang,

C. Kelley, V. Pulito, A. Sung, R. F. Mervis, R. Navarra, W. D. Hirst, P. H. Reinhart, K. L. Marquis, S. J. Moss, M. N. Pangalos and N. J. Brandon (2008). "Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory." Nat Neurosci **11**(3): 334-343.

Liu, X. B., K. D. Murray and E. G. Jones (2004). "Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development." J Neurosci **24**(40): 8885-8895.

Löffler, G., P. E. Petrides and P. Löffler (1998). Biochemie und Pathobiochemie : mit 233 Tabellen. Berlin [u.a.], Springer.

Mack, V., N. Burnashev, K. M. Kaiser, A. Rozov, V. Jensen, O. Hvalby, P. H. Seeburg, B. Sakmann and R. Sprengel (2001). "Conditional restoration of hippocampal synaptic potentiation in Glur-A-deficient mice." Science **292**(5526): 2501-2504.

Makino, H. and R. Malinow (2009). "AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis." Neuron **64**(3): 381-390.

Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" Science **285**(5435): 1870-1874.

Malinow, R. (2003). "AMPA receptor trafficking and long-term potentiation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 707-714.

Malinow, R. and R. C. Malenka (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **25**: 103-126.

Matsuzaki, M., N. Honkura, G. C. Ellis-Davies and H. Kasai (2004). "Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines." Nature **429**(6993): 761-766.

Mukai, H., T. Tsurugizawa, G. Murakami, S. Kominami, H. Ishii, M. Ogiue-Ikeda, N. Takata, N. Tanabe, A. Furukawa, Y. Hojo, Y. Ooishi, J. H. Morrison, W. G. Janssen, J. A. Rose, P. Chambon, S. Kato, S. Izumi, T. Yamazaki, T. Kimoto and S. Kawato (2007). "Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons." J Neurochem **100**(4): 950-967.

Naftolin, F., K. J. Ryan, I. J. Davies, Z. Petro and M. Kuhn (1975). "The formation and metabolism of estrogens in brain tissues." Adv Biosci **15**: 105-121.

Naftolin, F., K. J. Ryan and Z. Petro (1971). "Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human foetuses." J Endocrinol **51**(4): 795-796.

Naftolin, F., K. J. Ryan and Z. Petro (1972). "Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats." Endocrinology **90**(1): 295-298.

Nayak, A., D. J. Zastrow, R. Lickteig, N. R. Zahniser and M. D. Browning (1998). "Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis." Nature **394**(6694): 680-683.

Nilsson, A., J. Duan, L. L. Mo-Boquist, E. Benedikz and E. Sundstrom (2007). "Characterisation of the human NMDA receptor subunit NR3A glycine binding site." Neuropharmacology **52**(4): 1151-1159.

Nilsson, A., M. Eriksson, E. C. Muly, E. Akesson, E. B. Samuelsson, N. Bogdanovic, E. Benedikz and E. Sundstrom (2007). "Analysis of NR3A receptor subunits in human native NMDA receptors." Brain Res **1186**: 102-112.

Pachernegg, S., N. Strutz-Seebohm and M. Hollmann (2012). "GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies." Trends Neurosci **35**(4): 240-249.

Passafaro, M., V. Piech and M. Sheng (2001). "Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons." Nat Neurosci **4**(9): 917-926.

Pierce, J. P., K. van Leyen and J. B. McCarthy (2000). "Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines." Nat Neurosci **3**(4): 311-313.

Prange-Kiel, J., L. Fester, L. Zhou, H. Jarry and G. M. Rune (2009). "Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms." J Neural Transm **116**(11): 1417-1425.

Prange-Kiel, J., L. Fester, L. Zhou, H. Lauke, J. Carretero and G. M. Rune (2006). "Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons." Hippocampus **16**(5): 464-471.

Prange-Kiel, J., H. Jarry, M. Schoen, P. Kohlmann, C. Lohse, L. Zhou and G. M. Rune (2008). "Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis." J Cell Biol **180**(2): 417-426.

Prange-Kiel, J., G. M. Rune and C. Leranth (2004). "Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats." Eur J Neurosci **19**(2): 309-317.

Prange-Kiel, J., U. Wehrenberg, H. Jarry and G. M. Rune (2003). "Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons." Hippocampus **13**(2): 226-234.

Rune, G. M. and M. Frotscher (2005). "Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity." Neuroscience **136**(3): 833-842.

Rune, G. M., C. Lohse, J. Prange-Kiel, L. Fester and M. Frotscher (2006). "Synaptic

plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus?" Neurochem Res **31**(2): 145-155.

Schmitz, D., J. Mellor, J. Breustedt and R. A. Nicoll (2003). "Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation." Nat Neurosci **6**(10): 1058-1063.

Shepherd, J. D. and R. L. Huganir (2007). "The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 613-643.

Shi, S., Y. Hayashi, J. A. Esteban and R. Malinow (2001). "Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons." Cell **105**(3): 331-343.

Shi, S. H., Y. Hayashi, R. S. Petralia, S. H. Zaman, R. J. Wenthold, K. Svoboda and R. Malinow (1999). "Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation." Science **284**(5421): 1811-1816.

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): 7780-7791.

Smith, C. C. and L. L. McMahon (2006). "Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors." J Neurosci **26**(33): 8517-8522.

Snyder, M. A., B. M. Cooke and C. S. Woolley (2011). "Estradiol potentiation of NR2B-dependent EPSCs is not due to changes in NR2B protein expression or phosphorylation." Hippocampus **21**(4): 398-408.

Spacek, J. and K. M. Harris (1997). "Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat." J Neurosci **17**(1): 190-203.

Sprengel, R., B. Suchanek, C. Amico, R. Brusa, N. Burnashev, A. Rozov, O. Hvalby, V. Jensen, O. Paulsen, P. Andersen, J. J. Kim, R. F. Thompson, W. Sun, L. C. Webster, S. G. Grant, J. Eilers, A. Konnerth, J. Li, J. O. McNamara and P. H. Seeburg (1998). "Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo." Cell **92**(2): 279-289.

Srivastava, D. P., K. M. Woolfrey, K. A. Jones, C. Y. Shum, L. L. Lash, G. T. Swanson and P. Penzes (2008). "Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14650-14655.

Srivastava, D. P., K. M. Woolfrey, F. Liu, N. J. Brandon and P. Penzes (2010). "Estrogen receptor ss activity modulates synaptic signaling and structure." J Neurosci **30**(40): 13454-13460.

Steward, O. and E. M. Schuman (2001). "Protein synthesis at synaptic sites on dendrites." Annu Rev Neurosci **24**: 299-325.

Toran-Allerand, C. D. (2004). "Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end?" Endocrinology **145**(3): 1069-1074.

Vierk, R., G. Glassmeier, L. Zhou, N. Brandt, L. Fester, D. Dudzinski, W. Wilkars, R. A. Bender, M. Lewerenz, S. Gloger, L. Graser, J. Schwarz and G. M. Rune (2012). "Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice." J Neurosci **32**(24): 8116-8126.

Warren, S. G., A. G. Humphreys, J. M. Juraska and W. T. Greenough (1995). "LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats." Brain Res **703**(1-2): 26-30.

Washbourne, P., J. E. Bennett and A. K. McAllister (2002). "Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses." Nat Neurosci **5**(8): 751-759.

Waters, E. M., K. Mitterling, J. L. Spencer, S. Mazid, B. S. McEwen and T. A. Milner (2009). "Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus." Brain Res **1290**: 1-11.

Wehrenberg, U., J. Prange-Kiel and G. M. Rune (2001). "Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase." J Neurochem **76**(6): 1879-1886.

Wenthold, R.J., N. Yokotani, K. Doi, K. Wada (1992). “Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain.” J Biol Chem. **267**(1): 501-507.

Wenthold,R.J., R.S. Petralia, J.I.I. Blahos, A.S. Niedzielski (1996). “Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons.” J Neurosci **16**(6): 1982-1989.

Williams, J. M., D. Guevremont, J. T. Kennard, S. E. Mason-Parker, W. P. Tate and W. C. Abraham (2003). "Long-term regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits and associated synaptic proteins following hippocampal synaptic plasticity." Neuroscience **118**(4): 1003-1013.

Williams, J. M., S. E. Mason-Parker, W. C. Abraham and W. P. Tate (1998). "Biphasic changes in the levels of N-methyl-D-aspartate receptor-2 subunits correlate with the induction and persistence of long-term potentiation." Brain Res Mol Brain Res **60**(1): 21-27.

Woolley, C. S. (2007). "Acute effects of estrogen on neuronal physiology." Annu Rev

Pharmacol Toxicol **47**: 657-680.

Woolley, C. S., E. Gould, M. Frankfurt and B. S. McEwen (1990). "Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons." J Neurosci **10**(12): 4035-4039.

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): 2549-2554.

Woolley, C. S. and B. S. McEwen (1993). "Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat." J Comp Neurol **336**(2): 293-306.

Zhou, L., L. Fester, B. von Blittersdorff, B. Hassu, H. Nogens, J. Prange-Kiel, H. Jarry, K. Wegscheider and G. M. Rune (2010). "Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice." Endocrinology **151**(3): 1153-1160.

Zhu, J. J., J. A. Esteban, Y. Hayashi and R. Malinow (2000). "Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity." Nat Neurosci **3**(11): 1098-1106.

Zwain, I. H. and S. S. Yen (1999). "Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain." Endocrinology **140**(8): 3843-3852.

6.2 Ergänzende Fachliteratur:

Leidenberger F, Strowitzki T, Ortmann O. 2009. Klinische Endokrinologie für Frauenärzte. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 4. Auflage.

Petrides P E, Löffler G. 1998. Biochemie und Pathobiochemie.
Springer Verlag, Berlin, 6. Korrigierte Auflage

6.3 Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Ein Vergleich der anatomischen Lage des Hippocampus, bei der Ratte(li.) und bei dem Menschen

Das Orginalbild von http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh284/213-221.htm entnommen und abgewandelt. Stand 11.11.2012.

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Hippocamus.
Schünke et al. , Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 2006, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Seite 375.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des trisynaptischen Schaltkreises Bild entnommen von http://neurosciencenews.com/neuroscience_images/rat-hippocampus-public.jpg und persönlich abgewandelt. Stand 11.11.2012

Abbildung 4: Schematische Darstellung eines aktivierten AMPA-Rezeptors
Bild entnommen von http://quizlet.com/4618036/tb-zns-biochemie-synaptische-ubertragung-flash-cards/ und persönlich abgewandelt. Stand 11.11.2012

Abbildung 5: Schematische Darstellung eines inaktiven und aktiven NMDA Rezeptor.
Bild entnommen von http://quizlet.com/4618036/tb-zns-biochemie-synaptische-ubertragung-flash-cards/ und persönlich abgewandelt. Stand 11.11.2012

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Vorgänge bei Langzeitpotenzierung.
Bild entnommen von http://quizlet.com/4618036/tb-zns-biochemie-synaptische-ubertragung-flash-cards/ und persönlich abgewandelt. Stand 11.11.2012

Abbildung 7: Beispiel für die Flächenauswahl für die Immunhistochemieauswertung in der CA1 Region des Hippocampus. M.Mechsner, Hamburg 2013

Abbildung 8: Beispiel eines Western-Blot zur Analyse der GluR1 Expression unter E2- und Letrozolbehandlung nach 7 Tagen. M.Mechsner, Hamburg 2012

Abbildung 9: Grapische Darstellung der Western-Blot Analyse von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen E2-, Letrozol-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner, Hamburg 2012

Abbildung 10: Beispiel eines Western-Blot zur Analyse der NR1 Expression unter E2- und Letrozolbehandlung nach 7 Tagen. M.Mechsner, Hamburg 2012

Abbildung 11: Grapische Darstellung der Western-Blot Analyse von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen E2-, Letrozol-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 12: A-H, Vergleich hippocampaler Expression von GluR1 bzw. NR1 bei Ratten, in 50-, und 400-facher Vergrößerung. M.Mechsner 2012

Abbildung 13: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen E2-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 14: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen E2-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 15: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen Letrozol-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 16: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen Letrozol-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 17: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen E2-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 18: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen E2-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 19: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen Letrozol-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Abbildung 20: Graphische Ergebnisdarstellung der Auswertung der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen Letrozol-Behandlung bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der GluR1 Western-Blot Ergebnisse nach 7 Tagen E2-, Letrozol-Stimulation, bzw. Kontrolle. M.Mechsner 2012

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der NR1 Western-Blot Ergebnisse nach 7 Tagen E2-, Letrozol-Stimulation, bzw. Kontrolle. M.Mechsner 2012

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen E2-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen E2-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen Letrozol-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von GluR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen Letrozol-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen E2-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 7 Tagen E2-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen Letrozol-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunhistochemie von NR1 Rezeptoren in CA1-Region nach 4 Tagen Letrozol-Stimulation bzw Kontroll Lösung. M.Mechsner 2012

7. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Rune für die Möglichkeit, die Dissertation in ihrer Abteilung durchführen zu können.

Herrn Prof. Bender danke ich für die Überlassung des Themas und seine konstruktive, unermüdliche Betreuung zu jedem Zeitpunkt.

Allen Mitarbeiten des Institutes für Neuroanatomie danke ich für die gute Zusammenarbeit in vielen Bereichen, die interessanten Seminare. Insbesondere danke ich Frau Kruck für ihre exzellente technische Assistenz.

Meiner Frau und meiner Familie danke ich für die Geduld und die liebevolle Unterstützung.

8. Eidesstattliche Versicherung

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

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....