Molekularbiologische Untersuchungen zu zentralnervösen Alterungsprozessen der Reproduktionsfunktion in der weiblichen Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von **Bassel Makhouly** aus Haifa/Israel

Göttingen 2002

<u>D7</u>

Referent: Prof. Dr. Schürman Korreferent: Prof. Dr. Fuchs Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2002

Meinen Eltern Maha und Moris Makhouly

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenin-5'-Triphosphate
bp	Basenpaare
СТР	Cytosin-5'-Triphosphate
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	counts per minute
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER α	Estrogen Rezeptor Suptyp alpha
ER β	Estrogen rezeptor Suptyp beta
et al.	et alteri
f	Femto
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GTP	Guanin-5'-Triphosphate
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactosid
KDa	Kilo Dal ton
Kb	Kilobasen
1	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LH	luteinisierendes Hormon
μ	Mikro
m	Milli
М	Mol
MBH	mediobasaler Hypothalamus

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Nano
OD	optische Dichte
р	pico
PBS	phosphae bufer saline
PCR	polymerase chian reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
POA	präoptische Regiondes anterioren Hypothalamus
RIA	Radioimmunoassay
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	$reverse\ Transkription\ mit\ anschleißender\ Polymerase-Ketten-Reaktion$
SCN	Nukleus suprachiasmaticus
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TED	Tris-EDTA-Dithiothreitol
U	unit
UTP	Uridine-5'-Triphosphate
x g	Erdbeschleunigung
x-Gal	5-Bromo-5-Chloro-3indolyl-β-D-Galaktosid

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die hypothalamo-hypophysio-ovarielle Achse	1
1.2	GABA-erges System	3
1.3	Die Alterungsprozesse des Reproduktionssystems	7
1.3.1	Die Laborratte als geeignetes Modell	8
1.3.2	ZNS als Taktgeber der reproduktiven Seneszenz	9
1.4	Die Hormon-Rezeptoren der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse	.10
1.4.1.	Estrogen-Rezeptor	.11
1.4.2	GnRH-Rezeptor	.12
1.5.	Zielsetzung	.13
MATERIAL UND METHODEN15		
2.	METHODEN	.15
2.1	Allgemeine molekular-biologische Methoden	.15
2.1.1	Kultivierung von E. coli DH 5 a	.15
2.1.2	Stammhaltung und Konservierung von E.coli DH 5 a	.15
2.1.3	Plasmid-Minipräparation (nach Qiagen ®)	.16
2.1.4	Entfernen von RNA	.16
2.1.5	Reinigung von DNA durch Phenolextraktion	.17
2.1.6	Konzentrierung der DNA durch Alkoholfallung	.17
2.1.7	DNA-Reinigung mit dem "Nucleotrap®-Kit"	.17
2.1.8	Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA und RNA	.18
2.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	.18
2.1.10	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	.19
2.1.11	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	.19
2.1.12	Präparation von kompetenten Bakterien DH 5 α	.20

2.1.13	Transformation von Plasmiden nach E. coli	20
2.1.14	Maßnahmen für den Umgang mit RNA	21
2.2	<i>in situ</i> Hybridisierung	22
2.2.1	Herstellung von radioaktiven Sense- und Antisense-cRNA für GAD ₆₅ b GAD ₆₇	ozw. 22
2.2.2	Transkription	22
2.2.3	Pre-Hybridisierung und Präparation der Gewebe	24
2.2.4	Hybridisierung	24
2.2.5	Post-Hybridisierung	25
2.2.6	Auflegung der Objektträger auf Filme	26
2.2.7	Entwicklung der Filme	26
2.2.8	Densitometrische Auswertung der Filme	26
2.2.9	Emulsionsbeschichtung der Objektträger	27
2.2.10	Entwicklung und Färbung der Objektträger	27
2.3	Kompetitive Reverse Transkription mit anschließender Polymera kettenreaktion.	ase- 28
2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.3.2	Reverse Transkription	29
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.3.3.1	Kompetitive RT-PCR	30
2.3.4	Wahl und Synthese der PCR-Primer	31
2.3.5	Klonierung der PCR-Fragmente für ER α , ER β , GnRH-R, LH- β und FSH	[-β . 32
2.3.6	Strategie zu Klonierung und Synthese von internen Standards kompetitiven RT-PCR für, ER β , GnRH-R, LH- β und FSH- β	der 33
2.3.7	Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte	34
2.3.8	In-vitro-Transkription von sense-RNA	34
2.3.9	Durchführung der PCR	35
2.3.10	Densitometrische Auswertung der PCR-Agarose-Gele	35
2.4.	Real-Time Taqman® Polymerase Kettenreaktion	36

2.4.1	Wahl der Primern und Sonden der Taqman®-PCR	37
2.4.2	Durchführung der Real-Time Taqman®	38
2.4.4	ABI PRISM [™] 7700 Sequence Detection System	38
2.5	Statistische Auswertung	39
2.5.1	Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse der in situ Hybridisierung	g.39
2.5.2	Statistische Auswertung der Versuchergebnisse RT-PCR	40
2.6	Tierexperimentelle Methoden	40
2.6.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	40
2.6.2	Tierexperimentelle Methoden zum Effekt von Testosteron im Vergleich Estradiol und Gonadektomie auf die GABA-Expression innerhalb des GnI Netzwerks	1 zu RH- 41
2.6.2.1	1 Gonadektomie (Orchidektomie)	41
2.6.2.2	2 Dekapitation und Entnahme von Geweben	42
2.6.2.3	3 Präparation von Gewebeproben aus dem Gehirn	42
2.6.3	Tierexperimentelle Methoden zur Untersuchung der physiologischen molekular-biologischen Alterungsprozesse der weiblichen Ratte	und 43
2.6.3.1	1 Dekapitation und Entnahme von Geweben	43
2.6.3.2	2 Präparation von Gewebeproben aus dem Gehirn	44
2.7	Radioimmunoassay (RIA)	44
2.7.1	Radioimmunoassay für die Messung von Prolaktin	44
2.7.3	Radioimmunoassay für die Messung von FSH	46
2.7.4	Radioimmunoassay für die Messung von Testosteron	47
3.	PUFFER UND LÖSUNGEN	48
3.1	Allgemeine molekular-biologische Methoden	48
3.2	in situ Hybridisierung	50
3.3	Tierexperimente	53
4.	ERGEBNISSE	54
4.1	Etablierung einer <i>in situ</i> Hybridisierung zur RNA-Quantifizierung GAD ₆₅ und GAD ₆₇ in den Rattengehirnarealen	von 54

4.1.1	Durchführung der Hybridisierung
4.2	Effekte von Testosteron im Vergleich zu Estradiol und Gonadektomie auf die GABA-Expression innerhalb des GnRH-Netzwerks
4.2.1	Bestimmung der Serumkonzentration von LH, Prolaktin und Testosteron in den Kontroll- und behandelten Ratten
4.2.2	Die Expression von GAD ₆₅ und GAD ₆₇ in der POA, im SCN, im MBH und im Hippocampus unter Einfluss von Gonadektomie sowie Testosteron- und Estradiol-Substitution
4.3	Entwicklung eines Tiermodells zur Untersuchung der physiologischen und molekularbiologischen Alterungsprozesse der weiblichen Ratte
4.3.1	Bestimmung der Serumkonzentration von LH, FSH, Prolaktin und Estradiol im benutzten Tiermodell
4.5	Molekularbiologische Untersuchungen zu Alterungsprozessen auf der Ebene der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse
4.5.1	Etablierung und Durchführung der kompetitiven RT-PCR
4.5.2	Etablierung der Real-Time Taqman® PCR für GAD ₆₅ , GAD ₆₇ und GnRH79
4.6	Die Expressionsveränderungen der untersuchten Gene auf der Ebene der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse
4.6.1	Die präoptische Region des vorderen Hypothalamus (POA)80
4.6.2	Der mediobasale Hypothalamus
4.6.3	Die Hypophyse
4.6.4	Das Ovar
5.	DISKUSSION100
5.1	Die Wirkung von Steroiden auf die GABA-erge Aktivität100
5.1.1	Methodische Aspekte der RNA-Quantifizierung101
5.1.2	Die Verteilung von GAD ₆₅ und GAD ₆₇ im GnRH-Netzwerk102
5.1.3	Die männliche Ratte als Tiermodell103
5.1.4	Effekte von Testosteron im Vergleich zu Estradiol und Gonadektomie auf die GABA-Expression innerhalb des GnRH-Netzwerks104
5.2	Die Alterungsprozesse der weiblichen reproduktiven System der Ratte109
5.2.1	Entwicklung eines Tiermodells zur Untersuchung der Alterungsprozesse der weiblichen reproduktiven System der Ratte

5.2.2	Methodische Aspekte der RNA-Quantifizierung durch die RT-PCR111
5.2.3	Die Verteilung der untersuchten Gene in der hypothalamo-hypophysio- ovariellen Achse
5.2.4	Die altersabhängige Veränderungen der der Expression der untersuchten Gene entlang der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse
6.	ZUSAMMENFASSUNG
7.	LITERATUR

1. Einleitung

1.1 Die hypothalamo-hypophysio-ovarielle Achse

Die reproduktive Phase aller weiblichen Säugetiere wird durch das Vorhandensein des weiblichen Zyklus charakterisiert. Die Regulation dieses Zyklus erfolgt über komplexe, hormonelle Interaktionen, den hypothalamo-hypophysio-ovariellen Regelkreis. Durch das hypothalamische Neurohormon GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormon) werden sowohl die LH- (luteinisierendes Hormon) als auch die FSH- (Follikel-stimulierendes Hormon) Sekretion aus der Adenohypophyse stimuliert. Die GnRH-Sekretion aus den hypothalamischen Neuronen in die portalen Blutgefäße des Hypophysenstiels erfolgt in allen Spezies in pulsatiler und synchroner Freisetzung (Carmel et al., 1976; Clarke; Cummins, 1982; Wilson et al., 1984). Demzufolge schüttet die Hypophyse ebenso pulsartig LH und FSH aus. Im Ovar induziert FSH die Reifung einer Kohorte von Follikeln, aus denen sich im Menschen in der Regel nur ein sogenannter Graaf-Follikel entwickelt (Jaffe et al., 1993). Die heranreifenden Follikel produzieren Estrogene, insbesondere Estradiol. Beim Zyklusbeginn beeinflussen die noch geringen Estradiolkonzentrationen das Sensibilitätsniveau des GnRH-Rezeptors der LH- und FSH-produzierenden Zellen, der sogenannten gonadotrophen Zellen, so dass die Wirkung von GnRH niedrig gehalten wird. Zusätzlich zur Wirkung in der Hypophyse reduziert Estradiol die hypothalamische GnRH-Ausschüttung. Dies wird als die negative, rückkoppelnde Wirkung von Estradiol bezeichnet. Mit zunehmender Reifung des Follikels zum Graaf-Follikel steigt der Estradiolspiegel und erreicht seinen Höhepunkt unmittelbar vor der Ovulationsphase. Als Folge dieser Estradiol-Erhöhung nimmt die Pulsaktivität der GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus zu. Charakteristisch für die ovulatorische Phase ist eine sehr große, jedoch vorübergehende Spitze in der LH-Plasma-Konzentration. Anders als diese LH-Konzentrationspitze zeichnet sich der FSH-Plasma-Spiegel durch einen weniger starken Anstieg aus. Der präovulatorische Gonadotropin-Peak wird zuerst durch den Estradiol-Anstieg und anschließend durch den Anstieg der GnRH-Pulse hervorgerufen (Genuth, 2000). Der beschriebene Effekt des Estradiols in dieser Phase wird als positive Rückkopplung des Estradiols

1

bezeichnet. Die beschriebenen Abläufe führen schließlich zur Follikelruptur. Der Follikel wird nun zum Corpus luteum, welches Estradiol und Progesteron ausschüttet. Durch die erneute gemeinsame negative Rückkopplung von Estradiol und Progesteron auf den Hypothalamus und auf die Hypophyse sinkt nun die LHund FSH- Sekretion wieder auf basale Werte herab. Die weitere Estradiol- und Progesteron-Produktion ist von der Befruchtung des Eies abhängig. Bleibt die sich Befruchtung aus, bildet das Corpus luteum zurück und die Steroidkonzentrationen sinken ab, so dass ein neuer Zyklus beginnen kann.

In der Ratte sind die GnRH-Neurone zahlenmäßig mit ungefähr 1000 Neuronen nur gering vorhanden (Silverman, 1994) und im medialen, septal-diagonalen Bandkomplex sowie im rostalen Hypothalamus verteilt. Hauptsächlich liegen ihre Axone in der Eminentia mediana des mediobasalen Hypothalamus (MBH). Ihre Perikarya befinden sich aber in der präoptischen Region (POA) des vorderen Hypothalamus (Silverman *et al.*, 1987; Merchenthaler *et al.*, 1989). Aufgrund dieser räumlichen Trennung von Axonen und Perikarya wird die Untersuchung der Regulationsmechanismen der GnRH-Freisetzung in diesen Spezien deutlich vereinfacht.

Immunohistochemische Untersuchungen, kombiniert mit retrograden-Transport-Experimenten, haben gezeigt, dass die axonalen Projektionen aus den GnRH-Neuronen relativ weitverbreitet sind und verschiedene Zielregionen erreichen (Übersicht bei Jennes und Conn, 1994). Genau so erhalten die GnRH-Neurone zahlreiche hypothalamische und extrahypothalamische Afferenzen (Übersicht bei Kalra *et al.*, 1997). Somit entsteht ein neuronales Netzwerk, für das der Begriff "GnRH-Pulsgenerator" geprägt wurde (Knobil, 1989; Knobil, 1990). Um einen LH-Puls aus der Hypophyse zu erzeugen müssen eine Mindestanzahl von, wenn nicht sogar alle GnRH-Neuronen synchron ihre Peptide freisetzen. Der GnRH-Pulsgenerator muss also *en block* aktiv werden.

Die LH-Puls-Aktivität entsteht erst in Verlauf der Geschlechtsreifung durch die Aktivierung des hypothalamischen GnRH-Pulsgenerators. Der GnRH-Pulsgenerator zeigt eine funktionale Aktivität in der Prepubertätsphase mit erhöhten LH-Pulsen nach dem Eintritt des Schlafs (Yen *et al.*, 1993; Apter *et al.*, 1993). In der späteren Pubertätsphase wird eine Veränderung in der Pulsatilität während der nächtlichen Periode beobachtet: in der Schlafphase nimmt die Frequenz der Pulse stärk ab und die Amplitude steigt an (Apter *et al.*, 1993; Grumbach, 1980; Boyer, 1978; Judd *et al.*, 1977).

Die LH-Pulse treten in der Follikelphase der Primaten und der Menschen alle 70 bis 80 Minuten auf (Dierschke *et al.*, 1970; Naftolin *et al.*, 1972; Yen *et al.*, 1972). Diese Frequenz verlangsamt sich jedoch während der Nacht. (Filicori *et al.*, 1986; Reame *et al.*, 1984). Während der negativen Rückkopplung des Estradiols im Menstrualzyklus ist die Pulsamplitude sehr klein und hochfrequent, zum Zeitpunkt des Umschlagens in den positiven Feedback steigt die Amplitude jedoch stark an. Zur Zeit des LH-Peaks kommt es zu einer Abnahme der Frequenz der LH-Pulse im Blut (Übersicht bei Jaffe *et al.*, 1990). Durch den anschließenden Progesteron-Anstieg im Blut nimmt die LH-Pulsfrequenz ab und die Amplitude steigt an.

Bei der Ratte findet während der reproduktiven Periode eine analoge LH-Sekretion statt (Levine und Ramirez, 1982; Dluzen und Ramirez, 1986; Park *et al.*, 1989). Die Steroide spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der LH-Pulsatilität. Bei fehlenden Steroiden, wie zu Beispiel nach einer Gonadektomie, ist eine Beschleunigung der Frequenz und eine erhöhte Amplitude bei den GnRH-Peaks zu beobachten. Neben den gonadalen Steroiden beeinflussen auch zahlreiche Substanzen direkt bzw. indirekt die Frequenz und Amplitude des GnRH-Netzwerks (Übersicht bei Kalra, 1993). Diese Substanzen weisen ein breites Spektrum auf und umfassen Gase, Amine, Aminosäuren, Neuropeptide und Proteine. Sie regulieren die LH-Pulsatilität sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation.

1.2 GABA-erges System

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der inhibitorische Aminosäure-Neurotransmitter Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) eine zentrale Rolle für die pulsatile Sekretion von GnRH spielt. Jarry *et al.* (1988) konnten bei Ratten nachweisen, dass die GABA-Sekretion in der POA vor dem Auftreten eines LH-Pulses im Blut dramatisch reduziert wird. Daraus folgerte man, dass GABA die GnRH-Neuronen stark inhibiert. Dies wurde auch bei anderen Spezien bestätigt (Robinson *et al.*, 1991). Bei der Unterbrechung dieser tonischen Inhibition werden alle GnRH-Neurone simultan desinhibiert und dadurch synchronisiert, so dass eine massive GnRH-Sekretion in die portalen Gefäße erfolgt. Diese inhibitorische Wirkung von GABA auf die GnRH-Neurone wurde bei beiden Geschlechtern beobachtet (Hood & Schwartz, 2000). Durch eine dauerhafte Infusion von GABA in physiologische Konzentrationen oder eines GABA-Agonisten in die preoptische Region konnte die pulsatile LH-Sekretion reversibel zum Erliegen gebracht werden, d.h. der GnRH-Pulsgenerator wurde auf diese Weise gehemmt (Leonhardt et al., 1995; Hiruma et al., 1994; Akema & Kemura, 1992). Da die GnRH-Perikarya in der POA mit zahlreichen GABA-ergen Synapsen verbunden sind (Leranth et al., 1985), liegt die Vermutung nahe, dass die inhibitorischen Effekte von GABA auf die GnRH-Sekretion direkt auf die Ebene der Perikarya der GnRH-Neurone einwirken. Trotz der Tatsache, dass neuerdings widersprüchliche Hinweise auf die Existenz von Estrogen-Rezeptoren in GnRH-Neuronen bekannt wurden (Hrabovszky et al., 2001; Hrabovszky et al., 2000; Skynner et al., 1999), bleibt die zyklisch biosynthetische und elektrische Aktivität in den GnRH-Neuronen durch die Wirkung von Estrogen und Progesteron während des ovariellen Zyklus ungeklärt (Herbison, 1998; Kalra, 1993). Als Erklärung für die Wirkung gonadalen Steroide auf die GnRH-Neurone wird in der Literatur die "transsynaptische Hypothese" favorisiert. Dabei wird angenommen, dass die GnRH-Neuronenaktivität durch steroidrezeptive, primäre Afferenten moduliert wird (Levine, 1997; Herbison, 1998). Simonian et al. (1999) konnten zeigen, dass dichte Populationen von estrogenrezeptiven Neuronen im Hypothalamus in die Nähe von GnRH-Perikarya in der POA projizieren. In dieser Gehirnregion sind zahlreiche GABA-erge Neurone vorhanden (Decavel & van den Pol, 1990; Mugnaini & Oertel, 1985), die im Gegensatz zu den GnRH-Neuronen estrogenrezeptiv sind (Flügge et al., 1986; Herbison et al., 1993). Eine deutliche Estradiol-Wirkung auf die GABA-Freisetzung (Jarry et al., 1992; Fleischmann et al., 1992), Wiederaufnahme (Luine et al., 1999; Etchegoyen & Del Zotto, 1996) und Expression von GABA-Rezeptoren (Herbison & Fenelon, 1995; Scott & Clarke, 1993) wurde in diesen Neuronen beobachtet. Diese Fakten deuten darauf hin, dass GABA-erge Neurone wegen ihrer Estrogenrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der estrogenabhängigen, transsynaptischen Regulation (negative/positive Rückkoppelung des Estradiols) auf die GnRH-Sekretion spielen. Jarry et al. (1995) konnten diese beiden Vermutungen durch die Beobachtung bekräftigen, dass unmittelbar vor und während des estrogeninduzierten LH-Peaks in ovariektomierten Ratten die GABA-Sekretion nur in der POA und nicht im MBH deutlich absinkt und dadurch vermehrt GnRH freigesetzt wird. Diese Sekretionsänderungen von GABA sind auf die Aktivierung der Gen- und Transkriptionsebenen von GABA-Systemen zurückzuführen (Leonhardt et al., 2000, Herbison, et al., 1992). Eine zusätzliche Ebene der Estradiol-Wirkung auf GABA

besteht im Hinblick auf dessen extrazelluläre Konzentration. Aufgrund der Tatsache, dass Estrogene die Transkription des GABA-Transporters 1 (GAT-1) regulieren (Herbison *et al.*, 1996), kann davon ausgegangen werden, dass diese Regulation zur Wirkung von Estrogenen auf die extrazelluläre GABA-Konzentration beitragen kann (Herbison, 1997).

Bei der Synthese von GABA dient Glutamat im Gehirn als primäres Substrat des Enzyms Glutamat-Decarboxylase (GAD) (Robert et al., 1951). Glutamat gilt als hauptsächlicher excitatorischer Aminosäure-Neurotransmitter und gehört auch zu den Substanzen, die das GnRH-Netzwerk beeinflussen (Ford & Ebling, 2000; Kawakami et al., 1998a; Kawakami et al., 1998b; Brann, 1995; Gargiulo & Donoso, 1995). Für das ratenlimitierende Enzym, GAD, wurden zwei separate cDNA identifiziert, die zwei verschiedene Formen von GAD kodieren (Erlander et al., 1991a; Bu et al., 1992). Diese beiden Isoformen sind in der Lage, GABA zu synthetisieren (Bu et al., 1992), unterscheiden sich jedoch in der Aminosäurensequenz, in ihren Molekulargewichten und in ihrer Interaktion mit ihrem Kofaktor Pyridoxyal 5'-Phosphat (Kaufman et al., 1991).

Humane GAD Isoformen bestehen aus zwei Domänen: Einer hochdivergenten Nterminalen Domäne, die eine 23%-ige Homologie zwischen den beiden GAD-Formen zeigt. Diese N-terminale Domäne ist an der Membranassoziation und den heteromeren Interaktionen (GAD₆₅ mit GAD₆₇) beteiligt (Namchuk *et al.*, 1997; Sloviter *et al.*, 1996; Dirkx *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1994; Christgau *et al.*, 1992; Erlander *et al.*, 1991b; Martin *et al.*, 1991). Die zweite Domäne ist größer und konservierter. Sie liegt im C-terminalen Bereich und beinhaltet das katalytische Zentrum (Qu *et al.*, 1998). Im Promoterbereich besteht aber wenig Homologie zwischen den beiden Isoformen (Pinal *et al.*, 1997). Die gesamte Homologie zwischen GAD65 und GAD67 beträgt in der Ratte 65% (Bu *et al.*, 1992). Das Molekulargewicht von GAD₆₅ bemisst sich auf 65 kDa bzw. bei GAD₆₇ 67 kDa. Die Namen der beiden Isoformen beziehen sich auf ihr jeweiliges Molekulargewicht.

Immunohistochemische Studien haben gezeigt, dass die intraneuronale Verteilung von GAD₆₅ und GAD₆₇ verschieden ist. Der Großteil von GAD₆₅ ist in den synaptischen Verbindungen lokalisiert, während GAD₆₇ überwiegend in den Somata und Dentriten gefunden wurde (Kaufman *et al.*, 1991; Gonzales *et al.*, 1991). Aufgrund dieser Tatsachen wurde vermutet, dass GAD₆₇ an der Synthese von GABA im Rahmen der allgemeinen metabolischen Aktivität beteiligt ist, während GAD₆₅ für die synaptische Transmission verantwortlich ist (Martin & Rimvall, 1993). Da GABA in zwei Mechanismen, dem vesikulären und nicht-vesikulären, freigesetzt wird, kann gefolgert werden, dass beide Isoformen unterschiedlich in den Sekretionsmechanismen der GABA involviert sind (Belhage *et al.*, 1993). GAD₆₅ dürfte dabei vorrangig an der Synthese und Sekretion von vesikulärer GABA beteiligt sein, während GAD₆₇ vorrangig die nicht-vesikuläre-Sekretion von GABA synthetisieren könnte (Übersicht bei Soghomonian & Martin, 1998).

GABA-erge Neurone sind durch das ganze zentrale Nervensystem verteilt. Die meisten inhibitorischen Interneurone des Rückenmarks und des Gehirns sind GABAerge Neurone wie die Korbzellen des Cerebellums und des Hippocampus, die Purkinje-Zellen des Cerebellums, die Granulazellen vom olfaktorischen Bulbus und die amakrinen Zellen der Retina. Sie sind auch in großer Zahl im Thalamus und im Hypothalamus vorhanden (Übersicht bei Schwartz 2000), wobei mehr als 50% der Neuronen im Hypothalamus und der preoptischen Region GABA-erge Neurone sind (Decavel & van den Pol, 1990; Mugnaini & Oertel, 1985).

Radioaktive und nicht-radioaktive in situ Hybridisierungsstudien haben gezeigt, dass die beiden Isoformen des GAD, GAD₆₅ und GAD₆₇, in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte in gleichen und unterschiedlichen Mengen exprimiert werden, wobei in den meisten Gehirnstrukturen die in situ Hybridisierungssignale für GAD₆₅ und GAD₆₇ ähnliche Muster gezeigt haben (Feldblum et al., 1993; Escalpez et al., 1993; Escalpez et al., 1994). Stärkere Signale für GAD₆₅ als für GAD₆₇ wurden bei der Hybridisierung innerhalb des olfaktorischen Tuberkels (pyramidische Schicht), im Hypothalamus (Preoptische Region und suprachiasmatische Nuklei) und im lateralen hypothalamischen Nukleus, im lateralen geniklaten Körper sowie in den superioren Kollikuli nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde eine höhere Signalintensität für GAD₆₇ als für GAD₆₅ in den Strukturen des olfaktorischen Bulbus (glomerularen- und granularen Schicht sowie anterioren Nuklei), im medialen Septum und im Cerebellum (Purkinje Zellen) gemessen. Im Hippocampus konnte mittels Doppel-in situ Hybridisierung gezeigt werden, dass in CA1- und CA3-Sektoren ungefähr 5-10% derjenigen Zellen, die positive Signale für GAD₆₇ aufwiesen, schwache bzw. keinerlei Signale für GAD₆₅ zeigten (Stone *et al.*, 1999).

Wie bereits oben beschrieben, regulieren die endogenen und exogenen Steroidhormone sowohl die Synthese als auch die Freisetzung (Turnover) von GABA. Da die meisten GABA-ergen Neurone estrogen- und progesteronrezeptiv sind (Brown *et al.*, 1990; Le'rànth *et al.*, 1992), konnte diese Regulation untersucht und durch die Manipulation mit Steroiden bestätigt werden (Kornblatt & Grattan, 2001; Majdoubi *et al.*, 2000; Herbison *et al.*, 1998; Grattan & Selmanoff, 1994; Grattan & Selmanoff, 1993; McCarthy *et al.*, 1992; Demling *et al.*, 1985). Dabei bleibt aber die Richtung der Regulation von GAD ungeklärt.

Zusammenfassend ist folgendes festzuhalten: Wegen der wesentlich inhibitorischen Funktion von GABA erscheint die Regulation von GAD durch Steroidhormone ein logischer Mechanismus für die Kontrolle der GnRH- und LH-Sekretion.

1.3 Die Alterungsprozesse des Reproduktionssystems

Die altersabhängigen Veränderungen der humanen, weiblichen Reproduktionsfunktionen sind durch folgende Phasen charakterisiert: Zunahme der Zykluslänge, Verlust der Regelmäßigkeit und anschließend komplettes Sistieren des Zyklus (Aschheim, 1983; Mandl, 1961; Huang und Meites, 1975; Lu et al., 1979). Die letzte Phase, die sog. Menopause, tritt ungefähr im 51. Lebensjahr einer Frau ein und beendet somit die fertile Lebensphase (Übersicht bei Wise et al., 1999). Frauen werden mit einem großen, aber begrenzten, Vorrat an postmitotischen, nichterneuerbaren Follikeln geboren (Wassarman und Albertini, 1994). Ihre Zahl wird auf bis zu mehrere Millionen geschätzt (Yen und Jaffe, 1986). Die meisten dieser Follikel degenerieren jedoch während der Entwicklung zur Pubertät. Bis zu einigen Hunderttausend primäre Follikel können sich potenziell zur Ovulation weiter differenzieren, jedoch reift im Menschen pro Menstruationszyklus nur ein Follikel bis zur Ovulation. Die Abnahme der Follikelzahl beschleunigt sich dramatisch in einer zehnjährigen Phase vor dem Eintritt der Menopause, also bei Frauen mittleren Alters mit irregulärem Menstruationszyklus (Richardson et al., 1987), der sogenannten perimenopausalen Phase, so dass in einem postmenopausalen Ovar keine Follikel mehr nachweisbar sind (Costoff und Mahesh, 1975). Seit vielen Jahren wurde die Erschöpfung der ovariellen Follikel einfach als die Ursache für die Menopause angenommen (von Saal et al., 1994). Die Menopause begleitende Veränderungen im reproduktiven System, der hypothalamo-hypophysiären Achse, wurden somit lediglich als Konsequenz der Terminierung der endokrinen Aktivität des Ovars angesehen.

In jüngster Zeit wird mehr Aufmerksamkeit auf die Möglichkeit gerichtet, dass altersabhängige Änderungen im Hypothalamus und im zentralen Nervensystem (ZNS) eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Ereignissen spielen, die zur Menopause führen: Die beschleunigte Erschöpfung des Follikelvorrats im Ovar wird möglicherweise bei Frauen mittleren Alters als Konsequenz einer Signaländerung aus dem ZNS hervorgerufen (Wise, 1997; Wise 1997).

1.3.1 Die Laborratte als geeignetes Modell

Zur Erforschung der altersabhängigen Veränderungen der weiblichen reproduktiven Funktionen wurden zahlreiche Untersuchungen an Labornagetieren unternommen. Bei der Ratte unterscheidet man drei Altersstufen: Junge Ratten im Alter von 2 Monaten, mittelalte Tiere zwischen 9-11 Monaten und alte Ratten im Alter von mehr als 20 Monaten.

Bei mittelalten Ratten sind wiederum drei Phasen in der Länge des Östrus-Zyklus zu unterscheiden: Während der Alterung der Ratte geht der reguläre 4-5-tägige Östrus-Zyklus langsam in einen irregulären Östrus-Zyklus über (Lu *et al.*, 1994; Lu, 1983a); dieser ist durch seine Zyklusverlängerung und durch ein späteres Eintreten der Ovulation gekennzeichnet. Dabei bleibt jedoch die periodische Estrogen-Sekretion erhalten. Anschließend tritt die anovulatorische Periode, die als persistent östrisch bezeichnet wird, auf.

Definitionsgemäß kommt die Menopause bei dieser Spezies nicht zustande, da sie keine Menstruationsblutung während des reproduktiven Lebensabschnitts aufweist. Deutliche physiologische Unterschiede existieren zwischen postmenopausalen Frauen und alten azyklischen Ratten. Der dramatische Verlust von ovariellen Follikeln ist bei Mensch und Ratte fundamental unterschiedlich. Bei Eintritt der Menopause weisen die Ovarien von Frauen keine Follikel auf (Richardson *et al.*, 1987). Dagegen sind bei persistent östrischen Ratten im Ovar verschiedene Entwicklungsstadien von Follikeln, nicht aber von *corpora lutea* vorhanden (Meites & Lu, 1994; Lu, 1983a). Hierbei scheinen also der Mechanismus der Rekrutierung und das Wachstum der Follikel nicht mehr zu funktionieren. Damit ist die Gonadenfunktion hinsichtlich der Gametenreifung terminiert. Trotz dieser Unterschiede existieren analoge endokrine Veränderungen bei pre- und

perimenopausalen Frauen und bei mittelalten Ratten.

In mehreren Studien wurde beobachtet, dass die Estradiol-Konzentrationen während der pre- und perimenopausalen Perioden bei Frauen sowie auch bei mittelalten Ratten nicht gesenkt wurden, sondern normal blieben oder sogar angestiegen (Klein et al., 1996a; Santoro et al., 1996; MacNaughton et al., 1992; Lu, 1983a). Ein deutlicher Anstieg der FSH-Konzentrationen wurde auch beim Menschen und der Ratte während der Transitionsphase gemessen (DePaolo, 1987; Klein et al., 1996b). Dieser selektive, supraphysiologische FSH-Konzentrationsanstieg wird als eines der frühesten Anzeichen von pre- und perimenopausalen Phasen bei Frauen sowie der Transition zum irregulären Östrus-Zyklus angesehen (Klein et al., 1996a; Klein et al., 1996b; Klein et al., 1996c). Das pulsatile LH-Sekretionsmuster zeigt auch Veränderungen, die bei Frauen und weiblichen Ratten mittleren Alters ähnlich sind. Bei mittelalten Ratten wurde sowohl eine Verzögerung als auch eine "Dämpfung" des LH-Peaks beobachtet, bevor die Tiere in ihre irreguläre Phase eintraten (Nass et al., 1984; Wise 1982; Copper et al., 1980). Eine weitere Ähnlichkeit zwischen den beiden Spezies in der Transitionsphase ist die abnehmende Fähigkeit von Estradiol, einen LH-Peak hervorzurufen (Wise, 1984; Van Look et al., 1977). Wegen dieser auch beim Menschen auftretenden Modifikationen der Estradiol-, LH- und FSH-Spiegel ist die Ratte als Tiermodell zur Untersuchung der reproduktiven Alterungsprozesse geeignet.

1.3.2 ZNS als Taktgeber der reproduktiven Seneszenz

In jüngster Zeit wurden in der hypothalamo-hypophysiären Achse deutliche Veränderungen während der Transitionsphase des reproduktiven Alterns bei Frauen sowie in Tiermodellen beobachtet. Diese neurochemischen und neuroendokrinen Signaländerungen bekräftigen die These, dass initiale Änderungen im Hypothalamus den Verlust der reproduktiven Phase sowohl bei Frauen als auch bei Ratten hervorrufen könnten.

Zum ersten Mal konnten Scarbrough und Wise (1990) zeigen, dass Veränderungen in der Funktion des Pulsgenerators bei mittelalten Ratten, deren reproduktiver Status sich aufgrund ihres regulären Östrus-Zyklus nicht von dem der jungen Ratten unterschied, auftreten können. Durch den Vergleich der pulsatilen LH-Sekretion von ovariektomierten jungen Ratten, die vor der Ovariektomie regulär zyklisch waren, und ovariektomierten mittelalten Ratten, die vor der Ovariektomie gemäß ihres zyklischen Zustandes (regulärer oder irregulärer Zyklus bzw. persistent östrisch) unterteilt waren, wurde ermittelt, dass die Amplitude der LH-Pulse mit dem Altern und dem reproduktiven Verlust abnimmt. Dagegen wurde ein Anstieg des Interpulsintervalls und der durchschnittlichen Dauer der einzelnen Pulse gemessen.

Während dieses Veränderungsmusters der Pulsamplitude als Folge von Veränderungen in Hypothalamus und/oder Hypophyse gewertet werden kann, sind die Änderungen in Interpulsintervall und -dauer ausschließlich auf Änderungen in dem hypothalamischen GnRH-Pulsgenerator zurückzuführen.

Um zu ermitteln, zu welchem Zeitpunkt in der Transition zum Sistieren des Zyklus Veränderungen im LH-Pulsgenerator gemessen werden, wurde eine genaue Untersuchung der Interpulsintervalle der jungen und mittelalten Ratten unternommen. Dabei ergab sich, dass die beobachtete Erhöhung des Interpulsintervalls erst bei Beginn des irregulären Zyklus der mittelalten Ratten zustande kam. Im Gegensatz dazu zeigte die Frequenzverteilung des Intervalls bei mittelalten Ratten, die vor der Ovariektomie noch regulär zyklisch waren, eine längere Phase zwischen den Pulsen (Scarbrough und Wise, 1990). Analoge Änderungen des LH-Pulses wurden in mittelalten Frauen in pre-menopausalen, regulär zyklischen Phasen (Matt et al., 1998; Matt et al., 1994) und in perimenopausalen, irregulär-zyklischen Phasen (Prior, 1998; Reame et al., 1996; Santoro et al., 1996 Batista et al., 1995) beobachtet. Diese Daten wurden als gewichtiger Nachweis dafür gewertet, dass subtile Änderungen im GnRH-Pulsgenerator früh, vor der Transition von regulären zu irregulären Zyklen, auftreten, und dass diese Veränderungen ein Teil von einer Kaskade von Ereignissen sein könnten, die zum reproduktiven Altern beitragen (Wise, 1999; Wise et al., 1997).

1.4 Die Hormon-Rezeptoren der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse

Die hormonellen Komponenten der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse können sowohl sich (Autoregulation) als auch andere Zielorgane regulieren. Ein Organ oder eine Zelle ist dann ein Zielorgan oder eine Zielzelle eines Hormons, wenn Rezeptoren für das jeweilige Hormon gebildet werden. Der Einfluss der Steroidhormone wird durch die Steroid-Rezeptoren, die GnRH-Peptid durch GnRH-Rezeptoren vermittelt.

1.4.1. Estrogen-Rezeptor

Die Estrogen-Rezeptoren gehören zu der Steroidhormon-Rezeptoren-Superfamilie. Diese cytoplasmatischen Rezeptoren interagieren mit den ins Cytoplasma diffundierenden Steroidhormonen. Nach der Entstehung des Hormon-Rezeptor-Komplexes erfolgt eine Konformationsänderung, die den Rezeptor an *Hormone Response Elements* (HRE) von steroidregulierten Genen binden lässt (Bettuzi *et al.*, 1991; Carson-Jurica *et al.*, 1990). Die Interaktion zwischen Hormon-Rezeptor-Komplex und HRE moduliert die Transkription der Zielgene (Jansen, 1995; Beato *et al.*, 1995; Tsai & O'Malley, 1994).

Die Wirkung von Estrogenen wird in der Zelle durch die Estrogenrezeptor Subtypen α und β vermittelt, die als ER α und ER β bekannt sind. Lange Zeit galt der ER α als der einzige Rezeptor des Estradiols. Die humane, kodierende Sequenz des ER α besteht aus 6322 Nukleotiden und ist in acht Exone aufgeteilt (Green *et al.*, 1986). Das translatierte Protein hat eine Größe von 66 kDa und entsteht durch Faltung von 595 AS. Die klonierte komplementäre DNA (cDNA) der Ratte hat eine 88%-ige Sequenzhomologie mit der des Menschen und kodiert ein 600 AS langes Protein, das eine Größe von 67 kDa hat (Koike *et al.*, 1987).

Die Ergebnisse von "knock-out"-Mäusen für ER α (Couse *et al.*, 1995; Lubahn *et al.*, 1993) lieferten die ersten Hinweise auf die Existenz eines alternativen ER. Kuiper *et al.* isolierte und klonierte 1996 erstmals den neuen ER Subtyp, ER β , aus Prostata-cDNA der Ratte. ER β kodiert ein Protein von 485 AS mit einem Molekulargewicht von 54,2 kDa. Das ER β -Protein weist eine 95%-ige Homologie mit ER α auf. Gegenwärtig ist keine Intron-Exon-Struktur von ER β der Ratte bekannt. Beim Menschen wurde das ER β -Gen isoliert (Mosselmann *et al.*, 1996) und auf dem Chromosom 14 (14q22-24) lokalisiert (Enmark *et al.*, 1997). Aufgrund dieses Nachweises kann ausgeschlossen werden, dass es sich beim ER β um eine "Splicing" Isoform von ER α handelt, da das humane ER α -Gen auf dem langen Arm des Chromosom 6 lokalisiert wurde (Gosden *et al.*, 1986). ER β bindet ebenso wie ER α Estrogen mit hoher Affinität und Spezifität und kann die Transkription über das *Estrogen-Response Element* (ERE) aktivieren (Kiuper *et al.*, 1996; Kuiper *et al.*, 1997).

ER α und ER β werden in verschiedenen Organen und Zelltypen in unterschiedlichen Mengen exprimiert (Laflamme *et al.*, 1998; Mitchner *et al.*, 1998; Byers *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1997; Shughrue *et al.*, 1997a). Die Regulation der Estrogen-Rezeptoren durch Estrogen oder durch synthetische und pflanzliche Steroidanaloga erfolgt sowohl gewebe- als auch rezeptorspezifisch, d.h., die Wirkung auf ER α und/oder ER β ist z.B. einmal in bestimmten Zielorganen/-zellen antagonistisch und in anderen agonistisch (Makela *et al.*, 2000; Tessier *et al.*, 2000; Österlund *et al.*, 1998; Orikasa *et al.*, 1996; Katzenellenbogen *et al.*, 1996).

1.4.2 GnRH-Rezeptor

Im Gegensatz zu den Steroid-Rezeptoren gehört der plasmamembranständige GnRH-Rezeptor (GnRH-R) zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der metabotropischen Rezeptor-Superfamilie. Der ligand-beladene Rezeptor interagiert mit einem G-Protein und aktiviert dieses. Das aktivierte G-Protein bindet GTP und interagiert mit dessen Effektoren und löst die sog. "Second Messenger Cascade" aus, die zur Öffnung Calcium-Kanälen in der Membran führt (Sieglbaum *et al.*, 2000). Die aus der Hypophyse isolierte cDNA des Ratten-GnRH-R ist 2,9 kb groß und kodiert ein 327 AS langes Protein mit drei N-gebundenen Glykosylationsseiten (Kaiser *et al.*, 1994). Die Topologie zeigt sieben hochhydrophobe Regionen, die alle typischen Eigenschaften einer Transmembrandomäne aufweisen (Kakar *et al.*, 1994; Tsutsumi *et al.*, 1992).

Die Expressionsmuster von GnRH-R im Hypothalamus (Han *et al.*, 1999; Jennes *et al.*, 1996), Hippocampus (Jennes *et al.*, 1997), in der Hypophyse (Kakar *et al.*, 1994) und im Ovar (Kogo *et al.*, 1999) können durch Steroide und/oder GnRH reguliert werden.

1.5. Zielsetzung

Signalveränderungen im GnRH-Netzwerk rufen lange vor dem Auftritt der Transition vom regulären in den irregulären Zyklus altersabhängige Änderungen in der reproduktiven Phase hervor. In jungen Ratten fungiert der Neurotransmitter GABA als ein wichtiger Bestandteil des GnRH-Netzwerks. Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung sowie seiner Bedeutung als "Eintrittspforte" für die negative/positive Rückkoppelung des Estradiols spielt GABA eine unverzichtbare Rolle bei der Regulation der GnRH-Sekretion. Durch die Messung der Freisetzungsraten von GABA in verschiedenen hypothalamischen Regionen von mittelalt persistent östrischen bzw. persistent dieöstrischen Ratten im Vergleich zu jungen Ratten konnten Jarry *et al.* (1999) zeigen, dass die Aktivität von GABA-ergen Neuronen auch eine Rolle während des Alterns spielt. Diese beobachteten hypothalamischen Aktivitätsveränderungen während des Alterns sind Teil einer Kaskade von Ereignissen, die zum Ende des Zyklus-Verlaufes führen könnten.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll der Einfluss von Steroiden auf die Sekretion von GABA in einem Tiermodell untersucht werden. Um den endokrinen Zustand der Tiere gleich zu halten und den Einfluss des Östrus-Zyklus auszuschließen, ist das männliche Rattenmodell zu wählen. In diesem Modell soll der Einfluss von Testosteron und Estradiol im Vergleich zur Gonadektomie untersucht werden. Die Synthese von GABA ist anhand der Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ mit der Methode der *in situ* Hybridisierung zu messen. Als Gehirnareale werden die Preoptische Region (POA), der suprachiasmatische Nukleus (SCN), der mediobasale Hypothalamus (MBH) und der Hippocampus (Gyrus dentatus) ausgesucht.

Um endokrine und molekularbiologische Untersuchungen während der Transitionsphase durchführen zu können, soll im zweiten Teil dieser Arbeit ein Tiermodell, das die regulär zyklische Phase bei den mittelalten Ratten wiedergibt, entwickelt werden. Dieses Modell soll auch von der Handhabung her als eine einfache Alternative zu einer langfristige Vaginal-Abstriche erfordernden Ermittlung der Transitionsphase fungieren. Dabei werden 3 Monate alte proöstrische Ratten (Y) und 12 Monate alte persistent östrische Ratten (MA) benutzt. Den MA-Ratten wird über einen Zeitraum von 12 Tagen jeden vierten Tag um 12 Uhr Progesteron injiziert. Die Progesteroninjektion kann bei persistent östrischen Ratten den Östrus-Zyklus wieder in Gang bringen (Huang *et al.*, 1976; Quadri *et al.*, 1973; Clemens *et al.*, 1969). Die MA-Ratten werden am Tag 12 um 10 Uhr, 13 Uhr sowie um 17 Uhr und die Y-Ratten um 13 Uhr und 17 Uhr getötet. Die Prolaktin-, FSH- und LH-Konzentrationen im Serum sollen mit Radio-Immuno-Assay (RIA) festgestellt werden. Der LH-Spiegel soll als Kontrollwert für eine positive Reaktion der Tiere auf Progesteron sowie auch als Kontrolle des Tiermodells fungieren.

Die molekularbiologischen Untersuchungen werden auf den drei Ebenen der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse durchgeführt, um die Expression verschiedener Rezeptoren und Peptide zu studieren. In dieser Arbeit soll zunächst die aus Hypophyse, Ovarien und verschieden Regionen des Gehirns isolierte RNA quantitativ bestimmt werden. Dafür soll die kompetitative RT-PCR als Meßinstrument etabliert werden. Durch die Verkürzung der cDNA der untersuchten Rezeptoren bzw. Peptide wird eine exogene Sequenz als interner Standard hergestellt. Dadurch wird das gleiche Primer-Paar für den jeweiligen Rezeptor/das Peptid und für den Standard benutzt. Die Etablierung der quantitativen Real-Time RT-PCR mit Taqman® soll die kompetitive RT-PCR ergänzen. Folgende Gene sind zu untersuchen: Estrogen-Rezeptoren α und β , GnRH, GnRH-Rezeptor, beide Isoformen des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamat Decarboxylase (GAD 65 und GAD 67), LH- β sowie FSH- β .

Material und Methoden

2. Methoden

Die Prinzipien der in dieser Arbeit angewandten Methoden sollen in diesem Kapitel dargestellt werden. Die dafür benutzten Chemikalien und Materialien und die Rezepturen für Medien und Puffer sind im Anschluss an dieses Kapitel separat aufgelistet.

2.1 Allgemeine molekular-biologische Methoden

2.1.1 Kultivierung von *E. coli* DH 5 a

Für Plasmidpräparationen in kleinerem Maßstab werden die Bakterien, ausgehend von einer Einzelkolonie, in 5 ml des entsprechenden Nährmediums (mit Antibiotika) im Luftschüttler bei 37°C und 120 rpm angezogen. Größere Volumina werden im Erlenmeyer-Kolben kultiviert.

Bei Kulturausstrichen auf Festmedien erfolgt die Inkubation bei 37°C im Brutschrank.

2.1.2 Stammhaltung und Konservierung von *E.coli* DH 5 a

Zur Lagerung von *E. coli* DH 5 α wird der Stamm selektiv auf Festmedium angezogen. Einzelne Kolonien werden mit einer Pipette abgenommen und über Nacht in 2 ml LB-Medium bei 37°C kultiviert. Aliquots der Flüssigkultur werden mit 15 % Glycerin versetzt und bei - 70°C als Glycerin- Suspension aufbewahrt. Zur

Reaktivierung werden die Suspensionen auf Eis aufgetaut. Anschließend werden 10 µl Bakterien-Stammkultur in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.3 Plasmid-Minipräparation (nach Qiagen ®)

Die Minipräparation dient der schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA, die sauber genug ist, um für Restriktionsanalysen und Klonierungsexperimente eingesetzt werden zu können. Die folgenden Zentrifigationsschritte werden in einer Tischzentrifuge durchgeführt:

- selektive Anzucht der Bakterien über Nacht in LB-Medium
- 2 ml Kultur 3 min bei 12.000 rpm zentrifugieren, Überstand quantitativ abnehmen
- Pellet in 200 µ1 Puffer 1 aufnehmen
- Zugabe von 200 µl Puffer 2, vorsichtig mischen
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zugabe von 200 µl Puffer 3, vorsichtig mischen
- 15 min bei 12.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Gefäß überfuhren
 je 300 µl Phenol (pH 8) und Chloroform zufügen, kurz mischen
- wässrige Phase in ein neues Gefäß überfuhren
- Phenol/Chloroform-Extraktion wiederholen
- Ethanol- oder Isopropanol-Fällung der DNA

2.1.4 Entfernen von RNA

Für die Restriktionsanalyse und weitere DNA-Manipulationen ist es notwendig, die bei der Plasmid-Minipräparation mit isolierter RNA vollständig zu entfernen. Dieses wird durch eine RNase-Behandlung erreicht, die entweder gleichzeitig mit der Restriktionsspaltung erfolgt oder folgendermaßen durchgeführt wird:

DNA mit 1 IU Rnase/µg DNA versetzen und 10 min bei 37°C inkubieren.

2.1.5 Reinigung von DNA durch Phenolextraktion

Zur Inaktivierung von Restriktionsenzymen und zum Entfernen von Proteinen aus DNA-Präparationen wird die DNA mit Phenol extrahiert. Durch eine kurze Zentrifugation wird eine Phasentrennung herbeigeführt. Die in der wässrigen Phase vorhandene DNA wird anschließend mit Alkohol gefällt. Die Alkoholfällung erfolgt folgendermaßen:

- Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) zum DNA-Präparat, mischen
- 5 min Zentrifugation bei 12.000 rpm
- obere (wäßrige) Phase abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- Extraktion eventuell wiederholen, bis die Interphase nicht mehr vorhanden ist
- Alkoholfällung

2.1.6 Konzentrierung der DNA durch Alkoholfallung

Zur Konzentrierung und Reinigung kann DNA aus einer wässrigen Lösung gefällt werden. Dies kann folgendermaßen durchgeführt werden:

- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,8 5,2) zum DNA-Präparat
- Zugabe des zweifachen Volumens 96%igen Ethanol oder des 0,6fachen Volumens Isopropanol
- mindestens 20 min bei 20°C inkubieren
- 15 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand vorsichtig dekantieren
- Pellet mit 70% igem Ethanol waschen
- 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet trocknen
- DNA in adäquater Menge Wasser aufnehmen

2.1.7 DNA-Reinigung mit dem "Nucleotrap®-Kit"

Diese Methode stellt eine schnelle und effektive Art der DNA-Reinigung dar. Unter

anderem kann DNA aus Agarose-Gelen isoliert werden. Die DNA wird an eine Silika-Matrix (Glasmilch) gebunden. Verunreinigungen wie Salze, Nukleotide, Agarose oder Proteine werden nicht gebunden und können somit durch mehrere Waschschritte entfernt werden. Durch Resuspension der Glasmilch in Wasser und Erhöhung der Temperatur wird die DNA von der Matrix gelöst und kann weiter verwendet werden.

2.1.8 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA und RNA

Die Konzentration der isolierten DNA oder RNA kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden. Eine OD_{260} von 1 entspricht bei einer Schichtdichte der Küvette von 1 cm 50 µg/ml DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der DNA/RNA wird anhand der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Nukleinsäuren werden als rein bezeichnet, wenn der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführte Gel-Elektrophorese führt zu einer Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Zur Visualisierung der PCR-Produkte oder DNA-Fragmente nach Restriktion und Ligation werden in horizontalen Flachbettapparaturen Gele aus 0,8 - 1,5 % Agarose gegossen, welche einen Trennbereich von 0,2 - 4 Kilobasen aufweisen. Zur Größenbestimmung wird ein DNA-Längenstandard von GIBCO-BRL (Karlsruhe) mit aufgetragen. Die Taschen in den Gelen können ein Volumen von ca. 10 µl aufnehmen.

Es werden folgende Arbeitsschritte ausgeführt:

- die Agarose wird in 0,5 fachem TBE-Puffer gekocht, bis sie vollständig gelöst ist
- Abkühlung der Lösung auf ca. 60°C
- die warme Agarose-Lösung luftblasenfrei in die Flachbettkammer gießen, Kamm einsetzen

- nach Erstarren des Gels den Kamm entfernen
- das Gel mit 0,5 X TBE überschichten
- 10 µl DNA-Probe mit 2 µl Stop-Mix mischen und in die Taschen geben.

Der Elektrophorese-Lauf erfolgt 1 - 3 Stunden bei 60 - 100 Volt, wobei die Qualität der Auftrennung und die Schärfe der Banden von der angelegten Spannung und der Laufzeit abhängig sind. Anschließend wird das Gel in Ethidiumbromid-Lösung gefarbt und auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer digitalen-Kodak®-Kamera unter Verwendung eines Rot-Orange-Filters fotografiert.

2.1.10 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die Reaktionsbedingungen der Restriktionsanalysen sind von verschiedenen Faktoren abhängig, die vom verwendeten Enzym bestimmt werden. So sind die Reaktionstemperatur und die Konzentration des Enzyms von entscheidender Bedeutung. Ein Restriktionsansatz von 20 µl kann z.B. folgendermaßen aussehen:

- 3 μl DNA
- $2 \mu l$ 10 x Restriktionspuffer
- $13 \ \mu 1$ H₂O Bidest
- 1 μ l Enzym (5U/1 μ g DNA)

Die Ansätze werden ca. 1 - 2 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend kann eine Inaktivierung des Enzyms durch Hitze (10 min 70°C), Phenol-Extraktion oder Reinigung der DNA mit NUCLEOTRAP® erfolgen.

2.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Vektor- und Insert-DNA werden nach der Restriktion in geeignetem Verhältnis

gemischt, wobei das Mischungsverhältnis von der Konzentration der DNA abhängig ist. Die Ligation verläuft optimal in einem geringen Reaktionsvolumen bei hoher DNA-Konzentration. Dazu wird die DNA in Ligationspuffer (G1BCO-BRL, Karlsruhe) aufgenommen bzw. verdünnt. Die Reaktion wird durch Zugabe von T4-DNA-Ligase gestartet, wobei die Menge des Enzyms von der Größe des Ansatzes abhängt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei einer Temperatur von 16°C. Das Ligationsgemisch kann anschließend zur Transformation eingesetzt werden.

2.1.12 Präparation von kompetenten Bakterien DH 5 α

Die kompetenten Bakterien wurden nach Inoue *et al.* (1990) präpariert. 5 ml DH 5 α Übernachtkultur in LB-Medium werden in 250 ml SOB-Medium angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,55 bis 0,63 wachsen gelassen. Die Kulturen werden auf Eis für 10 min inkubiert. Die Zellen werden dann durch Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4°C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden mit 0°C-kaltem 80 ml TB resuspendiert und anschließend auf Eis für 10 min inkubiert. Die Zellen werden dann durch Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4°C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird nun mit 0°C-kaltem 40 ml TB resuspendiert und anschließend auf Eis für 10 min inkubiert. Die Zellen werden mit 1,4 ml DMSO vermischt und anschließend auf Eis für 10 min inkubiert. Die Zellen werden nun in 100 µl aliquotiert und können anschließend direkt zur Transformation eingesetzt oder für längere Zeit bei -70°C tiefgefroren werden.

2.1.13 Transformation von Plasmiden nach E. coli

Kompetente Bakterien des Stammes DH 5 α sind in der Lage, freie Plasmid-DNA aufzunehmen. Die Transformation wurde nach einer Methode nach Hanahan (Hanahan *et al.*, 1983) durchgeführt:

- kompetente Bakterien auf Eis auftauen
- 5 10 μ1 DNA auf Eis vorkühlen

- die DNA zu den Bakterien geben, leicht mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- Durchführung eines Hitzeschocks von 2 min bei 42°C
- Zugabe von 1 ml LB-Medium, leicht mischen
- 5 min auf Eis inkubieren
- 30 60 min im Schüttler bei 37°C inkubieren (Ausbildung der Antibiotika-Resistenzen)
- Bakterien 1 min bei 12.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Bakterien auf Selektionsmedium ausplattieren und über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufbewahren.

2.1.14 Maßnahmen für den Umgang mit RNA

Um die RNase-Aktivität möglichst gering zu halten, werden folgende Maßnahmen durchgeführt:

- Bei allen RNA-Methoden wird mit Ethanol-desinifizierten Handschuhen gearbeitet.
- Alle Arbeitsschritte werden möglichst schnell und auf Eis durchgeführt (Ausnahme Rneasy).
- Die Glasgefäße werden bei 240°C für 12 Stunden sterilisiert, alle anderen Materialien werden für 30 min bei 121°C autoklaviert.
- Zu den Lösungen wird 0,1 % Velcorin® (Dimethylpyrocarbonat, Bayer, Leverkusen) gegeben, welches RNasen durch kovalente Modifikationen inaktiviert. Anschließend werden auch diese Lösungen autoklaviert.
- Reagenzien wie Tris und DTT, die durch eine Behandlung mit Velcorin® zersetzt werden, werden anschließend autoklaviert.

2.2 *in situ* Hybridisierung

Das in diesem Abschnitt benutze bidestilierte H_2O wurde mit 0,1% Velcorin® (Dimethylpyrocarbonat, Bayer, Leverkusen) behandelt und anschließend autoklaviert.

2.2.1 Herstellung von radioaktiven Sense- und Antisense-cRNA für GAD₆₅ bzw. GAD₆₇

Für die Herstellung der Sense- und Antisense-Proben wurde das GAD₆₅-cDNA enthaltende Plasmid mit dem Restriktionsenzym *StuI*, das GAD₆₇-cDNA enthaltende Plasmid mit dem Restriktionsenzym *HincII* linearisiert. Die Restriktionsschnittstelle des Enzyms *StuI* liegt innerhalb der GAD₆₅-cDNA, so dass zwischen der Multiple Cloning Site und der Schnittstelle ein ungefähr 0,9 kb großes Fragment entsteht. Im Gegensatz verdaut *HincII* sowohl den Vektor als auch das Insert von GAD₆₇-cDNA. Die Größe des entstandenen Fragments beträgt ungefähr 1,1 kb.

Für die Herstellung des Sense-Transkriptes wurden 200-300 ng gereinigte und auf dem Gel geprüfte linearisierte-cDNA beider GAD-Isoformen mit ³⁵S markierten UTP (Uridine-5'-Triphosphate, $[\alpha$ -³⁵S], ICN, USA) und mit *T7-RNA-Polymerase* transkribiert. Auf gleiche Weise wurde die Antisense-cRNA hergestellt, allerdings unter Verwendung von *T3-RNA-Polymerase*.

2.2.2 Transkription

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sense- und Antisense-cRNA wurde 30 μ l 10 mCi/ml Uridine-5'-Triphosphat [α -³⁵S] in 5 mM Tris (ICN, USA) eingesetzt. Die radioaktiv markierten UTP wurden vor dem Ansetzen in einer Vakuumzentrifuge für 30 Minuten getrocknet. Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: μl Transkriptionspuffer (10X)
 μl 5 mM NTP mix (ATP, CTP, GTP)
 μl 100 mM DTT
 5,5 – Y Velcorin® H₂O bidest
 Y μl 200 – 300 ng linearisierten cDNA
 0,5 μl RNasin.

Nach dem leichten Mischen wurde dem Ansatz 1 µl *RNA Polymerase* zugegeben und anschließend bei 37°C für 120 Minuten inkubiert.

Nach Zugabe von RNase-freier DNase folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Der DAN-Verdau-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

80 μl Velcorin® H₂O bidest
5 μl 1 M Tris
1 μl 1 M MgCl₂
1 μl tRNA (10mg/ml)
1 μl RNasin
2 μl Dnase.

Zur Berechnung der Inkorporation, die zur Kontrolle der Effizienz der Transkription dient, wurde 1 µl aus dem Ansatz entnommen, 1:10 verdünnt und anschließend in 1 ml Scinti Verse® vermischt.

Die radioaktiv markierte cRNA-Lösung wurde folgenermaßen durch die Quick Spin[™] Säulen (G-50 Sephadex[®] Columns for Radiolabeled RNA Purification, Boehringer Mannheim) gereinigt:

Puffer aus der Säule laufen lassen Säule 2 Minuten bei 1100 x g zentrifugieren Die cRNA-Lösung (100 µl) auf die Säule geben 4 Minuten bei 1100 x g zentrifugieren.

Nach der Reinigung wurde 1 µl gereinigter cRNA entnommen und 1:10 verdünnt sowie anschließend mit 1 ml Scinti Verse® vermischt.

Die Aktivität der beiden Ansätze, vor und nach der Reinigung, wurde durch den γ -Counter gezählt. Die Korrelation zwischen der Zählerrate vor der Reinigung und nach der Reinigung wurde durch die Inkorporation in Prozent ermittelt. Die Inkorporation einer effizienten Transkription liegt bei 30% und 80%.

2.2.3 Pre-Hybridisierung und Präparation der Gewebe

Die tiefgefrorenen auf Objektträger aufgezogenen Gehirnschnitte wurden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Es folgten die folgenden Arbeitsschritte:

- Dehydration durch 4% Paraformaldehyd in 100 mM PBS (pH7.4) bei RT für 5 Minuten

- Waschen mit PBS (pH 7,4) bei RT für 2 Minuten
- Waschen mit 100 mM TEA (, pH 8,0) bei RT für 1 Minute

- Waschen mit TEA unter Zugabe von Essigsäureanhydrid bei RT für 10 Minuten unter ständigem Bewegen

- Waschen mit 2XSSC bei RT für 2 Minuten
- Dehydration durch:
- 70% Ethanol; 2 Minuten
- 95% Ethanol; 2 Minuten
- 100% Ethanol; 2 Minuten
- Chloroform; 5 Minuten
- 100%Ethanol; 2 Minuten
- 95% Ethanol; 2 Minuten
- Die Objektträger wurden bei RT trocknen gelassen.

2.2.4 Hybridisierung

Auf die fixierten Gewebeschnitte wurde 200 μ l einer Hybridisierungsmischung aufgetragen. Ein Einsatz dieser Mischung besteht aus vier Anteilen einer Hybridisierungslösung und einem Anteil cRNA-Probe in TED-Puffer. Die beschichteten Gewebeschnitte wurden in einer mit einem Kammer-Puffer aufgeleuchteten Hybridisierungskammer bei 55°C 20 Stunden lang inkubiert.

Während der Hybridisierung wird bei den herkömmlichen Methoden die Hybridisierungsmischung, die auf die Gewebe aufgetragen wird, mit einem Deckglas bedeckt. Dies kann erfahrungsgemäß Artefakte, wie eine ungleichmäßige Verteilung der Hybridisierung, hervorrufen. Um diese unerwünschten Effekte zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode benutzt, bei der eine viskosere Hybridisierungsmischung ohne die Verwendung von Deckgläsern verwendet wurde. Dabei wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten, die mit der Hybridisierungsmischung überschichtet waren, in einer hermetisch abgeschlossenen und ein durch Kammer-Puffer angefeuchteten, sogenannten Hybridisierungskammer inkubiert. Die Effizienz dieser Methode wurde durch verschiedene Studien belegt (Horvath *et al.*, 1999; Shughrue *et al.*, 1997a; Shughrue *et al.*, 1997b).

2.2.5 Post-Hybridisierung

Die hybridisierten Gewebeschnitte wurden in einer 107 mM DTT in 2XSSC Lösung eingetaucht und anschließend mit frischer 2XSSC/107 mM DTT Lösung bei RT für 15 min unter ständigem Bewegen gewaschen. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 30 min lang Waschen mit RNase-Puffer bei 37°C
- Waschen mit RNase-Puffer mit Zugabe von 30 ng/ml RNase A bei 37°C 30 min unter ständigem Bewegen
- Waschen mit 1XSSC bei RT 15 min unter ständigem Bewegen
- Waschen mit 0,1XSSC bei 67°C 30 min
- Waschen mit 0,1XSSC bei 67°C 30min
- Waschen mit 0,1XSSC bei RT 15 min unter ständigem Bewegen Dehydration durch:
- 300 mM Ammunium-Acetat in 70% Ethanol bei RT 5 min
- 300 mM Ammunium-Acetat in 94% Ethanol bei RT 5 min
- 100% Ethanol bei RT 5 min
- Die Objektträger wurden bei RT trocken gelassen

2.2.6 Auflegung der Objektträger auf Filme

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Filmen BioMax MR der Firma Kodak, USA, ist die Photoemulsion auf nur einer der Kunststoff-Folien aufgebracht.

Die getrockneten Objektträger wurden in einer Reihenfolge, die dem Versuchsverlauf entspricht, in die Film-Kassetten sortiert. Unter Rotlicht wurden die Filme aufgelegt. Die Kassetten wurden geschlossen und in lichtdichte Tüten bis zum Ende der Expositionszeit verpackt.

2.2.7 Entwicklung der Filme

Der Entwicklungsprozess muss bis zum Fixieren unter Rotlicht durchgeführt werden:

- Den belichteten Film mit der beschichteten Seite nach oben in die Fotoschale geben

- in eiskaltem LX-24-Entwickler (Kodak, USA) 1-5 min unter ständigem Bewegen inkubieren

- den Film in den Rahmen einspannen

- Entwicklungsprozess in 400mM Eisessig 30 sec stoppen
- den Film in Unifix®-Lösung (Kodak, USA) 20 min fixieren
- Waschen mit kalten fließendem Wasser 20 min
- Film zum trocknen aufhängen.

2.2.8 Densitometrische Auswertung der Filme

Die Filme wurden mit Hilfe des Bildanalyse-Softewareprogramms MCID® (The Microcomputer Imaging Device), der Firma Imaging Rsearch Inc., digital densitometrisch ausgewertet. Die am Imaging-System ermittelten Daten wurden statistisch sortiert und ausgewertet.
2.2.9 Emulsionsbeschichtung der Objektträger

Der Emulsionsbeschichtungsprozess muss unter Rotlicht durchgeführt. Für die Emulsionsbeschichtung der Objektträger wurde die Fotoemulsion NTB 2 von Kodak verwendet. Die bei -20°C eliquotierte Emulsionen wurden bei einem Wasserbad von 45°C über eine Stunde aufgetaut. Die flüssige Emulsion wurde in eine Dippküvette gefüllt. Die Objektträger wurden kurz in die befüllten Dippküvette bis zur Bedeckung der Gewebeschitte eingetaucht. Die beschichteten Objektträger wurden waagerecht auf eiskalte Metallplatte gelegt und für zwei Stunden trocken gelassen. Die beschichteten trockenen Objektträger wurden in schwarze Kästen sortiert, lichtdicht verpackt und für eine Expositionszeit, die 4-5 Mal länger als bei den Filmen ausfiel, gelagert.

2.2.10 Entwicklung und Färbung der Objektträger

Der Entwicklungsprozess sollte unter Rotlicht durchgeführt werden:

- Objektträger in 15°C kaltem D-19-Entwickler-Lösung (Kodak, USA) für 4 min inkubieren
- zweimal kurz mit Wasser Waschen
- die Objektträger in Unifix-Lösung (Kodak, USA) 5 min fixieren.
- zweimal kurz mit Wasser Waschen.

Die Färbung der Objektträger erfolgt mit Kresylviolett nach Nissel (Kernfärbung):

- 5 min Entfetter-Lösung
- 1 min 100% Ethanol
- 1 min 100 % Ethanol
- 1 min 90 % Ethanol
- 1 min 80 % Ethanol
- 1 min 70 % Ethanol
- 1 min 50 % Ethanol

- 10 sec H₂0 bidest waschen
- 1 min in Kresylviolett-Lösung färben
- 10 sec H₂0 bidest waschen
- 3 min in Eisessig-H₂0-Lösung (1:250) differenzieren
- 2 min in Eisessig-H₂0-Lösung (1:125) differenzieren
- 10 sec H₂0 bidest waschen
- 1 min 50 % Ethanol
- 1 min 70 % Ethanol
- 1 min 80 % Ethanol
- 1 min 90 % Ethanol
- 1 min 100 % Ethanol
- 1 min 100 % Ethanol
- 1 min Xylol
- 4 mal nach einander 1 min Xylol
- mit Eukitt eindecken

über Nacht trocknen lassen.

2.3 Kompetitive Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-kettenreaktion

2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt mit dem Rneasy Kit® (QIAGEN, Hilden). Die RNA wird an eine Silikon-Gelmembran in den verwendeten Säulen gebunden und kann nach den Waschschritten mit Wasser eluiert werden. Diese Methode wird für die Analyse von allen untersuchten Geweben verwendet.

- Zugabe von 350 µ1 Puffer RLT (10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Puffer RLT) zu den Geweben bzw. den Zellen
- 30 sec Ultraschall, um Homogenisierung und Lyse zu unterstützen
- Zugabe von 350 µl 70 %igen Ethanol zum Lysat, durch Pipettieren mischen

- das Gemisch auf die Rneasy Säulen geben
- 15 sec bei 8000 x g zentrifugieren
- Flüssigkeit verwerfen
- Säule mit 700 µl Puffer RWI waschen (15 sec bei 8000 x g)
- Säule mit 500 µl Puffer RPE waschen (15 sec bei 8000 x g)
- Säule erneut mit 500 µl Puffer RPE waschen
- 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren
- Elution der RNA durch Zugabe von 30 µl H₂O Bidest.
- 1 min Zentrifugation bei 8000 x g

2.3.2 Reverse Transkription

Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase reverse Transkriptase wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Zum "priming" können sequenzspezifische Primer, "random"-Hexamere oder Oligo-dT-Primer verwendet werden. In dieser Arbeit wurde mit "random"-Hexamer-Primern gearbeitet.

Die reverse Transkription wurde mit dem *SUPERSCRIPT*® Präamplifikationssystem der Firma GIBCO BRL durchgeführt. Das in diesem System verwendete Enzym weist keine RNase-H-Aktivität auf, so dass ein vorzeitiger Abbau der RNA während der Transkription vermieden wird. Das Reaktionsvolumen von 20 µl besteht aus folgenden Reagenzien:

1 - 10 µl	Gesamt-RNA oder 10 µ1 mRNA			
1 µl	"random"-Hexamer-Primer (0,5 mg/ml)			
0 – 9 µl	Velcorin®-H ₂ O Bidest			
4 µl	5 x Transkriptionspuffer			
0,5 µl	Rnasin (40 IU/ml) (PROMEGA, Madison, USA)			
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)			
1 µl	MML V-SUPERSCRIPT-Reverse Traskriptase			
	(200 IU/ml)			

Zur Denaturierung der RNA wird der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Reaktionsansatz durchläuft im Thermocycler folgende Inkubationsschritte:

10 min Primer-Annealing bei 22°C

50 min Gegenstrangsynthese bei 42°C

10 min Denaturierung bei 95°C

Die cDNA wird entweder sofort in die PCR eingesetzt oder bei - 70°C gelagert.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR wird eine schnelle und effektive Amplifikation kleinster DNA-Mengen möglich. Das Prinzip ist die mehrfache Wiederholung von Denaturierung der Template-DNA, Hybridisierung der für das zu untersuchende Gen spezifischen Primern an die Template-DNA und Gegenstrangsynthese durch das thermostabile Enzym *Taq-DNA-Polymerase*. Falls die Expression eines Gens untersucht werden soll, so muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der Reaktion werden bei jedem Experiment Negativ-Kontrollen durchgeführt.

2.3.3.1 Kompetitive RT-PCR

Aufgrund der exponentiellen Natur der PCR führt schon eine sehr kleine Veränderung der Amplifikationseffizienz zu einer großen Veränderung der Menge des Reaktionsprodukts. Die Amplifikationseffizienz ist als die amplifizierte Menge an DNA während eines Zyklus zu definieren und wird durch verschiedene Faktoren beeinflußt, z.B. durch die Bindung des Primers, vor allem aber auch durch die Aktivität der *Polymerase*. Diese Beeinflussungen lassen sich nicht ausschalten. Das Problem wird für die Quantifizierung der PCR-Produkte oft durch eine Amplifikation eines endogenen Standards umgangen. Die kompetitive RT-PCR-Methode wird durch die Zugabe von exogener Sequenz zu einer quantitativen Methode optimiert. Die exogene Sequenz wird jeder Probe zugefügt. Diese Sequenz ist annährend gleich lang wie das gewünschte PCR-Produkt und besitzt dessen Primer-Sequenz. Diese Voraussetzungen sind bei einer homologen Sequenz erfüllt. Daher werden verkürzte Formen der gewünschten cDNA als interner Standard hergestellt.

Durch die vorherige Bestimmung der Konzentration des eingesetzten Standards ist die Messung der absoluten Menge der nativen Sequenz ebenso wie die Messung der relativen Veränderungen in Versuchsgruppen möglich. Mit einer Titrationskurve kann man diejenige Menge der mutanten cRNA bestimmen, welche in die RT-PCR eingesetzt werden muss, um ein äquivalentes Signal aus einer definierten Menge totaler RNA aus einer biologischen Probe zu erhalten.

2.3.4 Wahl und Synthese der PCR-Primer

Bei der Auswahl der Primern müssen folgende Punkte beachtet werden:

- Die Länge der Primern sollte 20 30 Basen betragen.
- Der GC-Gehalt darf nicht höher als 60 % liegen und sollte für beide Primer möglichst gleich sein.
- AT- und GC-reiche Regionen (Haarnadelstrukturen) sowie Bereiche mit Polypurinen und Polypyrimidinen sollten vermieden werden.
- Die beiden Primer dürfen keine komplementären Sequenzen besitzen.

Da in der Ratte gegenwärtig die vollständige Gensequenz der beiden Estrogen-Rezeptoren (Intron/Exon-Sequenz) noch unbekannt ist, wurde für die ER α Primer auf die humane Sequenz zurückgegriffen (Ponglikitmongkol et al., 1988). Sie liegen in der für die Hormon-Bindungsstelle kodierenden Region und begrenzen die Exone vier bis acht. Das erwartete PCR-Produkt ist 638 bp groß. Für die Wahl der Primer für ER β wurde die Ratten-cDNA verwendet (Kuiper *et al.*, 1996). Da eine hohe Sequenzhomologie zwischen ER β der Ratte und der Maus besteht, kann aufgrund der komplett bekannten Maus-Gensequenz die wahrscheinliche Lage der Ratten-Primer zwischen Exon zwei bis vier in der kodierenden Region der Hormon-Bindungsstelle festgestellt werden (Tremblay et al., 1997). Das erwartete PCR- Produkt ist -734 bp groß.

Estrogen-Rezeptor α: Sense Primer: 5'-GGCGGATCCGACCAGATGTCAGTGCCT-3' Antisense Primer: 5'-GGCGTCGACAGATGCTCCATGCCTTTGTTAC-3'

Estrogen-Rezeptor β : Sense Primer: 5'-GCATCTGGGTATCATTACGG-3' Antisense Primer: 5'-GCCAGGAGCATGTCAAAGAT-3'

Folgende Primer-Paare wurden in dieser Arbeit verwendet:

<u>GnRH-Rezeptor (Kaiser et al., 1992):</u> Sense Primer: 5'-TCAGTGGTATGCTGGAGAGT-3' Antisense Primer: 5'-ATATAAGTGGGTCGAAGCAC-3'

LH-β (Chin et al., 1983): Sense Primer: 5'-GGCGGATCCTGCAAGAGAATGAGTTCTGCC-3' Antisense Primer: 5'-GGCAAGCTTGTCACAGGTCATTGGTTGAG-3'

<u>FSH-β (Kato et al., 1990):</u> Sense Primer: 5'-CAGAAGCTTCTCCTCAGGATCTGGTGTAT-3' Antisense Primer: 5'-ACTGAATTCACAATAGTGGAGCCGATGGT-3`

2.3.5 Klonierung der PCR-Fragmente für ER α, ERβ, GnRH-R, LHβ und FSHβ

Zum Nachweis von ER α - und ER β -mRNA wurde totale RNA aus der Rattenhypophyse isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNAs wurden anschließend in die PCR-Reaktionen eingesetzt und mit 28 Zyklen für ER α und 36 Zyklen für ER β amplifiziert.

Dem Verfahren bei ER α und ER β ähnliche Strategien wurden auch bei der PCR-

Gene	PCR-Produkt	Amplifikation-Zyklus-Zahl
GnRH-R	650 bp	22 Zyklen
LH-β	284 bp	22 Zyklen
FSH-β	362	27 Zyklen

Amplifikation und -Klonierung der Gene GnRH-R, LH- β und FSH- β durchgeführt und in Tabelle I zusammengefasst.

Tab. I: Zusammenfassung der Strategien zur PCR-Amplifikation und -Klonierung der Gene GnRH-R, LH- β und FSH- β

2.3.6 Strategie zu Klonierung und Synthese von internen Standards der kompetitiven RT-PCR für, ER β, GnRH-R, LH-β und FSH-β

Die PCR-Fragmente der beiden Estrogen-Rezeptoren wurden bewusst so gewählt, dass möglichst große Fragmente mit zwei verschiedenen Restriktionsschnittstellen gewonnen werden konnten. Dies ist für die anschließende Trennung der Restriktionsprodukte von Vorteil. Nach der Restriktionsreaktion der Expressionsvektoren mit wurden die Produkte auf einem Agarose-Gel getrennt.

Die kleineren Fragmente beider Produkte wurden aus dem Gel entfernt. Die restlichen Fragmente (die verbliebenen PCR-Fragmente mit dem Vektor) wurden aus dem Gel isoliert und gereinigt. Ihre Enden wurden anschließend mit T4-DNA-Ligase ligiert. Auf diese Weise entstanden kleinere "Deletionsmutanten", die aber noch die Komplementärsequenzen für die jeweiligen Primer enthielten. Vor der in vitro-Transkription wurden die Plasmide linearisiert. Die entstandenen Fragmente enthielten die "multiple cloning region" und die RNA-T7-Polymerase-Promotor. Die "Teilplasmide" mit der integrierten cDNA für die nativen und mutierten cDNA wurden sequenziert. Alle untersuchten nativen und mutanten Inserts der Ziel-Gene 100% homolog dem entsprechenden Abschnitt der waren zu zu Datenbanksequenzen.

2.3.7 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarose-Gel mit dem NUCLEOTRAP®-Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert und gereinigt. Der Vektor wurde mit dem Enzym *Not 1* verdaut. Nach dem Entfernen der Restriktionsenzyme durch Phenolextraktion wurde eine Ligation von Fragment und Vektor mit anschließender Transformation nach *E. coli* DH5 α durchgeführt. Durch selektive Anzucht der Klone entstehen Transformanten, die den neuen Vektor mit dem entsprechenden PCR-Produkt enthalten. Diese Klone wurden über Nacht im LB-Medium kultiviert, um genügend Material für eine Plasmid-Präparation (QIAGEN, Hilden) zu erhalten. Die neuen Vektoren wurden anschließend sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SequeLab, Göttingen, durchgeführt.

2.3.8 In-vitro-Transkription von sense-RNA

Zur Herstellung von *in vitro*-transkribierter sense-RNA wurde ein i*n Vitro*-Transkriptionssystem der Firma PROMEGA® (Madison, USA) verwendet. Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4 μl Transkriptionspuffer (5 X)
4 μl dNTP-Mix (je 2,5 mM ATP, CTP, GTP, UTP)
1 μl linearisierte DNA
1 μl T7-RNA-Polymerase (20 Einheiten/μl)
1 μl RNase-Inhibitor (20 Einheiten/μl)
9 μ1 Velcorin®-H₂O Bidest.

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von RNase-freier *DNase* (eine Einheit/µg DNA) folgte eine Inkubation bei 37°C für 15 Minuten. Die RNA-Lösung wurde einmal mit einem Volumen Phenol-Chloroform (1:1) und anschließend mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Zur Präzipitation der RNA wurden dem abgenommenen Überstand 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt. Es folgten Fällung, Zentrifugation und Resuspendierung der RNA.

2.3.9 Durchführung der PCR

Für die Analyse der Genexpression im Ovar, der Hypophyse, POA und MBH wird aus dem Gewebe die totale RNA isoliert, von der 100 ng in die reverse Transkription eingesetzt werden. Von der resultierenden cDNA werden 2 µ1 in der 50 µl PCR-Reaktion amplifiziert. Bei allen PCR-Reaktionen wurden regelmäßig Negativ-Kontrollen mitgeführt, um die möglichen Konzentrationen des Reaktionsansatzes zu überprüfen. Die PCR-Reaktion setze sich wie folgt zusammen:

2 μ1 cDNA
45 μl PCR SuperMix (GIBCO®)
0,25 μl sense Primer (25 pmol)
0,25 μl antisense Primer (25 pmol)
2,5 μl H₂0.

Die Ansätze durchlaufen im Thermocycler folgendes Programm:

- 1. 3 min 94°C (primärer Denaturierungsscbritt)
- 2. 1 min 94°C (Denaturierung)
- 3. 1 min 62°C (Primer-Annealing)
- 4. 1 min 72°C (Gegenstrangsynthese)
- 5. 10 min 72°C (finale Gegenstrangsynthese).

Die Schritte 2-4 werden als Zyklus je nach cDNA-Konzentration und Amplifikationseffizienz 25-36 mal wiederholt

2.3.10 Densitometrische Auswertung der PCR-Agarose-Gele

Die zu analysierenden PCR-Proben werden auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen, das nach dem Lauf im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und anschließend digital fotografiert wird. Die digitalen Fotos werden mit Hilfe des Softwareprogramms Kodak® densitometrisch ausgewertet. Die so ermittelten Daten werden einer statistischen Auswertung unterzogen.

2.4. Real-Time Taqman[®] Polymerase Kettenreaktion

Bei der Real-Time Taqman® PCR werden mittels Taq Polymerase einzelne komplementäre Oligonukleotide, die sich an die aufgetrennte DNA-Doppelhelix angelagert haben, zu einem Strang verbunden. Bei diesem System hybridisiert jedoch während der PCR eine markierte Sonde mit den Primern zusammen an den Matrizenstrang. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden "Reporter"-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist und der am 3'-Ende einen "Quencher"-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt. Solange die beiden Farbstoffe räumlich eng angeordnet sind, wie es bei Anlagerung der Sonde an den DNA-Einzelstrang der Fall ist, wird durch einen Fluoreszenz-Energietransfer die Emission des Reporter-Farbstoffes unterdrückt. Wenn nach der Hybridisierung der Primer und der Sonde an den Matrizenstrang die Taq Polymerase die einzelnen Nukleotide zusammenfügt, trifft sie auch auf die Sonde. Während die Taq Polymerase die Sonde vom Matrizenstrang verdrängt, entsteht eine y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Tag Polymerase induziert wird. Die Sonde wird somit abgetrennt und geschnitten. Dadurch wird der Abstand zwischen dem fluoreszierenden Farbstoff und dem Quencher-Farbstoff größer, der Fluoreszenz-Energietransfer wird ausgeschaltet und der Reporter-Farbstoff gibt sein Signal ab. Sonden, die während der PCR nicht an den DNA-Strang angelagert waren, werden nicht hydrolysiert. Somit wird die räumliche Nähe zwischen den beiden Farbstoffen auch nicht unterbrochen und die nicht angelagerten Sonden geben daher kein Signal ab. Auf diese Weise ist es möglich, an der Stärke des Fluoreszenzsignals die Akkumulation der PCR-Produkte abzulesen. Dies wird mit Hilfe des ABI PRISMTM 7700 Sequence Detektors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst. Die Real Time Taqmann® PCR erfordert also keine post-PCR Auswertung per Gel-Elektrophorese.

Als Referenz werden bei der Taqman® PCR bekannte Mengen von Ziel-cDNA, die zuvor aus einer cRNA revers transkribiert wurden, als Standardkurve amplifiziert. Die sogenannten CT-Werte werden in Abhängigkeit von der Standard-cDNA-Menge anhand des Auswertungsprogramms aufgetragen und dienen als Bezug für die Messwerte der Proben.

2.4.1 Wahl der Primern und Sonden der Taqman®-PCR

Bei der Wahl der Sonde sollten einige Punkte berücksichtigt werden:

- Das 5'-Ende der Sonde sollte sich in relativer N\u00e4he des 3'-Endes des PCR-Primers befinden
- Die Sondenlänge sollte 20-30 Basen umfassen
- Der GC-Gehalt sollte 40-60 % betragen
- Am 5'-Ende der Sonde darf keine G liegen
- Es dürfen nie mehr als drei gleiche Base hintereinander liegen
- Sonde und PCR-Primer dürfen nicht komplementär zueinander sein
- Auffällige Sekundärstrukturen (z.B. hairpin-loops) sollten vermieden werden

Die eingesetzte Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit dem Farbstoff FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) und an ihrem 3'-Ende mit dem Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) markiert.

Für die Auswahl der Primern gelten die schon in 2.3.4. genannten Kriterien.

Folgende Sonden und Primer wurden in dieser Arbeit verwendet:

GAD₆₅ (Erlander et al., 1991):

Sense Primer: 5'-ATGCACTTCTCCACGCAACA-3' Antisense Primer: 5'-AGAAATGCGAGAGTGGGGCC-3' Sonde: 5'-FAM-TTCTCCTTCACAGGCTGGCAGCAGG-TAMRA-3'

<u>GAD₆₇ (Michelsen *et al.*, 1991):</u> Sense Primer: 5'-TGAGCGCCTTCAGGGAGAG-3' Antisense Primer: 5'-GGGCACCAGGGTCACTGTT-3' Sonde: 5'-FAM-AGGCCTCCAAGAACCTGCTTTCCTGTG-TAMRA-3'

<u>GnRH: (Bond *et al.*, 1989):</u> Sense Primer: 5'-GCAGAACCCCAGAACTTCGA-3' Antisense Primer: 5'-TGCCCAGCTTCCTCTTCAAT-3' Sonde: 5'-FAM-TCTGCGAGGAGCTCTGGAACGTCTG-TAMRA-3'

2.4.2 Durchführung der Real-Time Taqman®

Die Durchführung der Taqman[®] erfolgte wie bereits unter beschrieben 2.3.9. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl und wurde wie folgt eingesetzt:

12,5 μ l 2X Puffer
2,5 μl Sense-Primer (300 nM)
2,5 μl Antisense Primer (300 nM)
2,5 μl Sonde (225 nM)
3 μl H₂O (Ampuwa®)
2 μl cDNA

Diese Reagenzien wurden in eine 96-Microtiterplatte (MicroAmp® Optical 96 well reaction plate, Pe Applied Biosystems) pipettiert, und die Platte mit optischen Deckeln (MicroAmp® Optical caps, Applied Biosystems) verschlossen.

Zur Analyse wurde die Microtiterplatte in das ABI PRISM™ 7700 Detection System überführt.

2.4.4 ABI PRISM[™] 7700 Sequence Detection System

Das ABI PRISM[™] 7700 Sequence Detection System (7700 SDS, PE Applied Biosystems) verfügt über einen eingebauten Thermocycler, in welchem die Proben 40mal den folgenden Zyklus durchlaufen:

2 min 50°C (ab dem zweiten Zyklus Strangsynthese)
10 min 95°C (primärer Denaturierungsschritt)
15 sec 95°C (Denaturierung)
1 min 60°C (Primer-Annealing).

Über den Reaktionsgefäßen der Microtiterplatte befindet sich eine Linse, die den Strahl eines Argon-Lasers (488 nm) in die Gefäße weiterleitet, wodurch eine Fluoreszenzanregung erfolgen kann. Die Fluoreszenzemission wird über denselben optischen Leiter gemessen. Die Steuerung des gesamten Systems leistet ein Power Macintosh® 4400.

2.5 Statistische Auswertung

Für alle Experimente werden der Mittelwert (AVG) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Die Messwerte werden prozentrelativiert, um die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Experimente miteinander vergleichen zu können. Der Durchschnitt der Basalwerte wird gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Messwerte werden in Relation zu den Kontrollen berechnet.

Für die Statistik wird das Computerprogramm PRISM® verwendet. Das Signifikanzniveau wird auf p<0,05 festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgt durch Anwendung einer Varianzanalyse für wiederholte Messung eines Faktors (ANOVA) und anschließendem multiplen t-Test nach Bonferroni auf signifikanten Veränderungen geprüft.

2.5.1 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse der *in situ* Hybridisierung

Für die Auswertung der Versuchsergebnisse wurde der Versuchsverlauf nach Gehirnregionen durchgeführt. Je Region wurde ein Objektträger mit zwei Gewebeschnitten eines Tieres benutzt. Je Versuchsverlauf wurden aus jeder Gruppe sechs Tiere verwendet. Die dem Versuchsanlauf unterzogenen 24 Objektträgern wurden auf einen Film aufgelegt und nach der benötigten Expositionszeit densitometrisch ausgewertet.

2.5.2 Statistische Auswertung der Versuchergebnisse RT-PCR

Für die statistische Auswertung der durch die kompetitive RT-PCR gewonnenen Ergebnisse wurden Maxi-Gele, die eine Fläche von 20X10 cm² haben, benützt. Auf dem Gel wurde eine komplette Aufarbeitung, die aus 18 Proben von allen Gruppen zusammengesetzt wurde, aufgetragen. Die resultierten kompetitiven RT-PCR-Signale wurden anschließend digital ausgewertet (Kodak, USA).

Bei der Taqman[®] RT-PCR konnte neben der Standardkurve in der 96-well-Microtiterplatte zwei komplette Aufarbeitungen eingesetzt und anschließend bewertet werden. Jede Aufarbeitung beinhaltete 18 Proben aus allen Gruppen. Die Messung und Auswertung der Ergebnisse erfolgen durch das ABI PRISMTM System.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

Eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig für die Durchführung der Tierversuche liegt vor.

2.6.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für alle Experimente wurden Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die adulten Tiere haben ein Gewicht von ca. 300 g und werden in Makrolon-Käfigen Typ III in Gruppen von drei Ratten pro Käfig gehalten. Die Belichtung des Raumes erfolgt im 12h Rythmus von 06:00 - 18:00 Uhr. Die Raumtemperatur beträgt $23^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, die relative Luftfeuchtigkeit schwankt zwischen 50 und 80 %. Beide Parameter werden mit einem Thermo-Hygrometer registriert. Den Tieren steht Futter und Wasser ad libidum zur Verfügung. Nach operativen Eingriffen werden die Tiere einzeln in Makrolon-Käfigen Typ III gehalten. Die übrigen Bedingungen sind identisch mit denen der Gruppentierhaltung.

2.6.2 Tierexperimentelle Methoden zum Effekt von Testosteron im Vergleich zu Estradiol und Gonadektomie auf die GABA-Expression innerhalb des GnRH-Netzwerks

Die Quantifizierung der *in situ* Hybridisierung ist, wie bei allen morphologischen Methoden, sehr aufwendig (Kim *et al.*, 1989). In der Literatur liegt die durchschnittliche Zahl der Tiere bzw. der Proben per Gruppe zwischen drei und sieben (Patisaul *et al.*, 1999; Finn *et al.*, 1998; Shughrue *et al.*, 1997b; Sannella und Petersen, 1997). Daher wurde die Zahl der Tiere der untersuchten Gruppen mit sechs Tieren festgesetzt.

24 männliche Ratten im Alter von 90 Tage wurden unter gleichen Bedingungen gehalten. 18 Tiere davon wurden zunächst gonadoektomiert. Die restlichen intakten Tiere wurden als Kontrollgruppe vorgesehen.

Die gonadoektomierten Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt. Jede Gruppe bestand aus sechs Tieren. Nach dreiwöchiger Erholungszeit wurde einer gonadoektomierten Gruppe mit 3,5 µg/Tier Estradiol und eine andere mit 3,5 mg/Tier Testosteron subkutan injiziert. Die dritte gonadoektomierte Gruppe wurde mit Olivenöl behandelt. Die Dekapitation erfolgte nach einer Woche.

2.6.2.1 Gonadektomie (Orchidektomie)

Unter leichter Ethernarkose wurde das Fell vom Scrotum entfernt. Durch einen medianen Einschnitt von 1 cm an der Spitze des Scrotums und durch einen Einschnitt von 7 mm an den beiden Seiten der Kremastermuskeln wurden die beiden Testes aus der Leibeshöhle freigelegt. Nach dem Abbinden der Blutgefäße wurden die beiden Testes mit einem Skalpell entfernt. Die Muskelschichten und die Haut wurden mit sterilem Nahtmaterial vernäht.

2.6.2.2 Dekapitation und Entnahme von Geweben

Nach der Dekapitation und der Blutentnahme wurde das Gehirn durch Öffnung der Schädeldecke mit Hilfe einer Knochenzange freigelegt, nach Durchtrennen der Sehnerven entnommen und sofort auf Trockeneis tiefgefroren. Die Hypophyse wurde nach Abtrennung des Hinterlappens in Flüssigstickstoff tiefgefroren und anschließend bei -70°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Das bei der Dekapitation aufgefangene Blut wurde etwa 24 Stunden bei 4°C gelagert und dann bei 3000 rpm zentrifugiert und das gewonnene Serum bei - 20°C aufbewahrt.

2.6.2.3 Präparation von Gewebeproben aus dem Gehirn

Für die Gewinnung der Gehirngewebeschnitte wurden die gefrorenen Gehirne im Kryostat geschnitten. Die Temperatur der Kryostatkammer und des Objekthalters wurden auf -20°C eingestellt. Die Gehirne wurden über Trockeneis mit Gewebeeinbettungsmittel (Tissue Tek®) auf dem Objektträger des Kryostats aufgefroren, der anschließend auf den Objekthalter im Kryostat aufgeschraubt. 12 µm dicke Schnitte wurden auf positiv geladene Antifrost-Glasobjektträger, die im Kryostatkammer schon aufbewahrt wurden, aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte wurden in der Kryostatkammer nur für kurze Zeit kalt gehalten und anschließend bei -80°C für längere Zeit eingefroren.

Für die untersuchten Regionen wurden die folgenden Schnitte nach der Bregma-Messung (Paxinos und Watson, 1986) präpariert:

POA: Bregma -0,4 mm; SCN: Bregma -1,30 mm; MBH: Bregma -2,12 mm; HIP: Bregma -3,30 mm.

2.6.3 Tierexperimentelle Methoden zur Untersuchung der physiologischen und molekular-biologischen Alterungsprozesse der weiblichen Ratte

151 weibliche Sprague Dawly Ratten im Alter von 12 Monate (mittelalte Tiere, MA) wurden unter Standard-Verhältnisse gehalten. Die Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt. 18 von ihnen wurden als Kontrollgruppe vorgesehen, die um 10 Uhr des Dekapitationstages getötet sein sollten. 42 Tiere wurden als 13 Uhr-Gruppe (Dekapitation um 13 Uhr) und 55 Tiere als 17 Uhr-Gruppe (Dekapitation um 17 Uhr) eingeplant. 18 Tiere der 13 Uhr-Gruppe und 36 Tiere der 17 Uhr-Gruppe wurden über einen Zeitraum von 12 Tagen jeden vierten Tag um 12 Uhr Progesteron (0,5mg/100g BW) subkutan injiziert. Die Dekapitation der Tiere erfolgte anschließend am Proöstrus-Tag an vier aufeinander folgenden Tagen.

Als Kontrolltiere zu den MA Tiere wurden 34 90-Tage-alte weibliche Sprague Dawley Ratten (junge Tiere, Y) benutzt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt: 16 Tiere für die 13 Uhr-Gruppe Dekapitation um 13 Uhr) und 18 Tiere für die 17 Uhr-Gruppe (Dekapitation um 17 Uhr). Die Tiere wurden an ihrem Proöstrus. Tag dekapitiert.

2.6.3.1 Dekapitation und Entnahme von Geweben

Die Prozedur der Dekapitation und Entnahme von Gehirngeweben entspricht wie unter 2.6.2.1 erwähnt. Nach der Entnahme des Gehirns wurde die Hypophyse nach Abtrennung des Hinterlappens in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die Ovarien wurden nach dem Öffnen der Bauchdecke etwa 2 cm kaudal der Rippenbögen freigelegt, mit einem Skalpell entnommen und in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

2.6.3.2 Präparation von Gewebeproben aus dem Gehirn

Für die Isolierung der RNA aus Mikrostanzen werden die gefrorenen Gehirne wie folgt aufgearbeitet:

Aus den auf einem Kryostat in Einbettungsmedium gefrorenen Gehirnen werden 600 μ m dicke Schnitte angefertigt. Für die untersuchten Regionen werden drei verschiedene aufeinander folgende Schnitte präpariert. Der erste Schnitt enthält die Struktur der Präoptischen Region des anterioren Hypothalamus (POA), Bregma -0,4 mm. Der zweite Schnitt enthält die Strukturen des Nukleus suprachiasmaticus (SCN), Bregma -1,30 mm. Die Struktur des Hippocampus (HIP) ist im dritten Schnitt zu finden, -3,30 mm.

Die Schnitte werden auf Objektträger aufgebracht und bei - 70°C gelagert. auf Trockeneis werden später die gewünschten Areale aus den Hirnschnitten mit hypodermischen Nadeln (\emptyset 1,1 mm) ausgestanzt, in Reaktionsgefäße überführt und bei - 70°C aufbewahrt oder sofort zur RNA-Isolierung weiter verwendet.

Der mediobasale Hypothalamus (MBH) wird als Block aus den Gehirnen geschnitten, in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben. und bei -70°C gelagert.

2.7 Radioimmunoassay (RIA)

2.7.1 Radioimmunoassay für die Messung von Prolaktin

In den Ratten-Seren wird das Proteohormon Prolaktin mit einem Doppelantikörper Radioimmunoassay (RIA) in Anlehnung an die Methoden von Nisweder *et al.* (1968, 1969) nach Vorgaben des NIH gemessen. Die radioaktive Markierung der Referenzhormone mit ¹²⁵Jod erfolgt nach der Chloramin-T-Methode von Hunter und Greenwood (1962).

Jodierungspräparat:	NIADDK-RP I-V
Prolaktin-Antiserum:	rPRL-S-9 (1: 12800 in NRS verdünnt)
Referenzpräparat:	NIADDK-rPRL-RP-3

<u>1. Tag</u>:

- Verdünnung von 25 µl Serum in PBS-BSA (Endvolumen: 500 µ1)

Zugabe von 200 μ1 rPRL-S-9 (erstes Antiserum) ins Probenröhrchen, mischen
-24 Stunden Inkubation bei 4 °C

2. Tag:

- Zugabe von 100 μl des radioaktiv markierten Hormons (Tracer, ca. 20.000 cpm, in PBSBSA verdünnt)

- 24 Stunden Inkubation bei 4°C

3. Tag:

- Zugabe von 200 p1 des zweiten Antikörpers
- 72 Stunden Inkubation bei 4°C

<u>6. Tag</u>:

- Zugabe von 4 ml PBS
- 45 min Zentrifugation bei 2500 X g
- Dekantieren des Überstandes
- Messung der Radioaktivität im Gamma-Zähler
- Auswertung mit dem Programm RIA-Calc

2.7.2 Radioimmunoassay für die Messung von LH

Die Durchführung des LH-RIA erfolgt analog zum Prolaktin-RIA. Es werden 50 µl Serum für die Messung eingesetzt.

Jodierungspräparat:	NTH-I-5
LH-Antiserum:	NH-I rLH-S-7 (1: 7500 in NRS verdünnt)
Refernzpräparat:	NIH rLH-RP-2

Die Kreuzreaktivität des LH-Antikörpers beträgt 5 % mit rR-TSH-I und weniger als 0,1 % mit anderen Hypophysen-Hormonen.

2.7.3 Radioimmunoassay für die Messung von FSH

Die Proben aus den Versuchen werden, wenn nötig, aufgetaut und sortiert. 400 µl 1 % BSA werden in die Assayröhrchen vorgelegt. In den vorgelegten Puffer werden 100 µl Probe pipettiert. Anschließend werden die Standardkurve vorbereitet. Dazu werden noch einmal 40 PS-Röhrchen benötigt: 3 mal Total counts, 3 mal unspezifische Bindung, 4 mal spezifische Bindung und 10 Standardpunkte mit je 3 Röhrchen. Die Standardlösung (Referenzpräparat NIDDK-RAT-FSH-RP-2) enthält 1 ng / µl. Die Standardlösung wird in den Puffer hineinpipettiert, dabei sollen Puffer und Standardlösung ebenfalls 500 µl Volumen ergeben. Jeder Standardpunkt enthält doppelt soviel Referenzpräparat als der vorhergehende. Zur Vorbereitung gehört auch die Herstellung des ¹²⁵Jod markierten Ratten-FSH-Tracer. 5µg des Jodierungspräparates wird mit Chloramin T (Methode von Hunter und Greenwood 1962) jodiert.

Nachdem Standardkurve und Proben pipettiert sind, werden 200 μ l 1. Antikörper (Anti -Rat-FSH-AK S 11) in einer Verdünnung von 1:25000 in 1:300 verdünntem NRS mit der Multipette zugegeben. In die unspezifische Bindung kommen 200 μ l 1:300 verdünntes NRS. Anschließend werden die Proben geschüttelt und 24 Stunden bei 4⁰ C inkubiert.

Nach der 1. Inkubation wird das jodierte Hormon zugegeben. Es werden mit der Multipette 100 μ l (ca. 20000 cpm) in jedes Assayröhrchen gegeben. Die Proben werden wieder geschüttelt und weitere 24 Stunden bei + 4⁰ C inkubiert.

Der letzte Inkubationsschrittt erfolgt nach der Zugabe des 2. Antikörpers. Es werden 200 μ l des 2. Antikörpers in einer Verdünnung von 1:30 in PBS mit der Multipette in alle Assayröhrchen außer TC dazugegeben. Nach der Zugabe werden die Proben wieder geschüttelt und für mindestens 48 bis maximal 72 Stunden bei + 4^oC inkubiert.

Der letzte Assayschritt ist die Zentrifugation. Dazu werden alle Röhrchen mit Ausnahme der Total Counts mit 2 ml PBS versetzt und 60 Min. bei 3000 upm zentrifugiert. Sofort danach werden die Proben dekantiert und auf einer Zellstoffunterlage umgekehrt zum Abtropfen gestellt.

Zum Schluß werden alle Assayröhrchen im Gamma-counter mindestens 1 Min. gemessen und mit dem RIA-CALC-PROGRAMM der Firma Wallac ausgewertet.

NIDDK-anti-rFSH-S-11 Spezifität

NIDDK-rFSH-I-8	100%
NIDDK-rFSH-RP-2	100%
NIDDK-rTSH-I-5	1,7137%
NIDDK-rPRL-RP-2	0,0609%
NIDDK-rGH-I-4	0,0219%
NIDDK-rLH-I-5	0.0082%

2.7.4 Radioimmunoassay für die Messung von Testosteron

Das Verfahren beruht auf dem Grundprinzip eines Radioimmunoassy, wobei radioaktive (125 Jod- Testosteron) und nicht radioaktives (Testosteron aus Serum oder Plasma, Standards,Kontrollen) Antigene um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen hochspezifischer Antikörper, die an der Wandung von Polypropylenröhrchen immobilisiert sind, konkurrieren. Die Menge von 125Jod-markiertem Antigen, das an die Antikörper gebunden ist, ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration der Probe. Die Trennung von freiem und ungebundenem Antigen erfolgt durch Dekantieren oder Absaugen des Röhrcheninhalts,. Die Einheiten sind in ng/ml ausgedrückt. Die Sensitivität, definiert als niedrigster vom Nullstandard nachweisbarer Testosteronwert beträgt 0,08ng/ml. Es werden 50µl Serum in die gecoateten Röhrchen gegeben, dazu kommen 500µl 125jod Testosteron, vortexen, 60-70 Min bei 37 Grad im Wasserbad inkubieren, dekantieren und im Gammacounter 1 Min messen.

Dies ist das wichtigste aus der Anleitung. Als Anhang die Arbeitsanleitung von FSH

3. Puffer und Lösungen

3.1 Allgemeine molekular-biologische Methoden

In dieser Abschnitt sind nur Puffern und Lösungen, die für die verlauf der Versuche eingesetzt wurden müssen und nicht von der Hersteller der Kitts mit geliefert waren.

Agarose-Gel

0,8 - 1,5 g Agarose in

100 ml TBE-Lösung (Kochen)

Ampicillin

Stammlösung: 25 mg/ml in H₂0

Endkonzentration: 100 µg/ml in LB-Medium

Chloroform

49:1 Chloroform/Isoamylalkohol

DAN-Längestandard

50 µl 100 pb DAN Leiter

 $450 \ \mu l \ H_20 \ bidest$

100 µl Stop-Mix

dNTP (Fa. GIBCO)

je 10 mM dAT, dCTP, dGTP, dTTP

Elutionspuffer

2 m EDTA, pH 7,5

Ethidiumbromid-Bad

13 µl Ethidiumbromid in

 $750\ ml\ H_20$

<u>IPTG</u>

Stammlösung: 200 mg/ml H₂0 bidest Endkonzentration: 40 μg/ml in LB-Medium

Lysis-Puffer 100 mM Tris-HCL, pH 8,0 500 mM LiCl 10 mM EDTA, pH 8,0 1 % SDS 5,5 mM DTT 40 U/ml Rnasin (Promega)

Luria-Bertani (LB)-Medium

10 g Trypton5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

pH 7,4

Luria-Bertani (LB)-Agar

37 g Luria-Agar in

100 ml H₂0 bidest

Stop-Mix

50 % Saccharose

7 M Harnstoff

1 mM EDTA

0,1 % Bromphenolblau

<u>10 X TBE-Puffer</u>

0,5 M Tris

0,5 M Borsäure

25 mM EDTA

<u>X-Gal</u>

Stammlösung: 20mg/ml in Dimethylformamid

Endkonzentration: 20 $\mu g/ml$ in LB-Medium

3.2 *in situ* Hybridisierung

Entfetter-Lösung

348 ml Chloroform

48 ml Ether

48 ml Methanol

Hybridisierngskammer-Puffer

250 ml 100% Formamid

60 ml 5 M NaCl

190 ml H₂0 bidest

Hybridisierungslösung (50ml)

31,25 ml deionisierten Formamid

12,5 ml 50% Dextran Sulfat

3.75 ml 5M NaCl

625 μl 1M Tris, pH 8,0

125 μl 0,5 M EDTA pH 8,0

1,25 ml 50X Denhard

1,93 DTT

auf 50 ml H₂0 bidest

Hybridisierungsmix (200µl)

vier Teile aus Hybridisierungslösung

Ein Teil cRNA in TED-Puffer

Kresylviolett nach Nissel

5,44 g Natriumacetat in $100 H_20$

5 g Kresyviolett in Natriumacetat lösen

auf 500 H_20

9,6 ml Eisessig

Filtrieren

<u>10X PBS</u> NaCl 80g KCl 2g Na₂HPO₄ 14.4g KH₂PO₄ 2.4g PH 7,5

Rnase A

Stammlösung 25 mg/ml Endkonzentration 30 µg/ml in Rnase-Puffer

RNnase-Puffer

10 ml 1M Tris

100 ml 5M NaCl

2 ml 0,5M EDTA

auf 1000ml H_20 bidest

<u>10X SSC</u>

NaCl 175,3g

Na Citrat 88,2g

PH 7,4

TE-Puffer

10 mM Tris, pH 7,5

1 mM EDTA

TEA

100 mM Triethanolamin, pH 8,0

TED-Puffer

1 mM DTT in TE-Puffer

3.3 Tierexperimente

Für die subkutane Injektion von Estradiol Testosteron und Progesteron wurden die Konzentrationen wie folgend eingesetzt:

Estradiol	3,5 µg/Tier
Testosteron	3,5 mg/Tier
Progesteron	0,5 mg/Tier
Olivenöl	0,5mg/Tier

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung einer *in situ* Hybridisierung zur RNA-Quantifizierung von GAD₆₅ und GAD₆₇ in den Rattengehirnarealen

Wegen der inhibitorischen Funktion von GABA im GnRH-Netzwerk sowie ihrer Auswirkung auf die Alterungsprozesse, spielt die Regulation von GAD durch die Steroidhormone eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der GnRH- und LH-Sekretion. Die Expression von mRNA der beiden Isoformen der GAD wird unter den Einfluss von Steroiden in Abhängigkeit der Gehirnregionen reguliert.

In der Literatur ist die *in situ* Hybridisierung als die bestgeeignete Methode zum Nachweis und zur Lokalisierung zellulärer Gentranskripte auf der Einzel-Zell-Ebene beschrieben (Park *et al.*, 1990; Shivers *et al.*, 1986). Ein weiterer Vorteil der Methode besteht im Hinblick auf ihr Anwendungsspektrum darin, dass sie es ermöglicht, die Expression einzelner Gene in Geweben in quantitativ aussagekräftiger Weise zu beschreiben.

Zur regionsspezifischen Quantifizierung der RNA-Level für GAD₆₅ und GAD₆₇ in Rattengehirnen wurde in der vorliegenden Arbeit eine *in situ* Hybridisierung für die Messung von Expressionsveränderungen durch Steroide entwickelt.

Die dafür benötigte GAD_{67} -cDNA wurde aus Klonen, die aus der Gesamt-Rattengehirn-cDNA-Bank (Tillakaratne et al., 1992) isolierten wurden, subkloniert. Aus der Rattenhippocampus-cDNA-Bank (Erlander et al., 1991a) entstammenden Klone wurde die GAD_{65} -cDNA subkloniert. Beide cDNA wurden jeweils in den Bluescript®-Transkriptionsvektor in beiden Richtungen zur Herstellung von Antisense- und Sense-Proben in *E. coli* DH 5 α transformiert. Die in Vektoren subklonierten GAD_{65} -(2.4 kb) und GAD_{67} -cDNAs (2.7 kb) beinhalten jeweils die gesamte kodierende Region und wurden freundlicherweise aus den Laboratorien von Dr. James P. Herman (Department of Anatomy and Neurobiology, University of Kentucky Medical Center, Lexington, Kentucky, USA) zur Verfügung gestellt. Die Richtigkeit der subklonierten cDNA wurde durch Sequenzierung und den Vergleich mit den veröffentlichten Sequenzen bestätigt.

4.1.1 Durchführung der Hybridisierung

Zur Etablierung der *in situ* Hybridisierung wurde zunächst die Antisense-cRNA von GAD₆₅ und GAD₆₇ benutzt. Je 3X10⁶ Counts ³⁵S-UTP-cRNA von GAD₆₅ oder GAD₆₇ wurden in 200µl Hybridisierungsmix vermischt, auf fixierte Gewebeschnitte, die POA, SCN, MBH und Hippocampus der Ratte beinhalteten, aufgetragen und bei 55°C 20 Stunden lang hybridisiert. Nach dem Waschen bei 67°C zur Reduzierung nicht-spezifischer Bindungen und im Anschluss an die Dehydrierung wurden die nun radioaktiv markierten Gewebeschnitte auf Kodak Röntgen-Filme (Kodak BioMAX MR) für 3 (Abb. 1) bzw. 7 (Abb. 2) Tage zur Belichtung der Filme im totalen Dunkel aufbewahrt. Die Filme wurden danach entwickelt. Densitometrische Messungen dieser Filme haben gezeigt, dass die Expositionszeit von 7 Tagen optimal ist.



Abb. 1: 3-Tage-Expositionszeit der Schnitte auf dem Film am Beispiel von GAD67mRNA. Die Expression des Gens wurde in zahlreichen Regionen, u.a. in der präoptischen Region (POA), im Nukleus suprachiasmaticus (SCN), im mediobasalen Hypothalamus (MBH) und im Hippocampus (HIP), nachgewiesen.



Abb. 2: 7-Tage-Expositionszeit der Schnitte auf dem Film am Beispiel von GAD65mRNA. Die Expression des Gens wurde in zahlreichen Regionen, u.a. in der präoptischen Region (POA), im Nukleus suprachiasmaticus (SCN), im mediobasalen Hypothalamus (MBH) und im Hippocampus (HIP), nachgewiesen

Im Interesse einer möglichst exakten Untersuchung der spezifischen Bindung der radioaktiven Sonde und zur genauen zellulären Lokalisationsspezifität der Methode wurden die radioaktiv markierten Gewebeschnitte in einer nuklearen Emulsion (NTB 2, Kodak) für 24 Tage in absoluter Dunkelheit inkubiert. Die Schnitte wurden entwickelt und mit Cresyl-Violet zur Zellkernfärbung behandelt (Abb. 3 und Abb. 4).



Abb. 3: Mikroskopische Aufnahme (40-fache Vergrößerung) vom Hippocampus (Gyrus dentatus) nach der Hybridisierung mit ³⁵S-UTP-markierter Sonde für GAD₆₅-mRNA. Die Silberkörner (durch Pfeile markiert) sind in den GABA-ergen Neuronen konzentriert.



Abb. 4: Mikroskopische Aufnahme (40-fache Vergrößerung) des mediobasalen Hypothalamus (MBH) nach der Hybridisierung mit ³⁵S-UTP-markierter Sonde für GAD₆₅-mRNA. Die Silberkörner (durch Pfeile markiert) sind in den GABA-ergen Neuronen konzentriert. Die Silberkörner, die durch die Strahlenemission der radioaktiven Sonden von GAD₆₅ und GAD₆₇ entstanden sind, zeigen eine Konzentration nur in bestimmten Zellentypen. Der Zellkern der Neuronen ist durch die cresyl-violette Färbung kenntlich gemacht. Wegen der spezifischen Markierung der Zellen durch die GAD₆₅ und GAD₆₇–Sonden sind diese markierten Zellentypen als GABA-erge Neurone zu identifizieren.

Um einen Vergleich der Sense-Proben zu den Antisense-Proben ziehen zu können, wurden getrennt je 3X10⁶ Counts ³⁵S-UTP-Sense-cRNA oder ³⁵S-UTP-AntisensecRNA von GAD₆₅ oder GAD₆₇ in 200µl Hybridisierungsmix vermischt, auf fixierte Gewebeschnitte der Ratte aufgetragen, unter gleichen Bedingungen hybridisiert und weiterverarbeitet. Die mit der Sense- bzw. Antisense-cRNA markierten Schnittgewebe des jeweiligen Gens wurden zusammen auf dem Film zu dessen Belichtung inkubiert. Die Filme wurden nach sieben Tagen entwickelt (Abb. 5 und Abb. 6). Die sehr schwachen Hintergrundsignale der Sense-cRNA der beiden Gene bestätigen die Spezifität der Methode.



Abb. 5: Vergleichende Hybridisierung für Sense- und Antisense- cRNA-³⁵S-UTP
 Proben für GAD₆₅ am Beispiel der präoptischen Region (POA) und des mediobasalen Hypothalamus (MBH). A: GAD₆₅ Sense-cRNA, POA. B: GAD₆₅ Sense-cRNA, MBH. C: GAD₆₅ Antisense-cRNA, POA. D: GAD₆₅ Antisense-cRNA, MBH



Abb. 6: Vergleichende Hybridisierung für Sense- und Antisense- cRNA-³⁵S-UTP Proben für GAD₆₇ am Beispiel des Nukleus suprachiasmaticus (SCN) und des Hippocampus (HIP). A: GAD₆₇ Sense-cRNA, SCN. B: GAD₆₇ SensecRNA, HIP. C: GAD₆₇ Antisense-cRNA, SCN. D: GAD₆₇ Antisense-cRNA, HIP

Um das Vorhandensein einer möglichen Artefakte-Bildung während der Hybridisierung zu testen, wurden für jede Gehirnregion vier aufeinanderfolgende Gebewebeschnitte aus einem Tier mit ³⁵S-UTP-cRNA für GAD₆₅ bzw. für GAD₆₇ hybridisiert, wobei sich an jedem Objektträger zwei Gewebeschnitte befanden. Wegen der Symmetrie der Gewebeschnitte waren jeweils zwei Regionen zu untersuchen, also insgesamt vier Regionen pro Objektträger. Die einzelnen densitometrischen Messungen der markierten Regionen innerhalb eines Objektträgers zeigten für die beiden Gene einen sehr niedrigen Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Der Mittelwert (AVG) der gesamten Messungen einer Region wies daher ebenfalls eine niedrige SEM auf. Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen sind in den Tabellen I und II zusammengefasst.

	Mittelwert	SEM	Anzahl der	
Region	per Region	per	Messungen	Zusammenfassung
		Region	per OT	der Messungen
POA: OT1	125,831	4,41	4	
POA: OT2	125,784	0,193	4	AVG 128,22
POA: OT3	128,941	2,713	4	SEM 1,80
POA: OT4	132,339	9,566	4	
SCN: OT1	137,094	1,767	4	
SCN: OT2	135,483	5,114	4	AVG 143,96
SCN: OT3	149,499	2,975	4	SEM 5,23
SCN: OT4	153,778	4,241	4	
MBH: OT1	122,812	1,842	4	
MBH: OT2	112,478	4,232	4	AVG 115,93
MBH: OT3	114,29	5,201	4	SEM 2,69
MBH: OT4	114,16	1,69	4	
HIP: OT1	123,559	6,285	4	
HIP: OT2	121,308	6,823	4	AVG 120,42
HIP: OT3	118,867	8,324	4	SEM 1,46
HIP: OT4	117,965	7,17	4	

Tabelle I:Darstellungen der Messungen für die Ermittlung der Präzision der
Hybridisierung für GAD65. OT: Objektträger. AVG: Der Mittelwert der
gesamten Messungen einer Region bei allen vier Objektträgern. SEM:
Standardfehler des Mittelwertes. Da sich an jedem Objektträger zwei
Gewebeschnitte befanden und eine Symmetrie der Gewebeschnitte
vorhanden ist, ergaben sich pro Objektträger vier Messungen.

	Mittelwert	SEM	Anzahl der	
Region	per Region	per	Messungen	Zusammenfassung
		Region	per OT	der Messungen
POA: OT1	102,36	11,02	4	
POA: OT2	97,837	7,269	4	AVG 100,47
POA: OT3	92,435	6,464	4	SEM 4,12
POA: OT4	109,28	0,863	4	
SCN: OT1	128,56	0,172	4	
SCN:OT 2	125,28	5,477	4	AVG 122,08
SCN: OT3	116,35	4,563	4	SEM 3,34
SCN: OT4	118,15	4,341	4	
MBH: OT1	90,771	6,029	4	
MBH: OT2	100,57	6,241	4	AVG 100,78
MBH: OT3	116,05	4,543	4	SEM 6,31
MBH: OT4	95,735	5,023	4	
Hip: OT1	115,04	7,609	4	
Hip: OT2	110,74	9,433	4	AVG 112,80
Hip: OT3	113,16	9,993	4	SEM 1,04
Hip: OT4	112,26	5,564	4	

 Tabelle II: Darstellungen der Messungen für die Ermittlung der Präzision der Hybridisierung für GAD₆₇. OT: Objektträger. AVG: Der Mittelwert der gesamten Messungen einer Region bei allen vier Objektträgern. SEM: Standardfehler des Mittelwertes. Da sich an jedem Objektträger zwei Gewebeschnitte befanden und eine Symmetrie der Gewebeschnitte vorhanden ist, ergaben sich pro Objektträger vier Messungen.
4.2 Effekte von Testosteron im Vergleich zu Estradiol und Gonadektomie auf die GABA-Expression innerhalb des GnRH-Netzwerks

Nach der Etablierung der *in situ* Hybridisierung für GAD_{65} und GAD_{67} ist es sinnvoll, eine genauere, regionspezifische Quantifizierung der Regulation durch Steroide in hypothalamischen und extra-hypothalamischen Regionen durchzuführen, die zum GnRH-Netzwerk gehören.

Für diese Untersuchungen wurde das männliche Rattenmodell gewählt. Bei diesem Modell kann der endokrine Zustand der Tiere gleich gehalten und der Einfluss des Östrus-Zyklus ausgeschlossen werden. Dies ist ein Vorteil gegenüber dem weiblichen Rattenmodell.

Intakte sowie gonadektomierte und gonadektomierte mit Estradiol (3,5 μ g/Tier)oder Testosteron (3,5 mg/Tier) behandelte Ratten wurden miteinander verglichen. Die Synthese von GABA wurde anhand der Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ durch die *in situ* Hybridisierung in der POA, im SCN, im MBH und im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus untersucht. ermittelt.

4.2.1 Bestimmung der Serumkonzentration von LH, Prolaktin und Testosteron in den Kontroll- und behandelten Ratten

Vor den molekularen Untersuchungen zur Expression von GAD_{65} und GAD_{67} wurde im Serum der Ratten die Konzentration von LH, Prolaktin und Testosteron gemessen (Abb. 7 +8).

Im Vergleich zu den intakten Kontrolltieren zeigte der LH-Spiegel eine deutliche Erhöhung durch die Gonadektomie (21 ng/ml \pm 0,7). Die Zugabe von Estradiol dämpfte zwar die durch die Gonadektomie erzeugte Erhöhung, die LH-Konzentration blieb jedoch signifikant hoch (12,65 ng/ml \pm 0,86). Bei den mit Testosteron behandelten, gonadektomierten Ratten wurde der LH-Spiegel auf das Kontroll-Niveau gebracht. Es wurde einen Wert von 0,26 ng/ml gemessen.

Die Serumkonzentration von Prolaktin (Abb. 8) zeigte bei der mit Estradiol behandelten Gruppe einen signifikanten Anstieg (42,19 ng/ml \pm 6,82). Eine

erhebliche Zunahme wurde bei der mit Testosteron behandelten Gruppe (75.6 ng/ml \pm 15,6) gemessen. Der Prolaktinspiegel blieb bei den Gonadektomierten Tieren (24.9 ng/ml \pm 2,6) auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

Der Konzentrationsmittelwert von Testosteron (Abb. 8) im Serum der gonadektomierten Gruppe fiel sehr niedrig aus: 0,77 ng/ml. Die Applikation von Estradiol zu den gonadektomierten Raten erniedrigt zwar den Testosteronspiegel (0,59 ng/ml), jedoch blieb dieser Wert im Vergleich zu der gonadektomierten Gruppe insignifikant.

Wie erwartet war der Konzentrationsmittelwert der mit Testosteron behandelten Ratten erheblich höher und lag bei 124,63 ng/ml.



Abb. 7: Serumkonzentrationen von LH in behandelten sowie unbehandelten Tieren, pro Gruppe n=6. DGX: Gonadektomierte Ratten GDX+E2 und GDX+T Gonadektomierte Ratten, behandelt mit 3,5 ug/ml Estradiol bzw. mit 3,5 mg/ml Testosteron.



Prolaktin Serumkonzentration

Abb. 8: Serumkonzentrationen von Prolaktin und Testosteron behandelten sowie unbehandelten Tieren, pro Gruppe n=6. GDX: Gonadektomierte Ratten GDX+E2 und GDX+T Gonadektomierte Ratten, behandelt mit 3,5 ug/ml Estradiol bzw. mit 3,5 mg/ml Testosteron.

4.2.2 Die Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ in der POA, im SCN, im MBH und im Hippocampus unter Einfluss von Gonadektomie sowie Testosteron- und Estradiol-Substitution

In der präoptischen Region wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von GAD_{65} und GAD_{67} in den mit Estradiol behandelten Gruppen beobachtet. Dabei stiegen die mRNA-Signale für GAD_{65} um nahezu 40% (138,99 ± 12,11). Für GAD_{67} wurde ein ähnlicher Anstieg gemessen (143,24 ± 7,9). Im Gegensatz dazu wurde bei den mit Testosteron behandelten Tieren eine niedrigere Expression (71,43 ± 10,6) von GAD_{67} festgestellt (Abb. 9).

Im Nukleus suprachiasmaticus (SCN) bewirkte die Zugabe von Testosteron bei den gonadektomierten Tieren eine signifikante Absenkung der GAD₆₇-mRNA-Konzentration um 15% (74,61 \pm 6,86). Die GAD₆₅-Werte blieben auf dem Kontrollniveau (Abb. 10).



Abb. 9: Genexpresion von GAD₆₅ und GAD₆₇ in der präoptischen Region (POA) der Ratte unter dem Einfluss von Gonadektomie, Testosteron und Estradiol, pro Gruppe n=6. In dieser und allen folgenden Abbildungen sind die Mittelwerte der densitometrischen Werte der Kontrolltiere (intakt) gleich 100% ± SEM gesetzt.
*: p< 0,05 vs. intakte Kontrolltiere. Die folgenden Abkürzungen gelten auch für die übrigen Abbildungen des Kapitels: Intakt: Unbehandelte Tiere, die als Kontrolle dienen. GDX: Gonadektomierte Ratten GDX + E₂: Gonadektomierte, mit 3,5 µg/ml Estradiol behandelte Tiere GDX + T: Gonadektomierte, mit 3,5 mg/ml Testosteron behandelte Tiere







Abb. 10:Genexpression von GAD65 und GAD67 im Nukleus suprachiasmaticus (SCN)
der Ratte unter dem Einfluss von Gonadektomie, Testosteron und Estradiol,
pro Gruppe n=6. *: p< 0,05 vs. intakte Kontrolltiere.</th>

Eine signifikante Änderung wurde in dem mediobasalen Hypothalamus (MBH) durch die Gonadektomie mit einer Testosteronbehandlung beobachtet. Die Expression von GAD_{65} sank bei dieser behandelten Gruppe um 21 % (78,67 ± 6,71).



Abb. 11: Genexpression von GAD_{65} und GAD_{67} im mediobasalen Hypothalamus (MBH) der Ratte unter dem Einfluss von Gonadektomie, Testosteron und Estradiol, pro Gruppe n=6. *: p< 0,05 vs. intakte Kontrolltiere.

Wie bereits bei der MBH wurde eine signifikante Abnahme der Genexpression von GAD₆₅ im Gyrus dentatus des Hippocampus (Hip-DG) bei den gonadoktomierten

und mit testosteronbehandelten Tieren beobachtet. Dabei fiel das Niveau der mRNA-Konzentration in dieser Gruppe um 16% ($83,45 \pm 3,27$).



Hip-DG GAD₆₅





Abb. 12: Genexpression von GAD_{65} und GAD_{67} im Gyrus dentatus des Hippocampus (HIP-DG) der Ratte unter dem Einfluss von Gonadektomie, Testosteron und Estradiol, pro Gruppe n=6. *: p< 0,05 vs. intakte Kontrolltiere.

Die Gonadektomie, die Estradiol- sowie die Testosterongabe zeigten auf die Expression der beiden GAD-Isoformen in der POA, im SCN, im MBH und im Gyrus dentatus des Hippocampus unterschiedliche Wirkungen.

Die Ergebnisse der untersuchten Regionen innerhalb des GnRH-Netzwerks sind in Tabelle III zusammengefasst.

Regulation	der	beiden	untersuchten	Gene

im Vergleich zu den Kontrolltiere

	GAD ₆₇				GAD ₆₅			
	HIP-DG	MBH	SCN	POA	HIP-DG	MBH	SCN	POA
GDX	t	t	t	t	रु	t	t	t
GDX+E ₂	t	t	t	+	t	t	t	+
GDX+T	t	t	-	-	-	-	t	t

Tab. III:

Zusammenfassung der untersuchten Regionen für GAD₆₅ und GAD₆₇ unter dem Einfluss von Gonadektomie, Estradiol und Testosteron.

- € Keine signifikante Änderungen
- + : Signifikante Erhöhung der mRNA-Menge
- : Signifikante Abnahme der mRNA-Menge

4.3 Entwicklung eines Tiermodells zur Untersuchung der physiologischen und molekularbiologischen Alterungsprozesse der weiblichen Ratte

In jungen weiblichen Ratten bewirkt der am Proöstrus-Tag hervorgerufenen Anstieg des Estradiol-Spiegels eine plötzliche Erhöhung der LH-Konzentration im Blut. Diese positive Rückkopplung von Estradiol wird von einem weiteren Anstieg von Progesteron unterstützt und ist eine Vorrausetzung für die Ovulation. Das hypothalamische GnRH-Netzwerk reguliert diesen estradiolinduzierten LH-Peak. Beim Eintritt in die Transitionsphase, von der regulären in den irregulären Zyklus-Verlauf, verliert Estradiol seine Fähigkeit, einen LH-Peak auszulösen. In der persistent-östrischen Phase kann ein Estradiol-Anstieg keine LH-Konzentrationszunahme im Blut bewirken. Im Gegensatz dazu verursacht eine Progesteron-Erhöhung einen LH-Peak (Everett und Tyrey et al., 1982). Diese und weitere Veränderungen während der Transitionsphase wurden sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen beobachtet (s. 1.3.1, S. 8).

Um die physiologischen und molekularbiologischen Veränderungen während dieser Phase zu studieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Rattenmodell entwickelt.

Dabei wurden 3 Monate alte, proöstrische Ratten (Y) und 12 Monate alte, persistentöstrische Ratten (MA) benutzt. Den MA-Ratten wurde jeden vierten Tag um 12 Uhr über einen Zeitraum von 12 Tagen Progesteron (0,5 mg / 100 g BW) injiziert. Die MA-Ratten wurden am Tag 12 der Behandlung um 10 Uhr, 13 Uhr sowie um 17 Uhr und die Y-Ratten um 13 Uhr und 17 Uhr getötet.

4.3.1 Bestimmung der Serumkonzentration von LH, FSH, Prolaktin und Estradiol im benutzten Tiermodell

Die nach der Dekapitation gesammelten Blutproben dienten zur Messung der Serumkonzentration von LH. Anhand der gemessenen LH-Konzentrationen (Abb. 13) wurden Subgruppen der Tier gebildet. Eine LH-Konzentration von 5 ng/ml wurde als Grenzwert für eine positive Reaktion der Tiere auf Progesteron (responding animals) eingesetzt. Die Tiere, die weniger als 5 ng/ml LH-Konzentration im Serum aufwiesen, wurden als "non-responding animals" definiert. Als Vergleich wurde eine weitere Gruppe gebildet, die alle mit Progesteron injizierten Tiere, unabhängig von der Reaktion der LH-Sekretion umfasst. In dieser Gruppe waren also sowohl die non- als auch responding animals vertreten. Die um 10 Uhr getöteten, unbehandelten MA-Tiere dienten hier als Kontrollgruppe.

Die gesamte Anzahl der mit Progesteron behandelten Tiere, die um 17 Uhr getötet wurden, lag bei 36. Davon wurden 16 Tiere als responding und 20 Tieren als nonresponding definiert. In persistent östrischen, mittelalten Ratten konnte somit durch die Progesteron-Applikation 44 % der Tiere der Östrus-Zyklus anhand der gemessenen LH-Werte wieder hergestellt werden.

Bei den um 13 Uhr behandelten bzw. unbehandelten MA-Gruppen blieb der LH-Spiegel auf dem niedrigsten Niveau. Ähnliche LH-Konzentrationen wurden bei der um 17 Uhr unbehandelten MA-Gruppe beobachtet. Die Zugabe von Progesteron bewirkte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die zusammengefasste Gruppe aller Progesteron injizierten Tiere, die MA17 LH ≥ 0 Gruppe, zeigte eine signifikante Erhöhung der LH-Konzentration im Blut auf 7,10 ng/ml. Die non-responding Tiere (LH \leq 5 ng/ml) zeigten einen niedrigen LH-Spiegel: 0,5 ng/ml, der auf der Ebene der Kontrollgruppe blieb. Bei den responding Tieren (LH \geq 5 ng/ml) wurde eine Konzentration von 15,32 ng/ml (15,32 ± 2,32) gemessen. Die jungen Tiere, die gegen 13 Uhr getötet wurden (Y13), zeigten einen auf dem Niveau der Kotrollgruppe verbliebenen Stand. Dagegen stieg der LH-Spiegel der Y17-Gruppe auf eine Konzentration von 22,84 ng/ml $(22,84 \pm 7,70)$ an. Anhand der gemessenen LH-Konzentration konnte eine Analogie zwischen den Gruppen festgestellt werden: Die mit Progesteron behandelte MA 13 Uhr-Gruppe wies eine Analogie zu der Y13-Gruppe auf. Die responding Tiere zeigten ebenfalls eine Analogie im Verhältnis zu der Y17-Gruppe. Diese Gruppenanalogie wird für die

übrigen Messungen der untersuchten Hormone und mRNA-Konzentrationen als

Maßstab der Gruppenvergleiche berücksichtigt.



LH-Serumskonzentration

Abb. 13: LH-Serum-Konzentrationen in den verschiedenen Subgruppen des benutzten Tiermodells. Die folgenden Abkürzungen gelten auch für die übrigen Abbildungen des Kapitels. *: p < 0.05 vs. intakte Kontrolltiere

MA: 12 Monate alte, mittelalte, persistent östrische Ratten. Y: 3 Monate alte, junge, proöstrische Ratten Con 10:00: Gegen 10 Uhr getötete MA Tiere. MA 13:00 -P: Gegen 13 Uhr getötete MA Tiere, ohne Progesteron-Behandlung MA 13:00 +P: Gegen 13 Uhr getötete MA Tiere, mit Pogesteron-Behandlung MA 17:00 -P: Gegen 17 Uhr getötete MA Tiere, ohne Progesteron-Behandlung MA 17 +P: gegen 17 Uhr getöteten MA Tiere, mit Progesteron Behandlung. MA 17 +P/LH \leq 5: Gegen 17 Uhr getötete non-responding MA MA 17 +p/LH \ge 5: Um 17 Uhr getötete responding MA Y13:00: Um 13 Uhr getötete Y Tiere. Y17:00: Um 17 Uhr getötete Y Tiere

Die FSH- und Prolaktin-Konzentrationen im Serum der Tiere dieses Modells zeigten ähnliche Ergebnisse, welche die der LH-Ergebnisse ergänzten (Abb. 14 und 15).



FSH-Sekretion

Abb. 14: Serum-Konzentration von FSH des benutzten Tiermodells. *: p < 0,05 vs. intakte Kontrolltiere

Sowohl die FSH- als auch die Prolaktin-Konzenration der unbehandelten Tieren blieb auf dem Niveau der Kontrollgruppe und analog zu der Y13-Gruppe. Bei den non-responding Tieren wurde eine leichte Erhöhung der FSH- und Prolaktin-Konzenration beobachtet, die jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe insignifikant war. Bei den responding-Tieren wurde ein signifikanter Anstieg der FSH-Sekretion gemessen (5,78 ng/ml), welcher mit dem der Y17-Gruppe analog war (7,79 ng/ml). Der Prolaktinspiegel bei den responding-Tieren stieg auf 56,82 ng/ml, während sich derjenige der Y17-Gruppe erheblich erhöhte (129,31 ng/ml).



Prolaktin-Sekretion

Abb. 15: Serum-Konzentration von Prolaktin des benutzten Tiermodells. *: p< 0,05 vs. intakte Kontrolltiere

Das hier vorgestellte Tiermodell hat sich wegen der LH-, FSH-, und Prolaktin-Konzentrationen im Serum und aufgrund der zufriedenstellenden Ausbeute zur Wiederherstellung des Östrus-Zyklus (44%) als geeignet erwiesen, die physiologischen und molekularbiologischen Prozesse des Alterns zu studieren.

4.5 Molekularbiologische Untersuchungen zu Alterungsprozessen auf der Ebene der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse

Für die weiteren Untersuchungen altersabhängigen Prozesse in dem hier vorgestellten Tiermodell auf der Ebene der Molekularbiologie sollte eine Methode eingesetzt werden, die für diesen Zweck bestgeeignet ist. Dadurch sollte die Genexpression verschiedener Rezeptoren und Peptide/Proteine, die für die Alterungsprozesse relevant sind, untersucht werden. Zu den Rezeptoren gehören: Die Estrogen-Rezeptoren α und β (ER α und ER β) sowie der GnRH-Rezeptor (GnRH-R). Zu den untersuchten Peptide/Proteinen zählen die beiden Isoformen des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamat Decarboxylase (GAD₆₅ und GAD₆₇), das GnRH, LH- β und FSH- β .

Trotz ihrer Spezifität und ihrer genauen Quantifizierung der zellulären Lokalisation der Genexpression beibt die *in situ* Hybridisierung eine sehr aufwendige Methode, bei der nur eine begrenzte Anzahl von Proben untersucht kann. Bei dem hier vorgestellten Tiermodell, mit einer derart hohen Anzahl von Tieren, erscheint die *in situ* Hybridisierung als nicht geeignet, um eine aussagekräftige Statistik zu Veränderungen in individuellen Tieren zu erhalten. Als alternative Methoden haben sich die Real-Time Taqman® Polymerase-Kettenreaktion (Taqman®-PCR) und die reverse Transkription mit anschließender, kompetitiver Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erwiesen.

4.5.1 Etablierung und Durchführung der kompetitiven RT-PCR

Der Vorteil der PCR als Untersuchungsmethode besteht darin, dass bereits kleine Mengen an RNA durch die reverse Transkription und die anschließende Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und nachgewiesen werden können. Durch die Amplifikation eines Standards können Artefakt-Probleme bei der Quantifizierung der PCR-Produkte vermieden werden. Die Methode der kompetitiven RT-PCR basiert auf der Zugabe von einer exogenen Sequenz, die zu jeder Probe in einer cRNA-Form zugegeben wird. Diese hergestellte Sequenz ist eine verkürzte cDNA des gewünschten PCR-Produkts und besitzt dessen Primer-Sequenz.

Durch die vorherige Bestimmung der Konzentration des eingesetzten Standards ist die Messung der absoluten Menge der nativen Sequenz ebenso wie die Messung der relativen Veränderungen in Versuchsgruppen möglich. Mit einer Titrationskurve kann man diejenige Menge der "mutanten" cRNA bestimmen, die in der RT-PCR eingesetzt werden muss, um ein äquivalentes Signal aus einer definierten Menge totaler RNA aus einer biologischen Probe zu erhalten.

Die kompetitive RT-PCR wurde auch für ER β , GnRH-R, LH β und FSH β durchgeführt und in Abbildung 16 zusammengefasst.



Abb. 16: Zusammenfassung der etablierten kompetitiven RT-PCR von 1: ER α, 2: ER β, 3 und 4: GnRH-R sowie 5: FSH β. M: 100 pb DNA-Längenstandard (helle Bande: 600 bp).

4.5.2 Etablierung der Real-Time Taqman® PCR für GAD₆₅, GAD₆₇ und GnRH

Die Real-Time Taqman® PCR (Applied Biosystems GmbH, BRD) ermöglicht es, PCR-Produkte zu amplifizieren und gleichzeitig die amplifizierte Menge an DNA quantitativ nachzuweisen (Lee et al., 1993). Bei diesem System hybridisiert jedoch während der PCR eine fluorogene Sonde mit den Primern zusammen am Matrizenstrang. In der Extensionsphase der PCR-Reaktion "verdrängt" die AmpliTaq DNA Polymerase® die Sonde und lässt dadurch eine Y-förmige Sekundärstruktur entstehen, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase® induziert wird. Die Sonde wird somit abgetrennt und hydrolysiert. Freie, nicht-hybridisierte Sonden werden hingegen nicht hydrolysiert. Die Hydrolyse der Sonde führt zur Abspaltung eines an diese Sonde gekoppelten fluoreszierenden Farbstoffs, der durch einen Sequenz-Detektor gemessen werden kann.

Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts steigt die Fluoreszenz also mit jedem PCR-Zyklus an. Auf diese Weise ist es möglich, an der Stärke des spezifischen Fluoreszenzsignals die Akkumulation der PCR-Produkte abzulesen.

Diese Methode der PCR-Durchführung erfordert also keine post-PCR Auswertung per Gel-Elektrophorese und es sind auch keine Mutanten (kompetitive RT-PCR) oder House-Keeping-Genes (Semiquantitative RT-PCR) notwendig, um eine Vergleichsgröße zu erhalten und damit die Ergebnisse zu standardisieren.

Als Referenz werden bei der Taqman® PCR bekannte Mengen von Ziel-cDNA, die zuvor aus einer cRNA revers transkribiert wurden, als Standardkurve amplifiziert. Die sogenannten CT-Werte werden in Abhängigkeit von der Standard-cDNA-Menge anhand des Auswertungsprogramms aufgetragen und dienen als Bezug für die Messwerte der Proben.

4.6 Die Expressionsveränderungen der untersuchten Gene auf der Ebene der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse

Aus technischen Gründen konnte nicht immer die gleiche RNA Mengen aus den Tieren gewonnen werden. Daher konnte sich eine Abweichung der Zahl der Tiere innerhalb bestimmter Gruppen (n=x) in einigen Versuchsreihen ergeben.

4.6.1 Die präoptische Region des vorderen Hypothalamus (POA)

In der hypothalamischen Region POA (Perikarya der GnRH-Neurone) wurden die folgenden Gene, die für das GnRH-Netzwerk relevant sind und so eine wichtige Rolle bei den Alterungsprozessen spielen, untersucht: GAD_{65} und GAD_{67} , GnRH und dessen Rezeptor (GnRH–R), ER α sowie ER β .

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bei der Messung der Konzentration von GAD_{65} – und GAD_{67} –mRNA keine signifikanten Veränderungen in der POA des Rattenmodells beobachtet. Ebenso wurden im Vergleich zu den jungen Tieren (Y13-Gruppe und Y17-Gruppe) keine Änderungen in deren analogen Gruppen (MA 13:00 +P und MA 17:00 +P) detektiert.



Abb. 17: Genexpression von GAD_{65} der POA des Rattenmodells. In dieser und allen folgenden Abbildungen sind die Mittelwerte der densitometrischen Werte der Kontrollgruppe gleich 100 % ± SEM gesetzt. Die hier und in den übrigen Abbildungen des Kapitels verwandten Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 13.



Abb. 18: Genexpression von GAD₆₇ in der POA des Rattenmodells.

Die Expression von GnRH und dessen Rezeptor, der GnRH-R, in der POA blieben auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Die Vergleiche mit den jungen Tieren behielten insignifikante Veränderungen bei (Abb. 19 und Abb. 20).







Die Expression des GnRH in der POA des Rattenmodells.

POA



Abb. 20: Die Expression des GnRH-R in der POA des Rattenmodells.



In der POA des untersuchten Tiermodells wurden keine Veränderungen der Expression von ER α beobachtet (Abb. 21).

Abb. 21: Die Expression des ER α in der POA des Rattenmodells.

Im Gegensatz zu ER α -mRNA zeigte die ER β -mRNA (Abb. 22)eine signifikante Absenkung um 34% in den responding Tieren (66 ± 13) sowie um 34% in deren analoger Gruppe der jungen Tiere der 17 Uhr-Gruppe (66 ± 13,7).



Abb. 22: Die Expression des ER β in der POA des Rattenmodells. *: p< 0,05 vs. Kontrolltiere.

Die Ergebnisse der untersuchten Gene in der POA sind in der Tabelle IV zusammengefasst.

Regulation der untersuchten Gene in der POA

	im Ver	gleich zu o	den Kontro	olltieren		
	GAD ₆₅	GAD ₆₇	GnRH	GnRH-R	ER α	ER β
MA 10:00	100%	100%	100%	100%	100%	100%
MA 13:00 – P	t	t	t	t	t	t
MA 13:00 +P	t	t	t	t	t	t
МА 17:00 – Р	t	t	t	t	t	t
$MA17 + P/LH \ge 0$	t	t	t	t	t	t
$MA17 + P/LH \le 5$	t	t	t	t	t	t
$MA17 + P/LH \ge 5$	t	रि	रि	रि	t	- 34%
Y 13:00						
Y 17:00	Ð	t	t	t	t	- 34%

Tab. IV: Zusammenfassung der untersuchten Gene in der POA des Rattenmodells.

€: Keine signifikante Änderung.

- + : Signifikante Erhöhung der mRNA-Menge
- : Signifikante Abnahme der mRNA-Menge

4.6.2 Der mediobasale Hypothalamus

Folgende, für die Alterungsprozesse relevante Gene wurden im mediobasalen Hypothalamus (MBH), in dem sich die Axone der GnRH-Neurone befinden, auf Veränderungen im Tiermodell untersucht: GAD_{65} und GAD_{67} , GnRH-Rezeptor (GnRH-R), ER α sowie ER β .

Die mRNA-Transkripte von GAD_{65} und GAD_{67} sanken gleicherweise bei der Y17:00-Gruppe um ungefähr 15% ab (Abb. 23 und Abb. 24).



Abb. 23: Die Expression des GAD_{65} im MBH des Rattenmodells. *: p < 0.05 vs. Kontrolltiere.



MBH

Abb. 24:Die Expression des GAD_{67} im MBH des Rattenmodells.*: p<0,05 vs. Kontrolltiere.</td>

Bei der Messung von GnRH-R-mRNA-Konzentrationen im MBH wurde bei der Y13-Gruppe eine Absenkung von 30% (70 ± 10.70) festgestellt. Diese Abweichung gegenüber der dazu analogen Gruppe MA13:00 +P zeichnete sich durch eine Erhöhung der MA13:00 +P um 70% aus.

Eine signifikante Absenkung der ER α -mRNA-Werte wurde im MBH nur in den beiden jungen Tieren beobachtet (Abb. 26). Die restlichen Gruppen blieben auf dem Kontrollniveau. Die Abnahme der Werte war bei der Y17-Gruppe (58% ± 8) deutlicher als bei der Y13-Gruppe (77% ± 10). Der Unterschied zwischen der Y17-Gruppe und den analogen mittelalten Gruppen war eindeutig und signifikant.



Abb. 25: Die Expression des GnRH-R im MBH des Rattenmodells.
*: p< 0,05 vs. Kontrolltiere. ⊗: p< 0,05 vs. dazugehörige analoge Gruppe.



Abb. 26: Die Expression des ER α im MBH des Rattenmodells.
*: p< 0,05 vs. Kontrolltiere. S: p< 0,05 vs. dazu gehörige analoge Gruppe.

Die ER β -Expression zeigte eine Veränderung nur bei der Y17-Gruppe (Abb. 27). Dabei sank die Expression um 25.5% (74,5 ± 8,5) ab. Diese Absenkung machte einen Unterschied zu der analogen responding-Gruppe kenntlich.



Abb. 27: Die Expression des ER β im MBH des Rattenmodells.
*: p> 0,05 vs. Kontrolltiere. S: p> 0,05 vs. dazu gehörige analoge Gruppe.

e							
im Vergleich zu den Kontrolltieren							
	GAD ₆₅	GAD ₆₇	GnRH-R	ER a	ER β		
MA 10:00	100%	100%	100%	100%	100%		
MA 13:00 – P	t	t	t	Ð	t		
MA 13:00 +P	t	t	+ 🛞	t	t		
MA 17:00 – P	t	t	t	t	t		
$MA17 + P/LH \ge 0$	t	t	t	t	t		
$MA17 + P/LH \le 5$	t	t	t	Ð	t		
$MA17 + P/LH \ge 5$	t	t	t	+ 🛞	+⊗		
Y 13:00	t	t	- 30 %	- 23 %	t		
Y 17:00	- 15 %	- 15 %	t	- 42 %	-25,5%		

Die Werte der untersuchten Gene im MBH sind in Tabelle V dargestellt.

Regulation der untersuchten Gene im MBH

Tab. V: Zusammenfassung der untersuchten Gene im MBH des Rattenmodells

€: Keine signifikante Änderung.

- 🛞 bzw. + 🕲: Ab- bzw. Anstieg vs. dazugehörige analogen Gruppe.
- + : Signifikante Erhöhung der mRNA-Menge
- : Signifikante Abnahme der mRNA-Menge

4.6.3 Die Hypophyse

Die Expression der folgenden Gene wurde in der Hypophyse untersucht: Der GnRH-Rezeptor (GnRH–R), ER α sowie ER β und die β Untereinheiten von LH und FSH (LH- β und FSH- β).

Im Zusammenhang mit der GnRH-R-Genexpression bei den non-responding Tieren wurde eine Absenkung ($63\% \pm 13,7$) in der Hypophyse festgestellt. Die gesamte

behandelte Tiergruppe zeigte mit der Abnahme von 32% ($68 \pm 11,7$) ein ähnliches Expressionsmuster. Die restlichen, gemessenen Veränderungen in den anderen Gruppen waren insignifikant (Abb. 28). Gegenüber der analogen Y17:00-Gruppe wurde ebenfalls eine Absenkung bei den behandelten Tiergruppen erkennbar.

Hypophyse GnRH-R



Abb. 28:Die Expression des GnRH-R in der Hypophyse des Rattenmodells.*: p < 0.05 vs. Kontrolltiere. $\bigotimes: p < 0.05$ vs. dazugehörige analoge Gruppe.

In der MA13:00 +P-Gruppe und deren analoger Gruppe, der Y13-Gruppe, wurde eine Expressionserhöhung von ER α gemessen (Abb. 29). Dieser Expressionsanstieg wurde bei den mittelalten Tieren auf 155% (155 ± 25) gemessen. Eine erhebliche Zunahme wurde bei der Y13-Gruppe (253% ±48) gemessen. Die restlichen Gruppen blieben auf dem Niveau der Kontrollgruppe.



Abb. 29: Die Expression des ER α in der Hypophyse des Rattenmodells. *: p< 0,05 vs. Kontrolltiere.

Im Gegensatz zu ER α zeigten die ER β -mRNA-Konzentrationsrate eine Absenkung in der Hypophyse (Abb. 30). Die mRNA-Konzentration sanken in der responding Tiergruppe (56% ± 17,3) und deren analogen Y17-Gruppe (56,6% ± 16). Bei den Transkript-Werten von ER β in den restlichen Gruppen wurde keine signifikante Veränderung gemessen.



Abb. 30: Die Expression des ER β in der Hypophyse des Rattenmodells. *: p< 0,05 vs. Kontrolltiere.

Signifikante Erhöhungen der Transkripte der β -Untereinheit von FSH wurden in der Hypophyse beobachtet (Abb. 31). Die mRNA-Werte von FSH- β nahmen bei der responding Tiergruppe (296% ± 53) sowie deren analogen Y17-Gruppen (293% ± 45) zu. Die gesamten, behandelten Tiere zeigten auch eine Erhöhung der FSH- β mRNA-Konzentration (238% ± 42). Auch bei der non-responding Tiergruppe stieg das mRNA-Niveau (191,5% ± 30). Desweiteren dazu wurde eine leichtere Erhöhung (146% ± 20,8) bei der jungen Y13-Gruppe beobachtet. Eine Zunahme der Transkripte bei der MA13:00 +P (analog zu Y13) blieb jedoch insignifikant.

Aus technischen Gründen konnte leider die Methode der kompetitiven RT-PCR zur Messung der Genexpression von LH β nicht etabliert wurden. Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um diese Methode für LH β zu optimieren, die jedoch nicht erfolgreich waren.



Hypophyse FSH-ß

Abb. 31: Die Expression des FSH- β in der Hypophyse des Rattenmodells. *: p< 0,05 vs. Kontrolltiere.

Die Ergebnisse der untersuchten Gene in der Hypophyse des Rattenmodells sind in der Tabelle VI aufgelistet.

Regula	tion der un	tersuchten	Gene in der	· Hypophyse			
im Vergleich zu den Kontrolltieren							
	GnRH-R	ER α	ER β	FSH-β	LH - β		
MA 10:00	100%	100%	100%	100%	100%		
MA 13:00 – P	t	t	t	t			
MA 13:00 +P	t	+ 155%	t	t			
MA 17:00 – P	t	t	t	t			
$MA17 + P/LH \ge 0$	t	t	t	+ 238%			
$MA17 + P/LH \le 5$	t	t	t	+ 191,5%			
$MA17 + P/LH \ge 5$	- 🛞	+ 253%	- 56 %	+ 296%			
Y 13:00	t	t	t	t			
Y 17:00	t	t	- 46,6 %	+ 293%			

Tab. VI:Zusammenfassung der untersuchten Gene in der Hypophyse des
Rattenmodells

- €: Keine signifikante Änderung.
- 😣 bzw. + 🕲: Ab- bzw. Anstieg vs. dazugehörige analogen Gruppe.
- + : Signifikante Erhöhung der mRNA-Menge
- : Signifikante Abnahme der mRNA-Menge

4.6.4 Das Ovar

Im Ovar wurden die folgenden Gene, die für die Alterungsprozesse relevant sind, auf Veränderungen im Rattenmodell untersucht: GnRH, GnRH-R, ER α und ER β .

Die Expression von GnRH und dessen Rezeptor, GnRH-R, zeigte keine signifikante Veränderung in allen untersuchten Gruppen (Abb. 32 und Abb. 33).

Ovar GnRH

Abb. 32: Die Expression des GnRH im Ovar des Rattenmodells.

Die ER α -mRNA-Konzentrationen im Ovar blieben bei allen Tiergruppen des Modells auf dem Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 34).



Abb. 33: Die Expression des GnRH-R im Ovar des Rattenmodells.



Abb. 34: Die Expression des ER α im Ovar des Rattenmodells.

Im Gegensatz zu den ER α wurde bei den ER β Transkript-Werten eine Absenkung gemessen (Abb. 35). Die Expression von ER β sank bei den responding Tieren auf 68,3% (68,3 ± 12) im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Die dazu analoge Y17-Gruppe verzeichnete auch eine signifikante Absenkung der ER β -Expression (73,3% ± 12,5).



Abb. 35: Die Expression des ER β im Ovar des Rattenmodells.
Die im Ovar untersuchten Gene sind in der Tabelle VII zusammengefasst.

Regulation der untersuchten Gene im Ovar				
im Vergleich zu den Kontrolltieren				
	GnRH	GnRH-R	ER α	ER β
MA 10:00	100%	100%	100%	100%
МА 13:00 – Р	t	t	t	t
MA 13:00 +P	t	t	t	t
МА 17:00 – Р	t	t	t	tł
$MA17 + P/LH \ge 0$	t	t	Ð	t
$MA17 + P/LH \le 5$	t	t	t	t
$MA17 + P/LH \ge 5$	t	t	t	- 68,3%
Y 13:00	t	t	Ð	t
Y 17:00	t	t	t	- 73,3%

Tab. VII:Zusammenfassung der untersuchten Gene im Ovar des Rattenmodells.••••: Keine signifikante Änderung.

- + : Signifikante Erhöhung der mRNA-Menge
- : Signifikante Abnahme der mRNA-Menge

5. Diskussion

Die charakteristische Pulsatilität der hypothalamischen GnRH-Neurone ist eine unabdingbare Vorrausetzung für die Funktion des hypothalamo-hypophysiogonadalen Regelkreises. Da die GnRH-Neurone zahlreiche hypothalamische und extrahypothalamische Afferenzen erhalten, wurde für dieses neuronale Netzwerk der Begriff "GnRH-Pulsgenerator" geprägt. Frequenz und Amplitude der GnRH-Freisetzung werden direkt bzw. indirekt durch viele Substanzen beeinflusst. Eines dieser Produkte ist der Neurotransmitter GABA, der - neben seiner Rolle als "Vermittler" des Estrogen-Einflusses auf die GnRH-Neurone - auf die Regulation der GnRH-Sekretion inhibitorisch wirkt. Altersabhängige Veränderungen in der Regulation des GnRH-Netzwerks tragen zum reproduktiven Altern bei. Hypothalamische Aktivitätsveränderungen der GABA-ergen Neurone während des Alters könnten daher als ein wichtiger Teil einer Kaskade, die zum Erliegen des reproduktiven Zyklus führen, sein. Das Rattenmodell hat sich als geeignet erwiesen, Studien zur Untersuchung des GnRH-Netzwerks und der Alterungsprozesse des Reproduktionssystems durchzuführen: In dieser Spezies sind die in der POA gelegene Perikarya der GnRH-Neurone von der Terminalienebene im MBH räumlich weit getrennt (Pellegrino et al., 1979). Dadurch bietet sich die Möglichkeit, die beiden Regionen auf getrennten Ebenen zu untersuchen. Analoge Veränderungen in der Estradiol-, FSH- und LH-Sekretion sowie auch des LH-Peaks treten während des Alters auch bei Menschen auf, was im folgender Text diskutiert werden soll.

5.1 Die Wirkung von Steroiden auf die GABA-erge Aktivität

Der Neurotransmitters Gamma-Amino-Buttersäure ist ein wichtiger Bestandteil des GnRH-Netzwerks und von wesentlicher Bedeutung bei der Regulation des GnRH-Pulsgenerators: Maßgeblich ist in diesem zusammhang vor allem seine inhibitorische Wirkung auf die GnRH-Sekretion (Hood & Schwartz, 2000; Hiruma *et al.*, 1994; Lee & Pelletier 1993; Akema & Kimura, 1992; Bergen *et al.*, 1991; Jarry *et al.*, 1991; Jarry *et al.*, 1988) sowie seine Bedeutung als "Eintrittspforte" für die negative/positive Rückkopplung des Estradiols (Übersicht bei Herbison 1998). Die altersabhängigen Prozesse der Reproduktionsfunktion werden durch Veränderungen im hypothalamischen GnRH-Netzwerk hervorgerufen. Zu diesen Veränderungen tragen auch die GABA-ergen Neurone während des Alters aktiv bei. Die Aussage beruht auf der Beobachtung, dass im Vergleich von 22 Monate alten die persistent östrischen Ratten und 4 Monate alten Ratten, die einen normalen östrischen Zyklus zeigten, eine Abnahme der Freisetzungsrate von GABA in der preoptischen Region der alten Ratten beschrieben wurde (Jarry et al., 1999). Diese Rolle des GABA-ergen Systems bei Alterungsprozessen der Reproduktion wurde ebenso von Herman und Larson (2001) bekräftigt. Sie beobachteten eine signifikante Zunahme der Expression von GAD₆₅ mRNA in der medialen preoptischen Region der alten Ratten (30Monate alt), die mit jungen Ratten (3 Monate bzw. 15 Monate alt) verglichen wurden. Die altersabhängigen Veränderungen im Hypothalamus und im zentralen Nervensystem führen generell zu deutlichen Änderungen der Steroid-Spiegel (Klein et al., 1996a; Santoro et al., 1996; Nass et al., 1984; Wise, 1984). Die Steroide wiederum regulieren die Freisetzung (Jarry et al., 1992; Fleischmann et al., 1992) und Wiederaufnahme von GABA (Luine et al., 1999; Etchegoyen & Del Zotto, 1996) sowie auch die Expression von GAD (Kornbach & Grattan, 2001; Majdoubi et al., 2000; Herbison et al., 1998) erheblich.

5.1.1 Methodische Aspekte der RNA-Quantifizierung

Für das Verständnis der spezifischen Regulation der GABA-Synthese unter dem Einfluss von Steroiden ist es notwendig, die RNA-Spiegel von GAD₆₅ und GAD₆₇, beides Isoformen Glutamat Decarboxylase, in definierten des Enzyms Zellpopulationen des Gehirns zu messen. Im Hinblick auf die Sensibilität hat sich die Methode der in situ Hybridisierung als beste Methode zum Nachweis und zur Lokalisierung zellulärer Gentranskripte in Geweben erwiesen (Park et al., 1990; Shivers et al., 1986). Andere quantitative Methoden wie Northern Blot und der Ribonuklease-Protektion-Assay sind nicht sensitiv genug für den Nachweis der geringen mRNA-Mengen eines Genes, die etwa aus hypothalamischen Geweben eines Gehirns isoliert werden. Um einen Messwert zu erhalten, müssen mehrere RNA-Proben mehrer Tiere einer Behandlungsgruppe zusammen analysiert werden (Lee et al., 1990), so dass Aussagen zu Veränderungen in individuellen Tieren nicht möglich sind. Andere quantitativen Methoden wie quantitativer reversen Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und wie die quantitativen Real-Time RT-PCR, sind extrem sensitiv, erlauben jedoch eine Aussage über die Veränderung der Genexpression in einem Hirnareal, nicht aber auf zellulärer Ebene.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden Methoden, *in situ* Hybridisierung und RT-PCR, für zwei spezifische Fragestellungen des GABA-ergen Systems verwendet. Beide Techniken haben sich, wie nun folgt diskutiert als geeignet zu der gestellten Fragen erwiesen.

5.1.2 Die Verteilung von GAD₆₅ und GAD₆₇ im GnRH-Netzwerk

In fast allen GABA-ergen Neuronen des Ratengehirns werden die beiden Isoformen der GAD expremiert. Die preoptische Region (POA) ist die wichtigste Region im GnRH-Netzwerk. Die Perikarya der GnRH-Neurone sind in der POA lokalisiert. Zu diesen Neuronen bestehen direkte synaptische Verbindungen mit GABA-ergen Neuronen (Léránth et al., 1988). Durch Doppelmarkierung mit in situ Hybridisierung wurde gezeigt, dass die GnRH-Neurone in der POA GABA-Rezeptoren besitzen (Peterson et al., 1993). Die POA ist an verschiedenen Regulationen von zahlreichen autonomen und neuroendokrinen Funktionen beteiligt. Ebenso wichtig ist der Nukleus suprachiasmaticus (SCN). Der SCN ist der zirkadianisch Haupttaktgeber bei den Mammalien. In jungen Ratten werden in dem SCN täglich neurochemische Signale erzeugt, die sich auf die GnRH-Neuronen richten und den richtigen Zeitpunkt des preovulatorischen LH-Surges hervorrufen (Van der Beek et al., 1997; Harney et al., 1996). Im SCN ist GABA der überwiegende Neurotransmitter (Moore und Speh, 1993). Von den beiden Isoformen der GAD in der POA und im SCN wurden bei der in situ Hybridisierung stärkere Signale für GAD₆₅ als für GAD₆₇ gemessen (Feldblum et al., 1993; Escalpez et al., 1993; Escalpez et al., 1994).

Im Gegensatz zu der POA und SCN ist die Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ im mediobasalen Hypothalamus (MBH) der Ratte gleich (Feldblum *et al.*, 1993). Die Axone der GnRH-Neurone liegen im posterioren mediobasalen Hypothalamus (PMBH), in der Eminentia mediana. Dort interagiert die GABA präsynaptisch mit den GnRH-Terminalen. Diese Interaktion wurde in jüngster Zeit durch molekularbiologische Studie eindeutig belegt (Bilger et al., 2001).

Im Hippocampus konnte durch doppelt-*in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass in Sektoren der CA1 und CA3 stärkere Signale für GAD₆₇ als für GAD₆₅ gemessen werden (Stone *et al.*, 1999; Houser und Esclapez, 1994). Im Gyrus dentatus ist GAD₆₇ ebenfalls der dominante Subtyp der GAD (Feldblum *et al.*, 1993). Die hippocampale Formation gehört zum limibischen System. In ihr werden Lernen, Sexualverhalten und Stresseinflüsse verarbeitet. Interessanterweise expremiert der Hippocampus reichlich GnRH-Rezeptoren (Jennes und Conn, 1994) und enthält ebenso neuronale Verbindungen zu den subcorticalen GABA-ergen Netzwerken bis hin zu der medialen preoptischen Region (Herman *et al.*, 1995; Cullinan *et al.*, 1993). Dies deutet darauf hin, dass die hippocampale Formation am GnRH-Netzwerk beteiligt sein könnte.

5.1.3 Die männliche Ratte als Tiermodell

Um das Expressionsmuster von GAD_{65} und GAD_{67} unter Einfluss von gonadalen Steroiden in der POA, im SCN, im MBH und im Hippocampus zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das männliche Rattenmodell gewählt, das gegenüber der weiblichen Ratte eines konstanten endokrinen Zustand durch Ausschluss von Einflüssen des Östrus-Zyklus bietet.

In mehreren Studien wurde berichtet, dass endogene Veränderungen der ovariellen Steroid-Sekretion während des Östrus-Zyklus die Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ beeinflussen. Herbison *et al.* (1992) konnte eine 40%ige Reduktion der GAD₆₇ mRNA in der MPOA während des Proöstrus (15:00 h) beobachten. Ähnliche Abnahme der GAD₆₇ mRNA wurden im *diagonalen Band* von Broca des Organum Vasculosums der Lamina terminalis (DBB(ovlt) gemessen (Grattan *et al.*, 1996). Diese Beobachtungen wurden durch Verminderungen der GABA-ergen Aktivität in der MPOA während des Estrogen-induzierten GnRH-Peaks in ovariektomierten Ratten (Leonhardt *et al.*, 2000; Seltzer und Donoso, 1992; Jarry *et al.*, 1992; Jarry *et al.*, 1988; Demling *et al.*, 1985) und anderen Spezies (Wagner *et al.*, 2001) bestätigt.

5.1.4 Effekte von Testosteron im Vergleich zu Estradiol und Gonadektomie auf die GABA-Expression innerhalb des GnRH-Netzwerks

Um die Einflüsse der einzelnen Steroide auf die GABA-erge Aktivität studieren zu können, mussten zunächst die steroidalen Rückkopplungsmechanismen ausgeschaltet werden. Dies ist allerdings nur in Studien mit gonadektomierten Individuen möglich. Für die Wirkung von Estradiol bzw. von Testosteron wurden gonadektomierte Tiere mit Estradiol (3,5 μ g/Tier) oder Testosteron (3,5 mg/Tier) behandelt.

In männlichen Säugern wird der Hauptanteil des eigenen Estradiols aus Testosteron transformiert. Dies geschieht durch eine Umwandlung der androgenischen Struktur von Testosteron durch *Aromatase* in einer aromatischen Ringkonfiguration von Estrogenen. Solche Aromatesierungsprozesse finden in Zielorganen statt. Im Gehirn von Nagetieren ist *Aromatase* relativ weit verbreitet insbesondere in Regionen, die an der Kontrolle von reproduktiven Funktionen beteiligt sind, (Lauber und Lichtensteiger, 1994; Tsuruo *et al.*, 1994). In dieser Gehirnregion, beispielsweise der Hypothalamus, sind zahlreiche GABA-erge Neurone vorhanden (Decavel & van den Pol, 1990; Mugnaini & Oertel, 1985), die im Gegensatz zu den GnRH-Neuronen estrogenrezeptiv sind (Flügge *et al.*, 1986; Herbison *et al.*, 1993). Um die durch die Orchidektomie ausgefallene Menge an Testosteron bzw. Estradiol zu ersetzen, wurden die gonadektomierten Tiere mit Estradiol behandelt.

Der endokrine Zustand durch die der Zielgruppen wurde zunächst Radioimmunoassays (RIA) untersucht. Da bei den männlichen Ratten nur eine negative Rückkopplungsaktion von Testosteron existiert, liegt die LH-Konzentration in den intakten Tieren ungefähr bei 0,5 ng/ml (Maeda et al., 2000). Daher blieb die LH-Konzentration bei der Testosteronapplikation auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Diese Unterdrückung der LH-Konzentration durch Testosteron nach der Gonadektomie wurde auch bei anderen Studien beobachtet (Park et al., 1996; Grattan und Selmanoff, 1994; Hutchison und Goldman, 1975). Die Gonadektomie hob die negative Rückkopplung von Testosteron auf und zeigte eine signifikante LH-Spiegelerhöhung im Vergleich zu der intakten Kontrollgruppe (Abb. 7). Die gonadektomierten und mit Estradiol behandelten Tieren wiesen erhöhte LH-Serum-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, jedoch war eine signifikante Absenkung im Vergleich zu den gonadektomierten Tieren messbar. Diese geringe

LH-Konzentrationsabnahme (estradiol-behandelte gegenüber gonadektomierten Tieren) bestätigte die Ergebnisse von Gharib *et al.* (1986).

Die Gonadektomie konnte keine Veränderung an der Prolaktin-Serum-Konzentration hervorrufen (Abb. 8). Ein erhöhter Prolaktin-Spiegel wurde durch die Administration von Estradiol oder Testosteron nach der Gonadektomie bei den männlichen Ratten gemessen. Bei der GDX+ E_2 -Gruppe stieg der Prolaktin-Spiegel auf 42.19 ng/ml und bei der GDX+T-Gruppe sogar auf 75.6 ng/ml. Diese Daten der Prolaktin-Konzentration der untersuchten Gruppen stimmten mit denen aus der Literatur bekannten werten überein (Shimokawa *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1986; Shin, 1979). Es wurde bereits beschrieben, dass die erhöhten Prolaktin-Messungen als Indikator für eventuellen Stress bei den Tieren fungieren (Caligaris und Taleisnik, 1983; Terry *et al.*, 1977). Da alle Gruppen bei der Dekapitation gleich behandelt wurden, schien der Stressfaktor in diesem Fall ausschliessbar zu sein.

Die Administration von Estradiol bei den gonadektomierten Ratten hatte keine Auswirkung auf die Konzentration von Testosteron. Diese Ergebnisse bestätigte die Studie von Rahimy *et al.* (1991).

Nachdem der endokrine Zustand des hier vorgestellten männlichen Rattenmodells untersucht war, wurde die GABA-erge Aktivität anhand der Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ mit der Methode der *in situ* Hybridisierung in den spezifischen Regionen des GnRH-Netzwerks, POA, SCN, MBH und Hippocampus, gemessen.

In der POA konnte durch die Kastration und die anschließende dreiwöchige Erholungszeit kein Effekt gemessen werden (Abb. 9). Die mRNA Mengen der beiden GAD Isoformen blieben bei der GDX-Gruppe auf dem Niveau der intakten Tiere. Die Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ erreichte in dieser Region durch die Administration von Estradiol eine signifikante Erhöhung um nahezu 40%. Im Gegensatz dazu wurde durch die Testosteronbehandlung eine Absenkung der GAD₆₇-Expression um ungefähr 30% gemessen. Dieser signifikante Effekt konnte bei GAD₆₅ nicht beobachtet werden.

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen kann auf einen eignen Testosteron-Effekt geschlossen werden. Dies wird deutlich durch die verschiedenen Regulationsmuster von GAD durch die parallele Behandlung mit Testosteron und Estradiol.

Grattan und Selmanoff (1994; 1993) konnten bei gonadektomierten Ratten eine Reduktion bis zu 50% der GABA-Freisetzungsrate in der POA beobachten. Die Zugabe von Testosteron (entweder durch episodische Administrationen oder durch subcutane Implantate) verhinderte die durch die Kastration induzierte Abnahme der GABA-Freisetzungsrate, so dass die Freisetzungsraten der mit Testosteron behandelten Tieren auf dem Niveau der Kontrollgruppen blieben (Gratten und Selmanoff, 1994).

In den Laboratorien von Wuttke konnten die ersten Hinweise auf eine erhöhte extrazellulare GABA-Konzentration durch Estradiol in der POA der weiblichen Ratte geliefert werden (Demling et al., 1985; Mansky et al., 1982; Ondo et al., 1982). Während des preovulatorischen LH-Surges, der von einem Estradiol-Surge begleitet wird, konnten Leonhardt et al. (2000) eine signifikante Zunahme der mRNA-Konzentration von GAD₆₇ jedoch nicht von GAD₆₅ in der POA beobachten Im männlichen Tiermodell konnte nach zweitägiger Erholungszeit nach der Kastration kein dem weiblichen Modell vergleichbarer Effekt beobachtet werden. Eine extrazelluläre GABA-Konzentrationserhöhung konnte jedoch durch die Zugabe von Testosteron erreichtet werden (Grattan und Selmanoff, 1994). Trotz der durch Estradiol erzeugten Zunahme der GABA-Turnover-Rate konnte in früheren Studien kein signifikanter Anstieg der GAD Expression in der POA beobachtet werden (Herbison et al., 1992; Leigh et al., 1990; Fleichmann et al., 1990). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten McCarthy et al. (1995) in der magnozellulären preoptischen Region eine signifikant erhöhte Expression von GAD₆₅, jedoch eine Expressionsabnahme von GAD₆₇ messen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die verschiedenen Erholungszeiten nach der Kastration erklärt werden. In der hier vorgestellten Studie zeigt die mRNA Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ bei den mit Estradiol behandelten Tieren eine Übereinstimmung mit der beschriebenen erhöhten extrazellulären GABA-Konzentration nach Estradiol-Behandlung sowie auch mit der hier gemessenen erniedrigten LH-Konzentration der GDX-E₂-Gruppe (im Vergleich zur GDX-Gruppe).

Im SCN wies die Gonadektomie weder einen Effekt auf die Expression von GAD_{65} noch auf GAD_{67} auf (Abb. 10). Ebenso blieb die mRNA-Konzentration der beiden Isoformen des GADs bei den mit Estradiol behandelten Tieren unverändert. Die Behandlung mit Testosteron bewirkte dagegen eine signifikante Abnahme der mRNA-Konzentration von GAD_{67} um 15% jedoch nicht von GAD_{65} .

Mit diesen Ergebnissen konnte zum ersten Mal ein Einfluss von gonadalen Steroiden

auf das GABA-erge System im SCN gezeigt werden. In der Literatur wurde bislang mehr der Tag-Nacht-Auswirkung auf die Expression von GAD Beachtung geschenkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mRNAs von GAD₆₅ und GAD₆₇ im SCN rhythmisch variieren und dass die mRNA Konzentrationen der beiden Isoformen während des Licht-Dunkel-Zyklus unterschiedlich im SCN reguliert werden (Huhman *et al.*, 1996). Es wurde vermutet, dass diese Regulation auf den Aktivitäten der retinalen Afferenzen beruht (Huhman *et al.*, 1999).

Die mit Testosteron-behandelten Tiere weisen eine sehr niedrige LH-Konzentration auf (0,26 ng/ml). Dies deutet auf eine erhöhte GABA-turnover-Rate hin, die die LH-Freisetzung inhibiert. Trotz dieser Tatsache wurde eine signifikante Absenkung von GAD₆₇ sowohl in der POA als auch im SCN beobachtet. Diese widersprüchliche Beobachtung könnte mit der Tatsache begründet werden, dass GAD andere physiologische Funktionen zusätzlich zur GABA-Produktion besitzt. Es wurde durch verschiedene Studien gezeigt, dass eine funktionale Rolle von GAD, besonders der Isoform GAD₆₇, in nicht-GABA-ergen Neuronen und sogar in nicht-neuronalen Geweben vorhanden ist (Asada *et al*; 1997; Liu *et al.*, 1996; Mally *et al.*, 1996; Pleau *et al.*, 1996). Diese Rolle bleibt jedoch ungeklärt und kann aus den vorgestellten Untersuchungen nicht abgeleitet werden.

Im mediobasalen Hypothalamus (MBH) wurde kein Effekt durch der Gonadektomie auf die Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ beobachtet (Abb. 11). Ebenso wenig wurde eine Veränderung durch die Zugabe von Estradiol gemessen. Bei den Tieren, die mit Testosteron nach der Orchidektomie behandelt wurden, sank die mRNA-Konzentration von GAD₆₅, jedoch nicht von GAD₆₇, um 21% ab.

Ähnliche Ergebnisse wurden im Gyrus dentatus gemessen. Die Verteilung der GABA-ergen Neuronen sowie der beiden Isoformen des GAD, GAD₆₅ und GAD₆₇, wurde im Hippocampus der Ratte durch zahlreiche Studien in der Literatur beschrieben. Jedoch blieb die Regulation dieser Neuronen durch die gonadalen Steroide unerforscht. Die Resultate dieser Arbeit liefern aber erste Hinweise auf die Einflüsse von Estrogen und Testosteron auf das GABA-erge System im Hippocampus, insbesondere im Gyrus dentatus. Testosteron bewirkte im Gyrus dentatus eine Reduktion der Genexpression von GAD₆₅ (16%) nicht aber von GAD₆₇ (Abb. 12). Bei den gonadektomierten sowie den gonadektomierten mit Estradiol behandelten Tieren blieben die mRNA-Konzentrationen der beiden Gene, GAD₆₅ und GAD₆₇, auf den Niveau der Kontrollgruppe. Da gegenläufig zu Estradiol eine durch Testosteron verursachte Abnahme von GAD₆₅-mRNA gemessen wurde, kann aus diesen hier vorgelegten Ergebnissen abgeleitet werden, dass Testosteron über einen eigenen Effekt auf die GABA-erge Aktivität verfügt.

Trotz der Tatsache, dass GAD₆₅ und GAD₆₇ im MBH gleich verteilt sind und GAD₆₇ im Gyrus dentatus die dominante Isoform des GAD ist, legen die hier vorgestellten Ergebnisse nahe, dass die negative Wirkung des Testosterons im MBH und im Gyrus dentatus auf GAD₆₅ auf eine andere Aktivität zusätzlich zur GABA-Produktion und die Kontrolle der Sekretion von LH deutet. Diese mögliche Erklärung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die LH-Freisetzung in den mit Testosteron-behandelten Tieren sehr niedrig ist und so die GABA-Freisetzungsrate sehr hoch sein sollen.

Die Rückkopplung des Estradiols bewirkte in der POA eine Zunahme der mRNA-Konzentration sowohl von GAD₆₅ als auch von GAD₆₇. Dies wird mit einer Abnahme der LH-Konzentration im Serum dieser Tiergruppe begleitet. In den anderen Regionen wurde keine Veränderung gemessen. Diese Ergebnisse bestätigen folgende Hypothese: Da nur in der POA der LH-Peak mit Änderungen in den GABA-ergen Aktivitäten verbunden ist, agieren die inhibitorischen Aktivitäten von GABA zur Übermittlung der positiven Rückkopplung von Estradiol auf die LH-Freisetzung auf der Ebene der GnRH Perikarya und/oder Dentriten und nicht auf der Ebene der Axone (Leonhardt *et al.*, 2000; Jarry *et al.*, 1995).

In diesem ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde durch die sensitive *in situ* Hybridisierungsmethode im männlichen Tiermodell deutlich gezeigt, dass die gonadalen Steroide die Expression von GAD und so wiederum die inhibitorische Funktion von GABA regulieren. Dabei ist deutlicher geworden, dass Testosteron und Estradiol in unterschiedlicher Weise die GABA-ergen Aktivitäten beeinflussen. Durch die parallele Behandlung der gonadektomierten Ratten mit Testosteron oder Estradiol konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine eigne androgene Regulation von GAD vorhanden ist. Diese Regulation wird entweder durch Androgen-Rezeptoren in GABA-ergen Neuronen oder in anderen Androgen-rezeptiven Neuronen, die auf die GABA-erge Neurone projezieren, vermittelt. Im letzten Fall entsteht somit ein indirekter Testosteron-Effekt.

5.2 Die Alterungsprozesse der weiblichen reproduktiven System der Ratte

Der Östrus-Zyklus wird bei der weiblichen Ratte als Charakteristikum der reproduktiven Phase betrachtet. Die Voraussetzung für die Ovulation ist die plötzliche Erhöhung des LH-Spiegels. Die LH-Konzentrationszunahme wird in den Ratten in der ovulatorischen Periode durch die positive Rückkopplung von Estradiol verursacht. Das hypothalamische GnRH-Netzwerk reguliert diesen estradiolinduzierten Peak.

Die Fähigkeit von Estradiol, einen LH-Peak auszulösen, nimmt während der Alterung, insbesondere in der Übergangsphase zwischen dem irregulären Zustand und der anovulatorischen Periode ab (Wise, 1984; Van Look *et al.*, 1977). Dies hat zur Folge, dass sowohl bei Frauen als auch bei weiblichen Ratten in der anovulatorischen Periode eine erhöhte Estradiolkonzentration <u>keinen</u> LH-Anstieg durch eine positive Rückkopplung von Estradiol mehr verursacht.

Durch Untersuchungen der Funktionalität des GnRH-Pulsgenerators während des Alterns prägte Phyllis Wise die These: Die altersabhängigen Veränderungen in der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse, die zum Verlust der reproduktiven Funktion führen, können durch neurochemische und neuroendokrine Signalveränderungen im Hypothalamus, insbesondere im GnRH-Netzwerk, hervorgerufen werden (Wise, 1999; Wise et al., 1997).

5.2.1 Entwicklung eines Tiermodells zur Untersuchung der Alterungsprozesse der weiblichen reproduktiven System der Ratte

Im Gegensatz zu Estradiol kann eine Progesteronbehandlung bei persistent östrischen Ratten einen LH-Peak auslösen (Everett und Tyrey, 1982) und somit den Östrus-Zyklus wieder in Gang bringen (Huang et al., 1976; Quadri et al., 1973; Clemens et al., 1969). Mit einer solchen Behandlung können die Tiere in der vorliegenden Studie in der Transitionsphase versetzt werden.

Die 97 persistent östrischen Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die um 13 Uhr und die um 17 Uhr getöteten Tieren. Diese zwei Gruppen wurden wiederum in mit Progesteron und in ohne Progesteron behandelte Gruppe unterteilt. Als Vergleich zu diesen Gruppen dienten 34 junge Ratten, von denen ein Teil um 13 Uhr und der andere Teil um 17 Uhr getötet wurden. Zusätzlich wurde eine Gruppe aus 18 persistent östrischen Tieren, die um 10 Uhr getötet wurden, als Kontrollgruppe vorgesehen.

Der LH-Spiegel der Tiere aller Gruppen wurde durch Radioimmunoassay ermittelt. Um die Reaktion der Tiere auf Progesteron zu ermitteln, wurde ein Grenzwert von 5 ng/ml LH im Serum festgelegt.

In der ovulatorischen Periode zeigen die Ratten während des Östrus, Diöstrus-1 und Diöstrus-2 einen LH-Wert von unter 2 ng/ml. Erst ab 14 Uhr am Proöstrus-Tag steigt die LH-Konzentration rapid bis zu 35 ng/ml an (Maeda *et al.*, 2000). Daher ist der hier gewählte LH-Grenzwert von 5 ng/ml als Indikator der positiven Reaktionen der Tiere auf Progesteron (responding animals) sehr realistisch. Dieser Grenzwert wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Wise gewählt (Tsai *et al.*, 1999).

Wie erwartet zeigten die Kontrolltiere einen sehr niedrigen LH-Wert (Abb. 13). Ebenso niedrig blieb die LH-Konzentration bei den um 13 Uhr getöteten Tieren. Bei diesen Gruppen bewirkte die Progesteronbehandlung keinen Effekt. Die um 17 Uhr getöteten, nicht behandelten Tiere (MA 17:00 –P/L-) zeigten, wie erwartet, auch eine niedrigere LH-Konzentration. Von den 36 mit Progesteron behandelten Tieren wiesen 16 Tiere einen LH-Wert von über 5 ng/ml (15,32 ng/ml \pm 2,32) auf. Diese responding animals wurden in einer Gruppe zusammengefasst (MA 17 +P > 5). Die restlichen nonresponding animals zeigten einen niedrigere LH-Spiegel (0,5 ng/ml) und bildeten eine weitere Gruppe (MA 17 +P/LH < 5). Somit konnte anhand der gemessenen LH-Werte bei 44% der Tiere durch die Progesteronbehandlung der Östrus-Zyklus wieder hergestellt werden.

Als weiterer Vergleich wurden alle 36 mit Progesteron behandelten Ratten, unabhängig vom 5 ng/ml LH-Grenzwert in einer Gruppe zusammengefügt (MA 17:00 +P). Bei dieser Gruppe wurde ein signifikant hoher LH-Mittelwert von 7,1 ng/ml gemessen, der jedoch erwartungsgemäß niedriger als bei den responding animals blieb. Diese Gruppe dient hier als Kontrolle für die Wirkung von Progesteron.

Bei den jungen östrischen Tieren, die gegen 13 Uhr getötet wurden (Y 13:00), blieb der LH-Spiegel auf dem Niveau der Kontrolltiere. Wie erwartet, stieg die LH-Konzentration im Serum der jungen östrischen, um 17 Uhr getöteten Ratten (Y 17:00), auf 22,84 ng/ml an.

Anhand der vorliegenden LH-Werte im Serum der Tiere dieses Modells kann eine Analogie zwischen den Gruppen festgestellt werden. Da Progesteron keinen Effekt bei der MA 13:00 Gruppe bewirkte, zeigt die Gruppe der um 13 getöteten und mit Progesteron behandelten Tieren eine Analogie mit denen der Y 13:00 Gruppe. Eine weitere Übereinstimmung konnte zwischen den responding animals und den jungen östrischen Tieren, die um 17 Uhr getötet wurden (Y 17:00), festgestellt werden.

Diese Gruppenanalogien wurden durch die Messungen der FSH- und Prolaktin-Konzentrationen bestätigt (Abb. 14 und Abb. 15). Bei den Tieren, die um 13 Uhr getötet wurden (MA 13:00 –P, MA 13:00 +P und Y 13:00), blieben wie erwartet sowohl FSH- als auch Prolaktin-Werte auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Bei den responding animals wurde ein erhöhter FSH- und Prolaktin-Spiegel gemessen, welcher zu der Y 17:00-Gruppe eine Analogie bildete.

Mit Hilfe der gemessenen LH-Werte konnte in der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell mit sehr zufriedenstellender Ausbeute zur Wiederherstellung des Östrus-Zyklus (44%) vorgestellt werden. Daher hat sich das hier vorgelegte Tiermodell als geeignet erwiesen, die physiologischen und molekularbiologischen Prozesse des reproduktiven Alters zu studieren.

5.2.2 Methodische Aspekte der RNA-Quantifizierung durch die RT-PCR

Trotz der Tatsache, dass neurochemische und neuroendokrine Signalveränderungen im Hypothalamus, insbesondere im GnRH-Netzwerk, zum Ende der reproduktiven Phase führen können, ist es sinnvoll, molekular biologische Untersuchungen entlang der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse durchzuführen.

Wie bereits unter 5.1 erläutert, kann bei der Methode der *in situ* Hybridisierung wegen ihrer Aufwendigkeit (Kim *et al.*, 1989) nur eine begrenzte Anzahl von Proben untersucht werden. Es kann daher bei dem hier vorgestellten Tiermodell mit einer derartig hohen Anzahl von Tieren (149 Ratten), nicht auf die *in situ* Hybridisierung zurückgegriffen werden.

Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren mehrere Einsatzmöglichkeiten von quantitativen, auf der Polymerase-Kettenrektion basierender Methoden, beschrieben. Die reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (Zimmermann & Mannhalter, 1996; Piatek *et al.*, 1993; Scadden *et al.*, 1992; Wang

et al., 1989;) und die quantitative Real-Time RT-PCR (Desjardin *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996) haben sich von der Handhabung, Aufwendigkeit und vor allem Quantifizierung her als erfolgreich erwiesen.

Ausgehend von diesen methodologischen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die Real-Time Taqman® Polymerase-Kettenreaktion (Taqman®-PCR) und die quantitative RT-PCR eingesetzt, um eine aussagekräftige Statistik auf der Ebene der Molekularebiologie zu Veränderungen in individuellen Tieren zu erhalten.

Dank der reversen Transkription und der anschließenden Polymerase-Kettenreaktion können bei PCR Methoden geringe Mengen an RNA amplifiziert und nachgewiesen werden. Bei der Methode der kompetitiven RT-PCR können durch die Zugabe einer exogenen Sequenz (Standard), die zu jeder Probe in einer cRNA-Form zugegeben wird, Artefakt-Probleme vermieden werden. Die Konzentration des eingesetzten Standards wird im voraus bestimmt. Da sowohl der Standard als auch die Ziel-RNA im gleichen Reaktionsansatz amplifiziert werden, ist es möglich, die absolute Menge der untersuchten RNA ebenso wie die relativen Veränderungen in Versuchsgruppen zu messen. Die kompetitive RT-PCR wurde für die Genregulation von ER α , ER β , GnRH-R und FSH β angewandt.

Der Vorteil der Real-Time Taqman[®] PCR (Applied Biosystems GmbH) besteht darin, PCR-Produkte zu amplifizieren und gleichzeitig die amplifizierte Menge an DNA quantitativ nachzuweisen (Lee *et al.*, 1993). Dabei hybridisiert während der PCR eine fluorogene Sonde mit den Primern zusammen am Matrizenstrang. Nur hybridisierte Sonden lassen sich hydrolysieren. Diese Hydrolyse der Sonde führt zur Abspaltung eines an diese Sonde gekoppelten fluoreszierenden Farbstoffs, der durch einen Detektor gemessen werden kann. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts nimmt die Fluoreszenz also mit jedem PCR-Zyklus zu. Bekannte Mengen von Ziel-cDNA werden bei der Taqman[®] PCR in einer Standardkurve amplifiziert und dienen dadurch als Referenz. Ein weiterer Vorteil der Taqman[®] PCR besteht darin, dass bei dieser Methode keine post-PCR Auswertung per Gel-Elektrophorese nötig ist. Die Taqman[®] PCR diente der Bestimmung der Genregulation von GAD₆₅, GAD₆₇ und GnRH.

5.2.3 Die Verteilung der untersuchten Gene in der hypothalamo-hypophysioovariellen Achse

Da die Perikarya der GnRH-Neurone in der POA lokalisiert sind (Silverman *et al.*, 1987; Merchenthaler *et al.*, 1989), zählt die POA zu den wichtigsten Regionen des GnRH-Netzwerks. In diesem Teil des limbischen Systems entstehen direkte synaptische Verbindungen mit den GABA-ergen Neuronen (Léránth *et al.*, 1988). An diesen Verbindungen übt der Neurotransmitter GABA seine wichtigsten Aufgaben im GnRH-Netzwerk aus: Die inhibitorische Wirkung sowie die "Vermittlung" für die negative/positive Rückkopplung des Estradiols.

In der POA sind beide Isoformen des GABA-synthetisierenden Enzyms GAD_{65} und GAD_{67} vorhanden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass dort mehr GAD_{65} als GAD_{67} exprimiert werden (Feldblum *et al.*, 1993; Escalpez *et al.*, 1993; Escalpez *et al.*, 1994). Beide Etrogen-Rezeptoren α und β (ER α und ER β) sind in der POA (Laflamme *et al.*, 1998; Shughrue *et al.*, 1997a). In der POA konnte in den Laboratorien, in denen die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, ferner erfolgreich die Genexpression des GnRH (Kim *et al.*, 1993) und dessen Rezeptor (GnRH-R) (Leonhardt *et al.*, 1999) durch die Methode der kompetitive RT-PCR beobachtet werden.

Im posterioren Teil des mediobasalen Hypothalamus (MBH), in der Eminentia mediana, liegen die Axone der GnRH-Neurone. Dort interagiert GABA präsynaptisch mit den GnRH-Terminalen (Bilger *et al.*, 2001). Die beiden Isoformen GAD₆₅ und GAD₆₇ werden im MBH im gleichen Maß exprimiert (Feldblum *et al.*, 1993). Für ER α und ER β wurden im MBH gleiche Hybridisierungssignale gemessen (Shughrue *et al.*, 1997a). Auch im MBH ist die Expression von GnRH-R vorhanden (Seong *et al.*, 1995).

Durch die portalen Blutgefäße des Hypophysenstiels gelangt das Neurohormon GnRH in die Hypophyse. Dort stimuliert es sowohl die LH- als auch die FSH-Sekretion. Während der negativen Rückkopplung von Estradiol wird das Sensibilitätsniveau des GnRH-Rezeptors in den LH- und FSH-produzierenden Zellen, den sogenannten gonadotrophen Zellen, reduziert, so dass die Wirkung von GnRH niedrig gehalten wird. Somit bleibt die Sekretion von LH und FSH niedrig. Bei der positiven Rückkopplung wird dieser Einfluss aufgehoben. ER α ist der dominante Rezeptor des Estrogens in der Hypophyse (Mitchner *et al.*, 1998; Kuiper *et al.*, 1997) In der Hypophyse konnte eindeutig ein Expressionsmuster des GnRH Rezeptors beobachtet werden (Kakar *et al.*, 1994). Die Genexpression der β Untereinheit von LH als auch von FSH wurden schon früh untersucht (Childs *et al.*, 1987; Maurer, 1987). In der vorliegenden Arbeit konnte aus technischen Gründen die Detektion des LH- β -Gens leider nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Im Ovar induziert FSH die Reifung einer Kohorte von Follikeln, aus denen sich im Menschen in der Regel nur ein sogenannte *Graaf-Follikel* entwickelt (Jaffe *et al.*, 1993). Die heranreifenden Follikel produzieren Estrogene, insbesondere Estradiol. Die Rückkopplung des Estradiols wirkt neben dem Hypothalamus und der Hypophyse auch autokrin auf das Ovar (Enmark *et al.*, 1997). Der dominante Rezeptor des Estradiols im Ovar der Ratte ist ER β (Byers *et al.*, 1997). Es mehren sich die Hinweise, dass GnRH auch im Ovar von Säugern exprimiert wird (Clayton *et al.*, 1992; Oikawa, 1991; Oikawa *et al.*, 1990; Sakakibara, 1989), ebenso dessen Rezeptor GnRH-R (Kogo *et al.*, 1999).

5.2.4 Die altersabhängige Veränderungen der der Expression der untersuchten Gene entlang der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse

Nachdem anhand des endokrinen Zustands der Tiere des hier vorliegenden Tiermodells Untergruppen und Analogien gebildet wurden, wurden mit der Methode der kompetitiven RT-PCR und der Taqman® PCR die altersabhängigen Veränderungen der Expression der untersuchten Gene entlang der hypothalamohypophysio-ovariellen Achse studiert.

In der POA zeigten die GAD_{65} und GAD_{67} Gene in allen Gruppen des Modells keine relevanten Veränderungen in ihrem Expressionsmuster. Im Vergleich zwischen jungen und alten Ratten konnten Herman und Larson (2001) eine erhöhte GAD_{65} mRNA-Expression in dieser Region bei den älteren Ratten bestimmen. Ebenso beobachteten Jarry *et al.* (1999) bei älteren Ratten erhöhte GABA-erge Aktivitäten in der POA. Das Fehlen des Estradiol oder Progesteron induzierten LH-Peaks bei den Tieren der beiden Studien aus der Literatur kann als mögliche Erklärung der Differenz zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen dienen. Eine erhöhte mRNA-Konzentration von GAD_{67} in der POA wurde jedoch während des preovulatorischen LH-Surges (Leonhard *et al.*, 2000) beobachtet. Die Ursache hierfür konnte noch Die gemessene mRNA von GnRH und dessen Rezeptor in den untersuchten Gruppen blieben auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Dass die Alterung keinen direkten Einfluss auf die GnRH mRNA-Expression bewirkt, bestätigten auch Gore et al. (2002). Ebenso wurde in der Literatur beschrieben, dass die GnRH-mRNA-Mengen während des Estradiol oder Progesteron induzierten LH-Peaks konstant geblieben waren (Finn et al., 1998; Gore and Roberts, 1995; Park et al., 1990). Anhand der Messung der Expression von c-fos- und Jun-mRNA in den GnRH-Neuronen konnten altersabhängige Veränderungen bei den Expressionsaktivitäten der GnRH-Neuronen festgestellt werden (Lloyd et al., 1994; Rubin et al., 1994). Da jedoch keine direkte Veränderung in der GnRH-Expression während des Alters vorhanden ist, ist zu vermuten, dass die Veränderungen in diesen Neuronen, die die Sekretion von LH aus der Hypophyse beeinflussen, nicht auf der Ebene der Transkription von GnRH sondern auf der Proteinebene oder auf der Ebene der synaptischen Verbindungen stattfinden. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die GnRH-Neuronen eine große Zahl an GnRH-mRNA-Kopien und ein hohes Niveau von GnRH primären Transkripte behalten (Maurer und Wray, 1999; Yeo et al., 1996; Jakubowski et al., 1994). Die Rolle des GnRH Rezeptors während des Alters ist in der Literatur noch nicht ausreichend untersucht.

Bei der Genexpression von ER β wurde eine Reduktion um 34 % sowohl in der Gruppe responding animals als auch in deren analogen Gruppe, der junge Ratten der 17 Uhr-Gruppe, beobachtet (Abb. 22). Im Gegensatz dazu zeigte die ER α -mRNA keine signifikanten Veränderungen in den untersuchten Gruppen. Dass ER α keine Veränderungen während des Alters in der POA aufweist, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Funabashi *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1994). Aus diesen Ergebnissen, ist zu entnehmen, dass ER β der verantwortliche Rezeptor zur Vermittlung des Estrogen-Effekts während des Progesteron induzierten LH-Peaks in der POA ist. In der Literatur mehren sich Hinweise, die diese These unterstützen (Orikasa *et al.*, 2002; Kallo *et al.*, 2001). Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass mehr ER β als ER α in der POA vorhanden ist und dass die Expressionen von ER α und ER β während des Alterns unterschiedlich moduliert werden und von der Region abhängig sind (Wilson *et al.*, 2002). Da die Verminderung der Expression von ER β im Vergleich zu den nicht mit Progesteron injizierten Tieren in gleichem Maße sowohl bei den responding animals als auch bei deren analogen jungen Ratten auftrat, ist zu vermuten, dass dieser Gen altersabhängig expremiert und an der Zyklusregulation ursächlich beteiligt sein kann. Diese altersabhängige Modulation von ER β wurde nicht im MBH beobachtet. Dies bekräftigt die Vermutung, dass die POA die wichtigste Region des GnRH-Netzwerks ist.

Im MBH zeigten die Transkripte der beiden Isoformen GAD₆₅ und GAD₆₇ nur in der Y 17 Uhr-Gruppe eine signifikante Absenkung um 15 % (Abb. 23 und Abb. 24). Während des reovulatorischen LH-Surges konnte die Gruppe um Jarry (Leonhardt *et al.*, 2000) keine Veränderung der Expression von GAD im MBH beobachten. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz ist die Nutzung der Methode der Taqman PCR in dieser vorlegenden Arbeit. Die Taqman PCR ist eine sensibler mit weniger Variationen Methode als die competative RT-PCR, wie bei Leonhard *et al.* (2000), daher wurde diese marginale Veränderungen erkennbar gemacht.

Eine 30 %ige Abnahme der mRNA-Konzentration von GnRH-R (Abb. 25) wurde bei der Y 13:00-Gruppe festgestellt. Dadurch entstand ein signifikanter Unterschied zu deren analogen Gruppe, der MA 13:00 +P Gruppe. Diese Reduktion der Expression von GnRH-R kann mit der Wirkung der negativen Rückkopplung des GnRH auf dessen Rezeptor erklärt werden. Eine solche negative Regulierung von GnRH-RmRNA im MBH wurde ebenfalls von Han *et al.*, (1999) beobachtet. In dieser Studie wurde ein Mechanismus einer extrem kurzen Rückkopplungsschleife sowohl auf der Ebene der POA als auch auf der Ebene des MBH beschrieben.

In der Hypophyse wurde bei der Messung der mRNA-Konzentration von GnRH-R eine Verminderung der Expression um 37 % in den non-responding animals beobachtet (Abb. 28). Alle behandelten Tiere (MA17 +P) zeigten ebenso eine Reduktion um 32 %. Da alle behandelten Tiere eine Reduktion der GnRH-R-mRNA aufweisen, kann dies durch die Progesteronzugabe verursacht werden sein. In der Literatur wird eine solche Abnahme der GnRH-R-mRNA beschrieben (Bauer-Dantoin *et al.*, 1995). Es ist somit anzunehmen, dass dieser Effekt nicht altersabhängig ist und nur auf die Zugabe von Progesteron zurückzuführen ist.

Eine signifikante Erhöhung der Expression von ER α wurde in den analogen Gruppen der 13 Uhr-Gruppe gemessen: Die Gruppe der behandelten mittelalten Ratten (MA 13:00 +P/LH-) verzeichnete eine Zunahme von 55% und die Nachmittag Gruppe der jungen Ratten einen Anstieg von 153 % (Abb. 29). Im Gegensatz zu ER α wurde eine Absenkung der Expression von ER β in der Hypophyse gemessen 33(Abb. 30). Dort nahm die mRNA-Konzentration bei den analogen Gruppen der Nachmittag-Gruppe (MA 17 +P/LH \geq 5 und Y17:00) um 44 % ab. Dieser Effekt der Estrogen Rezeptoren könnte in beiden Gruppen auf den erhöhten Progesteron-Spiegel (entweder exogen oder endogen mit ansteigender adrenaler Sekretion von Progesteron) beruhen. Diese altersabhängige Veränderungen von ER β in der Hypophyse sind analog mit den Ergebnissen aus der POA und belegen, dass wie Knobil (1990) vorgeschlagen, dass der rückkoppelnde Effekt von Estrogen auch in der Hypophyse stattfindet.

Die mRNA-Konzentration der β Untereinheit von FSH nahm sowohl bei den responding animals auf einen Wert von 296 % als auch bei deren analogen Gruppe, die Y17-Gruppe, auf einen Wert von 293 % zu (Abb. 31). Daher ist dieser Effekt als altersabhängig zu bezeichnen. In der Literatur wurde eine Erhöhung der FSH- β mRNA-Konzentration durch einen Progesteron induzierten LH-Peak beschrieben (Attardi und Fitzgerald, 1990). Bei den non-responding animals wurde eine Erhöhung der Transkripte um 91 % beobachtet. Bei der Vergleichsgruppe, die alle behandelten Tiere umfasst, wurde ebenso eine Zunahme von 183 % gemessen. Diese Beobachtung ist mit dem erhöhten FSH-Wert im Serum der alternden Ratten (während und nach der Transitionsphase) zu erklären (Klein *et al.*, 1996a; Klein *et al.*, 1996b; klein *et al.*, 1996c). Überdies wurde eine leichtere Erhöhung der Transkripte von FSH- β (146 % ± 20,8) bei der jungen Y13-Gruppe beobachtet. Deren analoge Gruppe, die MA 13:00 +P Gruppe, zeigte keine signifikante Veränderung. Diese Zunahme der Expression von FSH- β in der Y13-Gruppe bleibt zu erklären.

Im Ovar blieben die Transkripte des GnRH und dessen Rezeptor (GnRH-R) in allen Gruppen auf dem Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 32 und Abb. 33). Ebenso wurden keine signifikanten Veränderungen bei der Messung der ER α -mRNA-Konzentration beobachtet (Abb. 34). Im Gegensatz dazu wurde bei der ER β Genexpression eine Absenkung bei den responding animals (32 %) und deren jungen analogen Gruppe (27 %) festgestellt (Abb. 35). Die altersabhängige Veränderungen der Expression von ER β im Ovar sind möglicherweise durch Estrogen reguliert wurden (Byers *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden ER β -Expressionsveränderungen in der POA, in der Hypophyse und im Ovar gemessen, darauf entstand die wichtigste Beobachtung

dieser hier vorgestellten Untersuchungen, dass ER β altersabhängig expremiert und für den Erhalt des Zyklus essentiell sein kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell zur molekular biologischen Untersuchungen der altersabhängigen Veränderungen entlang der hypothalamohypophysio-ovariellen Achse erfolgreich entwickelt. In diesem Tiermodell konnte vor allem bei 44 % der persistent östrischen Ratten der Östrus-Zyklus wieder hergestellt werden. Dieses Modell ermöglichte aber die Untersuchung einer relativ hohen Anzahl an Genen entlang der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse.

In den letzten Jahren wurde eine dramatische Zunahme der Lebenserwartung beobachtet. In Deutschland und in den Vereinigten Staaten von Amerika lag beispielsweise die Lebenserwartung für 1998 bei 77 Jahren (von Baratta *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu bleibt das Alter, in dem die Menopause auftritt, konstant. Dadurch leben immer mehr Frauen eine längere Zeitperiode ihres Lebens im Status der Postmenopause. In einer solchen langen Periode sind die Frauen in einem hypoestrogen Status. Dies beeinflusst und beeinträchtigt viele physiologische Systeme. Mit diesen hier vorgestellten Ergebnissen konnte ein Beitrag geleistet werden, mehr Gewicht in das Verständnis der komplexen Interaktionen der Faktoren zu legen, die zur Transition zum Status der Postmenopause führen.

6. Zusammenfassung

Die GABA-ergen Neurone als Teil des GnRH-Netzwerkes spielen eine Rolle bei den Veränderungen der altersabhängigen Prozesse der Reproduktionsfunktion. Um die Regulation der gonadalen Steroide auf die Expression von GAD in reproduktionsabhängigen Regionen zu untersuchen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das männliche Rattenmodell gewählt. Nach der Untersuchung des endokrinen Zustands der Tiere anhand der Radioimmunoassay-Methode (RIA) wurden die zellulären Gentranskripte der beiden Isoformen von GAD, GAD₆₅ und GAD₆₇, mittels der Methode der *in situ* Hybridisierung in der POA, im Nukleus suprachiasmaticus (SCN), im mediobasalen Hypothalamus (MBH) und im Gyrus dentatus bestimmt. In allen untersuchten Regionen konnte nach der Kastration und einer anschließenden dreiwöchigen Erholungszeit kein Effekt beobachtet werden.

Die Administration von Estradiol bewirkt in der POA eine signifikante Erhöhung der Expression von GAD₆₅ und GAD₆₇ um nahezu 40%. In den restlichen Regionen konnte dagegen kein Effekt gemessen werden.

Die Testosteronbehandlung zeigte eine negative Wirkung auf die Regulation nur von GAD₆₇: Eine 30%-ige Abnahme in der POA und eine 15%-ige im SCN. Im Gegensatz dazu trat im MBH und im Gyrus dentatus eine Verminderung der Expression nur bei GAD₆₅ auf. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen kann folgendes abgeleitet werden: Testosteron und Estradiol regulieren in unterschiedlicher Weise die Expression von GAD und so wiederum die inhibitorische Funktion von GABA. Da in der SCN, im MBH und im Gyrus dentatus im Gegensatz zu Estradiol eine Testosteron-Wirkung gemessen wurde, existiert eine eigene androgene Regulation von GAD. Weil die Estradiol-Zugabe eine Zunahme der Expression von GAD bewirkte und dieser Effekt von einer Abnahme der LH-Konzentration im Serum der betroffenen Tiergruppe begleitet wurde, ist die These bestätigt, dass GABA mit ihren inhibitorischen Funktionen zur Übermittlung der positiven Rückkopplung von Estradiol auf die LH-Freisetzung auf der Ebene der POA und nicht auf der Ebene der Axone agiert.

Im Gegensatz zu Estradiol kann eine Progesteronbehandlung bei persistent östrischen Ratten einen LH-Peak auslösen und somit den Östrus-Zyklus wieder in Gang bringen. Aufgrund dieser Tatsache wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell zur Untersuchung der molekularbiologischen altersabhängigen Veränderungen entwickelt. Dabei wurden drei Monate alte proöstrische Ratten (Y) und 12 Monate alte persistent östrische Ratten (MA) benutzt. Die MA-Ratten wurden mit Progesteron behandelt. Sowohl die MA-Ratten als auch die Y-Ratten wurden um 13 Uhr und um 17 Uhr getötet. Eine unbehandelte MA-Gruppe, deren Tiere um 10 Uhr getötet wurden, diente hier als Kontrollgruppe. Anhand der LH-Messung der untersuchten Gruppen wurde ein Kontrollwert (5 ng/ml LH) für die positive Reaktion der Tiere auf Progesteron (responding animals) festgestellt. Es konnte bei 44% der persistent östrischen Ratten ein erhöhter LH-Spiegel erfolgreich wieder erreicht werden. In den Gruppen dieses Modells entstand eine Analogie zwischen den Gruppen der behandelten MA-13-Uhr und Y-13-Uhr Tiere sowie zwischen den responding animals und den Y-17 Uhr-Tieren. Um aussagekräftige statistische entlang der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Veränderungen Achse in individuellen Tieren zu erhalten, wurde die Tagman®-PCR und die guantitative, kompetitive RT-PCR eingesetzt. Dabei wurden die folgenden Gene untersucht: ER a und ER β, GnRH, GnRH-R, GAD65 und GAD67, sowie FSH-β.

In der POA, Hypophyse und im Ovar wurde altersabhängigen Genexpression beobachtet: Eine signifikante Abnahme der Expression von ER β sowohl in der Gruppe responding animals als auch in deren analoger Gruppe wurde in der POA (34%), Hypophyse (44 %) und im Ovar (um die 30 %) gemessen. In der Hypophyse verzeichneten die mRNA-Transkripte von ER α bei der Gruppe der behandelten mittelalten Ratten der 13 Uhr–Gruppe eine Zunahme von 55% und bei der 13-Uhr-Gruppe der jungen Ratten einen Anstieg von 153 %. Ebenso nehmen die mRNA-Konzentrationen von FSH- β sowohl bei den responding animals als auch bei deren analoger Gruppe in gleichem Masse (ungefähr 300 %) zu.

Da die Veränderungen der Expression von ER β , ER α und FSH- β bei den zwei analogen Gruppen auftritt, ist zu vermuten, dass diese Gene altersabhängig expremiert und an der Zyklusregulation ursächlich beteiligt sind. Die restlichen Gene zeigten entlang der Achse keine altersrelevanten Veränderungen. Da ER β -Expressionsveränderungen in der POA, in der Hypophyse und im Ovar gemessen wurden, konnte der wichtigste Schluss der hier vorgestellten Untersuchungen gezogen werden, dass nämlich ER β für den Erhalt des Zyklus essentiell sein kann.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell zur molekular biologischen Untersuchung der altersabhängigen Veränderungen mit sehr zufriedenstellender Ausbeute zur Wiederherstellung des Östrus-Zyklus (44%) erfolgreich entwickelt. Dieses Modell ermöglichte darüber hinaus die Untersuchung einer relativ hohen Anzahl an Genen entlang der hypothalamo-hypophysio-ovariellen Achse.

7. Literatur

Akema T., Kimura F. (1992). Modulation of pulsatile LH secretion by baclophen, a selective GABA_B receptor agonist, in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* **56**: 141-147

Apter D., Butzow T.L., Laughlin G.A., Yen S.S. (1993). Gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity during pubertal transition in girls: pulsatile and diurnal patterns of circulating gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab*, **76**: 940-9

Asada H., Kawamura Y., Maruyama K., Kume H., Ding R.G., Kanbara N., Kuzume H., Sanbo M., Yagi T., Obata K. (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 6496-6499

Asada H., Kawamura Y., Maruyama K., Kume H., Ding R., Ji F.Y., Kanbara N., Kuzume H., Sanbo M., Yagi T., Obata K. (1996). Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 891-895

Aschheim P. (1983). Relation of neuroendocrine system to reproductive decline in female rats. In: *Meites J (ed) Neuroendocrinology of Aging. Plenum Press, New York.*, p 73

Batista M.C., Cartledge T.P., Zellmer A.W., Merino M.J., Axiotis C., Bremner W.J., Nieman L.K. (1995). Effects of aging on menstrual cycle hormones and endometrial maturation. *Fertil Steril*. 64: 492-9

Bauer-Dantoin A.C., Weiss J., Jameson J.L. (1995). Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology.* **136**: 1014-1019

Beato M., Herrlich P., Schutz G. (1995). Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857

Belhage B., Hansen G.H., Schousboe A. (1993). Depolarization by K+ and glutamate activates different neurotransmitter release mechanisms in GABAergic neurons: vesicular versus non-vesicular release of GABA. *Neuroscience* **54**: 1019-1034

Bettuzi A., Robinson A., Fuchs-Young R., Greene G.L. (1991). Estrogen and progesterone receptor structure and action in breast cancer sells. In: *Genes, Oncogenes, and Hormones: Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer.* Dickson, RB., Lipman ME. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston. p.: 301-315

Bilger M., Heger S., Brann D.W., Paredes A., Ojeda S.R. (2001). A conditional tetracycline-regulation in gamma amino butyric acid production near luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* **142**: 2102-2114

Bond CT, Hayflick JS, Seeburg PH, Adelman JP. (1989). The rat gonadotropinreleasing hormone: SH locus: structure and hypothalamic expression. *Mol Endocrinol.* 8: 1257-1262

Bowers G., Cullinan W.C., Herman J.P. (1999). Region-specific Regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J. Neurosci.* **18**: 5938-5947

Boyer R.M. (1978). Sleep-related endocrine rhythms. In: *The hypothalamus,* Reichlin S., Baldessarini RJ. Martin JB. (ed), Raven Press, New York pp.: 373-386

Brann D.W. (1995). Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*. 61: 213-225

Brown T.J., MacLusky N.J., Leranth C., Shanabrough M., Naftolin F., (1990). Progestin receptor containing cells in the guinea pig hypothalamus: afferent connection, morphological characteristics, and neurotransmitter content. *Mol. Cell. Neurosci.* 1: 58-77

Bu D.-F., Erlander M.G., Hitz BC., Tillakaratne N.J.K., Kaufman D.L., Wagner-MaPherson C.B., Evans G.A., Tobin A.J. (1992). Two human glutamate decarboxylase, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 2115-2119

Byers M., Kuiper G.G.J.M., Gustafsson J.-Å., Park-Sarge O-K. (1997). Estrogen receptor β mRNA expression in rat ovary: Down-regulation by gonadotropins. *Mol. Endocrinol.* **11**: 172-182

Caligaris L., Taleisnik S. (1983). Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatments, sex and daily rhythm. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 102: 505-510

Carmel P.W., Araki S., Ferin M. (1976). Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Exp. Brain Res.* **75:** 644-652

Carson-Jurica M.A., Schrader W.T., O'Malley B.W. (1990). Steroid receptor family: Structur and functions. *Endocrine Rev.* 11: 201-220

Childs G.V., Lloyd J.M., Unabia G., Gharib S.D., Wierman M.E., Chin W.W. (1987). Detection of luteinizing hormone beta messenger ribonucleic acid (RNA) in individual gonadotropes after castration: use of a new in situ hybridization method with a photobiotinylated complementary RNA probe. *Mol Endocrinol.* 1: 926-932

Chin W.W., Godine J.E., Klein D.R., Chang A.S., Tan L.K., Habener J.F. (1983). Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the beta subunit of the rat lutropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4649-4653

Christgau S, Aanstoot H.J, Schierbeck H, Begley K., Tullin S., Hejnaes K., Baekkeskov S. (1992). Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain *J Cell Biol* 118: 309-20

Clarke I.J., Cummins J.T. (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* **111**: 1737-1739

Clayton R.N., Eccleston L., Gossard F., Thalbard J.C., Morel G. (1992). Rat granulosa cells express the gonadotrophin-releasing hormone gene: evidence from in-situ hybridization histochemistry. *J Mol Endocrinol* 9: 189-195

Clemens J.A., Amenomori Y., Jenkind T., Meites J. (1969). Effects of hypothalamic stimulation, hormones, and drugs on ovarian function in old female rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132: 561-563

Cooper R.L., Conn P.M., Walker R.F. (1980). Characterization of LH surge in middle-aged female rats. *Biol Reprod* 23: 611-615

Costoff A., Mahesh VB. (1975). Primordial follicles with normal oocytes in the ovaries of postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc.* 23(5): 193-6.(1975).

Couse J.F., Curtis S.W., Washbum T.F., Lindzey J., Golding T.S., Lubahn D.B., Smithies O., Korach K.S. (1995). Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 9: 1441-1454

Cullinan Cullinan W.E., Herman J.P., watson S.J. (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: Evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 332: 1-20

Decavel C., van den Pol A.N. (1990). GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. J. Comp. Neurol. 302: 1019-1037

Demling J., Fuchs E., Baumert M., Wuttke W. (1985). Preoptic catecholamin, GABA, and glutamate release in ovariectomised and ovariectomised estrogen-primed rats utilizing a push-pull cannula technique. Neuroendocrinology 41: 212-218.

DePaolo L.V. (1987). Age-associated increases in serum follicle-stimulating hormone levels on estrus are accompanied by a reduction in the ovarian secretion of inhibin. *Exptl. Aging Res.* **13**: 3-7

Desjardin L.e., Chen Y., Perkins M.D., Teixeira L., Cave M. D., Eisenach K.D. (1998). Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *Jour. Clin. Microbiol.* 36: 1964-1968

Dierschke D.J., Bhattacharya A.N., Atkinson L.E., Knobil E. (1970). Circhoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* **87**: 850-853

Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjold M., Gustafsson J.-Å. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 4258-65.

Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K., Feldblum S., Patel N., Tobin A.J. (1991a). Two genes encode distinct glutamate decarboxylase. *Neuron* 7: 91-100

Erlander M.G., Tobin A.J. (1991b). The structural and functional heterogeneity of glutamate decarboxylase: A review. *Neurochem*. *Res.* 16: 215-226

Escalpez M., Tillakaratne N.J.K., Feldblum S., Patel N., Tobin AJ. (1993). Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization method. *J. Comp. Neurol.* 331: 339-362

Escalpez M., Tillakaratne N.J.K., Kaufman D.L., Tobin A.J., Houser C.R. (1994). Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in the rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J. Neurosci.* 14: 1834-1855

Etchegoyen G.S., Del Zotto H. (1996). Changes induced by sex steroids in the kinetic properties of hypothalamic GABA uptake. *Arch Physiol Biochem* **104**: 287-92

Evaerett J.P., Tyrey L. (1982). Comparison of luteinizing hormone surge responses to ovarien steroids in cyclic and spontaneously persistent estrous rats of middle age. *Biol. Repord.* **26**: 663-672

Feldblum S., Dumoulin A., Anoal M., Sandillon F., Privat A. (1995). Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases in vivo. *Neurosci. Res.* **42**: 742-57.

Feldblum S., Erlander M.G., Tobin A.J. (1993). Different Distribution of GAD65 und GAD67 mRNA suggest that the two glutamate Decarboxylases play distinctive functions roles. *J. Neurosci. Res.* **34**: 689-706

Filicori M., Santoro N., Merriam G.R., Crowley W.F. (1986). Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstraul cycle. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 40: 1136-1144

Finn P.D., Steiner R.A., Clifton D.K. (1998). Temporal patterns of gonadotropinreleasing hormone (GnRH), c-fos, and galanin gene expression in GnRH neurons relative to the luteinizing hormone surge in the rat. J. Neurosci. 18: 713-719

Ford H., Ebling F.j. (2000). Glutamate regulation of gonadotropin releasing hormone mRNA levels during development in the mouse. *J Neuroendocrinology* **12**: 1027-1033

Fleischmann A., Makman M.H., Etgen A.M. (1990). Ovarian steroids increase veratridine-induced release of amino acid neurotransmitters in preoptic area synaptosoms. *Brain Res.* 507: 161-163

Fleischmann A., Etgen A.M., Makman M.H. (1992). Estradiol plus progesterone promote glutamate-induced release of gamma-aminobutyric acid from preoptic area synaptosomes. *Neuropharmacology* **31**: 799-807

Funabashi T., Kleopoulos S.P., Brooks P.J., Kimura F., Pfaff D.W., Shinohara K., Mobbs C.V. (2000). Changes in estrogenic regulation of estrogen receptor alpha mRNA and progesterone receptor mRNA in the female rat hypothalamus during aging: an in situ hybridization study. *Neurosci Res.* **38**: 85-92

Funabashi T., Kimura F. (1994). Effects of estrogen and estrogen receptor messenger RNA levels in young and middle-aged female rats: comparison of medial preoptic area and mediobasal hypothalamus. *Acta Biol Hung.* **45**: 223-231

Flügge G., Oertel W.H., Wuttke W. (1986). Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology* 43: 1-5

Gargiulo P.A., Donoso A.O. (1995). Interaction between glutamate and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in lordosis behavior and luteinizing hormone release (LH): further studies on NMDA receptor mediation. *Physiol Behav.* **58**: 169-173.

Genuth S.M. (2000). Female Reproduction. In: *Principles of Physiology*. Berne R.M.; Levy M.N. (eds). Mosby, St. Louis, pp.: 598-615

Gharib S.D., Bowers S.M., Need L.R., Chin W.W. (1986). Regulation of rat luteinizing hormone subunit ribonucleic acids by gonadal streoid hormones. *J Clin Invest* 77: 582-589

Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6: 995-1001

Gonzales C., Kaufman D., tobin A.J., Chesselet M.-F. (1991). distribution of GAD67 in the basal ganglia of the rat: An immunohistochemical study with a selective cDNA-generated polyclonal antibody. *J. Neurocytol.* **20**: 953-961

Gore A.C., Oung T., Woller M.J. (2002). Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat. *J Neuroendocrinol.* 14: 300-309

Gore A.C., Roberts J.L. (1995). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*.136: 889-896

Gorski R.A. (2000). Sexual differentiation of the nervous system. In: *Principles of neural science*. Kandel ER., Schwartz JH., Jessell TM. (ed.) McGraw-Hill, New York. pp.: 1131-1148

Gorski R.A., Harlan R.E., Jacobson C.D., Shryne J.E., Southam A.M. (1980). Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. J. Comp. Neurol. 193: 529-39

Gorski R.A., Gordon J.H., Shryne J.E., Southam A.M. (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148: 333-46

Gosden J.R., Middleton P.G., Rout D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* **43**: 218-20.

Grattan D.R., M Selmanoff M. (1997). Sex differences in the activity of gammaaminobutyric acidergic neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 14: 244-249

Grattan D.R., M Selmanoff M. (1994). Castration-induced decrease in the activity of medial preoptic and tuberoinfundibula GABAergic neurons is prevented by testosterone. *Neuroendocrinology* **60**: 141-149

Grattan D.R., M Selmanoff M. (1993). Regional variation in γ -aminobutyric acid turnover: effect of castration on γ -aminobutyric acid turnover in microdissected brain regions of the male rat. *J. Neurochem.* **60**: 2254-2264

Green S., Walter P., Kumer V., Bomet J.M., Argos P., Chambon P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-139

Grumbach M.M. (1980). The neuroendocrinology of the puberty. In: *Neuroendocrinology*, Drieger DT., Hughes JC. (eds), Sinauer, Sunderland (Mass.) pp.: 249-258

Gu G.B., Simerly R.B. (1997). Projection of the sexually dimorphic anteroventral periventral nucleus in the female rat. J. Comp. Neurol. 384: 142-164

Han Y.G., Kang S.S., Seong J.Y., Geum D., Suh Y.H., Kim K. (1999). Negative regulation of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 11: 195-201

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Bio.* 166: 557-580

Han Y.G., Kang S.S., Seong J.Y Geum D., Suh Y.H., Kim K. (1999). Negative regulation of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression by a gonadotropin-releasing hormone agonist in the rat. J. *Neuroendocrinol.* **11**: 195-201

Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.

Herbinson A.E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropinreleasing hormone neurons. *Endocr. Rev.* 19: 302-330

Herbinson A.E. (1997). Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic area. *Brain Res. Bull.* 44: 321-326

Herbison A.E., Augood S.J., Simonian S.X., Chapman C. (1996). Regulation of GABA transporter activity and mRNA expression by estrogen in rat preoptic area. *J. Neurosci* 15: 8302-8309

Herbison A.E, Fenelon V.S. (1995). Estrogen regulation of GABAA receptor subunit mRNA expression in preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain. *J Neurosci* **15**: 2328-37

Herbison A.E., Augood S.J., McGowan E.M. (1992). Expression of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in rat medial preoptic area neurones during the oestrous cycle and after ovariectomy. *Mol. Brain. Res.* 14: 310-316

Herman J.P., Larson B.R. (2001). Differential regulation of forebrain glutamic acid decarboxylase mRNA expression by aging and stress. *Brain Res.* 912: 60-6

Herman J.P., Cullinan W.E., Morano M.I., Akil H., Watson S.J. (1995). Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis. *J. Neuroendocrinol.* 7: 475-482

Hiruma X., Sano A., Kimura F. (1994). Injection of bicuculline elicits firing of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in muscimol-treated ovarriectomized rats. *Brain Res.* 641: 191-197

Hood S.C., Schwartz N.B. (2000). Sex difference in serum luteinizing hormone posgonadectomy in the rat: role of gamma-aminobutyric acid-eric inhibition. *Endocrine* **12**: 35-40

Horvath T.L., Diano S., Sakamoto H., shughrue P., Merchenthaler I. (1999). Estrogen receptor β and progesterone receptor mRNA in the intergeniculate leaflet of the female rat. *Brain Res.* 844: 196-200

Houser C.R., Esclapez M. (1994). Localization of mRNA encoding two forms of glutamic acid decarboxylase in the rat hippocampal formation. *Hippocampus* **4**: 530-545

Hrabovszky E., Steinhauser A., Barabas K., Shughrue P.J., Petersen S.L., Merchenthaler I., Liposits Z. (2001). Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*. 142: 3261-3264.

Hrabovszky E., Shughrue P.J., Merchenthaler I., Hajszan T., Carpenter C.D., Liposits Z., Petersen S.L. (2000). Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*. 141: 3506-9

Huang H.H., Meites J. (1975). Reproductive capacity of aging female rats. *Neuroendocrinology*. 17: 289-95

Huang H.H., Marshal S., Meites J. (1976). Induction of estrous cycles in old noncyclic rats by progesterone, ACTH, ether stress or L-dopa. *Neuroendocrinology* 20: 21-34

Hunter W.M., Greenwood F.C. (1962). Preparation of iodine-131-labelld human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495-496

Hutchison J.S., Goldman B.D. (1975). The relationship between the rat of testosterone infusion and gonadotropin secretion. *Endocrinology*. 97: 725-730

Hutton L.A., Gu. G.B., Simerly R.B. (1998). Development of a sexually dimorphic projection from the bed nuclei of the stria terminalis to the anteroventral periventricular nucleus in the rat. *J. Neurosci.* 18: 3003-30013

Ionue H., Nojima H., Okayama H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96: 23-28

Jaffe R.B., Plosker S., Marshall L., Martin M.C. (1990). Neuromodulatory regulation of gonadotropin-releasing hormone pulsatile discharge in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 1727-1731

Jaffe R.B., Monroe S.E. (1980). Hormone interaction and regulation during the menstrual cycle. *Front. Neuroendocrinol.* 6: 219-247

Jakubowski M., Roberts J.L. (1994). Processing of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat brain. J. Biol. Chem. 269: 4078-4083

Jarry H., Wise P.M., Leonahard S., Wuttke W. (1999). Effects of age on GABA turnover rates in specific hypothalamic areas in female rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107:59-62

Jarry H., Leonhardt S., Schwarze T., Wuttke W. (1995). Preoptic rather than mediobasal hypothalamic amino acid neurotransmitter release regulates GnRH secretion during the estrogen induced LH surge in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* **62**:479-86.

Jarry H., Hirsch B., Leonhardt S., Wuttke W. (1992). Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release. *Neuroendocrinology* 56: 133-40

Jarry H., Perschl A., Wuttke W. (1988). Further evidence that preoptic anterior hypothalamic GABAergic neurons are part of the GnRH pulse and surge generator. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 118: 573-579

Jennes L., Eyigor O., Janovick J.A., Conn P.M. (1997). Brain gonadotropin releasing receptors: Localization and regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**: 475-490

Jennes L., McShane T., Brame B., Centers A. (1996). Dynamic changes in gonadotropin releasing hormone receptor mRNA content in the mediobasal hypothalamus during the rat estrous cycle. *J. Neuroendocrinol.* 8: 275-281

Jennes L., Conn M.P. (1994). Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Receptors in the rat brain. Front Neuroendocrinol. 15: 51-77

Jensen E.V. (1995). Steroid hormone, receptors and antagonists. *Ann. NY Acad. Sci.* 761: 1-17

Judd H.L. Parker D.C. Yen S.S.C. (1977). Sleep-wake pattern of LH and testosterone release in prepubertal boys. J. Clin. Endocrin. Metat. 44: 865-869

Kaiser U.B., Zhao D., Cardona G.R., Chin W.W. (1992). Isolation and characterization of cDNAs encoding the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1645-1652

Kakar S.S., Grantham K., Musgrove L.C., Devor D., Seller J.C., Neill J.D. (1994). Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: Tissue expression and hormone regulation of its mRNA. *Mol. Cell Endocrinol.* 101: 151-157

Kallo I., Butler J.A., Barkovics-Kallo M., Goubillon M.L., Coen C.W. (2001). Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol.* 13: 741-748

Kalra S.P., Horvath T., Naftolin F., Xu B., Kalra P.S. (1997). The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GnRH) system. *J. Neuroendocrinol.* **9**: 569-576

Kalra S.P. (1993). Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr. Rev.* 14: 507-538

Kato Y., ezashi T., Hira T., kato T. (1990). Strain difference nucleotide sequenzes of rat glycoprotein homone subunit cDNA and gene fragment. *Zool Sci.* **7**: 879-887

Katzenellenbogen J.A., O'Malley B.W., Katzenellenbogen B.S. (1996). Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interaction with multiple effectors site as basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* **10**: 119-131

Kaufman D.L., Houser C.R., Tobin A.J. (1991). Two forms of the gammaanimobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneurnal distribution and cofactor interaction. *J. Neurochem* 56: 720-723

Kawakami S., Ichikawa M., Murahashi K., Hirunagi K., Tsukamura H., Maeda K. (1998a). Excitatory amino acids act on the median eminence nerve terminals to induce gonadotropin-releasing hormone release in female rats. *Gen Comp Endocrinol.* 112: 372-82.

Kawakami S.I., Hirunagi K., Ichikawa M., Tsukamura H., Maeda K.I. (1998b). Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: a dual immunoelectron microscopic study. *Endocrinology*. **139**: 1458-1461

Kim K., Jarry H., Knoke I., Seong J.Y., Leonhardt S., Wuttke W. (1993). Competitive PCR for quantitation of gonadotropin-releasing hormone mRNA level in a single micropunch of the rat preoptic area. *Mol Cell Endocrinol.* 97: 153-158.

Kim K.E., Lee B.J., Park Y., Cho W.K. (1989). Progesterone increase messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) level in the hypothalamus of ovariectomized estradiol-primed prepubertal rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6: 151-158

Klein N.A., Illingworth P.J., Groome N.P., McNeilly A.S., Battaglia D.E., Soules M.R. (1996a). Decreasing inhibin B secreation is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin B in spontaneous menstrual cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 2742-2745

Klein N.A., Battaglia D.E., Fujimoto V.Y., Davis G.S., Bremner W.J., Soules M.R. (1996b). Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1038-1045

Klein N.A., Battaglia D.E., Miller P.B., Branigan E.F., Giudice L.C., Soules M.R. (1996c). Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 1946-51.

Knobil E. (1990). The GnRH pulse generator. Am. J. Obstet. Gynecol. 163 suppl.: 1721-17727

Knobil E. (1989). The physiology of the GnRH pulse generator. *J. Steroid Biochem.* **33**: 669-671

Kogo H., Fujimoto T., Park M.K., Mori T. (1999). Gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the ovaries of neonatal and adult rats. *Cells Tissues Organs* 164: 14-22

Koike S., Sakai M., Muramatsu M. (1987). Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 15: 2499-2513

Kornblatt J.J., Grattan D.R. (2001). Lactation alter gamma-aminobutyric acid neuronal activity in the hypothalamus and cerebral cortex in the rat. *Neuroendocrinology* **73**: 175-184

Kuiper G.G.J.M., Carlsson B., Gradien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.-Å. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor α and β . *Endocrinology* 138: 963-870

Kuiper G.G.J.M., Enmark E., Pelto-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.-Å. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5925-5930

Laflamme N., Nappi RE., Drolet G., Labrie C., Rivest S. (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: Anatomical evidence of distinct reöes of each subtype. *J. Neurobiol.* 36: 357-378

Lauber M.E., Lichtensteiger W. (1994). Pre- and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in the male rat brain studied by in situ hybridization. *Endocrinology*. 135:1661-1668

Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-6

Lee W.-S., Smith M.S., Hoffman G.E. (1990). Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 5163-5167

Leigh A.J., Carter N.D., Horton R., Silverlight J.J., Wilson C.A. (1990). Ovarian steroid regulation of glutamic acid decarboxylase gene expression in individual hypothalamic nuclei. *J. Neuroendocrinol.* **2**: 433-438

Leonhardt S., Boning B., Luft H., Wuttke W., Jarry H. (2000). Activation of gene expression of the gamma-aminobutyric acid rather than the glutamatergic system in the preoptic area during the preovulatory gonadotropin surge of the rat. *Neuroendocrinology* 71:8-15

Leonhardt S., Shahab M., Luft H., Wuttke W., Jarry H. (1999). Reduction of luteinzing hormone secretion induced by long-term feed restriction in male rats is associated with increased expression of GABA-synthesizing enzymes without alterations of GnRH gene expression. *J. Neuroendo.* 11: 613-619

Leonhardt S., Seong J.Y., Kim K., Wuttke W., Jarry H. (1995). Activation of central $GABA_A$ – but not of $GABA_B_-$ receptor rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* **61**: 655-662.

Léránth C., MacLusky N.J., Browm T.J., Chen EC., Redmond Jr. D.E., Naftolin F. (1992). Transmitter content and afferent connections of estrogensensitive progestin receptor-containing neurons in the primate hypothalamus. *Neuroendocrinology* 55: 667-682

Léránth C., MacLusky N.J., Sakamoto M., Naftolin F. (1988). Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. Neuroendocrinology **48**: 591-602

Léránth C., MacLusky N.J., Sakamoto H., Shanabrough M., Naftolin F. (1985). Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial-preoptic area . *Neuroendocrinology* **40**: 536-539

Levine J.E. (1997). New concept of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surge in rats. *Biol. Reprod.* 56: 291-302

Lu C.K.H., Hopper B.R., Vargo T.M., Yen S.S.C. (1979). Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 21: 193

Lu J.K.H. (1994). Changes in ovarien function and gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats. In: *Meites J. : Neuroendocrinology of aging*. New York: Plenum Press pp.: 103-133

Lu J.K.H (1983a). Changes in ovarien function and gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats. In: *Neuroendocrinology of Aging*. Meites J. (ed.) New York p. 103-122

Lu J.K.H., Anzalon C.R., LaPolt P.S. (1983b). Relation of neuroendocrine function to reproductive decline during aging in the female rat. *Neurobiol. Aging* 15: 541-544

Luine V.N., Wu V., Hoffman C.S., Renner K.J. (1999). GABAergic regulation of lordosis: influence of gonadal hormones on turnover of GABA and interaction of GABA with 5-HT. *Neuroendocrinology* **69**: 438-45

Lubahn D.B., Moyer J.S., Golding T.S., Couse J.F., Korach K.S., Smithies O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11162-11166

MacNaughton J.M., banah M., McCloud P., Hee J., Burger H. (1992). Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol.* **36**: 339-345

Maeda K.I., Ohkura S., Tsukamura H. (2000). Physiology of Reproduction. In: *The Laboratory Rat.* Krinke G.J: (ed). Academic Press, SanDiego pp.: 145-176

Makela S., Strauss L., Kuiper G., Valve E., Salmi S., Santti R., Gustafsson J.-Å. (2000). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol.* 164: 109-16.

Mandl A.M. (1961). Cyclical changes in the vaginal smears of senile nulliparous and multiparous rats. *J. Endocrinol* 22: 257

Martin D.L., Martin S.B., Wu S.J., Espina N. (1991). Regulatory properties of brain glutamate decaroxylase (GAD): The apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J. Neurosci.* 11: 2725-2731

Martin D.L., Rimvall K. (1993). Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem* 60:395-407

Matt D.W, WeltmanJ.Y., Evans W.S., Kauma S.W., Veldhuis J.D., Jams C.A., Board J.A. (1994). In "Program & Abstracts of the 76th Annual Meeting of the Endocrine Society" June 1994, Anaheim, CA (abstract 710)

Matt D.W., Kauma S.W., Pincus S.M., Veldhuis J.D., Evans W.S. (1998). Characteristics concentrations on luteinizing hormone secretion in younger versus premenopausel women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178: 504-510

Maurer J.A., Wray S. (1999). Luteinizing hormone-releasing hormone quantified in tissues and slices explant cultures of postnatal rat hypothalami. *Endocrinology.* **140**: 791-799

Maurer R.A. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of complementary deoxyribonucleic acid for the beta-subunit of rat follicle stimulating hormone. *Mol Endocrinol* 1: 717-723

McCarthy M.M., Kaufman L.C., Brooks P.J., Pfaff D.W., Schwarz-Giblin S. (1995). Estrogen modulation of mRNA levels for the two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD) in female rat brain. J. Comp. Neurol. 360: 685-697

McCarthy M.M., Coirini H., Schumacher M., Johnson A.E., Pfaff D.W., Schwartz-Giblin S., McEwen B.S. (1992). Steroid regulation and sex differences in [³H]-muscimol binding in hippocampus, hypothalamus, and midbrain of the rats. *J. Neuroendocrinol.* 4: 393-399

Meites J., Lu J.K.H. (1994). Reproductive aging and neuroendocrine Function. In: *Oxford reviews of reproductive biology*, Charlton HM (ed.), Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; p.: 214-247

Merchenthaler I., Göres T., Sélàlo G., Petrusz P., Flerkò B. (1989). Identification of hypohysiotropic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons by combined retrograde labeling and immunohicytochemistry. *Exp. Endocrinol.* 94: 133-140

Miller M.A., Kolb P.E., Planas B., Raskind M.A. (1994). Estrogen receptor and neurotensin/neuromedin-N gene expression in the preoptic area are unaltered with age in Fischer 344 female rats. *Endocrinology*. 135: 1986

Mitcher N.A., Glaire G., Ben-Jonathan N. (1998). Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors α and β in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139: 3976-3983

Moenter S.M., Caraty A., Locatelli A., Karsch F.J. (1991). Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*. **129**: 1175-82.

Moore R.Y., Speh J.C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150: 449-450

Mosselmann S.J., Polman R., Dijkema (1996). Er beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* **392**: 49-53

Mugnaini E., Oeret W.H. (1985). An atlas of the distribution of GABAergig neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunocytochemistry. *Handbk. Chem. Neuroanat.* **4**: 436-608

Naftolin N., Yen S.S.C., Tsai C.C. (1972). Rapid cycling of plasma gonadotrophins in normal men as demonstrated by frequent sampling. *Nature* **236**: 92-93

Namchuk M., Lindsay L., Turck C.W., Kanaani J., Baekkeskov S. (1997). Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65alpha. *J Biol Chem* 272: 1548-57

Nass T.E., Lapolt P.S., Judd H.L., Lu J.K.H. 1984). Alteration in ovarian streoid and gonadotropin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats. *J. Endocrinol.* 100: 43-50

Nisweder G.D., Midgley E.R., Meites J., Ellis S. (1969). Radioimmunoassay for rat prolactin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 793-797

Nisweder G.D., Midgley A.R., Monroe S.E., Reichert L.E. (1968) Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH-¹³⁵I. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128**: 807-811

Österlund M., Kuiper G.G.J.M., Gustafsson J-Å. (1998). Differential distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA within the female rat brain. *Mol. Brain Resc.* 54: 175-180

Oikawa M. (1991). Detection of gonadotropin releasing hormone (GnRH) messenger RNA in the ovary and cloning of LH, chorionic gonadotropin (CG) receptor. *Hokkaido Igaku Zasshi* **66**: 749-757

Oikawa M., Dargan C., Ny T., Hsueh A.J. (1990). Expression of gonadotropinreleasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* **127**: 2350-2356
Orikasa C., Kondo Y., Hayashi S., McEwen B.S., Sakuma Y. (2002). Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 3306-11

Orikasa C., Mizuno K., Sakuma Y., Hayashi S. (1996). Exogenous estrogen acts differently on production of estrogen receptor in the preoptic area and the mediobasal hypothalamic nuclei in the newborn rat. *Neurosci. Res.* **25**: 247-254

Park O.K., Gugneja S., Mayo K.E. (1990). Gonadotropin-releasing hormone gene expression during the rat estrous cycle: effects of pentobarbital and ovarian steroids. *Endocrinology*. 127: 365-372

Park S.K., Strouse D.A., Selmanoff M. (1996). Prolactin- and testosterone-induced inhibition of LH secretion after orchidectomy: Role of catecholaminergic neurons terminating in the diagonal band of Broca, medial preoptic nucleus and median eminence. *J. Endocrinol.* **148**: 291-301

Patisaul H.B., Whitten P.L., Young L.J. (1999). Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17β -estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. *Mol. Brain Res.* **67**: 165-171

Pau K.Y., Berria M., Hess D.L., Spies H.G. (1993). Preovulatory gonadotropinreleasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques. *Endocrinology*. 133: 1650-6.

Paxinos G., Watson Ch. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.

Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J. (1979). A stereotaxic atlas of the rat brain. Anonymous 2nd edition Plenum Publishing Corporation, New York.

Peterson S.L., McCrone S., Coy D., Adelman J.P., Mahan L.C. (1993). GABAA receptor subunit mRNA in cells of preoptic area: Colocalization with LHRH mRNA using daul-label *in situ* hybridization histochemistry. *Endocrine Journal*. 1: 29-34

Piatek M., Saag M.S., Yang L.C., Clark S.J., Kappes J.C., Luk K.-C., Hahn B.H., Shaw G.M., Lifson J.D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259: 1749-1754

Pinal C.S., Cortessis V., Tobin A.J. (1997). Multiple elements regulate GAD65 transcription. *Dev. Neurosci.* 19: 465-475

Ponglikitmongkol M., Green S., Chambon (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.* **7**: 3385-3388

Prior J.C. (1998). Perimenopause: The complex endocrinology of the menopausel transition. *Endocr. Rev* 19: 397-428

Qu K., Martin D.L., Lawrence C.E. (1998). Motifs and structural fold of the cofactor binding site of human glutamate decarboxylase. *Protein Sci* 7: 1092-105

Quadri S.K., Kledzik G.S., Meites J. (1973). Reinitiating of estrous cycles in old constant-estrous rats by central-acting drugs. *Neuroendocrinology*. 11: 248-255

Rahimy M.H., Anderson W.R., Brewster M.E., Bodor N., Simpkins J.W. (1991). The effects of a brain-enhanced estradiol delivery system on testosterone and androgen-dependent tissues. I. Dose-response and time-course evaluation. *Endocrinology*. **129**: 717-25

Reame N.E., Kelche R.P., Beitins I.Z., Yu M.Y., Zawacki C.M., Padmanabhan V. (1996). Age effects of follicle-stimulating hormone and pulsatile luteinizing hormone secretion across the menstrual cycle of premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 1512-8.

Richardson S.J., Senikas V., Nelson J.F. (1987). Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* **65**: 1231-7.

Robert E., Frankel S. (1951). Further studies of glutamic acid decarboxylase in brain. J. Biol. Chem. 190: 505-512

Robinson J.E., Kendrick K.M., Lambert C.E. (1991). Changes in the release of GABA and catecholamines in the preoptic septal area prior and during the preovulatory surge of luteinizing hormone in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* **3**: 393-400

Rubin B.S., Lee C.E., King J.C. (1994). A reduced proportion of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons express Fos protein during the ovulatory or steroid-induced LH surge in middle-aged rats. *Biol Reprod.* **51**: 1264-1272

Sagrillo C.A., Selmanoff M. (1997). Castration decreases single cell levels of mRNA encoding glutamic acid decarboxylase in the diagonal band of broca and the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *J Neuroendocrinol* **9**: 699-706.

Sakakibara H. (1989). Gene expression of gonadotropin releasing hormone in the rat ovary. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **41**: 1817-1822

Sannella M.I., Petersen S.L. (1997). Dual label *in situ* Hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for μ , κ , or δ optiate receptors. *Endocrinology*. **138**: 16671672

Santoro N., Brown J.R., Adel T., Skurnick J.H. (1996). Characteristion of reproductive hormonal dynamic in the perimenopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1495-1501.

Sarkar D.K., Chiappa S.A., Fink G. Sherwood N.M. (1976). Primordial follicles with normal oocytes in the ovaries of postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc.* 23: 193-196.

Scadden D.T., Wang Z., Groopman J.E. (1992). Quantitation of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA by competitive polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 165: 1119-1123

Scarbrough K., Wise P.M. (1990). Age-related changes in the pulsatile pattern of LH release precede the transition to estrous acyclicity and depend upon estrous cycle history. *Endocrinology* 126: 884-890

Schwartz J.H. (2000). Neurotransmitters. In: *Principles of neural science*. Kandel ER., Schwartz JH., Jessell TM. (ed.) McGraw-Hill, New York. pp.: 280-297

Scott C.J., Clarke I.J. (1993). Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors for gamma-amino butyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. *Endocrinology* 133: 2904-12

Searles R.V., Yoo M.-J., He J.-R., Shen W.-B., Selmanoff M. (2000). Sex differences in GABA turnover and glutamic acid decarboxylase (GAD₆₅ and GAD₆₇) mRNA in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 878: 11-19

Seltzer A.M., Donoso A.O. (1992). Restraining action of GABA on estradiolinduced LH surge in the rat: GABA activity in brain nuclei and effect of GABA mimetics in the medial prooptic nucleus. *Neuroendocrinolog.* **55**: 28-34

Shi Y., Veit B., Baekkeskov S. (1994). Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65. *J Cell Biol* 124: 927-34

Shi S.H. (1979). Estradiol generates pulses of prolactin secretion in castrated male rats. *Neuroendocrinilogy*. 29: 270-275

Shimokawa N., Kato Y., Hattori M., Wakabayashi K. (1992). Indirect effects of progesterone on the synthesis and secretion of prolactin in mammotroph-enriched cells. *Exp. Clin. Endocrinol.* **99**: 3-7

Shin Y.F., Patterson A.P., Sherins R.J. (1986). Increased plasma and pituitary prolactin concentration in adult male rats selective elevation of FSH levels may be explained by reduced testosterone and increased estradiol production. *J. Androl.* 7: 105-111

Shughrue P.J., Malcolm V.M., Merchenthaler I. (1997a). Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp Neurol.* **388**: 507-525

Shughrue P., Scrimo P., Lane M., Askew R., Merchenthaler I. (1997b). The distribution of Estrogen Receptor- β in forebrain regions of the estrogen receptor- α knockout mouse. *Endocrinology* 138: 5649-5652

Siegelbaum S.A. Schwartz J.H., Kandel E.R. (2000). Modulation of synaptic transmission: Second messengers. In *Principles of neural science*. Kandel ER., Schwartz JH., Jessell TM. (ed.) McGraw-Hill, New York. pp.: 229-252

Silverman A.J (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemstry an in situ hybridization. In: *The physiology of reproduction*, edited by Knobil E. and Neil J. New York: Raven, pp. 1683-1710

Silverman A.J. Jhammandas J.H., Renauld L.P. (1987). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to median eminence. J. Neurosci. 7: 2312-2319

Simonian S.X., Spratt D.P., Herbison A.E. (1999). Identification and characterization of estrogen receptor α -containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J. Comp. Neurol* 441: 346-358

Skynner M.J, Sim J.A, Herbison A.E. (1999). Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 140: 5195-201.

Sloviter R.S., Dichter M.A., Rachinsky T.L., Dean E., Goodman J.H., Sollas A.L., Martin D.L. (1996). Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 373: 593-618

Soeng J.Y., Jarry H., Kühnemuth S., Leonhardt S., Wuttke W., Kim K. (1995). Effect of GABAergic compounds on gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology*. **136**: 2587-2593

Soghomonian J.-J., Martin D.L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci.* **19**: 500-5

Stone D.J., Walsh J., Benes F.M. (1999). Localization of cells prefentially expressing GAD67 with negligible GAD65 in the rat hippocampus. A double in situ hybridization study. *Mole Brain Res* 71: 201-209

Tessier C., Deb S., Prigent-Tessier A., Ferguson-Gottschall S., Gibori G.B., Shiu R.P., Gibori G. (2000). Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology.* **141**: 3842-51.

Tillakarante N.J.K., Erlander M.G., Collard M.W., Greif K.F., Tobin A.J. (1992). Glutamate decarboxylase in nonneurol cells of rat testis and oviduct: Differtial expression of GAD₆₅ and GAD₆₇. *J. Neurochem.* **58**:618-627

Tremblay G.B., Tremblay A., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Labrie F., Giguére V. (1997). Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol. Endocrinol.* 11: 353-365.

Tsai H.-W., Krajnak K., Legan S.J., Wise P.M. (1999). Induction of LH surges by progesterone in early persistent-estrous rats is mediated by activation of hypothalamic LHRH neurons. *The endocrine society* 81st annual meeting. [P1-432]

Tsai M.-J., O'Malley B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of Steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 451-486

Tsuruo Y., Ishimura K., Fujita H., Osawa Y. (1994). Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre- and postnatal development. *Cell Tissue Res.* 278: 29-39

Tsutsumi M., Zhou W., Millar RP., Mellon P.L., Roberts J.L., Flanagan C.A., Dong K., Gillo B., Sealfon S.C. (1992). Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 6: 1163-1169

Van der Beek E.M., Horvath T.L., Wiegant V.M. Vander Hurk R., Buijs R.M. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Comp. Neurol.* **384**: 569-579

Van Look P.E.A., Lothian H., Hunter W.H., Michie E.A., Baird D.T. (1977). hypothalamic-pituitary-ovarian function in perimenopausal women. *Clin. Endocrinol.* 7: 13-31

Vom Saal F.S., Finsch C.E., Nelson J.F. (1994). Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. In: Knobil E, Neil JD (ed.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, pp. 1213-1314

von Baratta M. (ed.) (2001). Der Fischer Weltalmanach 2001. Frankfurt am Main: Fischer Taschenbuch Verlag. p. 179/ p. 839

Wagner E.J., Ronnekleiv O.K., Bosch M.A., Kelly M.J. (2001). Estrogen biphasically modifies hypothalamic GABAergic function concomitantly with negative and positive control of luteinizing hormone release. *J. Neurosci.* **21**: 2085-2093

Wang A. M., Doyle M.V., Mark D.F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9717-9721

Wassarman P.M., Albertini D.F. (1994). The mammalian oovuum. In: Knobil E, Neil JD (ed.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, pp. 79-122

Wilson M.E., Rosewell K.L., Kashon M.L., Shughrue P.J. Merchenthaler I., Wise P.M. (2002). Age differentially influence estrogen receptor-alpha und (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mech Ageing*. 123: 593-601

Wilson R.C., Kesner J.S., Kaufman J-.M., Uemura T., Akema T., Knobil E. (1984). Central electrophysiological correlates of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* **39**: 429-438

Wise PM. (1999). Neuroendocrine modulation of the "menopause": insights into the aging brain. *Am. J. Physiol.* 277: E965-E970

Wise P.M., Smith M.J., Dubal D.B., Wilson M.E., Krajnak K.M., Rosewell K.L. (1999). Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. *Endocrine Reviews* 20: 243-248

Wise P.M, Kashon M.L., Krajnak K.M., Rosewell K.L., Cai A., Scarbrough K., Harney J.P., McShane T., Lloyd J.M., Weiland N.G. (1997). Aging of the female reproductive system: a window into brain aging. *Recent Prog Horm Res.* 52: 279-303

Wise P.M. (1984). Alteration in proestrous LH, FSH, and prolactin surge in middleaged rats. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 169: 348-354

Wise P.M. (1984). Estradiol-induced daily luteinizing hormone and prolactin surge in young and middle-aged rats: correlations with age-related changes in pituitary responsiveness and catecholamine turnover rates in microdissected brain areas. *Endocrinology* **115**: 801-809

Yen S.S., Apter D., Butzow T., Laughlin G.A. (1993). Gonadotrophin releasing hormone pulse generator activity before and during sexual maturation in girls: new insights. *Hum Reprod.* ;8 [Suppl 2]: 66-71.

Yen S.S.C., Jaffe R.B. (1986). Reproductive Endocrinology. Saunders, Philadelpha

Yen S.S.C., Tsai C.C., Naftolin F., Vandenberg G., Ajabor L. (1972). Pulsatile pattern of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **34**: 671-675

Yeo T.T., Gore A.C., Jakubowski M., Dong K.W., Blum M., Roberts J.L. (1996). Characterization of gonadotropin-releasing hormone gene transcripts in a mouse hypothalamic neuronal GT1 cell line. *Brain Res Mol Brain Res.* **42**: 255-262

Yoo M.J., Searles R.V., He J.R., Shen W.B., Grattan D.R., Selmanoff M. (2000). Castration rapidly decreases hypothalamic gamma-aminobutyric acidergic neuronal activity in both male and female rats. *Brain Res.* **878**: 1-10

Zimmermann K., Mannhalter J.W. (1996). Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques* **21**: 268-279

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F.-W. Schürmann danke ich für seine Bereitschaft, diese externe Arbeit zu betreuen, das Interesse an der Thematik und seine Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. E. Fuchs sowohl für die Übernahme des Koreferates als auch die Bereitschaft, mir die unter seiner Leitung stehenden Laboratorien für die Durchführung der *in situ* Hybridisierungsstudien zur Verfügung zu stellen. Ebenso bedanke ich mich ganz herzlichen für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die wertvollen Anregungen und die Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen wie technischen Fragen aller Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der "AG-Fuchs" (Abteilung Neurobiologie, Deutsches Primaten Zentrum, Göttingen). Stellvertretend seien hier Frau PD. Dr. G. Flügge, Frau S. Gleisberg und Frau M. Vorwald genannt.

Herrn Prof. Dr. W. Wuttke gebührt mein herzlicher Dank für die Überlassung dieser Arbeit und ihrer kontinuierlichen Förderung, insbesondere während der Forschungszeit im Ausland.

Herr Prof. Dr. Jarry hat mit zahlreichen kompetenten Anregungen und seiner kritischen Durchsicht des Manuskriptes wesentlich bei der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt. Dafür möchte ich mich ebenso herzlich bedanken wie für den mir gewährten Freiraum, der dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ich danke ferner ganz herzlich Frau Prof. Dr. Phyllis M. Wise und Ihrem gesamten Abteilungsteam sowie Prof. Dr. Lother Jennes (College of Medicine, University of Kentucky, Lexington, USA) für ihren Einsatz für das Gelingen der *in situ* Hybridisierungsmethode. Ihre Gastfreundlichkeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre haben in besonderer Weise den Auslandsforschungsaufenthalt unterstützt.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsfrauenklinik, Göttingen, bedanke ich mich ganz herzlich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Hier möchte ich stellvertretend Frau Maria Metten, Frau Heike Luft, Frau Dr. Tamara Becker und Frau Martina Bremer nennen.

Besonders dankbar bin ich auch für die mir in Deutschland zuteil gewordene staatliche Unterstützung. Das mir gewährte Studienstipendium und der studiengebührenfreie Zutritt zu deutschen Universitäten haben meine akademische Laufbahn ganz entscheidend geprägt.

Schließlich richte ich meinen besonderes herzlichen Dank an die zahlreichen Personen, die auf ganz unterschiedliche Weise zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben: Meiner Familie (Kufur Yassif/Galiläa) insbesondere meinen Eltern, Maha und Morris Makhouly, auf die ich stets während meiner akademischen Laufbahn zählen konnte, meiner Frau Dr. Janina Heisz und der Familie Dres. Gisela und Otto Heisz, die das Leben und die deutsche Sprache erheblich erleichtert haben sowie den vielen Freundinnen und Freunden, wie Frau Yasmin Soyka, Herrn Dr. Ibrahim Habib und Familie Wasmuth.

Lebenslauf

Bassel Makhouly

Geboren am:	03. Sept. 1971
Geboren in:	Haifa
Familienstand:	Verheiratet mit Dr. jur. Janina Heisz
Nationalität:	Palästinensischer Israeli
Relegion:	Christ (Episcopal)

Beruflicher Werdegang

April 99 – Aug. 01	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Klinische
	und Experimentelle Endokrinologie der Georg-August-
	Universität Göttingen
Jan. 02 – Juni 02	Anstellung als SAP-Berater bei der Firma SAP Systems
	Integration AG.

Sept. 02 - .-.-- Anstellung als Software Berater bei der Firma AOK Systems GmbH

Schulische und universitäre Ausbildung

Sep. 76 – Juli 84	Grundschule in Kufur Yassif
Sep. 84 – Juli 86	Mittlere Schule in Kufur Yassif
Sep. 86 – Juli 89	Gymnasium in Kufur Yassif
Juli 89	Bagrout (Allgemeine Hochschulreife ausgestellt am
	11.03.90)
Sep. 91 – Okt. 92	Teilnahme an Deutsch Sprachkursen in Osnabrück und
	Würzburg
Okt. 92	Prüfung zum Nachweis der deutschen Sprache (PNdS) an
	der Universität Würzburg

Okt. 92 – Sep. 94 Studium der Biologie an der Universität Osnabrück

Sep. 94 Vordiplom

- Okt. 94 März 99 Studium der Biologie an der Georg–August-Universität, Göttingen
- Juni 96 März 99 Studienstipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung
- März 98 März 99 Verfassung der Diplomarbeit "Expression und Regulation der Estradiol-Rezeptoren Typ alpha und beta in endokrinen Organen der Ratte" in der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsfrauenklinik Göttingen.
- März 99Erlangung des Diploms der Biologie, ausgestellt am
27.05.9927.05.99Hauptfach: Molekulare Genetik; erstes
Nebenfach: Immunologie; zweites (freiwilliges
zusätzliches) Nebenfach: Mikrobiologie; Nicht-biologisches
Nebenfach: Organische Chemie.
- April 99 Dez. 01 Anfertigung der Doktorarbeit "Neuroendokrine und molekulare altersabhängige Änderungen der reproduktiven Funktionen der weiblichen Ratte". in der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsfrauenklinik Göttingen.
- Juni 99 Sep. 99Forschungsaufenthalt im Deptartment of Physiology, Prof.Dr. P. M. Wise, University of Kentucky, Lexington, USA