

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Untersuchungen zu der Östrogen-abhängigen Expression von Arc/Arg3.1 in weiblichen und männlichen embryonalen hippocampalen Neuronen

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Debacher

aus Hamburg

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät Hamburg am: 21.10.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Friedrich Haag

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	2
1.1 Gedächtnis.....	3
1.2 Hippocampus	3
1.3 Langzeitpotenzierung.....	5
1.4 Arc/ Arg3.1	6
1.4.1 Aktivierung von Arc/Arg3.1	6
1.4.2 Regulation von Arc/Arg3.1.....	7
1.4.3 Funktion von Arc/Arg3.1	8
1.4.4 Arc/Arg3.1 und Östrogen.....	12
1.5 Östrogenwirkung im Gehirn	12
1.6 Letrozol	16
1.7 Fragestellung	16
2. MATERIAL	18
2.1 Arbeitsmaterial, Geräte und Software	18
2.2 Chemikalien	20
2.3 Lösungen	21
3. METHODEN.....	24
3.1 Gewinnung und Kultivierung der Dispersionskulturen.....	24
3.1.1 Präparation des Hippocampus von E18 Ratten.....	24
3.1.2 Beschichten der 24-Well mit Poly-L-Lysin	24
3.1.3 Kultivierung der Hippocampi.....	25
3.2 Western-Blot-Analyse	25
3.2.1 Stimulation der Dispersionskulturen für die Western-Blot-Analyse....	26
3.2.2 Zellaufschluss für die Westen-Blot-Analyse	26

3.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford	27
3.2.4	Herstellung der Gele	27
3.2.5	SDS-PAGE	28
3.2.6	Blottechnik.....	28
3.2.7	Entwicklung der Blots	29
3.3	Quantitativer immunzytochemischer Nachweis von Arc/-Arg3.1 in den Somata.....	30
3.3.1	Stimulation der Dispersionskulturen für die Immunzytologie	30
3.3.2	Fixierung der Dispersionskulturen für die Immunzytologie	30
3.3.3	Immunzytologie	30
3.3.4	Konfokale Mikroskopie.....	31
3.4	Auswertung	32
3.4.1	Auswertung Western-Blot.....	32
3.4.2	Auswertung der Immunzytologie	32
3.4.3	Zählung entlang der Dendriten	32
4.	ERGEBNISSE.....	34
4.1	Western-Blot-Analyse nach einstündiger Stimulation.....	34
4.2	Western-Blot-Analyse nach dreistündigen Stimulation	36
4.3	Quantitativer immunzytochemischer Nachweis von Arc/-Arg3.1 in den Somata	39
4.4	Zählung entlang der Dendriten	44
5.	DISKUSSION	47
5.1	Schnittstellen von Östrogen und Arc/Arg3.1	47
5.2	Östrogen beeinflusst die Expression von Arc/Arg3.1 in weiblichen hippocampalen Neuronen	48
5.3	Einfluss Letrozol auf die Expression von Arc/Arg3.1 in weiblichen hippocampalen Neuronen	49
5.4	Sexueller Dimorphismus	50
5.5	Einfluss von Testosteron auf den die Expression von Arc/Arg3.1	51
5.6	Kritische Beurteilung des experimentellen Modells	52
6.	ZUSAMMENFASSUNG	54

7. SUMMARY.....	56
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	57
9. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	64
9.1 Tabellenverzeichnis	64
9.2 Abbildungsverzeichnis	64
10. LEBENSLAUF	65
11. DANKSAGUNG	66
12. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AMPA-Rezeptor	α -amin-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid-Rezeptor
Arc	activity-regulated cytoskeleton-associated protein
Arg3.1	activity-regulated gene of 3.1 kb transcription length
BDNF	Brain-derived-neurotrophic factor
Ca ²⁺	Calcium
CA	Cornu ammonis
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DHPG	3,5-Dihydroxyphenylglycine
DHT	Dihydrotestosteron
E2	Estradiol
E18	Embryonalstadium 18
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
e-LTP	early-form-LTP
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	Estrogenrezeptor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GapDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GluR1	Glutamatrezeptor
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
IRES	Internal ribosomal entry site
ko	knock-out
Let	Letrozol
LH	luteinisierendes Hormon
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
Map2	Micotubule-associated-protein 2
MAPK	Mitogen-activated-Proteinkinase
Mg ²⁺	Magnesium
mGluR	metabotropic glutamate receptor
mRNA	messenger RNA
Na ⁺	Natrium
NMD	nonsense-mediated mRNA Decay
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
ODNs	antisense oligodexynucleotides
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
PKA	Proteinkinase A
PSD-95	postsynaptic density-95
SRF	serum-response-Faktor
TBS	Tris-buffered saline
wt	wildtyp

1. EINLEITUNG

Das Gehirn ist die Schaltzentrale des menschlichen Körpers. Es initiiert und koordiniert Bewegungsabläufe, verarbeitet Sinneseindrücke und ist nicht zuletzt für die Verarbeitung und Speicherung von Informationen zuständig. Hinsichtlich der Gedächtnisbildung liegt aus neuroanatomischer Sicht ein besonderes Augenmerk auf den sich im Temporallappen befindlichen Hippocampi. Für die Verarbeitung von Informationen sind ständige morphologische und funktionelle Veränderungen notwendig. Ein bedeutender Mechanismus ist die Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation, LTP*), die zur Steigerung der Funktionalität der synaptischen Übertragung beiträgt und elektrophysiologisch als Korrelat zur Gedächtnisbildung steht. Mechanismen, die auf Synapsenebene zur funktionellen Anpassung und morphologischer Veränderung der Neuronen als Antwort auf veränderte Aktivität beitragen, bezeichnet man als synaptische Plastizität.

Aufgrund ihrer Komplexität und ihrer Relevanz für diverse Krankheitsbilder, wie zum Beispiel Amnesie und Morbus Alzheimer, sind die Gedächtnisbildung und die mit ihr verbundenen molekularen und strukturellen Veränderungen Gegenstand der medizinischen und neurobiologischen Forschung.

Ein Protein, welches in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat, ist das *immiated early gene Arc/Arg3.1*. Die aktuellen Forschungsergebnisse demonstrieren, dass *Arc/Arg3.1* sowohl bei synaptischer Aktivität vermehrt exprimiert wird (Lyford et al. 1995; Link et al. 1995; Kuhl and Skehel 1998) als auch bei der Konsolidierung der LTP eine entscheidende Rolle spielt (Steward et al. 2001).

Auch dem Steroidhormon Östrogen wird in diesem Zusammenhang zunehmend eine Rolle in der Regulierung der synaptischen Plastizität zugeschrieben. So konnte nicht nur gezeigt werden, dass Östrogen die Spinedichte im Hippocampus beeinflusst, sondern auch, dass darüber hinaus hippocampale Neurone Östrogen synthetisieren (Woolley et al. 1990; Gould et al. 1990; J Prange-Kiel and Rune 2006). Ferner zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede. Östrogen scheint in weiblichen Organismen eine entscheidende Rolle für die LTP und für die Spine-Synapsen-Dichte zu spielen. Diese Bedeutung konnte in männlichen Tieren nicht nachgewiesen werden (Fester and Rune 2014).

1.1 Gedächtnis

Die Begriffe Lernen und Gedächtnis bezeichnen die Fähigkeiten, Information aufzunehmen und erlerntes Wissen wieder abzurufen. Nach Läsionen im Gehirn fallen verschiedene Formen von Gedächtnisdefiziten auf, was darauf hindeutet, dass es mehr als nur ein Gedächtnissystem gibt. Lernen und Gedächtnisbildung kann als eine lebenslange Anpassung der Verschaltung des Gehirns an die Umwelt verstanden werden. Diese Anpassung beschreibt die synaptische Plastizität. Das Gedächtnis lässt sich in deklaratives und nichtdeklaratives Gedächtnis unterteilen. Bei dem deklarativen, oder auch expliziten Gedächtnis, wird zwischen einem semantischen Gedächtnis für Faktenwissen und einem episodischen Gedächtnis für Erinnerungen unterschieden. Das nichtdeklarative, oder auch implizite Gedächtnis, beinhaltet das prozedurale Gedächtnis, welches Fähigkeiten und Verhaltensweisen abspeichert, die im Gegensatz zum deklarativen Gedächtnis nicht bewusst abgerufen werden können. Des Weiteren ist eine Unterteilung in Kurz- und Langzeitgedächtnis möglich. Es wird davon ausgegangen, dass Erinnerungen im Kurzzeitgedächtnis gespeichert und durch sogenannte Gedächtniskonsolidierung selektiv in das Langzeitgedächtnis übertragen werden. Die Gedächtniskonsolidierung erfordert allerdings nicht das Kurzzeitgedächtnis als Zwischenspeicher. Es besteht die Theorie, dass Langzeit- und Kurzzeitgedächtnis parallel existieren.

1.2 Hippocampus

Der Hippocampus liegt C-förmig an der medialen Fläche des Temporallappens und bildet den Hauptteil des Archicortex. Er ist Teil des limbischen Systems, das an allen neuronalen Vorgängen beteiligt ist, die das Verhalten bestimmen. Der Hippocampus besteht aus dem Gyrus dentatus, dem Subiculum und dem Ammonshorn (Cornu ammonis, CA), das wiederum in drei Regionen CA1 bis CA3 unterteilt wird (siehe Abbildung 1). Teilweise beschreibt die Literatur noch eine CA4-Region, die neben dem Hilus der Fascia dentata liegt.

Die Prinzipalzellen des Gyrus dentatus sind die Körnerzellen, deren Axone als Moosfasern bezeichnet werden. Diese verbinden den Gyrus dentatus mit dem Ammonshorn (CA3). Die CA1 Region besteht vorwiegend aus kleinen Pyramidenzellen, wohingegen die CA2 Region durch große Pyramidenzellen, den dominierenden Zellen des Hippocampus, gekennzeichnet ist. Die CA3 Region gliedert

sich von innen nach außen in Stratum molekulare, Stratum pyramidale mit aufgelockerten großen Pyramidenzellen und den Oriens.

Abbildung 1: Hippocampusschnitt in Nissl-Färbung, Quelle:
www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/hippocampus/5439 (Stand 28.09.2017)

Innerviert wird der Hippocampus von der Area entorhinalis, dem Thalamus, dem Septum und dem Gyrus cinguli. Den Hauptverschaltungsweg des Hippocampus bildet ein exzitatorischer, trisynaptischer Kreislauf. Ein Axonbündel, der sogenannte Tractus perforans, überträgt Informationen von dem entorhinalen Cortex in den Hippocampus. Diese Axone ziehen zum Gyrus dentatus und bilden mit den Neuronen Synapsen (1.Synapse) aus. Von dort aus ziehen die als Moosfaser bezeichneten Axone in die CA3 Region (2.Synapse) und bilden dort sogenannte Schaffer-Kollaterale aus, die in die CA1 Region projizieren (3.Synapse).

Die Efferenzen verlassen den Hippocampus über den Fornix. Der Fornix bildet das Crus fornicus und teilt sich anschließend an der Commissura anterior in den vorderen Teil, der Columna anterior fornicis, und den hinteren Teil, der Columna posterior fornicis. Erstere zieht unter anderem zu den Nuclei spetales und zum vorderen Hypothalamus. Die größere Columna posterior fornicis projiziert vor allem zur Corpora mamillaria, zum Nucleus ventromedialis hypothalami sowie dem Mesencephalon.

Der Hippocampus ist Teil des Papez-Neuronenkreises. In diesen gelangen die Erregungen vom Ammonshorn über den Fornix zum Corpus mamillare. Von dort aus zieht der Tractus mamillothalamicus (Vicq d'Azyr-Bündel) zum Nucleus anterior des Thalamus, in dem die Umschaltung über die Radiatio thalamocugularis zum Gyrus

cinguli erfolgt. Der Kreis schließt sich durch die Verbindung vom Gyrus cinguli zurück zum Hippocampus.

Dem Hippocampus wird die Fähigkeit zugeschrieben, neue Informationen aufzunehmen und in neokortikale Bereiche zu transferieren. So trägt der Papez-Neuronenkreis zum Transfer von Informationen vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis bei (Bailey and Kandel 1993).

Der früheren Vorstellung widersprechend, dass von Geburt an schon alle Neuronen vollständig ausgebildet sind, konnte im Hippocampus postnatal Neurogenese nachgewiesen werden (Altman et al. 1965), so dass in dieser Region durch stetig ablaufender Synaptogenese synaptische Plastizität ermöglicht wird.

Aufgrund seines einfachen Aufbaus lässt sich der Hippocampus in Form von Zell- und Gewebekulturen bei guter Erhaltung der Gewebearchitektur kultivieren (Raineteau et al. 2004). Er eignet sich daher gut für die Erforschung der synaptischen Übertragung sowie synaptischer Plastizität und wird somit in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis des Einflusses von Östrogen auf die Bildung von Arc/Arg3.1 genutzt.

1.3 Langzeitpotenzierung

Die Langzeitpotenzierung ist ein zelluläres Korrelat des Lernens und der Gedächtnisbildung (Bliss and Collingridge 1993; Martinet al. 2000). Bereits 1949 konnte Hebb diesen Mechanismus mit der Verarbeitung von Gedächtnisinhalten in Verbindung bringen (Hebb 1949). Untersuchungen zeigen, dass langanhaltende Formen der LTP und des Gedächtnisses auf der Synthese von mRNA und Proteinen beruhen und eine strukturelle und molekulare Neuordnung der Proteine an den Synapsen erfordern (Goelet et al. 1986; Sheng et al. 2002; Pocklington et al. 2006).

Im Jahre 1973 konnten Bliss und Kollegen zeigen, dass durch eine kurze hochfrequente elektrische Stimulation einer exzitatorischen Bahn zum Hippocampus die Stärke der aktivierten Synapsen für eine längere Zeit erhöht wird. Damit konnten sie erstmalig den Effekt der Langzeitpotenzierung nachweisen (Bliss and Gardner-Medwin 1973). Später wurde dann auch der Begriff der *long-term depression* (LTD) geprägt. Hierbei kommt es zu einer Abschwächung der Signalübertragung. Die neuronalen Antworten im Hippocampus können in beide Richtungen modifiziert werden. LTP und LTD gelten heutzutage als wesentliche Mechanismen der deklarativen Gedächtnisbildung.

Die Übertragung exzitatorischer Signale wird im Hippocampus über die Glutamat-Rezeptoren α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid-Rezeptor (AMPA-

Rezeptor) und N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) vermittelt. Na⁺-Einstrom durch den AMPA-Rezeptor sorgt für ein exzitatorisches, postsynaptisches Potenzial (EPSP) in der Postsynapse. Durch ausreichende Depolarisation werden die an der postsynaptischen NMDA-Rezeptoren gebundenen Mg²⁺-Ionen gelöst, wodurch die Rezeptoren durchlässig für Ca²⁺-Ionen werden, so dass es zu einem Ca²⁺-Einstrom kommt. Dieser postsynaptische Anstieg von Ca²⁺-Ionen führt zu einer starken Depolarisierung im Zellinneren und steht in einem engen Zusammenhang mit der LTP. So zeigt sich, dass nach pharmakologischer Blockierung der NMDA-Rezeptoren keine LTP zu beobachten ist. Der Ca²⁺ Anstieg bewirkt, dass die Protein-C-Kinase und die Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2 aktiviert werden. Die starke Depolarisierung triggert eine Signalkaskade, die bewirkt, dass neue AMPA-Rezeptoren exprimiert und einlagert werden (Xia et al. 1996). Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass sich die Struktur der Synapsen verändern, indem diese vor allem postsynaptisch dendritische Dornfortsätze und neue synaptische Kontakte zu Axonen, sogenannte *Spines*, ausbilden. Die Langzeit-Potenzierung gilt damit als Grundlage für die Verarbeitung von Informationen und als grundlegender Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisbildung (Muller et al. 2000; Martin et al. 2000).

1.4 Arc/ Arg3.1

Das Langzeitgedächtnis als eine Form der anhaltenden synaptischen Plastizität, einschließlich der LTP, erfordert die Veränderung der molekularen Zusammensetzung und der Struktur der Neuronen (Goelet et al. 1986; M. Sheng and Greenberg 1990). Diese Veränderung ist abhängig von der Genexpression verschiedenster Proteine. Ein Protein, das in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren an immer mehr Bedeutung gewonnen hat, ist das immediate *early gene* *Arc/Arg3.1*. *Arc/Arg3.1* wurde 1995 zeitgleich von Dietmar Kuhl („*activity-regulated gene of 3.1 kb transcription length*“ (*Arg3.1*)) und Paul Worley („*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*“ (*Arc*)) erstmalig beschrieben (Link et al. 1995; Lyford et al. 1995).

1.4.1 Aktivierung von Arc/Arg3.1

Die Expression von *Arc/Arg3.1* wird stimuliert durch synaptische Aktivität, ausgelöst unter anderem durch Applikation von Drogen, Lernen und Kontext bedingter Angstkonditionierung (Czerniawski et al. 2011; Kelly and Deadwyler 2002; Steward et al. 1998).

Sowohl *Arc/Arg3.1*-mRNA als auch *Arc/Arg3.1*-Protein werden in die Dendriten transportiert und akkumulieren insbesondere in Bereichen synaptischer Aktivität (Kuhl and Skehel 1998; Link et al. 1995; Lyford et al. 1995, Steward et al. 2001, Steward et al. 1998; Moga et al. 2004; Rodriguez et al. 2005). Dieser Mechanismus unterstreicht die bedeutende Rolle, die *Arc/Arg3.1* für die Konsolidierungsphase der LTP hat. *Arc/Arg3.1* ist darüber hinaus im Nucleus lokalisiert, wo es u.a. die Transkription des Glutamatrezeptors GluR1 beeinflusst. (Korb et al. 2013).

Waltereit et al. und Park et al. konnten nachweisen, dass eine Steigerung der *Arc/Arg3.1*-Expression sowohl durch die Aktivität des *metabotropic glutamate receptors* (mGluR), als auch die Applikation des Wachstumsfaktors *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) vermittelt wird (Waltereit et al. 2001; Park et al. 2008)

1.4.2 Regulation von *Arc/Arg3.1*

Die Expression von *Arc/Arg3.1* ist abhängig von der Synapsenaktivität und weist einen zeitlich mehrphasigen Verlauf auf. Ein basaler Level von *Arc/Arg3.1*-mRNA und Proteinen ist auch unter Normalbedingungen nachzuweisen. Der Proteinlevel steigt nach synaptischer Aktivität als Folge von lokaler Translation an den Synapsen an (Steward and Worley 2002). Ein zweiter Anstieg erfolgt etwa 5 bis 30 Minuten nach synaptischer Aktivität durch den Transport weiterer *Arc/Arg3.1*-mRNA und Proteine von dem Zellkern in die aktive Synapse. Dabei scheint die *Arc/Arg3.1*-Expression engmaschig reguliert zu sein. Der genaue Signalweg, der zur Transkription und Translation von *Arc/Arg3.1* führt, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Die Arbeitsgruppe von Waltereit konnte 2001 zeigen, dass sowohl die Proteinkinase A (PKA) als auch die Mitogen-activated-Proteinkinase (MAPK) bei der Induktion der Expression von *Arc/Arg3.1* beteiligt sind (Waltereit et al. 2001). Über Stimulation des NDMA-Rezeptors wird *Arc/Arg3.1* sowohl durch Calcium als auch durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) induziert und erfordert dabei die Aktivität der PKA und der MAPK (Waltereit et al. 2001). Transkriptions *Enhancer*, wie *serum-response-*

Faktoren (SRF), konnten in der Promoter Region von *Arc/Arg3.1* nachgewiesen werden (Waltereit et al. 2001).

Die Translation von *Arc/Arg3.1* wird in zweierlei Hinsicht streng reguliert. Einerseits durch die Initiation der Translation. Dabei liegt ein besonderer Fokus auf dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E), welcher durch Bindung an die „cap“-Struktur des 5´-Endes der mRNA die Bildung eines Preinitiations-Komplexes fördert (Bramham et al. 2010). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass *Arc/Arg3.1*-mRNA eine *internal ribosomal entry site* (IRES) besitzt. Als IRES wird eine spezifische Sekundärstruktur der mRNA bezeichnet, die durch Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen induziert. Dadurch kann die Translation auch von der Mitte einer mRNA aus unmittelbar gestartet werden. Bei allgemein reduzierter Proteinbiosynthese könnte auf diese Weise die Translation einer Teilmenge der mRNA, darunter *Arc/Arg3.1*, kontrolliert werden (Costa-Mattioli et al. 2009).

Andererseits ist die Translation von *Arc/Arg3.1* beeinflusst durch die Phosphorylierung des Elongationsfaktors eEF2. Dieser ist bekannt dafür, die Proteinbiosynthese im Rahmen der LTP zu hemmen, aber paradoxerweise die Translation von *Arc/Arg3.1* zu fördern (Chotiner et al. 2003).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Proteine, die pro mRNA gebildet wird, begrenzt ist, da die *Arc/Arg3.1*- mRNA einem *nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) unterliegt (Giorgi et al. 2007). Daraus kann geschlossen werden, dass dieser Mechanismus als Bremse in der Proteinbiosynthese fungiert und auf diese Weise die *Arc/Arg3.1*- Expression präziser kontrolliert werden kann.

Die Arbeitsgruppe um Giorgi fand außerdem heraus, dass eine starke Assoziation zwischen *Arc/Arg3.1*-mRNA und dem eukaryotischen Translation Initiationsfaktor 4AII besteht (Giorgi et al. 2007). *Arc/Arg3.1* unterliegt des Weiteren der schnelle Ubiquitin- sowie der UB3a- vermittelten Degradation (Greer et al. 2011).

1.4.3 Funktionen von *Arc/Arg3.1*

Nicht nur die Expression von *Arc/Arg3.1* scheint streng reguliert zu sein, sondern auch dessen Aktivität. Die Vielzahl von potenten *Arc/Arg3.1*-Aktivatoren und die Beteiligung verschiedener Signalkaskaden lässt vermuten, dass mehrere fein aufeinander abgestimmte Signalwege die Aktivität von *Arc/Arg3.1* steuern (Shepherd and Bear 2011).

Hinsichtlich der Expression zeigte sich, dass die *Arc/Arg3.1*-Expression im Gyrus dentatus durch die gleichen Stimulationsmuster induziert wird, die auch bei der Induktion der LTP zu beobachten sind. (Waltereit et al. 2001; Link et al. 1995; Lyford et al. 1995). So konnte dargestellt werden, dass die Blockade der *Arc/Arg3.1*-Expression in antisense Experimenten zu einem Verlust der LTP führt und das hippocampale Lernen beeinträchtigt (Guzowski et al. 2000).

Übereinstimmend mit der beobachteten Beeinträchtigung der Gedächtnisbildung fand man auch eine Abhängigkeit zwischen *Arc/Arg3.1* und der synaptischen Plastizität (Guzowski et al. 2000; Plath et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Plath konnte zeigen, dass biphasische Veränderungen der hippocampalen LTP im Gyrus dentatus *in vivo* und in der Area CA1 *in vitro* vorliegen. In *Arc/Arg3.1*-knock-out (ko) Mäusen konnte eine Steigerung der Amplitude der early-form-LTP (e-LTP) um 50 % im Vergleich zu wildtyp (wt) Mäusen festgestellt werden. Dabei hatte *Arc/Arg3.1* weder Auswirkungen auf die basale synaptische Übertragung, die neuronale Struktur, die Induktion der synaptischen Plastizität, noch auf das Kurzzeitgedächtnis (Plath et al. 2006).

Arc/Arg3.1-ko Mäuse zeigen sowohl im Gyrus dentatus als auch in der CA1 Region von hippocampalen Schnittkulturen eine Steigerung der early-phase LTP, wohin gegen die late-phase LTP blockiert ist (Plath et al. 2006). Zusätzlich wurde paradoxerweise gefunden, dass *Arc/Arg3.1* ebenfalls essentiell für die anhaltende LTD ist. Die NMDA Rezeptor-abhängige LTD, der Schaffer collateral-CA1 Synapsen, ist ebenfalls in den hippocampalen Schnittkulturen (Slices) reduziert. Park konnte 2008 nachweisen, dass in *Arc/Arg3.1*-ko Mäusen die mGluR LTD Expression beeinträchtigt ist (Park et al. 2008). Des Weiteren zeigte sich, dass sich die *Arc/Arg3.1*-Expression durch chemische (DHPG, 3,5-Dihydroxyphenylglycine) und elektrische Stimulationen induzieren lässt, welche genutzt werden, um LTD zu evozieren (Park et al. 2008). Es scheint, dass *Arc/Arg3.1* an beide Richtungen der synaptischen Plastizität, sowohl an der LTP als auch an der LTD, beteiligt ist. Sowohl LTD als auch die homöostatische Plastizität im Hippocampus scheinen entscheidend abhängig von der *Arc/Arg3.1*-vermittelten Endozytose von AMPA-Rezeptoren (Bramham et al. 2008). Waung et al. zeigten, dass *Arc/Arg3.1* die LTD direkt durch die Endozytose von surface AMPA-Rezeptoren vermittelt, da hierdurch die synaptische Stärke verringert wird (Waung et al. 2008). Hinsichtlich des molekularen Mechanismus konnten Worley und Kollegen nachweisen, dass *Arc/Arg3.1* mit Endophilin und Dynamin interagiert und Endosomen bildet. Eine gesteigerte Expression von *Arc/Arg3.1* erhöht so die Rate der AMPAR

Endozytose und reduziert auf diese Weise die Menge an oberflächlichen AMPAR. Dies wird als AMPAR Trafficking bezeichnet. Dabei scheint Arc/Arg3.1 der limitierende Faktor zu sein, da die alleinige Überexpression von Endophilin nicht zu einem AMPAR Trafficking führt. Genauere molekulare Mechanismen, die zum selektiven Transport von AMPA-Rezeptor beitragen, sind bislang unbekannt; eine direkte Bindung von Arc/Arg3.1 mit Endophilin und Dynamin konnte nicht nachgewiesen werden.

2012 wurde die Hypothese des „*inverse*“ *synaptic tagging* aufgestellt. Okuno und Kollegen zeigten, dass Arc/Arg3.1 mit einer hohen Affinität mit CaMKII β interagiert und so in inaktiven Synapsen akkumuliert, die zuvor stark aktiviert wurden (Okuno et al. 2012). Dadurch würde eine zuvor stark aktive Synapse durch AMPA-Rezeptor *Trafficking* geschwächt werden und die Stärkung einer „schwachen“ Synapse verhindert werden. Diese Hypothese bringt die Gegensätze von Schwächung der Synapse durch AMPA Rezeptor-Endozytose und die Notwendigkeit von Arc/Arg3.1 für die Festigung der synaptischen Plastizität in Einklang. Dieser Mechanismus wird als „*Homeostatic scaling*“ bezeichnet (Peebles et al. 2010).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Arc/Arg3.1 die Spinedichte steigert und die Spine-Morphologie beeinflusst, indem es den Anteil an dünnen Spines erhöht (Peebles et al. 2010). Besonders an den dünnen Spines konnte beobachtet werden, dass die *surface* GluR Internalisierung reduziert ist. Darüber hinaus zeigte sich, dass gezielte Mutationen von Arc/Arg3.1, welche die Bindung an Endophilin 3 und somit die Endozytose von AMPA-Rezeptor Endozytose hemmen, nicht zu einer Steigerung des Anteils an dünnen Spines führt. Dieses lässt vermuten, dass die Arc/Arg3.1-vermittelte AMPAR Endozytose die Veränderung der Spine Morphologie erleichtert. Somit würde Arc/Arg3.1 ein Gleichgewicht zwischen dem „*synaptic Downscaling*“ und der Steigerung der synaptischen Plastizität herstellen (Peebles et al. 2010).

Dazu passend haben Bramham und Kollegen belegt, dass die anhaltende Translation von neu induzierter Arc/Arg3.1-mRNA notwendig für die Phosphorylierung und stabile Erweiterung des F-actin Zytoskeletts ist. Dieser Mechanismus ist grundlegend für die Festigung der LTP im Gyrus dentatus bei Ratten (Bramham et al. 2008).

In einer Reihe von Verhaltensstudien konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Arc/Arg3.1 insbesondere Wirkung auf das Langzeitgedächtnis hat. *Arc/Arg3.1*-ko Mäuse scheiterten in Experimenten daran, langanhaltende Erinnerungen von implizierten und explizierten Lernaufgaben aufzubauen, trotz intaktem

Kurzzeitgedächtnis. Sie zeigten biphasische Veränderungen des hippocampalen Langzeit-Potentials im Gyrus dentatus und der CA1 Region mit einer Steigerung der frühen (*early-phase*) und dem Ausbleiben der späten Phase (*late-phase*) (Plath et al. 2006). Dabei zeigten die *Arc/Arg3.1*-ko Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren schlechtere Ergebnisse beim langfristigen Erlernen von Verhaltensmustern wie dem Morrisen Wasserlabyrinth, dem räumlichen Lernen, der Angstkonditionierung, den konditionierten Geschmacks-Aversions-Tests und den Objekt-Erkennungs-Tests (Plath et al. 2006). Letzteres wurde zum Beispiel im „*novel Objekt recognition test*“ nachgewiesen. Die Tiere wurden an eine Arena mit drei Objekten habituiert und anschließend aus der Arena genommen. Daraufhin wurde ein Objekt ausgetauscht und die Tiere in verschiedenen Zeitabständen zurück in die Arena gesetzt. Nach 10 Minuten erforschten sowohl wildtyp als auch *Arc/Arg3.1*-ko Maus das neue Objekt längere Zeit, wohingegen nach 24 Stunden bei den *Arc/Arg3.1*-ko Mäusen keine wesentlich längere Verweildauer bei den neuen Objekt festgestellt werden konnte (Plath et al. 2006). Dieses deutet darauf hin, dass in *Arc/Arg3.1*-ko Mäusen die Übertragung in das Langzeitgedächtnis nicht mehr funktioniert.

Eine Störung der Festigung des Gedächtnisses konnte auch durch Hemmung der Translation mittels *antisense oligodeoxynucleotides* (ODNs) gezeigt werden. Dabei ergab sich eine Verschlechterung der Aufrechterhaltungsphase des LTP ohne deren Induktion, die Akquisition Phase, zu beeinträchtigen oder das Kurzzeitgedächtnis zu beeinflussen (Guzowski et al. 2000).

Messaoudi und Mitarbeiter zeigten in einer weiteren Studie, dass es nach Applikation von *Arc/Arg3.1*- antisense ODNs, vor oder sofort nach der Induktion der LTP, zu einer vorübergehenden Inhibition der LTP kommt, welches sich erst wieder erholt, nach dem die *Arc/Arg3.1*-Synthese wiederhergestellt ist. Im Gegensatz dazu führt eine Applikation von ODNs nach 2 Stunden, aber nicht 4 Stunden nach Induktion des LTP, zu einer kompletten Umkehrung des LTP, was vermuten lässt, dass eine anhaltende Synthese von *Arc/Arg3.1* erforderlich ist um LTP zu konsolidieren. (Messaoudi et al. 2007).

Die Gesamtheit dieser Erkenntnisse in Zusammenschau mit der Tatsache, dass *Arc/Arg3.1*-mRNA in Bereichen synaptischer Aktivität akkumuliert (Steward and Worley 2001) hebt die besondere Bedeutung von *Arc/Arg3.1* für die synaptische Plastizität heraus.

1.4.4 Arc/Arg3.1 und Östrogen

Chamniansawat und Chongthammakun zeigten in ihrer Veröffentlichung mittels *real-time* PCR, Westernblot und Immunzytohistochemie-Techniken, dass Östrogen die Expression von *Arc/Arg3.1*-mRNA und Protein in SH-SY5Y-Zellen steigert (Chamniansawat and Chongthammakun 2009). Sie konnten nachweisen, dass diese Östrogen-abhängige Expression vor allem über MAPK und PI-3K vermittelt wird. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Östrogen das Dendriten-Gerüstprotein postsynaptic density-95(PSD-95) und die Expression von Synaptophysin hochreguliert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein möglicher *Arc/Arg3.1* gekoppelter Mechanismus der Östrogen-induzierten synaptischen Plastizität und damit der Gedächtnisbildung besteht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *Arc/Arg3.1* eine wichtige Rolle für die Festigung des Langzeitgedächtnisses spielt und sowohl für die Gedächtnisformation als auch für die synaptische Plastizität entscheidend ist. Des Weiteren scheint *Arc/Arg3.1* maßgeblich an der homöostatischen Plastizität beteiligt zu sein.

1.5 Östrogenwirkung im Gehirn

Östrogene gehören zur Klasse der Steroidhormone und werden hauptsächlich in den Ovarien, in den Follikeln und im Gelbkörper produziert. Die Synthese von Östrogen wird durch die Aromatase katalysiert. Durch einen Feedbackmechanismus reguliert die Serumkonzentration von Östrogen und Testosteron die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus, welcher wiederum die Hypophyse stimuliert, Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) zu produzieren und zu sezernieren. FSH und LH steigern die Synthese von Östrogen in den Granulosazellen der Ovarien. Zusätzlich wird auch im Fettgewebe Östrogen produziert und auch das Skelettsystem und die Brust können Östrogene sezernieren. Lange wurde angenommen, dass Östrogene ausschließlich den Östrus auslösen, die Ausbildung der sekundären weiblichen Geschlechtsorgane bei Frauen bewirken und durch Förderung der Retention von Calcium, Phosphat und Natrium die Bildung der Knochenmatrix fördern.

Bereits 1962 gaben erste Studien allerdings Hinweise darauf, dass die Struktur des Hippocampus durch weibliche Sexualhormone beeinflusst wird (Woolley and Timiras 1962). Es zeigte sich nach weiterer Forschung deutlicher, dass das Hormon Östrogen die synaptische Plastizität, die zuvor beschriebene Fähigkeit der Neuronen, sich der gesteigerten oder verminderten Aktivität anzupassen, beeinflusst.

Das zirkulierende Sexualhormon ist in der Lage, die Blut-Hirnschranke zu überwinden und in das Gehirn zu gelangen. Die Konzentration im hippocampalen Gewebe korreliert mit der Konzentration im Serum während des Östrogenzyklus (Kato et al. 2013). Dieser Erkenntnis folgend konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Spinedichte im Hippocampus von weiblichen Ratten dem Östrogenzyklus folgt. Das Östrogen aus den Ovarien beeinflusst die Spinedichte im Hippocampus (Woolley et al. 1990). Im Proestrus, kurz vor der Ovulation, wenn die Konzentration von Östrogen am höchsten ist, erreicht parallel dazu die Spinedichte im Hippocampus ihr Maximum und nimmt, simultan zu dem Absinken der Östrogenkonzentration, nach der Ovulation im Serum wieder ab.

Nach Ovariectomie von Ratten kommt es zu einem Verlust von postsynaptischen dendritischen Spines in der CA1-Region des Hippocampus (Gould et al. 1990; Leranth et al. 2004). Die Entfernung der Gonaden führte sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren zu einer Verringerung der hippocampalen Spinedichte (Leranth et al. 2004; Gould et al. 1990).

Die Arbeitsgruppe um Gould konnte weiter belegen, dass eine Ersatztherapie mit subkutanen Injektionen mit Östrogen dem signifikanten Verlust der dendritischen Spines entgegenwirkt (Gould et al. 1990).

Die ersten Erkenntnisse über die Wirkung von Östrogen auf den Hippocampus gewann man aus Studien, die die Wirkung applizierter Sexualhormone nach der Entfernung der Gonaden, dem Hauptsyntheseort der Sexualhormone, untersuchten. Diese Resultate ließen nicht unterscheiden, ob eine Veränderung der neuronalen Strukturen durch das applizierte Östrogen bedingt ist oder das applizierte Östrogen den Verlust der Gonaden kompensiert (Rescue-Effekt).

Daran anknüpfend führte die Applikation von Östrogen auf hippocampale Sliceulturen *in vitro* nicht zu einer Induktion der Spine Synapsen Formation (Kretz et al. 2004).

Prange-Kiel konnte 2003 zeigen, dass hippocampale Neuronen Östrogen synthetisieren (Prange-Kiel et al. 2003). Die zur Steroidbiosynthese nötigen Enzyme werden im Gehirn exprimiert (Prange-Kiel and Rune 2006). Die Östrogen Synthese im

Hippocampus reguliert die Expression von ER-Alpha und ER-Beta gegensätzlich (Prange-Kiel et al. 2003). Östrogenrezeptoren fungieren als Transkriptionsfaktoren, die nach Ligandenbindung dimerisieren, in den Nukleus translozieren, an *Estrogen-Responsiv-Elements* in den Promotoren ihrer Ziel-Gene binden und so deren Expression regulieren. Zudem werden auch membrangebundene (nicht-genomische) Effekte, wie die Aktivierung von Signalkaskaden von zum Beispiel MapK und PI3K, vermutet (Morissette et al. 2008).

Durch eine Behandlung mit Letrozol, einem in der Therapie von rezeptor-positiven Mammakarzinomen eingesetzten Aromatase-Inhibitor, lässt sich sowohl in kultivierten, dissoziierten hippocampalen Neuronen sowie in organoidtypischen hippocampalen Schnittkulturen eine Reduktion der Östrogen-Synthese nachweisen (Kretz et al. 2004). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Letrozol zu einem im Serum nicht mehr nachweisbaren Östrogenlevel führt (Zhou et al. 2010).

Des Weiteren zeigen sich teilweise geschlechtsspezifische Unterschiede. So war es in weiblichen hippocampalen Geweben möglich, mittels massenspektrometrischen Messungen Östrogen *in vivo* nachzuweisen. Dieser Nachweis gelang in männlichen Geweben nicht, was darauf schließen lässt, dass die Östrogenmenge hier unter der Nachweisgrenze liegt. *In vitro* konnte dagegen in kultivierten hippocampalen Neuronen ein Unterschied in der Synthesemenge von Östrogen zwischen weiblichen und männlichen Neuronen nicht bestätigt werden (Fester et al. 2011).

Vierk und Kollegen konnten 2012 zeigen, dass es nach systematischer Inhibition der Aromataseaktivität zu einer signifikanten Beeinträchtigung der LTP und zu einer transienten Induktion der Dephosphorylierung von Cofilin im Hippocampus von weiblichen, männlichen und ovariectomierten Tieren kommt (Vierk et al. 2012). Dabei waren die deutlichsten Effekte in weiblichen Mäusen zu sehen, gefolgt von den ovariectomierten und anschließend den männlichen Mäusen. Cofilin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, das durch die Phosphorylierung am Ser3-Rest durch die LIM-1 Kinase inaktiviert wird. Dadurch wird der Abbau von F-Aktin inhibiert und somit werden die Spines stabilisiert (Bramham et al. 2008). Passend zu diesem Ergebnis zeigten Kramár et al. 2009, dass es nach der Applikation von Estradiol in männlichen hippocampalen Schnitten zu einem Anstieg von LTP und zu einer Phosphorylierung von Cofilin durch die Aktivierung der LIM-1 Kinase kommt (Kramár et al. 2009). Somit führt die Applikation von Estradiol zum Anstieg der LTP, zur Phosphorylierung von Cofilin und dadurch zu Stabilisierung der Spine-Synapsen.

Nach systematischer Inhibition der Aromatase kam es in weiblichen Tieren ebenfalls zu einem Verlust von sowohl dünnen Spines ($< 0,6 \mu\text{m}$) als auch von großen ($> 0,6 \mu\text{m}$) Spines. Wohingegen bei männlichen Tieren nur ein Verlust der dünnen Spines nachweisbar war (Vierk et al. 2012). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die ovariectomierten Tiere keine Beeinträchtigung der LTP vorweisen. Dieses hebt nochmals die Bedeutung des im Hippocampus synthetisierten Östrogens, im Gegensatz zu dem in den Ovarien synthetisierten Östrogen, in Bezug auf die LTP hervor und deutet darüber hinaus darauf hin, dass die Beeinträchtigung der LTP nicht im direkten Zusammenhang mit dem Spine- und Spine-Synapsenverlust steht.

Rune und Fester zeigen, dass hippocampale Neuronen Östrogen produzieren, welches zur Aufrechterhaltung der LTP und der Synapsen in weiblichen Ratten führt. In weiblichen Tieren führte eine Inhibition der Östrogensynthese durch den Aromatase-Inhibitor Letrozol zur einer Verminderung der LTP und einem Synapsen-Verlust. Dies konnte in männlichen Tieren nicht beobachtet werden (Fester and Rune 2014) und zeigt den sexuellen Dimorphismus der Wirkung von Östrogen auf die Ausbildung der LTP und der Spine-Synapsen-Dichte.

Untersuchungen zeigten, dass die mRNA der GnRH-Rezeptoren, welche die Östrogen Synthese in den Ovarien stimulieren, im Vergleich zu Cortex und Hypothalamus im Hippocampus stärker exprimiert wird (Prange-Kiel et al. 2008). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Behandlung von hippocampalen Kulturen mit GnRH zu einem Anstieg der Östrogensynthese und der Spine-Synapsendichte führt. Prange-Kiel konnte an weiblichen hippocampalen Slice-Kulturen zeigen, dass die Synthese von Estradiol dosis-abhängig von GnRH reguliert wird (Prange-Kiel et al. 2013). Daraus ergibt sich, dass sowohl die hippocampale als auch die ovariale Synthese von Estradiol durch GnRH reguliert wird. Der gezeigte Effekt konnte durch Behandlung mit Letrozol aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass GnRH über die Aromatase auf die Spine-Synapsendichte im Hippocampus wirkt (Prange-Kiel et al. 2013).

Durch die Zugabe von ausreichend Cholesterol, welches für die Synthese von Östrogen durch die Aromatase benötigt wird, wird die Menge des synthetisierten Östrogens in kultivierten hippocampalen Neuronen erheblich gesteigert (Huber et al. 2009).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass Östrogen die synaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptopodin, die an der synaptischen Plastizität beteiligt sind, beeinflusst. Durch Behandlung neuronaler Dispersionskulturen mit Östrogen kommt

es zu einer verringerten Expression von Synaptopodin und parallel dazu zu einer gesteigerten Expression von Synaptophysin (Fester et al. 2009).

Die klinische Bedeutung zeigte sich in Studien über die E2-regulierte Gedächtnisleistung, die an prä- und postmenopausalen Frauen mit Hormonersatztherapie durchgeführt wurden. Diese weisen auf einen Vorteil durch die E2-Therapie im Hinblick auf die Gedächtnisleistung (Sherwin 1988; Phillips and Sherwin 1992; Maki and Resnick 2001) und auf demenzielle Erkrankungen hin (Yaffe et al. 1998; Fordham and Speed 1993). Daran anschließend wird vermutet, dass die Behandlung mit Aromatase-Inhibitoren die Kognition negativ beeinflusst (Martin et al. 1960).

In klinischen Studien ist ebenfalls ein sexueller Dimorphismus zu beobachten. So verbesserte sich nach Gabe von Androgenen das räumliche Gedächtnis (Cherrier et al. 2007).

Zusammenfassend zeigt sich, dass Östrogen Einfluss auf die Spinedichte und die LTP und somit die synaptische Plastizität im Hippocampus hat. Weiterhin sind Unterschiede zwischen der Reaktion auf Östrogen zwischen männlichen und weiblichen Ratten feststellbar.

1.6 Letrozol

Letrozol ist ein selektiver nicht-steroidaler Aromatasehemmer, der derzeit zur Therapie postmenopausaler Frauen mit einem Östrogen-Rezeptor-positiven Mammakarzinom zugelassen ist. Im klinischen Alltag findet Letrozol Verwendung als Antihormontherapie nach rezeptorpositivem Mammakarzinom um den Östrogenspiegel im Serum zu senken und so einem Rezidiv entgegen zu wirken.

1.7 Fragestellung

2009 zeigten Chamniansawat und Chongthammakun an einer SH-SY5Y Zelllinie, dass nach Östrogen Stimulation die Expression von *Arc/Arg3.1* ansteigt (Chamniansawat and Chongthammakun 2010, 2009). Ebenso konnte in einer *in vitro* Studie von Siriporn durch exogenes Östrogen die *Arc/Arg3.1*-Expression gesteigert werden. Untersuchungen und Vorversuche der Rune-Arbeitsgruppe zeigten allerdings, dass exogenes Östrogen keinen Einfluss auf die Spinedichte hat. Dagegen führte die

Inhibition der Aromatase durch Letrozol zu einem Verlust von Spines, welcher durch parallele Stimulation mit exogenem Östrogen aufgehoben werden konnte (Fester and Rune 2014).

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals in einer Dispersionskultur von embryonalen hippocampalen Neuronen untersucht werden, ob ein Anstieg der *Arc/Arg3.1*-Expression nach Stimulation mit Östrogen in diesem Modell nachweisbar ist. Hierbei dient die Induktion der *Arc/Arg3.1*-Expression durch den *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) als Positivkontrolle. Zur Expressionsanalyse sollten Western Blot und Immunzytologie verwendet werden. Mittels einer Behandlung von primären hippocampalen Neuronen mit dem Aromatase-Inhibitor Letrozol, bzw. mit einer Kombination von Letrozol und exogenem Östrogen, sollte zusätzlich die Frage geklärt werden, ob eine Induktion der Expression von *Arc/Arg3.1* durch endogen synthetisiertes Östrogen bedingt ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit bei den obigen Fragestellungen ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Kulturen besteht, und somit ein sexueller Dimorphismus naheliegt.

2. MATERIAL

2.1 Arbeitsmaterial, Geräte und Software

Produkt:	Hersteller:
Brutschrank (Serie WTC)	Binder
Bio-Photometer	Eppendorf
Borsäure	Merck
Cell Scraper, 28 cm	Greiner Bio-One
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG
Deckgläser 24x46, 24 x 18	Marienfeld
ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fischer Scientific
Electrophoresis power supply EPS 3501XL	GE Healthcare
Entwicklungskamera	Vilber Lourmat
Excel	Microsoft
Falcon Cell Stainer, 40µm Nylon	Becton
Falcon Tissue Culture Plate, 24iger well und 6er well-Platte	Becton Dickinson
Färbekästen nach Hellendahl (Küvetten)	Roth
Feuchtkammer	Labor Anatomie UKE
Fluoreszenz-Mikroskope, BZ-9000 (BIOREVO)	KEYENCE
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	Liebherr
Gel-Kämme	Bio-Rad
Handschuhe (Vinyl/Latex)	Hartmann
Heidemannspatel	Aesculap de
ImageJ	National Institutes of health, USA
Instrumentenkasten	Merck
Konfokales Mikroskope, LSM Axiovert 510	Carl Zeiss
Kühlschrank, 4°C	Bosch/Liebherr
Laborflaschen, 0,5 l und 1 l	Schott
Magnetrührer	Heidolph

Magnetrührstäbchen, Standard	VWR
Micro Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG
Mini-Protean Casting Stand	BioRad
Neubauer Zählkammer	Brand Germany
Objektiv, 20fach und 40fach Vergrößerung	Zeiss
Objektiv, 60facher Vergrößerung	UPlan Sapo
Objektträger	Marienfeld
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25 cm	Merck
pH-Meter	Knick
Pinzette nach Dumont	Merck
Pinzette, fein und gebogen	FST
Pipetten, diverse	Eppendorf AG/Gilson
Pipettenspritzen, diverse	Eppendorf AG/Gilson
Pipetus Akku	Hirschmann Laborger.
Plastik Pipetten, 10 ml	Eppendorf AG
PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
PP-Test-Tubes, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinsons
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf AG
Rüttler	Bühler
Vakuum-Anlage zum Mediumwechsel	Millipore
Schere	Aesculap de
Semidry-Transfer-Cell	BioRad
Sicherheitswerkbank Klasse 2, LaminAir HVR 2472	Heraeus
SPSS 20 für Windows	IBM statistics
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad mit Schüttler	GFC
Zellstofftücher	Wepa
Zentrigue Universal 32 R	Hettich

2.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Chicken-Anti-Rabbit AlexaFlour 488 konjugiert	Sigma-Aldrich
Adenosinphosphosulfat (APS)	Sigma-Aldrich
B27 Supplement	Gibco/Invitrogen
BDNF	BIO-rad
Bromphenolblau (BPB)	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
DAKO Einbettungsmedium	Dako
ECL-Substrat	Thermo Scientific
17 β -Estradiol (wasserlöslich)	Sigma-Aldrich
Ethanol (96%)	Apotheke UKE
Glutamin	Sigma-Aldrich
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen
Küvetten, Arcyl 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
Letrozol	Apotheke UKE
Milchpulver	Heirler
Millipore Substrat	Merck
Molekulargewichtsmarker für Gele (Page Ruler Plus Prestained)	Fermentas
Phosphate buffered saline(PBS)-Tabs	Merck
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Ponceau-Rot	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Fluka
Sterilium	Bode Chemie
Stickstoff	Apotheke UKE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Trockeneis	TMG

Tween	Sigma
-------	-------

2.3 Lösungen

17 β -Östradiol-Lösung

2,72 mg 17 β -Östradiol in 1 ml Aqua bidest. steril = Konzentration

Konzentration mit Aqua dest. steril 1:100 verdünnen = Stammlösung (10^{-4} M)

Letrozol-Lösung

2,85 mg Letrozol in 1 ml ETOH = Konzentration

Konzentration mit Aqua bidest. steril 1:100 verdünnen = Stammlösung (10^{-4} M)

Laemmli-Laufpuffer

30,3 g TrisBase

144,2 g Glycin

10 g SDS

Aqua bidest. steril ad 1000 ml

Semi-Dry-Blot-Puffer

3,03 g TrisBase

14,4 g Glycin

100 ml 10% Methanol

Aqua bidest. steril, ad 1000 ml

PBS-Lösung für die Zellkultur

1 PBS-Tab (5 g) in 500 ml Aqua bidest. steril, lösen

Titration bis pH = 7,4 mit NaOH (1 mol/ l) bzw. HCl (1 mol/ l)

PBS (Phosphat-Bufferde Saline) für die Immunzytologie

8 g Natriumchlorid

0,2 g Kaliumchlorid

1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat

0,2 g Kaliumhydrogenphosphat

Ad 1000 ml mit aqua bidest.

PH 7,4; Lagerung bei Raumtemperatur

PFA-Lösung (4%)

20 g PFA in 400 ml Aqua bidest. steril, lösen

Aqua dest. steril, ad 500 ml

PBS-Tween

100 ml PBS

30 ml Tween-20

Aqua bidest. steril, ad 1000ml

Milchpulver (5%)-PBS-Tween

2 g Milchpulver

38 ml PBS-Tween

Poly-L-Lysin zur Beschichtung der Platten

6.183 g Borsäure

In 800 ml H₂O lösen

pH einstellen auf 8,5 und auf 1000ml auffüllen

steril filtrieren

100 mg Poly-L-Lysin darin lösen,

Aliquotieren und bei -20°C einfrieren und lagern

HBSS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺, mit 10mM HEPES)

50 ml 10Xhbss (Gibcon 14180-146 500ml)

5,04 ml HEPES (Sigma H3537)

Ad 450 ml H₂O

pH einstellen auf 7,3

ad 500ml mit Aqua bidest.

steril filtrieren

Neurobasal-Kulturmedium

50 ml Neurobasalmedium (ohne Phenolrot)

500 µl B 27

125 µl L-Glutamin 200mM

500 µl Penicillin/Streptomycin

Aufschlusspuffer:

TBS → 2 ml einer 10x Lösung	200 µl	500 µl
1,2% TX-100 → 2,4 ml einer 10%igen Lösung	240 µl	600 µl
Proteaseschutz → 800 µl (25x; Roche Tabletten)	80 µl	200 µl
5 mM EDTA → 200 µl einer 0,5 M Lösung	20 µl	50 µl
PhosStop 1:10	200 µl	500 µl

3. METHODEN

3.1 Gewinnung und Kultivierung der Dispersionskulturen

3.1.1 Präparation des Hippocampus von E18 Ratten

Zur Gewinnung von primären hippocampalen Neuronkulturen wurden Rattenembryonen im Embryonalstadium 18 (E18) verwendet. Das Muttertier wurde sachgemäß betäubt und dekapitiert. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet und die Embryonen dem Uterus entnommen. Unter semisterilen Bedingungen wurden die Embryonen ebenfalls dekapitiert und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel gelöst. Im nächsten Schritt wurden unter dem Binokular die Meningen vollständig vom Gehirn gelöst, das Cerebellum entfernt und die Hemisphären voneinander getrennt. Anschließend wurden die Hippocampi aus den Temporallappen herausgeschnitten, in HBSS aufgenommen und auf Eis gelegt. Parallel wurde bei jedem Embryo durch Eröffnung des Bauchraumes und Aufsuchen der Ovarien bzw. der Hodenstränge das Geschlecht bestimmt und die Hippocampi nach den Geschlechtern in getrennte Falcone sortiert. Bei der weiteren Behandlung blieben die Geschlechter durchgehend getrennt.

3.1.2 Beschichten der 24-Well mit Poly-L-Lysin

Die bereits über Nacht in reinem Ethanol entfetteten und anschließend einmal mit Ethanol gespülten Glasdeckgläser wurden anschließend getrocknet und in einer Glaspetrishale für vier Stunden bei 200 °C sterilisiert. Zur Beschichtung wurde nun in jede Kavität ein Deckgläschen gelegt und mit jeweils 500µl Poly-L-Lysin beschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Glasplättchen nicht oben schwammen, sondern am Boden der Kavität lagen und vollständig bedeckt waren. Die Platten wurden über Nacht unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Poly-L-Lysin vollständig abgesaugt und die Kavitäten mit 1 ml sterilem Wasser gefüllt. Bis zur Verwendung wurden die Platten bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.3 Kultivierung der Hippocampi

Die Hippocampi wurden nach der Präparation in HBSS aufgenommen und anschließend einmal mit HBSS gespült. Dann wurde das Medium möglichst vollständig abgesaugt. Nach der Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA sowie 8 ml HBSS und anschließendem gründlichen Vermischen, wurden die Hippocampi 15 Minuten unter mehrmaligem Schwenken im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde erneut viermal mit HBSS gewaschen. Nach dem letzten Spülen wurden 2 ml Neurobasal Kulturmedium darauf gegeben und mit einer feuerpolierten Pasteurpipette mit einem mittleren Lumen das Gewebe durch mehrfaches auf- und abpipettieren suspendiert. Dies wurde mit einer weiteren Pasteurpipette mit kleinerem Lumen wiederholt, so dass eine homogene Suspension entstand. Diese wurde durch ein 40 µm Zellsieb gegeben um unverdaute Bestandteile zu entfernen und mit 3 ml Neurobasal Kulturmedium nachgespült. In einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 150.000 Zellen/ml Kulturmedium in 24-Well-Platten für weiterführende immunzytochemische Untersuchungen ausgesät. Ebenso wurde eine Zellkonzentration von 450.000 Zellen/ml Kulturmedium für anschließende Western-Blot-Analysen in 6-Well-Platten ausplattiert. Nach einer Stunde im Inkubierschrank bei 37°C wurde das Medium gewechselt.

Zur Vitalitätskontrolle wurden die Kulturen am nächsten Tag unter dem Mikroskop betrachtet. Beginnende Ausbildung von Fortsätzen und Zellverbindungen zwischen den Neuronen wiesen auf einen funktionellen *in vitro* Zellverband hin.

3.2 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient zum Nachweis der Proteinmenge von Arc/Arg3.1 in den Lysaten der unterschiedlich behandelten Neuronkulturen. Zur Ladekontrolle wurde parallel auch die Menge an GapDH bestimmt, die durch die Stimulation der Kulturen nicht beeinflusst wird.

3.2.1 Stimulation der Dispersionskulturen für die Western-Blot-Analyse

Nach 14-tägiger Vorinkubation konnten die Zellen stimuliert bzw. inhibiert werden. Unter dem Mikroskop waren nun deutliche Verflechtungen innerhalb der Kulturen zu sehen.

Nur mit Aqua dest. behandelte Kulturen, die unter identischen Versuchsbedingungen mitgeführt wurden, dienten bei allen Experimenten als Kontrolle. Im ersten Durchlauf wurden die männlichen und weiblichen Kulturen jeweils 1 Stunde bzw. 3 Stunden mit dem Stimulator bzw. Inhibitor bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Kulturen wurden jeweils mit 10^{-7} M Letrozol sowie mit 10^{-7} M E2 behandelt.

Die Vorversuche für die Immunzytologie zeigten ein stärkeres Signal für Arc/Arg3.1 nach dreistündiger Stimulation, sowohl mit E2 als auch mit BDNF. Daraufhin wurde beschlossen, einen zweiten Durchlauf mit einer dreistündigen Stimulation durchzuführen und zusätzlich mit BDNF (10^{-8}) als Positivkontrolle sowie mit E2 und Letrozol in Kombination zu behandeln, um einen wechselseitigen Effekt zu untersuchen.

3.2.2 Zellaufschluss für die Western-Blot-Analyse

Zur Gewinnung der Proteine aus den Dispersionskulturen wurden die Zellen pro Kavität mit je 4 ml PBS gewaschen. Zur Auflösung der Neuronenstruktur und zum Ablösen von der Kulturplatte wurden immer zwei Kavitäten mit der gleichen Stimulation (z.B. E2) mit 100 µl Aufschlusspuffer versetzt, abgenommen und in einem Doppelansatz gepoolt. Das gewonnene Material wurde in ein auf Eis stehendes 1,5 ml Eppi überführt und mit Hilfe einer Insulinspritze 5-7 mal eingezogen und dadurch mechanisch lysiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1400 rpm 30min bei 4°C zentrifugiert um die Zellrückstände von dem Zell-Lysat zu trennen. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppi überführt und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford dient der Bestimmung der Proteinmenge in den gewonnenen Lysaten. Dieses ist erforderlich um zu gewährleisten, dass in der späteren Western-Blot-Analyse dieselbe Proteinmenge eingesetzt wird.

Dazu wurden anhand einer Standardreihe (Konzentrationen: 0 µm; 1,25 µm; 2,5 µm; 5 µm; 7,5 µm, 10 µm BSA) aus BSA und Aqua bidest. mittels eines Elisa-Readers photometrisch die Proteinmenge bestimmt. Jeweils 1µl der Probe wurde mit 19 µl sterilisiertem Wasser verdünnt, mit 1000 µl 1:5 verdünnten Bradford Reagenz versetzt und anschließend gründlich vermischt, um eine Farbkomplexbildung gewährleisten zu können. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden nach Eichung mit der Standardreihe die Proben nacheinander im Photometer in einem Messbereich von 0,5-10 µg gemessen.

3.2.4 Herstellung der Gele

Die zuvor mit Ethanol gesäuberten Glasplatten, jeweils ein Spacer und eine Glasplatte, wurden zusammengelegt und in die Gelkammersysteme eingespannt. Das zuvor hergestellte Trenngel wurde in den durch den Spacer geschaffenen Spalt pipettiert und anschließend mit Propanol beschichtet. Das Acrylamid braucht ca. 20 bis 30 Minuten zum Auspolymerisieren. Anschließend konnte das Propanol abgegossen und die Reste des Propanols mit Hilfe eines Filterpapiers abgesaugt werden. Das Sammelgel wurde bis zum Rand in die Kammer gegossen und der Kamm eingesetzt. Dieser formt die späteren Sammelaschen. Das Sammelgel war nach weiteren 20 Minuten ebenfalls auspolymerisiert. Das fertige Gel wurde in feuchte Papiertücher gewickelt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

In den Versuchen wurden 0,75 mm dicke 10% Gele verwendet.

Tabelle 1: Trenngel

H ₂ O	8ml
1,5 Tris 88Trennpuffer	5ml
30% Acrylamid	6,6ml
10% SDS	200µl
10% APS	200µl
Temed	8µl

Tabelle 2: Sammelgel

H ₂ O	5,5ml
30 % Acrylamid	1,7ml
0,5 M Tris 68 Sammelpuffer	2,5ml
10% SDS	100µl
BRB	100µl
10% APS	100µl
Temed	10µl

Die Mengenangaben beziehen sich auf vier 0,75 mm dicke 10% Acrylamidgele.

3.2.5 SDS-PAGE

Die zuvor hergestellten Gele wurden in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Lämmli-Laufpuffer befüllt. Die Taschen der Gele wurden mit Hilfe einer Spritze mit Lämmli-Laufpuffer gespült um mögliche Gelreste zu entfernen. Eingesetzt wurden jeweils 25 µg Protein pro Behandlungsgruppe, die auf 16 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und mit je 4µl 5xLPP zum Beschweren der Proben versetzt wurden. Die Proben wurden jeweils für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend kurz mit der Fullspeed-Zentrifuge abzentrifugiert. Die Proben sowie 5 µl des Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder Marker wurden jeweils in eine Tasche pipettiert. Die Kammer wurde an den Power Supply angeschlossen, so dass, der Spannung folgend, die Proben zuerst ca.15 Minuten bei 80 Volt durch die Sammeltaschen liefen. Danach wurde die Spannung auf 180 Volt für ca. 45 Minuten erhöht, bis die Proben das Gel durchlaufen hatten.

3.2.6 Blottechnik

Im Western-Blot-Verfahren werden die auf dem SDS-Gel befindlichen Proteine durch das Anlegen an ein elektrisches Feld auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Semidry-Blotverfahren gewählt. Pro SDS-Gel wurden jeweils 2 dicke und 4 dünne Filterpapiere für ca. 30 Minuten in Semidry-Blot-Puffer eingeweicht und anschließend zusammen mit einer zuvor in Semidry-Blot-Puffer geschwenkte Nitrocellulose-Membran und dem in Semidry-Blot-Puffer

gespülten SDS-Gel aus der Gelelektrophorese in die Biorad Semidry-Transfer-Kammer gestapelt.

Dabei muss die Nirtocellulosemembran auf der Seite der Anode liegen, da nur so die negativ geladenen Proteine in die Membran übertreten können. Die Blotkammern wurden bei 15 Volt für 45 Minuten an den Power Supply der Firma Biorad angeschlossen. Um zu überprüfen, ob die Proteinübertragung auf die Nirtocellulosemembran erfolgreich war, wurden die Membranen für 1 Minute in Ponceaurot gelegt, anschließend zweimal mit Wasser gespült und auf Filterpapier getrocknet. Rote Banden wurden sichtbar, was auf eine erfolgreiche Übertragung der Proteine hinweist. Anschließend wurden die Membranen beschriftet, die Marker mit Kugelschreiber nachgezeichnet und bei ca. 45 kDa in einen Abschnitt mit Arc/Arg3.1 (55kDa) und einen mit GapDH (35 kDa) zerschnitten. Danach wurden die Membranen für eine Stunde mit 5%igen Milchpulver in TBS blockiert. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und der Membranabschnitt mit Arc/Arg3.1 mit 3 ml in 5%iger Milchpulver-Lösung 1:150 verdünnten Arc/Arg3.1-Antikörper bedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Der Membranabschnitt mit GapDH wurde ebenfalls mit 3 ml in 5%iger Milchpulver-Lösung 1:10000 verdünntem GapDH-Antikörper bedeckt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen Antikörper viermal (sofort, nach 5 Minuten und zweimal nach je 10 Minuten) mit PBS-T herunter gewaschen und anschließend der in Milchpulver 1:2500 verdünnte sekundäre Antikörper (goat anti-mouse) für eine Stunde auf beide Membranabschnitte gegeben. Die Membranen wurden im Anschluss erneut viermal mit PBS-T gewaschen.

3.2.7 Entwicklung der Blots

Im Allgemeinen werden anschließend an einen Western-Blot zur Detektion der gesuchten Proteinbanden lichtsensible Substanzen (Detektionsmittel) an die Proteinbanden gekoppelt und anschließend in einer Entwicklungskamera, die die fertigen Bilder auf einen Computer überträgt, sichtbar gemacht. Für die Entwicklung der Arc/Arg3.1-Proteinbanden wurde Millipore Immobilon Western HRP als Detektionsmittel verwendet und 5 Minuten inkubiert. Für die Entwicklung der GapDH Banden wurde ECL Western Blotting Substrate als Detektionsmittel verwendet und 2

Minuten inkubiert. Die Membranen wurden zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und einzeln entwickelt.

3.3 Quantitativer immunzytochemischer Nachweis von Arc/-Arg3.1 in den Somata

Mit Hilfe der Immunzytologie wurden die männlichen und weiblichen hippocampalen Dispersionskulturen hinsichtlich ihrer Arc/Arg3.1-Expression untersucht. Diese Methode basiert auf der Anlagerung von Antikörpern, welche gegen das Arc/Arg3.1-Protein gerichtet sind. An diesen Antikörper binden die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper. Unter UV-Licht wurden die Kulturen fotografiert und die Stärke der Anlagerung gemessen. In allen Experimenten wurden Negativkontrollen mitgeführt.

3.3.1 Stimulation der Dispersionskulturen für die Immunzytologie

Die Stimulation der Dispersionskulturen in den 24-Well-Platten für den immunzytochemischen Nachweis von Arc/Arg3.1 erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei den 6-Well-Platten für die Western-Blot-Analyse. Eine nur mit Aqua dest. behandelte Kultur wurde unter identischen Versuchsbedingungen mitgeführt und diente bei allen Experimenten als Kontrolle. Die Kulturen wurden jeweils mit 10^{-7} M Letrozol, 10^{-7} M E2, BDNF (0,5 µl pro ml) als positiv Kontrolle sowie E2 und Letrozol in Kombination behandelt und anschließend für drei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.3.2 Fixierung der Dispersionskulturen für die Immunzytologie

Für die Immunzytologie wurden die 24-Well-Platten nach Abschluss der Stimulation bzw. Inhibition mit 4% PFA fixiert. Dazu wurde das Kulturmedium nach Abschluss der Stimulation vollständig abgesaugt und pro Well mit je 0,5 ml 4%igem PFA für mindestens 10 Minuten bedeckt und anschließend wieder abgesaugt. Zur Lagerung wurden die Zellen mit 1 ml PBS pro Kavität beschichtet und anschließend bei 4°C kaltgestellt.

3.3.3 Immunzytologie

Die zuvor mit 4%igem PFA fixierten, mit PBS beschichteten und bei 4°C gelagerten 24-Well-Platten wurden zur Weiterbehandlung dreimal mit 1 ml PBS (pH 7,43) pro Kavität jeweils 3 Minuten gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 0,5 ml

Methanol unter dem Abzug bei Raumtemperatur für 10 Minuten erneut fixiert. Der Waschvorgang mit dreimal 1 ml PBS pro Kavität wurde wiederholt und anschließend die Zellen mit 1 ml 0,5% TBS + Triton X pro Kavität für 5 Minuten bei Raumtemperatur beschichtet. Danach wurde erneut dreimal mit 1 ml PBS pro Kavität gewaschen und mit jeweils 5 Tropfen BSA/DAKO Proteinblock pro Kavität für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden mit Nadel und Pinzette in eine feuchte Kammer überführt. Der Arc/Arg3.1-Antikörper (H-6, Santa Cruz) wurde in der Konzentration 1:500 und der Map2-Antikörper in der Konzentration 1:1000 in Proteinblock Diluent verdünnt und davon jeweils 50 µl auf ein Glasplättchen gegeben. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen und die Glasplättchen nur mit Proteinblock Diluent beschichtet. Die Zellen wurden nun für mindestens 12 Stunden bei 4°C gelagert.

Anschließend wurden die Zellen wieder in die Kavitäten der 24-Well-Platte überführt und erneut dreimal 5 min mit 1 ml PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden sowohl Alexa 488 Chicken-Anti-Mouse als auch Alexa 555 Goat-Anti-Rabbit in der Konzentration 1:500 in Diluent verdünnt und 50 µl auf die erneut in die Feuchtkammer umgebetteten Glasplättchen gegeben und für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Darauf folgend wurden die Zellen erneut in den 24-Well-Kavitäten dreimal je 5 Minuten mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend zur Kernfärbung mit 1 ml DAPI (1:100000) beschichtet und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang mit dreimal 1 ml PBS wurde wiederholt. Die Glasplättchen wurden nun erneut aus den Kavitäten geholt und in Aqua dest. kurz getaucht und anschließend auf einem Objektträger platziert. Jedes Glasplättchen wurde mit 3 Tropfen DAKO Mounting Lösung benetzt und anschließend mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die beschrifteten Objektträger wurden in einer vor lichtschützenden Mappe bei 4°C gelagert.

3.3.4 Konfokale Mikroskopie

Die Aufnahmen der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Immunzytologie der Dispersionskulturen wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Microscope (LSM) angefertigt. Eingangs wurden optimale Messeinstellungen, die während der gesamten Aufnahmen nicht mehr verändert wurden, als Standard festgelegt, so dass die mittels Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper durchgehend bei gleicher Intensität und Wellenlänge aufgenommen wurden. Es wurde stets das Soma der Zellen

in Arc/Arg3.1, Map2 und der überlappenden Darstellung aufgenommen. Pro angefertigten Objektträger wurden 30 Aufnahmen gemacht.

3.4 Auswertung

3.4.1 Auswertung Western-Blot

Die Auswertung der Western-Blots erfolgte mit dem Programm ImageJ. Dabei wurde die Intensität der Proteinbanden gemessen. Alle Banden für Arc wurden über eine Division durch die korrespondierenden GapDH-Werte normiert. Die Zahlenwerte wurden in eine Excel Tabelle übernommen und die jeweiligen Behandlungen zur Kontrolle in Verbindung gesetzt. Zur statistischen Analyse wurden Daten mittels eines Mixed Models in SPSS ausgewertet.

3.4.2 Auswertung der Immunzytologie

Die Auswertung der mit dem konfokalen LS-Mikroskop gemachten Aufnahmen erfolgte mit dem Programm ImageJ. Dabei wurde jeweils die Intensität der Arc/Arg3.1-Protein-Färbung im Soma der Neuronen gemessen. Nach Voreinstellung der Bemessungsgrenzen (Untergrenze 60, Obergrenze 250) der Intensitäten wurden diese während der gesamten Auswertung mit ImageJ nicht verändert, um gleiche Messbedingungen für alle Versuchsgruppen zu schaffen. Die gewonnenen Daten wurden in Excel erfasst und mit SPSS mittels einer Unianova Analyse ausgewertet.

3.4.3 Zählung entlang der Dendriten

Um die Anreicherung von Arc/Arg3.1-Protein in den Dendriten der verschiedenen Behandlungsgruppen untersuchen zu können, wurden die Dispersionskulturen, an denen bereits immunzytochemisch Arc/Arg3.1 in den Somata gemessen wurden, verwendet. Es wurden Aufnahmen entlang der Dendriten mit dem Keyence Mikroskop gemacht und die Anzahl der Arc/Arg3.1-Anreicherungen im Verhältnis zur Länge der Dendriten gezählt. Dabei wurden die Aufnahmen mit einem 60er Immersionsöl Objektiv und maximaler Vergrößerung aufgenommen. Zur Auswertung wurde die Anzahl der Anreicherungen in den Spine Synapsen, auf eine Anzahl pro 60 µm normiert.

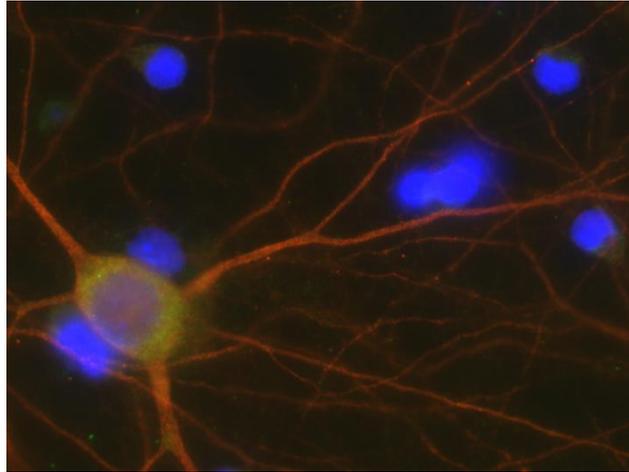


Abbildung 2: Übersichtsaufnahme mit KEYENCE-Mikroskope nach Färbung mit Arc/Arg3.1 und MAP-Antikörper, 60-facher Vergrößerung, blau=Zellkerne, grün=Arc/Arg3.1, rot= Map

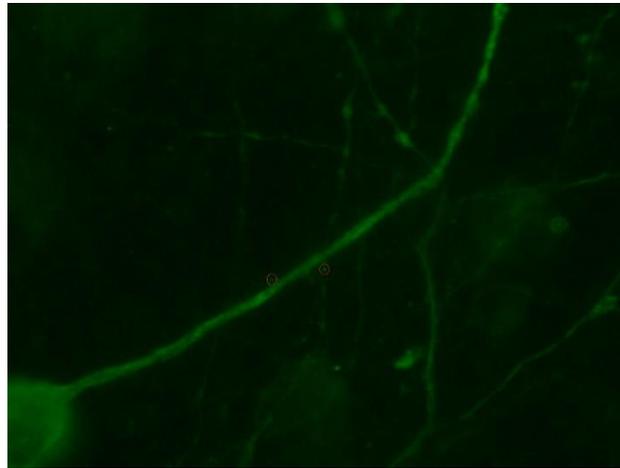


Abbildung 3: Arc/Arg3.1 Färbung KEYENCE-Mikroskopie, 60-facher Vergrößerung mit maximalem Zoom, Arg/Arg3.1 Anreicherung entlang der Dendriten, rote Markierung

4. ERGEBNISSE

4.1 Western-Blot-Analyse nach einstündiger Stimulation

Es sollte untersucht werden, ob die Behandlung von hippocampalen Neuronen mit Letrozol und E2 einen Einfluss auf die Expression von Arc/Arg.31 hat. Dabei lag ein besonderes Augenmerk auf möglichen Unterschieden zwischen den Geschlechtern. Dazu erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit weiblichen und männlichen E18 hippocampalen neuronalen Dispersionskulturen von Ratten, die zunächst nach einstündiger Stimulation mit 10^{-7} Letrozol und 10^{-7} E2 durchgeführt wurde (Abb.4). Die quantitative Auswertung erfolgte mit ImageJ, das Ergebnis wurde anschließend mit SPSS statistisch ausgewertet. In Abbildung 5 sind die Mittelwerte des Arc/Arg3.1-Proteingehalts in Prozent im Verhältnis zur Kontrolle der weiblichen Kulturen angegeben. Die in Abbildung 5 dargestellten Werte zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mit Letrozol behandelten und den mit E2 behandelten Dispersionskulturen gegenüber der Kontrolle.

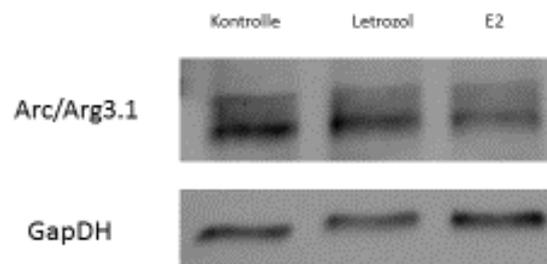


Abbildung 4: Western-Blot der weiblichen Dispersionskulturen nach einstündiger Behandlung. Jede Bahn entspricht einer Behandlungsgruppe (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle, Letrozol 10^{-7} M und E2 10^{-7} M. Die Bande des Arc/Arg3.1-Proteins liegt bei 55kDa. Die Bande von GapDH liegt bei 35,9 kDa, (hier als Ladekontrolle eingesetzt). $n=18$, n entspricht einem Western-Blot aus zwei Kulturen

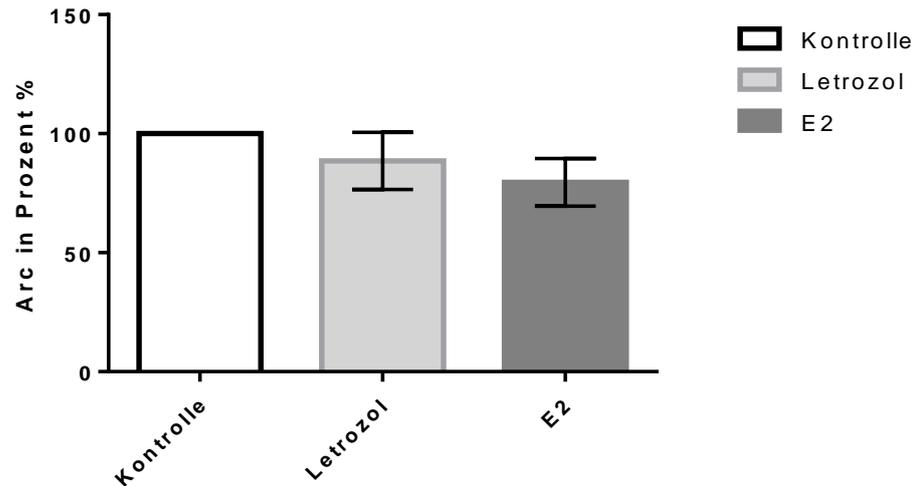


Abbildung 5: Quantitativer Arc/Arg3.1-Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse der weiblichen Dispersionskulturen nach einstündiger Behandlung. Die vertikale Achse zeigt den Arc/Arg3.1-Wert in % in Relation zur Kontrolle. Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle (weiß), Letrozol 10^{-7} M (hellgrau) sowie E2 10^{-7} M (dunkelgrau). Angegeben sind die Mittelwerte mit \pm SEM (Standard error of the mean). $n = 18$, n entspricht einem Western-Blot aus zwei Kulturen

Um einen möglichen sexuellen Dimorphismus zu untersuchen, wurden die männlichen Dispersionskulturen ebenfalls mit Letrozol sowie E2 behandelt und analog zu den weiblichen Dispersionskulturen mittels Westen-Blot (Abb. 6) und anschließender Aufarbeitung der Aufnahmen mit ImageJ sowie nachfolgender Auswertung mit SPSS mittels eines MixModels analysiert.

Abbildung 7 stellt die Arc/Arg3.1-Proteinwerte in Prozent im Verhältnis zur Kontrolle dar. Zwischen den Behandlungsgruppen der männlichen Dispersionskulturen ist kein signifikanter Unterschied in der Arc/Arg3.1-Proteinexpression feststellbar.

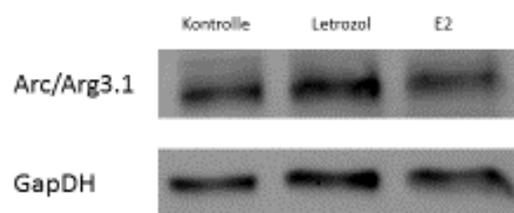


Abbildung 6: Western-Blot der männlichen Dispersionskulturen nach einstündiger Behandlung. Jede Bahn entspricht einer Behandlungsgruppe (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle, Letrozol 10^{-7} M und E2 10^{-7} M. Die Bande des Arc/Arg3.1-Proteins liegt bei 55kDa. Die Bande von GapDH liegt bei 35,9 kDa, hier als Ladekontrolle eingesetzt). $n = 18$, n entspricht einem Western-Blot aus zwei Kulturen

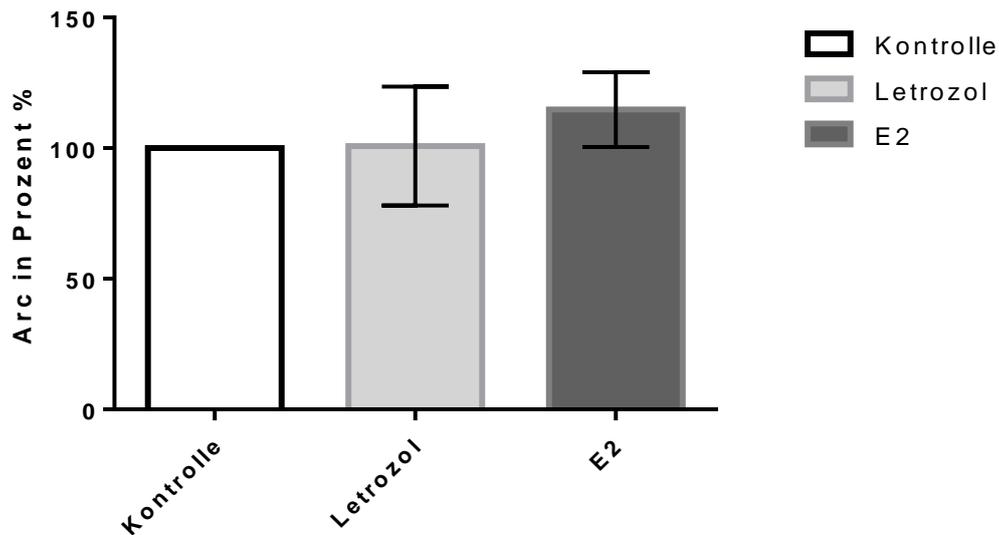


Abbildung 7: Quantitativer Arc/Arg3.1-Proteinnachweis mittels Western-Blot der männlichen Dispersionskulturen nach einstündiger Behandlung. Die vertikale Achse zeigt die den Arc/Arg3.1-Wert in % in Relation zur Kontrolle. Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle (weiß), Letrozol 10^{-7} M (hellgrau) sowie E2 10^{-7} M (dunkelgrau). Angegeben sind die Mittelwerte mit \pm SEM (Standard error of the mean). n=18, n entspricht einem Western-Blot aus insgesamt 2 Kulturen

4.2 Western-Blot-Analyse nach dreistündigen Stimulation

Aufgrund der unveränderten Arc/Arg3.1-Expression nach einstündiger Stimulation mit E2 bzw. Letrozol wurden immunzytochemische Untersuchungen von Dispersionskulturen durchgeführt, die darauf hindeuten, dass eine einstündige Stimulationszeit eventuell nicht ausreichend ist. In den immunzytochemischen Probefärbungen waren die stärksten Signale für Arc/Arg3.1-Protein nach dreistündiger Stimulation zu beobachten (Vorversuche; Daten nicht dargestellt). In der Folge wurde daher erneut eine Westernblot-Analyse in nach Geschlechtern unterteilten Dispersionskulturen durchgeführt. Es wurden E18 Rattenembryone verwendet, deren Hippocampi nach obenstehendem Protokoll kultiviert und nach 14-tägiger Kultivierung für drei Stunden mit BDNF (Positivkontrolle), Letrozol, E2 sowie E2 und Letrozol in Kombination behandelt wurden. Die gleichzeitige Behandlung mit E2 und Letrozol wurde gewählt, um beurteilen zu können, ob ein eventueller Effekt von exogenem Östrogen durch Letrozol aufhebbar ist.

Abbildung 9 zeigt den quantitativen Nachweis von Arc/Arg3.1 in Prozent im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Dargestellt sind die weiblichen Behandlungsgruppen nach dreistündiger Stimulation mit Letrozol, E2, BDNF, E2 und Letrozol in Kombination.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit E2 gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,038$, $n= 24$).

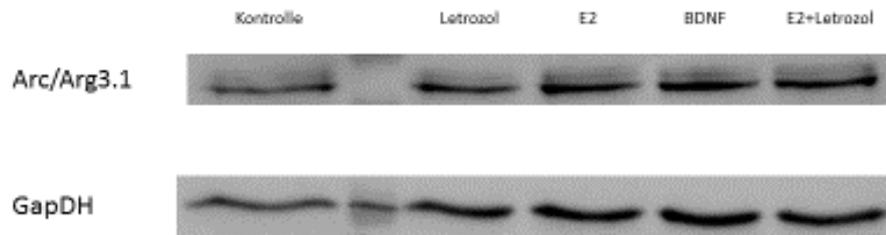


Abbildung 8: Western-Blot der weiblichen Dispersionskulturen nach dreistündiger Behandlung. Jede Bahn entspricht einer Behandlungsgruppe (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle, Letrozol $10^{-7}M$, E2 $10^{-7}M$, BDNF $10^{-8}M$, E2 und Letrozol je $10^{-7}M$ in Kombination. Die Bande des Arc/Arg3.1 liegt bei 55kDa. Die Bande von GapDH liegt bei 35,9 kDa, hier als Ladekontrolle eingesetzt).

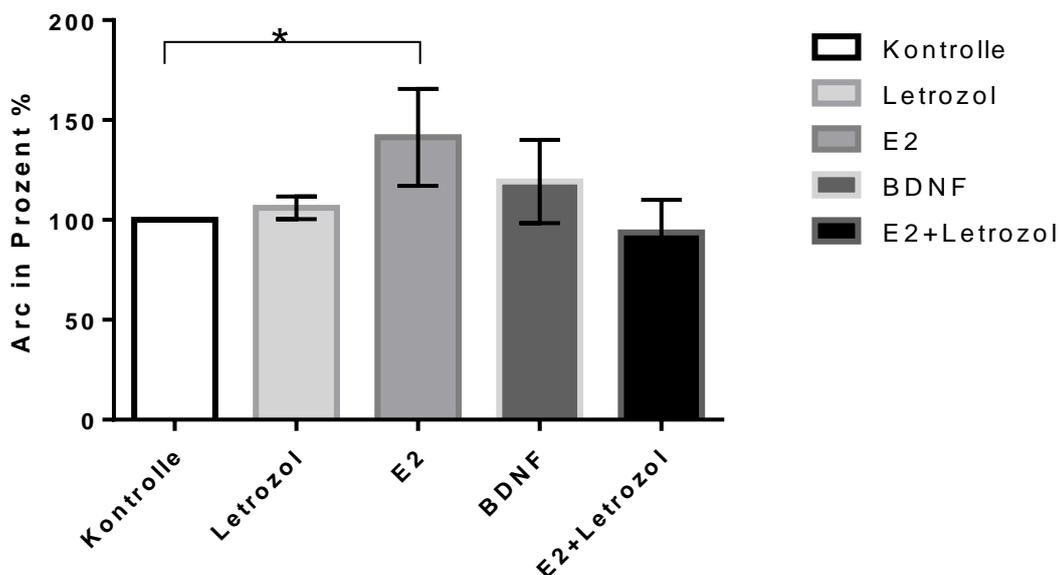


Abbildung 9: Quantitativer Arc/Arg3.1-Proteinnachweis mittels Western-Blot der weiblichen Dispersionskulturen nach dreistündiger Behandlung. Die vertikale Achse zeigt die den Arc/Arg3.1-Wert in % in Relation zur Kontrolle. Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle (weiß) Letrozol $10^{-7}M$ (hellgrau), E2 $10^{-7}M$ (mittelgrau), BDNF $10^{-8}M$ (dunkelgrau) sowie E2 und Letrozol in Kombination je $10^{-7}M$ (schwarz). Angegeben sind die Mittelwerte mit \pm SEM (Standard error of the mean). $n=24$, n entspricht einem Western-Blot aus insgesamt 3 Kulturen

Wie bei der Western-Blot-Analyse nach einstündiger Stimulationszeit wurden auch die Kulturen nach dreistündiger Stimulation auf einen möglichen sexuellen Dimorphismus

untersucht und dazu parallel zu den weiblichen Dispersionskulturen männlichen Kulturen unter den exakt gleichen Bedingungen mitgeführt.

Abbildung 11 zeigt den quantitativen Nachweis von Arc/Arg3.1 in Prozent im Verhältnis zur Kontrollgruppe. Dargestellt sind die männlichen Behandlungsgruppen nach dreistündiger Stimulation mit Letrozol, E2, BDNF, E2 und Letrozol in Kombination.

Die in Abbildung 11 dargestellten Daten zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

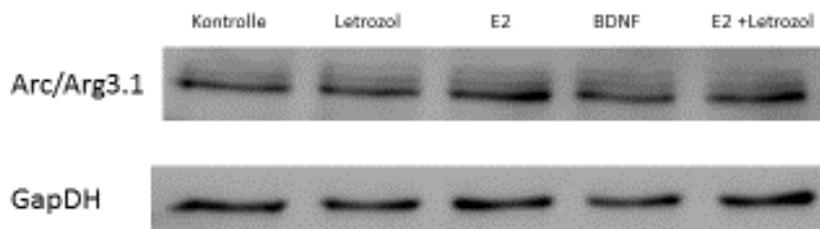


Abbildung 10: Western-Blot der männlichen Dispersionskulturen nach dreistündiger Behandlung. Jede Bahn (von oben nach unten) entspricht einer Behandlungsgruppe (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle, Letrozol $10^{-7}M$, E2 $10^{-7}M$, BDNF $10^{-8}M$, E2 und Letrozol je $10^{-7}M$ in Kombination. Die Bande des Arc/Arg3.1-Proteins liegt bei 55kDa. Die Bande von GapDH liegt bei 35,9 kDa, hier als Ladekontrolle eingesetzt).

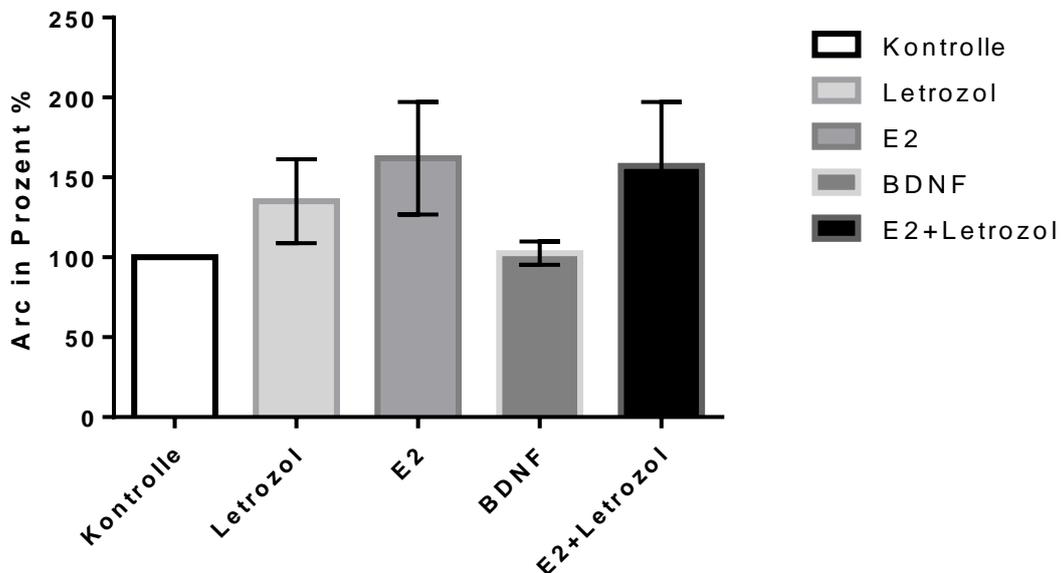


Abbildung 11: Quantitativer Arc/Arg3.1 Proteinnachweis mittels Western-Blot der männlichen Dispersionskulturen nach dreistündiger Behandlung. Die vertikale Achse zeigt die den Arc/Arg3.1-Wert in % in Relation zur Kontrolle. Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen (von links nach rechts): unbehandelte Kontrolle (weiß), Letrozol $10^{-7}M$ (hellgrau), E2 $10^{-7}M$ (mittelgrau), BDNF $10^{-8}M$ (dunkelgrau) sowie E2 und Letrozol in Kombination je $10^{-7}M$ (schwarz). Angegeben sind die Mittelwerte mit $\pm SEM$ (Standard error of the mean). $n = 24$, n entspricht einem Western-Blot aus insgesamt 3 Kulturen

4.3 Quantitativer immunzytochemischer Nachweis von Arc/-Arg3.1 in den Somata

Um im Weiteren zu untersuchen, welchen Einfluss Östrogen auf die Expression von Arc/Arg3.1 hat, wurde Arc/Arg3.1 immunzytochemisch in den Somata der hippocampalen Neuronen nachgewiesen. Dazu wurden die Kulturen nach dem gleichen Schema behandelt, wie unter 4.1. und 4.2 beschrieben. Hippocampale Dispersionskulturen wurden nach Geschlechtern getrennt, 14 Tage kultiviert und anschließend für drei Stunden mit Aqua dest. (unbehandelte Kontrolle), Letrozol, E2, BDNF (Positivkontrolle) sowie E2 und Letrozol in Kombination behandelt, um beurteilen zu können, ob ein eventueller Effekt von exogenem Östrogen durch Letrozol aufgehoben werden kann. In Abbildung 12 sind beispielhaft die Soma-Aufnahmen der weiblichen Dispersionskulturen der verschiedenen Behandlungen dargestellt. Zur Orientierung bei der Aufnahme der Bilder mit dem Mikroskop wurde in den Kulturen parallel das Microtubule-associated-protein 2, Map2 (mittlere Spalte), angefärbt. Es ist zu erkennen, dass die Arc/Arg3.1-Intensität (rechte Zeile) nach der Behandlung mit E2 und BDNF erhöht ist, wohin gegen die Kulturen, die mit Letrozol sowie mit E2 und Letrozol behandelt wurden, sich nicht deutlich von den Aufnahmen der Kontrollkulturen unterscheiden.

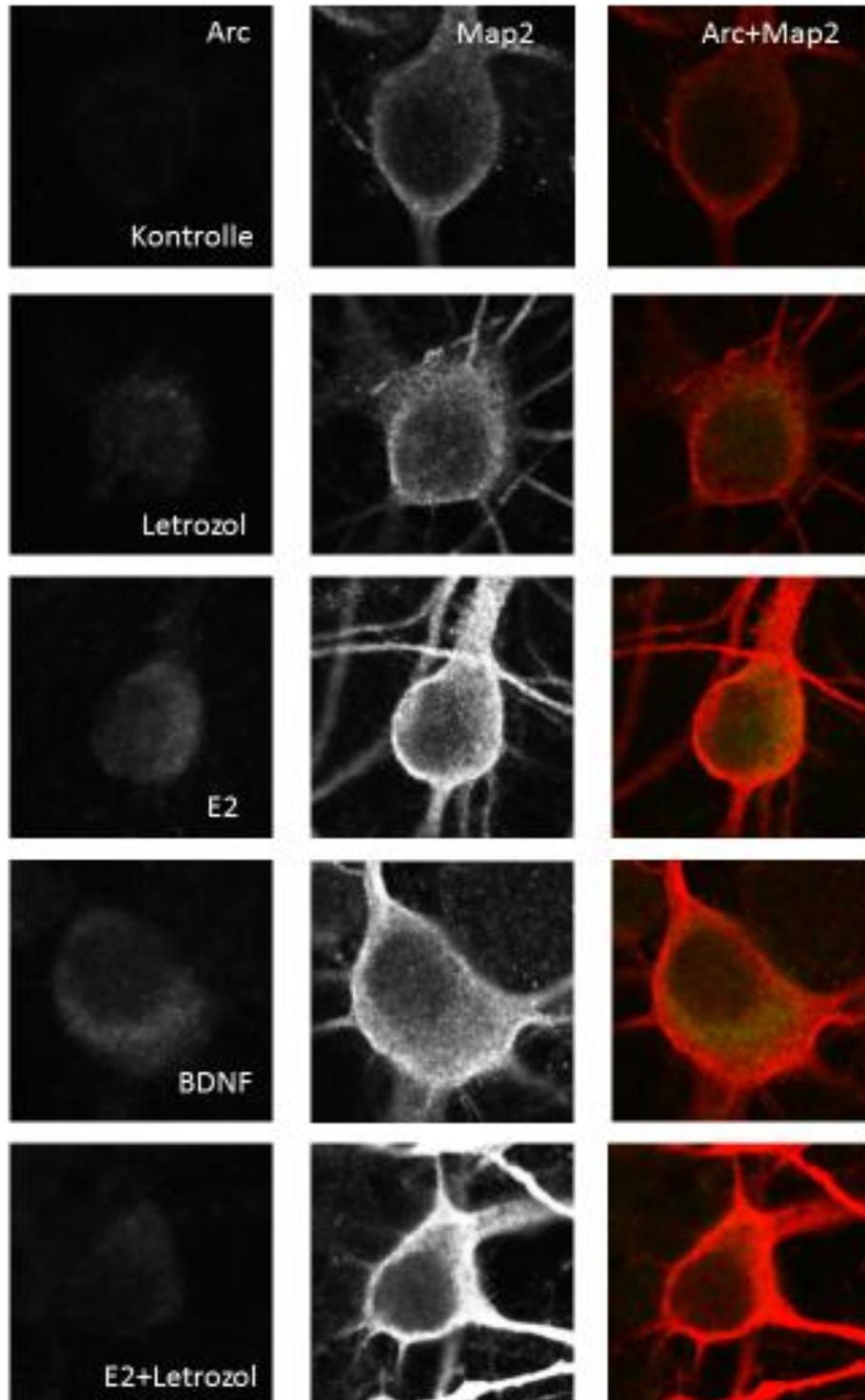


Abbildung 12: Immunzytochemischer Nachweis von Arc/Arg3.1-Protein im Soma weiblicher hippocampaler Neuronen. Die linke Spalte zeigt Arc/Arg3.1-Färbung (grau-weiß), die mittlere Spalte zeigt die Map2-Färbung, die rechte Spalte zeigt Map2-Färbung in rot und Arc/Arg3.1-Färbung in grün in hippocampalen Neuronen. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop gemacht und mit Hilfe von ImageJ dargestellt.

Die quantitative Auswertung der immunzytochemischen Untersuchungen zur Expression von Arc/Arg3.1 ist in Abbildung 13 dargestellt. Diese Abbildung zeigt die Mittelwerte der optischen Dichte von Arc/Arg3.1 der weiblichen Dispersionskulturen. Die Graphik zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mit E2 behandelten weiblichen Kulturen gegenüber der Kontrolle ($p=0,002$). Des Weiteren zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Arc/Arg3.1-Expression nach Stimulation mit BDNF gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,000$). Die Daten belegen zusätzlich einen signifikanten Unterschied der mittleren optischen Dichte von Arc/Arg3.1 zwischen der mit E2 und Letrozol in Kombination und der mit ausschließlich E2 behandelten Gruppen ($p=0,018$).

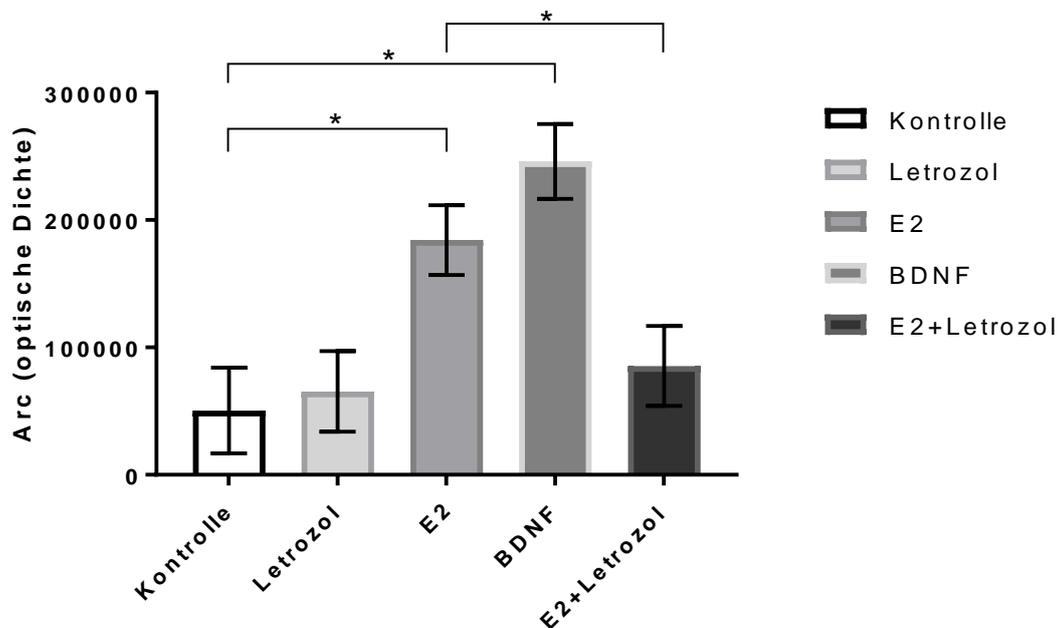


Abbildung 13: Quantitativer immunzytochemischer Nachweis von Arc/Arg3.1 im Soma weiblicher hippocampaler Neuronen. Die vertikale Achse zeigt, die optische Dichte von Arc/Arg3.1 in den Somata der Neuronen. Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen. Die Kulturen sind jeweils für 3 Stunden (von links nach rechts) mit Letrozol $10^{-7}M$ (hellgrau) E2 $10^{-7}M$ (mittelgrau), BDNF $10^{-8} M$ (dunkelgrau) sowie E2 und Letrozol jeweils $10^{-7}M$ (schwarz) behandelt worden. Angegeben sind die Mittelwerte mit $\pm SEM$ (Standard error of the mean). $n = 240$, n entspricht einem Neuron von insgesamt 2 Kulturen

Auch in der immunzytologischen Untersuchung steht die Überprüfung eines möglichen sexuellen Dimorphismus in Bezug auf den Einfluss von Östrogen auf die Arc/Arg3.1-Expression im Vordergrund. Aus diesem Grund wurden die männlichen Kulturen, wie oben beschrieben, in die entsprechenden Behandlungsgruppen sortiert und mit Letrozol, E2, BDNF sowie E2 und Letrozol in Kombination behandelt und zur Kontrolle verglichen.

In Abbildung 14 sind beispielhaft die Soma-Aufnahmen der männlichen Dispersionskulturen der verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Zur Orientierung bei der Aufnahme der Bilder mit dem Mikroskop wurde in den Kulturen parallel eine Map2-Färbung (mittlere Spalte) durchgeführt. Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass die Arc/Arg3.1-Färbung nach Behandlung mit Letrozol und BDNF in männlichen Dispersionskulturen stärker wird, wohingegen die Färbung nach der Behandlung mit E2 sowie nach der Behandlung mit E2 und Letrozol in Kombination keinen deutlichen Unterschied zu den Kontrollgruppen erkennen lässt.

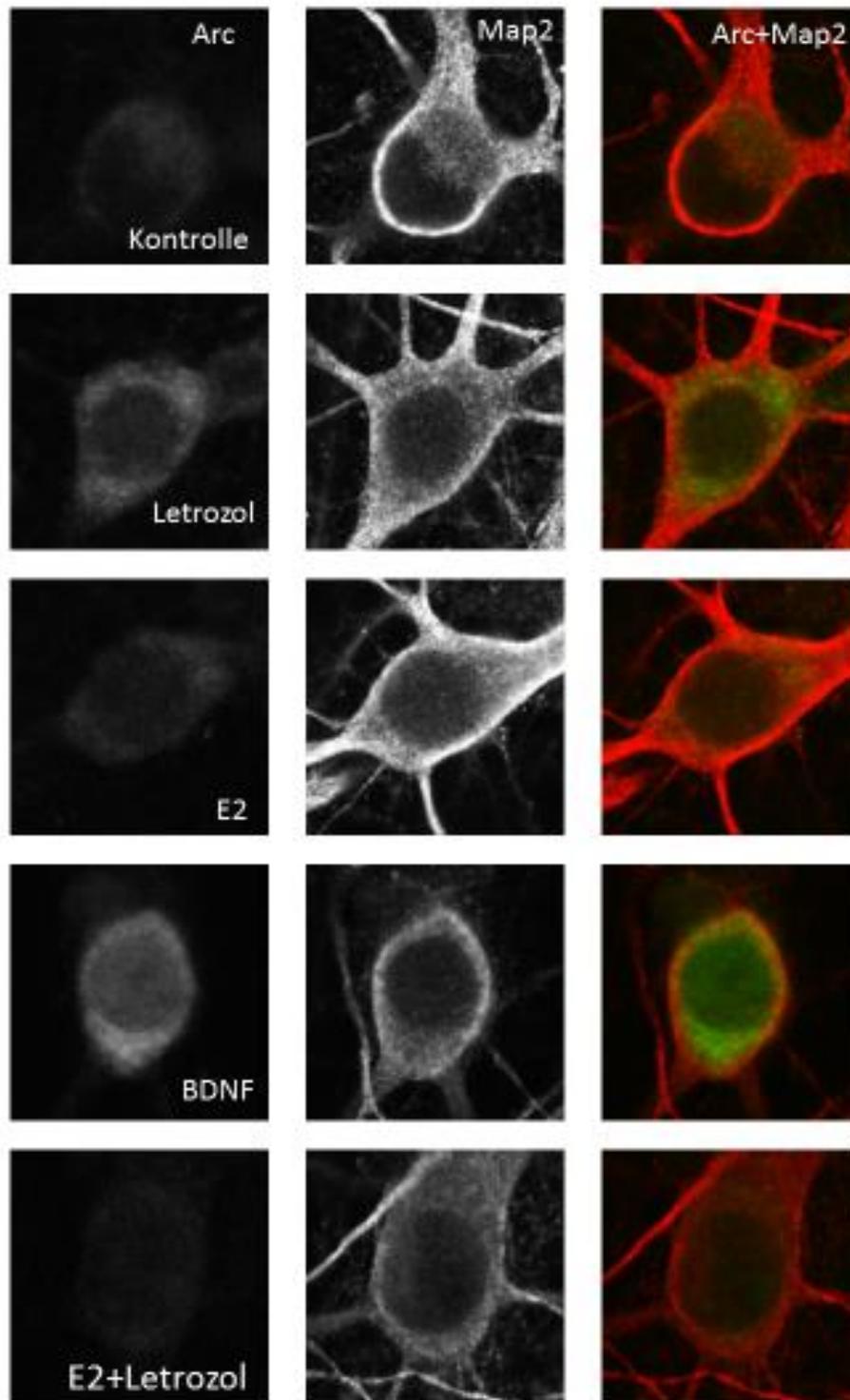


Abbildung 14: Immunzytochemischer Nachweis von Arc/Arg3.1 im Soma männlicher hippocampaler Neuronen. Die linke Spalte zeigt Arc/Arg3.1-Färbung (grau-weiß), die mittlere Spalte zeigt, die Map2-Färbung, die rechte Spalte zeigt die Map2-Färbung in rot und Arc/Arg3.1-Färbung in grün in hippocampalen Neuronen. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop gemacht und mit Hilfe von ImageJ dargestellt.

Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte der optischen Dichte von Arc/Arg3.1 in den Somata der männlichen Dispersionskulturen in der immunzytochemischen Untersuchung. Aus der Graphik wird ersichtlich, dass ein statistisch signifikanter Unterschied der Arc/Arg3.1-Expression zwischen den mit Letrozol ($p \leq 0,000$) sowie mit BDNF ($p \leq 0,000$) behandelten Kulturen zur Kontrollgruppe vorliegt. Des Weiteren zeigt sich ein signifikanter Unterschied der mit E2 ($p = 0,021$) sowie der mit E2 und Letrozol ($p = 0,002$) behandelten Kulturen gegenüber der Kontrollgruppe. Zusätzlich zeigen die Daten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den männlichen Dispersionskulturen, die mit Letrozol behandelt wurden, gegenüber den männlichen Dispersionskulturen, die mit E2 und Letrozol in Kombination behandelt worden sind ($p \leq 0,000$).

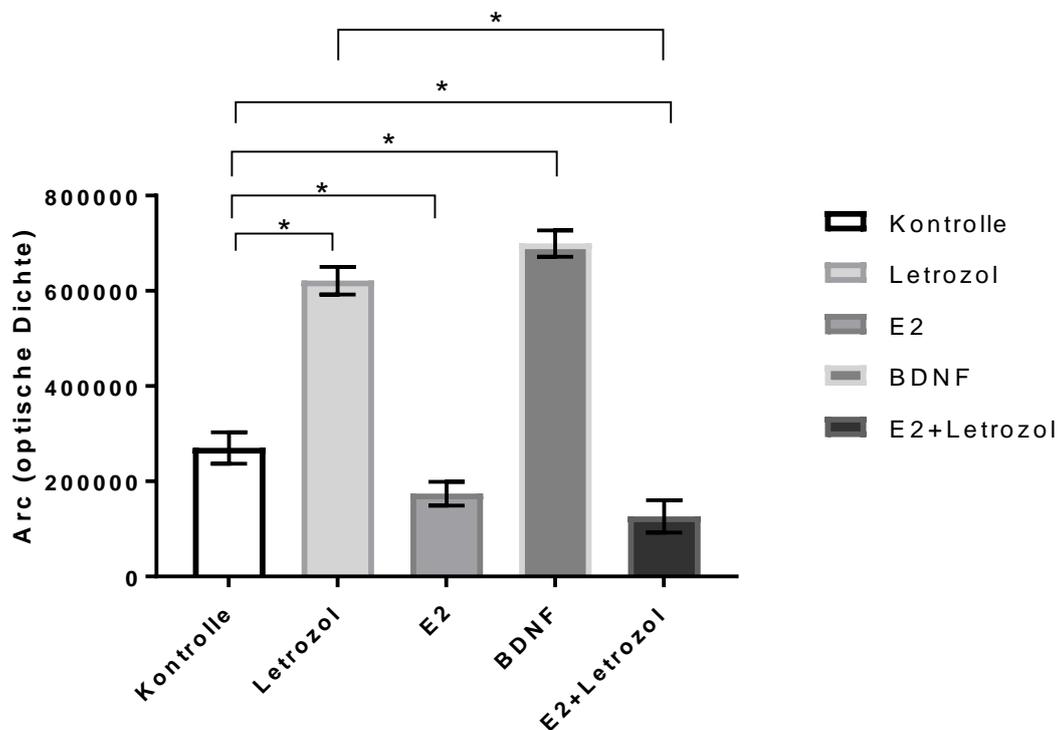


Abbildung 15: Immunzytochemischer Nachweis von Arc/Arg3.1 im Soma männlicher hippocampaler Neuronen. Die vertikale Achse zeigt, die optische Dichte von Arc/Arg3.1 in männlichen Dispersionskulturen im Soma. Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen. Die Kulturen sind jeweils für 3 Stunden (von links nach rechts) mit Letrozol $10^{-7}M$ (hellgrau) E2 $10^{-7}M$ (mittelgrau), BDNF $10^{-8}M$ (dunkelgrau) sowie E2 und Letrozol je $10^{-7}M$ (schwarz) behandelt worden. Angegeben sind die Mittelwerte mit $\pm SEM$ (Standard error of the mean). $n = 240$, n entspricht einem Neuron aus insgesamt 2 Kulturen

4.4 Zählung entlang der Dendriten

Da nach der Stimulation der Arc/Arg3.1-Expression Arc/Arg3.1 in die Dendriten transportiert wird (Oswald Steward et al. 1998; Link et al. 1995), wurden die

Arc/Arg3.1-Anreicherungen entlang der Dendriten untersucht, um Unterschiede in dem Transport und der Anreicherung in den Dendriten feststellen zu können. Dazu wurden die bereits für die Aufnahme der Somata immunzytochemisch gefärbten Dispersionskulturen verwendet.

Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte der Anreicherung von Arc/Arg3.1 entlang der Dendriten auf einer Länge von 60 μm gezählt in den weiblichen Dispersionskulturen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass die Anzahl der Anreicherung von Arc/Arg3.1 in den Dendriten nach der Behandlung mit E2 ($p \leq 0,000$), BDNF ($p \leq 0,000$) sowie E2 und Letrozol in Kombination ($p \leq 0,000$) statistisch signifikant zur Kontrolle ansteigt. Des Weiteren ist aus den Daten ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den E2 Behandlungsgruppe und den Kulturen, die mit E2 und Letrozol in Kombination behandelt wurden, nachweisbar ($p \leq 0,000$).

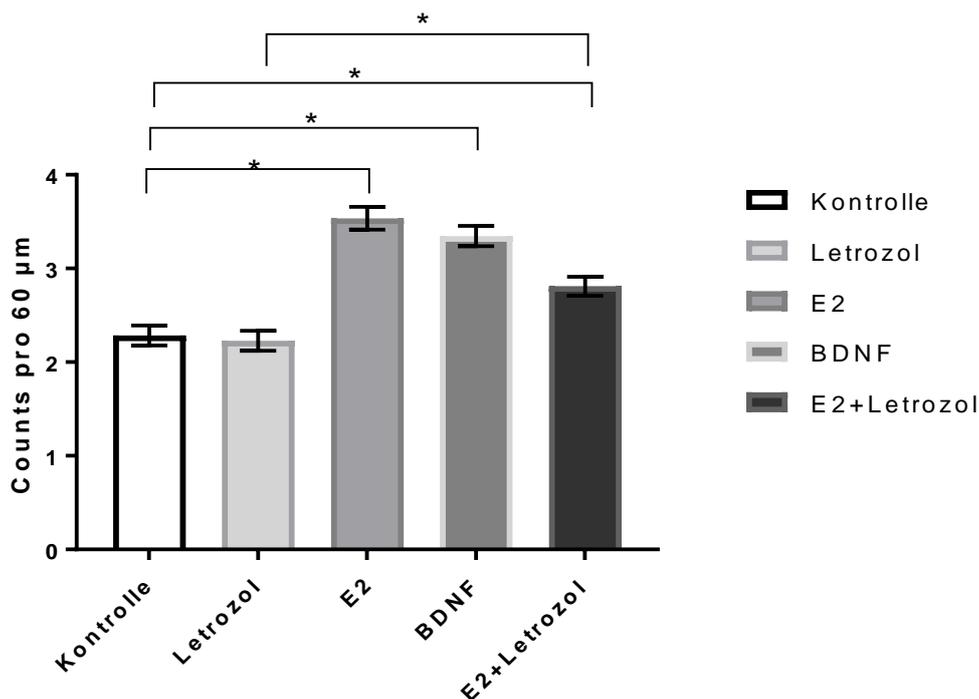


Abbildung 16: Immunzytologie: Quantitative Auswertung der Anreicherungen von Arc/Arg3.1 an entlang der Dendriten in weiblichen hippocampalen Neuronen. Die vertikale Achse zeigt die Mittelwerte der Counts pro 60 μm . Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen. Die Kulturen sind jeweils für 3 Stunden (von links nach rechts) mit Letrozol 10^{-7}M (hellgrau) E2 10^{-7}M (mittelgrau), BDNF 10^{-8}M (dunkelgrau) sowie E2 und Letrozol je 10^{-7}M (schwarz) behandelt worden. Angegeben sind die Mittelwerte mit $\pm\text{SEM}$ (Standard error of the mean). $n = 180$

Abbildung 17 zeigt die Mittelwerte der Anreicherung von Arc/Arg3.1 entlang der Dendriten, die auf einer Länge von 60 μm in den männlichen Dispersionskulturen gezählt wurde. Es stellt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Anreicherungen von Arc/Arg3.1 nach der Behandlung mit Letrozol und BDNF im Vergleich zur Kontrollgruppe dar ($p \leq 0,000$). Es zeigt sich, dass die Kulturen, die mit E2 und Letrozol in Kombination behandelt wurden, sich dem Kontrollniveau angleichen. Dabei zeigen die Daten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mit Letrozol behandelten zu den mit E2 und Letrozol behandelten Kulturen ($p \leq 0,000$).

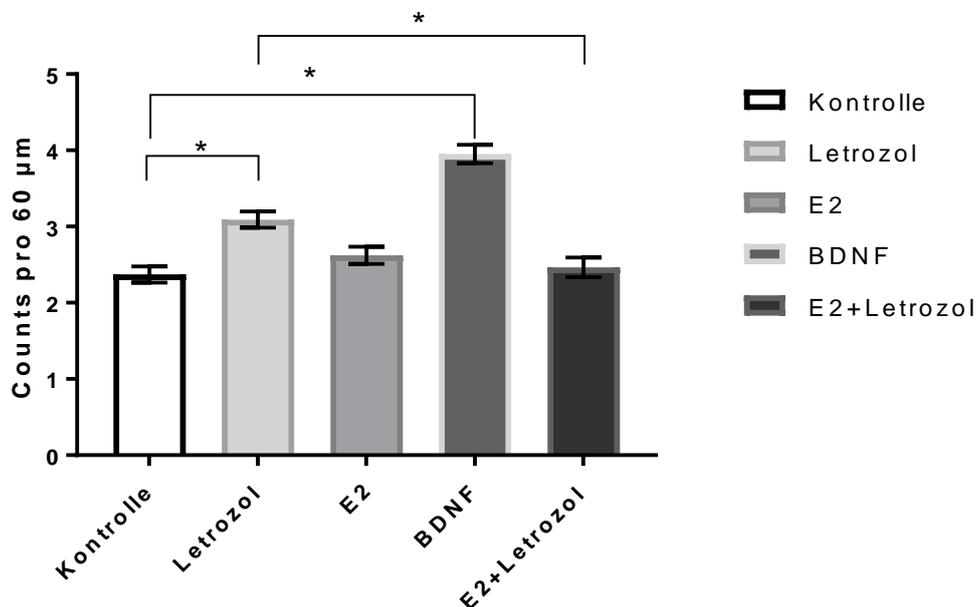


Abbildung 17: Immunzytologie: Quantitative Auswertung der Anreicherungen von Arc/Arg3.1 an entlang der Dendriten in männlichen hippocampalen Neuronen. Die vertikale Achse zeigt die Mittelwerte der Counts pro 60 μm . Die x-Achse zeigt die Behandlungsgruppen. Die Kulturen sind jeweils für 3 Stunden (von links nach rechts) mit Letrozol 10^{-7} (hellgrau) E2 10^{-7} (mittelgrau), BDNF 10^{-8} (dunkelgrau) sowie E2 und Letrozol jeweils 10^{-7} (schwarz) behandelt worden. Angegeben sind die Mittelwerte mit $\pm\text{SEM}$ (Standard error of the mean). $n=180$

5. DISKUSSION

Betrachtet man die Eigenschaften und Funktionen von Östrogen und Arc/Arg3.1 im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Gedächtnisbildung genauer, so fallen einige Parallelen auf. Sowohl Östrogen als auch Arc/Arg3.1 konnten in diversen Studien mit der Modulation der Langzeitpotenzierung in Verbindung gebracht werden und zeigen eine große Bedeutung für die Festigung des Gedächtnisses, insbesondere des Langzeitgedächtnisses. Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, in welchem Verhältnis die beiden zueinander stehen. Beeinflusst die Konzentration von Östrogen die Arc/Arg3.1-Expression in den Neuronen oder sind Östrogen und Arc/Arg3.1 unabhängig voneinander am gleichen Mechanismus beteiligt? Die Ausgangsfrage dieser Studie war die potentielle Regulation der Expression von Arc/Arg3.1 durch Östrogen. Dafür wurden Neuronen aus weiblichen und männlichen embryonalen Ratten getrennt kultiviert und anschließend mit Östrogen, Letrozol sowie Östrogen und Letrozol in Kombination behandelt und anschließend mit verschiedenen Methoden die Expression von Arc/Arg3.1 gemessen. Dadurch sollte gezeigt werden, ob eine erhöhte Zufuhr von Östrogen, bzw. eine erniedrigte Konzentration von endogenem Östrogen, durch die Inhibition der Aromatase mittels Letrozol Einfluss auf die Expression von Arc/Arg3.1 hat. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob in Bezug auf die Regulation von Arc/Arg3.1 ein sexueller Dimorphismus vorliegt und somit in weiblichen und männlichen Organismen Östrogen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Konzentration von Arc/Arg3.1 hat.

5.1 Schnittstellen von Östrogen und Arc/Arg3.1

Der Prozess der Langzeitpotenzierung ist ein entscheidender Mechanismus der Gedächtnisbildung (Muller et al. 2000; Martinet al. 2000). In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass Arc/Arg3.1 an der LTP beteiligt ist. So konnte nicht nur nachgewiesen werden, dass Arc/Arg3.1 und die LTP die gleichen Stimulationsmuster im Gyrus dentatus hervorrufen (Waltereit et al. 2001; Link et al. 1995; Lyford et al. 1995), sondern auch, dass die Blockade der Arc/Arg3.1-Expression zu einer Verminderung der LTP führt (Guzowski et al. 2000). In Versuchen mit Östrogen konnte nachgewiesen werden, dass durch Inhibition der Aromatase und der damit verminderten Östrogenproduktion ebenfalls eine Beeinträchtigung der LTP zu beobachten ist (Vierk et al. 2012). Die Regulation von Synaptophysin konnte sowohl

auf Arc/Arg3.1 als auch auf Östrogen zurückgeführt werden (Fester et al. 2009; Chamniansawat and Chongthammakun 2009).

Im Hinblick auf die beteiligten Signalwege zeigen sich weitere Parallelen. Um die beteiligten Signalwege bei der Wirkung von Östrogen auf die Arc/Arg3.1-Expression zu identifizieren, behandelten Chamniansawat und Kollegen die Zellreihen mit Estrogen-PI-3k- sowie MAPK-Rezeptorantagonisten vor. Nach der Vorbehandlung der Zellkulturen mit Rezeptor-Antagonisten konnte die zuvor durch Östrogen gesteigerte Arc/Arg3.1-Expression aufgehoben werden. Dies legt nahe, dass die Vermittlung der Wirkung von Östrogen auf die Arc/Arg3.1-Expression sowohl über die MAPK als auch über den ER verläuft (Chamniansawat and Chongthammakun 2009).

5.2 Östrogen beeinflusst die Expression von Arc/Arg3.1 in weiblichen hippocampalen Neuronen

In der Western-Blot-Analyse zeigte sich weder in den männlichen noch in den weiblichen Kulturen ein signifikanter Unterschied nach einstündiger Stimulation mit exogenem Östrogen. Hingegen konnte die Arbeitsgruppe um Chamniansawat anhand von SH-SY5Y-Zellen einen signifikanten Anstieg der Arc/Arg3.1-Expression nach einstündiger Stimulation mit Östrogen nachweisen (Chamniansawat and Chongthammakun 2009). In dem hier vorliegenden Experiment wurde im Unterschied zu den Studien von Chamniansawat mit kultivierten embryonalen Neuronen gearbeitet, so dass die benötigten Stimulationszeiten abweichen können. Nach einer Erhöhung der Östrogen-Stimulationszeit auf drei Stunden ließ sich in dem hier gezeigten Experiment ebenfalls ein statistisch signifikanter Anstieg der Arc/Arg3.1-Expression im Vergleich zu Kontrollgruppe mittels Westernblot-Analyse nachweisen. Durch die exogene Zugabe von Östrogen steigt die Expression von Arc/Arg3.1 in weiblichen Kulturen an. Derselbe Effekt war auch in immunzytochemischen Untersuchungen der weiblichen Kulturen nachweisbar. Nach einer dreistündigen Behandlung mit Östrogen ließ sich eine signifikant höhere Arc/Arg3.1-Konzentration in den Somata der weiblichen Neuronen feststellen. Folglich steht Arc/Arg3.1 in weiblichen Zellkulturen unter dem regulatorischen Einfluss von Östrogen. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen von Chamniansawat und Chongthammakun, die anhand von SH-SY5Y-Zellen zeigen konnten, dass die Konzentration von Arc/Arg3.1 durch die Stimulation mit exogenem Östrogen ansteigt (Chamniansawat and Chongthammakun 2009).

Der Transport und die Anreicherung von Arc/Arg3.1 in den Dendriten und den aktivierten Synapsen werden mit einer bedeutenden Rolle für die Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht (Steward et al. 1998; Moga et al. 2004; Rodriguez et al. 2005). Die Konzentration von Arc/Arg3.1 steigt im Rahmen der synaptischen Plastizität nicht nur an, sondern Arc/Arg3.1 wird auch zum Ort der synaptischen Verbindungen transportiert. Dieses betont die Bedeutung von Arc/Arg3.1 für die Gedächtnisbildung. Um nachvollziehen zu können, ob auch der Transport und die Anreicherung von Arc/Arg3.1 in den Dendriten von Östrogen abhängig ist, wurden die Anreicherungen von Arc/Arg3.1 entlang der Dendriten nach oben beschriebenem Schema gezählt. Sich deckend mit den Ergebnissen aus der Immunzytologie und der Westen-Blot-Analyse zeigte sich hier eine signifikant erhöhte Anreicherung von Arc/Arg3.1 in den weiblichen Kulturen nach Behandlung mit Östrogen. Exogene Östrogengabe steigert somit nicht nur die Expression und Konzentration von Arc/Arg3.1 in den Neuronen von weiblichen Kulturen, sondern aktiviert darüber hinaus den Transport von Arc/Arg3.1 in die Dendriten.

5.3 Einfluss Letrozol auf die Expression von Arc/Arg3.1 in weiblichen hippocampalen Neuronen

In einer Reihe von Studien konnte nachgewiesen werden, dass hippocampale Neuronen eine Aromatase besitzen und Östrogen synthetisieren (Prange-Kiel and Rune 2006; Janine Prange-Kiel et al. 2003). Außerdem führt die Behandlung von Neuronen mit dem Aromatase-Inhibitor Letrozol und der daraus resultierenden Verminderung des Östrogenspiegels zu einer Beeinträchtigung der LTP und einer Verringerung der Synapsendichte (Vierk et al. 2012; Fester and Rune 2014). Klinische Untersuchungen zeigen, dass eine Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen die Gedächtnisleistung positiv beeinflusst (Sherwin 1988; Phillips and Sherwin 1992; Maki and Resnick 2001). Ob die Behandlung mit Letrozol, wie im Rahmen der antihormonellen Therapie bei rezeptorpositiven Mammakarzinom, zu einer klinisch relevanten Beeinträchtigung der Kognition führt, ist noch nicht abschließend geklärt. In den hier vorliegenden Experimenten konnte keine signifikante Abnahme der Arc/Arg3.1-Expression in weiblichen Neuronen nach Behandlung mit Letrozol nachgewiesen werden. Die verringerte endogene Östrogenkonzentration durch die Inhibition der Aromatase mittels Letrozol scheint nicht auszureichen, um Einfluss auf die Expression von Arc/Arg3.1 zu haben. Dagegen bewirkte, wie oben aufgeführt, die

Zugabe von hohen (unphysiologischen) Östrogenkonzentrationen eine Zunahme der Arc/Arg3.1-Expression. Dies legt nahe, dass die Wirkung von Letrozol nicht ausreicht, um die endogene Östrogenkonzentration so stark zu senken, dass die Konzentration von Arc/Arg3.1 beeinflusst wird. Dazu passend zeigte sich, dass bei der gleichzeitigen Behandlung mit Östrogen und Letrozol in den immunzytochemischen Untersuchungen der weiblichen Kulturen eine signifikante Reduktion der Arc/Arg3.1-Konzentration im Vergleich zu den nur mit Östrogen behandelten Kulturen gemessen werden konnte. So führte die gleichzeitige Behandlung mit Östrogen und Letrozol zu einer Aufhebung der gesteigerten Arc/Arg3.1-Expression durch exogenes Östrogen. Daraus folgt, dass nicht nur exogen zugeführtes Östrogen eine Wirkung auf die Konzentration von Arc/Arg3.1 hat, sondern auch die Inhibition der Aromatase mittels Letrozol und die damit verbundene Reduktion des endogenen Östrogengehalts die Konzentration von Arc/Arg3.1 beeinflusst.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Arc/Arg3.1-Anreicherung in den Dendriten deckt sich mit dieser Erkenntnis. Hier konnte dargestellt werden, dass es bei der alleinigen Behandlung mit Östrogen zu einer gesteigerten Anreicherung von Arc/Arg3.1 in den Dendriten von weiblichen Kulturen kommt. Dieser steigernde Effekt ließ sich mit der Behandlung von Östrogen und Letrozol in Kombination signifikant reduzieren. Nicht nur die Expression von Arc/Arg3.1 ist somit von Östrogen abhängig und lässt sich durch Hemmung der Aromatase reduzieren, sondern auch der Transport in die Dendriten und Synapsen unterliegt dem Einfluss von Östrogen und lässt sich durch Letrozol hemmen.

5.4 Sexueller Dimorphismus

Geschlechtsspezifische Unterschiede im Rahmen des strukturellen Aufbaus und der Reaktion auf verschiedene Einflussfaktoren des Gehirns, insbesondere des Hippocampus, haben in der Forschung immer mehr Beachtung gefunden (Fester et al. 2011). In allen hier vorliegenden Experimenten fällt auf, dass männliche und weibliche Neuronenkulturen unterschiedlich auf die Behandlung mit Östrogen reagierten. Es war deutlich zu beobachten, dass die Stimulation der weiblichen Kulturen mit Östrogen zu einer Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression führte und dass die gleichzeitige Behandlung der Kulturen mit Östrogen und Letrozol diesen Effekt reduzieren konnte. Dagegen war in den männlichen hippocampalen Neuronen keine Hochregulation von Arc/Arg3.1 nach Stimulation mit Östrogen zu beobachten. Hier zeigte sich in der

immunzytochemischen Untersuchung eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression, während eine deutliche Steigerung der Arc/Arg3.1-Expression nach Behandlung mit Letrozol nachweisbar war. Die Hemmung der Aromatase führt in männlichen Neuronkulturen zu einer Steigerung der Expression von Arc/Arg3.1. In Hinblick auf den Transport von Arc/Arg3.1 in die Dendriten ließ sich analog dazu zeigen, dass es nach der Behandlung der männlichen Neuronkulturen mit Letrozol zu einer vermehrter Arc/Arg3.1-Anreicherung entlang der Dendriten kam. Somit liegt ein sexueller Dimorphismus in Bezug auf den Einfluss von Östrogen auf die Arc/Arg3.1-Konzentration und den Transport in die Dendriten vor.

5.5 Einfluss von Testosteron auf den die Expression von Arc/Arg3.1

In den Untersuchungen der männlichen Neuronkulturen ließ sich beobachten, dass die Behandlung mit Letrozol zu einer Steigerung der Arc/Arg3.1-Konzentration und zu einem vermehrten Transport von Arc/Arg3.1 in die Dendriten führt. Durch Letrozol wird die Aromatase, die die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen katalysiert, blockiert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass durch Hemmung der Aromatase vermehrt Testosteron in den Neuronen vorliegt, welches in den männlichen Zellkulturen vergleichbare Wirkung auf die Expression von Arc/Arg3.1 zeigt, wie sie bei Östrogen in weiblichen Kulturen nachzuweisen ist.

Studien haben gezeigt, dass die Entfernung der Gonaden zu einer verminderten Anzahl von Synapsen im Hippocampus sowohl in weiblichen als auch in männlichen Tieren führt (Gould et al. 1990; Leranth et al. 2004; Li et al. 2012). Allerdings konnte nur in weiblichen Tieren dieser Verlust durch die Injektion von Östrogen ausgeglichen werden. In männlichen Tieren konnte der Verlust der Synapsen durch die Entfernung der Gonaden hingegen mittels Injektionen von DHT, 5 α -Dihydrotestosteron, ein aktiver Metabolit des Testosterons, ausgeglichen werden (Li et al. 2012; Leranth et al. 2004; Leranth et al. 2003).

Die Zusammenschau der Ergebnisse derzeitiger Studien und der Ergebnisse der hier vorliegenden Experimente lässt vermuten, dass Testosteron die Expression von Arc/Arg3.1 in männlichen Neuronen steigert. Um dieses belegen zu können, müssten die hier aufgezeigten Experimente zusätzlich mit einer Stimulation der neuronalen Kulturen mit Testosteron, bzw. DHT, durchgeführt und anschließend die Arc/Arg3.1-Expression bestimmt werden.

5.6 Kritische Beurteilung des experimentellen Modells

Neben der Frage, wodurch sich die Arc/Arg3.1-Expression in männlichen Kulturen beeinflussen lässt, bleibt die Frage nach den involvierten Signalwegen offen. Anhand einer Studie mit SH-SY5Y Zellen konnten Chamniansawat und Kollegen zeigen, dass die MAPK und die PI-3K an der Signalübermittlung beteiligt sind (Chamniansawat and Chongthammakun 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass Östrogen sowohl über genomische als auch über nicht-genomische Effekte wirkt. Für die genomischen Effekte diffundiert Östrogen in die Zelle und bindet dort an den Östrogen-Rezeptor, der wiederum mit einem zweiten Rezeptor dimerisiert, in den Zellkern wandert und dort die Transkription beeinflusst. Für die nicht-genomischen Effekte konnte gezeigt werden, dass durch Östrogen die Konzentration von intrazellulären *second messengern* wie Calcium (Improta-Brears et al. 1999; Morley et al. 1992) und cAMP (Gu and Moss 1996) erhöht wird und es durch Östrogen zu einer Aktivierung der MAPK kommen kann (Migliaccio et al. 1996; Improta-Brears et al. 1999). In weiterführenden Experimenten sollte somit ein besonderes Augenmerk auf diese Signalwege und die beteiligten Rezeptoren gelegt werden.

Die Expression, die Translation und der Transport von Arc/Arg3.1 sind fein reguliert. Arc/Arg3.1-mRNA ist in den Dendriten und Synapsen lokalisiert (Kuhl and Skehel 1998; Link et al. 1995; Lyford et al. 1995). Arc/Arg3.1-mRNA wird nach Aktivierung in die Dendriten transportiert und lagert sich im Bereich der aktiven Synapsen an (Oswald Steward and Worley 2001). In den hier vorliegenden Experimenten wurde stets nur die Proteinkonzentration gemessen. So ist zu vermuten, dass die Konzentration der Arc/Arg3.1-mRNA ebenfalls dem Einfluss von Östrogen unterliegt. In weiterführenden Experimenten sollte zudem die Konzentration, der Transport, sowie die Anreicherung von Arc/Arg3.1-mRNA in den Dendriten untersucht werden.

Wie zuvor eingehend beschrieben ist Arc/Arg3.1 durch verschiedene Mechanismen streng reguliert. Es unterliegt der Degradation durch Ubiquitin (Greer et al. 2011) und wird auch im Hinblick auf die Translation durch den Initiationsfaktor 4E und durch die IRES der mRNA in seiner Konzentration beeinflusst (Bramham et al. 2010; Costa-Mattioli et al. 2009). Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Expression von Arc/Arg3.1 neben Östrogen noch anderen Einflussfaktoren unterliegt.

Zudem wurde in den hier vorliegenden Experimenten mit unphysiologisch hohen Östrogenkonzentrationen gearbeitet. Es bleibt die Frage offen, inwieweit die

Ergebnisse *in vivo* mit physiologischen Hormonkonzentrationen reproduzierbar sind und inwieweit die durch Östrogenkonzentration veränderte Arc/Arg3.1-Expression die Gedächtnisbildung beeinträchtigt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass sowohl Arc/Arg3.1 als auch Östrogen die Gedächtnisbildung, insbesondere die Festigung des Langzeitgedächtnisses, beeinflussen. Arc/Arg3.1 und Östrogen spielen eine bedeutende Rolle für die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP) und tragen somit zur synaptischen Plastizität, der Grundlage für Lernen und Gedächtnis, bei. Die hier vorliegende Arbeit sollte klären, ob Östrogen die Expression und Anreicherung von Arc/Arg3.1 in Somata und Dendriten von hippocampalen Neuronen beeinflusst und inwieweit ein direkter Zusammenhang besteht. Des Weiteren sollte ein möglicher sexueller Dimorphismus hinsichtlich der Östrogen-vermittelten Expression von Arc/Arg3.1 untersucht werden.

Dafür wurden embryonale hippocampale Neuronen nach ihrem Geschlecht getrennt kultiviert und jeweils unter gleichen Bedingungen mit Letrozol, Östrogen(E2), BDNF sowie mit Östrogen und Letrozol in Kombination behandelt. Die Expressionslevel von Arc/Arg3.1 wurden mittels Western-Blot-Analyse und immunzytochemischem Nachweis bestimmt. Des Weiteren wurden nach immunzytochemischer Färbung der Östrogen-vermittelte Transport und die damit verbundene Anreicherung von Arc/Arg3.1 entlang der Dendriten durch Auszählung untersucht.

Weibliche Neuronen zeigten nach der Stimulation mit Östrogen einen Anstieg der Arc/Arg3.1-Expressionslevel sowie einen vermehrten Transport von Arc/Arg3.1 in die Dendriten. Zudem konnte durch die kombinierte Behandlung mit Östrogen und Letrozol im Vergleich zu Kulturen, die nur mit Östrogen behandelt wurden, eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expressionslevel beobachtet werden. Die Hemmung des endogenen Östrogens mittels Letrozol kann somit nicht vollständig durch exogenes Östrogen kompensiert werden.

In männlichen Neuronen ließen sich nach Östrogenbehandlung keine gesteigerten Arc/Arg3.1-Proteinlevel nachweisen. Dagegen führte hier die Behandlung mit Letrozol zu einer Steigerung der Arc/Arg3.1-Expression. Dies ist durch die erhöhte Konzentration von Dihydrotestosteron (DHT), welches durch die Inhibition der Aromatase nicht in Östrogen umgewandelt werden kann, erklärbar. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse einen sexuellen Dimorphismus hinsichtlich der Wirkung von Östrogen auf die Arc/Arg3.1-Expression in primären

hippocampalen Neuronen. Im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Arc/Arg3.1 und der LTP ist in weiblichen Kulturen von einem Einfluss von Östrogen auf die LTP auszugehen.

7. SUMMARY

Previous studies could show that both, Arc/Arg3.1 and estrogen (E2) influence memory formation, especially the consolidation of long-term memory. Arc/Arg3.1 and estrogen play an important role for long-term potentiation (LTP) and therefore contribute to synaptic plasticity, which is the basis of learning and memory. The aim of the present study was to investigate whether estrogen influences the expression and accumulation of Arc/Arg3.1 protein in the somata and dendrites of hippocampale neurons and to what extent a direct connection exists. Furthermore a potential sexual dimorphism with regard to the estrogen-mediated expression of Arc/Arg3.1 was to be analyzed.

For this purpose, female and male embryonic hippocampale neurons were cultivated separately and treated under identical conditions with letrozole, E2, and a combination of E2 and letrozole, respectively. The expression levels of Arc/Arg3.1 were analyzed by western blot and immunocytochemistry. Furthermore, the estrogen-mediated transport and subsequent accumulation of Arc/Arg3.1 along dendrites was examined by counting immunocytochemical stained areas.

After E2 stimulation, female neurons showed an increase of Arc/Arg3.1 expression levels, as well as an augmented transport of Arc/Arg3.1 to dendrites. Moreover, in comparison to cultures that were treated with E2 alone, a reduction of Arc/Arg3.1 expression levels could be observed after a combined treatment with E2 and letrozole. The inhibition of endogenous estrogen by letrozole therefore could not be completely compensated by exogenous estrogen.

However, in male neurons no increase of Arc/Arg3.1 protein levels could be detected after E2 treatment, whereas the treatment with letrozole led to an increase of Arc/Arg3.1 expression. This can be explained by elevated concentration levels of dihydrotestosterone (DHT), which, due to the inhibition of aromatase, cannot be converted to estrogen.

In summary, the results show a sexual dimorphism concerning the impact of estrogen on the Arc/Arg3.1 expression in primary hippocampal neurons. With regard to the connection between Arc/Arg3.1 and LTP, in female cultures an influence of estrogen on LTP can be assumed.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Altman, J, and G D Das. 1965. "Autoradiographic and Histologicalevidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats." *The Journal of Comparative Neurology* 124 (3): 319–335.
- Bailey, C H, and E R Kandel. 1993. "Structural Changes Accompanying Memory Storage." *Annual Review of Physiology* 55 (1): 397–426. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.002145.
- Bliss, T V, and G L Collingridge. 1993. "A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus." *Nature* 361: 31–39. doi:10.1038/361031a0.
- Bliss, T V, and a R Gardner-Medwin. 1973. "Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Unanaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path." *The Journal of Physiology* 232: 357–74. doi:4727084.
- Bourne, Jennifer, and Kristen M. Harris. 2007. "Do Thin Spines Learn to Be Mushroom Spines That Remember?" *Current Opinion in Neurobiology* 17: 381–86. doi:10.1016/j.conb.2007.04.009.
- Bramham, Clive R., Maria N. Alme, Margarethe Bittins, Sjoukje D. Kuipers, Rajeevkumar R. Nair, Balagopal Pai, Debabrata Panja, et al. 2010. "The Arc of Synaptic Memory." *Experimental Brain Research* 200 (123): 125–40. doi:10.1007/s00221-009-1959-2.
- Bramham, Clive R, Paul F Worley, Melissa J Moore, and John F Guzowski. 2008. "The Immediate Early Gene arc/arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (46): 11760–67. doi:10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008.
- Chamniansawat, Siriporn, and Sukumal Chongthammakun. 2009. "Estrogen Stimulates Activity-Regulated Cytoskeleton Associated Protein (Arc) Expression via the MAPK- and PI-3K-Dependent Pathways in SH-SY5Y Cells." *Neuroscience Letters* 452: 130–35. doi:10.1016/j.neulet.2009.01.010.
- Chamniansawat, Siriporn, and Sukumal Chongthammakun. 2010. "Genomic and Non-Genomic Actions of Estrogen on Synaptic Plasticity in SH-SY5Y Cells." *Neuroscience Letters* 470: 49–54. doi:10.1016/j.neulet.2009.12.053.
- Cherrier, M. M., a. M. Matsumoto, J. K. Amory, M. Johnson, S. Craft, E. R. Peskind, and M. a. Raskind. 2007. "Characterization of Verbal and Spatial Memory Changes from Moderate to Supraphysiological Increases in Serum Testosterone in Healthy Older Men." *Psychoneuroendocrinology* 32 (1): 72–79. doi:10.1016/j.psyneuen.2006.10.008.
- Chotiner, J.K, H Khorasani, A.C Nairn, T.J O'Dell, and J.B Watson. 2003. "Adenylyl Cyclase-Dependent Form of Chemical Long-Term Potentiation Triggers Translational Regulation at the Elongation Step." *Neuroscience* 116 (3): 743–52. doi:10.1016/S0306-4522(02)00797-2.
- Costa-Mattioli, Mauro, Wayne S. Sossin, Eric Klann, and Nahum Sonenberg. 2009. "Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory." *Neuron* 61 (1). Elsevier Inc.: 10–26. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.055.
- Czerniawski, Jennifer, Fredrick Ree, Chester Chia, Kartik Ramamoorthi, Yayoi Kumata, and Timothy a Otto. 2011. "The Importance of Having Arc: Expression of

- the Immediate-Early Gene Arc Is Required for Hippocampus-Dependent Fear Conditioning and Blocked by NMDA Receptor Antagonism.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (31): 11200–207. doi:10.1523/JNEUROSCI.2211-11.2011.
- Fester, Lars, Janine Prange-kiel, Lepu Zhou, Julia Böhm, Hubertus Jarry, Michael Schumacher, and Gabriele M Rune. 2011. “Estrogen-Regulated Synaptogenesis in the Hippocampus: Sexual Dimorphism in Vivo but Not in Vitro.” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.11.010.
- Fester, Lars, and Gabriele M. Rune. 2014. “Sexual Neurosteroids and Synaptic Plasticity in the Hippocampus.” *Brain Research*. Elsevier, 1–8. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.033.
- Fester, Lars, Lepu Zhou, Corinna Voets, Christiana Ossig, Janine Prange-kiel, Erik Disteldorf, Christian Peters, et al. 2009. “The Opposing Roles of Estradiol on Synaptic Protein Expression in Hippocampal Cultures,” 123–29. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.08.013.
- Fordham, J N, and C Speed. 1993. “Postmenopausal Hormone Replacement Therapy.” *BMJ (Clinical Research Ed.)* 306 (7): 270. doi:10.1016/S1522-5720(03)00055-2.
- Giorgi, Corinna, Gene W. Yeo, Martha E. Stone, Donald B. Katz, Christopher Burge, Gina Turrigiano, and Melissa J. Moore. 2007. “The EJC Factor eIF4AIII Modulates Synaptic Strength and Neuronal Protein Expression.” *Cell* 130: 179–91. doi:10.1016/j.cell.2007.05.028.
- Goelet, P, V F Castellucci, S Schacher, and E R Kandel. 1986. “The Long and the Short of Long-Term Memory--a Molecular Framework.” *Nature* 322: 419–22. doi:10.1038/322419a0.
- Gould, E, C S Woolley, M Frankfurt, and B S McEwen. 1990. “Gonadal Steroids Regulate Dendritic Spine Density in Hippocampal Pyramidal Cells in Adulthood.” *The Journal of Neuroscience* 10 (April): 1286–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2329377>.
- Greer, Paul L, Rikinari Hanayama, Brenda L Bloodgood, Alan R Mardinly, M Lipton, Steven W Flavell, Tae-kyung Kim, et al. 2011. “NIH Public Access” 140 (5): 704–16. doi:10.1016/j.cell.2010.01.026.The.
- Gu, Q, and R L Moss. 1996. “17 Beta-Estradiol Potentiates Kainate-Induced Currents via Activation of the cAMP Cascade.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (11): 3620–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642406>.
- Guzowski, J F, G L Lyford, G D Stevenson, F P Houston, J L McGaugh, P F Worley, and C a Barnes. 2000. “Inhibition of Activity-Dependent Arc Protein Expression in the Rat Hippocampus Impairs the Maintenance of Long-Term Potentiation and the Consolidation of Long-Term Memory.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (11): 3993–4001. doi:20/11/3993 [pii].
- Hebb, D. O. 1949. “The Organization of Behaviour.” *Organization*, 62. doi:citeulike-article-id:1282862.
- Huber, Cornelia, Richard Von Lossow, Lars Fester, Lepu Zhou, Andrea Bu, Janine Prange-kiel, Hubertus Jarry, and Gabriele M Rune. 2009. “Cholesterol-Promoted Synaptogenesis Requires the Conversion of Cholesterol to Estradiol in the

- Hippocampus” 705: 692–705. doi:10.1002/hipo.20548.
- Improta-Brears, T., A. R. Whorton, F. Codazzi, J. D. York, T. Meyer, and D. P. McDonnell. 1999. “Estrogen-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Requires Mobilization of Intracellular Calcium.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (8): 4686–91. doi:10.1073/pnas.96.8.4686.
- Kato, Asami, Yasushi Hojo, Shimpei Higo, Yoshimasa Komatsuzaki, Gen Murakami, Hinako Yoshino, Masanao Uebayashi, and Suguru Kawato. 2013. “Female Hippocampal Estrogens Have a Significant Correlation with Cyclic Fluctuation of Hippocampal Spines.” *Frontiers in Neural Circuits* 7 (October): 149. doi:10.3389/fncir.2013.00149.
- Kelly, M. P., and S. a. Deadwyler. 2002. “Acquisition of a Novel Behavior Induces Higher Levels of Arc mRNA than Does Overtrained Performance.” *Neuroscience* 110 (4): 617–26. doi:10.1016/S0306-4522(01)00605-4.
- Korb, Erica, Carol L Wilkinson, Ryan N Delgado, Kathryn L Lovero, and Steven Finkbeiner. 2013. “Arc in the Nucleus Regulates PML-Dependent GluA1 Transcription and Homeostatic Plasticity.” *Nature Neuroscience* 16 (7). Nature Publishing Group: 874–83. doi:10.1038/nn.3429.
- Kramár, Enikő a, Lulu Y Chen, Nicholas J Brandon, Christopher S Rex, Feng Liu, Christine M Gall, and Gary Lynch. 2009. “Cytoskeletal Changes Underlie Estrogen’s Acute Effects on Synaptic Transmission and Plasticity.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (41): 12982–93. doi:10.1523/JNEUROSCI.3059-09.2009.
- Kretz, Oliver, Lars Fester, Uwe Wehrenberg, Lepu Zhou, Silke Brauckmann, Shanting Zhao, Janine Prange-kiel, et al. 2004. “Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis” 24 (26): 5913–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.5186-03.2004.
- Kretz, Oliver, Lars Fester, Uwe Wehrenberg, Lepu Zhou, Silke Brauckmann, Shanting Zhao, Janine Prange-Kiel, et al. 2004. “Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (26): 5913–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.5186-03.2004.
- Kuhl, Dietmar, and Paul Skehel. 1998. “Dendritic Localization of mRNAs.” *Current Opinion in Neurobiology* 8: 600–606. doi:10.1016/S0959-4388(98)80087-1.
- Leranth, Csaba, Tibor Hajszan, and Neil J MacLusky. 2004. “Androgens Increase Spine Synapse Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Ovariectomized Female Rats.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (2): 495–99. doi:10.1523/JNEUROSCI.4516-03.2004.
- Leranth, Csaba, Ors Petnehazy, and Neil J MacLusky. 2003. “Gonadal Hormones Affect Spine Synaptic Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Male Rats.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (5): 1588–92. doi:23/5/1588 [pii].
- Li, Meihua, Miwako Masugi-Tokita, Keiko Takanami, Shunji Yamada, and Mitsuhiro Kawata. 2012. “Testosterone Has Sublayer-Specific Effects on Dendritic Spine Maturation Mediated by BDNF and PSD-95 in Pyramidal Neurons in the Hippocampus CA1 Area.” *Brain Research* 1484. Elsevier: 76–84. doi:10.1016/j.brainres.2012.09.028.
- Link, W, U Konietzko, G Kauselmann, M Krug, B Schwanke, U Frey, and D Kuhl. 1995.

- “Somatodendritic Expression of an Immediate Early Gene Is Regulated by Synaptic Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (June): 5734–38. doi:10.1073/pnas.92.12.5734.
- Lyford, G L, K Yamagata, W E Kaufmann, C a Barnes, L K Sanders, N G Copeland, D J Gilbert, N a Jenkins, a a Lanahan, and P F Worley. 1995. “Arc, a Growth Factor and Activity-Regulated Gene, Encodes a Novel Cytoskeleton-Associated Protein That Is Enriched in Neuronal Dendrites.” *Neuron* 14: 433–45. doi:10.1016/0896-6273(95)90299-6.
- Maki, P M, and S M Resnick. 2001. “Effects of Estrogen on Patterns of Brain Activity at Rest and during Cognitive Activity: A Review of Neuroimaging Studies.” *NeuroImage* 14: 789–801. doi:10.1006/nimg.2001.0887.
- Martin, L., C. W. Emmens, and R. I. Cox. 1960. “The Effects of Oestrogens and Anti-Oestrogens on Early Pregnancy in Mice.” *The Journal of Endocrinology* 20: 299–306. doi:10.1677/joe.0.0200299.
- Martin, S J, P D Grimwood, and R G Morris. 2000. “Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis.” *Annual Review of Neuroscience* 23 (Hebb 1949): 649–711. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.649.
- Messaoudi, Elhoucine, Tambudzai Kanhema, Jonathan Soulé, Adrian Tiron, Girstaute Dageyte, Bruno da Silva, and Clive R Bramham. 2007. “Sustained Arc/Arg3.1 Synthesis Controls Long-Term Potentiation Consolidation through Regulation of Local Actin Polymerization in the Dentate Gyrus in Vivo.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (39): 10445–55. doi:10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007.
- Migliaccio, A, M Di Domenico, G Castoria, A De Falco, P Bontempo, E Nola, and F Auricchio. 1996. “Tyrosine kinase/p21ras/MAP-Kinase Pathway Activation by Estradiol-Receptor Complex in MCF-7 Cells.” *The EMBO Journal* 15 (6): 1292–1300.
- Moga, D E, M E Calhoun, A Chowdhury, P Worley, J H Morrison, and M L Shapiro. 2004. “Activity-Regulated Cytoskeletal-Associated Protein Is Localized to Recently Activated Excitatory Synapses.” *Neuroscience* 125 (1): 7–11. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.02.004.
- Morissette, M, M Le Saux, M D’Astous, S Jourdain, S Al Sweidi, N Morin, E Estrada-Camarena, Pablo Mendez, Luis Miguel Garcia-Segura, and T Di Paolo. 2008. “Contribution of Estrogen Receptors Alpha and Beta to the Effects of Estradiol in the Brain.” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108 (3–5): 327–38. doi:10.1016/j.jsbmb.2007.09.011.
- Morley, Paul, James F Whitfield, Barbara C Vanderhyden, Benjamin K Tsang, and Jean-louis Schwartz. 1992. “A New, Nongenomic Estrogen Action: The Rapid Release of Intracellular Calcium.” *Endocrinology* 131 (3): (. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16393/pdf/pq004686.pdf>).
- Muller, D, N Toni, and P a Buchs. 2000. “Spine Changes Associated with Long-Term Potentiation.” *Hippocampus* 10 (June): 596–604. doi:10.1002/1098-1063(2000)10:5<596::AID-HIPO10>3.0.CO;2-Y.
- Okuno, Hiroyuki, Kaori Akashi, Yuichiro Ishii, Nan Yagishita-Kyo, Kanzo Suzuki, Mio Nonaka, Takashi Kawashima, et al. 2012. “Inverse Synaptic Tagging of Inactive Synapses via Dynamic Interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β .” *Cell* 149 (4). Elsevier Inc.: 886–98. doi:10.1016/j.cell.2012.02.062.

- Park, Sungjin, Joo Min Park, Sangmok Kim, Jin Ah Kim, Jason D. Shepherd, Constance L. Smith-Hicks, Shoaib Chowdhury, et al. 2008. "Elongation Factor 2 and Fragile X Mental Retardation Protein Control the Dynamic Translation of Arc/Arg3.1 Essential for mGluR-LTD." *Neuron* 59: 70–83. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.023.
- Peebles, Carol L, Jong Yoo, Myo T Thwin, Jorge J Palop, Jeffrey L Noebels, and Steven Finkbeiner. 2010. "Arc Regulates Spine Morphology and Maintains Network Stability in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (42): 18173–78. doi:10.1073/pnas.1006546107.
- Phillips, S. M., and B. B. Sherwin. 1992. "Effects of Estrogen on Memory Function in Surgically Menopausal Women." *Psychoneuroendocrinology* 17 (5): 485–95. doi:10.1016/0306-4530(92)90007-T.
- Plath, Niels, Ora Ohana, Björn Dammermann, Mick L. Errington, Dietmar Schmitz, Christina Gross, Xiaosong Mao, et al. 2006. "Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories." *Neuron* 52: 437–44. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.024.
- Pocklington, Andrew J, Mark Cumiskey, J Douglas Armstrong, and Seth G N Grant. 2006. "The Proteomes of Neurotransmitter Receptor Complexes Form Modular Networks with Distributed Functionality Underlying Plasticity and Behaviour." *Molecular Systems Biology* 2: 2006.0023. doi:10.1038/msb4100041.
- Prange-Kiel, Janine, Hubertus Jarry, Michael Schoen, Patrick Kohlmann, Christina Lohse, Lepu Zhou, and Gabriele M. Rune. 2008. "Gonadotropin-Releasing Hormone Regulates Spine Density via Its Regulatory Role in Hippocampal Estrogen Synthesis." *Journal of Cell Biology* 180 (2): 417–26. doi:10.1083/jcb.200707043.
- Prange-Kiel, Janine, Tobias Schmutterer, Lars Fester, Lepu Zhou, Philipp Imholz, Nicola Brandt, Ricardo Vierk, Hubertus Jarry, and Gabriele M Rune. 2013. "Endocrine Regulation of Estrogen Synthesis in the Hippocampus?" *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 48 (2). Elsevier B.V.: 49–64. doi:10.1016/j.proghi.2013.07.002.
- Prange-Kiel, Janine, Uwe Wehrenberg, Hubertus Jarry, and Gabriele M. Rune. 2003. "Para/autocrine Regulation of Estrogen Receptors in Hippocampal Neurons." *Hippocampus* 13: 226–34. doi:10.1002/hipo.10075.
- Prange-Kiel, J, and G M Rune. 2006. "Direct and Indirect Effects of Estrogen on Rat Hippocampus." *Neuroscience* 138 (3): 765–72. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.05.061.
- Raineteau, Olivier, Lotty Rietschin, and Beat H Ga. 2004. "Neurogenesis in Hippocampal Slice Cultures" 26: 241–50. doi:10.1016/j.mcn.2004.01.003.
- Rodriguez, José J., H. a. Davies, a. T. Silva, I. E J De Souza, C. J. Peddie, F. M. Colyer, C. L. Lancashire, et al. 2005. "Long-Term Potentiation in the Rat Dentate Gyrus Is Associated with Enhanced Arc/Arg3.1 Protein Expression in Spines, Dendrites and Glia." *European Journal of Neuroscience* 21 (May 2004): 2384–96. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04068.x.
- Sheng, M., and M. E. Greenberg. 1990. "The Regulation and Function of c-Fos and Other Immediate Early Genes in the Nervous System." *Neuron* 4: 477–85. doi:10.1016/0896-6273(90)90106-P.
- Sheng, Morgan, and Myung Jong Kim. 2002. "Postsynaptic Signaling and Plasticity

- Mechanisms." *Science (New York, N.Y.)* 298 (October): 776–80. doi:10.1126/science.1075333.
- Shepherd, Jason D, and Mark F Bear. 2011. "New Views of Arc, a Master Regulator of Synaptic Plasticity." *Nature Neuroscience* 14 (3). Nature Publishing Group: 279–84. doi:10.1038/nn.2708.
- Sherwin, B B. 1988. "Estrogen And/or Androgen Replacement Therapy and Cognitive Functioning in Surgically Menopausal Women." *Psychoneuroendocrinology* 13 (4): 345–57. doi:10.1016/0306-4530(88)90060-1.
- Steward, O. 2002. "Local Synthesis of Proteins at Synaptic Sites on Dendrites: Role in Synaptic Plasticity and Memory Consolidation?" *Neurobiology of Learning and Memory* 78 (3): 508–27. doi:10.1006/nlme.2002.4102.
- Steward, Oswald, Oswald Steward, Christopher S Wallace, Christopher S Wallace, Gregory L Lyford, Gregory L Lyford, Paul F Worley, and Paul F Worley. 1998. "Synaptic Activation Causes the mRNA for the IEG." *Cell* 21: 741–51.
- Steward, Oswald, and Paul F. Worley. 2001. "Selective Targeting of Newly Synthesized Arc mRNA to Active Synapses Requires NMDA Receptor Activation." *Neuron* 30: 227–40. doi:10.1016/S0896-6273(01)00275-6.
- Vierk, R., G. Glassmeier, L. Zhou, N. Brandt, L. Fester, D. Dudzinski, W. Wilkars, et al. 2012. "Aromatase Inhibition Abolishes LTP Generation in Female But Not in Male Mice." *Journal of Neuroscience* 32 (24): 8116–26. doi:10.1523/JNEUROSCI.5319-11.2012.
- Waltereit, R, B Dammermann, P Wulff, J Scafidi, U Staubli, G Kauselmann, M Bundman, and D Kuhl. 2001. "Arg3.1/Arc mRNA Induction by Ca²⁺ and cAMP Requires Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase/extracellular Regulated Kinase Activation." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (15): 5484–93. doi:10.1523/JNEUROSCI.5319-11.2012 [pii].
- Waung, Maggie W., Brad E. Pfeiffer, Elena D. Nosyreva, Jennifer a. Ronesi, and Kimberly M. Huber. 2008. "Rapid Translation of Arc/Arg3.1 Selectively Mediates mGluR-Dependent LTD through Persistent Increases in AMPAR Endocytosis Rate." *Neuron* 59: 84–97. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.014.
- Woolley, C S, E Gould, M Frankfurt, and B S McEwen. 1990. "Naturally Occurring Fluctuation in Dendritic Spine Density on Adult Hippocampal Pyramidal Neurons." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 10 (December): 4035–39.
- WOOLLEY, D. E., and P. S. TIMIRAS. 1962. "The Gonad-Brain Relationship: Effects of Female Sex Hormones on Electroshock Convulsions in the Rat." *Endocrinology* 70 (September): 196–209.
- Xia, Z, H Dudek, C K Miranti, and M E Greenberg. 1996. "Calcium Influx via the NMDA Receptor Induces Immediate Early Gene Transcription by a MAP kinase/ERK-Dependent Mechanism." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (17): 5425–36.
- Yaffe, K, G Sawaya, I Lieberburg, and D Grady. 1998. "Estrogen Therapy in Postmenopausal Women: Effects on Cognitive Function and Dementia." *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 279 (9): 688–95.
- Zhou, Lepu, Lars Fester, Breda Von Blittersdorff, Basel Hassu, Henning Nogens, Janine Prange-Kiel, Hubertus Jarry, Karl Wegscheider, and Gabriele M. Rune. 2010. "Aromatase Inhibitors Induce Spine Synapse Loss in the Hippocampus of

Ovariectomized Mice." *Endocrinology* 151 (January): 1153–60.
doi:10.1210/en.2009-0254.

9. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1, Trenngel	27
Tabelle 2, Sammelgel.....	28

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Hippocampusschnitt in Nissel-Färbung.....	4
Abbildung 2, Übersichtsaufnahme mit KEYENCE	33
Abbildung 3, Arc/Arg3.1 Färbung KEYENCE-Mikroskopie	33
Abbildung 4, Western-Blot der weiblichen Dispersionkulturen	34
Abbildung 5, Quantitativer Arc/Arg3.1-Proteinnachweis.....	35
Abbildung 6, Western-Blot der männlichen Dispersionkulturen.....	35
Abbildung 7, Quantitativer Arc/Arg3.1-Proteinnachweis.....	33
Abbildung 8, Western-Blot der weiblichen Dispersionkulturen	37
Abbildung 9, Quantitativer Arc/Arg3.1-Proteinnachweis.....	37
Abbildung 10, Western-Blot der männlichen Dispersionkulturen.....	38
Abbildung 11, Quantitativer Arc/Arg3.1 Proteinnachweis.....	38
Abbildung 12, Immunzytochemischer Nachweis von Arc/Arg3.1	40
Abbildung 13, Quantitativer immunzytochemischer Nachweis	41
Abbildung 14, Immunzytochemischer Nachweis von Arc/Arg3.1	43
Abbildung 15, Immunzytochemischer Nachweis von Arc/Arg3.1	44
Abbildung 16, Arc/Arg3.1 Anreicherung in den Dendriten	45
Abbildung 17, Arc/Arg3.1 Anreicherung in den Dendriten	46

10. LEBENSLAUF

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11. DANKSAGUNG

Frau Professor Doktor G. Rune danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die sehr gute Betreuung und kontinuierliche Unterstützung.

Besonderen Dank schulde ich dem gesamten Team des neuroanatomischen Instituts der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Helga, Christina, Christiane und Herdis, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Fester für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und den stets guten Ratschlägen und motivierenden Worten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich in der gesamten Zeit unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Diese Arbeit ist Hannelore Collatz gewidmet.

12. 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: