

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Neuroanatomie  
Zentrum für Experimentelle Medizin

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

## **Reguliert Östrogen die HCN1-Kanal-Verteilung in der CA1-Region des Hippocampus?**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Florian Heinrich Neumüller  
aus Burglengenfeld

Hamburg 2018

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.06.2018**

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

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Roland Bender**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Axel Neu**

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
2. Abkürzungsverzeichnis	7
3. Einleitung	10
3.1. Gegenstand der Arbeit	10
3.2. Der Hippocampus	10
3.3. Die HCN-Kanäle	12
3.3.1. Die HCN1-Kanäle	14
3.4. Östrogen im Hippocampus	15
3.4.1. Östrogen-Rezeptoren	16
3.5. Reelin	16
3.5.1. Der Reelin-Signalweg	17
3.6. Arbeitshypothese und Durchführung der Arbeit	19
4. Materialien	20
4.1. Chemikalien	20
4.2. Antikörper	21
4.3. Geräte	21
4.4. Software	22
4.5. Ansätze für Lösungen	23
5. Methoden	25
5.1. Tiere	25
5.2. Präparation der Gewebekulturen	26
5.3. Behandlung der Gewebekulturen	27
5.4. Herstellung von Gefrierschnitten	29
5.5. Immunhistochemie an Gewebekulturschnitten	29
5.6. Gewebevorbereitung und Immunhistochemie an Gehirnschnitten	30
5.7. Mikroskopie und Auswertung der Immunhistochemie	32
5.7.1. Gewebekulturen von Ratten	32
5.7.2. Gehirnschnitte von Mäusen	34
5.8. Graphische Darstellung und statistische Analyse	34

6. Ergebnisse	35
6.1. Die HCN1-Verteilung <i>in vivo</i> wird <i>in vitro</i> reproduziert	35
6.2. Östrogen (E2)-Gabe verstärkt die HCN1-Anreicherung im Stratum lacunosum-moleculare	36
6.3. Keine signifikante Veränderung nach Inhibition der hippocampalen Aromatase durch Letrozol	37
6.4. Untersuchungen zur Rolle von E2-Rezeptoren	38
6.5. Untersuchungen zur Rolle von Reelin <i>in vitro</i>	44
6.6. Untersuchungen zur Rolle von Reelin <i>in vivo</i>	47
6.7 Untersuchung der HCN1-Verteilung in der CA1-Region <i>in vivo</i> in Abhängigkeit des weiblichen Zyklus	49
7. Diskussion	51
7.1. Estrogen versus Reelin	51
7.2. Mögliche E2-Signalwege zur Beeinflussung der HCN1-Verteilung	53
7.3. Warum sind keine Effekte des weiblichen Zyklus auf die HCN1-Verteilung nachweisbar?	55
7.4. Mögliche klinische Relevanz der Befunde	56
8. Zusammenfassung	58
8.1. Summary	59
9. Literaturverzeichnis	60
10. Danksagung	68
11. Curriculum Vitae	69
12. Eidesstattliche Versicherung	70

## 1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:

Abb. 1: Schematische Darstellung der einzelnen Schichten des Hippocampus

Abb. 2: Aufbau eines HCN-Kanals mit cAMP-Ligand

Abb. 3: Überblick Estradiol-Synthese aus Testosteron durch Aromatase

Abb. 4: Signalwege des Glykoprotein Reelin mit seinen Rezeptoren

Abb. 5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Anlegen hippocampaler Gewebekulturen

Abb. 6: Beispiel für eine Übersichtsaufnahme in der DAPI-Färbung in 20facher Vergrößerung

Abb. 7: Detailaufnahme aus der CA1-Region einer Gewebekultur nach HCN1-Immunfärbung

Abb. 8: Vergleich Hippocampus *in vivo* und *in vitro*

Abb. 9: Experimente mit E2

Abb. 10: Experimente mit Letrozol

Abb.11: Experimente mit dem ER $\alpha$ -Agonisten PPT

Abb. 12: Experimente mit dem ER $\beta$ -Agonisten DPN

Abb. 13: Experimente mit dem GPER1-Agonisten G1

Abb. 14: Experimente mit dem GPER1-Antagonisten G36 und E2

Abb. 15: Experimente mit dem Reelin-Rezeptor-Antagonisten GST-RAP und E2

Abb. 16: Experimente mit dem Reelin-Rezeptor-Antagonisten GST-RAP (10  $\mu\text{g/ml}$ , DIV5-11)

Abb. 17: Experimente mit dem Reelin-Rezeptor-Antagonisten GST-RAP (50  $\mu\text{g/ml}$ , DIV8-10)

Abb. 18: Vergleich der HCN1-Verteilung in der CA1-Region *in vitro* nach Zugabe von GST oder GST-RAP

Abb. 19: Verteilung von HCN1 in der CA1-Region nach induzierter Reelin-Deletion *in vivo*

Abb. 20: Vergleich der HCN1-Verteilung in der CA1-Region in adulten weiblichen Mäusen in Abhängigkeit von der Zyklusphase (Proestrus vs. Diestrus)

Tabellen:

Tab. 1: Eingesetzte Chemikalien und deren Hersteller

Tab. 2: Genutzte Antikörper und deren Hersteller

Tab. 3: Geräte und Hilfsmittel zur Realisierung der Experimente

Tab. 4: Softwareprogramme zur Auswertung und zum Verfassen der Dissertation

## 2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APOER 2	<i>apolipoprotein E receptor 2</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CA	Cornu ammonis
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK 5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
cKO	<i>conditional Knockout</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CREB	<i>Cyclic AMP-response element binding protein</i>
CRZ	Cajal-Retzius-Zellen
DAB 1	<i>disabled 1</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DG	<i>Dentate gyrus</i> (dt. Gyrus dentatus)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i> ; dt:Desoxyribonucleinsäure
DPN	Diarylpropionitril
DTT	Dithiothreitol
E2	17β-Estradiol
EC	Entorhinaler Cortex
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ETOH	Ethanol
ERα	Estrogen Rezeptor α

ERβ	Estrogen Rezeptor β
ERE	<i>Estrogen response element</i>
GD	Gyrus dentatus
GPER1 (GPR 30)	<i>G-protein-Coupled Estrogen Receptor</i> , dt.: G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GSK3β	Glycogen-Synthase-Kinase 3β
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	<i>Hank`s Balanced Salt Solution</i>
HCL	Hydrogenchlorid
HCN	<i>Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KTL	Kontrolle
LET	Letrozol
LTP	<i>Long-term potentiation</i> (dt. Langzeit-Potenzierung)
LRP	Lipoprotein- <i>related</i> Rezeptor
M	Mol
mM	Millimol
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
mTLE	mesiale Temporallappenepilepsie
mTor	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPT	4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
RAP	<i>receptor-associated protein</i>
SFK	<i>SRC family tyrosine kinases</i>
Src	Sarcoma
Str. gr.	Stratum granulosum
Str. pyr.	Stratum pyramidale
Str. lac/mol	Stratum lacunosum-moleculare



Sub	Subiculum
TRIP8b	<i>Tetratricopeptide repeat-containing Rab8b interacting protein</i>
WT	Wildtyp
VLDLR	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

## 3. Einleitung

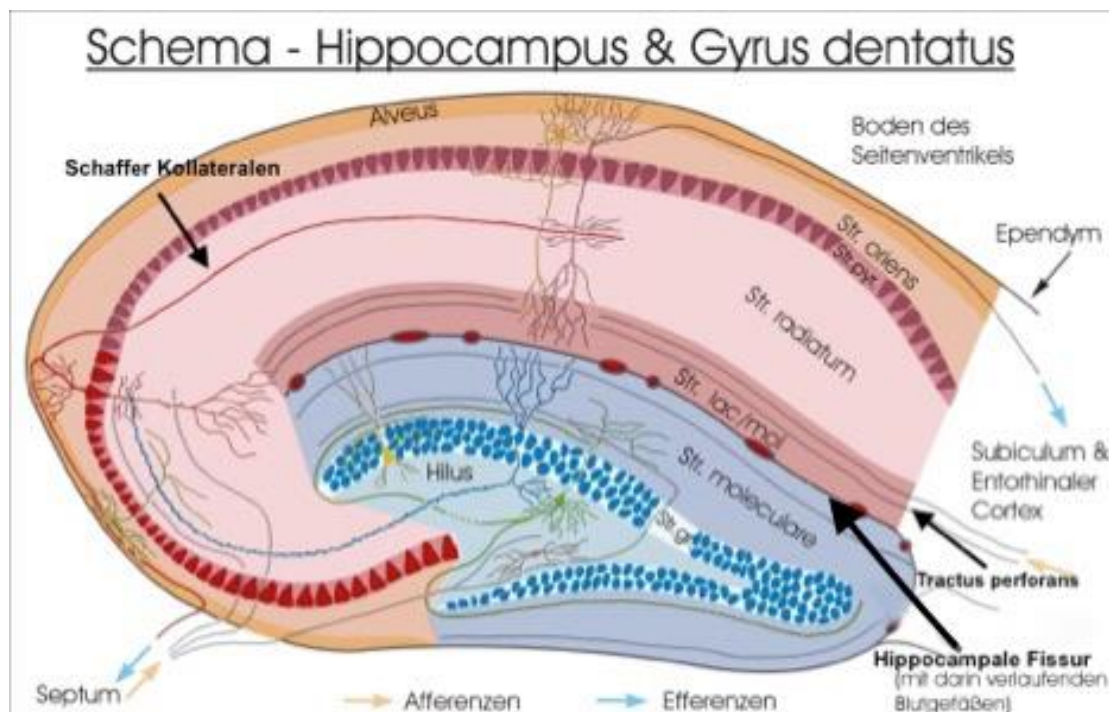
### 3.1. *Gegenstand der Arbeit*

In der vorliegenden Dissertation wird die Frage untersucht, ob  $17\beta$ -Estradiol (= E2, das potenteste Östrogen) einen Einfluss auf hyperpolarisationsaktivierte HCN- (= *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated*) Kanäle hat, und speziell eine Veränderung der Verteilung des HCN1-Subtyps in der CA1-Region des Hippocampus bewirkt. Dort findet man HCN1-Kanäle stark angereichert in den distalen (apikalen) Dendriten der Pyramidenzellen, wo sie durch Veränderung des Membranpotentials und des Membranwiderstandes die Erregungsleitung eingehender synaptischer Potentiale in Richtung Zellsoma regulieren (Magee, 1999; Robinson und Siegelbaum, 2003). Da dieser Funktion eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen zugeschrieben wird (Nolan et al., 2004) erregten dieser Anreicherung zu Grunde liegende Mechanismen ein starkes wissenschaftliches Interesse. Vor einigen Jahren wurde ein Erklärungsmodell präsentiert, das besagt, dass für die Anreicherung von HCN1-Kanälen in den distalen Dendriten der Pyramidenzellen das extrazelluläre Matrixprotein Reelin verantwortlich ist (Kupferman et al., 2014). Die hippocampale Reelin-Expression wird jedoch durch E2 reguliert (Bender et al., 2010), was die Hypothese nahelegt, dass E2 ebenfalls auf die Verteilung der HCN1-Kanäle im Hippocampus Einfluß nimmt. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wobei die Originalhypothese von Kupferman et al. (2014) dabei nochmals einer Überprüfung unterzogen wurde.

### 3.2. *Der Hippocampus*

Die menschliche Hippocampusformation liegt im Temporallappen und grenzt lateral an das Unterhorn des Seitenventrikels. Sie wird vor allem mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Verbindung gebracht. Beispielsweise werden Krankheitsbilder der Alzheimer-Demenz und der Schizophrenie auf pathologische Veränderungen von Hippocampusneuronen zurückgeführt (Hollands et al., 2016). Eine erhöhte, spontane Entladungstendenz der Neuronen wird des Weiteren mit verschiedenen Formen der Epilepsie in Verbindung gebracht (Trepel, 2008).

Die Hippocampusformation wird unterteilt in das Subiculum, den eigentlichen Hippocampus (Ammonshorn oder Cornu ammonis, CA), bestehend aus den Bezirken CA1-CA3, sowie den Gyrus dentatus (Abbildung 1). In den einzelnen Abschnitten werden weiterhin verschiedene Schichten definiert. In der CA1-Region, die hier von besonderem Interesse ist, bestehen diese von basal (Alveus) nach apikal (hippocampale Fissur) aus dem Stratum oriens, das u. a. die Axone und die basalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen enthält, dem Stratum pyramidale, mit den Somata der Pyramidenzellen, dem Stratum radiatum, mit den proximalen (apicalen), und dem Stratum lacunosum-moleculare, mit den distalen (apicalen) Dendriten der Pyramidenzellen. Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare unterscheiden sich weiterhin durch die Art ihrer synaptischen Eingänge. Im Stratum radiatum terminieren Axone aus der CA3-Region, die sog. Schaffer-Kollaterale. Die distalen Dendriten im Stratum lacunosum-moleculare hingegen erhalten synaptische Eingänge vorwiegend aus dem entorhinalen Cortex über den Tractus perforans (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der einzelnen Schichten des Hippocampus  
Verändert nach:

<http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/index.html>

**Abkürzungen:** Str. lac/mol – Stratum lacunosum-moleculare, Str. pyr. – Stratum pyramidale, Str. gr. – Stratum granulosum (Gyrus dentatus)

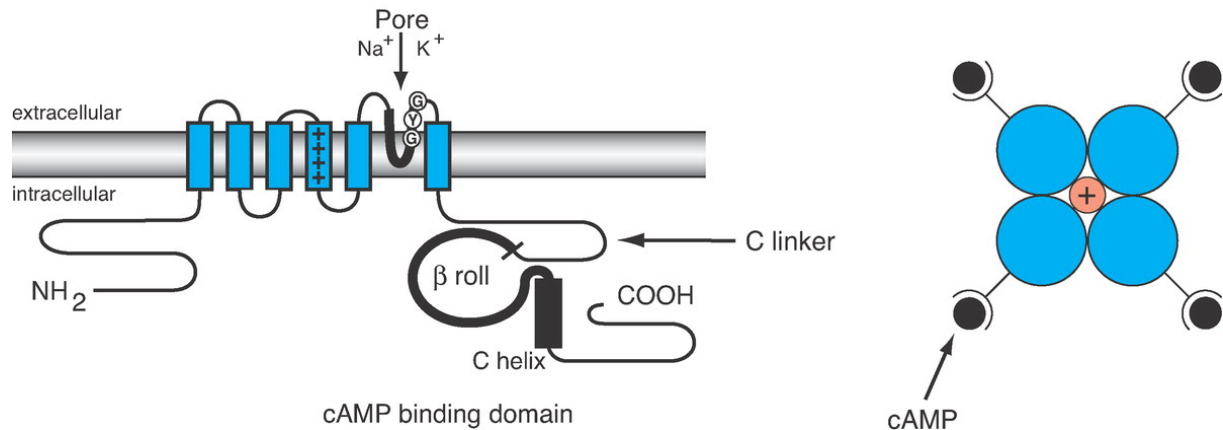
### 3.3. Die HCN-Kanäle

Die Familie der HCN-Kanäle besteht aus vier Mitgliedern: HCN1, HCN2, HCN3 und HCN4, die sich in ihrem Vorkommen und ihrer Funktion voneinander unterscheiden. Sie alle erzeugen einen in die Zelle gerichteten Kationen-Strom, den H-Strom ( $I_h$ ), bei dem Natrium-bzw. Kalium-Kationen durch den Kanal fließen. Eine wichtige Rolle spielen HCN-Kanäle im Herzen, wo sie an der Regulation der Herzschlagsfrequenz beteiligt sind. Der Hauptvertreter im kardialen Sinusknoten ist der Subtyp HCN4. In den ventrikulären Muskelzellen konnten alle Untertypen der Familie - hauptsächlich jedoch HCN2 - nachgewiesen werden (Biel et al., 2009). Im Gehirn kommen ebenfalls alle HCN-Subtypen vor, jedoch mit unterschiedlicher Verteilung: während der HCN2-Subtyp nahezu ubiquitär exprimiert wird, werden HCN1-Kanäle vor allem im Hippocampus, im Cerebellum und im Neokortex gefunden. Der Subtyp HCN4 wird verstärkt im Thalamus und HCN3 in geringer Konzentration im Hypothalamus exprimiert (Santoro et al., 2000; Herrmann, 2015). Das Auftreten und die Häufigkeit der einzelnen Subtypen sind außerdem vom Entwicklungszustand des Gewebes abhängig (Bender und Baram, 2008).

HCN-Kanäle sind Tetramere. Das bedeutet, dass sie aus vier Untereinheiten bestehen, die zusammen einen zentralen Kanal für Ionen bilden (siehe Abb. 2). Jede dieser Untereinheiten enthält sechs Transmembransegmente (S1-6), von denen das vierte Segment (S4) einen positiv geladenen Spannungssensor enthält. Vor allem dieses Segment ist an der Messung des Potentials beteiligt und für die Funktion der HCN-Kanäle von entscheidender Bedeutung (Männikkö et al., 2002; Robinson & Siegelbaum, 2003). HCN-Kanäle ähneln damit in Struktur und Funktion spannungsaktivierten Kalium-Kanälen, mit denen sie phylogenetisch auch verwandt sind (Robinson und Siegelbaum, 2003). Anders als klassische Kaliumkanäle können HCN-Kanäle jedoch sowohl spannungsabhängig (durch Hyperpolarisation), als auch Liganden-abhängig (durch cAMP) geöffnet werden. Spannungsabhängig werden die Kanäle bei Membranpotentialen negativer als -50 mV aktiviert (Maccaferri et al., 1993; Pape, 1996). Mit Annäherung an das Ruhemembranpotential, wird der H-Strom dagegen wieder inaktiviert (Robinson und Siegelbaum, 2003). Bei der Liganden-abhängigen Aktivierung bindet cAMP an den intrazellulären C-Terminus

der Kanaluntereinheiten und erleichtert dadurch die Öffnung des Kanals (Ulens und Siegelbaum, 2003).

## HCN Channel Domains



**Abbildung 2:** Aufbau eines HCN-Kanals mit cAMP-Ligand (modifiziert nach Robinson und Siegelbaum, 2003)

Der H-Strom hat somit in ruhenden Zellen einen stabilisierenden Effekt auf das Ruhemembranpotenzial und ist an der Aufrechterhaltung der neuronalen Erregbarkeit beteiligt. Im Gegensatz zu vielen anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen in den Zellen sind HCN-Kanäle bereits beim Ruhepotenzial permeabel (Bender und Baram, 2008). Durch die tetramere Struktur können die einzelnen Kanäle in ihrem Aufbau variieren. Es bilden sich sowohl homomere als auch heteromere Kanäle aus. Die daraus resultierenden, verschiedenen HCN-Kanaltypen haben unterschiedliche Aktivierungseigenschaften und unterscheiden sich auch in ihrer Affinität zu cAMP. Weiterhin spielen, wie bei anderen Mitgliedern der Kaliumkanalsuperfamilie (Trimmer und Rhodes, 2004), bei HCN-Kanälen neben Poren-bildenden  $\alpha$ -Untereinheiten auch noch  $\beta$ -Untereinheiten für die Kanalfunktion eine wichtige Rolle. Für HCN-Kanäle wurde hier insbesondere eine Funktion des *Tetratricopeptide repeat-containing Rab8b interacting protein* (TRIP8b) beschrieben. TRIP8b reguliert den subzellulären Transport der Kanäle (Piskorowski et al., 2009; Lewis et al., 2009; Lewis et al., 2011; Wilkars et al., 2012) und beeinflusst ihre Modulierbarkeit durch cAMP (Santoro et al., 2009; Zolles et al., 2009).

Neben der regional unterschiedlichen Expression der entsprechenden Gene (Santoro et al., 2000; Baram und Santoro, 2003) ist für die Funktion der HCN-Kanäle in Nervenzellen auch die subzelluläre Lokalisation von Bedeutung. So haben Kanäle, die in Dendriten lokalisiert sind, in der Regel eine andere physiologische Wirkung als Kanäle, die im Zellsoma oder in Axonen lokalisiert sind (Bender und Baram, 2008; siehe auch nachfolgenden Abschnitt).

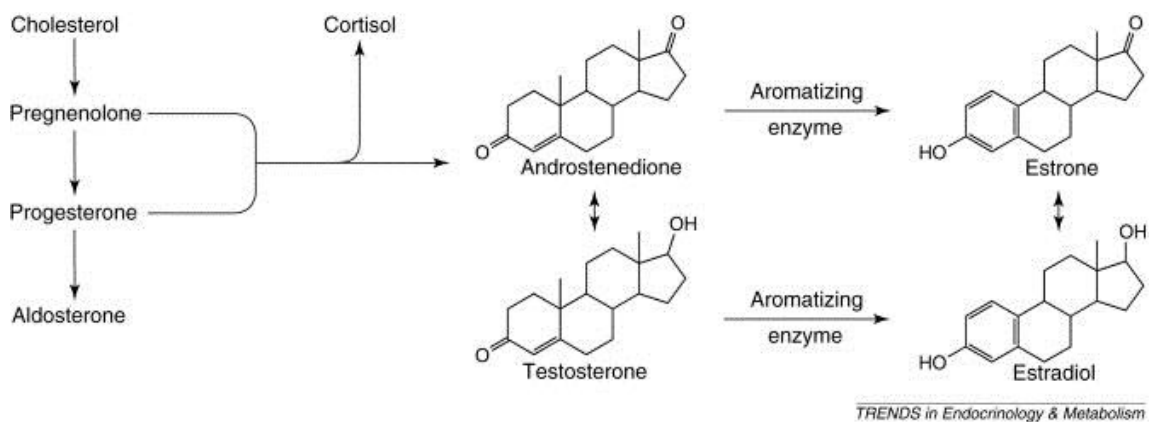
### 3.3.1. Die HCN1 Kanäle

Von allen HCN-Subtypen sind HCN1-Kanäle diejenigen mit der schnellsten Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsgeschwindigkeit (30-300 ms). Sie reagieren jedoch vergleichsweise wenig empfindlich auf cAMP (Pape, 1996; Robinson und Siegelbaum, 2003). HCN1-Kanäle haben eine große Bedeutung im Organismus, wie man an verschiedenen Krankheitsbildern feststellen konnte. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Mangel an HCN1-Kanälen eine Degeneration der Photorezeptoren in der Retina zur Folge hat (Schön et al., 2016). Weiterhin wird ein Zusammenhang von HCN1-Kanälen mit verschiedenen Epilepsien vermutet. So wird bei Verlust von HCN1-Kanälen die neuronale Erregbarkeit im Hippocampus gesteigert, was möglicherweise die Anfälligkeit für epileptische Anfälle erhöht, bzw. das Krankheitsbild der Temporallappenepilepsie nach sich zieht (Bender et al., 2003; Huang et al., 2009; Surges et al., 2012; DiFrancesco, 2015).

In dieser Arbeit geht es explizit um HCN1-Kanäle in der CA1-Region des Hippocampus. Hier sind diese Kanäle an den distalen Dendriten im Stratum lacunosum-moleculare konzentriert (Magee, 1999; Lörincz et al., 2002; Brewster et al., 2007). Diese Anreicherung bewirkt eine Regulation des Ionenflusses innerhalb der Dendriten dahingehend, dass alle über den Tractus perforans eingehenden synaptischen Potentiale das Soma der Pyramidenzelle in etwa zeitgleich erreichen und dadurch dort zur Erzeugung eines Aktionspotentials summiert werden können („temporal summation“; Magee, 1999). Dieser Prozess ist für die neuronale Informationsverarbeitung bei Lernprozessen wichtig (Nolan et al., 2004).

### 3.4. Östrogen im Hippocampus

Östrogene gehören zu den wichtigsten Sexualhormonen. Sie sind eine der fünf großen Gruppen der menschlichen Steroidhormone und leiten sich vom Grundgerüst des Cholesterins ab. Es kommen im menschlichen Körper verschiedene Formen des Östrogens vor: Estron (E1),  $17\beta$ -Estradiol (E2), Estriol (E3) und Estetrol (E4). Das Augenmerk in dieser Arbeit liegt auf dem Estradiol, welches auch die stärkste biologische Wirkung besitzt. Ausgehend von Cholesterin werden die Estrogene aus den Vorstufen Testosteron bzw. Androstenedion durch das Enzym Aromatase (CYP19A1) hergestellt (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Überblick über die  $17\beta$ -Estradiol-Synthese (Brodie, 2002)

Neben den Gestagenen sind Östrogene die entscheidenden Sexualhormone der Frauen und deshalb an der Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und der Gebärmutter entscheidend beteiligt. Sie werden hauptsächlich in den Gonaden produziert, können aber auch in anderen Gewebetypen, z. B. von Neuronen (Furukawa et al., 1998; Wehrenberg et al., 2001), *de novo* synthetisiert werden. Die Entdeckung, dass auch hippocampale Neurone E2 synthetisieren können (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004), führte zu ausführlichen Untersuchungen über deren Rolle bei hippocampalen Funktionen wie der Gedächtnisbildung. Es wurde dabei gefunden, dass nicht nur exogenes (hauptsächlich aus den Gonaden stammendes) E2 (Woolley et al., 1992), sondern auch das endogen im Hippocampus gebildete E2 wesentlich an der Regulation bei Lernprozessen relevanten Mechanismen wie der Synaptogenese und der Langzeitpotenzierung (*long-term*

*potentiation*, LTP) von Synapsen beteiligt ist (Kretz et al., 2004; Bender et al., 2010; Vierk et al., 2012; Bender et al., 2017). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hippocampal gebildetes E2, z. B. über die Regulation der Expression von Reelin, auch an Entwicklungsprozessen im Hippocampus beteiligt ist (Bender et al., 2010).

#### 3.4.1. Östrogen-Rezeptoren

Östrogene entwickeln ihre Wirkung, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. Die klassischen Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) bewirken als Transkriptionsfaktoren eine Regulation der Genexpression, können aber auch über die Aktivierung von Signalkaskaden nicht-genomische, schnelle Effekte (*rapid effects*) auslösen (Klinge, 2001; Levin, 2005). ER $\alpha$ , der bereits 1964 entdeckt wurde (Talwar et al., 1964), findet man vor allem in den Brustdrüsen, im Uterus, in den Thecazellen der Ovarien, im Knochen, in Hoden und Nebenhoden, im Stroma der Prostata, in der Leber und im Fettgewebe. Dahingegen ist ER $\beta$  gehäuft in den Epithelien der Prostata und der Harnblase, den Granulosazellen der Ovarien, im Colon und im Fett- und Lymphgewebe zu finden (Farzaneh, 2016). Im Hippocampus konnten sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  mittels *in situ* Hybridisierung (Osterlund et al., 1998; Shughrue and Merchenthaler, 2000; Bender et al., 2010) oder immunhistochemischer Verfahren (Bender et al., 2010) nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den beiden hauptsächlich genomisch wirkenden Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ , wurde vor einiger Zeit auch ein membranständiger, G-Protein-gekoppelter Rezeptor beschrieben, der *G-protein-coupled Estrogen Receptor 1* (GPER1, früher GPR30) (Srivastava et al., 2013).

#### 3.5. Reelin

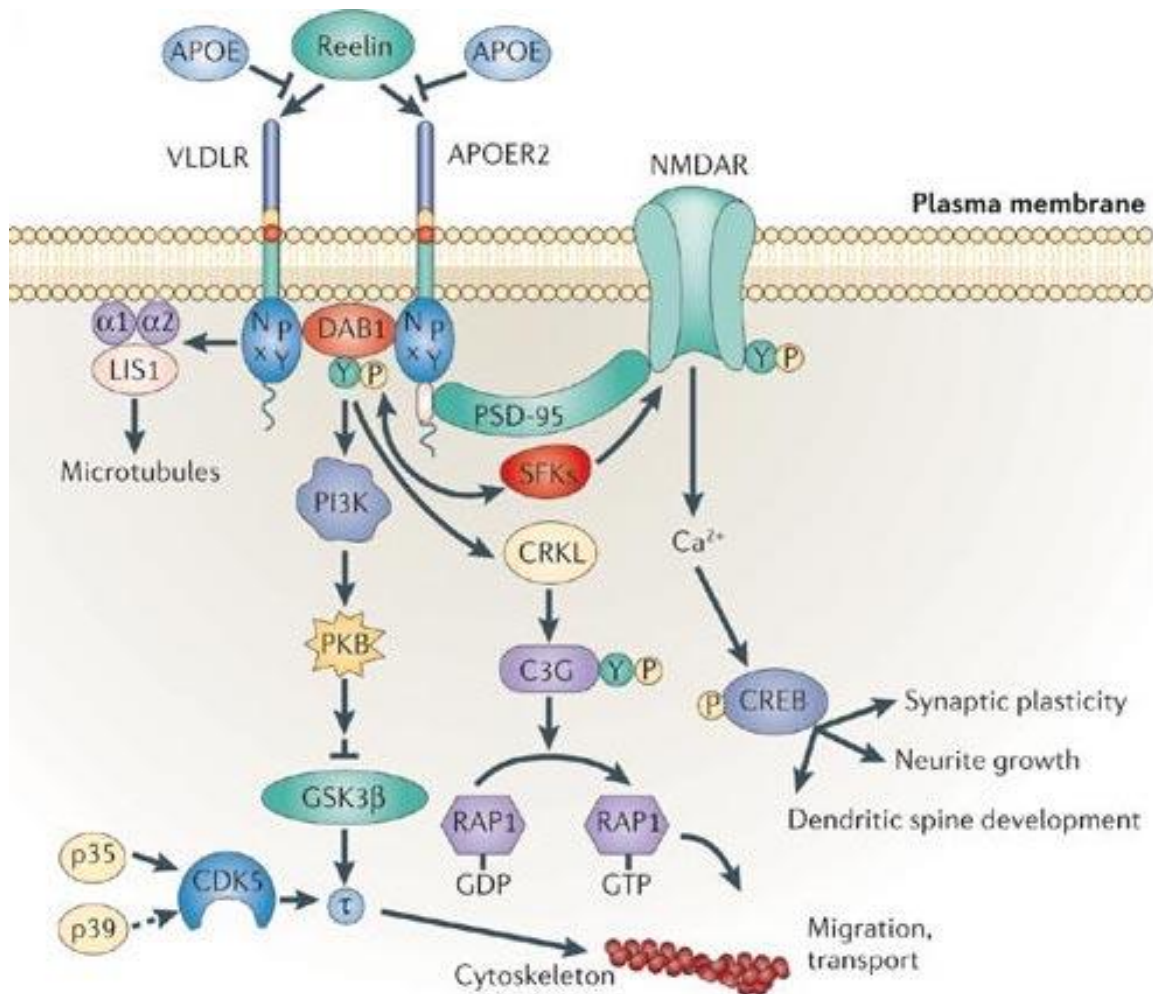
Das extrazelluläre Glykoprotein Reelin kommt im ZNS der Säugetiere vor und ist dort für die Differenzierung und Migration von Neuronen von Bedeutung. Es hat eine relative molekulare Masse von 388 kDa (D’Arcangelo et al., 1997), und zeichnet sich durch eine Serinprotease-Aktivität aus (Quattrocchi et al., 2002). Reelin wird während der Entwicklung von Cajal-Retzius-Zellen produziert und sezerniert (Ogawa et al., 1995; D’Arcangelo et al., 1997; Meyer, 1999; Förster et al., 2006). Bei Genmutationen, die es dem Organismus nicht mehr ermöglichen, Reelin zu produzieren, kommt es zu massiven Störungen der Hirnentwicklung und daraus



resultierenden Funktionsstörungen, wie Ataxie, Tremor und unkoordinierte Bewegungen (D'Arcangelo et al., 1995). Beschrieben wurde diese Pathologie bereits 1951 an einer Maus-Mutante, und diese Mutante wurde nachfolgend als *Reeler*-Maus (engl. *to reel* = schwanken, taumeln) bezeichnet (Falconer, 1951). Die Expression von Reelin ist jedoch nicht auf die Entwicklungsphase beschränkt. Auch im adulten Gehirn wird es gebildet und ist dort unter anderem an der Regulation der Langzeitpotenzierung (LTP) beteiligt (Herz und Chen, 2006). Da Cajal-Retzius-Zellen überwiegend nur in der Entwicklungsphase vorhanden sind, wird die Bildung von Reelin im adulten Gehirn von anderen Neuronentypen, z. B. Interneuronen, übernommen (Förster et al., 2006).

### 3.5.1. Der Reelin-Signalweg

Die Funktion von Reelin beruht auf seiner extrazellulären Dimerisierung und dem Andocken an seine beiden Rezeptoren, den *apolipoprotein E receptor 2* (APOER2) und dem *very low density lipoprotein receptor* (VLDLR; Trommsdorff et al., 1999). Diese Liganden-Rezeptor-Bindung hat die Phosphorylierung des intrazellulär gelegenen Adaptorproteins *Disabled-1* (Dab1) zur Folge. Dab1 ist in der Reelin-Signalkaskade das Schlüsselprotein. Seine Phosphorylierung wird von nicht-rezeptorgebundenen Src-Tyrosinkinasen durchgeführt (Howell et al., 1997; Bock und Herz, 2003). Dadurch kommen diverse Kinase-Kaskaden in Gang, die unter anderem das Mikrotubuli-Gerüst der Neurone verändern und darüber die Neuronenmigration beeinflussen (Beffert et al. 2002; Ballif et al., 2005; Bock et al. 2016; Meseke et al. 2013; Abb. 4). Darüber hinaus besteht eine Verbindung von Dab1 zu NMDA-Rezeptoren über die SFKs (*SRC family tyrosine kinases*). Auch der APOER2 kommuniziert über *postsynaptic density protein 95* (PSD95) mit diesem Rezeptor. Reelin kann somit über seine Rezeptoren indirekt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle beeinflussen (Bacskai et al., 2000; Herz und Chen, 2006). Die eingedrungenen Kationen sind in der Lage den Transkriptionsfaktor CREB zu mobilisieren, der an der Expression wichtiger Gene für die Synapsenplastizität, das Neuronenwachstum und die Dendritenentwicklung beteiligt ist (Chen et al, 2005).



**Abbildung 4:** Signalwege des Glykoproteins Reelin mit seinen Rezeptoren (verändert nach: Herz und Chen, 2006)

In der von Kupferman et al. (2014) veröffentlichten Arbeit wurde der Signalweg von Reelin durch einen viralen *knockdown* von Dab1 *in vivo* (Ratten), sowie durch eine Inhibition der Rezeptoren APOER2 und VLDLR mittels des *receptor associated protein* (RAP), das Lipoproteinrezeptoren inaktiviert (Willnow et al., 1996; Bu und Schwartz 1998; Gong et al., 2007), *in vitro* (organotypische Gewebekultur) blockiert. Dies hatte jeweils eine Minderung der HCN1 Kanäle und des damit assoziierten H-Stroms in den distalen Dendriten der Pyramidenzellen zur Folge. Daraus schlossen die Autoren, dass Reelin über den Dab1-Signalweg für die Anreicherung der HCN1 Kanäle in den distalen Dendriten der Pyramidenzellen verantwortlich ist (Kupferman et al., 2014).

## 6. Arbeitshypothese und Durchführung der Arbeit

Wenn Reelin die Anreicherung von HCN1-Kanälen in distalen Dendriten von Pyramidenzellen reguliert, dann sollte dies auch E2 tun, da die Expression von Reelin durch E2 reguliert wird (Bender et al., 2010). Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von organotypischen entorhino-hippocampalen Gewebekulturen getestet. Konkret wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1) Gewebekulturen von 5 Tage alten Ratten wurden nach einer Erholungsphase von 4 Tagen *in vitro* für die Dauer von 6 Tagen mit E2 inkubiert und danach wurde im Vergleich mit Kontrollkulturen („Schwesterkulturen“; siehe Methoden) die Verteilung der HCN1-Kanäle in der CA1-Region quantitativ bestimmt.
- 2) Durch Einsatz des Aromatase-Inhibitors Letrozol *in vitro* wurde der Einfluß einer hippocampalen E2-Bildung auf die distale HCN1-Anreicherung untersucht.
- 3) Nach Feststellung eines stimulierenden Effekts von E2 auf die distale HCN1-Anreicherung wurde in Folgeversuchen *in vitro* durch Einsatz von spezifischen Östrogenrezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten untersucht, welcher der Rezeptoren für den E2-Effekt auf die HCN1-Verteilung verantwortlich ist.
- 4) Die Rolle von Reelin bei der Vermittlung des E2-Effekts auf die HCN1-Verteilung wurde durch *in vitro*-Zugabe des VLDLR und APOER2 blockierenden Lipoproteinrezeptor-Inhibitors RAP überprüft.
- 5) Durch die Untersuchung der HCN1-Verteilung in einer konditionellen (Tamoxifen-induzierbaren) Reelin-Mutante wurde generell die Bedeutung von Reelin für die distale Anreicherung der HCN1-Kanäle in der CA1-Region untersucht.

- 6) Durch die Untersuchung von weiblichen Mäusen in unterschiedlichen Zyklusstadien wurde die Bedeutung von E2-Schwankungen während des weiblichen Zyklus auf die HCN1-Verteilung in der CA1-Region *in vivo* untersucht

## 4. Materialien

### 4.1. Chemikalien

Tabelle 1: Eingesetzte Chemikalien und deren Hersteller:

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Aqua dest.	ARIUM COMFORT SARTORIUS
Aqua	BRAUN
Einbettmedium (für Fluoreszenz)	DAKO
DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindol)	SIGMA
DPN (Diarylpropionitril)	TOCRIS, # 1494
17- $\beta$ -Estradiol (E2), wasserlöslich	SIGMA, # E4389
GST (Glutathion-S-Transferase) GST-RAP	Herstellung: B. Brunne (siehe unten)
G1	TOCRIS # 3577
G36	TOCRIS, # 4759
Letrozol	TOCRIS, # 4382
Natronlauge, 2N	MERCK
Ziegenserum ( <i>normal goat serum</i> , NGS)	SIGMA
Paraformaldehyd	MERCK
PBS (Tabletten)	GIBCO
PPT (4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol)	TOCRIS, # 1426
Saccharose	MERCK
Salzsäure, 2N	MERCK
Einfriermedium ( <i>Tissue Tek</i> )	SAKURA

## 4.2. Antikörper

Tabelle 2: Genutzte Antikörper und deren Hersteller

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
anti-HCN1, aus Kaninchen, polyclonal	Millipore, AB 5884
anti-Reelin, aus Maus, monoclonal	Millipore, MAB 5366
anti-Kaninchen-IgGs, Alexa488-gekoppelt, aus Ziege, polyclonal	Molecular Probes
anti-Maus-IgGs, Cy3-gekoppelt, aus Ziege, polyclonal	Molecular Probes

## 4.3. Geräte

Tabelle 3: Geräte und Hilfsmittel zur Realisierung der Experimente

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Accu-Jet Saugpipette	BRAND
Analyse-Waage	SARTORIUS
Aufbewahrungsboxen	HS
Dako Pen S 2002	DAKO
Deckgläser 24x60mm	AUTOMAT STAR
Dell Computer, Precision T 3500	DELL
Feuchte Kammer	UKE LABOR NEUROANATOMIE
Einmalhandschuhe, Nitril	ANSELL
Gefrierschrank, -25 Grad	LIEBHERR
Gewebehäcksler ( <i>Tissue chopper</i> )	MCILWAIN
Kosmetiktücher	GVS eG
Kryostat, HM 560	MICROM
Kulturschalen (6-Well)	FALCON
Küvetten	RESISTANCE
Macbook, Pro 2012	APPLE

Magnetrührer, MR 3001	HEIDOLPH
Magnetrührer	DIVERSE
Mikroskop, Biorevo BZ 9000	KEYENCE
Mini Zentrifuge	NATIONAL LABNET CO.
Objektive, 2x und 10x	Nikon
Objektträger (Super Frost Plus)	GLASWARENFABRIK KARL HECHT KG
Perfusionspumpe, Masterflex L/S	COLE-PARMER
pH Meter, PH M93 Reference ph Meter	RADIOMETER COPENHAGEN
Pinsel	DA VINCI, FABER-CASTELL
Pipetten für 10, 100, 200, 1000 µl	EPPENDORF
Pipettenspitzen	TIP ONE
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml, 100ml	GREINER
Schere, gerade	FST
Schere gebogen	FST
Schüttler, MS-2	IKA
Spatel	HENRY SCHEIN
Spritzflasche	VWR
Sterile Werkbank	HAREUS INSTRUMENTS
Stoppuhr	JUNGHANS

#### 4.4. Software

Tabelle 4: Softwareprogramme zur Auswertung und zum Verfassen der Dissertation

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BZ-2-Viewer	KEYENCE
Excel Mac 2011	MICROSOFT
Fiji (ImageJ)	WAYNE RASBAND (NIH)
Graph Pad Prism	GRAPH PAD SOFTWARE
Gimp 2.8.22	GNU IMAGE MANIPULATION PROGRAM
macOS Sierra 2016	APPLE

Windows 7 Professional	MICROSOFT
Word Mac 2011	MICROSOFT

#### 4.5. Lösungen und Kulturmedien

1x PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), 1000 ml:

8 g NaCl  
 0,2 g KCl  
 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen und im Anschluss mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf pH 7,4 bei Raumtemperatur einstellen

4% PFA (*Paraformaldehyd*), 1000 ml:

40 g PFA Pulver  
 + 750 ml PBS  
 Unter Rühren auf 50-60°C erhitzen, danach mit 1M HCl oder 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen, auf Eis bis Raumtemperatur rühren und auf 1000 ml mit 1x PBS auffüllen.  
 Zur Lagerung bei -18°C einfrieren.

*Präparationsmedium (für Gewebekulturen), Ansatz für 100 ml (alle Komponenten steril):*

50 ml *Minimal Essential Medium* (MEM), 2x konzentriert  
 + 1 ml Glutamin (200mM)  
 + 49 ml Gewebekulturwasser  
 durch Zugabe von steriler 1M NaOH oder 1M HCl wird das Präparationsmedium auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt und im Kühlschrank gelagert.

*Inkubationsmedium (für Gewebekulturen), Ansatz für 100 ml (alle Komponenten steril):*

25 ml *Minimal Essential Medium*, 2x konzentriert

1 ml Glutamin (200 mM)

580 µl Natriumbicarbonat-Lösung (7,5%)

21,17ml Gewebekulturwasser

25 ml *Hanks Balanced Salts* (HBSS)

25 ml Pferdeserum (hitzeinaktiviert)

1 ml Penicillin (10.000 Units/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)-Gemisch

1250 µl Glucose-Lösung (50%)

Das Medium kann für etwa 1 Woche im Kühlschrank gelagert werden und wird vor jeder Verwendung mit 1M NaOH oder 1M HCl steril auf pH 7,25 eingestellt.

*Ansätze für die jeweiligen Stimulantien:*

*17β-Estradiol (E2):*

2,72 mg E2 werden in 100 ml Aqua dest. gelöst (=  $10^{-4}$  M);

anschließende 1:1000 Verdünnung mit Inkubationsmedium führt zur  $10^{-7}$  M Endkonzentration.

DPN: # 1494

MW: 239,27 g/l

10mg in 4,18 ml DMSO =  $10^{-2}$  M

Endkonz.:  $10^{-7}$  M

G1: # 3577

MW: 412,28 g/l

10mg in 2,42 ml DMSO =  $10^{-2}$  M

Endkonz.:  $10^{-7}$  M



G36: # 4759

MW: 412,33 g/l

10mg in 2,42 ml DMSO =  $10^{-2}$  M

Endkonz.:  $10^{-7}$  M

Letrozol: # 4382

MW: 289,8 g/l

10mg in 3,45 ml DMSO =  $10^{-2}$  M

Endkonz.:  $10^{-7}$  M

PPT: # 1426

MW: 386,45 g/l

10mg in 2,59 ml DMSO =  $10^{-2}$  M

Endkonz.:  $10^{-7}$  M

RAP-GST: RAP-GST und GST wurden mit Hilfe eines bakteriellen Expressionssystems hergestellt und von der Produzentin (B. Brunne, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Stammlösung RAP-GST bzw. GST: 1mg/ml

## 5. Methoden

### 5.1. Tiere

Für die überwiegende Zahl der Experimente wurden Tiere aus der Versuchstierhaltung des UKE verwendet. Dabei handelte es sich um Ratten (*Rattus norvegicus*) des Zuchtstamms *Wistar*. Für die Gewebekulturen wurden insgesamt 86 fünf Tage alte (= P5) Ratten für die Herstellung von Gewebekulturen (*in vitro*) verwendet. Für einen Vergleich mit dem altersgerechten *in vivo*-Stadium wurden drei 16 Tage alte (= P16) Ratten transcordial perfundiert. Weiterhin wurde für diese Studie Gewebe von 12 adulten weiblichen Mäusen (P90) verwendet, die transcordial perfundiert worden waren. An diesen Mäusen war zuvor mittels vaginalem Abstrich eine Bestimmung des ovariellen Zyklusstadiums (Proestrus, Diestrus) durchgeführt worden (nach: Hoglund, 1972). Alle Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten: sie waren einem Dunkel- und Helligkeitsrhythmus von je 12 Stunden ausgesetzt und erhielten Futter und Wasser frei verfügbar. Alle Experimente wurden unter Einhaltung der gesetzlichen Richtlinien für Tierhaltung und Tierversuche der

Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Die zur Untersuchung der HCN1-Expression bei Abwesenheit von Reelin verwendete Reelin-Mutante (Reelin-cKO, Lane-Donovan et al., 2015) wird an der University of Dallas gezüchtet. Das Gewebe (Gehirn) wurde dort entnommen und zur Untersuchung ans Institut für Neuroanatomie geschickt.

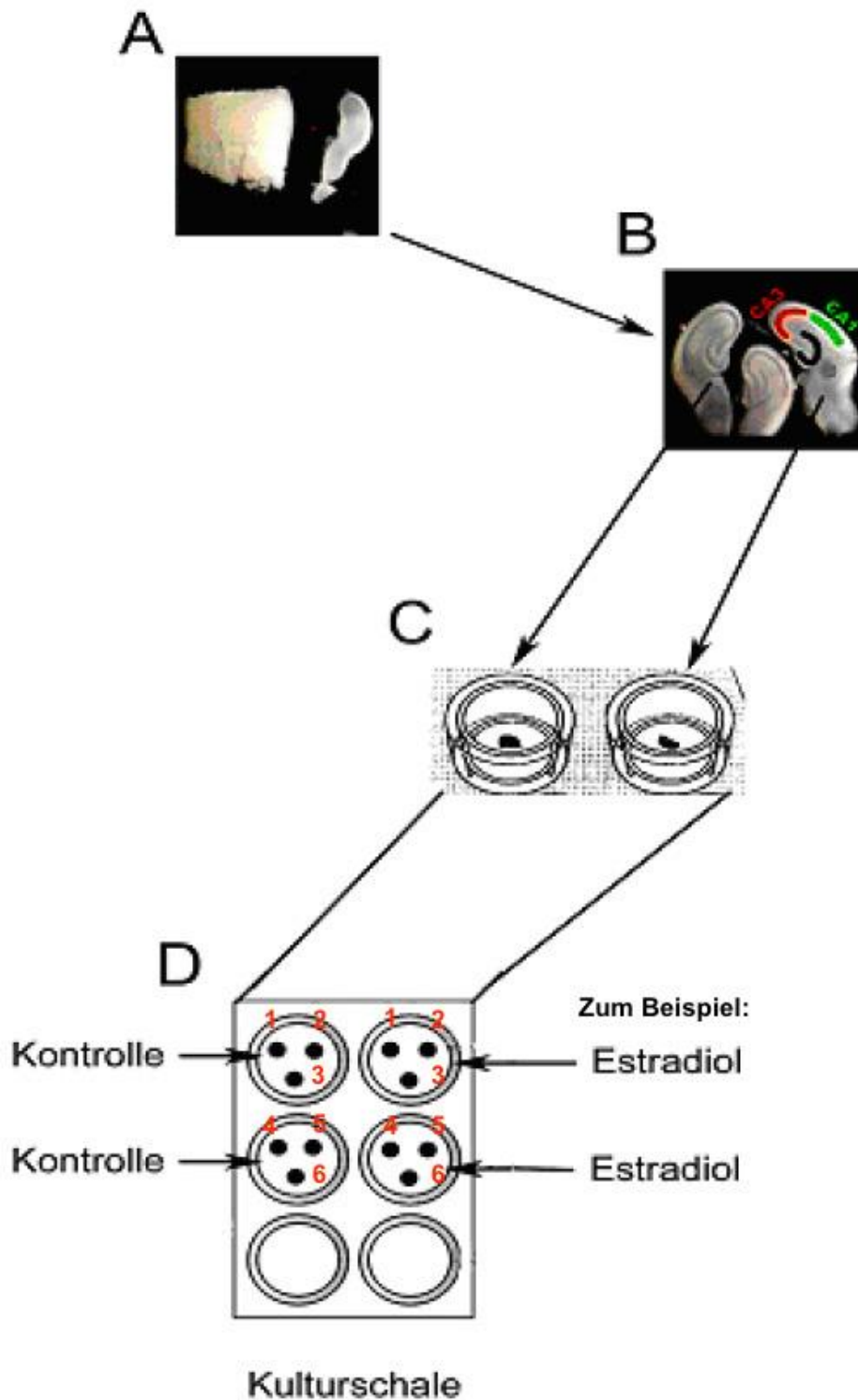
## 5.2. Präparation der Gewebekulturen

Die Präparation erfolgte unter semisterilen Bedingungen. Die 5 Tage alten Ratten wurden aus der Transportbox entnommen und umgehend mit einer chirurgischen Schere dekapitiert. Daraufhin wurde die Kopfhaut von dorsal ausgehend medial-sagittal mit einer Schere aufgeschnitten und zu beiden Seiten hin mit Hilfe einer Pinzette aufgeklappt. Dadurch eröffnete sich der Blick auf die Schädelkalotte, die mittig mit einem Skalpell durchtrennt wurde. Nach beidseitigen Hilfsschnitten entlang der Sutura coronalis wurden die beiden Hälften der Kalotte nach lateral weggeklappt, das Gehirn wurde mit einem Spatel vorsichtig entnommen und in ein auf Eis gestelltes Gefäß mit Präparationsmedium gegeben. Von dort wurde das Gehirn in eine Petrischale überführt, wo zuerst das Cerebellum und das Frontalhirn mittels eines Skalpells entfernt und danach die beiden Hirnhälften voneinander getrennt wurden. Durch Abtrennen von Hirnstamm und Diencephalon mit Hilfe eines gebogenen Spatels wurde der Hippocampus an der Innenseite der Hirnrinde freigelegt und gemeinsam mit dem entorhinalen Cortex (EC) aus dieser herausgelöst. Danach wurde der EC-Hippocampus-Komplex auf die Platte eines Gewebehäckslers (*Tissue Chopper*) gelegt und rechtwinklig zu seiner Längsachse in 10-12 Scheiben einer Dicke von 400 µm zerschnitten. Unter der Stereolupe wurden benachbarte Schnitte zu Gruppen von 2 (Paar) oder 3 (Tripel) Hippocampus-EC-Scheiben gruppiert („Schwester“kulturen). Von diesen „Schwester“kulturen wurde eine jeweils als Vergleichskultur (Kontrolle) verwendet, während die andere (oder anderen) experimentellen Bedingungen ausgesetzt wurden. Dazu wurden sie auf unterschiedliche Membraneinsätze transferiert, wo stets alle verfügbaren Kulturen eines Tieres (pro experimenteller Gruppe) nach einem reproduzierbaren Muster aufgelegt wurden (siehe Abb. 5). Danach wurden die Membraneinsätze in mit Inkubationsmedium (1 ml) gefüllte Kulturschalen gegeben und im Inkubator bei 37°C und 95% CO<sub>2</sub> Gehalt inkubiert.

### 5.3. Behandlung der Gewebekulturen

Die Gewebekulturen wurden für insgesamt 11 Tage in Kultur gehalten (= DIV11). Davon dienten die ersten 4 Tage als Erholungsphase vom Stress der Präparation. Am 5. Tag der Kultivierung (DIV5) wurde erstmals eine experimentelle Behandlung durchgeführt, d. h. bei Kulturen der experimentellen Gruppen wurde die zu testende Substanz zugegeben (z. B. E2, Letrozol, PPT, etc.) und bei den Kulturen der Kontrollgruppen nur das entsprechende Lösungsmittel (z. B. H<sub>2</sub>O, DMSO, etc.). Die Zugabe der Substanzen wurde bei Mediumwechsel an DIV 7 und DIV9 erneuert, so dass im Regelfall (Ausnahme: GST-RAP, 50 µg/ml; hier nur 2 Tage) die Kulturen über 6 Tage der gewählten experimentellen Behandlung ausgesetzt waren. Am Ende der Kultivierungsperiode (DIV11) wurden die Kulturen aus dem Inkubator genommen und fixiert. Dazu wurden die Membranen zuerst in eine neue *Six-Well*-Kulturschale überführt, die mit 1x PBS-Puffer gefüllt waren. Nach ca. 1 Minute Waschen in PBS folgte ein erneuter Transfer zu einer neuen Kulturschale, in der die Kulturen mit eisgekühlter PFA-Lösung (4%) bedeckt wurden. Die Kulturen wurden damit für 2,5 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Es folgte eine Überschichtung mit 25%iger Saccharose-Lösung (in 1x PBS) für 4 Stunden zum Zweck der Kryoprotektion. Danach wurden die Kulturen mit einem Pinsel von der Membran gelöst und die jeweiligen Schwesterkulturen (d. h. experimentell behandelte mit ihren Kontrollkulturen) gemeinsam auf ein Glasplättchen übertragen, dort nach vorsichtigem Abtupfen der restlichen Saccharose-Lösung mit einem Tropfen Gefriermedium (*Tissue Tec*) überschichtet und auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden die Kulturen einer bestimmten experimentellen Behandlung durch Beschriftung mit „A“, „B“ oder (ggf.) „C“ geordnet und bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank bei -25 °C gelagert.

Zum Zweck der „Verblindung“ wurden alle oben aufgeführten labortechnischen Arbeiten von einer technischen Assistentin durchgeführt. Für die nachfolgende analytische Bearbeitung erhielt der Verfasser nur die Angabe „Gruppe A“, „B“ oder „C“, ohne die experimentelle Behandlung der Kulturen zu kennen.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Anlegen hippocampaler Schwesterkulturen (Graphik freundlicherweise von Prof. Bender zur Verfügung gestellt)

A) Hippocampus mit abgetrennter Hippocampus-Scheibe (400 μm)

B) Querschnitte benachbarter Gewebeschnitte (Schwesterkulturen)

C) Platzierung der Gewebeschnitte auf Mikromembranen

D) Kulturschalen mit experimenteller Anordnung der Gewebeschnitte (Kontrolle vs. Versuchsgruppe)

#### 5.4. Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung der Schnitte wurden die in einem Tropfen Gefriermedium eingefrorenen Kulturen vom Glasplättchen gelöst und auf einen Haltemagnet mittels Gefriermedium aufgebracht. Im Kryostaten wurde der Haltemagnet danach so in seine Halterung eingebracht und fixiert, dass eine gleichmäßige Schnitfführung in vertikaler Richtung erfolgen konnte. Danach wurden 20 µm dicke Schnitt durch die Gewebekultur (+ Gefriermediumpfropf) hergestellt, diese mit Hilfe eines Spatels aus dem Kryostaten genommen und in eine Kulturschale mit 1x PBS überführt. Im Folgenden wurden von jeder Kultur die besten, d. h. komplettesten Schnitte (ca. 3-6) mit Hilfe eines dünnen Pinsels auf einen beschichteten Objektträger aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte von zusammen gehörenden, unterschiedlich behandelten Schwesterkulturen auf denselben Objektträger übertragen wurden und somit bei allen nachfolgenden Behandlungen denselben Bedingungen ausgesetzt waren. Nach Trocknung an der Luft (ca. 1-2 Stunden) wurden die Objektträger für 24 Stunden bei -25°C im Gefrierschrank eingefroren. Die Gewebeproben wurden nach Geschlechtern getrennt angelegt, da sich jedoch kein Unterschied nach ersten Ergebnissen herausstellte wurde bei der weiteren Auswertung auf eine Differenzierung danach verzichtet.

#### 5.5. Immunhistochemie an Gewebekulturschnitten

Mit Hilfe der Immunhistochemie sollte die Expression von HCN1-Kanälen in den Kulturen dargestellt werden. Dabei wurden stets die gleichen experimentellen Schritte durchgeführt, die im Folgenden erläutert werden:

Die mit Kulturschnitten belegten Objektträger wurden aus dem Gefrierschrank genommen und zuerst bei Raumtemperatur für eine Stunde geschützt aufbewahrt. Zur Nachfixierung des Gewebes wurden sie dann für 20 Minuten in mit 4% PFA gefüllte Küvetten eingestellt. Nach Waschung in 1x PBS für 10 Minuten folgte die Präinkubation mit Blockierungslösung in einer feuchten Kammer, zur Neutralisierung möglicher elektrostatischer Ladungen im Gewebe, die die darauffolgenden Antikörper behindern und zu deren unspezifischer Bindung führen könnten. Die Objektträger wurden dafür für eine Stunde mit 500 µl 3%igem Ziegen Serum (NGS),

gelöst in 1x PBS mit 0,3% Triton-X100 (PBS-T), überschichtet. Das Triton-X100 bewirkt dabei die Permeabilisierung der Zellwand. Nach sorgfältiger Entfernung des Präinkubationsmediums, folgte die Inkubation mit Primärantikörper über Nacht in einer feuchten Kammer. Dabei wurden je 200 µl der Inkubationslösung auf einen Objektträger gegeben, nachdem dort die Gewebeschnitte mittels eines Fettstifts umrandet worden waren. Die Inkubationslösung bestand aus der oben eingesetzten Blockierungslösung (PBS-T + 3% NGS), der gegen HCN1 gerichtete Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben worden waren. Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebeschnitte zunächst in einer Küvette für 2x 10 Minuten mit 1x PBS-Puffer auf einem Schüttler gewaschen. Danach erfolgte in einer feuchten Kammer die Überschichtung mit Fluorophor (Alexa488)-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-IgGs aus Ziege; 1: 500 verdünnt in Inkubationslösung) für drei Stunden unter Ausschluss von Licht. Danach wurden die Objektträger in mit 1x PBS gefüllten Küvetten im Dunklen erneut für 10 Minuten gewaschen und im Anschluss daran zur Markierung der Zellkerne für 1 Minute mit DAPI-Lösung (in 1x PBS, 1:1000) überschichtet. Abschließend wurden die Objektträger unter Verdunklung erneut für 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen und nach kurzem Eintauchen in Aqua dest. zum Trocknen in eine lichtundurchlässige Kammer gegeben. Nach etwa 30-minütigem Trocknen wurden die Objektträger mit dem Einbettmedium überschichtet und mit Deckgläschen versehen. Nachdem das Einbettmedium fest geworden war, konnte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (siehe unten) erfolgen.

#### 5.6. Gewebepreparation und Immunhistochemie an Gehirnschnitten

Um einen Vergleich der Verteilung von HCN1-Kanälen in der Hippocampus-Gewebekultur mit altersäquivalenten Hippocampi *in vivo* herstellen zu können, wurden 3 Ratten im Alter von 16 Tagen transcardial mit 4% PFA (in 1x PBS) perfundiert. Dazu wurden diese Tiere zuerst einer letalen Dosis CO<sub>2</sub> ausgesetzt, danach wurde sofort die Thoraxwand eröffnet und eine Kanüle in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt, über die zuerst physiologische Kochsalzlösung (für 2 Minuten) und danach die Perfusionslösung einströmen konnte. Um einen Abfluß der Lösungen zu ermöglichen, wurde der rechte Vorhof eingeschnitten. Nach etwa 15-minütiger Perfusionsdauer wurde das Gehirn entnommen und zur Nachfixierung (2 h) in 4% PFA-Lösung überführt. Es folgte eine Kryoprotektion für 48 h in 25%

Saccharose (in 1x PBS) und danach ein schnelles Einfrieren in Isopentan (- 50°C). Diese Prozeduren wurden von einem Mitarbeiter des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt.

Für die Immunhistochemie an Gehirnschnitten wurden die Gehirne im Kryostaten mit der dorsalen Seite nach unten auf dem Haltemagneten aufgeblokt. Die Schnitte (20 µm) wurden horizontal angefertigt, beginnend an der Unterseite des Temporallappens, wo Hippocampus und entorhinaler Cortex assoziiert sind. Schnitte, in denen beide Strukturen vorhanden waren, wurden in 1x PBS gesammelt und für die Immunhistochemie verwendet. Diese erfolgte im Prinzip nach derselben Abfolge, wie oben beschrieben. Allerdings wurden die Gehirnschnitte „*free floating*“ den Lösungen ausgesetzt, d. h. sie wurden dafür mittels eines Glashakens von einer Inkubationslösung zur anderen überführt (Bender et al., 2007). Erst nach Abschluss der gesamten Prozedur wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen, getrocknet, mit Einbettmedium überschichtet und eingedeckelt.

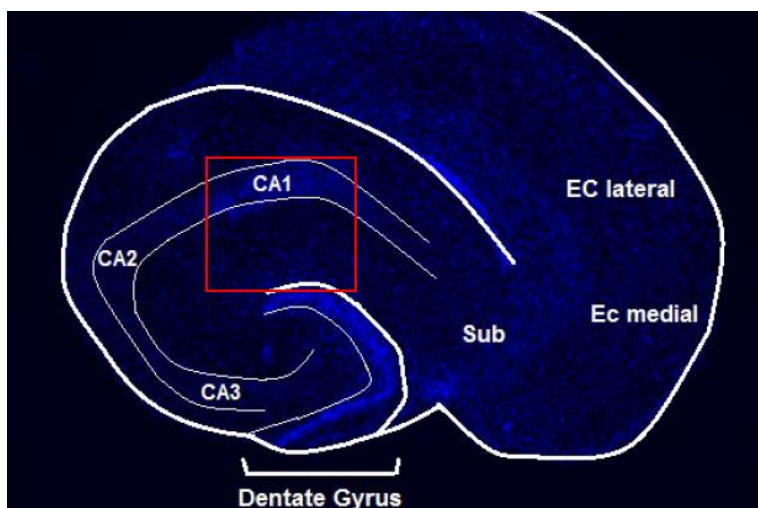
Außerdem wurde in einer Gruppe von 90 Tage alten, weiblichen Mäusen die hippocampale HCN1-Verteilung in Abhängigkeit vom ovariellen Zyklus untersucht. Dazu wurden 6 Mäuse im Proestrus (hohe E2-Konzentration) und 6 Mäuse im Diestrus (niedere E2-Konzentration) wie oben beschrieben transcardial perfundiert, die Gehirne entnommen, coronal geschnitten und eine Immunhistochemie durchgeführt. Die Bestimmung der Zyklusphase erfolgte durch einen Mitarbeiter des Instituts für Neuroanatomie.

Als weitere experimentelle Gruppe wurde die HCN1-Verteilung in der CA1-Region von 5-7 Monate alten Mäusen untersucht, in denen im Alter von 2 Monaten durch Tamoxifengabe eine Reelin-Deletion induziert wurde (Reelin-ckO; Lane-Donovan et al., 2015). Die Fixierung durch transcardiale Perfusion und die Gehirnentnahme wurden hier von den Erzeugern der Mutante, der Arbeitsgruppe um Prof. J. Herz an der Universität Dallas, vorgenommen. Am Institut für Neuroanatomie erfolgte das Schneiden (coronal), die Immunhistochemie und die Analyse der Ergebnisse.

## 5.7. Mikroskopie und Auswertung der Immunhistochemie

### 5.7.1. Gewebekulturen von Ratten

Die Objektträger mit Schnitten von sowohl den experimentell behandelten als auch den korrespondierenden („Schwester“) Kontrollkulturen wurden an einem Keyence Biorevo BZ 9000-Fluorescence-Mikroskop zuerst mit DAPI-Filter (358 nm Wellenlänge Anregung; Emission 461 nm Wellenlänge) unter 20facher Vergrößerung (10x Okular, 2x Objektiv) auf Schnitte abgesucht, in denen der Hippocampus und der entorhinale Cortex vollständig vertreten waren (Abbildung 6).



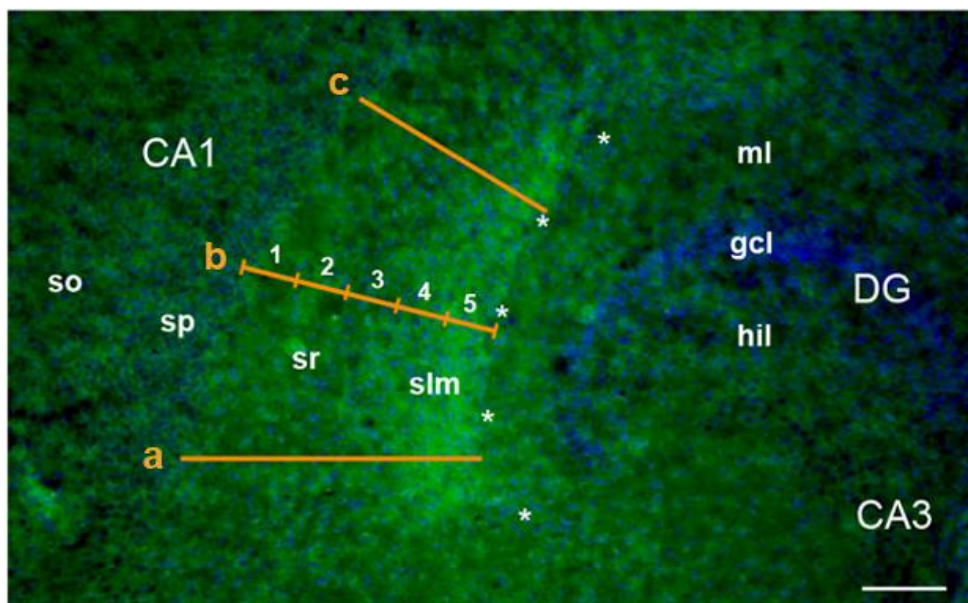
**Abbildung 6:** Übersichtsaufnahme in der DAPI-Färbung in 20x Vergrößerung: EC (entorhinaler Cortex), CA (Cornu ammonis), Sub (Subiculum)

Von diesen Schnitten wurde in jeder experimentellen Gruppe genau 1 Schnitt für die weitere Analyse ausgewählt. In diesem wurde nach Umschalten auf den Grün-Filter (495 nm Wellenlänge Anregung; Emission 519 nm Wellenlänge) unter 100x Vergrößerung (10x Okular, 10x Objektiv) und für jede experimentelle Gruppe unter identischen Beleuchtungsbedingungen (1/4 Sekunde) eine Aufnahme aus der CA1-Region gemacht (Abbildung 7). Diese wurde auf einen Laptop (Apple MacBook Pro) überspielt und dort mit dem Analyse-Programm Fiji (ehemals Image J) ausgewertet. Dabei wurde nach folgendem Muster vorgegangen (siehe Abbildung 7):

An definierten Positionen in der CA1-Region wurden Linien-Blots erstellt, die von der hippocampalen Fissur (durch Sterne markiert) bis zum Stratum pyramidale (sp) reichten. Als Positionsmarkierung ausgewählt wurden: die Spitze des



Körnerzellbandes (a), der Scheitelpunkt des Körnerzellbandes (c), sowie in ein Punkt mittig zwischen den Positionen a und c (b). Die Linien wurden jeweils so gelegt, dass der möglichst kürzeste Abstand von den Pyramidenzellen zur Fissur gewählt wurde. Sie wurden danach unabhängig von ihrer Gesamtlänge in 5 gleich große Intervalle unterteilt (1-5; Abbildung 7), und es wurde entlang der Linien a-c der jeweilige Anteil an der Gesamtintensität der HCN1-Färbung in diesen Intervallen ermittelt. Dadurch entstand ein Datensatz mit X- und Y-Werten, der in eine für dieses Projekt erstellte Excel-Mappe eingespeist wurde. Diese Werte beschreiben sowohl den Ort der Messung, als auch die jeweilige Intensität der Färbung. Aus den resultierenden 3 Messungen pro Kultur wurde anschließend für jedes Intervall ein Durchschnittswert (Prozent der Gesamtintensität) ermittelt.



**Abbildung 7:** Detailaufnahme aus der CA1-Region einer Gewebekultur nach HCN1-Immunfärbung. Die Linien a-c bezeichnen die Orte der Analyse. Querstriche in b bezeichnen die Intervalle (1 nahe dem Stratum pyramidale, 5 nahe der hippocampalen Fissur). Sterne (\*) markieren die hippocampale Fissur. Abkürzungen: so = stratum oriens; sp = stratum pyramidale; sr = stratum radiatum; slm = stratum lacunosum-moleculare; DG = Dentate gyrus; hil = hilus; ml = Molekularschicht (molecular layer); gcl = Körnerzellschicht (granule cell layer); CA1 = Cornu ammonis regio 1; CA3 = Cornu ammonis regio 3. Skalierung: 100  $\mu\text{m}$ .

### 5.7.2. Gehirnschnitte von Mäusen

Analog zur oben beschriebenen Analysemethode wurden auch die Gehirnschnitte von Mäusen ausgewertet. Dazu wurde aus einer ununterbrochenen Serie von Koronalschnitten durch den Hippocampus jeder 10. Schnitt entnommen und damit eine HCN1-Immunhistochemie durchgeführt. Aus den resultierende Färbungen wurden insgesamt 3 Hippocampusschnitte (ca. Positionen 70, 74, 78 des *Allen Mouse Brain Atlas*, coronal; <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>) ausgewählt und auf beiden Seiten ausgewertet. Aus den resultierenden 6 Werten pro Tiere wurde für jedes Intervall ein Durchschnittswert ermittelt.

### 5.8.. Graphische Darstellung und statistische Analyse

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden zwei Varianten ausgewählt:

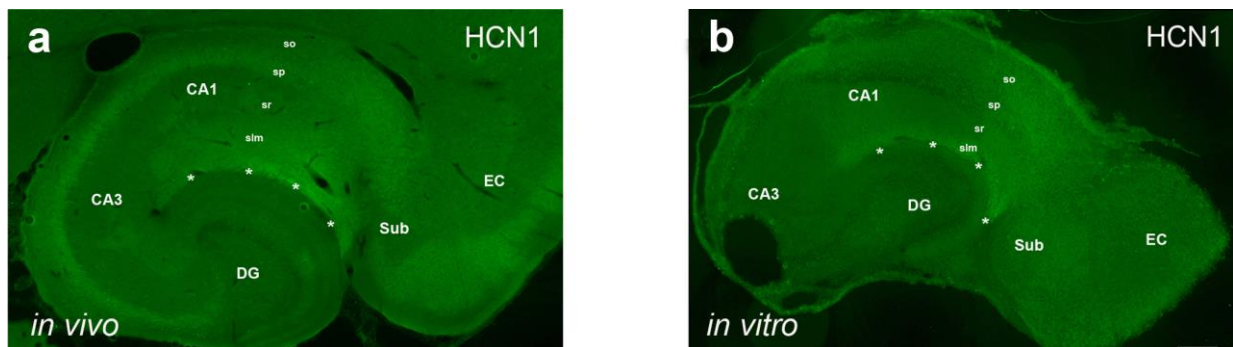
- 1) Mittels Balkendiagrammen werden die Ergebnisse (prozentualer Anteil an der HCN1 Gesamtintensität) für jedes einzelne Intervall separat dargestellt.
- 2) Durch lineare Regressionsanalyse wurde ein Wert für den Grad des Intensitätsanstiegs von Intervall 1 zu Intervall 5 ermittelt.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes *Graph Pad Prism* (Graph Pad Software) statistisch bewertet. Dabei wurde bei den Ergebnissen aus Gewebekulturen (Balkendiagramme) beim Vergleich zweier experimenteller Gruppen der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (nicht-parametrischer Test für zwei gepaarte Stichproben) und beim Vergleich dreier Gruppen der Friedman-Test (nicht-parametrischer Test für drei oder mehr gepaarte Stichproben) eingesetzt. Bei den Ergebnissen von Gehirnschnitten wurde der Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrischer Test für zwei ungepaarte Stichproben) verwendet. Bei der linearen Regressionsanalyse wurde der p-Wert (Wahrscheinlichkeit, dass die experimentellen Gruppen sich nicht unterscheiden) durch das eingesetzte Programm ermittelt. Das Signifikanzkriterium wurde bei allen Tests auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 6. Ergebnisse

### 6. 1. Die HCN1-Verteilung *in vivo* wird *in vitro* reproduziert

HCN1-Kanäle werden in der CA1-Region vom Stratum pyramidale zum Stratum lacunosum-moleculare hin zunehmend angereichert (Lörincz et al., 2002; Shin und Chetkovich, 2007; Abbildung 8a). Diese Anreicherung ist entwicklungsabhängig (Brewster et al., 2007). Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-Modell zu etablieren, in dem diese Anreicherung reproduziert wird. Dazu wurden kombinierte entorhinal-hippocampale Gewebekulturen verwendet, da die Erhaltung des vom entorhinalen Cortex ausgehenden Tractus perforans die Anreicherung der Kanäle im Stratum lacunosum-moleculare begünstigt (Shin und Chetkovich, 2007). Abbildung 8 zeigt, dass die HCN1-Verteilung in Gewebekulturen, die 11 Tage (DIV11) kultiviert worden waren (Abbildung 8b) der Verteilung im Hippocampus einer altersäquivalenten Ratte (P16) vergleichbar war (Abbildung 8a). Damit kann die entorhinal-hippocampale Gewebekultur für eine experimentelle Untersuchung der die HCN1-Verteilung regulierenden Faktoren verwendet werden.



**Abbildung 8:** Vergleich der HCN1-Verteilung im Hippocampus *in vivo* (8a) und *in vitro* (8b). Darstellung mittels Immunhistochemie. Das Muster der HCN1-Verteilung in der CA1-Region wird in der Kultur reproduziert. Abkürzungen: so = stratum oriens; sp = stratum pyramidale; sr = stratum radiatum; slm = stratum lacunosum-moleculare; DG = dentate gyrus (Gyrus dentatus); Sub = Subiculum; EC = entorhinaler Cortex; CA1, CA3 = Cornu ammonis regio 1,3. Die Sterne (\*) markieren die hippocampale Fissur. Skalierung: 500  $\mu$ m

## 6.2. Östrogen (E2)-Gabe verstärkt die HCN1-Anreicherung im Stratum lacunosum-moleculare

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese besagt, dass E2 über eine Expressionssteigerung von Reelin (Bender et al., 2010) eine Anreicherung der HCN1-Kanäle in den distalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen im Stratum lacunosum-moleculare verstärkt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde den Gewebekulturen für die Dauer von 6 Tagen E2 ( $10^{-7}$  M; DIV5-11) zugegeben und die HCN1-Verteilung im Anschluss daran im Vergleich zu nur mit Lösungsmittel ( $H_2O$ ) behandelten Vergleichskulturen quantitativ bestimmt. Die Auswertung ergab, dass die HCN1-Kanäle nach E2-Gabe im distalen Bereich (Intervall 5) im Vergleich zur Kontrolle signifikant angereichert waren (Abbildung 9a). Darüber hinaus ergab eine lineare Regressionsanalyse, dass der Anstieg (*slope*) der Expressionszunahme nach E2-Gabe signifikant erhöht war (Abbildung 9b). Die Hypothese kann somit als bestätigt angesehen werden.

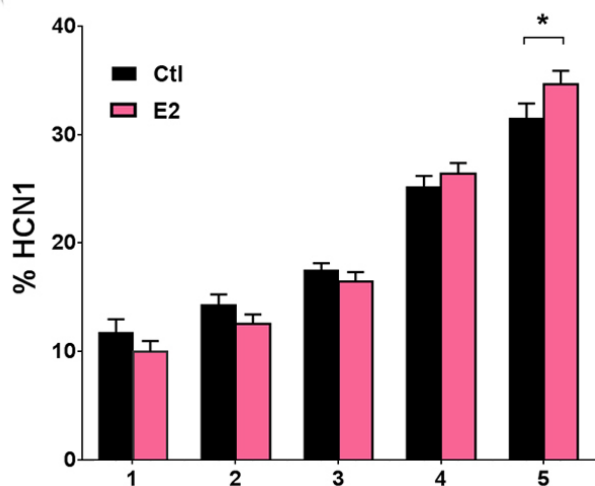


Abb. 9a

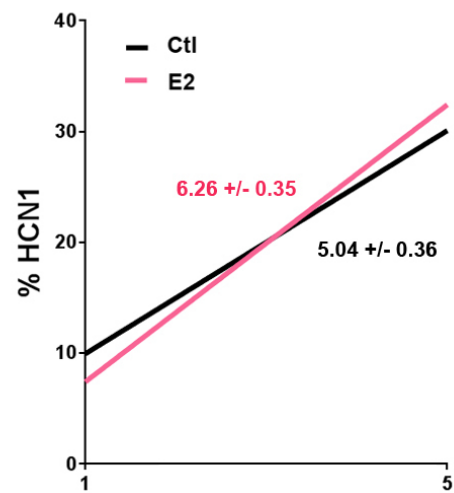


Abb. 9b

### **Abbildung 9:** Experimente mit E2

9a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe. Die rosa Balken illustrieren die Verteilung bei der E2-behandelten Gruppe.

9b: Regressionsgeraden der Kontroll- und E2-Gruppe.

Zu 9a: Statistische Daten zu Intervall 5 (Intervalle 1-4:  $p > 0,05$ ):

Intervall 5	E2	Kontrolle
N	21	21
Mittelwert	34.59	31.45
Standardabweichung	5.962	6.409
Standardfehler	1.301	1.399
p-Wert	<b>0.0351</b>	

Zu 9b: Statistische Daten zur linearen Regressionsanalyse (Anstieg der HCN1-Intensität von proximal nach distal).

	E2	Kontrolle
N	21	21
Slope	6.258 +/- 0.3505	5.040 +/- 0.3607
F	5.8658	
DFng	1	
DFd	206	
p-Wert	<b>0.0163</b>	

### 6. 3. Keine signifikante Veränderung nach Inhibition der hippocampalen Aromatase durch Letrozol

Eine Besonderheit des Sexualhormonstoffwechsels besteht darin, dass die Enzyme für die Synthese der Hormone auch in manchen Neuronen exprimiert werden. So können auch hippocampale Neurone über das Enzym Aromatase E2 *de novo* synthetisieren (Prange-Kiel et al., 2003). Um die Bedeutung dieser hippocampalen E2-Synthese für die HCN1-Verteilung in der CA1-Region zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die hippocampale Aromatase durch Zugabe des Inhibitors Letrozol ( $10^{-7}$  M; Bhatnagar et al., 2001; Kretz et al., 2004) für 6 Tage (DIV5-11) gehemmt und anschließend die HCN1-Verteilung im Vergleich zu nur mit Lösungsmittel (DMSO) behandelten Kulturen untersucht. Ergebnis: Obwohl bei der linearen Regressionsanalyse (Abbildung 10b) ein Trend zu einer geringeren Anreicherung von proximal nach distal zu beobachten war, war dieser Unterschied im Vergleich zu den Kontrollkulturen nicht signifikant ( $p = 0.185$ ). Auch beim Vergleich der Expression innerhalb der Intervalle 1-5 war kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 10a). Daraus lässt sich schließen, dass endogen im Hippocampus gebildetes E2 auf die HCN1-Verteilung nur geringen Einfluß nimmt bzw. der Effekt mit der gewählten Methodik nicht aufzulösen ist.

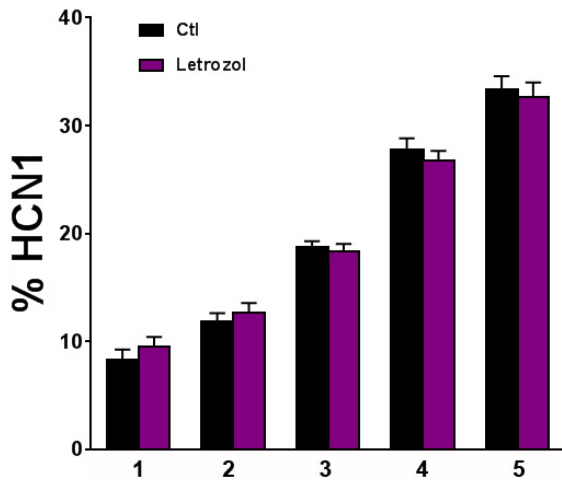


Abb. 10a

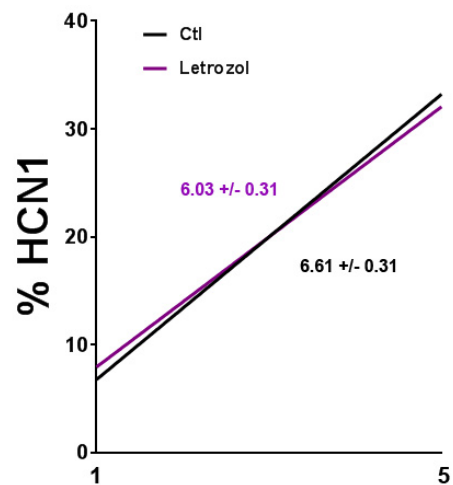


Abb. 10b

### Abbildung 10: Experimente mit Letrozol

10a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe. Die violetten Balken bilden die Verteilung bei der Letrozol-behandelten Gruppe ab.

10b: Regressionsgeraden der Kontrollgruppe und der Letrozol-Gruppe.

Zu 10b: Statistische Daten zur linearen Regressionsanalyse.

	Letrozol	Kontrolle
N	22	22
Slope	6.612 +/- 0.3059	6.032 +/- 0.3105
F	1.76806	
DFn	1	
DFd	216	
p-Wert	<b>0.185</b>	

### 6.4. Untersuchungen zur Rolle von E2-Rezeptoren

Im nächsten Schritt wurde von mir untersucht, welche Rezeptoren den beobachteten Effekt nach exogener E2-Gabe auf die HCN1-Verteilung vermitteln. Dazu wurden den Gewebekulturen für 6 Tage (DIV 5-11) spezifische Agonisten für bestimmte Rezeptortypen zugegeben: PPT ( $10^{-7}$  M, Stauffer et al., 2000) für den ER $\alpha$ , DPN ( $10^{-7}$  M, Meyers et al., 2001) für den ER $\beta$  und G1 ( $2 \times 10^{-8}$  M, Bologna et al., 2003) für den membrangebundenen GPER1. Die anschließende Auswertung ergab, dass nur G1 einen stimulierenden Effekt auf die HCN1-Verteilung hatte (Abbildung 13a und b).

Weder nach PPT (Abbildung 11a und b) noch nach DPN (Abbildung 12a und b) war beim Vergleich der einzelnen Intervalle oder nach linearer Regressionsanalyse ein signifikanter Unterschied feststellbar. Um die Annahme, dass der E2-Effekt auf die HCN1-Verteilung über den GPER1 vermittelt wird, weiter zu überprüfen, wurde in einem zusätzlichen Experiment mit drei experimentellen Gruppen der GPER1-Antagonist G36 ( $10^{-7}$  M, Dennis et al., 2011) in Kombination mit E2 ( $10^{-7}$  M) eingesetzt. Als Vergleichsgruppen dienten nur mit Lösungsmittel (DMSO + H<sub>2</sub>O) oder mit E2 (+ DMSO) behandelte „Schwester“-kulturen (Abbildung 14a und b). Während in der mit E2 (+ DMSO) -behandelten Gruppe wieder eine signifikante Steigerung der distalen HCN1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar war, zeigte sich in Kombination mit G36 kein signifikanter Effekt mehr, was darauf schließen lässt, dass die E2-Wirkung durch den GPER1-Antagonisten unterbunden wurde. Somit wurde die Annahme, dass GPER1 für den E2-Effekt auf die HCN1-Verteilung der entscheidende Rezeptor ist, in diesem Experiment bestätigt.

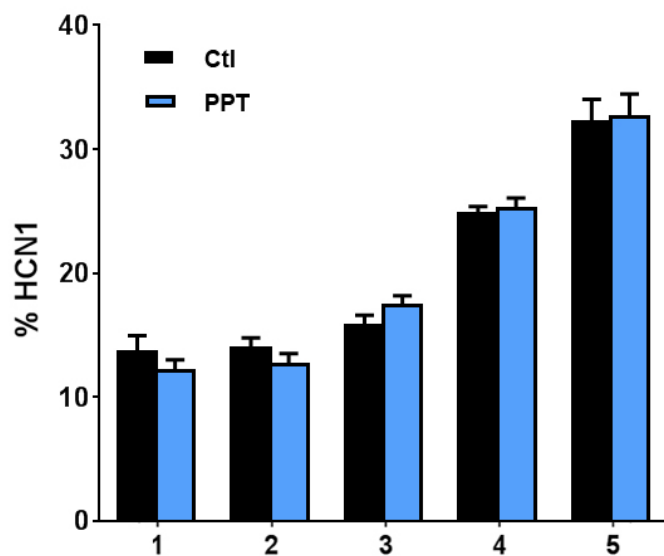


Abb. 11a

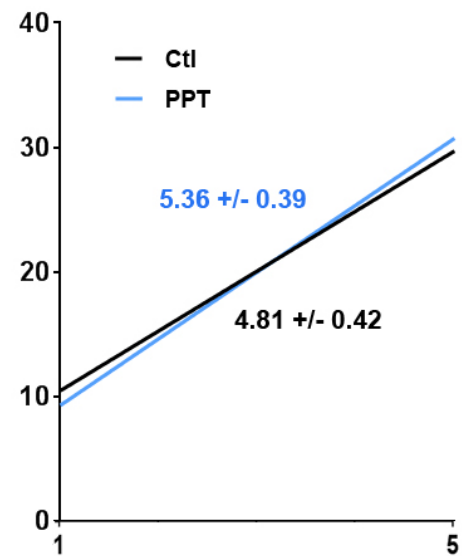


Abb. 11b

**Abbildung 11: Experimente mit dem ER $\alpha$ -Agonisten PPT**

11a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe. Die blauen Balken bilden die Verteilung bei der PPT-behandelten Gruppe ab.

11b: Regressionsgeraden der Kontrollgruppe und der PPT-Gruppe.

Zu 11a, b: Es waren weder beim Intervallvergleich noch bei der linearen Regressionsanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

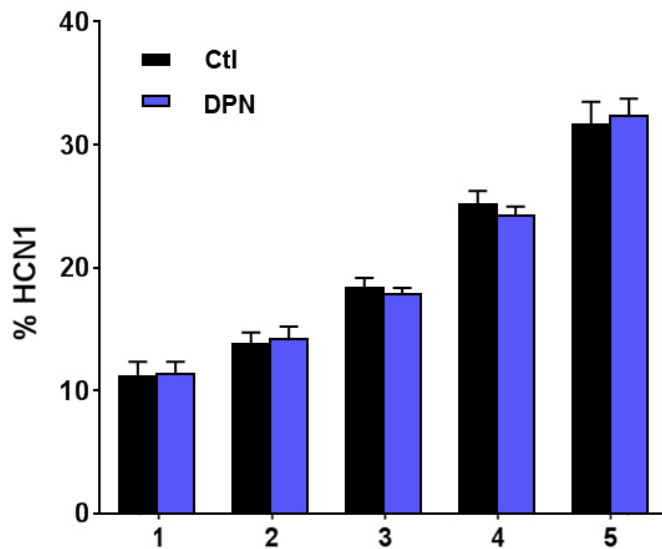


Abb. 12a

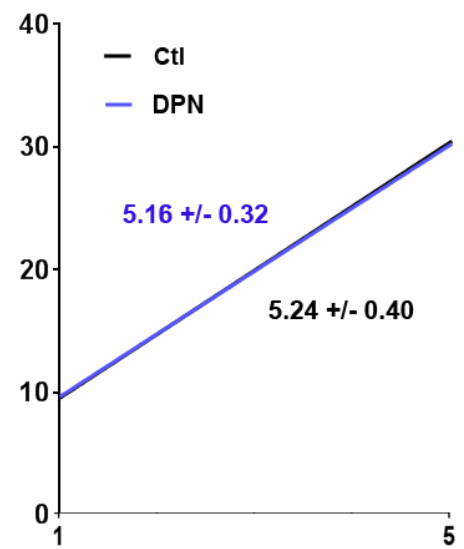


Abb. 12b

**Abbildung 12: Experimente mit dem ER $\beta$ -Agonisten DPN**

12a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe. Die violetten Balken bilden die Verteilung bei der DPN-behandelten Gruppe ab.

12b: Regressionsgeraden der Kontrollgruppe und der DPN-Gruppe.

Zu 12a, b: Es waren weder beim Intervallvergleich noch bei der linearen Regressionsanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.



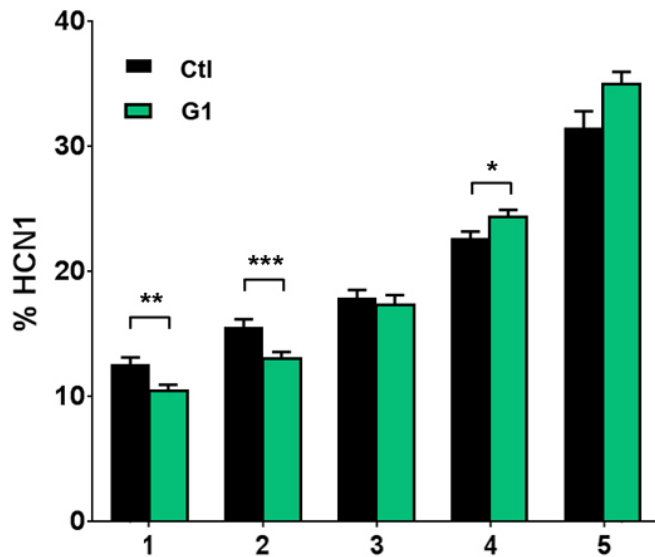


Abb. 13a

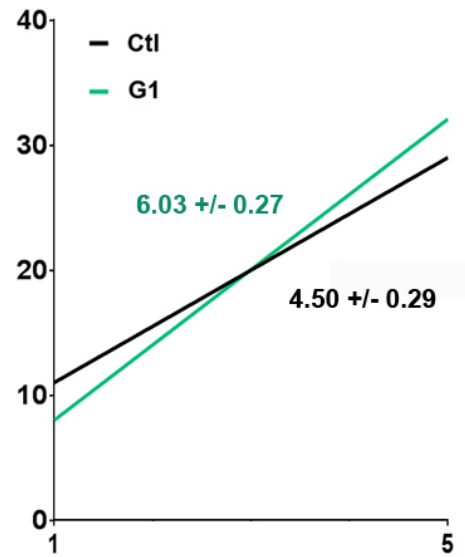


Abb. 13b

**Abbildung 13:** Experimente mit dem GPER1-Agonisten G1

13a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe. Die grünen Balken zeigen die Verteilung bei der G1-behandelten Gruppe.

13b: Regressionsgeraden der Kontrollgruppe und der G1-Gruppe.

Zu 13a: Statistische Daten zu den Intervallen 1, 2 und 4 (Intervalle 3 und 5:  $p > 0,05$ ):

Intervall 1	G1	Kontrolle
N	21	21
Mittelwert	10.49	12.52
Standardabweichung	2.148	2.870
Standardfehler	0.4688	0.6264
p-Wert		<b>0.0085</b>

Intervall 2	G1	Kontrolle
N	21	21
Mittelwert	13.01	15.52
Standardabweichung	2.651	3.136
Standardfehler	0.5785	0.6844
p-Wert		<b>0.0006</b>

Intervall 4	G1	Kontrolle
N	21	21
Mittelwert	24.34	22.63
Standardabweichung	2.770	2.637
Standardfehler	0.6046	0.5754
p-Wert		<b>0.0449</b>

Zu 13b: Statistische Daten zur linearen Regressionsanalyse.

	G1	Kontrolle
N	21	21
Slope	6.027 +/- 0.2737	4.503 +/- 0.2917
F	14.5131	
DFn	1	
DFd	206	
p-Wert	<b>0.0001837</b>	

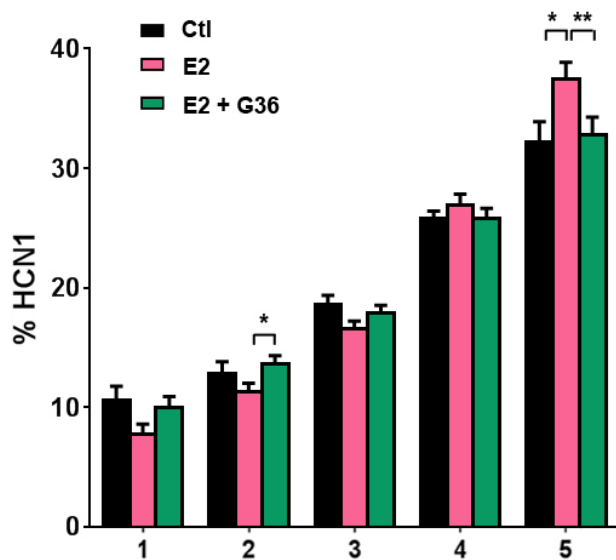


Abb. 14a

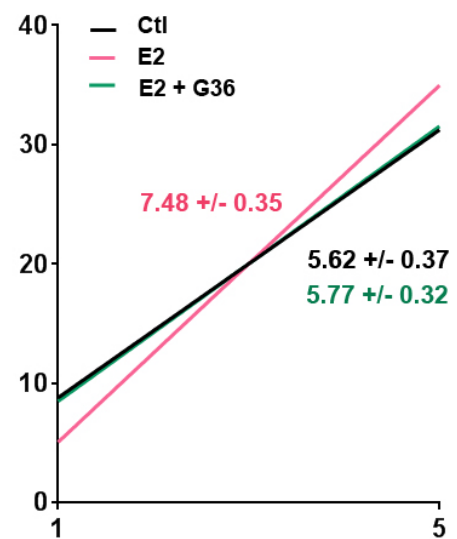


Abb. 14b

**Abbildung 14:** Experimente mit dem GPER1-Antagonisten G36 (+E2), E2 und der Kontrollgruppe (= 3 Versuchsgruppen)

14a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe. Die rosa Balken zeigen die Verteilung bei der E2-behandelten Gruppe. Die grünen Balken symbolisieren die E2+G36-behandelte Gruppe.

14b: Regressionsgeraden der Kontrollgruppe, der E2-Gruppe und der E2+G36-Gruppe.

Zu 14a: Statistische Daten zu den Intervallen 2 und 5, nach Analyse mit dem Friedman-Test (alle anderen Gruppenvergleiche:  $p > 0,05$ ):

Intervall 2	E2 (+ DMSO)	E2 + G36
N	14	14
Mittelwert	11.34	13.61
Standardabweichung	2.577	2.664
Standardfehler	0.6888	0.7119
p-Wert	<b>0.0302</b>	

Intervall 5	DMSO	E2
N	14	14
Mittelwert	32.18	37.44
Standardabweichung	6.430	5.339
Standardfehler	1.718	1.427
p-Wert	<b>0.024</b>	

Intervall 5	E2 (+ DMSO)	E2 + G36
N	14	14
Mittelwert	37.44	32.76
Standardabweichung	5.339	5.649
Standardfehler	1.427	1.510
p-Wert	<b>0.0044</b>	

Zu 14b: Statistische Daten zur linearen Regressionsanalyse.

	DMSO	E2 (+ DMSO)
N	14	14
Slope	5.619 +/- 0.3653	7.484 +/- 0.3552
F	13.4084	
DFn	1	
DFd	136	
p-Wert	<b>0.0003577</b>	

	DMSO	E2 + G36
N	14	14
Slope	5.619 +/- 0.3653	5.767 +/- 0.3232
F	0.0927362	
DFn	1	
DFd	136	
p-Wert	<b>0.7612</b>	

	E2 (+ DMSO)	E2 + G36
N	14	14
Slope	7.484 +/- 0.3552	5.767 +/- 0.3232
F	12.7829	
DFn	1	
DFd	136	
p-Wert	<b>0.0004849</b>	

## 6.5. Untersuchungen zur Rolle von Reelin in vitro

Nachdem ein stimulierender Effekt von E2 auf die HCN1-Anreicherung im Stratum lacunosum-moleculare in den vorhergehenden Experimenten mehrfach gezeigt wurde, wurde im nächsten Schritt die Rolle von Reelin in diesem Prozess untersucht. Hierzu wurden zuerst Experimente an Gewebekulturen durchgeführt, in denen die Rezeptoren von Reelin – APOER2 und VLDLR – mit Hilfe des an GST gekoppelten *Receptor Associated Protein* (GST-RAP) inhibiert wurden. Interessanterweise führte eine Co-Applikation von GST-RAP (10 µg/ml) und E2 ( $10^{-7}$  M) über 6 Tage (DIV5-11) nicht zu einer signifikanten Verringerung der durch E2 alleine bewirkten distalen HCN1-Anreicherung (Abbildung 15a und b). Auch führte GST-RAP-Applikation alleine (10 µg/ml; DIV5-11) nicht zu einer Veränderung der HCN1-Verteilung in der CA1-Region (Abbildung 16a und b). Da dieses Resultat den Befunden von Kupferman et al. (2014) widerspricht, wurde deren experimenteller Ansatz, d. h. Applikation einer höheren Konzentration GST-RAP (50 µg/ml) über einen kürzeren Zeitraum (2 Tage, DIV 8-10) ebenfalls durchgeführt (Abbildung 17a und b). Auch hier war kein Effekt auf die HCN1-Verteilung feststellbar.

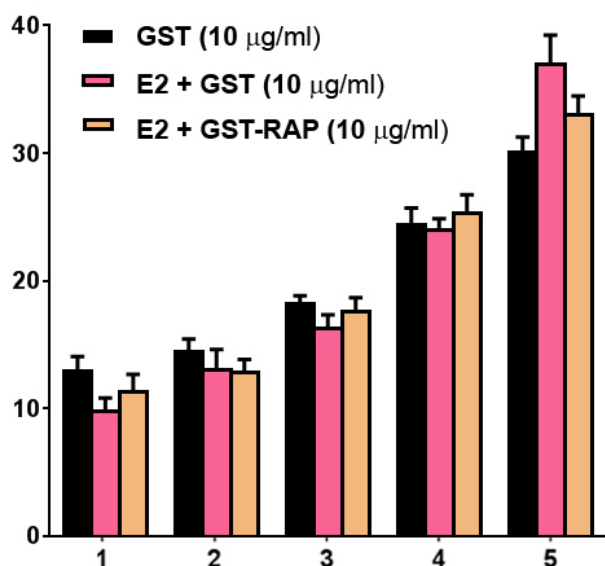


Abb. 15a

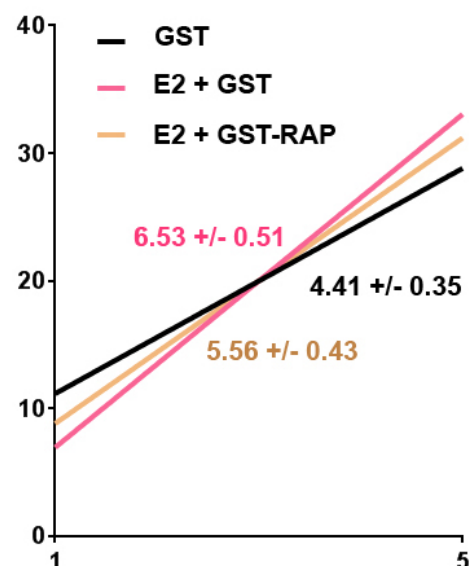


Abb. 15b

**Abbildung 15:** Experimente mit dem Reelin-Rezeptor-Antagonisten GST-RAP (+ E2) und E2 (3 Versuchsgruppen)

15a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe (GST). Die rosa Balken zeigen die Verteilung bei der E2-behandelten

Gruppe (E2+GST). Die orangenen Balken symbolisieren die E2+GST-RAP-behandelte Gruppe.

15b: Regressionsgeraden der GST-Kontrollgruppe, der E2+GST-Gruppe und der E2+GST-RAP-Gruppe.

Zu 15a: Statistische Analysen mit dem Friedman-Test ergaben in den Intervallen 1-5 keine signifikanten Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen.

Zu 15b: Statistische Daten zur linearen Regressionsanalyse.

	GST	E2 + GST
n	17	17
Slope	4.414 +/- 0.3558	6.528 +/- 0.5129
F	11.4694	
DFn	1	
DFd	166	
p-Wert	<b>0.0008834</b>	

	GST	E2 + GST-RAP
n	17	17
Slope	4.414 +/- 0.3558	5.594 +/- 0.4280
F	4.49465	
DFn	1	
DFd	166	
p-Wert	<b>0.03549</b>	

	E2 + GST	E2 + GST-RAP
n	17	17
Slope	6.528 +/- 0.5129	5.594 +/- 0.4280
F	1.95505	
DFn	1	
DFd	166	
p-Wert	<b>0.1639</b>	

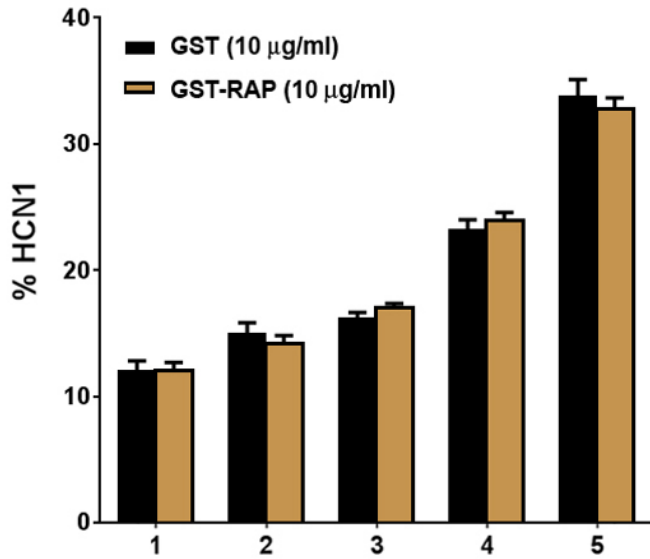


Abb. 16a

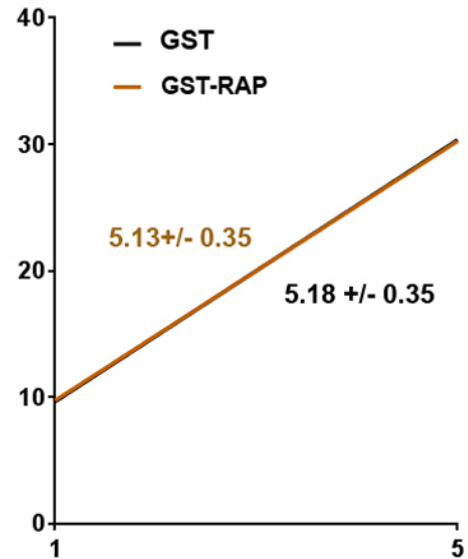


Abb. 16b

**Abbildung 16:** Experimente mit dem Reelin-Rezeptor-Antagonisten GST-RAP (10 µg/ml, DIV5-11)

16a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe (GST). Die okkerfarbenen Balken zeigen die Verteilung bei der RAP-behandelten Gruppe (RAP-GST).

16b: Regressionsgeraden der GST-Kontrollgruppe und der GST-RAP-Gruppe.

Zu 16a, b: Es waren weder beim Intervallvergleich noch bei der linearen Regressionsanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

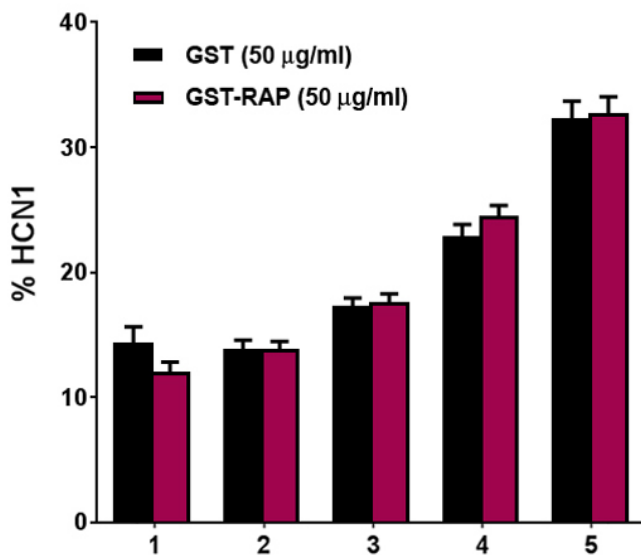


Abb. 17a

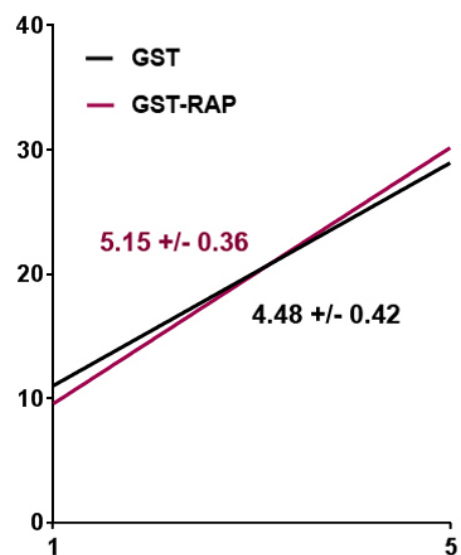


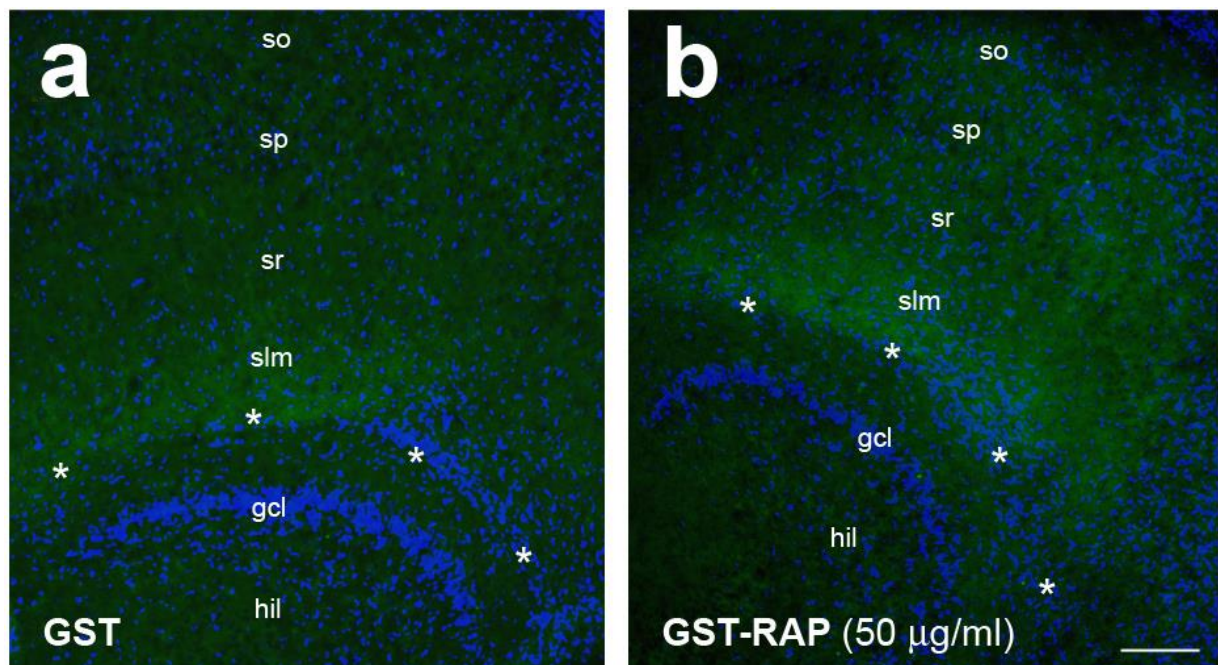
Abb. 17b

**Abbildung 17:** Experimente mit dem Reelin-Rezeptor-Antagonisten GST-RAP (50  $\mu\text{g/ml}$ , DIV8-10)

17a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe (GST). Die weinroten Balken zeigen die Verteilung bei der RAP-behandelten Gruppe (GST-RAP).

17b: Regressionsgeraden der GST-Kontrollgruppe und der GST-RAP-Gruppe.

Zu 17a, b: Es waren weder beim Intervallvergleich noch bei der linearen Regressionsanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

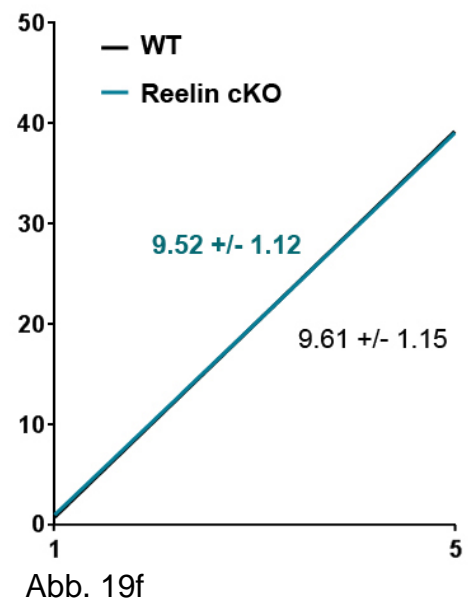
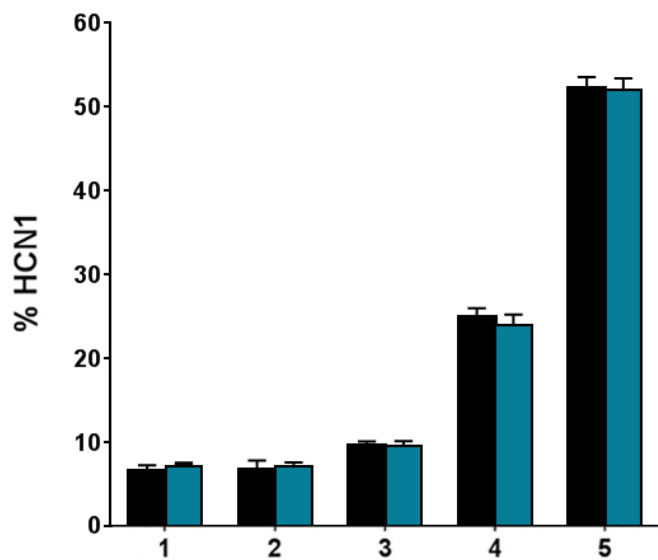
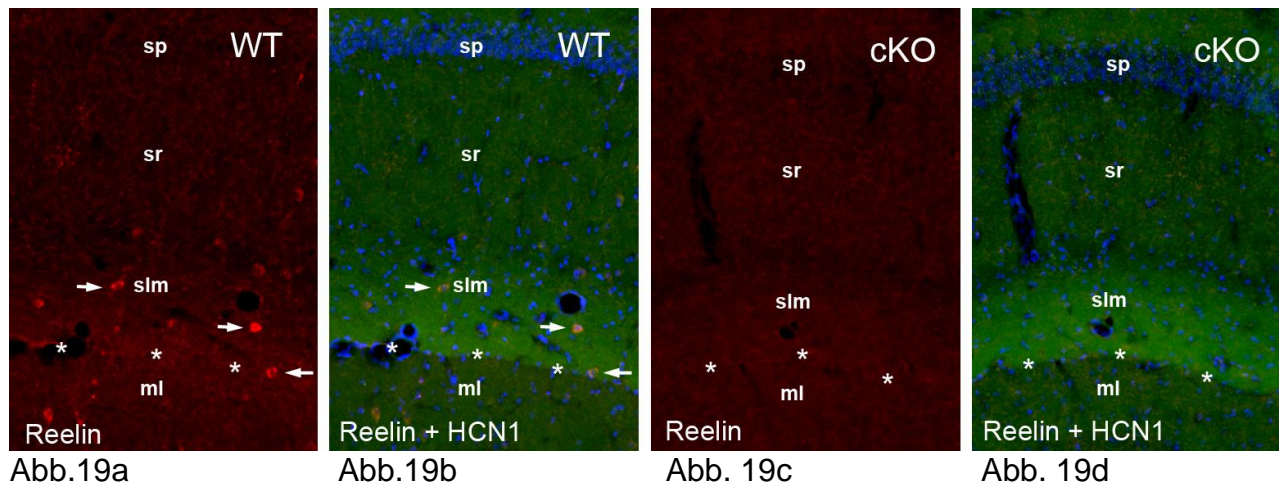


**Abbildung 18:** Vergleich der HCN1-Verteilung in der CA1-Region in vitro nach Zugabe von GST (18a) oder GST-RAP (18b, jeweils 50  $\mu\text{g/ml}$ , DIV8-10). Darstellung mittels Immunhistochemie. Kein Effekt von GST-RAP auf die HCN1-Anreicherung im Stratum lacunosum-moleculare (slm) war nachweisbar. Abkürzungen: hil = hilus; gcl = granule cell layer (Körnezellband); so = stratum oriens; sp = stratum pyramidale; sr = stratum radiatum; slm = stratum lacunosum-moleculare. Die Sterne markieren die hippocampale Fissur. Skalierung: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 6.6. Untersuchungen zur Rolle von Reelin in vivo

Da die in den Abbildungen 15-18 dargestellten Ergebnisse der von Kupferman et al. (2014) postulierten Rolle von Reelin bei der HCN1-Verteilung in der CA1-Region entschieden widersprechen, wurde zur Abklärung dieser Rolle eine weiterführende Untersuchung durchgeführt. Verwendet wurden dazu Gehirnschnitte von adulten Mäusen (5-7 Monate alt), bei denen im Alter von ca. 2 Monaten durch Gabe von

Tamoxifen eine Ausschaltung des Reelin-Gens veranlasst wurde (Tamoxifen-induzierbare Reelin-cKO, Lane-Donovan et al., 2015). Eine immunhistochemische Darstellung der HCN1-Verteilung in diesen Schnitten (Abbildung 19a-d) ergab keinerlei Hinweis auf eine Veränderung der HCN1-Verteilung in Abwesenheit von Reelin (vergleiche: Abb. 19b und d). Dies wurde durch Quantifizierung der HCN1-Verteilung von proximal nach distal bestätigt (Abbildung 19e, f).



**Abbildung 19:** Verteilung von HCN1 in der CA1-Region nach induzierter Reelin-Deletion *in vivo*:

19a/c: Reelin-Expression (rot) in Wildtyp- (a) und Knockout-Maus (c). Im Wildtyp ist Reelin-Expression vor allem in (vermutlich) Cajal-Retzius-Zellen nahe der hippocampalen Fissur zu sehen (Pfeile in a). Diese Expression fehlt nach induzierter Reelin-Deletion komplett (c).



19b/d Eine Doppelmarkierung von HCN1 (grün) und Reelin (rot) illustriert, dass die HCN1-Anreicherung im Stratum lacunosum-moleculare durch die Reelin-Deletion (d) im Vergleich zum Wildtyp (b) nicht beeinträchtigt war.

19e: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Kontrollgruppe (WT). Die blauen Balken zeigen die Verteilung bei der Reelin-Knockout Gruppe (Tamoxifen, cKO).

19f: Regressionsgeraden der WT-Gruppe und der Knock-Out-Gruppe.

Abkürzungen: sp = stratum pyramidale; sr = stratum radiatum; slm = stratum lacunosum-moleculare; ml = stratum moleculare (Gyrus dentatus); WT = Wildtyp; cKO = Reelin Knockout. Skalierung: 100  $\mu$ m.

Zu 19e, f: Es waren weder beim Intervallvergleich noch bei der linearen Regressionsanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

#### 6.7. Untersuchung der HCN1-Verteilung in der CA1-Region in vivo in Abhängigkeit des weiblichen Zyklus

Um eine eventuelle Bedeutung variierender E2-Konzentrationen während des weiblichen Zyklus für die HCN1-Verteilung zu untersuchen, wurden zum Abschluss der Studie adulte weibliche Mäuse (P90) untersucht, die sich in den Zyklusphasen Proestrus (hoher E2-Serumspiegel, n=6) oder Diestrus (niedriger E2-Serumspiegel; n=6) befanden. Die quantitative Auswertung erbrachte hier jedoch keine Hinweise auf eine Auswirkung der Zyklusphase auf die HCN1-Verteilung in der CA1-Region (Abbildung 20).

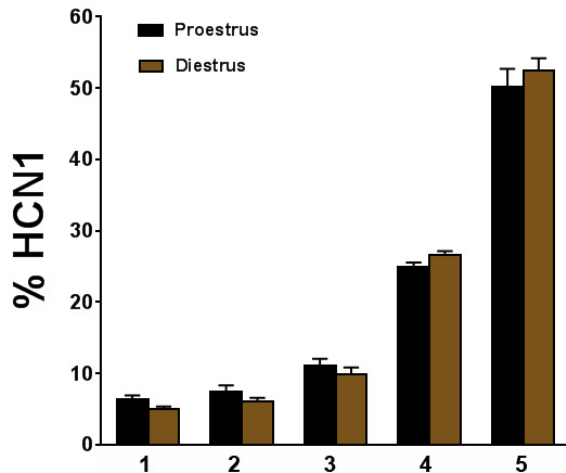


Abb. 20a

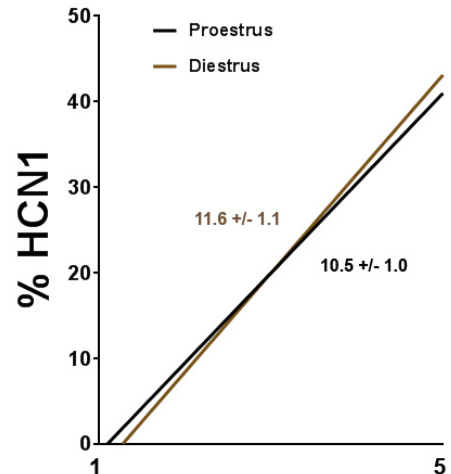


Abb. 20b

**Abbildung 20:** Vergleich der HCN1-Verteilung in der CA1-Region in adulten weiblichen Mäusen in Abhängigkeit von der Zyklusphase (Proestrus vs. Diestrus)

20a: Die schwarzen Balken zeigen die prozentuale HCN1-Kanalverteilung bei der Proestrus-Gruppe. Die braunen Balken zeigen die Verteilung bei der Diestrus-Gruppe.

20b: Regressionsgeraden der Proestrus- und Diestrus-Gruppe.

Zu 20 a, b: Es waren weder beim Intervallvergleich noch bei der linearen Regressionsanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

## 7. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung hat die Zielsetzung, die Rolle von  $17\beta$ -Estradiol (E2) bei der HCN1-Kanalverteilung in den distalen Dendriten der CA1-Region des Hippocampus zu erörtern. Dazu wurden zunächst als *in vitro*-Modell organotypische, entorhinal-hippocampale Gewebekulturen eingesetzt. Zusätzlich wurde eine zuvor geäußerte Hypothese zur Rolle von Reelin (Kupferman et al., 2014) überprüft. Sich aus den *in vitro*-Untersuchungen ergebende Befunde wurden weiterhin an Tiermodellen (ein Mausmodell für induzierbare Reelin-Defizienz; weibliche Mäuse in unterschiedlichen Zyklusphasen) überprüft. Die Untersuchung erbrachte folgende Resultate:

- 1) E2 fördert die Anreicherung der HCN1-Kanäle in den distalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen.
- 2) Dieser Effekt wird über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPER1 vermittelt.
- 3) Entgegen früherer Angaben, spielt Reelin für die HCN1-Anreicherung keine Rolle.
- 4) Inhibition der endogenen hippocampalen E2-Synthese mittels Letrozol führte nicht zu signifikanten Veränderungen der HCN1-Verteilung.
- 5) Effekte des weiblichen Zyklus waren nicht feststellbar.

Diese Befunde sollen im Folgenden diskutiert werden.

### 7. 1. *Estrogen versus Reelin*

Die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region erhalten potentialauslösenden, synaptischen Input aus überwiegend zwei Wegen: Zum einen aus der CA3 Region über die Schaffer-Kollateralen, die im Stratum radiatum enden, und zum anderen aus dem entorhinalen Cortex, der über den Tractus perforans Synapsen im Stratum lacunosum-moleculare bildet. Um die korrekte Integration der Synapsen zu erreichen, sind verschiedene Arten von Ionenkanälen an den proximalen und distalen Dendriten notwendig, die diesen Neuronen die Verarbeitungs- und Speichermöglichkeiten, angepasst an deren Anforderung, ermöglichen (Magee und Johnston 2005; Nusser, 2012). Bisher ist wenig über die

Mechanismen bekannt, über die Ionenkanäle in ihren spezifischen dendritischen Kompartimente platziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 17 $\beta$ -Estradiol (E2) einen regulierenden Faktor darstellt, indem es die Anreicherung der HCN1-Kanäle an den distalen apikalen Dendriten der CA1 Pyramidenzellen fördert. Da E2 auch die Expression von Reelin im Hippocampus stimuliert (Bender et al., 2010) war eine naheliegende Hypothese, dass diese Förderung über Reelin vermittelt wird, zumal in einer viel beachteten Publikation zuvor postuliert wurde, dass Reelin, vermittelt über den Dab1-Signalweg, für die Anreicherung der HCN1-Kanäle in der distalen CA1-Region essentiell ist (Kupferman et al., 2014). Diese Hypothese konnte von uns jedoch nach Rekonstruktion der Versuchsbedingungen und weiteren Experimenten nicht bestätigt werden! Während E2 mehrfach in unabhängigen *in vitro*-Experimenten zu einem signifikanten Anstieg der HCN1-Immunreaktivität im Stratum lacunosum-moleculare führte, war umgekehrt nach Blockade der Reelin-Rezeptoren APOER2 und VLDLR durch GST-RAP kein Effekt auf die HCN1-Verteilung *in vitro* nachweisbar. Es konnte selbst dann kein positives Ergebnis erzielt werden, als die experimentellen Bedingungen von Kupferman et al. (2014) reproduziert wurden (50  $\mu$ g/ml für 48 h). Außerdem konnten bereits wesentlich geringere Konzentrationen von GST-RAP (10  $\mu$ g/ml), wie in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eingesetzt, in früheren Studien zu einer deutlichen Reduktion der Dab1-Aktivierung führen (Groc et al., 2007). Diese Verringerung war auch in unserem Experimentiermodell nachweisbar (ca. 30% Reduktion der Dab1-Phosphorylierung bei 10  $\mu$ g/ml GST-RAP; Meseke, Neumüller et al., in Vorbereitung). Somit scheint ein methodischer Fehler eher unwahrscheinlich. Dennoch wurden zur Überprüfung, und zum Ausschluß möglicher methodischer Unterschiede im Vergleich zur Arbeit von Kupferman et al. (2014), zusätzlich adulte (d. h. 5-7 Monate alte) Mäuse untersucht, in denen im Alter von 2 Monaten, induziert durch Tamoxifen, das *Reelin*-Gen eliminiert wurde (Lane-Donovan et al., 2015). Auch in dieser Überprüfung waren nach Ausschaltung von Reelin keinerlei Veränderungen der HCN1-Verteilung in der CA1-Region nachweisbar. Es kann deshalb die Kernaussage der Arbeit von Kupferman et al. (2014), Reelin sei für die Anreicherung von HCN1-Kanälen in den distalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen essentiell, angezweifelt werden.

Wie ist diese Diskrepanz zu den Ergebnissen von Kupferman et al. (2014) zu erklären? Die Erkenntnisse dieser Arbeitsgruppe basieren vor allem auf zwei Beobachtungen:

1. Nach Ausschaltung von Dab1 in der CA1-Region von Mäusen mit Hilfe eines Adeno-assoziierten Virus (AAV), waren die HCN1-Kanalexpression und der H-Strom im Stratum lacunosum-moleculare deutlich reduziert.
2. Der somatodendritische HCN1-Gradient in der CA1-Region von organotypischen hippocampalen Kulturen wurde nach Behandlung mit GST-RAP aufgehoben.

Diese Ergebnisse können jedoch auch anders interpretiert werden: Das Adaptorprotein Dab1 kann möglicherweise auch andere Funktionen haben, als nur die bekannten Aufgaben im Reelin-Signalweg. Die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von Dab1 kann, Reelin-unabhängig, zum Beispiel über Lipoprotein-related Rezeptoren (LRPs) mit alternativen Liganden (Blake et al., 2008; Bock und May, 2016) oder durch LRP-unabhängige Signalwege, wie zum Beispiel über das *amyloid precursor protein* (APP; Trommsdorff et al., 1998; Homayouni et al., 1999; Howell et al., 1999; Young-Pearse et al., 2007; Peterziel et al., 2011) erfolgen. Da Dab1 insbesondere durch cytosolische Tyrosin-Kinasen der Src-Kinasen-Familie phosphoryliert wird (Bock und May, 2016), könnten zusätzlich auch noch andere Signalwege, unter Umständen sogar E2 über GPER1 (siehe unten), die Aktivität von Dab1 beeinflussen. Dab1-Aktivierung kategorisch mit Reelin-Funktion gleichzusetzen, ist daher nicht gerechtfertigt. Ebenso ist RAP kein spezifischer Reelin-Rezeptor-Inhibitor, sondern es blockiert generell LRPs, wozu auch wichtige Rezeptoren für die Steroidhormonaufnahme in die Zelle, die Megalin-Rezeptoren, gehören (Willnow et al, 1999). Auch hier kann also aus RAP-Effekten nicht zwingend auf eine Beeinträchtigung der Reelin-Funktion geschlossen werden.

### 7. 2. Mögliche E2-Signalwege zur Beeinflussung der HCN1-Verteilung

Es stellte sich die Frage, über welche Rezeptoren E2 seine auslösende Wirkung vermitteln könnte? Um die E2-Rezeptoren zu identifizieren, die die Anreicherung der HCN1-Kanäle an den distalen Dendriten präzisieren, wurden drei bekannte

Östrogen-Rezeptoren getestet. Dabei wurden die kerngängigen Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Hall et al., 2001; Gruber et al., 2002) und der membranständige, G-Proteingekoppelte GPER1 (Srivastava und Evans, 2013), mit spezifischen Agonisten stimuliert. Es zeigte sich ausschließlich beim membranständigen Rezeptor GPER1 ein signifikanter Unterschied, sowohl beim Anstieg (*slope*) als auch beim Vergleich einzelner Intervalle (Abb. 13). Durch Einsatz eines GPER1-Inhibitors (G36) gemeinsam mit E2 konnte dieser Befund bestätigt werden, da dieser Inhibitor die E2-Effekte auf die HCN1-Verteilung verhinderte (Abb. 14). Eine GPER1-vermittelte Einflußnahme von E2 auf HCN1-Kanäle wurde bereits früher in Barorezeptor-Neuronen gezeigt (Qiao et al., 2009; He et al., 2015). Jedoch handelte es sich dabei um einen Effekt auf die HCN1-Expression und nicht, wie in der vorliegenden Studie, auf die HCN1-Verteilung.

GPER1 ist im Hippocampus generell, und speziell im Stratum lacunosum-moleculare, des Weiteren in kortikalen Regionen, exprimiert (Hazell et al., 2009; Hammond et al., 2011; Meseke, Neumüller et al., in Vorbereitung). Der Rezeptor ist über zahlreiche Signalwege mit zellulären Signalkaskaden verbunden. So kann er beispielsweise über die Adenylatcyclase und cAMP Proteinkinasen aktivieren oder über Phospholipase C und den Phosphoinositolsignalweg den Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel der Zelle beeinflussen (Alexander et al., 2017). Neueste Befunde weisen außerdem auf die Fähigkeit von GPER1 hin, über den mTOR (*mechanistic target of rapamycin*)-Signalweg die Freisetzung von BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), das für zahlreiche Entwicklungsprozesse im Hippocampus von Bedeutung ist, zu beeinflussen (Briz und Baudry, 2015). Weiterhin wurde gezeigt, dass GPER1 auch mit cytosolischen Src-Kinasen interagiert (Prossnitz und Barton, 2011; Filardo und Thomas, 2012), was die Möglichkeit auch einer Interaktion mit dem Dab1-Signalweg eröffnet.

Weiterhin könnte GPER1 über die Beeinflussung des Cytoskeletts sein die Anreicherung der HCN1-Kanäle in den distalen Dendriten zu bewirken. Es ist bereits bekannt, dass der subzelluläre Transport von HCN1-Kanälen in Abhängigkeit von Mikrotubuli und Aktinfilamenten geschieht (Noam et al., 2010). Der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten wird jedoch stark von E2 reguliert (Srivastava et al., 2008;

Kramar et al., 2009; Vierk et al., 2012). Eine direkte Beteiligung des GPER1 an dieser Regulation wurde zwar bislang noch nicht gezeigt, ist jedoch denkbar.

### *7. 3. Warum sind keine Effekte des weiblichen Zyklus auf die HCN1-Verteilung nachweisbar?*

Ein unerwarteter Befund der Untersuchung war, dass in adulten weiblichen Mäusen während Stadien ihres Sexualzyklus, in denen die E2-Serumkonzentrationen stark unterschiedlich sind (Proestrus: hoch; Diestrus niedrig), keine Unterschiede in der HCN1-Verteilung in der CA1-Region festzustellen waren. Dieser Befund lässt sich folgendermaßen erklären:

1. Das gewählte Untersuchungsmodell – die organotypische Gewebekultur – ist streng genommen ein experimentelles Modell für Entwicklungsvorgänge. Organotypische Kulturen von Hirngewebe lassen sich nur nach Präparation in frühen postnatalen Entwicklungsstufen (bis ca. P20) für längere Zeit am Leben erhalten (Stoppini et al., 1991). Je später die Präparation erfolgt, desto geringer ist die Regenerationsfähigkeit. Untersucht wurde somit in der vorliegenden Arbeit insbesondere der Einfluss von E2 auf die Entstehung des HCN1-Verteilungsmusters, das sich in der CA1-Region der Ratte während der ersten beiden postnatalen Entwicklungswochen ausbildet (Brewster et al., 2007; Shin und Chetkovich, 2007). Es kann zwar angenommen werden, dass zu späteren Entwicklungszeitpunkten ähnliche Mechanismen wirken, es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass im Laufe der weiteren Entwicklung andere Mechanismen die E2-Effekte kompensieren.
2. Eine weitere Erklärung für diesen Befund könnte die Tatsache darstellen, dass sich die E2-abhängigen Effekte geschlechtsunabhängig präsentierten. Es ist potentiell denkbar, dass geschlechtsspezifische Regulationsmechanismen auf Hippocampusebene unterschiedliche Hormonspiegel aus der Peripherie kompensieren (Bender et al., 2017; siehe auch nachfolgenden Abschnitt).
3. Es muss berücksichtigt werden, dass Neurone im Hippocampus selbst in der Lage sind, E2 zu produzieren, da sie das Enzym Aromatase exprimieren (Hojó

et al., 2004; Kretz et al., 2004, Bender et al., 2010). Die Funktion der hippocampalen Aromatase wird jedoch zyklusabhängig reguliert: hohe E2-Serumwerte inhibieren die Aromatase, während niedrige E2-Konzentrationen eine verstärkte Aktivierung des Enzyms bewirken (Prange-Kiel et al., 2008; Kato et al., 2013). Folglich wird die hippocampale E2-Bildung über den Zyklus hinweg balanciert. Wozu dient dann diese Regulation? Die Aktivität der Aromatase kann auch noch über neuronale Aktivität reguliert werden (Balthazart and Ball, 2006; Charlier et al., 2015; Fester et al., 2015). Neuronale Aktivität wiederum ist ein entscheidender Faktor für die Konnektivität und die Informationsverarbeitung im Hippocampus. Synapsenbildung (Yuste und Bonhöffer, 2001), ebenso wie die HCN1-Verteilung in der CA1-Region (Fan et al., 2005), werden von neuronaler Aktivität reguliert. An dieser Regulation ist ebenfalls E2 beteiligt (Srivastava et al., 2008; Vierk et al., 2012; vorliegende Untersuchung). Es wäre also denkbar, dass die hippocampale Aromatase als eine Art „Sensor“ für einerseits den hormonellen Status und andererseits die Aktivität von Nervenzellen dient, und über entsprechend dosierte E2-Produktion demgemäß eine Feinjustierung der neuronalen Informationsverarbeitung vornimmt. Dieser Effekt ist vermutlich gering und dies würde auch erklären, warum nach Inhibierung der endogenen E2-Produktion mittels Letrozol – anders als nach exogener E2-Zugabe – keine signifikante Veränderung der HCN1-Verteilung detektierbar war (Abb. 10). Andererseits muss bedacht werden, dass im sensiblen System der hippocampalen Informationsverarbeitung bereits kleine Veränderungen der HCN1-Lokalisation in CA1-Pyramidenzellen eine veränderte Langzeitpotenzierung synaptischer Eingänge zur Folge haben können (Nolan et al., 2004, Fan et al., 2005).

#### *7. 4. Mögliche klinische Relevanz der Befunde*

HCN1-Kanäle werden im Gehirn überwiegend im Telencephalon exprimiert (Neocortex, Hippocampus, Amygdala), wo sie die dominante HCN-Isoform darstellen (Santoro et al., 2000). Ihre Funktion hängt jedoch sehr stark von der subzellulären Lokalisation ab (Bender und Baram, 2008). Deshalb sind Faktoren, die diese Lokalisation beeinflussen, von sehr großem Interesse. Es ist bereits länger bekannt,



dass Funktionsstörungen der HCN-Kanalfunktionen mit Epilepsien vergesellschaftet sind. So konnten Bender et al. (2003) zeigen, dass in Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie (mTLE) die HCN1-Expression in den Körnerzellen des Gyrus dentatus stark erhöht ist. Surges et al. (2012) bestätigten, dass bei Patienten mit mTLE ein bis zu 1,7-fach erhöhter H-Strom in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG) zu messen war. Die Funktion dieses erhöhten H-Stromes ist unklar, jedoch scheint die Erhöhung des H-Stroms und die Zunahme von HCN-Kanälen im DG im Zusammenhang mit Epilepsien zu stehen. Bei der Hochregulation von HCN1-Kanälen im DG könnte es sich jedoch auch um einen Schutzmechanismus zur Verhinderung von Übererregung handeln (Bender et al., 2003). Weiterhin wurden in genetischen Studien bestimmte HCN1-Genvarianten mit bestimmten Epilepsieformen in Verbindung gebracht (Poduri, 2014; Nava et al., 2014; Wu et al., 2017). Des Weiteren muss beachtet werden, dass sog. katameniale Epilepsien mit Östrogenschwankungen einhergehen können (Scharfman und MacLusky, 2006). Ob zwischen beiden Phänomenen ein Zusammenhang besteht, muss untersucht werden.

Auswirkungen von Östrogeneinflüssen auf HCN-Kanäle müssen jedoch nicht auf das Gehirn beschränkt sein. GPER1 wird beispielsweise auch stark im Herz exprimiert (Olde und Leeb-Lundberg, 2009), wo auch HCN-Kanäle bei der Regulation des Herzschlages eine wichtige Funktion haben (Biel et al., 2009). Bisher ist noch ungeklärt, ob der Einfluss von E2 sich auch die HCN1-Isoform beschränkt, oder ob auch andere HCN-Isoformen der Regulation durch Östrogen unterliegen.

## 8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass eine durch E2 stimulierte Reelin-Expression (Bender et al., 2010) zur markanten Anreicherung von HCN1-Kanälen in der distalen CA1-Region des Hippocampus führt. Vorausgegangen war dieser Hypothese die Behauptung einer anderen Arbeitsgruppe (Kupferman et al., 2014), dass Reelin für die Anreicherung von HCN1-Kanälen in den distalen (apikalen) Dendriten der CA1-Pyramidenzellen essentiell ist. Dazu wurden verschiedene *in vitro*-Untersuchungen an entorhinal-hippocampalen Gewebekulturen von Ratten (*Rattus Norvegicus*, Wistar) durchgeführt und diese durch Untersuchungen an altersäquivalenten Ratten und an Mausmodellen ergänzt.

Die Untersuchungen ergaben hinsichtlich der postulierten Hypothese einen diskrepanten Befund. So konnte in den Gewebekulturen tatsächlich ein Effekt von E2 auf die distale Anreicherung von HCN1-Kanälen in der CA1-Region nachgewiesen werden. Dieser Effekt ist jedoch unabhängig von Reelin, da weder eine Inhibierung des Reelin-Signalweges *in vitro* (mittels GST-RAP) noch die Ausschaltung der Reelin-Expression *in vivo* (Untersuchungen an induziert Reelin-defizienten Mäusen) zu einer veränderten HCN1-Verteilung in der CA1-Region führten. Die zuvor publizierten Befunde von Kupferman et al. (2014) sollten somit einer erneuten Überprüfung unterliegen.

Hingegen wurde in der vorliegenden Untersuchung gefunden, dass die E2-Effekte auf die HCN1-Verteilung in der CA1-Region über den membrangebundenen, G-Protein-gekoppelten E2-Rezeptor GPER1, und nicht über die kerngängigen Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ , vermittelt werden. Wie diese Signalkaskade genau funktioniert, wird Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Unerwartet war weiterhin der Befund, dass natürliche Schwankungen des E2-Spiegels während des weiblichen Zyklus sich in weiblichen Mäusen nicht messbar auf die HCN1-Verteilung in der CA1-Region auswirkten. Hier könnten kompensatorische Mechanismen, möglicherweise unter Einbeziehung einer endogenen hippocampalen E2-Synthese (Kretz et al., 2004), am Werke sein. Da HCN1-Kanäle im Hippocampus eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen spielen (Nolan et al., 2004), könnte eine weitere Untersuchung der beteiligten Mechanismen wertvolle Hinweise auf die Wirkung von Sexualhormonen bei diesen neuronalen Vorgänge liefern.

## 8.1. Summary

In this work the hypothesis was tested, whether an E2-stimulated Reelin expression (Bender et al., 2010) results in an enrichment of HCN1 channels at the distal CA1 region of the hippocampus or not. This assumption is based on the thesis of another scientific working group (Kupferman et al., 2014). They maintain Reelin being essential for the enrichment of HCN1 channels at the distal (apical) dendrites. We therefore performed various *in vitro* experiments by using organotypic entorhino-hippocampal cultures (*Rattus Norvegicus*, Wistar) and models of rats or mice at the same age.

Our data does not agree with the interpretation of Kupferman et al. (2014). In contrast we can suggest that E2 regulates HCN1 channel localization in CA1 pyramidal cells and this process seems to be independent of Reelin. Neither an inhibition of the *reelin* signaling pathway *in vitro* (using GST-RAP) nor experiments with *reelin*-knockout mice, in which the *reelin* gene was eliminated, have shown a different HCN1 compartmentalization in CA1. Because of these different results the data of Kupferman et al. (2014) should be under review again.

We further found in our trials that E2 promotes developmental HCN1 distal dendritic enrichment via the G-protein-coupled estrogen receptor GPER1 and not the other nuclear receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . The details of this signaling cascade will be part of future scientific explorations.

It was really unexpected that the distal dendritic enrichment of HCN1 in CA1 is not affected by the natural female estrous cycle. This could be due to the activity of endogenous E2 synthesis (Kretz et al., 2004).

As HCN1 channels thus markedly influence hippocampus-dependent learning and memory (Nolan et al, 2004), further experiments on these mechanisms might bring valuable help to understand the effects of sex hormones at these neuronal processes.

## 9. Literaturverzeichnis

Alexander A, Irving AJ, Harvey J (2017) Emerging roles for the novel estrogen-sensing receptor GPER1 in the CNS. *Neuropharmacology*. 113(Pt B):652-660.

Anstötz, M, Cosgrove, KE, Hack, I, Mugnaini, E, Maccaferri, G and Lübke, JH (2014) Morphology, input-output relations and synaptic connectivity of Cajal-Retzius cells in layer 1 of the developing neocortex of CXCR4-EGFP mice. *Brain Struct. Funct.* 219, 2119-2139.

Anstötz, M., Huang, H., Marchionni, I., Haumann, I., Maccaferri, G. and Lübke, J.H. (2016) Developmental profile, morphology, and synaptic connectivity of Cajal-Retzius cells in the postnatal mouse hippocampus. *Cereb. Cortex* 26, 855-872.

Ballif BA, Arnaud L, Arthur WT, Guris D, Imamoto A, Cooper JA (2005) Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. *Curr Biol*. 14(7):606-10.

Balthazart J, Ball GF (2006) Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci.* 29, 241-249.

Baram TZ, Santoro B (2003) The multiple personalities of h-channels. *Trends Neurosci.* 26(10):550-4.

Bacskai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW, Hyman BT (2000) The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(21):11551-6.

Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J (2002) Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem*. 277(51):49958-64.

Bender RA, Soleymani SV, Brewster AL, Nguyen ST, Beck H, Mathern GW, Baram TZ (2003) Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. *J Neurosci*. 23(17):6826-36.

Bender RA, Baram TZ (2008) Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Prog Neurobiol*. 86(3):129-40.

Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski JS, Paysen D, König A, Rune GM (2010) Roles of 17β-estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex*. 20(12):2985-95.

Bender RA, Zhou L, Vierk R, Brandt N, Keller A, Gee CE, Schäfer MK, Rune GM (2017) Sex-Dependent Regulation of Aromatase-Mediated Synaptic Plasticity in the Basolateral Amygdala. *J Neurosci*. 37(6):1532-1545.

Bhatnagar AS, Brodie AMH, Long BJ, Evans DB, Miller WR (2001) Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatase inhibitors. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 76:199-202.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X (2009) Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*. 89(3):847-85.

Blake SM, Strasser V, Andrade N, Duit S, Hofbauer R, Schneider WJ, Nimpf J (2008) Thrombospondin-1 binds to ApoER2 and VLDL receptor and functions in postnatal neuronal migration. *EMBO J*. 27, 3069-3080.

Bock HH, Herz J (2003) Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol*. 13(1):18-26.

Bock HH, May P (2016) Canonical and non-canonical reelin signaling. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 166.

- Bock HH, Jossin Y, May P, Bergner O, Herz J (2004) Apolipoprotein E receptors are required for reelin-induced proteasomal degradation of the neuronal adaptor protein disabled-1. *J. Biol. Chem.* 279, 33471-33479.
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER (2003) Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2(4):207-12.
- Brewster AL, Chen Y, Bender RA, Yeh A, Shigemoto R, Baram TZ (2007) Quantitative analysis and subcellular distribution of mRNA and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cereb Cortex.* 17(3):702-12.
- Briz V, Liu Y, Zhu G, Bi X, Baudry M (2015) A novel form of synaptic plasticity in field CA3 of hippocampus requires GPER1 activation and BDNF release. *J Cell Biol.* 210(7):1225-37.
- Brodie A (2002) Aromatase inhibitors in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 13(2):61-5.
- Bu G, Schwartz AL (1998) RAP, a novel type of ER chaperone. *Trends Cell Biol.* 8(7):272-6.
- Charlier TD, Cornil CA, Patte-Mensah C, Meyer L, Mensah-Nyagan AG, Balthazart J (2015) Local modulation of steroid action: rapid control of enzymatic activity. *Front. Neurosci.* 9:83.
- Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J (2005) Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci.* 25(36):8209-16.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719–723.
- D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T (1997) Reelin is a Secreted Glycoprotein Recognized by the CR-50 Monoclonal Antibody. *The Journal of Neuroscience* 17(1): 23 - 31.
- Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologa CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER (2011) Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127(3-5):358-66.
- DiFrancesco JC, DiFrancesco D (2015) Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Front Cell Neurosci.* 6:174.
- Falconer DS (1951) Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Genet.* 50(2):192-201.
- Fan Y, Zou B, Ruan Y, Pang Z, Xu ZC (2005) In vivo demonstration of a late depolarizing postsynaptic potential in CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 93(3):1326-35.
- Farzaneh S, Zarghi A (2016) Estrogen Receptor Ligands: A Review (2013-2015). *Sci Pharm.* 84(3):409-427.
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19, 692-705.
- Fester L, Brandt N, Windhorst S, Pröls F, Bläute C, Rune GM (2015) Control of aromatase in hippocampal neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 160:9-14.
- Fester L, Brandt N, Windhorst S, Pröls F, Bläute C, Rune GM (2016) Control of aromatase in hippocampal neurons. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160, 9-14.
- Filardo EJ and Thomas P (2012) Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology.* 153(7):2953-62.

- Förster E, Zhao S, Frotscher M (2006) Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci.* 7(4): 259-67.
- Frotscher M, Zhao S, Wang S, Chai X (2017) Reelin signaling inactivates cofilin to stabilize the cytoskeleton of migrating cortical neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 148.
- Furukawa A, Myatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998) Steroidogenic Acute Regulatory Protein(StAR) Transcripts Constitutively Expressed in the Adult Rat Central Nervous System: Colocalization of StAR, Cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3 $\beta$ - Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Rat Brain. *J Neurochem;* 71:2231-2238.
- Gong C, Wang TW, Huang HS, Parent JM (2007) Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci.* 27(8):1803-11.
- Groc, L., Choquet, D., Stephenson, F.A., Verrier, D., Manzoni, O.J. and Chavis, P. (2007) NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein reelin. *J. Neurosci.* 27, 10165-10175.
- Gruber HE, Yamaguchi D, Ingram J, Leslie K, Huang W, Miller TA, Hanley EN Jr (2002) Expression and localization of estrogen receptor-beta in annulus cells of the human intervertebral disc and the mitogenic effect of 17-beta-estradiol in vitro. *BMC Musculoskelet Disord.* 2002;3:4.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 276(40):36869-72.
- Hammond R, Nelson D, Gibbs RB (2011) GPR30 co-localizes with cholinergic neurons in the basal forebrain and enhances potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology.* 36(2):182-92.
- Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ (2009) Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol.* 202(2):223-36.
- He, J.L., Li, J.N., Zuo, C.M., Wang, L.Q., Wen, X., Zuo, M., Guan, J., Wu, D., Song, D.X., Yu, X., Qu, M.Y., Liu, Y., Qiao, G.F. and Li, B.Y. (2015) Potentiation of 17 $\beta$ -estradiol on neuroexcitability by HCN-mediated neuromodulation of fast-afterhyperpolarization and late-afterdepolarization in low-threshold and sex-specific myelinated Ah-type baroreceptor neurons via GPR30 in female rats. *Int. J. Cardiol.* 182, 174-178.
- Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A (2015) HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int J Mol Sci.* 16(1):1429-47.
- Herz J, Chen Y (2006) Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 7(11):850-9.
- Hojo YTA, Hattori, et al. (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 $\alpha$  and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(3): 865-70.
- Hollands C, Bartolotti N, Lazarov O (2016) Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis; Exploring Shared Mechanisms. *Front Neurosci.* 10:178.
- Homayouni R, Rice DS, Sheldon M, Curran T (1999) Disabled-1 binds to the cytoplasmic domain of amyloid precursor-like protein 1. *J. Neurosci.* 19, 7507-7515.
- Howell BW, Gertler FB, Cooper JA (1997) Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J.* 16:121-132.
- Howell BW, Lanier LM, Frank R, Gertler FB, Cooper JA (1999) The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5179-5188.

- Huang Z, Walker MC, Shah MM, (2009) Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *J Neurosci.* 29(35):10979-88.
- Kato A, Hojo Y, Higo, S, Komatsuzaki Y, Murakami G, Yoshino H, Uebayashi M, Kawato S (2013) Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front. Neural Circuits* 7, 149.
- Klinge CM, (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*; 29:2905-2919.
- Kramár EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G (2009) Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci.* 29(41):12982-93.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci.* 24(26):5913-21.
- Kupferman, JV, Basu J, Russo MJ, Guevarra J, Cheung SK, Siegelbaum SA (2014) Reelin signaling specifies the molecular identity of the pyramidal neuron distal dendritic compartment. *Cell.* 158(6):1335-47.
- Lane-Donovan C, Philips GT, Wasser CR, Durakoglugil MS, Masiulis I, Upadhaya A, Pohlkamp T, Coskun C, Kotti T, Steller L, Hammer RE, Frotscher M, Bock HH, Herz J (2015) Reelin protects against amyloid  $\beta$  toxicity in vivo. *Sci. Signal.* 8: ra67.
- Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, Noam Y, Shin M, Wadman WJ, Surmeier DJ, Baram TZ, Macdonald RL, Chetkovich DM (2009) Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. *J Neurosci.* 29(19):6250-65.
- Lewis AS, Vaidya SP, Blaiss CA, Liu Z, Stoub TR, Brager DH, Chen X, Bender RA, Estep CM, Popov AB, Kang CE, Van Veldhoven PP, Bayliss DA, Nicholson DA, Powell CM, Johnston D, Chetkovich DM (2011) Deletion of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel auxiliary subunit TRIP8b impairs hippocampal Ih localization and function and promotes antidepressant behavior in mice. *J Neurosci* 31, 7424-7440.
- Levin ER (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol.* 19(8):1951-9.
- Lörincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R, Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat. Neurosci.* 5, 1185-1193.
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol.* 69(6):2129-36.
- Männikkö R, Elinder F, Larsson HP (2002) Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature.* 419(6909):837-41.
- Magee JC, Carruth, M, (1999) Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J neurophysiol.* 82(4):1895-901.
- Magee JC, Johnston D (2005) Plasticity of dendritic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 334-342.
- Meseke M, Cavus E, Förster E (2013) Reelin promotes microtubule dynamics in processes of developing neurons. *Histochem. Cell. Biol.* 139, 283-297.
- Meyer G, Goffinet AM, Fairén A (1999) What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex. *Cereb Cortex.* 9(8):765-75.

Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA (2001) Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.* 44(24):4230-51.

Nava C, Dalle C, Rastetter A, Striano P, de Kovel CG, Nabbout R, Cancès C, Ville D, Brilstra EH, Gobbi G, Raffo E, Bouteiller D, Marie Y, Trouillard O, Robbiano A, Keren B, Agher D, Roze E, Lesage S, Nicolas A, Brice A, Baulac M, Vogt C, El Hajj N, Schneider E, Suls A, Weckhuysen S, Gormley P, Lehesjoki AE, De Jonghe P, Helbig I, Baulac S, Zara F, Koeleman BP; EuroEPINOMICS RES Consortium, Haaf T, LeGuern E, Depienne C (2014) De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 46(6):640-5.

Noam Y, Zha Q, Phan L, Wu RL, Chetkovich DM, Wadman WJ, Baram TZ (2010) Trafficking and surface expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 285(19):14724-36.

Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsáki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2004) A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell.* 119(5):719-32.

Nusser Z (2012) Differential subcellular distribution of ion channels and the diversity of neuronal function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 366-371.

Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K et al. (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899–912.

Olde B, Leeb-Lundberg LM (2009) GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab.* 20(8):409-16.

Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL, (1998) Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 54(1):175-80.

Pape H-C. (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol.* 58:299-327.

Peterziel H, Sackmann T, Stelau J, Kuhn PH, Lichtenthaler SF, Marom K, Klar A, Unsicker K (2011) F-spondin regulates neuronal survival through activation of disabled-1 in the chicken ciliary ganglion. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 483-497.

Piskorowski R, Santoro B, Siegelbaum SA (2011) TRIP8b splice forms act in concert to regulate the localization and expression of HCN1 channels in CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 70, 495-509.

Poduri A (2014) HCN1 Gain-Of-Function Mutations - A New Cause of Epileptic Encephalopathy. *Epilepsy Curr.* 14(6):348-9.

Pohlkamp T, Dávid C, Cauli B, Gallopin T, Bouché E, Karagiannis A, May P, Herz J, Frotscher M, Staiger JF, Bock HH (2014) Characterization and distribution of Reelin-positive interneuron subtypes in the rat barrel cortex. *Cereb. Cortex* 24, 3046-3058.

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

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



- Prossnitz ER, Arterburn JB (2005) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein-Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacol Rev.* 67(3):505-40.
- Prossnitz ER, Barton M (2011) The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 7(12):715-26.
- Qiao GF, Li BY, Lu YJ, Fu YL, Schild JH (2009) 17Beta-estradiol restores excitability of a sexually dimorphic subset of myelinated vagal afferents in ovariectomized rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* 297(3):C654-64.
- Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico AM, Ciafré SA, D'Arcangelo G, Farace MG, Keller F (2002) Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry* 277(1): 303 - 9.
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol.* 65:453-80.
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20:5264–5275.
- Santoro B, Piskorowski RA, Pian P, Hu L, Liu H, Siegelbaum SA (2009) TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. *Neuron.* 62(6):802-13.
- Scharfman H and MacLusky NJ (2006) Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 415-435.
- Schön C, Asteriti S, Koch S, Sothilingam V, Garcia Garrido M, Tanimoto N, Herms J, Seeliger MW, Cangiano L, Biel M, Michalakis S (2016) Loss of HCN1 enhances disease progression in mouse models of CNG channel-linked retinitis pigmentosa and achromatopsia. *Hum Mol Genet.* 25(6):1165-75.
- Shin M, Chetkovich DM (2007) Activity-dependent Regulation of h Channel Distribution in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *J Biol Chem.* 282(45): 33168–33180.
- Shughrue PJ, Merchenthaler I (2000) Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 99(4):605-12.
- Srivastava DP, Woolfrey KM, Jones KA, Shum CY, Lash LL, Swanson GT, Penzes P (2008) Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(38):14650-5.
- Srivastava DP, Evans PD (2013) G-protein oestrogen receptor 1: trials and tribulations of a membrane oestrogen receptor. *J Neuroendocrinol.* 25(11):1219-30.
- Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA (2000) Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J Med Chem.* 43(26):4934-47.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 37(2):173-82.
- Surges R, Kukley M, Brewster A, Rüschemschmidt C, Schramm J, Baram TZ, Beck H, Dietrich D (2012) Hyperpolarization-activated cation current Ih of dentate gyrus granule cells is upregulated in human and rat temporal lobe epilepsy. *Biochem Biophys Res Commun.* 420(1):156-60.
- Talwar GP, Segal SJ, Evans A, Davidson OW (1964) The binding of estradiol in the uterus: a mechanism for depression of RNA Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 52:1059-66.

Trimmer JS, Rhodes KJ (2004) Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol.* 66:477-519.

Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 273, 33556-33560.

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J, (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the Vldl receptor and ApoE receptor 2. *Cell.* 1999;97:689–701.

Ulen C, Siegelbaum SA (2003) Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. *Neuron.*40(5):959-70.

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

Willnow TE, Rohlmann A, Horton J, Otani H, Braun JR, Hammer RE, Herz J, (1996) RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J.* 15(11):2632-9.

Willnow, T.E., Nykjaer, A. and Herz, J. (1999) Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat. Cell. Biol.* 1, E157-162.

Wilkars W, Liu Z, Lewis AS, Stoub TR, Ramos EM, Brandt N, Nicholson DA, Chetkovich DM, Bender RA (2012) Regulation of axonal trafficking of HCN1 channels in perforant path involves expression of specific TRIP8b isoforms. *PLoS ONE* 7, e32181.

Woolley CS, McEwen BS (1992) Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J. Neurosci.* 12, 2549-2554.

Wu SZ, Ye H, Yang XG, Lu ZL, Qu Q, Qu J (2017) Case-control pharmacogenetic study of HCN1/HCN2 variants and genetic generalized epilepsies. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 45:226-233

Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM (2012) Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci.* 32(24):8116-26.

Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, Lo Turco JJ, Selkoe DJ (2007) A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J. Neurosci.* 27, 14459-14469.

Yuste R1, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 24:1071-89.

Zolles G, Wenzel D, Bildl W, Schulte U, Hofmann A, Müller CS, Thumfart JO, Vlachos A, Deller T, Pfeifer A, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B, Klöcker N (2009) Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. *Neuron.* 62(6):814-25.

### **Eigene Publikation:**

#### **Distal dendritic enrichment of HCN1 channels in hippocampal CA1 is promoted by estrogen, but does not require Reelin**

Maurice Meseke, Florian Neumüller, Xiaoyu Li, Max Anstötz, Meliha Karsak, Theresa Pohlkamp, Meike M. Rogalla, Bianka Brunne, Joachim Herz, Gabriele M. Rune, Roland A. Bender (in Vorbereitung).

Monographien:

Rudolf, Kuhlisch 2008 Biostatistik-Eine Einführung für Biowissenschaftler,  
Pearson Studium ISBN: 978-3-8273-7269-7

Speckmann, Hescheler, Köhling 2013 Physiologie 6. Auflage,  
Urban & Fischer Verlag ISBN: 978-3-437-41319-3

Trepel, M., 2008 Neuroanatomie Struktur und Funktion 4. Auflage,  
Urban & Fischer Verlag ISBN: 978-3-4374-1298-1

## 10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Roland A. Bender, meinem Doktorvater, für die Überlassung dieses spannenden Themas danken. Eine tolle Erfahrung war es, meine Ergebnisse in Göttingen präsentieren zu können. Für seine guten Ratschläge und einer hervorragenden Betreuung zu jeder Zeit, die man sich als Doktorand nicht besser vorstellen kann, möchte ich ihm herzlich danken.

Frau Prof. Dr. Gabriele Rune danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Experimente in ihrem Institut für Neuroanatomie durchführen durfte.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für eine stets angenehme und familiäre Arbeitsatmosphäre, anregende und hilfreiche Diskussionen rund um und auch neben dem Laboralltag. Frau Kristina Sander gilt mein Dank für die Inkubation meiner Slice Kulturen.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung im Studium und der Promotion danken. Sie waren stets eine wichtige Stütze und Rückhalt in jeder noch so anstrengenden Zeit.

## 11. Curriculum Vitae

**Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.**

## 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:

.....