Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie I:
Zelluläre Neurobiologie

Direktorin: Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Einfluss von exogenem und endogenem Estradiol auf die Expression hippocampaler GnRH- und LH-Rezeptoren *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Patrick Kohlmann
geb. am 15.03.1980
in Hamburg

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.01.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD. Dr. Janine Prange-Kiel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Frank Ulrich Beil

Inhaltverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis 3

II. Einleitung 6
1. Der Hippocampus 10
2. Inhibitoren der hippocampalen Estradiolsynthese 12
3. Östrogeneffekte 13
4. Regelkreislauf der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse 16
5. GnRH und sein Rezeptor 18
6. LH und sein Rezeptor 21
7. Fragestellung 23

III. Material und Methoden 24
1. Material 24
a. Arbeitsmaterialien, Geräte und Software 24
b. Chemikalien 25
c. Antikörper 25
d. Lösungen 26
2. Methoden 27
a. Präparation der Hippocampi aus der Ratte 27
b. Hippocampale Dispersionskultur 27
c. Stimulation und Inhibition 29
d. Fixierung der hippocampalen Dispersionskultur 30
e. Immunhistochemie der Dispersionskultur 30
f. Präabsorptionsversuch 31
g. Doppelinkubation 32
h. Mikroskopische Messung und Auswertung 34
i. Zellzählung 35

IV. Ergebnisse 37
1. Ergebnisse zum GnRH-R 37
a. Präabsorptionsversuch GnRH-R Ak 37
b. GnRH-R Doppelinkubation 38
c. Regulation des GnRH-R durch hippocampales Estradiol 39

d. Zellzählung GnRH-R positiver Zellen 42
2. Ergebnisse zum LH-R 43
a. Präabsorptionsversuch LH-R Ak 43
b. LH-R Doppelinkubation 43
c. Regulation des LH-R durch exogenes Estradiol 45
d. Zellzählung LH-R positiver Zellen 47

V. Diskussion 48
1. GnRH-R ist immunhistochemisch in verschiedenen Zellpopulationen nachweisbar 49
2. Hippocampales Estradiol reguliert die GnRH-R Expression in hippocampalen Neuronen 51
3. LH-R ist immunhistochemisch in verschiedenen Zellpopulationen nachweisbar 54
4. Exogenes Estradiol reguliert die LH-R Expression in hippocampalen Neuronen 55
5. Die Behandlung der Kulturen hat keinen Einfluss auf die Zahl der GnRH- und LH-Rezeptor-positiven Zellen 59
6. Wie führt Estradiol zu einer gesteigerten synaptischen Plastizität und welche Folgen hat diese? 59

VI. Zusammenfassung 62

VII. Literaturverzeichnis 65

VIII. Eidesstattliche Versicherung 76

I. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
AI	Aromataseinhibitor
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivatorprotein 1
AS	Aminosäuren
Bcl-x(L)	b-cell lymphoma-x(L)
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA1	Cornu ammonis Region 1
CA3	Cornu ammonis Region 3
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD11b	Cluster of Differentiation molecule 11b
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CSF	Zerebrospinale Flüssigkeit
Cy3	Indocarbocyanin 3
DABKO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	destillata (destilliert)
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	17β-Estradiol
EDTA	Ethylene diamine tetraacedic acid
ER	Östrogenrezeptor
ERα	Östrogenrezeptor Alpha
ERβ	Östrogenrezeptor Beta
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera
evtl.	eventuell

FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GnRH-R	Gonadotropin-Releasing Hormon Rezeptor
G-Protein	G für Guanylnukleotid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
hGLC	humane Granulosa Luteinzellen
His	Histidin
HHG-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
Ig	Immunglobulin
JPEG	joint photographic experts group
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KM	Kulturmedium
l	Liter
LH	luteinisierendes Hormon
LH-R	luteinisierendes Hormon Rezeptor
LSD	least significant difference
LSM	laser scanning microscope
M	Molar
MAC	Apple Macintosh
MAP	mitogen-activated protein
MAP2	microtubuli-associated protein 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol (1 mol=6,023 x 10^{23} Moleküle)

MOSP	myelin/oligodendrocyte-specific protein
mRNA	messenger-ribonucleic acid
MVK	Mevalonatkinase
n	Anzahl
NA Linse	Numerische Aperatur Linse
NaCl	Natriumclorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NChS	Normal Chicken Serum
NDS	Normal Donkey Serum
NeuN	Neuronal Nuclei
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRS	Normal Rabbit Serum
OVX	Ovarektomie
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PKC	Proteinkinase C
RT	Raumtemperatur
sek.	sekundär
sog.	sogenannt
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Umdrehung
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

II. Einleitung

Das Ovar gilt im weiblichen prämenopausalen Organismus als Hauptsyntheseort für Östrogen, ein Sexualhormon, welches neben den gut untersuchten Wirkungen auf den Reproduktionstrakt und andere periphere Gewebe auch seine Wirkungen innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) entfaltet. Diese Wirkungen beinhalten unterstützende Einflüsse auf kognitive Funktionen (LeBlanc et al., 2001; Krug et al., 2003) sowie auf neuroprotektive Fähigkeiten, welche u.a. im Zusammenhang mit zerebralen Erkrankungen, wie zerebrale Insulten, Morbus Alzheimer oder Schizophrenie beschrieben wurden (Behl and Manthey, 2000; Garcia-Segura et al., 2001; Cho et al., 2003; McCullough and Hurn, 2003).

Seit mehr als einem Jahrzehnt ist bekannt, dass Östrogene Auswirkungen auf die synaptische Plastizität im Gehirn, speziell im Hippocampus, haben. Dies konnte erstmals von einer Arbeitsgruppe um Gould und Mitarbeiter (1990) gezeigt werden. Sie beobachteten nach Ovarektomie (OVX) weiblicher Ratten eine Abnahme der Spinedichte an den Dendriten von Pyramidenzellen der CA1-Region (CA = Cornu ammonis) im Hippocampus, welche nach systemischer Estradiol (E2) Behandlung wieder zunahm. Zur gleichen Zeit beobachteten Woolley et al. (1990) eine Korrelation der Spinedichte ebenfalls an hippocampalen Neuronen mit den schwankenden E2-Spiegeln während des Estruszyklus in weiblichen Ratten. In der 24 h-Periode zwischen spätem Proestrus und spätem Estrus, die durch eine deutliche Abnahme des Plasma Estrogenspiegels charakterisiert ist, beobachteten sie eine deutliche Reduktion der Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus. In der anschließenden Diestrusphase, die durch steigende Estradiolspiegel gekennzeichnet ist, kam wieder zu einer Zunahme der Spinedichte.

In nachfolgenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass Östrogene die Expression gewisser synaptischer Marker, wie Spinophilin und Synaptophysin, im ZNS stimulieren (McEwen, 2002). Dies unterstreicht die fördernde Rolle von Östrogenen auf die Synapsenformation.

Obwohl die Möglichkeit der Östrogensynthese in zerebralen Geweben bereits vor mehr als 30 Jahren beschrieben wurde (Naftolin et al., 1971) und alle für eine regelrechte Steroidsynthese benötigten Enzyme im ZNS nachgewiesen wurden (Furukawa et al.,

1998; Stoffel-Wagner, 2001; Wehrenberg et al., 2001), ging man lange davon aus, dass die zerebrale Wirkung, u.a. die des zyklischen Synapsenumsatzes im Hippocampus, von den Östrogenen aus den Gonaden ausgeht (McEwen, 2002). Dem lokal synthetisierten Östrogen schenkte man wenig Aufmerksamkeit.

Vor kurzem konnten Prange-Kiel et al. (2003) nachweisen, dass Einzelzellkulturen hippocampaler Neurone in der Lage sind Östrogene *de novo* zu synthetisieren. Diese Ergebnisse konnten sowohl durch Versuche an hippocampalen Slicekulturen (Kretz et al., 2004) als auch durch Untersuchungen an männlichen Ratten, die eine 6-fach höhere Konzentration von E2 im Hippocampus im Vergleich zum Serum zeigten (Hojo et al., 2004), unterstützt werden.

Die Umwandlung von Testosteron in ein Östrogen wird durch das Cytochrom $P450_{aro}$, auch Aromatase genannt, katalysiert. Dabei kommt es zur Abspaltung der C19-Methylgruppe und Aromatisierung von Ring A, wodurch die beiden wichtigsten Östrogene, 17β-Estradiol und Estron, entstehen. 17β-Estradiol ist der effektivste Vertreter aller Östrogenformen. Die Aromatase stellt mit der Umwandlung eines Androgens in ein Östrogen das zentrale Enzym in der Östrogensynthese dar.

Die Hemmung der Aromatase durch den Aromataseinhibitor Letrozol, führte in hippocampalen Dispersionskulturen, neben einer signifikanten Abnahme der E2-Synthese (Prange-Kiel et al., 2003) (Abb.1), zu einer signifikanten Abnahme der

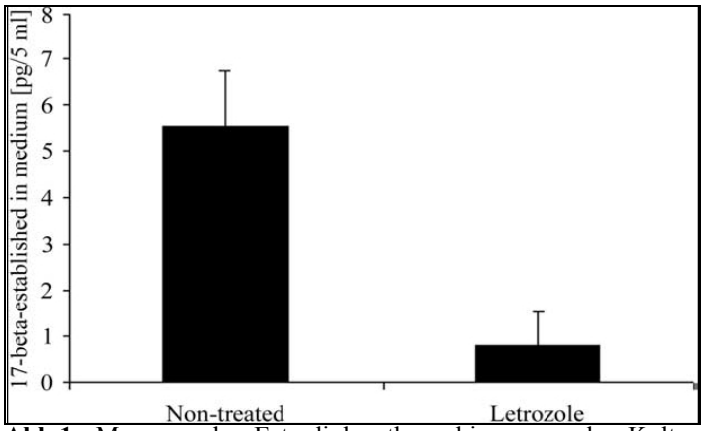

Abb.1: Messung der Estradiolsynthese hippocampaler Kulturen aus adulten Ratten Hippocampi nach Behandlung mit dem Aromataseinhibitor Letrozol. Die Estradiolabgabe ins Medium war nach Letrozolbehandlung fast komplett aufgehoben (n=3 Kulturen pro Gruppe; $p<0.05$).
Quelle: Prange-Kiel et al., 2003

Spinedichte in der CA1 Region von Slice- und Dispersionskulturen des Hippocampus (Kretz et al., 2004). Die Abnahme der hippocampalen E2-Synthese beeinflusste ebenfalls die Expression der Estrogenrezeptor (ER)-Isoformen, ERα und ERβ. Als Antwort auf die sinkende E2-Synthese zeigte sich eine Zunahme der ERβ-Expression und eine Abnahme der ERα-Expression (Prange-Kiel et al., 2003). Dadurch konnte erstmals ein para/autokriner Loop im Hippocampus nachgewiesen werden.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die parakrine Regulation durch E2 auch eine Rolle bei der Neurogenese (Fester et al., 2006) sowie beim Axonwachstum (von Schassen et al., 2006) im Hippocampus spielt.

Überraschenderweise führte die exogene E2-Applikation zu den Kulturen zu keiner Zunahme der Spinedichte in der CA1-Region (Kretz et al., 2004). Dies steht im Widerspruch zu oben aufgeführten *in vivo* Ergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass die im Rahmen des Zyklus erhöhten E2-Serumspiegeln eine Zunahme der Spinedichte in hippocampalen Neuronen bewirken (Woolley et al., 1990). Auch andere Untersuchungen deuten auf eine Korrelation zwischen Zyklus und Ausprägung der Spinedichte im Hippocampus hin (McEwen, 2002; Leranth et al., 2002).

Die Regulation der E2-Sekretion aus den Gonaden kann auf 2-fache Weise erfolgen. Zum Einen wird die E2-Abgabe aus den Gonaden durch einen Estrogen regulierten Feedbackmechanismus über die hypothalamo-hypophysäre-gonadale-Achse vermittelt. Das Gonadotrophin-Releasing Hormon (GnRH) aus dem Hypothalamus führt dabei indirekt über die Ausschüttung der hypophysären Gonadotropine, follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH), zu einer zyklusabhängigen E2-Sekretion aus den Gonaden. Zum Anderen kann durch eine direkte Stimulierung der Ovarien durch niedrige Dosen von GnRH ebenfalls E2 sezerniert werden (Parinaud et al., 1988; Janssens et al., 2000).

Sowohl im Ovar (Latouche et al., 1989) als auch im Hippocampus der Ratte wurden Bindungsstellen für GnRH autoradiographisch (Badr and Pelletier 1987; Reubi et al., 1987; Jennes et al., 1988; Leblanc et al., 1988) sowie GnRH-Rezeptor (GnRH-R) mRNA mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen (Jennes and Woolums, 1994). Das gleiche gilt für den LH-Rezeptor (Lei et al., 1993).

Demnach wäre es möglich, dass die E2-Synthese im Hippocampus analog zur gonadalen E2-Synthese durch eine zyklusspezifische GnRH-Sekretion aus dem Hypothalamus direkt und/oder indirekt reguliert wird.

II. 1 Der Hippocampus

Der Hippocampus ist Teil des Endhirns, der sich auf der medialen Seite einer jeden Hemisphäre im Temporallappen befindet und sich in Form eines nach okzipital geformten Bogens darstellt. Er liegt medial des Gyrus hippocampalis, hat eine enge topographische Lagebeziehung zum Seitenventrikel und reicht ventral an den Uncus heran (Abb.2). Er wird zum Archikortex gezählt, der stammesgeschichtlich zum älteren Teil des Cortex cerebri gehört und aus dem Gyrus dentatus (DG), dem Cornu ammonis (Ammonshorn) und dem Subiculum besteht.

Makroskopisch sind am Hippocampus drei Abschnitte zu unterscheiden: der Pes, welcher den anterioren Abschnitt des Hippocampus darstellt, die Fimbria, welche sich in den Fornix fortsetzt und sowohl afferente als auch efferente Fasern enthält und der Gyrus dentatus.

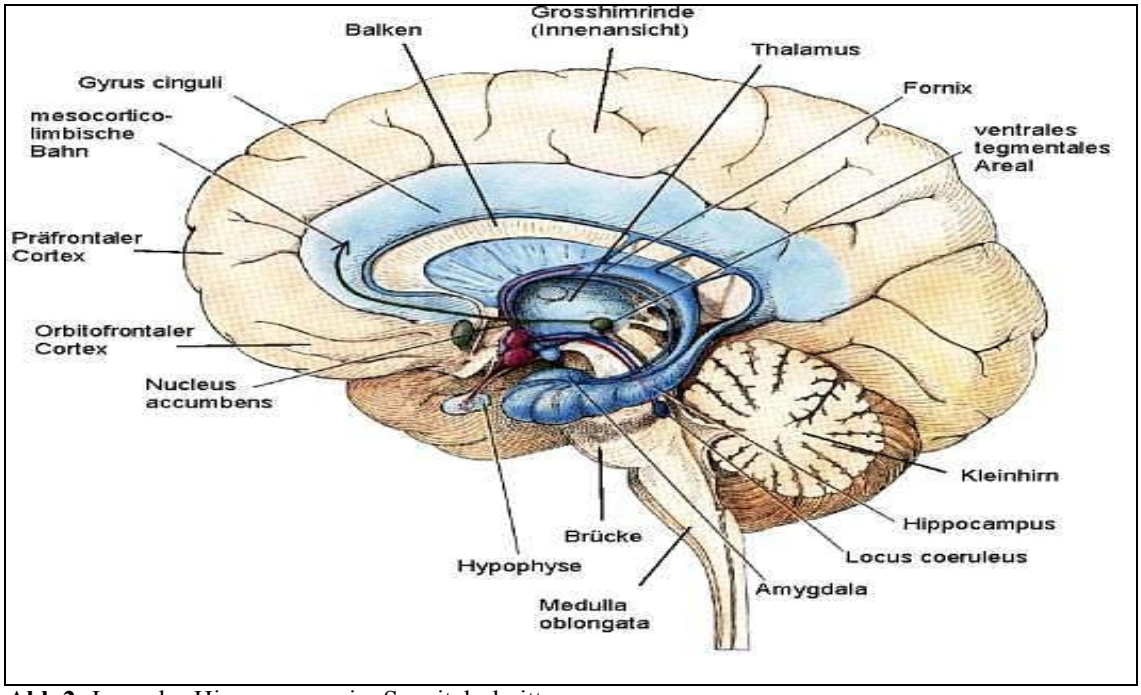

Abb.2: Lage des Hippocampus im Saggitalschnitt
Quelle: http://home.arcor.de/eberhard.liss/hirnforschung/Roth-Bild1.jpg

Die mikroskopische Aufgliederung des Hippocampus wird besonders gut im Koronar-Frontalschnitt deutlich, bei der man die Organisation der hippocampalen Neuronen in zwei sich umgreifenden C-förmigen Zellbändern sehen kann (Abb.3). Das eine Zellband wird von dicht aneinander liegenden, relativ kleinen Neuronen, sog. Körnerzellen, gebildet und formiert sich zum Gyrus dentatus/Fascia dentata. Das andere Zellband besteht aus einem eher lockeren Zellverband größerer, pyramidenförmiger

Neurone und bildet das Pyramidenzellband. Dieses gehört zum Ammonshorn gehört und wird wiederum, aufgrund unterschiedlicher Zellgröße und Verschaltungen, in eine CA1- und CA3-Region unterteilt. Es besitzt einen regelmäßigen dreischichtigen Aufbau. Die Perikarya, der für das Ammonshorn charakteristischen Pyramidenzellen, befinden sich in der zweiten Schicht. Die apikalen und basalen Dendriten der Pyramidenzellen verzweigen sich in der oberen Schicht (Stratum moleculare), die in ein Stratum radiatum und ein Stratum lacunosum-moleculare untergliedert wird, und der dritten Schicht, dem Stratum oriens (Abb.4). Die Dendriten sind reich mit Dornen besetzt, an denen sich die Kontaktstellen mit eingehenden Fasern befinden (Roth, 2001).

Der dritte Teil des Hippocampus, das Subiculum, schließt sich der CA1-Region an und bildet den Übergang vom dreischichtigen Aufbau des Archikortex zum sechschichtigen Aufbau des Neokortex.

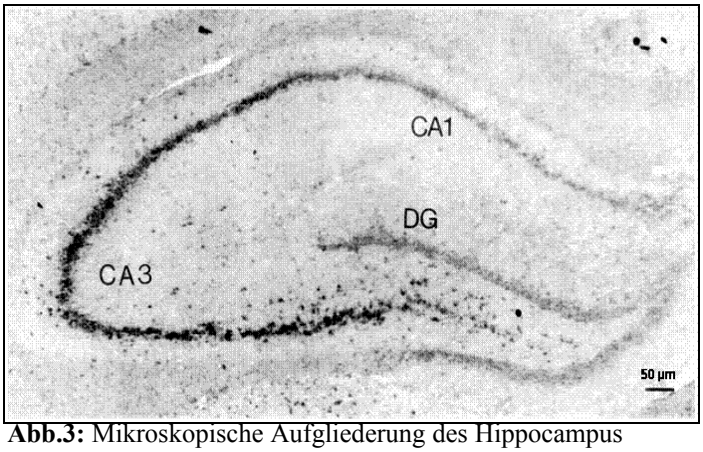

Abb.3: Mikroskopische Aufgliederung des Hippocampus
Quelle: Rune et al., 2002

Weitere zelluläre Bestandteile des Hippocampus sind Gliazellen, wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Sie übernehmen wichtige Aufgaben, wie die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke und die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen. Darüber hinaus werden Astrozyten als an der Synapsenübertragung aktiv Mitwirkende gesehen. Sie umhüllen die Synapsen und scheinen durch Abgabe von Neurotransmittern, wie Glutamat, die neuronale Erregbarkeit zu beeinflussen, welche wiederum Auswirkungen auf die Neubildung von Synapsen haben kann (Araque et al., 1999; Haydon, 2001; Perea and Araque, 2002).

Afferenzen erhält der Hippocampus, der funktionell als großes Integrationsgebiet die ihm zugeleiteten Informationen in zahlreichen Schaltkreisen verarbeitet, vor allem aus

den sensorischen Kortexgebieten. Darüber hinaus erhält der Hippocampus weitere Signale aus dem Hypothalamus, dem Hirnstamm und dem limbischen System selbst.

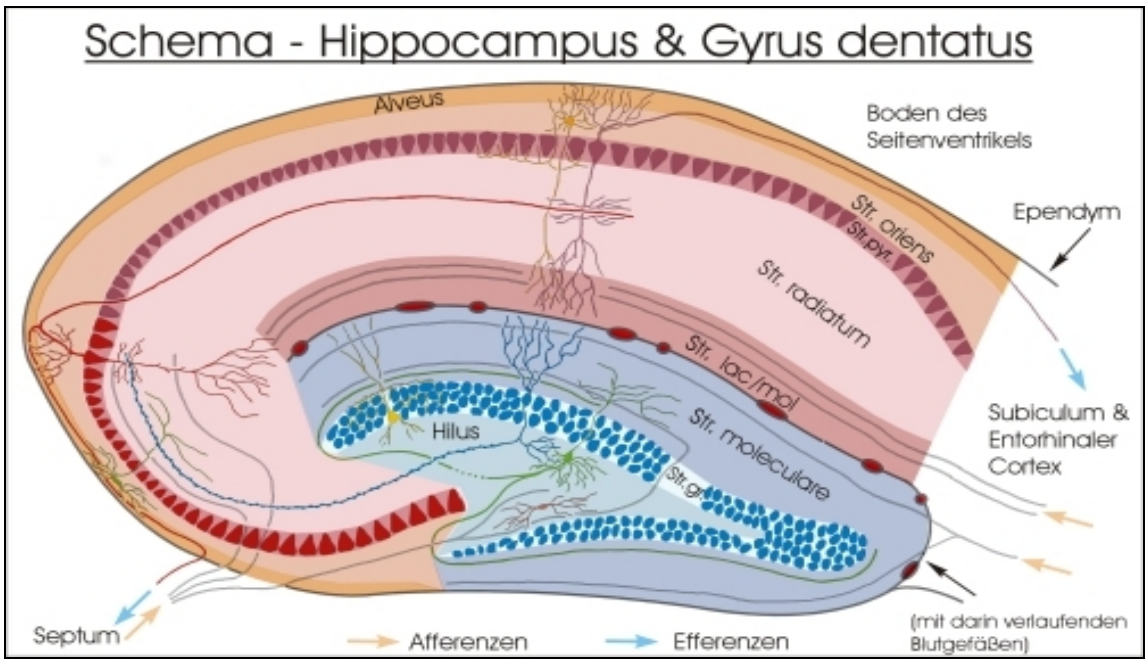

Abb.4: Schichten des Hippocampus
Quelle: http://www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus/hippocampus.html

Die Efferenzen bündeln sich überwiegend zum Fornix cerebri, der mit seinen Fasern u.a. zum Hypothalamus und Anteilen des motorischen Systems sowie zum Thalamus, dem Mittelhirn und den Corpora mammilaria zieht.

Als Teil des limbischen Systems ist der Hippocampus an allen neuronalen Vorgängen, die das Verhalten bestimmen und bei emotionalen Zuständen ablaufen, beteiligt. Als wichtigste Schaltstelle nimmt er Einfluss auf verschiedene vegetative Körperfunktionen, wie z.B. auf Wachsein, Schlafen, Erregung und Aufmerksamkeit. Der Hippocampus nimmt darüber hinaus als Struktur des Papez-Kreises Einfluss auf Emotionen und ist für Lern- und Gedächtnisprozesse unerlässlich.

II. 2 Inhibitoren der hippocampalen Estradiolsynthese

Ungefähr 2/3 der Brustkrebsfälle betrifft Frauen in der Postmenopause. Davon sind etwa 3/4 der Tumore Östrogenrezeptor-positiv (Possinger, 2004; Nadji et al., 2005). Man geht davon aus, dass Östrogen einen wachstumsstimulierenden Einfluss auf diese

ER-positiven Tumore hat. Aufgrund dieser Eigenschaft von Östrogen auf diese Tumore, wurde in der Vergangenheit intensiv an der Entwicklung Ostrogensynthese-hemmender Substanzen geforscht.

Um den letzten Schritt der Estradiolsynthese zu hemmen benötigt man sog. Aromataseinhibitoren (AI). Es wurden verschiedene Inhibitoren gefunden, die kompetetiv an die Aromatase binden, ihre enzymatische Aktivität hemmen und somit die Bildung von Estradiol aus Testosteron verhindern. Zu ihnen zählen Aminoglutethimid (Orimeten®), welches als erstes in der klinischen Therapie eingesetzt wurde, Anastrozol (Arimidex®) und Letrozol (Femara®), die zu den AI der 3.Generation gehören und weniger Nebenwirkungen aufweisen.

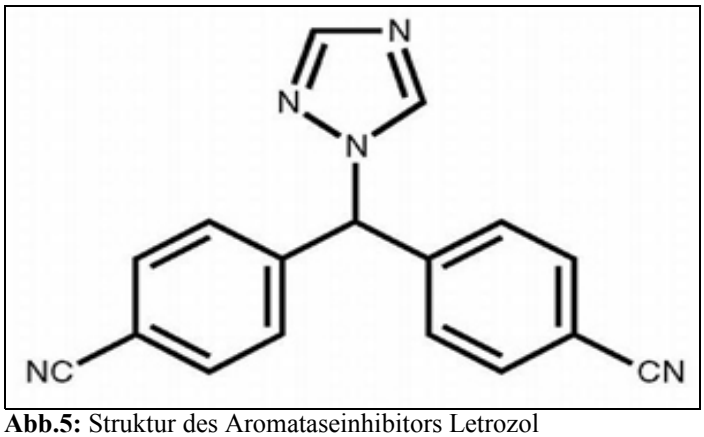

Abb.5: Struktur des Aromataseinhibitors Letrozol
Quelle: http://www.drugs.com/pro/femara.html

Dabei stellt Letrozol (Abb.5) den potentesten der drei aufgelisteten Aromataseinhibitoren dar, welcher in Dosen von 0.1-2.5 mg/Tag bei postmenopausalen Frauen zu einer signifikanten Abnahme des zirkulierenden E2 führte (Iveson et al., 1993).

II. 3 Östrogeneffekte

Östrogene können auf unterschiedlichen Wegen Einfluss auf ihre Zielstrukturen im Organismus nehmen. Die klassische Wirkung der Östrogene wird über einen spezifischen, intrazellulär gelegenen Östrogenrezeptor vermittelt, der zur Gruppe der Steroidrezeptoren gehört. Dieser Effekt, der aufgrund seines Einflusses auf die Transkription der Zelle auch als genomischer Effekt bezeichnet wird, entfaltet seine

Wirkung mit einer gewissen Latenzzeit, die zwischen Stunden und Tagen liegen kann (Beyer, 1999; Behl and Manthey, 2000; Lee and McEwen, 2001). Nach gängiger Lehrmeinung diffundiert dabei E2 aufgrund seiner Lipophilie durch die Zellmembran und bindet an den sich im Zytoplasma befindenden ER. Diese Bindung löst eine Konformationsänderung des Rezeptors mit Abspaltung rezeptor-assoziierter Proteine aus. Anschließend dimerisieren zwei ligandenbesetzte Rezeptoren, werden phosphoryliert und der Hormon-Rezeptor-Komplex in den Zellkern transloziert, wo er an die Promoterregion steroidabhängiger Gene bindet und zusammen mit anderen Regulatoren als Transkriptionsfaktor wirkt (Klinge, 2001).

Mittlerweile sind zwei Isoformen des ER bekannt, die eine große Homologie in ihrer AS-Sequenz zeigen. Sie weisen hinsichtlich ihrer DNA- und Ligandenbindungsdomäne keine wesentliche Unterschiede auf, jedoch große Unterschiede in ihrer Transaktivationsdomäne. Während ERα schon seit längerer Zeit bekannt ist (Green et al., 1986), wurde der ERβ erstmals vor einigen Jahren beschrieben (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996). Seine Wirkung wird zur Zeit, im Gegensatz zum ERα, noch nicht hinreichend verstanden.

In hippocampalen Neuronen konnte mittels *in situ* Hybridisierung ERα und ERβ mRNA, sowie immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern, beide Rezeptor-Isoformen im Kern und Zytoplasma nachgewiesen werden (Osterlund et al., 1998; Shughrue and Merchenthaler, 2000; Wehrenberg et al., 2001; Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003).

Den eben beschriebenen genomischen Effekten von Östrogenen stehen die nicht-genomischen Effekte gegenüber. Bei diesen kommt es innerhalb von Sekunden bzw. Minuten zu einer Östrogenwirkung (sog. „rapid effects“). Diese Östrogenwirkung wird vermutlich über membranständige Rezeptoren (z.B. GPR 30 (G-Protein-gekoppelter Receptor 30)) vermittelt, die möglicherweise intrazelluläre, kalziumabhängige Signalkaskaden, z.B. über MAP-Kinasen oder Phosphoinositid-3-Kinasen, aktivieren (Toran-Allerand et al., 2002; Beyer et al., 2003; Revankar et al., 2005).

Östrogene haben eine Vielzahl von Funktionen im Organismus. Ihre prominenteste und am besten untersuchteste Funktion ist die als weibliches Sexualhormon im weiblichen

Organismus, wo Östrogene u.a. für die Ausprägung der weiblichen Geschlechtsmerkmale, sowie entscheidend für eine regelrechte Sexualfunktion sind. Neben dem Ovar werden im weiblichen Organismus auch das Endometrium und die Mamma zu den klassischen Zielorganen der Östrogene gezählt.

Östrogene üben ihren Einfluss nicht nur auf den Reproduktionstrakt aus, sondern entfalten ihre Wirkung in zahlreichen anderen Geweben. Besonders deutlich wird die Wirkung von Östrogen bei postmenopausalen Frauen, bei denen die Östrogenkonzentration im Serum rapide abnimmt. Bei ihnen kann es nach Sistieren reproduktiver Hormonspiegel zum Auftreten verschiedenster Krankheiten, darunter auch Morbus Alzheimer und Osteoporose kommen.

Neben den Gonaden als Ort der Östrogensynthese, wurde außerhalb des Reproduktionstraktes für eine Vielzahl von Geweben die Fähigkeit zur Östrogensynthese beschrieben. Dazu zählen beim Mann und v.a. bei der postmenopausalen Frau das Fettgewebe, der Knochen, die Haut, evtl. sogar Gefäße und das Gehirn (Simpson et al., 1999).

Da sich diese Arbeit im Wesentlichen mit der hippocampalen Estradiolsynthese befasst und die damit im Zusammenhang stehende Wirkung auf zerebrale Strukturen, wird hierauf im Folgenden noch detaillierter eingegangen.

Östrogeneffekte im Gehirn wurden sehr vielseitig und komplex beschrieben. Verschiedene Studienergebnisse deuten darauf hin, dass Estradiolexposition zu einer Verringerung des Risikos, sowie einer Verzögerung des Fortschreitens neurologischer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Schizophrenie beiträgt. Darüber hinaus kann dies eine schnellere Erholung nach traumatischen Ereignissen, wie z.B. einen Schlaganfall, bewirken (Garcia-Segura et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das ZNS selbst Prozesse in Gang setzt, um sowohl die E2-Synthese als auch die ER-Expression im geschädigten Gewebe zu regulieren.

Die neuroprotektive Wirkung von Östrogenen wird auf unterschiedliche Weise vermittelt. So wird etwa das antiapoptotische Protein Bcl-x(L) in neuronalem Gewebe durch Estradiol vermehrt exprimiert, wodurch Neurone, die durch Toxine geschädigt

wurden, vor dem programmierten Zelltod (Apoptose) geschützt werden (Pike, 1999). Beim Morbus Alzheimer scheinen die antioxidativen Fähigkeiten der Östrogene das Fortschreiten der Erkrankung zu verzögern, indem sie den von den β-Amyloiden induzierten oxidativen Stress in den Neuronen reduzieren (McEwen and Alves, 1999; Behl, 2005).

Des weiteren beeinflussen Östrogene verschiedene Neurotransmittersysteme im ZNS, über welche sie u.a. Einfluss auf kognitive und emotionale Funktionen nehmen. Zu ihnen gehören u.a. das cholinerge System (McEwen, 2002), das serotonerge System (McQueen et al., 1997; Prange-Kiel et al., 2004; Rocha et al., 2005) sowie das dopaminerge System (McEwen and Alves, 1999; Cyr et al., 2002).

Ebenfalls konnte in zahlreichen Versuchen gezeigt werden, dass die Unterbindung der hippocampalen E2-Synthese durch Letrozol zu einem massiven Rückgang der Spinesynapsen und präsynaptischen Boutons, sowie verschiedener synaptischer Marker, wie Spinophilin und Synaptophysin führte. Dieser Rückgang kann als Ausdruck neuer Spineformationen gedeutet werden (Kretz et al., 2004).

Es ist bekannt, dass neben dem direkten Einfluss von hippocampalem E2 auf die Synapsenformation im Hippocampus auch gonadales E2 über subkortikale Strukturen, wie etwa die mediane Raphe, indirekte Effekte auf die synaptische Plastizität im Hippocampus ausübt (Prange-Kiel et al., 2004).

II. 4 Regelkreislauf der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse

Der Hypothalamus stellt zusammen mit der Hypophyse und den Gonaden einen fein abgestimmten Regelkreislauf dar, die sog. hypothalamo-hypophysäre-gonadale-Achse (HHG-Achse). Sie leistet einen wesentlichen Beitrag für die humorale Homöostase des Organismus, indem sie die Blutspiegel von Androgenen und Östrogenen reguliert und diese eine regelrechte sexuelle Entwicklung und Differenzierung gewährleisten.

Das in den Gonaden gebildete Östrogen wird an das Blut abgegeben, wo es gebunden an einem Testosteron-Östrogen-Bindungsprotein über den Blutweg zum Hypothalamus und zur Hypophyse transportiert wird (Abb.6).

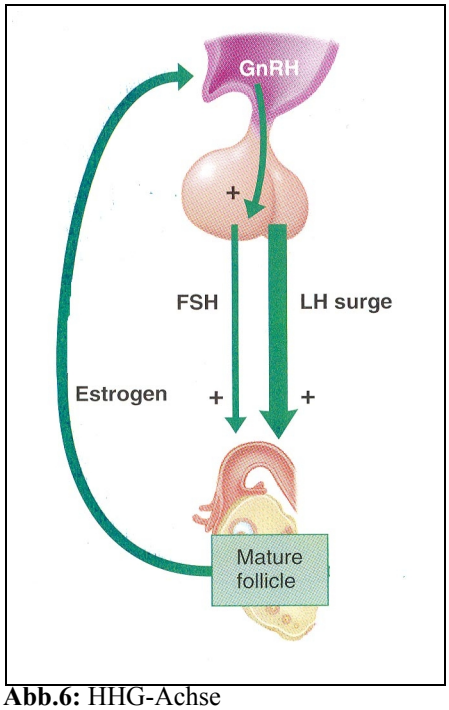

Abb.6: HHG-Achse
Quelle: Pearson International Edition, Human Biology, Concepts and Current Issues, 4th Edition, Michael D. Johnson

Abhängig vom Menstruationszyklus hat das im Ovar synthetisierte Estradiol sowohl einen fördernden, als auch einen hemmenden Einfluss auf die Strukturen der HHG-Achse und nimmt darüber stadiengerecht Einfluss auf die Synthese und Sekretion der gonadotropen Hormone.

In der Follikelphase (ersten 14 Tage des Zyklus) hat E2 v.a. auf die gonadotropen Zellen der Hypophyse einen fördernden Einfluss (positive Rückkoppelung). Hier kommt es zum Anstieg von LH und FSH im Blut. In der Gelbkörperphase (letzten 14 Tage des Zyklus) ist ihre Wirkung entgegengesetzt. Hier kommt es zu einer Hemmung der gonadotropen Zellen der Hypophyse durch Östrogen. Dabei scheint der ERα der entscheidende Rezeptor zu sein, über den sowohl eine negative, als auch eine positive Rückkopplung auf die Gonadotropinsekretion vermittelt wird (Lindzey et al., 2006). Progesteron kann die GnRH-Wirkung an den Hypophysenzellen nur nach vorheriger Östrogenexposition verstärken. Darüber hinaus erfolgt, analog zum Mann, eine selektive Hemmung der FSH-Sekretion durch Inhibin, das in den Granulosazellen der Ovarien gebildet wird.

II. 5 GnRH und sein Rezeptor

Dem Gonadotropin-Releasing Hormon kommt im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor eine Schlüsselrolle im Rahmen der Reproduktion von Säugetieren zu. Es ist ein aus 10 Aminosäuren bestehendes Dekapeptid. Dieses stellt das zentrale Hormon bei der Synthese und Freisetzung von follikelstimulierendem Hormon und luteinisierendem Hormon aus den gonadotropen Zellen der Hypophyse dar (Conn, 1994).

Syntheseort des Hormons sind bei der adulten Ratte Neurone im medialen Septum (MS), dem rostralen Hypothalamus und der präoptischen Area (Herbison, 1998).

Die Kommunikation zwischen Hypothalamus und der Hypophysen-Ovar-Achse läuft über GnRH. Die Hauptprojektionen der GnRH-bildenden Neurone ziehen zum Kapillarplexus der Eminentia mediana, die sich am Hypophysenstiel befindet. Dort findet in regelmäßigen Abständen von 90-120 min unter Kontrolle des Nucleus arcuatus für einen Zeitraum von etwa 1 Minute die pulsatile Freisetzung von GnRH in ein fenestriertes Kapillarsystem statt. Anschließend perfundiert GnRH die Kapillaren des Portalsystems der Adenohypophyse und steuert durch Stimulation der Hypophysenhormone FSH und LH den Menstruationszyklus (Knobil and Hotchkiss, 1988).

Neben diesem indirekten Einfluss auf die gonadale E2-Synthese wurde auch eine direkte GnRH-Wirkung im Ovar beschrieben. *In vivo* und *in vitro* Versuche konnten zeigen, dass niedrige Dosen GnRH in ovariellen Granulosazellen zu einer gesteigerten E2-Synthese und hohe Dosen zu einer Hemmung der E2-Synthese führten (Parinaud et al., 1988; Janssens et al., 2000).

Viele der GnRH-synthetisierenden Neurone projizieren nicht in die Eminentia mediana, sondern suchen andere Zielstrukturen im zentralen Nervensystem auf, um dort direkte Effekte zumindest auf solche Areale auszuüben, die mit dem Reproduktionsverhalten in Zusammenhang stehen (Jennes et al., 1997). So deuteten Versuche darauf hin, dass GnRH, neben seiner gut bekannten Wirkung auf die Gonadotropine, als Neurotransmitter und/oder Modulator im ZNS fungiert (Pfaff et al., 1994).

Erst kürzlich konnte bei der Ratte gezeigt werden, dass die hippocampale E2-Synthese, und damit indirekt die synaptische Plastizität, dosisabhängig durch GnRH direkt beeinflusst wird (Prange-Kiel et al., 2008).

Seit einiger Zeit weiß man, dass es bei den meisten Wirbeltieren, unter anderem auch beim Menschen, neben dem gut erforschten GnRH, welches in hypothalamischen Neuronen gebildet wird und die Freisetzung von FSH und LH aus der Hypophyse stimuliert, dem GnRH-I, noch ein weiteres, sog. GnRH-II, existiert. Dieses unterscheidet sich vom GnRH-I in seiner Struktur in 3 Aminosäuren an den Positionen 5,7 und 8 ($His^5Trp^7Tyr^8$GnRH-I) (Cheng and Leung, 2005). Es konnte in der Ratte bisher nicht nachgewiesen werden. Hier stehen noch eine Vielzahl von Untersuchungen aus, um die genaue Wirkung des GnRH-II zu verstehen.

Der GnRH-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der zur Familie der 7-Transmembranrezeptoren gehört (Abb.7).

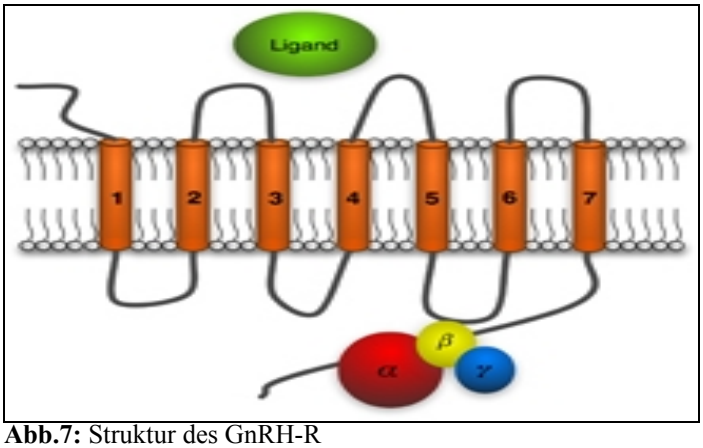

Abb.7: Struktur des GnRH-R
Quelle: http://phylogenomics.berkeley.edu/AnimalProteome/gpcr_banner.jpg

Eine Vielzahl von Bindungsstudien mit unterschiedlichen radioaktiv markierten GnRH-Agonisten als Liganden wurden bei der Ratte durchgeführt, um weitere Lokalisationen der GnRH-R im ZNS zu entschlüsseln. Dabei entdeckte man Bindungsstellen für GnRH u.a. im lateralen Septum, in den Nuclei ventromediales und arcuatus, der Amygdala und dem Hippocampus. Bei letzterem präsentierte sich der Gyrus dentatus frei von GnRH-R, wohingegen das Str. oriens und das Str. radiatum der CA1-CA3-Regionen Rezeptor-positiv waren. Die höchste Dichte an GnRH-R wurde jedoch im Parasubiculum gemessen (Badr and Pelletier, 1987; Reubi et al., 1987; Jennes et al., 1988; Leblanc et al., 1988).

Nach Entschlüsselung der DNA-Sequenz des GnRH-R Gens (Eidne et al., 1992, Kaiser et al., 1992; Kakar et al., 1994), konnten mittels *in situ* Hybridisierung große Übereinstimmungen mit den Ergebnissen aus den oben beschriebenen Bindungsstudien gezeigt werden (Jennes and Woolums, 1994).

Analog zum GnRH wurde ein Subtyp des GnRH-R gefunden, der GnRH-R II. Dieser konnte bisher beim Menschen nicht nachgewiesen werden (Cheng and Leung, 2005).

Die Anzahl der GnRH-R, die von den unterschiedlichen Zellen auf ihren Zelloberflächen präsentiert werden, ist nicht konstant. Die Anzahl der Rezeptoren, der G-Proteine sowie der Gehalt an GnRH-R mRNA Spiegel im Hippocampus, variiert während des Estruszyklus der Ratte (Bouvier et al., 1991; Jennes et al., 1996; Stanislaus et al., 1998).

Weitere Untersuchungen, die zum besseren Verständnis des Regulationsmechanismus der GnRH-R-Expression beitragen sollten, ergaben u.a., dass die Bindung von GnRH an seinen Rezeptor in der Hypophyse ein potenter Stimulus für die verstärkte Expression verschiedener Gene, wie auch für das Rezeptorgen selbst, ist. Dabei wird die GnRH-R-Expression dynamisch von GnRH reguliert, wobei es bei subnanomolaren Konzentrationen zu einer Hochregulation der Rezeptorexpression kam und hohe Konzentrationen einen Abfall der Expression verursachten (Loumaye and Catt, 1982; McArdle et al., 1987; Tsutsumi et al., 1993; Tsutsumi et al., 1995).

Versuche an ovariellen Granulosazellen der Ratte haben gezeigt, dass Estradiol die GnRH-R mRNA-Expression beeinflusst. Dabei führte die 24 h Behandlung mit E2 in verschiedenen Dosen (1-100 nM) zu einer signifikanten Abnahme der GnRH-R mRNA-Expression. Die 6 h Stimulation mit E2 (1 nM) führte im Gegensatz zu längeren Stimulierungszeiten zu einer signifikanten Zunahme der GnRH-R mRNA (Nathwani et al., 2000). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher noch nicht geklärt.

Die Bedeutung eines funktionstüchtigen GnRH-R für eine regelrechte sexuelle Entwicklung, zeigt das Krankheitsbild des hypogonadotropen Hypogonadismus, bei dem u.a. auch eine Mutation im humanen GnRH-R zu einer verspäteten sexuellen

Entwicklung führt und einen niedrigen Gonadotropin- und Sexualhormonspiegel zur Folge hat (Seminara et al., 1998; Millar et al., 2004).

II. 6 LH und sein Rezeptor

LH wird wie FSH in den gonadotropen Zellen der Hypophyse synthetisiert und nach Stimulation durch GnRH an das zirkulierende Blut abgegeben. Auf diesem Weg erreichen die Gonadotropine ihr primäres Zielorgan, die Gonaden. Sie stimulieren die Sexualhormonsynthese und Gametogenese in den Gonaden beider Geschlechter, was Voraussetzung einer regelrechten Reproduktion ist.

LH gehört mit dem in der Plazenta synthetisierten humanen Choriongonadotropin (hCG), dem FSH und dem Thyroidea-stimulierenden Hormon (TSH) zur Gruppe der heterodimeren Glykoproteinhormone, die aus einer identischen α-Untereinheit mit 92 Aminosäuren (AS) und einer unterschiedlichen, für die Rezeptorbindung spezifischen, β-Untereinheit mit 115 bzw. 118 AS bestehen. Aufgrund der großen Homologie (ca. 85%) der β-Untereinheit von LH und hCG kann auch hCG an den LH-R binden (Shome and Parlow, 1973).

LH hat eine zentrale Rolle im ovulatorischen Zyklus der Frau. Während des Zyklus fördert LH die Östrogensynthese in den Granulosazellen des Ovars. Am Ende der Follikelphase löst E2 über einen positiven Feedback-Mechanismus eine gesteigerte LH-Sekretion der Hypophyse aus, den sog. LH-Peak, welcher nach Bindung an den LH-R des reifen Follikels die Ovulation auslöst.

Der LH-R, genau wie der GnRH-R, ist ein GPCR und gehört zur Gruppe der 7-Transmembranrezeptoren (Abb.8). Er wird v.a. in den interstitiellen Leydig Zellen des Hodens bzw. in den Theca- und Granulosazellen des reifen Follikels im Ovar exprimiert, wo er eine Schlüsselrolle in der Physiologie der Reproduktion einnimmt.

Darüber hinaus wurde der LH-R auch in diversen anderen, nichtgonadalen Geweben beschrieben, wie z.B. in der Prostata von Mensch und Ratte (Reiter et al., 1995; Dirnhofer et al., 1998), in der Nebennierenrinde von Mensch und Maus (Kero et al.,

2000) und im ZNS (Croxatto and Arrau, 1964; Bagshawe et al., 1968; Gross and Page, 1979; Hostetter et al., 1981; Emanuele et al., 1983; Balasinor et al., 1992). Dabei zeigte der Hippocampus der Ratte höhere Anteile an LH-R-protein und mRNA als andere Hirnareale, was mittels *in situ* Hybridisierung und Autoradiographie nachgewiesen werden konnte (Lei et al., 1993).

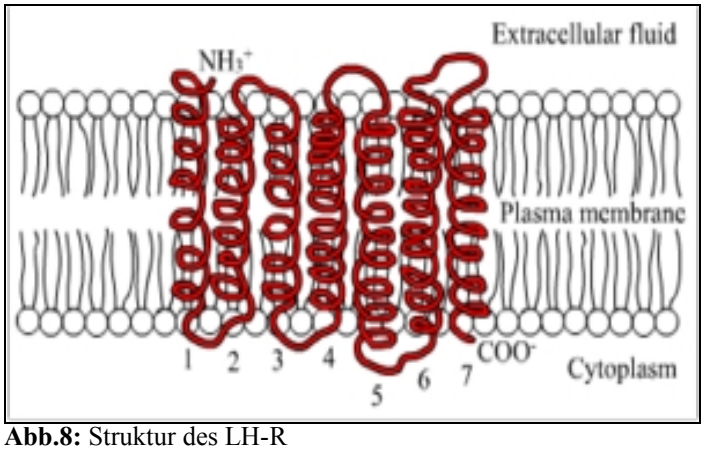

Abb.8: Struktur des LH-R
Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/Image:7TM_receptor.png

Sowohl die LH-R Dichte auf der Zelloberfläche der Granulosazellen als auch die der GnRH-R, variiert im Zuge des Menstuationszyklus. Die LH-R Expression nimmt zu, je mehr sich die Follikelreifung in Richtung Graaf'scher Follikel entwickelt. Dabei führt, bis zur präovulatorischen Phase, das Angebot an FSH und Estradiol in den Granulosazellen zu einer Induktion der LH-R-Expression (Richards and Kersey, 1979).

II. 7 Fragestellung

Wir wiesen vor kurzem nach, dass hippocampale Neurone Östrogen *de novo* synthetisieren (Prange-Kiel et al., 2003). Desweiteren deuten Versuche in unserem Labor darauf hin, dass das Ausmaß der hippocampalen Estradiolsynthese bei weiblichen Ratten mit dem Zyklus korreliert. Aus Bindungsstudien ist bekannt, dass Rezeptoren für GnRH und LH im Hippocampus vorhanden sind und sich ihre Expression zyklusabhängig verändert (Richards and Kersey, 1979; Bouvier et al., 1991; Jennes et al., 1996; Stanislaus et al., 1998). Es ist denkbar, dass diese Hormone, welche die ovarielle Östrogensynthese regulieren, auch Einfluss auf die hippocampale Östrogensynthese nehmen. In der vorliegenden Dissertation soll der Nachweis des GnRH- bzw. LH-Rezeptors auf Proteinebene in hippocampalen Dispersionskulturen erfolgen, seine Lokalisation beleuchtet und untersucht werden, ob die GnRH- und LH-Rezeptor-Expression in hippocampalen Neuronen durch appliziertes und/oder hippocampal synthetisiertes Östrogen reguliert wird.

III. Material und Methoden

III. 1 Material

III. 1. a Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Aluminiumfolie	LAGER UKE
Axio Vision 3.1 (Software)	CARL ZEISS
Brutschrank WTC	BINDER
Cutfix Surgical Disposable Scalpel	BRAUN
Deckgläser	MARIENFELD
ep T.I.P.S. Standard, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Excel 2000 (Software)	MICROSOFT
Falcon Cell Strainer, 40 µm Nylon	BECTON DICKINSON
Falcon Tissue Cultur Plate, 24 *well*	BECTON DICKINSON
Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml	BECTON DICKINSON
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	LIEBHERR
Handschuhe	KIMBERLY-CLARK
Heidemannspatel	AESCULAP DE
ImageTool 3.0 für Windows (Software)	UNIVERSITY OF TEXAS HEALTH SCIENCE CENTER/SAN ANTONIO
Instrumentenkasten	MERCK
Kosmetiktücher Samtess	WEPA
Kühlschrank	BOSCH
Mikroskop Axiovert 2	CARL ZEISS
Mikroskop Axiovert 25	CARL ZEISS
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm^2	BRAND GERMANY
Openlab 3.1.5 (Software)	IMPROVISION
Parafilm M	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
Pasteurpipetten, 25 cm	MERCK
Photoshop 7.0 (Software)	ADOBE
Pinzette nach Dumont	MERCK
Pipetten, diverse	GILSON
Pipettenspitzen, diverse	BECTON DICKINSON
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	EPPENDORF AG
Schwere	AESCULAP DE
See 5.0 (Software)	ACD
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
SPSS für Windows (Software)	SPSS GmbH SOFTWARE
Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Waage	SATORIUS
Wasserbad mit Schüttler	GFC
Windows 2000 (Software)	MICROSOFT
Windows XP (Software)	MICROSOFT
Word 2000 (Software)	MICROSOFT
Zellstofftücher	WEPA
Zentrifuge Universal 32R	HETTICH

III. 1. b Chemikalien

Albumine, Bovine, BSA, A 7906	SIGMA
Aqua ad iniectabilia, 1l	BAXTER DEUTSCHLAND
B27 Supplement	GIBCO
Barrycidal 36, Desinfektionsmittel	HELMUT SCHRÖDER
β-Estradiol-Water soluble, 100 mg	SIGMA
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	GIBCO
DAKO	DAKO CYTOMATION
DAPI	SIGMA
Ethanol, 70%, 96%	APOTHEKE UKE
Formaldehydlösung, 37%	MERCK
Kontroll-Peptid GnRH-R	SANTA CRUZ
Kontroll-Peptid LH-R	ACRIS
L-Glutamin, 200 mM	GIBCO
Letrozol	NOVARTIS
Natronlauge 1 N	MERCK
Neurobasal A Medium	GIBCO
Neurobasal A Medium ohne Phenolrot	GIBCO
Normal-goat-serum (NGS), 3%	SIGMA
Normal-donkey-serum (NDS), 2%	SIGMA
Normal-rabbit-serum (NRS), 2%	SIGMA
Normal-chicken-serum (NChS), 2%	SIGMA
PBS Tabletten	GIBCO
Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Poly-D-Lysin	SIGMA
Salzsäure	MERCK
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	INVITROGEN
Trypsin/EDTA	BIOCHROM

III. 1. c Antikörper

Primärantikörper	Firma	Poly/Monoklonal	Herkunft	Verdünnung in PBS
anti-CD11b	Serotec	Monoklonal	mouse anti rat	1 : 500
anti-GFAP	Chemicon	Polyklonal	rabbit anti rat	1 : 1000
anti-GFAP	Sigma	Monoklonal	mouse anti rat	1 : 500
anti-MAP2	Chemicon	Polyklonal	rabbit anti rat	1 : 500
anti-MOSP	Chemicon	Monoklonal	mouse anti rat	1 : 500
anti-GnRH-R	Santa Cruz	Polyklonal	goat anti rat	1 : 250
anti-LH-R	Acris	Polyklonal	rabbit anti rat	1 : 750
anti-NeuN	Chemicon	Monoklonal	mouse anti rat	1 : 100

Tab.1: Liste der verwendeten Primärantikörper

Sekundärantikörper	Firma	Herkunft	Verdünnung in PBS
Alexa Flour 546	Molecular Probes	donkey anti goat	1 : 250
Alexa Flour 488	Molecular Probes	goat anti rabbit	1 : 350
Alexa Flour 488	Molecular Probes	chicken anti rabbit	1 : 350
Alexa Flour 488	Molecular Probes	chicken anti mouse	1 : 350
Alexa Flour 488	Molecular Probes	goat anti mouse	1 : 350
Cy3	Jackson Immuno Research	goat anti mouse	1 : 350

Tab.2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

III. 1. d Lösungen

PBS:
- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
- 1 Liter Aqua dest.
- pH=7,4 bei Raumtemperatur

alternativ:
- 500 ml Aqua dest.
- 1 PBS Tablette
- Titration bis pH=7,4 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCL (1 mol/l)

bFGF:
- 5 mM Tris in Aqua dest. gelöst, pH=7,6, sterilfiltern
- 50 µl bFGF in 1000 µl Tris-Lösung lösen, vortexen und aliqotieren
- bei -25°C lagern

Kulturmedium für Dispersionskultur:
- 50 ml Neurobasal A
- 500 µl B27
- 125 µl L-Glutamin (200 mM)
- 500 µl Penicillin/Streptomycin
- 50 µl bFGF

Beschichtung der Kulturplatten:
- 600 µl Poly-d-Lysin (0,1 mg/ml Aqua dest.) pro Kavität
- 1 h Inkubation
- abpipettieren und Spülung mit Neurobasal A (mit Phenolrotzusatz)
- mind. 2 h trocknen lassen

BSA 2%:
- 2 g bovines Albumin in 100 ml PBS lösen, suspendieren

Fixierung:
- 5 ml Formaldehyd 37%
- 45 ml PBS

III. 2 Methoden

III. 2. a Präparation der Hippocampi aus der Ratte

Die Präparation der Hippocampi führten wir unter semisterilen Bedingungen durch. Wir verwendeten Rattenhippocampi von 5 Tage alten Tieren des Zuchtstamms *WISTAR*, denen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung standen.

Die Ratten wurden decapitiert und die Haut über der Schädelkalotte mit einer Schere aufgetrennt und entfernt. Das nun freiliegende Schädeldach wurde mit einer feinen Schere median sagittal eröffnet und das Gehirn vorsichtig mit Hilfe eines Heidemannspatels aus dem Schädel herausgehoben. Das frisch präparierte Gehirn wurde anschließend auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt. Daraufhin wurde das Kleinhirn und der Hirnstamm mit Hilfe eines Skalpells entfernt und die beiden Hemisphären durch einen sagittal medianen Schnitt voneinander getrennt. Nach Beiseiteschieben des Hirnstamms wurde der Hippocampus sichtbar und mit einem Heidemannspatel vorsichtig aus dem umliegenden Gewebe gelöst. Um das Auftreten von Ischämieschäden zu verringern wurde der Hippocampus auf eine gekühlte mit PBS gefüllte Petrischale gegeben.

III. 2. b Hippocampale Dispersionskultur

Bei der Herstellung hippocampaler Dispersionskulturen hielten wir uns, mit einigen Modifikationen von Prange-Kiel (Prange-Kiel et al., 2003), an die Methode von Brewer (Brewer, 1997).

Einen Tag vor Beginn der Herstellung der Dispersionskulturen wurden die 24 *well* Titerplatten beschichtet. Dafür platzierten wir in jedem *well* ein Glasplättchen, das mit 600 µl Poly-D-Lysin beschichtet wurde. Nach 1 Stunde wurde das Poly-D-Lysin abgesaugt und Neurobasal A hinzu gegeben, was nach kurzem Schwenken wurde erneut abgesaugt wurde. Anschließend wurde die Titerplatte leicht geöffnet unter einer Sicherheitswerkbank bis zum nächsten Morgen aufbewahrt.

Die weitere Präparation der entnommenen Hippocampi fand unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank statt. Zunächst wurden die Hippocampi, in der Regel 20 Stück, in eine größere Petrischale überführt und unter leichtem Schwenken und mehrmaligem Spülen mit PBS von überschüssigem Gewebe und Erythrozyten befreit. Anschließend wurden die Hippocampi für ca. 30 Sekunden mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und nach erneuter Zugabe von ca. 40 ml PBS in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 4°C mit 5000 U/min für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und zum Zellpellet, zur Verdauung der extrazellulären Proteine, pro präpariertes Gehirn 500 µl vorgewärmtes (37°C) Trypsin/EDTA gegeben. Unter mehrmaligem Schütteln wurde das Falconröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben und der Verdauungsprozess nach 2.5 Minuten durch Zugabe von 10 ml Neurobasal A gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein Nylon-Sieb (Zell Strainer, 40 µm), das größere unverdaute Bestandteile am Durchdringen hindert, in ein neues Röhrchen überführt.
Im Anschluss folgten zwei Waschgänge mittels Zentrifugation bei 4°C mit 5000 U/min für 5 Minuten, wobei wir vor der zweiten Zentrifugation Neurobasal A Medium (Phenolrot-frei) hinzugaben. Da es Untersuchungen gibt, die eine östrogenähnliche Wirkung von Phenolrot beschreiben (Berthois et al., 1986), wurde in den nachfolgenden Schritten nur Phenolrot-freies Neurobasal verwendet, um mögliche Beeinflussungen unserer Ergebnisse zu verhindern. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, gaben wir eine definierte Menge Neurobasal A zum Pellet, woraufhin die fertige Zellsuspension mit dem Vortex durchgemischt wurde.

Anschließend wurde die für die spätere Zelldichte der Kultur entscheidende Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch Hinzufügen von Neurobasal A wurde die Zellsuspension auf eine Zelldichte von 100.000 Zellen/ml eingestellt und je 1 ml auf die mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen gegeben.

Die Kulturplatten wurden anschließend für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO_2 in den Brutschrank gestellt, damit sich die Neurone unter optimalen Bedingungen an die Glasplättchen heften konnten.

Nun wurden die mit Zellen behafteten Glasplättchen nacheinander in eine neue Kulturplatte überführt, wodurch die noch nicht adherierten Astrozyten in der Kavität verblieben, und pro Kavität 1 ml Kulturmedium (KM) hinzu gegeben.

Der erste KM-Wechsel wurde nach 24 Stunden durchgeführt. Im weiteren Verlauf führten wir, bis nach 9 Tagen die Fixierung der Dispersionskultur anstand, die KM-Wechsel im 48 h Rhythmus durch. Unter ständiger mikroskopischer Kontrolle wurden die Kulturen im Brutschrank aufbewahrt. Bereits nach einigen Tagen konnte man das Aussprossen von Fortsätze beobachten und verfolgen, wie sich unter *in vitro* Bedingungen Zellverbände bildeten.

Nach diesem Protokoll entsteht eine Dispersionskultur, welche zu 80% aus neuronalen Zellen, zu 12% aus Astrozyten und einem Rest aus Oligodendrozyten und Mikroglia besteht (von Schassen et al., 2006)

III. 2. c Stimulation und Inhibition

Nach 3 Tagen Vorkultur wurden die Zellen im 48 h Rhythmus 3 mal behandelt. Zur Inhibition der hippocampalen Estradiolsynthese verwendeten wir den Aromatase-Inhibitor Letrozol in einer Konzentration von 100 nM. Wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, erzielt diese Konzentration eine sehr potente Hemmung der Estradiolsynthese hippocampaler Neurone (Prange-Kiel et al., 2003).

Zur Stimulation der Dispersionskultur verwendeten wir 17β-Estradiol (E2) in ebenfalls einer Konzentration von 100 nM. Diese Dosis zeigte keine toxischen Effekte auf die Zellen (Behl and Manthey, 2000) und führte zu einer signifikanten Zunahme der ERα-Färbung in Slicekulturen (Rune et al., 2002) sowie zu einer Zunahme des Axonwachstums (von Schassen et al., 2006).

In allen Versuchsreihen dienten unbehandelte Kulturen als Kontrolle, welche ausschließlich mit KM behandelt wurden. Während der Inkubation wurden die Kulturplatten in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 aufbewahrt.

III. 2. d Fixierung der hippocampalen Dispersionskultur

Nach abgeschlossener Behandlung und mikroskopischer Begutachtung wurden die Kulturen mit Formaldehydlösung (3,7% in PBS) fixiert. Dafür wurde das KM vorsichtig aus den Kavitäten abgesaugt und durch 1 ml Formaldehydlösung ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Formaldehydlösung erneut abgesaugt und die Zellen 3 mal für 5 min mit PBS gespült. Nach der letzten Spülung wurde erneut 1 ml PBS in jede Kavität gegeben, die Titerplatte mit Parafilm versiegelt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Im fixierten Zustand konnten die Zellen bis zu 6 Monate im Kühlschrank gelagert werden.

III. 2. e Immunhistochemie der Dispersionskulturen

Die mit fixierten Zellen behafteten Glasplättchen wurden vorsichtig *well* für *well* in eine neue Titerplatte überführt, 1 ml PBS hinzu gegeben und 3 mal für 5 min mit PBS gewaschen. Nun wurden die Kulturen bei RT mit einer Blockierungslösung für 30 min inkubiert, um unspezifische Immunreaktionen zu vermindern. Dabei wurde das Serum für die Blockierung aus dem Tier verwendet, aus dem der sekundäre Antikörper stammt. Wir verwendeten in unseren Versuchen überwiegend Normal Goat Serum (NGS 2%) und Normal Donkey Serum (NDS 2%).

Anschließend wurde die Blockierungslösung durch den in PBS gelösten Primärantikörper ersetzt. Als Primärantikörper verwendeten wir den GnRH-R Antikörper und den LH-R Antikörper. Die genauen Dosierungen, die Herkunft sowie die Firmennamen wurden in der Tabelle im Abschnitt III. 1. c aufgeführt. Die Inkubation erfolgte für 12 h bei 4°C im Kühlschrank.

Im Anschluss wurde die Lösung abpipettiert und jedes *well* 3 mal für 10 min mit 1 ml PBS gespült. Im Anschluss folgte die Zugabe des Flourochrom-markierten in PBS gelösten Sekundärantikörpers. Da die Sekundärantikörper sehr lichtempfindlich sind, wurde bei den nachfolgenden Schritten der Lichteinfall möglichst gering gehalten. Wir verwendeten zur Anfärbung des GnRH-R Antikörpers überwiegend einen Alexa 546-

markierten Antikörper, sowie einen Alexa Flour 488-markierten Antikörper für den LH-R Antikörper. Die anschließende Inkubation erfolgte für 1 h bei RT im Dunkeln.
Die Lösung wurde nach Ablauf der Zeit abpipettiert und die Zellen erneut 3 mal für 10 min mit PBS gewaschen. Die Anfärbung der Kerne führten wir mit 1 ml DAPI (1:100.000) pro *well* durch. Nach 3 min wurde der Farbstoff abgesaugt und die Kavitäten abschließend mit PBS gespült (3 mal für 10 min). Nun wurden die einzelnen Glasplättchen aus den Kavitäten auf je einen Objektträger überführt und mit ein bis zwei Tropfen DABKO (fluoreszenzfreies Eindeckmedium) versehen. Im Anschluss wurden die Glasplättchen vorsichtig mit einem Deckgläschen bedeckt.

Bei jeder Immunhistochemie gab es eine negativ-Kontrolle, bei der, um die Spezifität des Sekundärantikörpers zu kontrollieren, anstelle des Primärantikörpers nur PBS hinzu gegeben wurde.

III. 2. f Präabsorptionsversuch

Nachdem die geeigneten Antikörper für den GnRH- und LH-Rezeptor ausgewählt und in diversen Vorversuchen die optimalen Konzentrationen ermittelt wurde, führten wir einen sog. Präabsorptionsversuch durch. Dieser dient zur Spezifitätsbestimmung des primären Antikörpers.

Dabei wurde der primäre Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen (Ak:Peptid: 1:1, 1:10, 10:1 und 1:0) mit einem für den jeweiligen primären Antikörper spezifischen Peptid inkubiert. Das Peptid bindet den Primärantiköper und verhindert eine Bindung des Antikörpers an die Strukturen des Rezeptors. Daraus resultiert in der anschließenden Immunhistochemie eine verminderte Rezeptoranfärbung, da das Primärantikörper-Peptid-Gemisch aufgrund der fehlenden Bindung in nachfolgenden Waschvorgängen aus den *wells* gelöst wird und der Sekundärantikörper daraufhin an weniger Primärantikörper binden kann.

Nach 1h Inkubationszeit führten wir mit dem Ak-Peptid-Gemisch eine Immunhistochemie, wie oben beschrieben, durch. Anschließend wurden die Ergebnisse unter dem Mikroskop ausgewertet.

III. 2. g Doppelinkubation

Um zu untersuchen, welche der verschiedenen Zellpopulationen GnRH-R bzw. LH-R positiv sind, wurden weitere Versuche durchgeführt. Diese Versuche entsprachen im Grundsatz dem oben beschriebenen Vorgehen, wobei eine andere Blockierung, sowie andere Antikörper verwendet wurden. Die Details zu den verwendeten Antikörpern sind im Abschnitt III. 1. c. aufgeführt.

- Doppelinkubation mit dem GnRH-R Antikörper und einem polyklonalen MAP2 (microtuble associated protein 2)-Antikörper zum Anfärben von Neuronen. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 546-Antikörper, sowie ein Alexa 488-Antikörper verwendet.

- Doppelinkubation mit dem GnRH-R Antikörper und einem GFAP (glial fibrillary acid protein)-Antikörper der Firma Chemicon zum Anfärben von Astrozyten. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 546-Antikörper, sowie ein Alexa 488-Antikörper verwendet.

- Doppelinkubation mit dem GnRH-R Antikörper und einem MOSP (myelin/oligodendrocyte specific protein)-Antikörper zum Anfärben von Oligodendrozyten. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 546-Antikörper, sowie ein Alexa 488-Antikörper verwendet.

- Doppelinkubation mit dem GnRH-R Antikörper und einem CD11b (Cluster of Differentiation molecule 11b)-Antikörper zum Anfärben von Mikroglia. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 546-Antikörper, sowie ein Alexa 488-Antikörper verwendet.

- Doppelinkubation mit dem LH-R Antikörper und einem NeuN (Neuronal Nuclei)-Antikörper, ein Neuronalmarker. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 488-Antikörper, sowie ein Cy3-Antikörper verwendet.

- Doppelinkubation mit dem LH-R Antikörper und einem GFAP-Antikörper der Firma Sigma. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 488-Antikörper, sowie ein Cy3-Antikörper verwendet.

- Doppelinkubation mit dem LH-R Antikörper und einem MOSP-Antikörper, zum Anfärben von Oligodendrozyten. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 488-Antikörper, sowie ein Cy3-Antikörper verwendet.

- Doppelinkubation mit dem LH-R Antikörper und einem CD11b-Antikörper zum Anfärben von Mikroglia. Die Blockierung wurde mit BSA 2% durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurde ein Alexa 488-Antikörper, sowie ein Cy3-Antikörper verwendet.

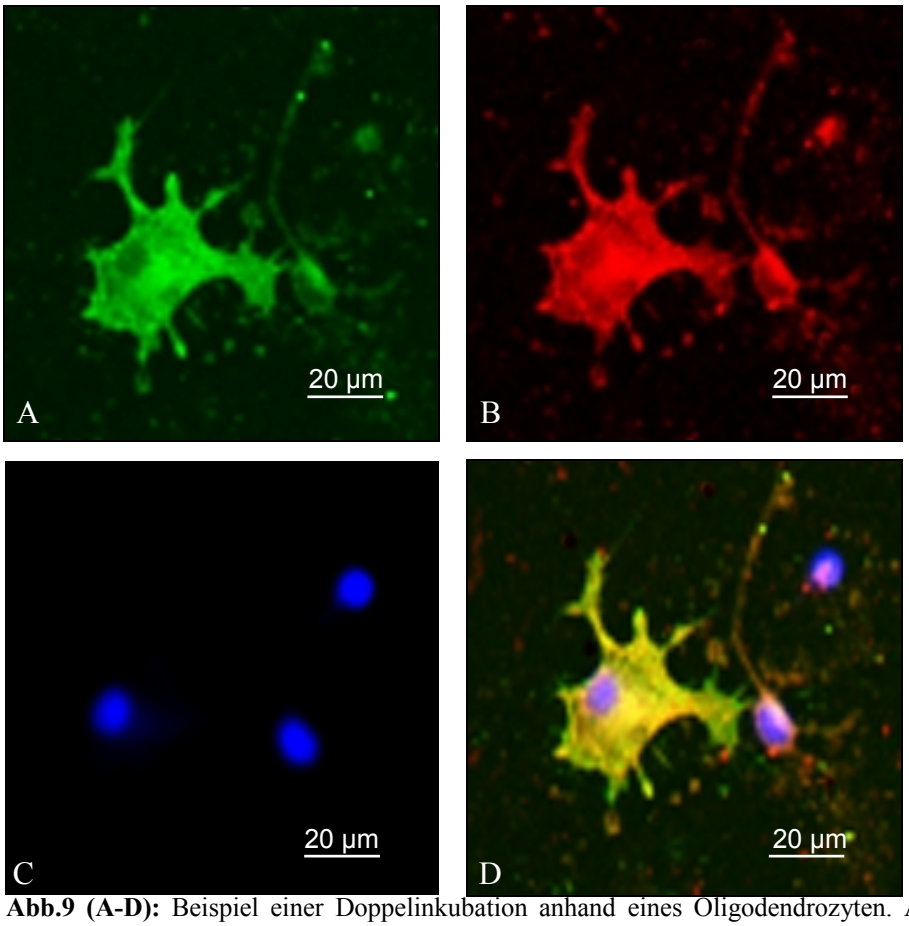

Abb.9 (A-D): Beispiel einer Doppelinkubation anhand eines Oligodendrozyten. Anfärbung einer Zelle mit dem anti-CD11b (grün) (A). Anfärbung der selben Zelle mit einem GnRH-R Antiköper (rot) (B). DAPI-Färbung hippocampler Zellen (blau) (C). Überlagerung der 3 Färbungen (D).

Das Vorgehen bei den Doppelinkubationen unterschied sich folgendermaßen vom oben beschriebenen. Die Immunhistochemie der Dispersionskultur dauerte 3 Tage. Am ersten Tag begannen wir zunächst mit der Inkubation der Zellen mit den für die Zelltypisierung verantwortlichen Antikörper. Am zweiten Tag folgte die Zugabe des entsprechenden Sekundärantikörpers. Anschließend wurde zu den Zellen zusätzlich der GnRH-R bzw. LH-R Antikörper gegeben und erneut über 12 h inkubiert. Am 3. Tag folgte die Zugabe des entsprechenden Sekundärantikörpers und anschließend die Kernfärbung mit DAPI (1:100000 in PBS) (Abb.9).

III. 2. h Mikroskopische Messung und Auswertung

Die Auswertung erfolgte im Sinne einer Blindstudie, um mögliche Beeinflussungen durch den Auswertenden zu vermeiden. Dafür wurden nach der Immunhistochemie die Glasplättchen von einer Person gesondert markiert, sodass keine Rückschlüsse auf die Gruppenzugehörigkeit gezogen werden konnten. Nachdem alle Bilder ausgewertet waren, erfolgte die Auflösung der Verschlüsselung.

Um den Einfluss von Estradiol auf die Rezeptorexpression zu untersuchen, führten wir nach der oben beschriebenen Rezeptoranfärbung eine Intensitätsmessung der immunhistochemischen Färbung durch, um den sog. *Staining Index* (Färbungsintensität) zu bestimmen.

Dazu mussten die Ergebnisse der Immunhistochemie zunächst mit Hilfe eines Laser Scanning Mikroskops (LSM, Carl Zeiss, Inc.) dokumentiert werden. Zur Bilderfassung wurde ein 63x/1.4 NA Objektiv verwendet. Nachdem die Mikroskopeinstellungen (Laserintensität, Belichtungszeit, etc.) für das Scannen der Zellen optimiert waren, wurden die gewählten Parameter im Laufe des Experiments nicht mehr verändert, sodass für die verschiedenen Versuchsgruppen gleiche Bedingungen herrschten. Es wurden folgende Wellenlängen verwendet: 370 nm für DAPI, 488 nm für die Alexa-488-Färbung, sowie 546 nm sowohl für Cy3 als auch für die Alexa-546-Färbung. Pro Untersuchungsgruppe und Versuch (Kontrollgruppe, Behandlung mit Letrozol, Behandlung mit E2) wurden jeweils 50 Zellen mit einem Zoomfaktor von 3 gescannt.

Anschließend wurden die Bilder mit Hilfe der OPENLAB 3.1.5 (Improvision) Software auf einem MAC 9.1 System semiquantitativ ausgewertet. Wir legten einen Schwellenwert fest, welcher sich in den nachfolgenden Auswertungen nicht mehr veränderte und markierten willkürlich pro Zelle 6 gleich große Felder (35x35 Pixel). Die Anzahl der positiven Pixel multipliziert mit der Färbeintensität (einen Grauwert zwischen 1-255) ergab den sog. *Staining index*. Pro Untersuchungsgruppe erhielten wir 50 Indizes, welche wir mit Hilfe des Programms Excel mittelten, und nach statistischer Auswertung mit dem Programm SPSS für Windows, die Standartabweichung und die Signifikanz ($p<0,05$) zu den jeweiligen Gruppen jeder Versuchreihe ermittelten. Hierfür verwendeten wir einen zweiseitigen post-hoc-Test (LSD).

III. 2. i Zellzählung

Um zu untersuchen, ob Estradiol neben dem Einfluss auf die Färbungsintensität auch die Anzahl der Rezeptor-positiven Zellen beeinflusst, führten wir Zellzählungen durch. Da die Färbeintensität während des Scanningprozesses unter dem konfokalen Mikroskop abnimmt, wurden für die anschließenden Versuche unbenutzte, zuvor nicht abfotografierte Zellen benutzt.

Die Deckgläser wurden unter einem Mikroskop vom Typ Axioskop 2 begutachtet und anschließend bei 10-facher Vergrößerung pro Gruppe 30 bis 50 Fotos gemacht. Dabei wurden unter dem Mikroskop verschiedene Areale zufällig ausgesucht und einmal als DAPI-Bild (370 nm), sowie mit dem entsprechenden Filter für die GnRH-R (547 nm) bzw. LH-R Färbung (488 nm) abfotografiert.

Anschließend wurden die Bilder mit der Software Adobe Photoshop in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt, um später ausgewertet werden zu können und als JPEG-Dateien abgespeichert (Abb.10).

Die Zellzählung erfolgte mit dem Programm Image Tool 3.0. Dabei wurden die einzelnen Bilder importiert und mit der Option Threshold ein Schwellenwert für die Zellen ausgewählt, welche standardisiert als positive Zellen gezählt werden sollten. Dieser Schwellenwert war für alle 3 Untersuchungsgruppen gleich. Anschließend

wurden die DAPI-positiven Zellen mit den GnRH- bzw. LH-positiven Zellen in Beziehung gesetzt und in eine Excel-Tabelle eingetragen.

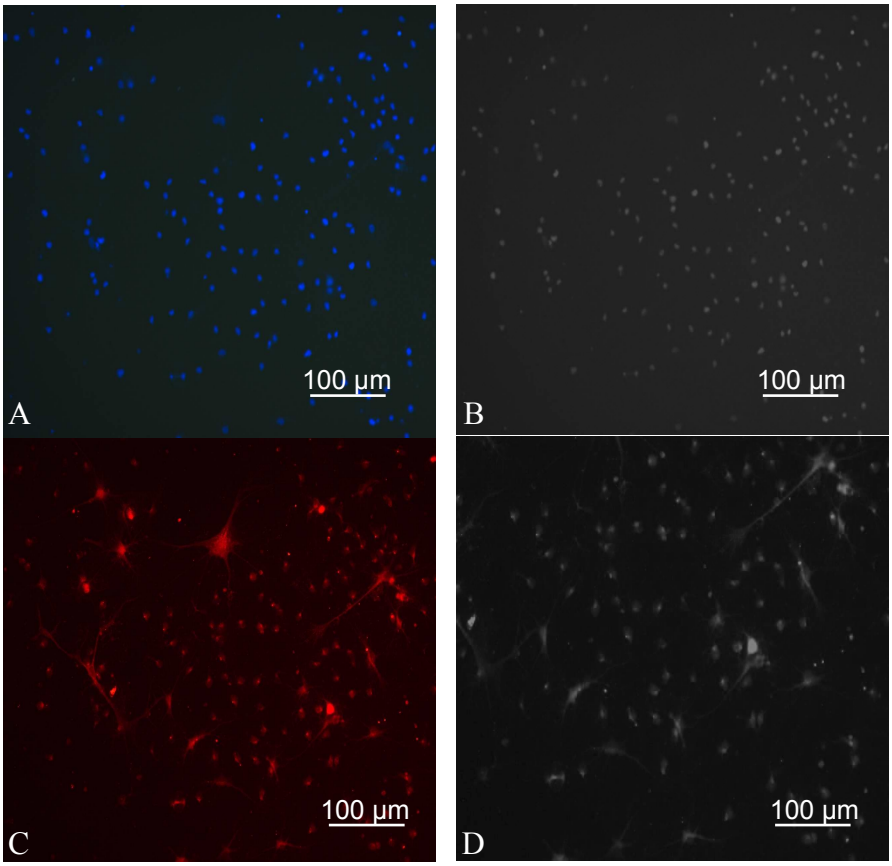

Abb.10 (A-D): Abfotografierte Bilder unter dem Mikroskop mit dem DAPI-Filter (A) und in schwarz-weiß (B), mit dem GnRH-R Filter (C) und in schwarz-weiß (D).

Bei einigen Bildern war es aufgrund in Gruppen zusammenhängenden Zellen oder Färbeartefakte nicht möglich die Threshold Option zu nutzen. Hier mussten die Zellen einzeln ausgezählt werden.

Mit dieser Methode konnte man erkennen, wie groß der Anteil GnRH-R bzw. LH-R positiver Zellen im Verhältnis zu allen in einem Areal befindlichen Zellen war und inwiefern eine Behandlung mit E2 bzw. die Inhibition mit Letrozol einen Einfluss auf die Anzahl positiver Zellen hatte.

IV. Ergebnisse

IV. 1 Ergebnisse zum GnRH-R

IV. 1. a Präabsorptionsversuch GnRH-R Ak

Um die Spezifität des GnRH-R Primärantikörpers zu untersuchen führten wir einen Präabsorptionsversuch durch (Abb.11). Es zeigte sich, dass die Färbung des Rezeptors bei steigender Peptidkonzentration abnahm. Bei der Konzentration 1:1 (Ak:Peptid) kam es zu keiner Anfärbung des GnRH-R. Bei einem Ak : Peptid Verhältnis von 10:1 war die Färbung fast so intensiv wie ohne Zugabe des Peptids (1:0). Bei einem Verhältnis von 1:10 (Ak:Peptid) kam es ebenfalls zu keiner Anfärbung des GnRH-R.
Diese Ergebnisse sprechen für eine hohe Spezifität des Primärantikörpers.

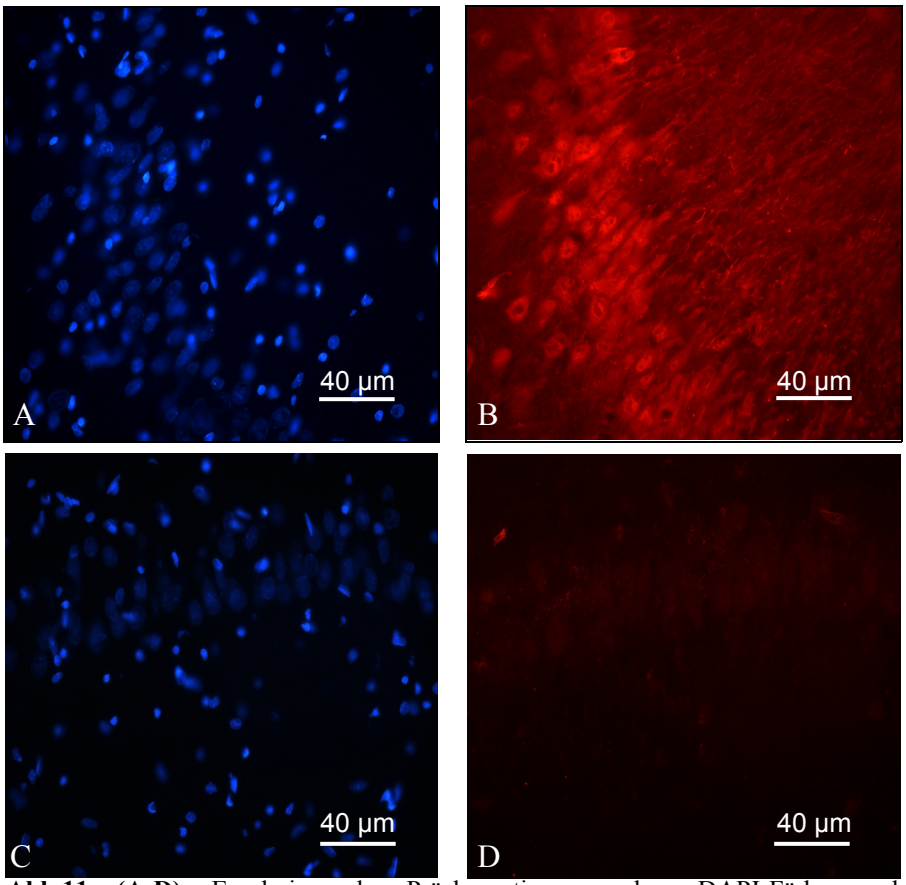

Abb.11. (A-D): Ergebnisse des Präabsorptionsversuches. DAPI-Färbung ohne Peptid hippocampaler Slicekulturen (A). Anfärbung des GnRH-R ohne Peptid von hippocampalen Slicekulturen (B). DAPI-Färbung mit Peptid hippocampaler Slicekulturen (C). Anfärbung des GnRH-R mit Peptid im Verhältnis 1:1 von hippocampalen Slicekulturen (D).

IV. 1. b GnRH-R Doppelinkubation

In diversen Bindungsstudien wurden Bindungsstellen für GnRH im ZNS nachgewiesen (Badr and Pelletier, 1987; Reubi et al., 1987; Jennes et al., 1988; Leblanc et al., 1988). Wir wollten durch Doppelinkubationsversuche feststellen, wo genau und an welchen neuronalen Strukturen sich die Rezeptoren befinden.

Wir führten Immunhistochemien aus Dispersionskulturen durch, bei denen wir jeweils den spezifischen GnRH-R und einen, für die entsprechende Zellpopulation zuständigen Antikörper, verwendeten. Da aus Vorversuchen bekannt war, dass sich die Zellen der hippocampalen Dispersionskultur aus Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia zusammensetzen (von Schassen et al., 2006), verwendeten wir entsprechende Marker.

Für die Neurone, welche rund 80% der Zellen ausmachen, verwendeten wir einen MAP2-Antikörper (Abb.12).

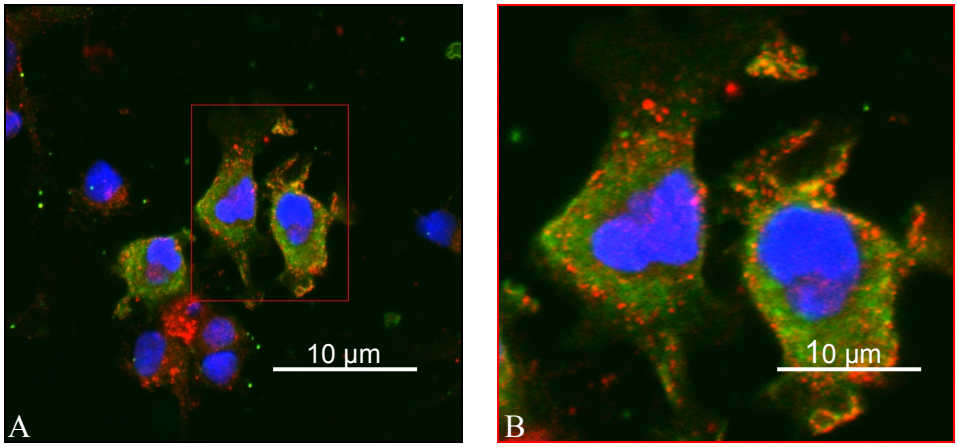

Abb.12 (A und B): Bild eines Zellverbandes aus 3 hippocampalen Neuronen unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Ergebnis einer Doppelinkubation mit einem AK für den GnRH-R (rot), MAP-2 (grün) und DAPI (blau) (A). Vergrößerung (B).

Die Doppelanfärbung beider Antigene führte zu einer deutlichen MAP-2 Färbung (grün), sowie zu einer punktuellen Anfärbung des GnRH-Rezeptors (rot). Wie bereits beschrieben, ist der GnRH-R ein membranständiger Rezeptor, der nach Bindung seines Liganden internalisiert wird (Hazum et al., 1980). Dementsprechend wurde die GnRH-R-Immunreaktivität primär in der Peripherie der hippocampalen Neurone gefunden. Zusätzlich fanden sich auch einige Signale im Zytoplasma der Zellen.

Um zu untersuchen, ob die restlichen Zellen der hippocampalen Dispersionskultur über GnRH-R verfügen, führten wir weitere Doppelinkubationen durch. Hierzu verwendeten wir für die Astrozyten einen GFAP-Antikörper, für die Oligodendrozyten einen MOSP-Antikörper und für die Mikroglia einen CD11b-Antikörer. Anders als bei den Oligodendrozyten, zeigten sich bei den Astrozyten und der Mikroglia deutlich positive Anfärbungen des Rezeptors (Abb.13).

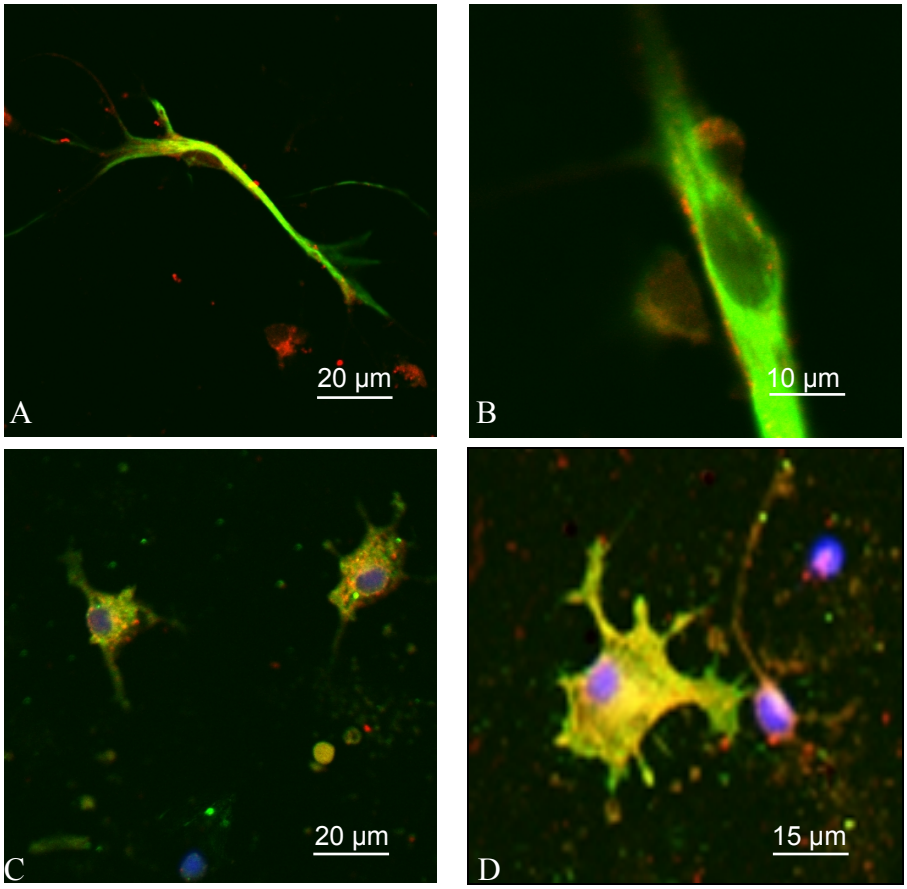

Abb.13 (A-D): Bilder einer Doppelinkubation unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Ergebnis einer Doppelinkubation mit einem AK für den GnRH-R (rot), GFAP (grün) und DAPI (blau) (A und B), sowie einen CD11b Ak (grün) (C und D).

Ähnlich wie bei den Neuronen, zeigte sich auch hier eine deutlich punktuelle Anfärbung des Rezeptors, die sich ebenfalls im Zytoplasma abzeichnete. Bei den Oligodendrozyten ließen sich dagegen keine GnRH-Rezeptoren nachweisen.

IV. 1. c Regulation das GnRH-R durch hippocampales Estradiol

Eine Arbeitsgruppe um Nathwani (2000) konnte an humanen Granulosa-Luteinzellen (hGLC) des Ovars einen Einfluss von E2 auf die GnRH und GnRH-R mRNA-

Expression nachweisen. Daher stellten wir uns der Frage, ob die GnRH-R-Expression in hippocampalen Neuronen, analog zu den hGLC, ebenfalls durch E2 reguliert wird. Wir differenzierten wiederum zwischen endogenem, also lokal im Hippocampus synthetisiertem, und exogen appliziertem E2.

Um dieser Frage nachzugehen, behandelten wir hippocampale Dispersionskulturen für 8 Tage entweder mit E2, in einer Dosis von 100 nM oder mit Letrozol in gleicher Dosis, um die hippocampale E2-Synthese zu unterbinden. Eine dritte Gruppe wurde nicht stimuliert und nur mit Kulturmedium behandelt. Sie diente als Kontrollgruppe. Nach anschließender immunhistochemischer Behandlung wurden die Ergebnisse unter einem konfokalen Mikroskop festgehalten.

Um mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptor-positiven Zelltypen, welche sich auf die Gesamtauswertung auswirken könnten, zu vermeiden, legten wir uns auf eine Zell-Gruppe der hippocampalen Dispersionskultur fest. Wir entschieden uns für die zellreichste Fraktion, die MAP-2 positiven Neurone. Sie wurden nach morphologischen Kriterien unter dem Mikroskop ausgewählt.

Bereits im Zuge der konfokalen Bildaufnahmen fiel auf, dass eine Gruppe im Vergleich zu den Anderen, eine deutlich stärkere Färbeintensität erkennen ließ (Abb.14). Es handelte sich hier um die mit Letrozol behandelte Gruppe.

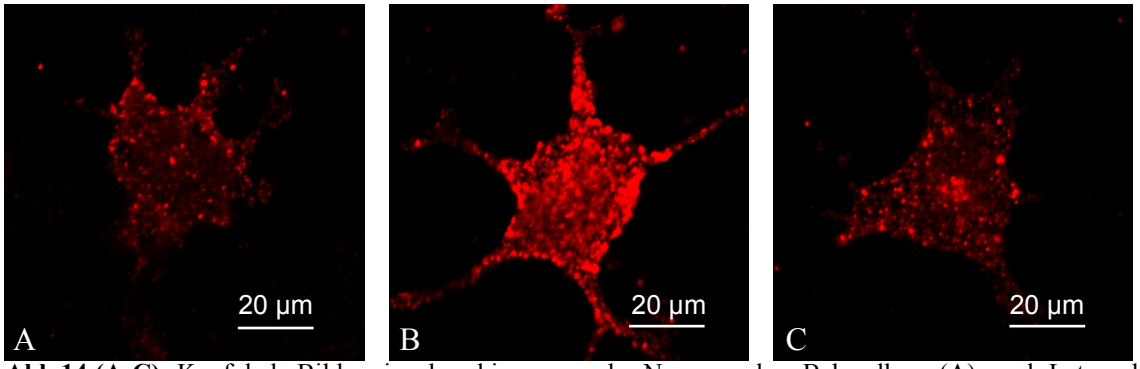

Abb.14 (A-C): Konfokale Bilder einzelner hippocampaler Neurone ohne Behandlung (A), nach Letrozol Behandlung (B) und nach Estradiol Behandlung (C).

Dieser Eindruck ließ sich durch eine anschließende Bildanalyse objektivieren und bestätigen.

Insgesamt wurden pro Gruppe 150 Zellen untersucht, verteilt auf 3 Versuchsreihen unterschiedlicher Dispersionskulturen.

In der Bildanalyse zeigte sich, dass die Zellen, deren hippocampale Estradiol-Synthese durch Behandlung mit Letrozol gehemmt wurde, eine signifikant höhere GnRH-R Färbung im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Interessanterweise führte die E2-Applikation zu den Kulturen zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Anschließend setzten wir die Kontrolle mit 100% gleich und ermittelten somit den prozentuellen Unterschied der beiden Gruppen zur Kontrolle (Tab.3).

Auswertung	**Kontrolle in %**	**Letrozol in %**	**Estradiol in %**
1. Auswertung (n:50)	100	165	93
2. Auswertung (n:50)	100	289	67
3. Auswertung (n:50)	100	260	105
Mittelwert	**100**	**238**	**88,33**

Tab.3: Auflistung der einzelnen Versuchsreihen (1.-3.) nachdem die Kontrolle auf 100% gesetzt wurde. Anschließend Errechnung des allgemeinen Mittelwertes.

Dadurch war es uns möglich die unterschiedlichen Auswertungen zusammenzuführen und eine zusammenfassende Aussage zu machen (Abb.15).

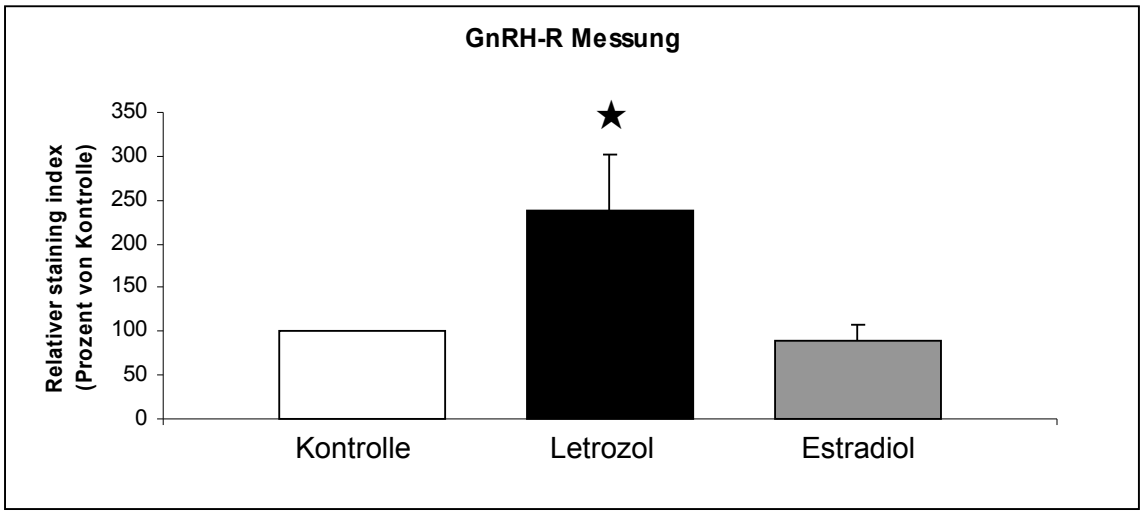

Abb.15: In hippocampalen Dispersionskulturen führte die Behandlung mit 100 nM Letrozol zu einer signifikanten Zunahme der GnRH-R Färbung. E2 Behandlung (100 nM) dieser Kulturen beeinflusste die GnRH-R Färbung nicht signifikant

Die Gruppe mit Letrozol behandelte Gruppe zeigte mit 238% im Vergleich zur Kontrolle und zur mit Estradiol behandelten Gruppe einen signifikant höheren *Staining index*. Die E2-behandelten Zellen, zeigten mit 88,33% einen verminderten Gehalt an GnRH-R.

IV. 1. d Zellzählung GnRH-R positiver Zellen

Durch die Untersuchung der Färbeintensität, die als Messwert für den Gehalt an GnRH-R in den Zellen dient, konnten wir nachweisen, dass hippocampale Neurone, die durch Letrozol eine verminderte E2-Synthese aufweisen, vermehrt GnRH-R exprimieren.

Darüberhinaus überprüften wir, ob sich die Anzahl der GnRH-R positiven Zellen nach Behandlung mit Letrozol und E2 verändert. Dabei spielte nicht die Stärke der GnRH-R-Färbung der einzelnen Zellen eine Rolle, sondern der Anteil GnRH-R positiver Zellen an der Gesamtzellenanzahl, unabhängig von der Färbeintensität.

Zur Klärung führten wir eine Zellzählung durch. Dabei wurden pro untersuchender Gruppe 40 Bilder mit jeweils einem Filter (370 nm) zur Anfärbung der Zellkerne (DAPI) und einen Filter (546 nm) zur Anfärbung des Rezeptors (GnRH-R Antikörper) gemacht. Die Anzahl der DAPI positiven Zellen, sowie die der GnRH-Rezeptor positiven Zellen konnten so ermittelt werden (Tab.4).

Gruppe	Anzahl (n)	GnRH-R positive Zellen	DAPI positive Zellen	Anteil in %
Kontrolle	40	9937	11169	88,4
Letrozol	40	12497	13940	89,92
Estradiol	40	10928	12130	89,03

Tab.4: Ergebnis der Zellzählung der einzelnen Gruppen. Aufgelistet ist die Gesamtheit der Zellen pro Gruppe (DAPI positive Zellen), die GnRH-R positiven Zellen und der prozentuale Anteil der GnRH-R positiven Zellen an der Gesamtheit.

Schon bei der Zellzählung fiel auf, dass ein großer Teil der DAPI positiven Zellen auch GnRH-R positiv waren.

Diese Vermutung ließ sich durch weitere Berechnungen bestätigen. Es zeigte sich, dass nur etwa 10% der DAPI positiven Zellen nach unserem Behandlungsschema GnRH-R negativ waren. Die drei Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich in der Anzahl GnRH-R positiver Zellen (Tab.4; Abb.16).

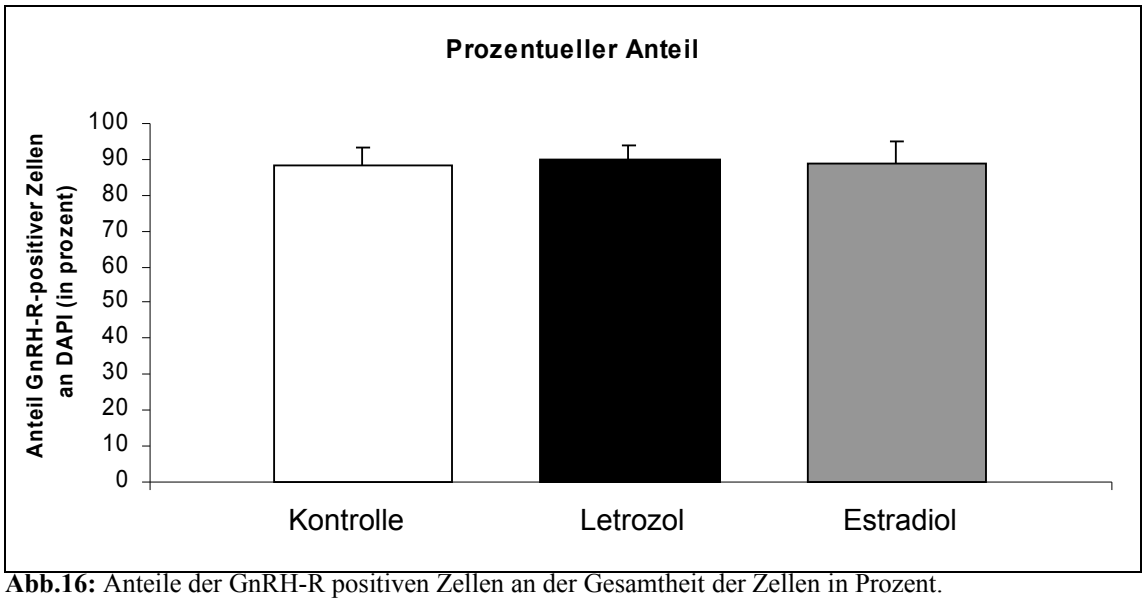

Abb.16: Anteile der GnRH-R positiven Zellen an der Gesamtheit der Zellen in Prozent.

IV. 2 Ergebnisse zum LH-R

IV. 2. a Präabsorptionsversuch LH-R Ak

Auch hier führten wir zur Spezifitätsbestimmung des LH-Rezeptor Primärantikörpers einen Präabsorptionsversuch durch. Es zeigte sich, wie auch beim GnRH-R, eine Abnahme der Rezeptorfärbung bei steigender Peptidkonzentration Dies spricht für eine hohe Spezifität des Primärantikörpers.

IV. 2. b LH-R Doppelinkubation

Ähnlich wie für GnRH wurden in der Vergangenheit Bindungsstellen für LH im ZNS gefunden (Croxatto and Arrau, 1964; Bagshawe et al., 1968; Gross and Page, 1979; Hostetter et al., 1981; Emanuele et al., 1983; Balasinor et al., 1992). Mittels *in situ* Hybridisierung und Autoradiographie konnte nachgewiesen werden, dass der Hippocampus, im Vergleich zu anderen Hirnarealen, einen höheren Gehalt an LH-Rezeptor mRNA und Protein aufweist (Lei et al., 1993).

Auch hier erörterten wir, in welchen Zellen und wo genau der Rezeptor lokalisiert ist und führten deshalb Doppelinkubationsversuche durch. Für die Markierung der

Neurone wählten wir einen anderen Antikörper, den NeuN-Antikörper, da der MAP-2 Antikörper, wie der primäre LH-Rezeptor Antikörper, aus dem Kaninchen stammt und somit Kreuzreaktionen auftreten würden. Für die Oligodendrozyten und Mikroglia wurden die selben Primärantikörper, wie bei den GnRH-R Versuchen, verwendet. Zur Anfärbung der Astrozyten verwendeten wir, anders als bei den GnRH-R Versuchen, einen Antikörper der Firma Sigma, da wir mit dem Antikörper der Firma Chemicon wiederholt keine positive Anfärbung erzielen konnten. Da der Sekundärantikörper des LH-Rezeptors eine Wellenlänge von 488 nm hat und somit grün färbt, mussten wir hier deshalb einen anderen, rot fluoreszierten, Sekundärantikörper verwenden (Abb.17).

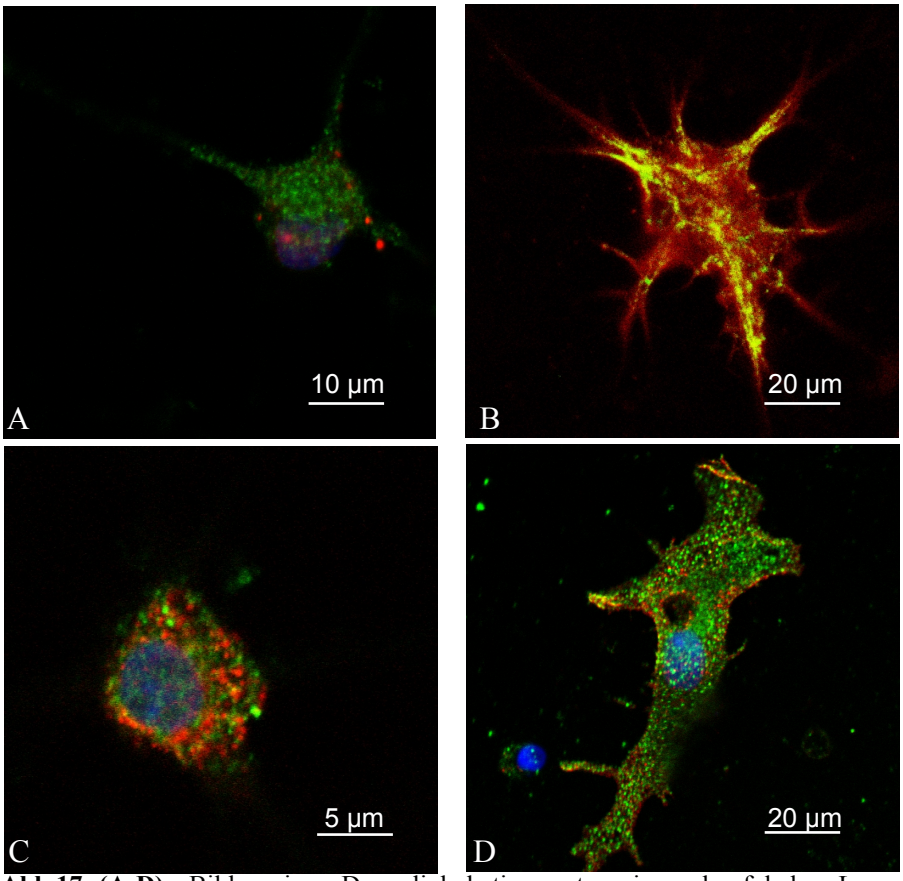

Abb.17 (A-D): Bilder einer Doppelinkubation unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Ergebnis einer Doppelinkubation mit einem AK für den LH-R (grün), DAPI (blau) und NeuN (rot) (A), GFAP (rot) (B), MOSP (rot) (C), sowie einen AK für CD11b (rot) (D).

Es zeigte sich wiederum eine deutlich punktuelle Anfärbung des LH-R (grün). Neben den Neuronen, Astrozyten und Mikroglia waren hier, anders als bei den GnRH-R Färbungen, die Oligodendrozyten definitiv LH-Rezeptor positiv. Ebenfalls fiel eine über das gesamte Zytoplasma der Zellen verteilte Anfärbung, ohne spezielle Präferenz, auf.

IV. 2. c Regulation des LH-R durch exogenes Estradiol

Vom Ovar wissen wir, dass FSH zusammen mit Estradiol eine entscheidende Rolle bei der Regulation des LH-R spielt (Menon et al., 2007).
Um den Einfluss von Estradiol auf die hippocampale LH-Rezeptor-Expression zu untersuchen, stellten wir analog zu den Untersuchungen des GnRH-R hippocampale Dispersionskulturen her und teilten sie in drei Gruppen ein. Die erste Gruppe wurde für 8 Tage mit Estradiol (100 nM) behandelt. Die zweite wurde, um die hippocampale E2-Synthese zu hemmen, mit Letrozol (100 nM) behandelt. Und die dritte Gruppe stellte die Kontrollgruppe ohne Behandlung dar.
Nach anschließender Fixierung wurde an den Kulturen eine Immunhistochemie durchgeführt und diese mittels Bildanalyse ausgewertet.

Wieder wurde nur eine Zellgruppe untersucht, um ein standardisiertes Vorgehen zu gewährleisten. Wir entschieden uns erneut für die zellreichste Population: Die Neurone.
Auch hier fiel, wie in Abbildung 18 exemplarisch dargestellt, eine deutlich stärkere Anfärbung der mit Estradiol behandelten Gruppe auf. Diese Beobachtungen ließen sich anschließend im Zuge der Bildanalyse objektivieren und bestätigen.

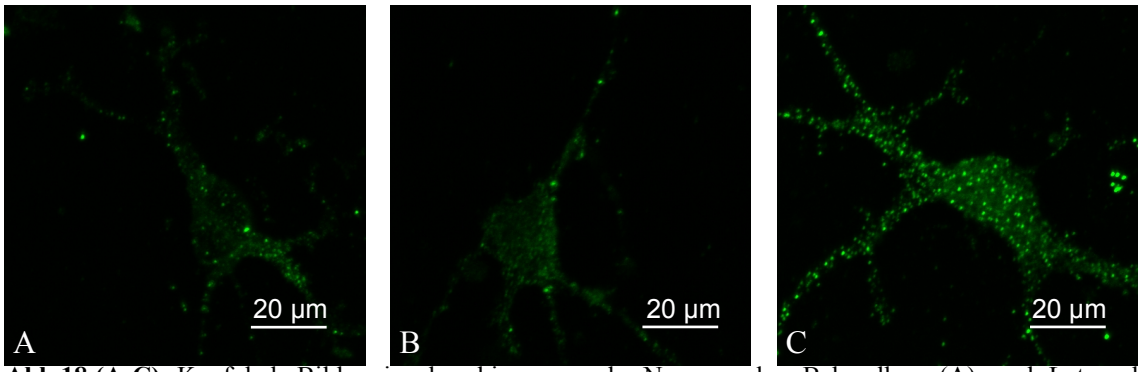

Abb.18 (A-C): Konfokale Bilder einzelner hippocampaler Neurone ohne Behandlung (A), nach Letrozol Behandlung (B) und nach Estradiol Behandlung (C).

Zusammengenommen wurden 4 Untersuchungsreihen mit insgesamt 180 Zellen durchgeführt. Die standardisierte computergestützte Auswertung der Bilder ergab, dass die mit E2 behandelten Zellen einen signifikant höheren Färbeindex und somit über mehr LH-R Protein im Vergleich zur Kontrolle verfügen. Die Hemmung der hippocampalen Estradiolsynthese führte zu keiner wesentlichen Änderung der LH-R Dichte im Vergleich zur Kontrolle (Tab.5).

Um eine stärkere Aussagekraft über die Werte der einzelnen Auswertungen zu erzielen und die 3 Gruppen besser vergleichen zu können, setzten wir hier die Kontrolle ebenfalls auf 100% (Tab.5).

Auswertung	Kontrolle in %	Letrozol in %	Estradiol in %
1. Auswertung (n: 30)	100	152	227
2. Auswertung (n: 50)	100	97	143
3. Auswertung (n: 50)	100	59	172
4. Auswertung (n: 50)	100	147	335
Mittelwert	**100**	**113,75**	**219,25**

Tab.5: Auflistung der einzelnen Versuchsreihen (1.-4.) nachdem die Kontrolle auf 100% gesetzt wurde. Anschließend Errechnung des allgemeinen Mittelwertes.

Schließlich führten wir die einzelnen Auswertungen zusammen und machten eine zusammenfassende Aussage, die in Abbildung 19 dargestellt ist.

Die Auswertungen ergaben, dass die Estradiobehandlung der hippocampalen Neuronen zu einer signifikanten Zunahme der Färbeintensität, im Vergleich zur Kontrolle und zu der mit Letrozol behandelten Gruppe, geführt hat. Mit 219,25% war der Gehalt an LH-R Protein deutlich stärker ausgeprägt als bei den anderen beiden Gruppen. Die Letrozol Behandlung führte zu keiner Zunahme der Färbeintensität (113,75%) im Vergleich zur Kontrolle.

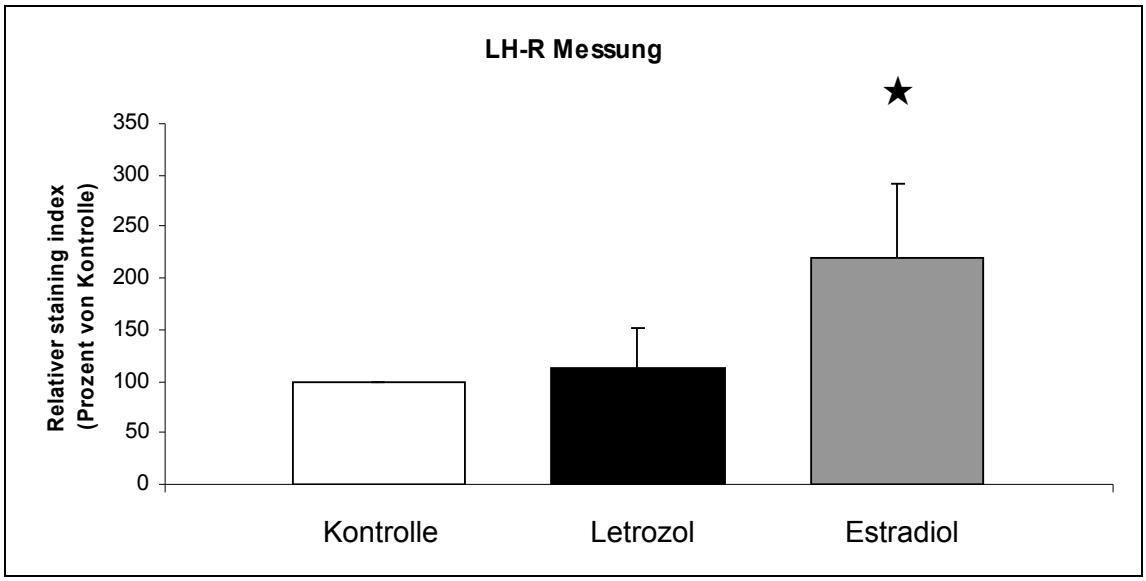

Abb.19: In hippocampalen Dispersionskulturen führte die Behandlung mit 100 nM Estradiol zu einer signifikanten Zunahme der LH-R Färbung. Letrozol Behandlung (100 nM) dieser Kulturen beeinflusste die LH-R Färbung nicht signifikant. ★ = signifikant ($p<0.05$).

IV. 2. d Zellzählung LH-R positiver Zellen

Darüber hinaus untersuchten wir, ob die unterschiedliche Behandlung der Zellkulturen in einer Veränderung der Anzahl LH-R positiver Zellen resultiert.
Wir führten dementsprechend eine Zellzählung durch. Dabei wurde pro zu untersuchender Gruppe 40 Bilder mit jeweils einem Filter (370 nm) zur Anfärbung der Zellkerne (DAPI) und einem Filter (488 nm) zur Anfärbung des Rezeptors (LH-R Antikörper) gemacht und die Anzahl der DAPI positiven Zellen, sowie die der LH-Rezeptor positiven Zellen ermittelt (Tab.6).

Gruppe	Anzahl (n)	LH positive Zellen	DAPI positive Zellen	Anteil in %
Kontrolle	40	1193	1560	76,47
Letrozol	40	1617	1996	81,01
Estradiol	40	2854	3518	81,13

Tab.6: Ergebnis der Zellzählung der einzelnen Gruppen. Aufgelistet ist die Gesamtheit der Zellen pro Gruppe (DAPI positive Zellen), die LH-R positiven Zellen und der prozentuale Anteil der LH-R positiven Zellen an der Gesamtheit.

Ähnlich wie bei der GnRH-Rezeptor Versuchsreihe war eine hohe Anzahl der Zellen Rezeptor-positiv. Etwa 20% der Zellen wiesen keine messbare Anfärbung auf. Zwischen den einzelnen Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied (Abb.20).

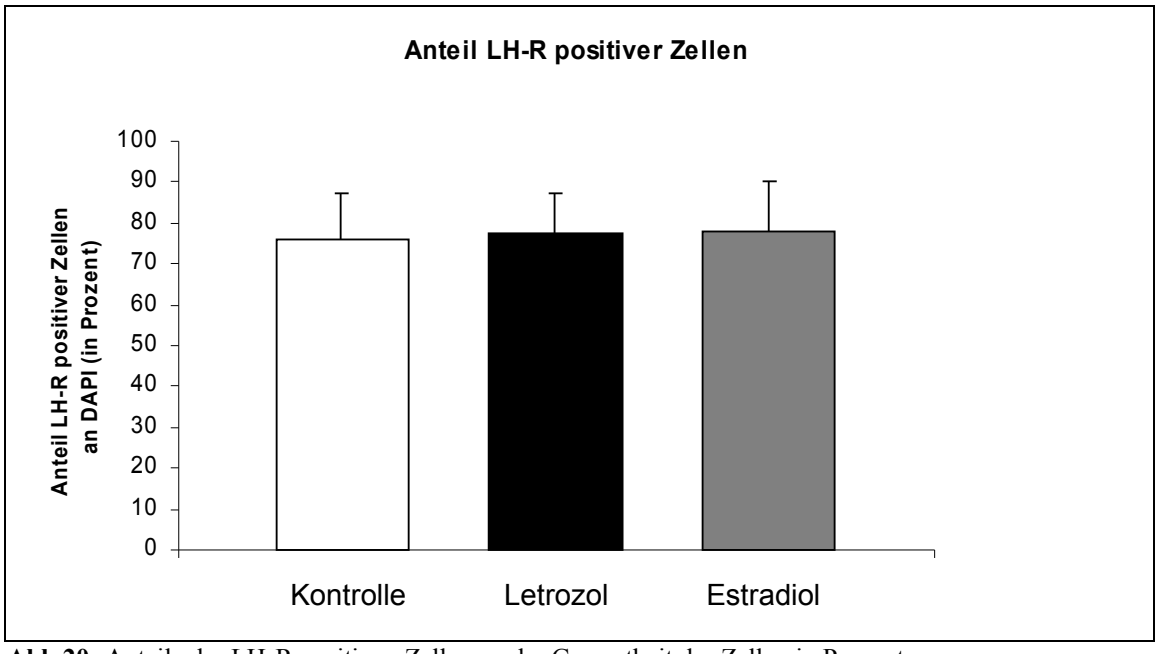

Abb.20: Anteile der LH-R positiven Zellen an der Gesamtheit der Zellen in Prozent.

V. Diskussion

Die von uns durchgeführten Untersuchungen stehen im Zusammenhang mit der Frage, wie die hippocampale Estradiolsynthese und die daraus resultierende Wirkung auf die synaptische Plastizität reguliert wird. Ausgangspunkt waren Ergebnisse einer Arbeitsgruppe um McEwen (Gould et al., 1990), die bei ovarektomierten Ratten eine Abnahme der Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus nachweisen konnten, welche nach systemischer E2-Gabe wieder zunahm. Darüber hinaus konnten Woolley und Mitarbeiter (1990) aus der gleichen Arbeitsgruppe eine synchrone Korrelation von hippocampaler Spinedichte und Estradiol-Serumspiegeln während der Estrusphasen aufzeigen. Dies führte zu der lange gültigen Auffassung, dass das gonadale Estradiol, welches über den Blutweg seine Zielstrukturen im ZNS erreicht, für die Änderungen der Spinedichte im Hippocampus verantwortlich sei (McEwen, 2002).

Versuche aus unserem Labor konnten diese These jedoch nicht bestätigen. Die Behandlung hippocampaler Slice- und Dispersionskulturen mit Estradiol (100 nM) führte widererwartend nicht zu einer Zunahme der Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus (Kretz et al., 2004). Vielmehr schien endogenes, im Hippocampus synthetisiertes Estradiol eine entscheidende Rolle auf die Synaptogenese im Hippocampus zu spielen (Kretz et al., 2004; Rune et al., 2006).

Bereits 2003 wiesen Prange-Kiel und Mitarbeiter eine hippocampale endogene Estradiolsynthese nach (Prange-Kiel et al., 2003). Es veranlasste zu vermuten, dass GnRH, analog zu den Ovarien, auch die Estradiolsynthese in hippocampalen Neuronen regulieren würde. Mittels real-time PCR wurde zunächst die Menge an GnRH-R mRNA im Hippocampus mit der im Hypothalamus und Neokortex enthaltenen Menge verglichen. Es stellte sich heraus, dass der Gehalt an GnRH-R mRNA im Hippocampus annährend 3 mal höher als im Hypothalamus und etwa 5 mal höher als im Neokortex ist (Prange-Kiel et al., 2008). Diese Ergebnisse sprechen für eine besonders hohe Affinität des Hippocampus für GnRH.

Nimmt man an, dass die hippocampale Estradiolsynthese letztlich durch GnRH aus dem Hypothalamus reguliert wird, gilt es die Auffassungen von Woolley et al. (1990) und McEwen (2002), die eine gonadale Wirkung auf die synaptische Plastizität im

Hippocampus postulierten, zu überdenken und neu zu bewerten. Es kann davon ausgegangen werden, dass die pulsatile Freisetzung von GnRH aus Neuronen des Hypothalamus zum einen über die Sekretion der Gonadotropine aus der Hypophyse die gonadale Estradiolsynthese reguliert und zum anderen, quasi synchron bzw. parallel, auf bisher noch nicht geklärte Weise auch regulierend auf die hippocampale Estradiolsynthese einwirkt. Dies könnte eine Erklärung liefern für die estrusabhängige Korrelation von Estradiol Serumspiegeln und Spinedichte im Hippocampus.

V. 1 GnRH-R ist immunhistochemisch in verschiedenen Zellpopulationen nachweisbar

Die Existenz von GnRH-R in den Pyramidenzellen des Hippocampus ist Vorraussetzung einer Beeinflussung hippocampaler Neurone durch GnRH.
Wir konnten durch Doppelinkubationsversuche zeigen, dass verschiedene Zellpopulationen des Hippocampus über GnRH-Bindungsstellen verfügen. Seit längerem ist bekannt, dass es im Hippocampus Bindungsstellen für GnRH gibt (Badr and Pelletier, 1987; Reubi et al., 1987; Jennes et al., 1988; Leblanc et al., 1988). Jennes und Woolums (1994) konnten mittels *in situ* Hybridisierung GnRH-R mRNA in Pyramidenzellen des Hippocampus nachweisen. Dies konnte durch unsere Versuche erstmals auf Proteinebene bestätigt und zusätzlich GnRH-Bindungsstellen in hippocampalen Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden. Die Oligodendrozyten waren überraschenderweise frei von GnRH-R. Der Grund für die negative Rezeptoranfärbung, ließ sich bisher nicht eruieren.

Die Präsenz von GnRH-R in Astrozyten und Mikroglia des Hippocampus wurde dabei erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Warum Astrozyten und Mikroglia über GnRH-R verfügen ist bisher unbekannt.

Wie man heute weiß, sind Gliazellen Ziel sowie Syntheseort von Steroiden. Sexualhormone, wie Estradiol, beeinflussen die Morphologie und die Genexpression von Astrozyten *in vivo* und *in vitro* (Garcia-Segura et al., 1989; Del Cerro et al., 1995; Amateau and McCarthy, 2002). Aber nicht nur Astrozyten werden von Sexualhormonen beeinflusst. Bei den Mikroglia wird die Phagozytoseaktivität und die Menge der

Superoxidabgabe durch diese Hormone reguliert (Bruce-Keller et al., 2000). Beide Zellpopulationen verfügen über ER (Jung-Testas and Baulieu, 1998; Hosli et al., 2001). Astrozyten von Nagetieren sind grundsätzlich in der Lage Estradiol zu synthetisieren. (Zwain et al., 1997; Zwain and Yen, 1999). Jedoch wird in Astrozyten der Ratte unter normalen Bedingungen keine Aromatase exprimiert (Negri-Cesi et al., 1992). Erst nach einem Stressstimuli, wie in *in vitro* Experimenten durch Serumentzug hervorgerufen, kam es zur Induktion der Aromataseexpression in Astrozytenkulturen der Ratte (Azcoitia et al., 2003). Zusätzlich wurden Aromatase-exprimierende reaktive Astrozyten in unterschiedlichen geschädigten Hirnregionen, wie den Hypothalamus und Hippocampus, beobachtet (Garcia-Segura et al., 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass Astrozyten potentiell in der Lage sind Aromatase zu bilden und Estradiol als Antwort auf eine Verletzung, aufgrund seiner neuroprotektiven Eigenschaften (Garcia-Segura et al., 2001), synthetisiert wird. Estradiol soll somit den neurodegenerativen Schaden limitieren.

Was die Mikroglia betrifft, so wäre es denkbar, dass die zur Phagozytose befähigten Mikroglia durch Internalisierung und anschließender Zersetzung auszusortierender Neurone und Astrozyten, einen Teil des Rezeptorproteins auf der Zelloberfläche präsentieren, an dem der Primärantikörper binden kann.

Ob GnRH die Astrozyten direkt zur Estradiolsynthese anregt, wie es bei den hippocampalen Neuronen gezeigt werden konnte (Prange-Kiel et al., 2008), ist offen, unterstreicht jedoch das hoch komplexe Zusammenspiel zwischen den auch dem Immunsystem zugerechneten Gliazellen, den Pyramidenzellen im Hippocampus und dem ZNS bzw. dem neuroendokrinen System allgemein.

V. 2 Hippocampales Estradiol reguliert die GnRH-R Expression in hippocampalen Neuronen

Dass Estradiol die GnRH-R Expression beeinflusst, wurde bereits in Untersuchungen aus den 90er Jahren beschrieben, in denen Jennes et al. (1995, 1996) eine Estrusstadien-abhängige, sowie nach Gonadektomie auftretende Änderung der GnRH-R mRNA Dichte im Hippocampus der Ratte nachweisen konnten.

In unseren Ergebnissen wiesen wir nach, dass die Hemmung der hippocampalen Östrogensynthese mit dem Aromataseinhibitor Letrozol, zu einer signifikanten Zunahme der GnRH-R Expression in hippocampalen Dispersionskulturen führt. Durch exogene Zufuhr von E2 (100 nM) konnte hingegen keine signifikante Änderung der Rezeptorexpression beobachtet werden.

Aus Untersuchungen mit Brust- und Ovarialkrebszelllinien wissen wir, dass Estradiol die GnRH-R Expression beeinflusst. Dabei bindet E2 an den ERα und stimuliert dadurch das Aktivator-Protein 1 (AP-1), welches als Transkriptionsfaktor die Expression von GnRH-R herunterreguliert (Cheng et al., 2003).

Bei der Regulation des GnRH-R an ovariellen Granulosazellen der Ratte, scheint Estradiol, abhängig von der Stimulierungsdauer, entweder eine Abnahme (24 h Behandlung) oder eine Zunahme (6 h Behandlung) der GnRH-R mRNA Expression zu bewirken (Nathwani et al., 2000).

Im Hippocampus scheint es, als würde endogenes Estradiol den Spiegel an GnRH-R auf einem niedrigen Niveau halten. Nimmt die endogene E2-Konzentration durch Verwendung eines Aromataseinhibitors ab, kommt es reaktiv zu einer Zunahme der GnRH-R Expression. Die Behandlung mit zusätzlichem E2 führte, im Vergleich zur Kontrolle, jedoch nicht zu einer weiteren Abnahme der GnRH-R Expression.

Eine Arbeitsgruppe um Yeung (2005) beobachte ein ähnliches Phänomen, bei dem nicht die Hinzugabe einer Substanz, sondern die Hemmung deren Synthese zu einer Änderung der Rezeptorexpression führte. Die Autoren beobachteten an einer humanen zerebellaren Medulloblastom-Zelllinie (TE-671) die Expression von GnRH und dessen Rezeptor. Dabei entdeckten sie einen GnRH-R-Promoter zwischen dem Nukleotid 2197 und 1018, der verschiedene Bildungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie das oben genannten AP-1, enthielten. Die Behandlung der TE-671 Zellen mit GnRH führte zu keiner Beeinflussung der Promoteraktivität. Die Blockierung der endogenen GnRH Wirkung auf seinen Rezeptor durch einen GnRH-R Antagonisten führte dagegen zu einer signifikanten Steigerung der Promoteraktivität.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass endogenes GnRH die GnRH-R Promoteraktivität durch einen autoregulativen Mechanismus beeinflusst, indem endogenes GnRH die Promoteraktivität auf einem niedrigen Niveau hält. Wird nun die GnRH Wirkung aufgehoben, entfällt die hemmende Wirkung auf die GnRH-R Promoteraktivität und es kommt zu dessen Aktivierung mit Steigerung der GnRH-R Zahl (Yeung et al., 2005). Dabei bedarf es allerdings noch der Klärung, ob AP-1 bei der Hemmung der GnRH-R Promoteraktivität eine Rolle spielt.

Dies alles spricht für eine durchaus komplexe Regulation des GnRH-Rezeptors im Hippocampus, die sowohl durch Estradiol wohl aber auch durch GnRH beeinflusst wird. Die bereits Eingangs geäußerte Vermutung, dass die hippocampale Östrogensynthese, ähnlich wie die des Ovars, durch eine direkte GnRH-Wirkung reguliert werden könnte, überprüften wir durch *in vitro* Untersuchungen an hippocampalen Slices und dissoziierten Neuronen. Dabei wurde mittels Radioimmunoassay (RIA) die Wirkung von GnRH auf die E2-Synthese über die ins Medium abgegebene Menge E2 gemessen.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit GnRH in Dosen von 1 bis 500 nM dosisabhängig zu Änderungen der E2-Abgabe führte. Dabei kam es bei mittleren Dosen von 10 und 100 nM im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Zunahme der E2-Synthese. Bei hohen Dosen von 500 nM blieb die E2-Synthese dagegen auf Kontrollniveau (Prange-Kiel et al., 2008).

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten zusätzlich Effekte von GnRH auf die Expression synaptischer Proteine, wie Spinophilin, vermittelt über seinen Einfluss auf die Estradiolsynthese, nachgewiesen werden. Mittlere Dosen von GnRH stimulierten die Spinophilin Expression wohingegen höhere Dosen keinen Effekt erzielten.

Außerdem beschäftigten sich Untersuchungen aus unserem Labor mit der Frage, ob die zyklusabhängigen Schwankungen der Spinedichte im Hippocampus, die bereits in den 90er Jahren beschrieben wurden (Woolley et al., 1990), neben dem Hippocampus auch andere Bereiche des Neokortex betreffen. In diesen Untersuchungen wurden die Ergebnisse von Woolley und Mitarbeitern (1990) bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass weibliche Ratten im Proestrus, der Zyklusphase mit einem hohen E2-Serumspiegel, eine

signifikant höhere Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus aufwiesen, im Vergleich zum Estrus, wo die E2-Serumspiegel am niedrigsten sind. Im Neokortex war ein solcher Effekt, also eine Korrelation der Spinedichte mit dem Estruszyklus, nicht nachzuweisen. Die zyklischen Schwankungen der Spinedichte scheinen demnach ein für den Hippocampus spezifisches Phänomen zu sein (Prange-Kiel et al., 2008).

GnRH in mittleren Konzentrationen (10-100 nM) stimuliert also die Estradiolsynthese in hippocampalen Neuronen. Aber wie gelangt GnRH zu seinen Zielstrukturen im Hippocampus? Zunächst einmal wird GnRH pulsatil von hypothalamischen Neuronen in ein Portalsystem sezerniert, das dann an der Hypophyse die Sekretion von FSH und LH stimuliert. Ein Teil des GnRH wird auch in die zerebrospinale Flüssigkeit (CSF) abgegeben (Skinner and Caraty, 2002), von wo darin enthaltenes GnRH angrenzende zerebrale Strukturen erreicht und diese möglicherweise zu beeinflussen vermag. Diese Auffassung wird gestützt durch Versuche, in denen GnRH in die CSF injiziert wurde und es in der Folge bei Schafen zu Änderungen des Sexualverhaltens kam (Caraty et al., 2002). Somit wäre dies ein möglicher Weg, auf dem GnRH den Hippocampus erreichen könnte. Die Existenz von GnRH-Fasern im Hippocampus (Jennes and Stumpf, 1980; Witkin et al., 1982) machen einen weiteren Weg, auf dem GnRH über Projektionen von Neuronen andere Hirnregionen in den Hippocampus gelangt, möglich. Bisher gibt es jedoch noch keine eindeutigen Erkenntnisse über die Herkunft dieser Fasern.

Dass die Letrozol Behandlung der Dispersionskulturen mit daraus resultierender Minderung der endogenen Estradiolsynthese, zu einer signifikanten Zunahme der GnRH-R Expression führt, lässt folgenden Schluss zu: Das endogene hippocampale Estradiol, das nach Stimulation des GnRH-R durch seinen Liganden vermehrt synthetisiert wird, scheint über einen negativen Feedbackmechanismus die überschüssige Estradiolsynthese in den Neuronen zu verhindern, indem es die Expression des GnRH-R auf einem niedrigen Niveau hält. Kommt es jedoch zu einer Abnahme der endogenen Estradiolsynthese, wie im Experiment durch einen Aromatasehemmer induziert, scheinen Mechanismen in der Zelle abzulaufen, die zu einer gesteigerten GnRH-R Expression mit anschließender gesteigerter E2-Synthese führen. Über einen fein abgestimmten Mechanismus der GnRH-Wirkung, balanciert endogenes hippocampales Estradiol die Estradiolsynthese und hält das System so im Gleichgewicht.

V. 3 LH-R ist immunhistochemisch in verschiedenen Zellpopulationen nachweisbar

Um festzustellen in welchen Zellpopulationen der LH-R vorkommt, führten wir Doppelinkubationsversuche durch. Aus früheren Studien wissen wir, dass es im Hippocampus Bindungsstellen für LH gibt (Lei et al., 1993). Ähnlich wie beim GnRH-R, fanden Lei und Mitarbeiter im Hippocampus einen höheren Gehalt an LH-R mRNA als in anderen Hirnregionen. Welche Zelltypen im Hippocampus genau über LH-R verfügen, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Wir konnten erstmals zeigen, dass der LH-R in verschiedenen Zellpopulationen vorhanden ist. Es fanden sich Bindungsstellen für LH sowohl in hippocampalen Neuronen, Astrozyten, wie in Oligodendrozyten als auch in Mikroglia.

Da wir von einer GnRH gesteuerten Estradiolsynthese im Hippocampus ausgehen, in der GnRH auf bisher noch nicht geklärter Weise hippocampale Neurone beeinflusst, kommt dabei der Wirkung von LH auf diese Neurone eine ähnlich bedeutende Rolle wie dem GnRH zu. Analog zum GnRH könnte hypophysäres LH an Rezeptoren im Hippocampus binden und so die hippocampale E2-Synthese mitbeeinflussen. Wie genau LH den Hippocampus erreicht ist bisher noch nicht bekannt. In verschiedenen Studien konnte die Existenz von LH in der CSF nachgewiesen werden (Bagshawe et al., 1968; Hostetter et al., 1981; Balasinor et al., 1992). Dabei könnte LH aus der peripheren Zirkulation über den Plexus choroideus (Knowles, 1972) oder über einen retrograden Transport über Sinusoide im Hypophysenstil (Oliver et al., 1977) in die CSF gelangen. Direkte LH-Injektion in den 3.Ventrikel führte in Ratten zu einer Veränderung des Essverhaltens (Emanuele et al., 1991).

Mit dem Beleg für die Existenz potentieller LH-Bindungsstellen im Hippocampus, wurde die Vorraussetzung einer möglichen direkten Beeinflussung hippocampaler Neurone durch LH geschaffen. Ähnlich wie beim GnRH-R, konnten wir bisher keine eindeutige Erklärung für das Vorkommen von LH-R in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia finden. Weiterführende Untersuchungen werden sich damit beschäftigen.

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist, dass Oligodendrozyten, wie die Mikroglia und Astrozyten auch, durch Sexualhormone, wie Progesteron und Estradiol,

insofern beeinflusst werden, als dass durch sie u.a. die Expression von Myelinproteinen reguliert wird (Jung-Testas et al., 1992). Sie sind in der Lage aus Cholesterol über Progesteron weitere Metabolite bis hin zum Testosteron zu bilden (Jung-Testas et al., 1999; Zwain and Yen, 1999; Garcia-Segura and Melcangi, 2006). Die E2-Synthese wurde in Oligodendrozyten bisher noch nicht beschrieben. Dennoch wäre es denkbar, dass LH einen Einfluss auf die, in Bezug auf die Steroibiosynthese, recht aktive Zellpopulation der Oligodendrozyten haben könnte.

V. 4 Exogenes Estradiol reguliert die LH-R Expression in hippocampalen Neuronen

Wir konnten mit unseren Versuchen nachweisen, dass die exogene Zufuhr von Estradiol (100 nM) zu einer signifikanten Zunahme der LH-R Expression in hippocampalen Neuronen führt. Die Hemmung der hippocampalen Estradiolsynthese mit Letrozol (100 nM) und die damit im Zusammenhang stehende Verminderung der Estradiolsynthese der Zelle, führte hingegen zu keiner signifikanten Änderung der Rezeptor-Expression.

Anhand der Verhältnisse des LH-R an den Granulosazellen des Ovars sollen im Folgenden exemplarisch einige Aspekte der Rezeptorregulierung etwas eingehender dargestellt werden. Auch ihnen dürfte eine Relevanz im Hippocampus zukommen. Darüber hinaus soll es dazu beitragen, besser einschätzen zu können, welche Komponenten beim Zusammenwirken der hippocampalen Estradiolsynthese als wesentlich zu berücksichtigen sind.

Von Granulosazellen des Ovars wissen wir, dass die LH-R-Expression im Zuge des weiblichen Zyklus nicht stetig ist, sondern u.a. durch unterschiedliche relative Verhältnisse der Blutspiegel u.a. von FSH, LH und Estradiol reguliert wird (Richards and Kersey, 1979). Während sich die Granulosazellen des Ovars in Richtung reifen Follikel entwickeln, nimmt die Anzahl der LH-R auf ihrer Zelloberfläche zu. Die ovulatorische Dosis an LH führt vorrübergehend zu einer Abnahme der LH-R-Dichte, die während der Gelbkörperphase wieder zunimmt (Segaloff and Ascoli, 1993).

Bei der vorrübergehenden Abnahme der LH-R-Dichte an den Granulosazellen kommen zwei unterschiedliche Mechanismen zum Tragen. Zum Einen kommt es zu einer

schnellen Antwort, vermutlich vermittelt über posttranslationale Modifikationen des Rezeptors, die innerhalb von Minuten auftritt und zu einer temporären Entkoppelung des Rezeptors vom G-Protein führt (Segaloff and Ascoli, 1993). Dies hat zur Folge, dass die Zelle kein cAMP mehr bilden kann und somit die LH-R-Induktion eingeschränkt ist (Menon et al., 2007). Hypophysäres FSH kommt dabei eine bedeutende Rolle zu. Vieles spricht dafür, dass die Bindung von FSH an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche der Granulosazellen die Synthese von cAMP induziert, das wiederum für die LH-R-Induktion verantwortlich ist. Dabei scheint die kontinuierliche Anwesenheit von FSH für die Erhaltung und Induktion des LH-R Voraussetzung zu sein (Segaloff and Limbird, 1983). Zum Anderen kommt es zu einer Reduktion der Rezeptordichte auf der Oberfläche der Zellen. Diese vollzieht sich über Minuten bis Stunden und wird durch eine Abnahme der Rezeptorsynthese, die Zunahme des Rezeptorabbaus oder der Kombination aus beiden umgesetzt (Segaloff and Ascoli, 1993).

Studien haben gezeigt, dass die Abnahme des LH-R auf der Zelloberfläche der Granulosazellen auf einen Verlust aller vier LH-R mRNA Transkripte beruht. Dabei steht hier, im Vergleich zur verminderten Synthese des Rezeptors, der verstärkte Abbau im Vordergrund (Hoffman et al., 1991; Lu et al., 1993).

In diesem Zusammenhang wurde ein spezifisches RNA-Bindungsprotein im Ovar der Ratte identifiziert, das an eine Cytidin-reichen Region der LH-R mRNA bindet (Kash and Menon, 1998; Kash and Menon, 1999), und dessen Abbau beschleunigt (Nair et al., 2002). Es handelt sich hierbei um die Mevalonatkinase (MVK), die erstmals aus einer Rattenleber isoliert wurde (Tanaka et al., 1990). Die MVK ist ein an der Cholesterinbiosynthese beteiligtes Enzym, das die Umwandlung von Mevalonsäure in 5-Phosphomevalonat katalysiert.

Die MVK wird nach Bindung von LH an seinen Rezeptor im Rahmen der durch die cAMP-Kaskade ausgelösten Transkription einer Reihe für die Steroidsynthese spezifischer Enzyme vermehrt exprimiert. Dies führt zu einer Zunahme von MVK/LH-R mRNA-Komplexen, wodurch der Zerfall von LH-R mRNA gefördert wird, was wiederum zu einer Abnahme der an der Zelloberfläche präsentierten LH-R führt (Menon et al., 2007).

Um den Einfluss von Estradiol auf die LH-R mRNA-Expression zu untersuchen, führten Ikeda et al. (2008) Versuche an Granulosazellen der Ratte durch. Die Zellkulturen wurden über 72 h mit FSH (30 ng/ml), FSH (30 ng/ml) mit E2 (0.1–1 nM) und E2 alleine inkubiert. Es zeigte sich, dass die alleinige Behandlung mit FSH bereits zu einer Zunahme der LH-R mRNA führte. Im Vergleich zur alleinigen FSH Behandlung führte die simultane Stimulation mit E2 in einer Dosis von 1 nM hingegen zu einer etwa 3.5 fach höheren LH-R mRNA-Expression. E2 alleine führte dagegen zu keinen messbaren LH-R-Spiegeln.

Diese Versuche zeigten, dass Estradiol im Ovar in Kombination mit FSH bei der Regulation des LH-R eine wesentliche Rolle spielt. Weitere Studien beschäftigten sich daher mit dem, der Estradiol/FSH Simultanwirkung zugrunde liegenden Mechanismus der LH-R-Expression. Dabei wies man nach, dass Estradiol die FSH-induzierte LH-R mRNA-Expression in den Granulosazellen der Ratte steigert und stabilisiert. Da an der Stabilität der LH mRNA die MVK beteiligt ist, richteten Ikeda und Mitarbeiter (2008) den Fokus auf dieses Enzym. Es konnte gezeigt werden, dass die simultane Applikation von FSH (30 ng/ml) und E2 bei den Granulosazellen eine Abnahme der MVK-Expression zur Folge hatte. Dabei führte die Hinzugabe von E2 (0.1 nM) im Gegensatz zu alleiniger FSH Behandlung zu einer Abnahme der MVK mRNA und einer daraus resultierenden Zunahme der LH-R mRNA. Bei einer E2 Dosis von 1 nM war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt (Ikeda et al., 2008). Diese Daten sprechen dafür, dass E2 in Anwesenheit von FSH die MVK-Expression senkt und damit die Stabilität der LH-R mRNA gesteigert wird, wodurch die LH-R-Dichte an der Zelloberfläche der Granulosazellen zunimmt.

Damit beeinflusst Estradiol in wesentlichem Maße die Regulation der LH-Rezeptor-Expression im Ovar. Es sorgt in der Follikelphase, die durch steigende Östrogenspiegel im Blut gekennzeichnet ist, für die Steigerung der LH-R-Expression, um den reifen Follikel auf die Ovulation vorzubereiten.

Wieder darf wohl davon ausgegangen werden, dass diese Regulationsmechanismen am Ovar auch auf die Verhältnisse im Hippocampus übertragbar sind. Schließlich konnten wir in unseren Experimenten, durch exogene Estradiolapplikation eine signifikante

Zunahme der LH-R-Expression in hippocampalen Neuronen erreichen. Dagegen führte in den Versuchen von Ikeda et al. (2008) im Ovar die alleinige Estradiolbehandlung der Granulosazellen zu keiner Änderung der LH-R-Expression.

Erst kürzlich konnte eine Arbeitsgruppe um Chu (2008) den Nachweis für FSH und seinen Rezeptor im Hippocampus erbringen. Dabei zeigte sich, dass FSH und sein Rezeptor in Zellen der Regionen CA1-3 und dem Gyrus dentatus exprimiert werden. Einige der hippocampalen Neurone dieser Regionen wiesen das gleichzeitige Vorhandensein von FSH und seines Rezeptors auf, was eine auto/parakrine Regulation der hippocampalen Neurone durch das in der Zelle synthetisierten FSH wahrscheinlich macht.

Es wäre also möglich, dass das in den hippocampalen Dispersionskulturen synthetisierte FSH auto/parakrin, zusammen mit dem exogen zugegebenen E2 auf die Zellen wirkt und zu einer Steigerung der LH-R-Expression führt. Dies würde erklären, warum die alleinige Gabe von E2 (100 nM) zu einer Zunahme der LH-R-Expression geführt hat.

Wie bereits oben erwähnt, führte die Hemmung der E2-Synthese durch Letrozol überraschenderweise zu keiner Abnahme der LH-R-Expression. Um diese Diskrepanz zu verstehen, sind weitere Fragen zu klären, die sich u.a. um ein detailliertes Verständnis der Funktion von LH in dem komplexen hormonellen Wechselspiel im Hippocampus bemühen. So könnte E2 etwa zusammen mit FSH die LH-R-Expression in hippocampalen Neuronen über den Einfluss auf die MVK regulieren. Es könnte sein, dass die MVK-Expression erst ab einer bestimmten E2-Konzentration beeinflusst wird und eine Grundaktivität auch bei sinkenden E2-Spiegeln erhalten bleibt. Dies könnte beispielweise die fehlende Auswirkung einer Letrozolbehandlung auf die LH-R-Expression erklären.

Versuche in unserem Labor befassen sich zur Zeit mit der direkten LH-Wirkung auf hippocampale Neurone. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass LH, ähnlich wie GnRH, die hippocampale E2-Synthese induziert.

V. 5 Die Behandlung der Kulturen hat keinen Einfluss auf die Zahl der GnRH- und LH-Rezeptor-positiven Zellen

Im Rahmen der Zellzählung wurde nicht die Menge des Rezeptorproteins der einzelnen Zellen gemessen, sondern untersucht, ob die Behandlung der Dispersionskulturen mit Letrozol bzw. Estradiol zu einer Änderung der Anzahl der Zellen, die über einen GnRH- bzw. LH-Rezeptor verfügen, führt. Dies war nicht der Fall. Die Anzahl der GnRH- bzw. LH-R-positiven Zellen war in allen 3 Gruppen annährend gleich.

Die Tatsache, dass in den 3 Gruppen die Anzahl Rezeptor-positiver Zellen annährend gleich ist und der Anteil der GnRH-R-positiven Zellen bei ca. 90%, der Anteil der LH-R-positiven Zellen bei ca. 80% liegt, lässt vermuten, dass annährend alle Zellen der untersuchten Dispersionskulturen über eine Mindestmenge an Rezeptorprotein verfügen und diese durch die Behandlung nicht beeinflusst wurde.

V. 6 Wie führt Estradiol zu einer gesteigerten synaptischen Plastizität und welche Folgen hat dies?

Der folgende Abschnitt soll als kleiner Exkurs die Kernfrage unserer Versuche beleuchten. Welche Prozesse führen zu einer gesteigerten Synapsenaussprossung im Hippocampus und welchen Zweck erfüllt dieses Phänomen?

Die Induktion der Synapsenbildung ist hoch komplex und wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Es gibt folgende unterschiedliche Ansatzpunkte:

Zum Einen scheint es, als würde Estradiol die intrinsische Erregbarkeit von Neuronen in unterschiedlichen Hirnarealen wie den Hippocampus insofern zu beeinflussen, als es die Sensitivität, sowie die Anzahl des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors erhöht (Gazzaley et al., 1996; Woolley et al., 1997; Rudick and Woolley, 2001). Der NMDA-Rezeptor ist der Rezeptor für den Neurotransmitter Glutamat, wobei in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist, dass im Wesentlichen die erregende Stimulation auf die Pyramidenzellen der CA1-Region über glutamaterge Synapsen von den Pyramidenzellen der CA3-Region stammt (Woolley, 2007). Neben dem NMDA-

Rezeptor scheinen auch die sog. non-NMDA-Rezeptoren, wie der α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure (AMPA)-Rezeptor und der Kainatrezeptor, eine Rolle bei der Übermittlung spineinduzierender Wirkungen zu spielen (Woolley, 2007).
Estradiolbehandlung führte in hippocampalen Neuronen zu rapiden Änderungen der *firing rate*, sowie in manchen Fällen zu Änderungen der Kalium-Strömung (Woolley, 2007). Diese gewährleistet u.a. die adäquate Erregbarkeit der Zelle. Wurden hippocampale Neurone der CA1-Region für einige Minuten mit E2 behandelt, kam es neben einem spontanen Feuern der Neurone (Wong et al., 1991) auch innerhalb einiger Minuten durch Unterdrückung der Afterhyperpolarisation (Carrer et al., 2003) zu einer Steigerung der Erregbarkeit der Pyramidenzellen. Die Afterhyperpolarisation tritt im Anschluss eines Aktionspotentials auftritt und sorgt für die Anergie der Zelle.
Zusätzlich erkannte man, dass Estradiol in Slices der CA1-Region zu einer Steigerung des dendritischen exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) hippocampaler Neurone führt (Fugger et al., 2001). Diese eben beschriebenen Estradiolwirkungen scheinen einen Einfluss auf die Spineinduktion zu haben.

Zum Anderen scheinen GABA(γ-Aminobuttersäure)erge Interneurone, die hemmende Impulse auf die Pyramidenzellen ausüben, die Aussprossung neuer Spines zu beeinflussen. Diese Interneurone verfügen über ER (Weiland et al., 1996). Murphy (1998) konnte zeigen, dass die Behandlung mit Estradiol in einer Reduktion der γ-Glutamatdecarboxylase (GAD), dem GABA synthetisierenden Enzym, resultierte. Dies wiederum führt zu einer verminderten Synthese des inhibitorischen Transmitters GABA in den Interneuronen, wodurch es zu einer Abnahme der hemmenden Wirkung auf die Pyramidenzellen kommt. Dies könnte wiederum den exzitatorischen Input auf die Pyramidenzellen erhöhen und die Bildung neuer Spines zur Folge haben. Diese Hypothese verlangt weiterführende Versuche.

Doch warum kommt es im Zuge des Zyklus zu Änderungen der Spinedichte? Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Wirkung von Östrogen und die damit im Zusammenhang stehende Zunahme der synaptischen Plastizität auf Hippocampus-spezifische Funktionen untersucht. Dabei überprüfte man u.a. das Orientierungsempfinden bzw. –lernen. Zu diesem Thema führten anfänglich eine Vielzahl von Versuchen zu keinen oder nur zu sehr gering ausgeprägten Effekten (Berry et al., 1997; Stackman et al.,

1997; Warren and Juraska 1997; Chesler and Juraska 2000). 2001 jedoch konnte in einer Studie ein Einfluss von Estradiol auf das Orientierungsgedächtnis nachgewiesen werden. In einem modifizierten Morris Watermaze Verhaltenstest konnte gezeigt werden, dass das Orientierungsvermögen der Ratten in der Phase höherer Spinedichten, welche nach vorheriger E2 Applikation auftrat, verbessert war (Sandstrom and Williams, 2001).

Möglicherweise verschafft dieses verbesserte Orientierungsvermögen, wie dies Cooke und Woolley (2005) zu erklären versuchten, im Fall der Ratte, dieser gewisse Vorteile in Bezug auf eine erfolgreichere Reproduktion.

VI. Zusammenfassung

Nachdem bei weiblichen Ratte gezeigt wurde, dass die Spinedichte im Hippocampus mit den im ovariellen Zyklus schwankenden Östrogenspiegeln korreliert, ging man lange Zeit davon aus, dass das gonadale Östrogen für die Änderung der synaptischen Plastizität im Hippocampus verantwortlich ist (Woolley et al., 1990; McEwen, 2002).

2003 wiesen Prange-Kiel und Mitarbeiter die *de novo* Synthese des Sexualhormons Estradiol in hippocampalen Neuronen nach, so dass wir davon ausgehen, dass eine entscheidende Rolle bei der Regulation der synaptischen Plastizität dem hippocampal synthetisierten E2 zukommt (Prange-Kiel et al., 2003). Diese Annahme wurde von *in vitro* Untersuchungen gestützt, welche keinen Einfluss von exogenen E2 auf die synaptische Plastizität im Hippocampus zeigten (Kretz et al., 2004).

Wir befassten uns mit der Frage, ob die für die Regulation der ovariellen Estradiolsynthese verantwortlichen Hormone, in erster Linie GnRH, aber auch die Gonadotropine LH und FSH (letzteres wurde bisher von uns nicht experimentell untersucht), ebenfalls an der Regulation der Estradiolsynthese im Hippocampus beteiligt sind. Diese Vermutung konnten wir durch unsere Versuche bestätigen.

Zu Beginn untersuchten wir, ob im Hippocampus potentielle Bindungsstellen für GnRH und LH vorhanden sind. Wir konnten immunhistochemisch den GnRH-R in Neuronen, sowie erstmals in Astrozyten und Mikroglia nachweisen. Der LH-R lies sich zusätzlich in Oligodendrozyten des Hippocampus anfärben.

Mit dem Rezeptornachweis war die Vorraussetzung erfüllt, um eine Beteiligung der beiden Hormone an der Regulation der hippocampalen E2-Synthese in Betracht zu ziehen. Dies bekräftigte uns in der Annahme, dass GnRH bzw. LH eine Rolle im Zusammenhang mit der hippocampalen Estradiolsynthese spielt. In der Zwischenzeit konnte dies für GnRH nachgewiesen werden (Prange-Kiel et al., 2008).

Wenn nun GnRH und LH bei der Regulation der E2-Synthese eine Rolle spielen, kann davon ausgegangen werden, dass deren Wirkung unter Einhaltung allgemeiner biologischer Prinzipien, im Sinne eines Feedback-Mechanismus, erfolgt.

Vorausgegangene Studien zeigten, dass Estradiol die GnRH-R mRNA-Expression in Zellen des Ovars vermindert (Nathwani et al., 2000). Wir untersuchten deshalb, ob die GnRH-R -und LH-R-Expression in hippocampalen Neuronen durch Estradiol beeinflusst wird.

Die exogene Applikation von Estradiol zu hippocampalen Neuronen führte zu keiner Änderung der GnRH-R-Expression. Die Hemmung der endogenen Estradiolsynthese durch Letrozol führte dagegen zu einer signifikanten Zunahme der GnRH-R-Expression.

Bei der Regulation des LH-R schien weniger das endogene Estradiol als das exogen applizierte Estradiol eine Rolle zu spielen. Während die Hemmung der endogenen Estradiolsynthese zu keiner Änderung der LH-R-Expression führte, zeigte die exogene Applikation von E2 eine signifikante Zunahme der Rezeptordichte.

Anschließend wurde untersucht, ob die Anzahl der Zellen, die in den Dispersionskulturen über einen GnRH- bzw. LH-R verfügen durch Estradiol verändert wird. Im Rahmen der Zellzählungen, ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zeigen.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Regulationsmechanismen der hippocampalen Estradiolsynthese. Sie zeigt, dass die Expression der GnRH- und LH-R auf Protein-Niveau durch Estradiol beeinflusst wird und somit Teil eines Regelkreises ist.

Da seit kurzem bekannt ist, dass GnRH in der Lage ist, die E2-Synthese in hippocampalen Neuronen direkt zu stimulieren (Prange-Kiel et al., 2008), könnte diese Reaktion Teil eines fein abgestimmten Regulationsmechanismus der hippocampalen E2-Synthese sein. Demnach würde die GnRH-R-Expression durch eine gewisse Konzentration an endogenem E2, im Sinne einer negativen Rückkoppelung, auf einem basalen Niveau gehalten, um eine überschiessende E2-Synthese zu verhindern. Kommt es jedoch zu einer Abnahme der endogenen Estradiolkonzentration, steigt die Anzahl der GnRH-R an, wodurch die GnRH-Wirkung auf die E2-Synthese zunehmen kann.

Ikeda et al. (2008) konnte kürzlich am Ovar zeigen, dass FSH in Kombination mit E2 die LH-R-Expression erhöht. Sehr wahrscheinlich scheint die LH-R-Expression im Hippocampus auf ähnliche Weise reguliert zu werden. Neueste Erkenntnisse, welche eine FSH-Synthese in hippocampalen Neuronen beschreiben, unterstützen diese These (Chu et al., 2008).

Wir gehen davon aus, dass nicht das gonadale E2, sondern das im Hippocampus synthetisierte E2 auf die synaptische Plastizität wirkt. Dabei scheint die pulsatile Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus neben der Stimulation der ovariellen E2-Synthese auch die hippocampale E2-Synthese zu induzieren und zu modulieren.

VII. Literaturverzeichnis

Amateau, S.K. and M.M. McCarthy (2002). "Sexual differentiation of astrocyte morphology in the development rat preoptic area." J Neuroendocrinol **14**(11): 904-910.

Araque, A., V. Parpura, R.P. Sanzgiri, P.G. Haydon (1999). "Tripartite synapses: glia the unacknowledged partner." Trends in Neurosci **22(5)**: 208-215.

Azcoitia, I, A. Sierra, S. Veiga, L.M. Garcia-Segura (2003). "Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective." Ann N Y Acad Sci **1007**: 298–305.

Badr, M. and G. Pelletier (1987). "Characterization and autoradiographic localization of LHRH receptors in the rat brain." Synapse **1**(6): 567-71.

Bagshawe, K.D., A.H. Orr, A.G. Rushworth (1968). "Relationship between concentrations of human chorionic gonadotrophin in plasma and cerebrospinal fluid." Nature **217**(5132): 950-1.

Balasinor, N., M.K. Gill-Sharma, P. Parte, H.S. Juneja (1992). "Cerebrospinal fluid and blood concentrations of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin following castration of adult male rats." Acta Endocrinol (Copenh) **127**(1): 58-65.

Behl, C. (2005). "Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy." Subcell Biochem **38**: 65-78.

Behl, C. and D. Manthey (2000). "Neuroprotective activities of estrogen: an update." J Neurocytol **29**(5-6): 351-8.

Berry, B., R. McMahan, M. Gallagher (1997). "Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task." Behav Neurosci **111**(2): 267-74.

Berthois, Y., J.A. Katzenellenbogen, and B.S. Katzenellenbogen (1986). "Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogenresponsive cells in culture." Proc Natl Acad Sci U S A. **83**:2496-500.

Beyer, C., J. Pawlak, M. Karolczak (2003). "Membrane receptors for oestrogen in the brain." J Neurochem **87**(3): 545-50.

Bouvier, C., G. Lagacé, R. Collu (1991). "G protein modulation by estrogens." Mol Cell Endocrinol **79**(1-3): 65-73.

Brewer, G.J. (1997). "Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons." J Neurosci Methods **71**(2): 143-55.

Bruce-Keller, A.J., J.L. Keeling, J.N. Keller, F.F. Huang, S. Camondola, M.P. Mattson (2000). "Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation." Endocrinology **141**(10): 3646-3656.

Caraty, A., B. Delaleu, D. Chesneau, C. Fabre-Nys (2002). "Sequential role of e2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes." Endocrinology **143**(1):139-45.

Carrer, H.F., A. Araque, W. Buño (2003). "Estradiol regulates the slow Ca2+-activated K+ current in hippocampal pyramidal neurons." J Neurosci **23**(15): 6338-44.

Cheng, C.K. and P.C. Leung (2005). "Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans." Endocr Rev **26**(2): 283-306.

Cheng, C.K., B.K. Chow, P.C. Leung (2003). "An activator protein 1-like motif mediates 17beta-estradiol repression of gonadotropin-releasing hormone receptor promoter via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism in ovarian and breast cancer cells." Mol Endocrinol **17**(12): 2613-29.

Cheng, K.W., C.K. Cheng, P.C. Leung (2001). "Differential role of PR-A and -B isoforms in transcription regulation of human GnRH receptor gene." Mol Endocrinol **15**(12): 2078-92.

Chesler, E.J. and J.M. Juraska (2000). "Acute administration of estrogen and progesterone impairs the acquisition of the spatial morris water maze in ovariectomized rats." Horm Behav **38**(4): 234-42.

Cho, J.J., F.A. Iannucci, M. Fraile, J. Franco, T.N. Alesius, G.B. Stefano (2003). "The role of the estrogen in neuroprotection: implications for neurodegenerative diseases." Neuro Endocrinol Lett **24**(3-4): 141-7.

Chu, C., G. Gao, W. Huang (2008). "A study on co-localization of FSH and its receptor in rat hippocampus." J Mol Histol **39**(1): 49-55.

Conn, P.M. (1994). In "The Physiology of Reproduction" (E. Knobil and J.D.Neill, eds.), vol. 1, pp. 1815-1832. Raven Press, New York.

Cooke, B.M. and C.S. Woolley (2005). "Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS." J Neurobiol **64**(1): 34-46.

Crowder, M.E. and T.M. Nett (1984). "Pituitary content of gonadotropins and receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic content of GnRH during the periovulatory period of the ewe." Endocrinology **114**(1): 234-9.

Croxatto, H. and J. Arrau (1964). "Luteinizing Hormone-Like Activity in Human Median Eminence Extracts." Nature **204**: 584-5.

Cyr, M., F. Calon, M. Morissette, T. Di Paolo (2002). "Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease." J Psychiatry Neurosci **27**(1): 12-27.

Del Cerro, S., J. Garcia-Estrada and L.M. Garcia-Segura (1995). "Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats." Glia **14**: 65-71.

Dirnhofer, S., C. Berger, M. Hermann, G. Steiner, S. Madersbacher, P. Berger (1998). "Coexpression of gonadotropic hormones and their corresponding FSH- and LH/hCG receptors

in the human prostate." Prostate **35**(3): 212-20.

Eidne, K.A., R.E. Sellar, G. Couper, L. Anderson, P.L. Taylor (1992). "Molecular cloning and characterisation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor." Mol Cell Endocrinol **90**(1): R5-9.

Emanuele, N.V., J. Anderson, E. Andersen, E. Connick, G. Baker, L. Kirsteins, A.M. Lawrence (1983). "Extrahypothalamic brain luteinizing hormone: characterization by radioimmunoassay, chromatography, radioligand assay and bioassay." Neuroendocrinology **36**(4): 254-60.

Fester, L., V. Ribeiro-Gouveia, J. Prange-Kiel, C. von Schassen, M. Böttner, H. Jarry, G.M. Rune (2006). "Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis." J Neurochem **97**(4): 1136-44.

Fugger, H.N., A. Kumar, D.B. Lubahn, K.S. Korach, T.C. Foster (2001). "Examination of estradiol effects on the rapid estradiol mediated increase in hippocampal synaptic transmission in estrogen receptor alpha knockout mice." Neurosci Lett **309**(3): 207-9.

Furukawa, A., A. Miyatake, T. Ohnishi, Y. Ichikawa (1998). "Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain." J Neurochem **71**(6): 2231-8.

Garcia-Segura, L.M. and R.C. Melcangi (2006). "Steroids and glial cell function." Glia **54**(6): 485-98.

Garcia-Segura, L.M., I. Torres-Aleman and F. Naftolin (1989). "Astrocytic shape and glial fibrillary acidic protein immunreactivity are morified by estradiol in primary rat hypothalamic cultures." Brain Res Dev Brain Res **47**(2): 298-302.

Garcia-Segura, L.M. A. Wozniak, I. Azcoitia, J.R. Rodriguez, R.E. Hutchison, J.B. Hutchison (1999). "Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair." Neuroscience **89**(2): 567-578.

Garcia-Segura, L.M., I.Azcoitia, L.L. Don Carlos (2001). "Neuroprotection by estradiol." Prog Neurobiol **63**(1): 29-60.

Gazzaley, A.H., N.G. Weiland, B.S. McEwen, J.H. Morrison (1996). "Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus." J Neurosci **16**(21): 6830-8.

Gould, E., C.S. Woolley, M. Frankfurt, B.S. McEwen (1990). "Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood." J Neurosci **10**(4): 1286-91.

Green, S., V. Kumar, A. Krust, P. Walter, P. Chambon (1986). "Structural and functional domains of the estrogen receptor." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 2**: 751-8.

Gross, D.S. and R.B. Page (1979). "Luteinizing hormone and follicle-stimulating

hormone production in the pars tuberalis of hypophysectomized rats." Am J Anat **156**(2): 285-91.

Hapgood, J.P., H. Sadie, W. van Biljon, K. Ronacher (2005). "Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes." J Neuroendocrinol **17**(10): 619-38.

Haydon, P.G. (2001). "Glia: Listening and talking to the synapse." Nature Rev. Neurosci. **2**(3): 185-193.

Hazum, E., P. Cuatrecasas, J. Marian, P.M. Conn (1980). "Receptor-mediated internalization of fluorescent gonadotropin-releasing hormone by pituitary gonadotropes." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6692-5.

Herbison, A.E. (1998). "Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocr Rev **19**(3): 302-30.

Hoffman, Y.M., H. Peegel, M.J. Sprock, Q.Y. Zhang, K.M. Menon (1991). "Evidence that human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor down-regulation involves decreased levels of receptor messenger ribonucleic acid." Endocrinology **128**(1): 388-93.

Hojo, Y., T.A. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H.T. Ishii, H. Mukai, J.H. Morrison, W.G. Janssen, S. Kominami, N. Harada, T. Kimoto, S. Kawato (2004). "Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 865-70

Hösli, E., K. Jurasin, W. Rühl, R. Lüthy, L. Hösli (2001). "Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured astrocytes of rat central nervous system." Int J Dev Neurosci **19**(1): 11-19.

Hostetter, G., R. V. Gallo, M.S. Brownfield (1981). "Presence of immunoreactive luteinizing hormone in the rat forebrain." Neuroendocrinology **33**(4): 241-5.

Ikeda, S., K. Nakamura, K. Kogure, Y. Omori, S. Yamashita, K. Kubota, T. Mizutani, K. Miyamoto, T. Minegishi (2008). "Effect of Estrogen on the Expression of Luteinizing Hormone-Human Chorionic Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Cultured Rat Granulosa Cells." Endocrinology **149**(4): 1524-33.

Iveson, T.J., I.E. Smith, J. Ahern, D.A. Smithers, P.F. Trunet, and M. Dowsett (1993). "Phase I study of the oral nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 20267 in healthy postmenopausal women." J Clin Endocrinol Metab. **77**(2): 324-31.

Janssens, R.M., L. Brus, D.J. Cahill, J.A. Huirne, J. Schoemaker, C.B. Lambalk (2000). "Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists." Hum Reprod Update **6**(5): 505-18.

Jennes, L. and W.E. Stumpf (1980). "LHRH-systems in the brain of the golden hamster." Cell Tissue Res **209**(2): 239-56.

Jennes, L., B. Dalati, P.M. Conn (1988). "Distribution of gonadrotropin releasing

hormone agonist binding sites in the rat central nervous system." Brain Res **452**(1-2): 156-64.

Jennes, L., O. Eyigor, J.A. Janovick, P.M. Conn (1997). "Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation." Recent Prog Horm Res **52**: 475-90.

Jennes, L., T. McShane, B. Brame, A. Centers (1996). "Dynamic changes in gonadotropin releasing hormone receptor mRNA content in the mediobasal hypothalamus during the rat estrous cycle." J Neuroendocrinol **8**(4): 275-81.

Jennes, L. and S. Woolums (1994). "Localization of Gonadotropin-Releasing-Hormone Receptor Messenger-RNA in Rat-Brain." Endocrine **2**(6): 521-28.

Jung-Testas, I. and E.E. Baulieu (1998). "Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system." J Steroid Biochem Mol Biol **65**(3-8): 243-251.

Kaiser, U.B., D. Zhao, G.R. Cardona, W.W. Chin (1992). "Isolation and characterization of cDNAs encoding the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor." Biochem Biophys Res Commun **189**(3): 1645-52.

Kakar, S.S., K. Grantham, L.C. Musgrove, D. Devor, J.C. Sellers, J.D. Neill (1994). "Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: tissue expression and hormonal regulation of its mRNA." Mol Cell Endocrinol **101**(1-2): 151-7.

Kash, J.C. and K.M. Menon (1998). "Identification of a hormonally regulated luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor mRNA binding protein. Increased mrna binding during receptor down-regulation." J Biol Chem **273**(17): 10658-64.

Kash, J.C. and K.M. Menon (1999). "Sequence-specific binding of a hormonally regulated mRNA binding protein to cytidine-rich sequences in the lutropin receptor open reading frame." Biochemistry **38**(51): 16889-97.

Kero, J., M. Poutanen, F.P. Zhang, N. Rahman, A.M. McNicol, J.H. Nilson, R.A. Keri, IT Huhtaniemi (2000). "Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex." J Clin Invest **105**(5): 633-41.

Klinge, C.M. (2001). "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements." Nucleic Acids Res **29**(14): 2905-19.

Knobil, E. and J. Hotchkiss (1988). "The menstrual cycle and its neuroendocrine control." The Physiology of Reproduction pp. 1971-1994, Raven Press, New York.

Knowles, F. (1972). "Ependyma of the third ventricle in relation to pituitary function." Prog Brain Res **38**: 255-70.

Kretz, O., L. Fester, U. Wehrenberg, L. Zhou, S. Brauckmann, S Zhao, J. Prange-Kiel, T. Naumann, H. Jarry, M. Frotscher, G.M. Rune (2004). "Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis." J Neurosci **24**(26): 5913-21.

Krug, R., M. Molle, C. Dodt, H.L. Fehm, J. Born (2003). "Acute influences of estrogen

and testosterone on divergent and convergent thinking in postmenopausal women." Neuropsychopharmacology **28**(8): 1538-45.

Kuiper, G.G., E. Enmark, M. Pelto-Huikko, S. Nilsson, J.A. Gustafsson (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.

Latouche J., M. Crumeyrolle-Arias, D. Jordan, N. Kopp, B. Augendre-Ferrante, L. Cedard, F. Haour (1989). "GnRH receptors in human granulosa cells: anatomical localization and characterization by autoradiographic study." Endocrinology **125**(3): 1739-1741.

Laws, S.C., M.J. Beggs, J.C. Webster, W.L. Miller (1990). "Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary culture." Endocrinology **127**(1): 373-80.

LeBlanc, E.S., J. Janowsky, B.K. Chan, H.D. Nelson (2001). "Hormone replacement therapy and cognition: systematic review and meta-analysis." JAMA **285**(11): 1489-99.

Leblanc, P., M. Crumeyrolle, J. Latouche, D. Jordan, G. Fillion, A. L'Heritier, C. Kordon, M. Dussaillant, W. Rostene, F. Haour (1988). "Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus." Neuroendocrinology **48**(5): 482-8.

Lee, S.J. and B.S. McEwen (2001). "Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 569-91.

Lei, Z.M., C.V. Rao, J.L. Kornyei, P. Licht, E.S. Hiatt (1993). "Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain." Endocrinology **132**(5): 2262-70.

Leranth, C., M. Shanabrough, and D.E. Redmond, Jr. (2002). "Gonadal hormones are responsible for maintaining the integrity of spine synapses in the CA1 hippocampal subfield of female nonhuman primates." J Comp Neurol **447**(1):34-42.

Lindzey, J., F.L. Jayes, M.M. Yates, J.F. Couse, K.S. Korach (2006). "The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor-alpha." J Endocrinol **191**(1): 309-17.

Loumaye, E. and K.J. Catt (1982). "Homologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells." Science **215**(4535): 983-5.

Lu, D.L., H. Peegel, S.M. Mosier, K.M. Menon (1993). "Loss of lutropin/human choriogonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during ligand-induced downregulation occurs post transcriptionally." Endocrinology **132**(1): 235-40.

McArdle, C.A., E. Schomerus, I. Gröner, A. Poch (1992). "Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone receptor number, growth and inositol phosphate production in alpha T3-1 cells." Mol Cell Endocrinol **87**(1-3): 95-103.

McArdle, C.A., W.C. Gorospe, W.R. Huckle, and P.M. Conn (1987). "Homologous down-regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors and desensitization of

gonadotropes: lack of dependence on protein kinase C." Mol Endocrinol **1**(6): 420-9.

McCullough, L.D. and P.D. Hurn (2003). "Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view." Trends Endocrinol Metab **14**(5): 228-35.
McEwen, B. (2002). "Estrogen actions throughout the brain." Recent Prog Horm Res **57**: 357-84.

McEwen, B.S. and S.E. Alves (1999). "Estrogen actions in the central nervous system." Endocr Rev **20**(3): 279-307.

McQueen, J.K., H. Wilson, G. Fink (1997). "Estradiol-17 beta increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain." Brain Res Mol Brain Res **45**(1): 13-23.

Mellon, S.H., L.D. Griffin, and N.A. Compagnone (2001). "Biosynthesis and action of neurosteroids." Brain Res Brain Res Rev. **37**(1-3): 3-12.

Menon, K.M., A.K. Nair, L. Wang, H. Peegel (2007). "Regulation of luteinizing hormone receptor mRNA expression by a specific RNA binding protein in the ovary." Mol Cell Endocrinol **260-262:**109-16.

Millar, R.P., Z.L. Lu, A.J. Pawson, C.A. Flanagan, K. Morgan, S.R. Maudsley (2004). "Gonadotropin-releasing hormone receptors." Endocr Rev. **25**(2): 235-75.

Mosselman, S., J. Polman, R. Dijkema (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." FEBS Lett **392**(1): 49-53.

Murphy, D.D., N.B. Cole, V. Greenberger, M. Segal (1998). "Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons." J Neurosci **18**(7): 2550-9.

Nadji, M., C. Gomez-Fernandez, P. Ganjei-Azar, A.R. Morales (2005). "Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers." Am J Clin Pathol **123**(1): 21-7.

Nair, A.K., J.C. Kash, H. Peegel, K.M. Menon (2002). "Post-transcriptional regulation of luteinizing hormone receptor mRNA in the ovary by a novel mRNA-binding protein." J Biol Chem **277**(24): 21468-73.

Naftolin, F., K.J. Ryan, Z. Petro (1971). "Aromatization of androstenedione by the diencephalon." J Clin Endocrinol Metab **33**(2): 368-70.

Nathwani, P.S., S.K. Kang, K.W. Cheng, K.C. Choi, P.C. Leung (2000). "Regulation of gonadotropin-releasing hormone and its receptor gene expression by 17beta-estradiol in cultured human granulosa-luteal cells." Endocrinology **141**(5): 1754-63.

Negri-Cesi, P., R.C. Melcangi, F. Celotti, L. Martini (1992). "Aromatase activity in cultured brain cells: Difference between neurons and glia." Brain Res **589**(2): 327–332.

Oliver, C., R.S. Mical, J.C. Porter (1977). "Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk." Endocrinology **101**(2): 598-604.

Osterlund, M., G.G. Kuiper, J.A. Gustafsson, Y.L. Hurd (1998). "Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain." Brain Res Mol Brain Res **54**(1): 175-80.

Parinaud, J., A. Beaur, E. Bourreau, G. Vieitez, G. Pontonnier (1988). "Effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells." Fertil Steril **50**(4): 597-602.

Perea, G. and A. Araque (2002). "Communication between astrocytes and neurons: a complex language." J. Physiology Paris **96**(3-4): 199-207.

Pfaff, D.W., Schwartz-Giblin, S., McCarty, M.M., and Kow, L-M. (1994). "In The Physiology of Reproduction" (E. Knobil and J.D.Neill, eds.), vol. 2, pp. 107-220. Raven Press, New York.

Pike, C.J. (1999). "Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloidinduced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease." J Neurochem **72**(4): 1552-63.

Possinger, K. (2004). "Fulvestrant - a new treatment for postmenopausal women with hormone-sensitive advanced breast cancer." Expert Opin Pharmacother **5**(12): 2549-58.

Pozzo-Miller, L.D., W. Gottschalk, L. Zhang, K. McDermott, J. Du, R. Gopalakrishnan, C. Oho, Z.H. Sheng, B. Lu (1999). "Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice." J Neurosci **19**(12): 4972-83.

Prange-Kiel, J. and G.M. Rune (2006). "Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus." Neuroscience **138**(3): 765-72.

Prange-Kiel, J., G.M. Rune, C. Leranth (2004). "Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats." Eur J Neurosci **19**(2): 309-17.

Prange-Kiel, J., H. Jarry, M. Schoen, P. Kohlmann, C. Lohse, L. Zhou, G.M. Rune (2008). "Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis." J Cell Biol **180**(2): 417-26.

Prange-Kiel, J., U. Wehrenberg, H. Jarry, G.M. Rune (2003). "Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons." Hippocampus **13**(2): 226-34.

Reiter, E., M. McNamara, J. Closset, G. Hennen (1995). "Expression and functionality of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in the rat prostate." Endocrinology **136**(3): 917-23.

Reubi, J.C., J.M. Palacios, R. Maurer (1987). "Specific luteinizing-hormone-releasing hormone receptor binding sites in hippocampus and pituitary: an autoradiographical study." Neuroscience **21**(3): 847-56.

Revankar, C.M., D.F. Cimino, L.A. Sklar, J.B. Arterburn, E.R. Prossnitz (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." Science **307**(5715): 1625-30.

Richards, J.S., and K.A. Kersey (1979). "Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 beta." Biol Reprod **21**(5): 1185-201.

Rocha, B.A., R. Fleischer, J.M. Schaeffer, S.P. Rohrer, G.J. Hickey (2005). "17 Betaestradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice." Psychopharmacology (Berl) **179**(3): 637-43.

Roth, G. (2001). "Fühlen, Denken, Handeln. Wie das Gehirn unser Verhalten steuert." Suhrkamp Verlag Frankfurt/Main: 160-61.

Rudick, C.N. and C.S. Woolley (2001). "Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in the adult female rat." J Neurosci **21**(17): 6532-43.

Rune, G.M., U. Wehrenberg, J. Prange-Kiel, L. Zhou, G. Adelmann, M. Frotscher (2002). "Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus." Neuroscience **113**(1): 167-75.

Rune, G.M., C. Lohse, J. Prange-Kiel, L. Fester, M. Frotscher (2006). "Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus?" Neurochem Res **31**(2): 145-55.

Sandstrom, N.J. and C.L. Williams (2001). "Memory retention is modulated by acute estradiol and progesterone replacement." Behav Neurosci **115**(2): 384-93.

Savoy-Moore, R.T., N.B. Schwartz, J.A. Duncan, J.C. Marshall (1980). "Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle." Science **209**(4459): 942-4.

Segaloff, D.L. and L.E. Limbird (1983). "Luteinizing hormone receptor appearance in cultured porcine granulosa cells requires continual presence of follicle-stimulating hormone." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(18): 5631-5.

Segaloff, D.L. and M. Ascoli (1993). "The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later." Endocr Rev **14**(3): 324-47.

Seminara, S.B., F.J. Hayes, W.F. Crowley jr. (1998). "Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations." Endocr Rev **19**(5): 521-39.

Shaywitz, S.E., F. Naftolin, D. Zelterman, K.E. Marchione, J.M. Holahan, S.F. Palter, B.A. Shaywitz (2003). "Better oral reading and short-term memory in midlife, postmenopausal women taking estrogen." Menopause **10**(5): 420-6.

Sherwin, B.B. (2002). "Estrogen and cognitive aging in women." Trends Pharmacol Sci **23**(11): 527-34.

Shome, B. and A.F. Parlow (1973). "The primary structure of the hormone-specific, beta subunit of human pituitary luteinizing hormone (hLH)." J Clin Endocrinol Metab **36**(3): 618-21.

Shughrue, P.J. and I. Merchenthaler (2000). "Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus." Neuroscience **99**(4): 605-12.

Simpson, E., G. Rubin, C. Clyne, K. Robertson, L. O'Donnell, S. Davis, M. Jones (1999). "Local estrogen biosynthesis in males and females." Endocr Relat Cancer **6**(2): 131-7.

Skinner, D.C. and A. Caraty (2002). "Measurement and possible function of GnRH in cerebrospinal fluid in ewes." Reprod Suppl **59**: 25-39.

Stackman, R.W., M.E. Blasberg, C.J. Langan, A.S. Clark (1997). "Stability of spatial working memory across the estrous cycle of Long-Evans rats." Neurobiol Learn Mem **67**(2): 167-71.

Stanislaus, D., J.H. Pinter, J.A. Janovick, P.M. Conn (1998). "Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone." Mol Cell Endocrinol **144**(1-2): 1-10.

Stoffel-Wagner, B. (2001). "Neurosteroid metabolism in the human brain." Eur J Endocrinol **145**(6): 669-79.

Tanaka, R.D., B.L. Schafer, L.Y. Lee, J.S. Freudenberger, S.T. Mosley (1990). "Purification and regulation of mevalonate kinase from rat liver." J Biol Chem **265**(4): 2391-8.

Toran-Allerand, C.D., X. Guan, N.J. MacLusky, T.L. Horvath, S. Diano, M. Singh, E.S. Connolly jr., I.S. Nethrapalli, A.A. Tinnikov (2002). "ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury." J Neurosci **22**(19): 8391-401.

Tsutsumi, M., S.C. Laws, and S.C. Sealfon (1993). "Homologous up-regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor in alpha T3-1 cells is associated with unchanged receptor messenger RNA (mRNA) levels and altered mRNA activity." Mol Endocrinol **7**(12):1625-33.

Tsutsumi, M., S.C. Laws, V. Rodic, and S.C. Sealfon (1995). "Translational regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor in alpha T3-1 cells." Endocrinology **136**(3):1128-36.

Turgeon, J.L., Y. Kimura, D.W. Waring, P.L. Mellon (1996). "Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line." Mol Endocrinol **10**(4): 439-50.

von Schassen, C., L. Fester, J. Prange-Kiel, C. Lohse, C. Huber, M. Böttner, G.M. Rune (2006). "Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth." J Neuroendocrinol **18**(11): 847-56.

Warren, S.G. and J.M. Juraska (1997). "Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle." Behav Neurosci **111**(2): 259-66.

Wehrenberg, U., J. Prange-Kiel, G.M. Rune (2001). "Steroidogenic factor-1 expression

in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase." J Neurochem **76**(6): 1879-86.

Witkin, J.W., C.M. Paden, A.J. Silverman (1982). "The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain." Neuroendocrinology **35**(6): 429-38.

Weiland N.G., C. Orikasa, S. Hayashi, B.S. McEwen (1996). "Localization of estrogen receptors in the hippocampus of male and female rats." Soc Neurosci Abstr 22: 618.

Wong, M. and R.L. Moss (1991). "Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 beta-estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus." Brain Res **543**(1): 148-52.

Woolley, C.S. (2007). "Acute effects of estrogen on neuronal physiology." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 657-80.

Woolley, C. S., E. Gould, M. Frankfurt, B.S. McEwen (1990). "Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons." J Neurosci **10**(12): 4035-9.

Woolley, C.S., N.G. Weiland, B.S. McEwen, P.A. Schwartzkroin (1997). "Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptormediated synaptic input: correlation with dendritic spine density." J Neurosci **17**(5):1848-59.

Wu, J.C., S.C. Sealfon, W.L. Miller (1994). "Gonadal hormones and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) alter messenger ribonucleic acid levels for GnRH receptors in sheep." Endocrinology **134**(4): 1846-50.

Yeung, C.M., B.S. An, C.K. Cheng, B.K. Chow, P.C. Leung (2005). "Expression and transcriptional regulation of the GnRH receptor gene in human neuronal cells." Mol Hum Reprod **11**(11):837-42.

Zwain, I.H., S.S. Yen, C.Y. Cheng (1997). "Astrocytes cultured in vitro produce estradiol-17b and express aromatase cytochrome P-450 (P-450 AROM) mRNA." Biochim Biophys Acta **1334**(2-3): 338–348.

Zwain, I.H. and S.S. Yen (1999). "Dehydroepiandrosterone (DHEA): Biosynthesis and metabolism in the brain." Endocrinology **140**(2): 880–887.

VIII. Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Patrick Kohlmann