

Aus dem Institut für Anatomie I – Zelluläre Neurobiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktorin: Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Estradiol reguliert Axonwachstum im Hippocampus

Dissertation

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

Christian von Schassen
geboren in Stade, Niedersachsen

Hamburg, 2006

TEILE DIESER ARBEIT WURDEN IN FOLGENDEN PUBLIKATIONEN VERÖFFENTLICHT:

Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M, Rune GM (2006)
Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells requires local estrogen synthesis. J
Neurochem 97: 1136-1144

von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006)
Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth. J Neuroendocrinol 18:
847-856

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 12. Juni 2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. L.-W. Braendle

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. Th. Becker

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	3
II. Einleitung	6
1. Hippocampale Estradiolsynthese	7
2. Inhibitoren der hippocampalen Estradiolsynthese	9
3. Estradioleffekte – genomisch oder nichtgenomisch	10
4. Östrogenrezeptor-Antagonisten	11
5. Histologischer Aufbau des Hippocampus	11
6. Beteiligung des Hippocampus an pathologischen Prozessen	14
7. GAP43 – ein Marker für Axonwachstum	14
8. Fragestellung	17
III. Material und Methoden	18
1. Material	18
a) Arbeitsmaterialien, Geräte und Software	18
b) Chemikalien	20
c) Lösungen	21
2. Methoden	22
a) Präparation der Hippocampi	22
b) Hippocampale Dispersionskultur	23
c) Stimulation und Inhibition	24
d) Fixierung der hippocampalen Dispersionskultur	25
e) Immunocytochemie der Dispersionskulturen	26
f) Bildanalyse	27
IV. Ergebnisse	29
1. Charakterisierung hippocampaler Dispersionskulturen	29
2. Proliferationsniveau unter Letrozol und ICI 182,780	30
3. Nachweis der Spezifität des GAP43-Antikörpers	31
a) GAP43 – GFAP	31
b) GAP43 – MAP2	32

c) GAP43 – τ (Tau)	33
4. GAP43-Expression in hippocampalen Dispersionskulturen	33
5. Axonlänge in hippocampalen Dispersionskulturen	39
6. Axonlänge und GAP43-Expression unter Einfluss verschiedener Anti- östrogene	42
V. Diskussion	44
1. Methodische Überlegungen	44
2. GAP43-Regulation und axonales Wachstum durch Estradiol	47
3. Bedeutung von exogenem und endogenem Estradiol	48
4. Genomische und nichtgenomische Estradioleffekte	49
5. Aromatase als neuroprotektiver Faktor	50
VI. Zusammenfassung	51
VII. Literaturverzeichnis	52
1. Wissenschaftliche Publikationen	52
2. Ergänzende Fachliteratur	59
VIII. Danksagung	60
IX. Lebenslauf	62
X. Eidesstattliche Versicherung	63

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
aro	Aromatase
Aufl.	Auflage
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
ca.	<i>circa</i> (ungefähr)
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i>
CA2	<i>Cornu ammonis 2</i>
CA3	<i>Cornu ammonis 3</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
Cy3	Indocarbocyanin 3
d	<i>day/ days</i> (Tag/ Tage)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
d. h.	das heißt
dest.	<i>destillata</i> (destilliert)
DHEA	Dehydroepiandrosteron
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ER	Östrogenrezeptor/ Östrogenrezeptoren
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)
GAP43	<i>growth-associated protein 43</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>

GnRH	<i>gonadoliberin-releasing-hormone</i>
h	<i>hour/ hours</i> (Stunde/ Stunden)
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
IP ₃	<i>inositole 1,4,5-triphosphate</i>
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
l	Liter
M	Molar
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
min	Minute/ Minuten
ml	Milliliter
µl	Microliter
µm	Micrometer
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol (1 mol = 6,023 • 10 ²³ Moleküle)
MOSP	<i>myelin/ oligodendrocyte-specific protein</i>
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i>
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
P	Pigment
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC12	Phäochromocytom 12 (Zelllinie)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
scc	<i>side chain cleavage enzyme</i>
sd	<i>standard deviation</i> (Standartabweichung)
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
τ	<i>Tau</i>

Tab.	Tabelle
U	Umdrehungen
u. a.	unter anderem
ZNS	Zentrales Nervensystem
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

II. Einleitung

Die vielfältigen cerebralen Wirkungen von Steroiden wurden durch zahlreiche Studien dokumentiert (Baulieu, 1997; Behl and Manthey, 2000; Cambiasso et al., 2000; Stoffel-Wagner, 2001). Insbesondere Estradiol ist heute Gegenstand vieler wissenschaftlicher Arbeiten, und es konnte bereits gezeigt werden, dass ihm eine große Bedeutung im neuroprotektiven Bereich, z. B. beim Morbus Alzheimer, bei der Schizophrenie und bei der Regeneration nach cerebralen Traumata wie Schlaganfällen, zukommt (Azcoitia et al., 2002; Cho et al., 2003; Garcia-Segura et al., 2001; Kadish and van Groen, 2002; Saunders-Pullman, 2003). Auch bei der Entwicklung des ZNS gilt Estradiol als wichtiger Differenzierungsfaktor (Beyer, 1999). Insbesondere zeigten viele Studien, dass Estradiol synaptische Plastizität im hippocampalen Gewebe und anderen ZNS-Regionen beeinflusst (Ferrini et al., 2002; Kretz et al., 2004; Lee and McEwen, 2001; McEwen, 2002; Murphy and Segal, 1996; Murphy et al., 1998; Pozzo-Miller et al., 1999; Prange-Kiel et al., 2004; Rune et al., 2002).

Estradiol steigert die Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat und die Expression der präsynaptischen Vesikelproteine Synaptophysin, Synaptotagmin und Syntaxin in Kulturen hippocampaler Neurone (Yokomaku et al., 2003). Als zugrunde liegender Mechanismus der estradiolinduzierten Synaptogenese postulierten Amateau und McCarthy (2002), dass Prostaglandin-E₂ durch Erhöhung der *spine*-Dichte eine Rolle spielt und Nathan et al. (2004) beschreiben eine Interaktion von Estradiol mit Apolipoprotein E beim Neuritenwachstum. Estradiol fördert das Neuritenwachstum und die -verzweigung cholinergischer Neurone, zumindest bei weiblichen Ratten (Dominguez et al., 2004), wobei die Estradioleffekte offensichtlich ein Zusammenspiel mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor B erfordern (Brito et al., 2004).

Rune et al. zeigten 2002, dass im Hippocampus in CA3 (siehe unten) eine im Vergleich zu CA1 erhöhte Expression von ER α (siehe unten) und Synaptophysin zu finden ist. Nach Estradiol-Applikation konnte eine starke Heraufregulation des präsynaptischen Markerproteins Synaptophysin im Stratum radiatum von CA1, die Zone, in der die Schaffer-Kollaterale (Axone der CA3-Neurone zur CA1-Region) enden, gezeigt werden. Daher kann vermutet werden, dass im Hippocampus die Estradiolwirkung im CA1-Bereich

über die Schaffer-Kollateralen durch eine Heraufregulation präsynaptischer Proteine vermittelt wird.

Erst kürzlich gelang definitiv der Nachweis, dass hippocampale Neurone in der Lage sind, Estradiol *de novo* zu synthetisieren (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al. 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass Estradiol die ER α -Expression erhöht und die ER β -Expression erniedrigt. Der Inhibitor der Estradiolsynthese Letrozol (siehe unten) induziert ein dazu exakt umgekehrtes Verhalten. Diese Befunde zeigen, dass östrogene Wirkung im Hippocampus auto- und parakrin vermittelt werden (Prange-Kiel et al., 2003).

Zahlreiche frühere Arbeiten legten bereits die Fähigkeit von Neuronen nahe, *de novo* Estradiol zu synthetisieren: Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass alle zur Steroid-/ Estradiolsynthese nötigen Enzyme in Neuronen des Hippocampus vorhanden sind (Furukawa et al., 1998; Mellon et al., 2001; Stoffel-Wagner, 2001; Wehrenberg et al., 2001; Zwain and Yen, 1999).

II. 1. Hippocampale Estradiolsynthese

Die Familie der Cytochrom P450 Enzyme, deren molekulares Gewicht bei 50 kDa liegt, stellt einen Großteil der bekannten Enzyme der Steroidsynthese dar. Ihr Name ist ein Hinweis auf ihre Eigenschaften, da sie Licht der Wellenlänge 450 nm absorbieren.

Wie bereits erwähnt, konnten im ZNS alle steroidogenen Enzyme detektiert werden, was zu dem Schluss führt, dass die Neurosteroidsynthese mit der gonadalen identisch ist (Furukawa et al., 1998; Stoffel-Wagner, 2001; Wehrenberg et al., 2001). Die Estradiolsynthese beginnt wie die Synthese aller Steroide mit der Bereitstellung des Cholesterols (siehe Abb. 1a und 1b, siehe unten), wofür das Enzym StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) verantwortlich ist: Cholesterol wird durch StAR zur inneren Mitochondrienmembran transportiert, was gleichzeitig der *rate limiting step* der Steroidsynthese ist. Das erste Enzym der Familie der Cytochrom P450 Enzyme befindet sich dann an der inneren Mitochondrienmembran: Cytochrom P450_{scc} (*side chain cleavage enzyme*) wandelt Cholesterol in Pregnenolon um. Die zwei nun folgenden Syntheseschritte

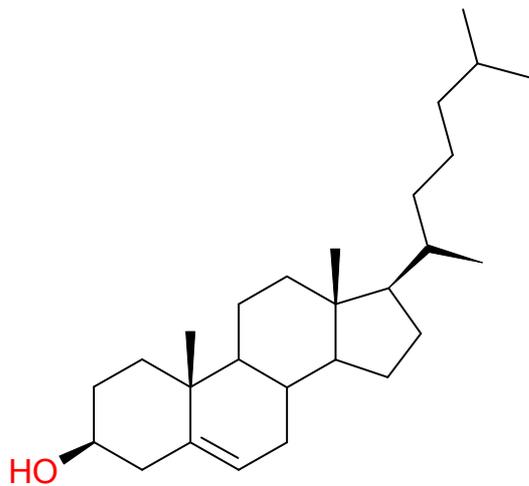


Abb. 1a: Cholesterol

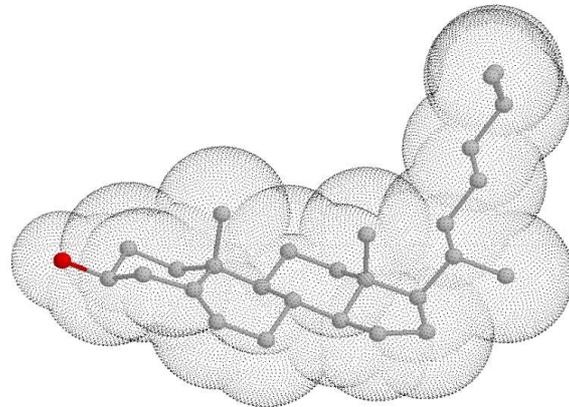
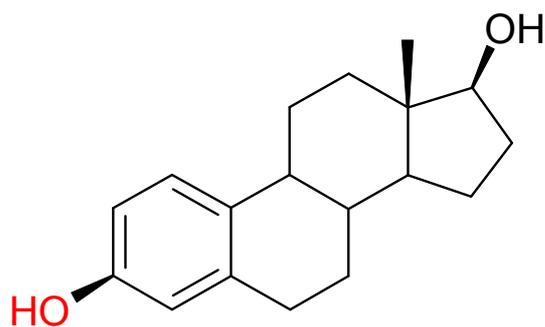
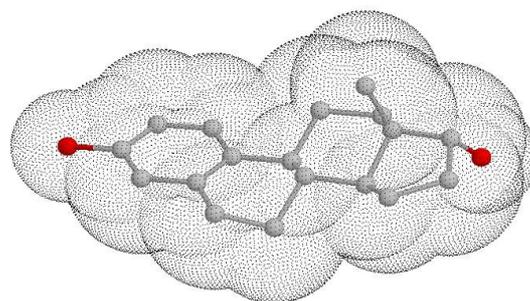


Abb. 1b: Cholesterol (3D-Struktur)

werden irreversibel vom Enzym Cytochrom P450_{c17} (17 α -Hydroxylase/ c17,20-Lyase) katalysiert, wodurch Pregnenolon über den Zwischenschritt 17-Hydroxy-Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) umgewandelt wird. Nicht zur Gruppe der Cytochrom P450 Enzyme gehören die 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase; sie katalysieren den reversiblen Schritt vom DHEA zum Androstendiol und den irreversiblen Syntheseschritt zum Testosteron. Als letzter Schritt der Estradiolsynthese katalysiert das Enzym Cytochrom P450_{aro} (CYP19A1, Aromatase) die Abspaltung der C19-Methylgruppe und die Aromatisierung des Ringes A, dessen Ergebnis 17 β -Estradiol (siehe Abb. 2a und 2b) ist. Das Aromatasegen befindet sich auf dem humanen Chromosom 15 und die kodierende Sequenz ist 1511 bp lang.

Abb. 2a: 17 β -EstradiolAbb. 2b: 17 β -Estradiol (3D-Struktur)

Da nachgewiesen werden konnte, dass die neuroprotektiven Effekte von Estradiol nicht durch seine Vorstufen DHEA und Pregnenolon ausgelöst und nur unter Anwesenheit von Aromatase mit konsekutiver Estradiolsynthese die erwähnten Effekte erzielt werden können

(Veiga et al., 2003), könnte Aromatase ein neues pharmakotherapeutisches Ziel bei der Behandlung vieler neurodegenerativer Erkrankungen sein (Azcoitia et al., 2001). Somit erscheint es sinnvoll, die Wirkung des endogen hippocampal synthetisierten Estradiols zu untersuchen, da die Rolle der Aromatase im Sinne neuroprotektiver Funktionen bisher wenig verstanden ist.

II. 2. Inhibitoren der hippocampalen Estradiolsynthese

Es wurden in der Vergangenheit verschiedene nichtsteroidale reversible Aromataseinhibitoren gefunden: Aminoglutethimid (Orimeten[®]), Anastrozol (Arimidex[®]) und Letrozol (Femara[®]) können kompetitiv mit ihrer hemmenden Domäne an die Aromatase binden, wodurch deren katalytische Interaktion verhindert wird.

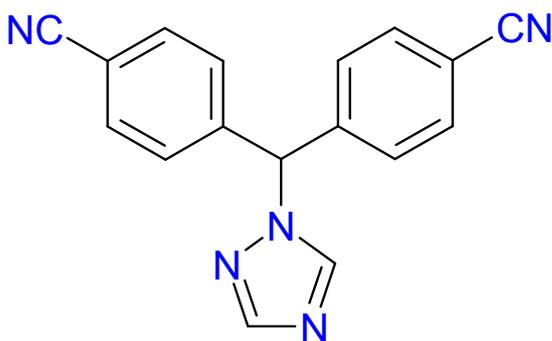


Abb. 3a: Letrozol

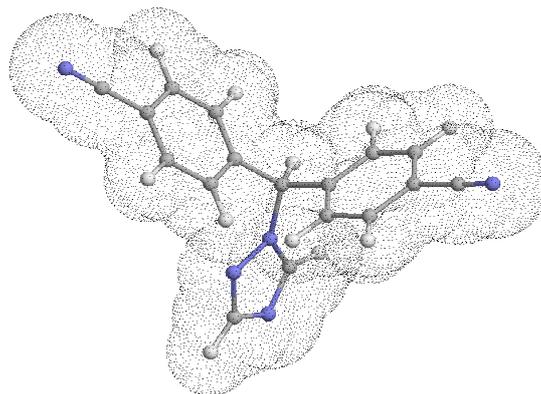


Abb. 3b: Letrozol (3D-Struktur)

In einer *in vivo* Testreihe erwies sich Letrozol (siehe Abb. 3a und 3b) als ein 10 000-fach potenterer Inhibitor als Aminoglutethimid und 10-fach stärker in seiner Wirkung als Anastrozol (Smith, 1999).

Letrozol ist demzufolge der potenteste und wirkungsvollste der aufgeführten Aromataseinhibitoren. Ein weiterer Vorteil ist die kompetitive Inhibition: Bei Hemmung kann also nach Entfernung des Letrozol die *de novo* Synthese von Estradiol erneut beginnen, da eine reversible Bindung vorliegt. Auch andere Syntheseleistungen der Zelle unterliegen mit hoher Wahrscheinlichkeit keiner Hemmung durch Letrozol, da keine

Wechselwirkungen mit anderen Enzymen bekannt sind (Smith, 1999).

Letrozol hat im klinischen Alltag eine wichtige Funktion: Da Mammakarzinome oft ER-positiv sind und somit Estradiol als ein die Prognose des Patienten verschlechterndes Wachstumsstimulans wirkt, findet Letrozol hier Verwendung in der Rezidivprophylaxe für das Mammakarzinom sowie als Therapeutikum beim metastasierten postmenopausalen Mammakarzinom (Thiantanawat et al., 2003).

II. 3. Estradioleffekte – genomisch oder nichtgenomisch

Nach der klassischen Vorstellung vermittelt Estradiol seine Wirkungen über zytosolische Rezeptoren, die zur Familie der Steroidrezeptoren gehören. Er bindet seinen Liganden, nachdem dieser durch die Zellmembran diffundiert ist, dimerisiert, transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Transkription seiner Zielgene durch eine Interaktion mit deren Promoter. Von diesem klassischen ER sind inzwischen zwei Subtypen bekannt: ER α und ER β , die trotz hoher Homologie im Aufbau einige Unterschiede zeigen: 17 β -Estradiol hat z. B. eine höhere Affinität zum ER α . Auch zeigen beide Typen unterschiedlich hohe Expression in diversen cerebralen Regionen. Diese klassischen oder genomischen Effekte beeinflussen die *de novo* Proteinbiosynthese und sind daher durch eine lange Latenzzeit gekennzeichnet, die Stunden oder gar Tage in Anspruch nimmt (Behl and Manthey, 2000; Beyer, 1999; Lee and McEwen, 2001).

Im Gegensatz dazu konnten Effekte von Estradiol beobachtet werden, die nicht mit dem oben beschriebenen Konzept der genomischen Regulation zu vereinbaren sind. So ist Estradiol in der Lage, innerhalb von Sekunden die Physiologie der Nervenzelle zu verändern. Als Beispiele seien hier die Stimulation der cAMP- und IP₃-Produktion, die Aktivierung des MAP-Kinaseweges und die Erhöhung des Ca²⁺-Einstromes aus dem endoplasmatischen Retikulum über den IP₃-Signalweg aufgeführt (Beyer, 1999). Inzwischen scheint es gesichert, dass diese nichtgenomischen oder schnellen Effekte des Estradiols über spezifische membranständige Rezeptoren vermittelt werden (Behl and Manthey, 2000; Carrer et al., 2003; Farach-Carson and Davis, 2003; Lee and McEwen, 2001; McEwen, 2002; Revankar et al., 2005; Walters and Nemere, 2004).

II. 4. Östrogenrezeptor-Antagonisten

Eine genauso hohe klinische Relevanz wie die oben erwähnte Aromataseinhibitoren haben Östrogenrezeptor-Antagonisten, die ebenso wie Letrozol zur sogenannten Gruppe der „Antiöstrogene“ gehören. Auch sie werden im Rahmen der Therapie des ER-positiven Mammakarzinoms eingesetzt.

In dieser Arbeit soll ein Vergleich des Proliferationsniveaus in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Letrozol und mit einem ER-Antagonisten weitere Erkenntnisse über den Signalweg des endogen synthetisierten Estradiols liefern. Hierzu wird neben dem oben beschriebenen Letrozol der ER-Antagonist ICI 182,780 (Fulvestrant, Faslodex[®]) eingesetzt.

ICI 182,780 ist ein steroidaler Rezeptorantagonist und hat eine 100-fach höhere Affinität zum cytosolischen ER als Estradiol. Im Gegensatz zum Standardtherapeutikum des ER-positiven Mammakarzinoms – Tamoxifen – besitzt es keine bekannten agonistischen Effekte, kann also als reiner Antagonist genutzt werden. Nach Bindung kann der ER aufgrund der sehr langen Seitenkette des ICI 182,780 nicht mehr dimerisieren und in den Zellkern translozieren, womit auch die Veränderungen durch den ER auf Transkriptionsebene verhindert werden, welche – wie bei vielen DNA-bindenden Proteinen üblich – durch Zinkfingerdomänen vermittelt werden. Außerdem sorgt die hochaffine Bindung für eine Zerstörung des Rezeptors, es resultiert daher eine starke Herunterregulation der ER (Howell et al., 2002). Es scheint inzwischen gesichert, dass ICI 182,780 neben dem zytosolischen auch den membranständigen Rezeptor inhibiert (Fitzpatrick et al., 2002).

II. 5. Histologischer Aufbau des Hippocampus

Wegen der verschiedenen Phylogenie bei Mensch und Ratte befindet sich der Hippocampus der Ratte weiter kranial im Vergleich zum Menschen und jeweils lateral des Corpus callosum. Im mikroskopischen Aufbau sind jedoch kaum noch Unterschiede festzustellen. In Abb. 4 (siehe unten) kann man deutlich – hier am Beispiel eines

menschlichen Hippocampus – das Pyramidenzellband mit den Bereichen CA1, CA2 und CA3 sowie den Gyrus dentatus erkennen, der überwiegend aus Körnerzellen, deren Migration im Laufe der Ontogenese durch bestimmte Signale getriggert werden (Bagri et al., 2002), besteht.

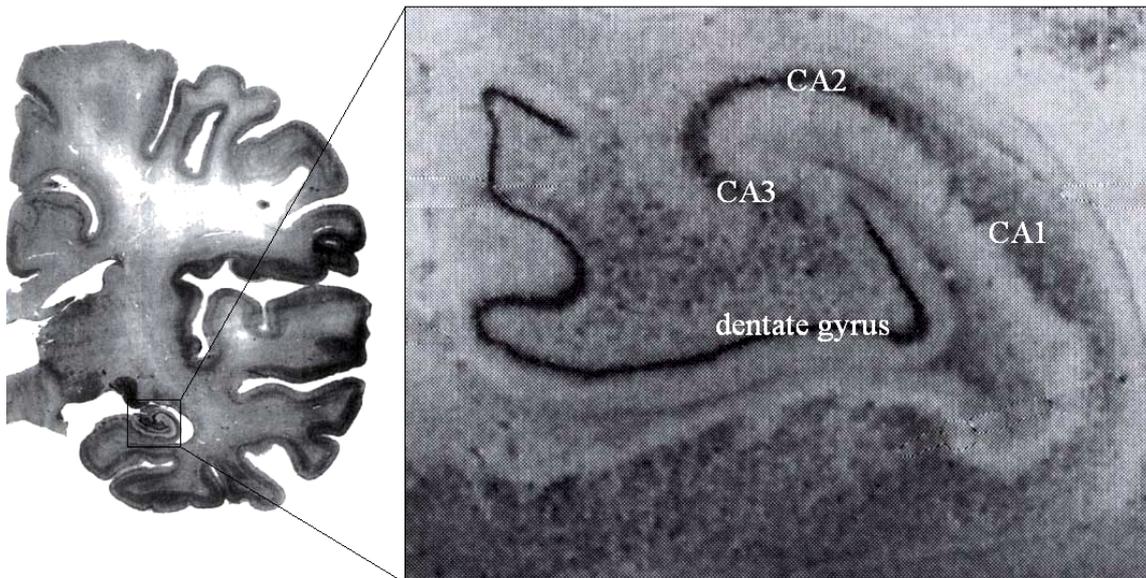


Abb. 4: Frontalschnitt menschlicher Hippocampus

Quelle: Steward, *Functional Neuroscience*, 1st Edition, 2000, Springer, New York, S. 471

In CA1 finden sich überwiegend kleine Pyramidenzellen, gefolgt von der sehr dichten Struktur der großen Pyramidenzellen des CA2-Bereichs. Die großen Pyramidenzellen der CA3-Region wiederum bilden einen lockeren Verband. Dieses Stratum pyramidale wird umschlossen durch die Strata oriens et radiatum und enthält große Mengen an GAP43-mRNA (Jacobs et al., 1993; Tolner et al., 2003), sodass sich der Hippocampus als geeignete Gehirnregion für unsere Fragestellung darstellt.

Kleine (Körnerzellen des Gyrus dentatus) und große (Pyramidenzellen) Neurone sowie Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) sind die zellulären Bestandteile des Hippocampus. Gliazellen sind für die Funktion der Neurone wichtig, da sie neben ihrer konstitutionellen Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Astrozyten) die Pyramidenzellen einerseits vor neurotoxischen Substanzen schützen und andererseits mit Nährstoffen wie z. B. Glucose und Cholesterol, aber auch mit Hormonen versorgen. Diese Nährstoffe könnten dann nur zur Energiegewinnung, für den Eigenbedarf der Neurone und auch für den Aufbau von Hormonen, wie z. B. Estradiol, genutzt werden.

Afferenzen aus dem Riechhirn und dem Neokortex erreichen den Hippocampus aus der Regio entorhinalis. Zudem senden der Gyrus cinguli und das Septum Fasern, die motorische, somatische, olfaktorische, visuelle und auditorische Signale transferieren. Efferenzen des Hippocampus verlaufen überwiegend in den Fornix cerebri, der selber Ausgänge in Richtung Septum, Hypothalamus und Thalamus besitzt.

Des Weiteren ist der Hippocampus ein Teil des Papez-Neuronenkreises (siehe Abb. 5): Er projiziert über den Fornix in die Corpora mammillaria, welche über das Vicq-d'Azyr-Bündel (Tractus mamillothalamicus) die Nuclei anteriores des dorsalen Thalamus erreichen und von dort aus über den Gyrus cinguli wieder zurück in den Hippocampus gelangen. Dieser Neuronenkreis soll eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Langzeitgedächtnisses spielen.

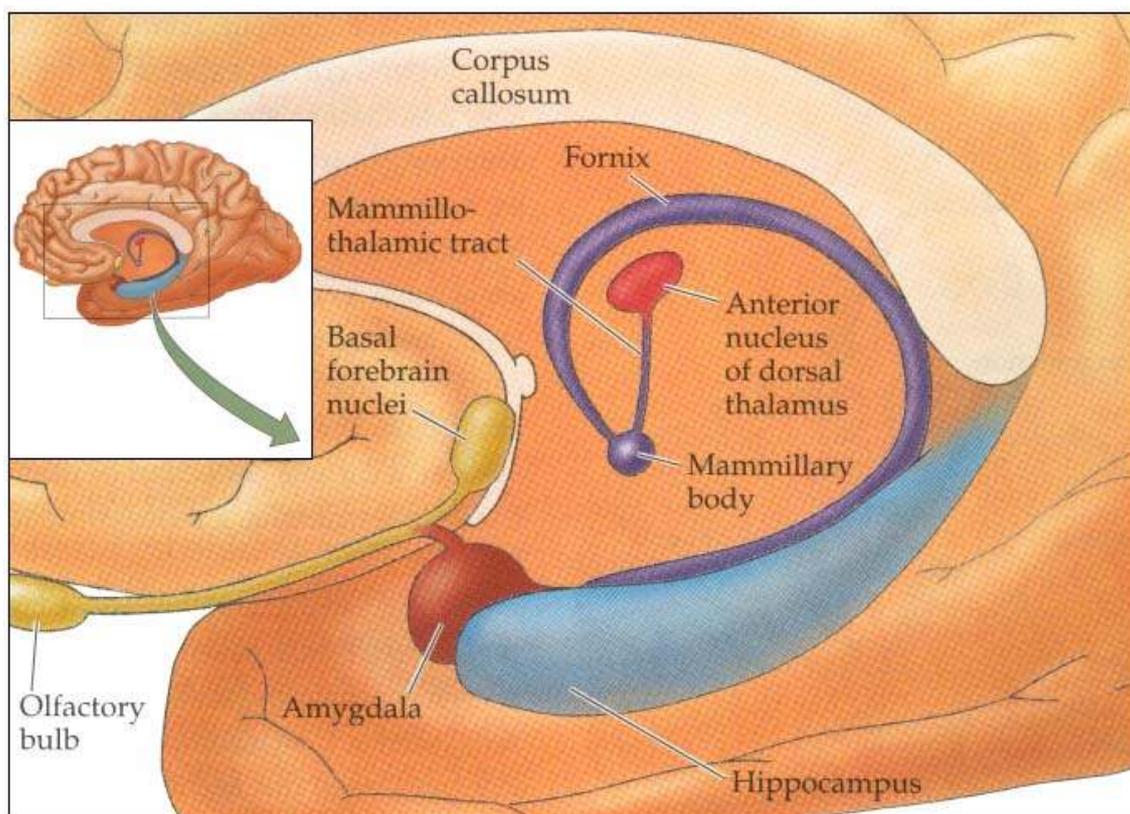


Abb. 5: Limbischen System mit Papez-Neuronenkreis (siehe Text)

Quelle: Purves, Neuroscience, 1st Edition, 1997, Sinauer Associates Inc., Sunderland, S. 519

II. 6. Beteiligung des Hippocampus an pathologischen Prozessen

Aufgrund der oben erwähnten Beteiligung des Hippocampus an der Entstehung des Langzeitgedächtnisses wird klar, dass Patienten mit bilateralen Läsionen des Hippocampus an einer globalen anterograden Amnesie leiden, d. h. sie können Dinge und Ereignisse, die ihnen nach Entstehung des Defektes begegnen, nicht mehr als 1-2 min im Gedächtnis behalten (Spiers et al., 2001), was zu völliger temporaler und lokaler Desorientierung führen kann.

Ebenso wie das Corpus amygdaloideum spielt der Hippocampus eine Rolle bei der Genese epileptischer Krankheitsbilder. In diesen Gehirnregionen herrscht große Bereitschaft zu plötzlichen pathologischen Entladungen von Neuronen, sodass schon kleinste krankhafte Veränderungen – wie Gefäßmissbildungen oder auch Tumoren – zu charakteristischen epileptischen Anfällen führen können (Duzel et al., 2004; Kurz et al., 2003; Martin and Pozo, 2003).

Auch Krankheiten des schizophrenen Formenkreises, die zu erheblichen Denkstörungen und Halluzinationen bis hin zu schwersten Wahnvorstellungen führen können, werden u. a. mit Prozessen innerhalb des Hippocampus assoziiert. So stellte sich heraus, dass bei der Pathogenese der Schizophrenie nicht nur die Überaktivität einiger ins limbische System projizierender dopaminerger Neurone sondern auch eine Unteraktivität glutamaterger hippocampaler Neurone beteiligt ist (Harrison et al., 2003).

II. 7. GAP43 – ein Marker für Axonwachstum

Das *growth-associated protein* GAP43, auch bekannt unter den Bezeichnungen B-50, F1, P57 und Neuromodulin, ist ein Protein mit einem molekularen Gewicht von 43 kDa, dessen Gen sich auf dem menschlichen Chromosom 3 befindet. Es wurde in den 1980er Jahren als neuronspezifisches und membranständiges Protein identifiziert und als erster molekularer Unterschied zwischen Axon und Dendrit beschrieben, da es nur in Axonen exprimiert wird, hier insbesondere in den axonalen *growth cones* (Wachstumskolben) (Benowitz and Routtenberg, 1997; Goslin et al., 1988).

GAP43 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der neuronalen Polarität: Ein Neuron hat initial mehrere kurze Fortsätze, die alle unterschiedliche Mengen an GAP43 enthalten. In einem ca. 30-60 Minuten dauernden Vorgang, differenziert sich einer der Fortsätze zum Axon, wobei eine Erhöhung der GAP43-Expression in genau diesem Axon zu erkennen ist. Die GAP43-Expression verlagert sich aufgrund dieser Differenzierung in das Axon und es findet in den Dendriten keine weitere Expression statt. In dem wachsenden Axon konzentriert sich die GAP43-Expression auf das *growth cone*. Die GAP43-Konzentration geht nach Etablierung des Axon im Axon-Schaft langsam von distal nach proximal auf ein immer noch messbares Minimum zurück (Goslin and Banker, 1990; Goslin et al., 1990; van Lookeren Campagne et al., 1990). GAP43 scheint demnach eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung der neuronalen Polarität und auch beim axonalen Wachstum sowie bei der Regeneration von traumatisch geschädigten Axonen (Aigner and Caroni, 1993; Goslin and Banker, 1989; Goslin and Banker, 1990) zu haben.

Des Weiteren konnte GAP43 in der Membran von Transportvesikeln in der *trans*-Region des Golgi-Apparats nachgewiesen werden (van Lookeren Campagne et al., 1992), wodurch vermutet werden kann, dass GAP43 mit diesen Transportvesikeln zum *growth cone* gelangt, um dort seine Funktion auszuüben. Gestützt wird diese These durch eine Untersuchung, bei der durch ein Stoppen des Vesikelstroms vom Golgi-Apparat zur Zellmembran auch das Axonwachstum unterbrochen wurde bzw. die Ausbildung der neuronalen Polarität verhindert werden konnte (Jareb and Banker, 1997).

Über die molekularen Wirkmechanismen von GAP43 weiß man, dass GAP43 durch die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C einer posttranslationalen Modifikation unterliegt. Diese Phosphorylierung findet am Serin Nr. 41 statt und wird durch erhöhten Ca^{2+} -Einstrom (z. B. im Rahmen der Langzeitpotenzierung; Chirwa et al., 2005; Sanes and Lichtman, 1999) in das axonale *growth cone* ausgelöst (Nelson and Routtenberg, 1985). Phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes GAP43 haben eine unterschiedliche Wirkung: Phosphoryliertes GAP43 stabilisiert lange Actin-Filamente des Zytoskeletts und manifestiert so wahrscheinlich seine wachstuminduzierende Wirkung auf Axone. Außerdem steigert phosphoryliertes GAP43 die Neurotransmitter-Ausschüttung in den *growth cones* der Axone (Dekker et al., 1989). Nicht phosphoryliertes GAP43 dagegen reduziert die Actin-Filament-Länge, erhöht die nötige GAP43-Konzentration, ab der eine Filament-Polymerisierung stattfindet und hat somit antagonistische Wirkung zum phosphorylierten

GAP43 (He et al., 1997; Meiri et al., 1998; Rosner and Vacun, 1999). Diese GAP43-Effekte konnten ebenfalls an PC12-Zelllinien gezeigt werden (Laux et al., 2000; van Hooff et al., 1989).

GAP43 wird in vielen ZNS-Regionen, wie den GnRH-Neuronen des Hypothalamus, der Area preoptica und weiteren Kerngebieten des basalen Hypothalamus, exprimiert, wobei die Expression hier durch Steroide wie Testosteron und Estradiol reguliert wird (Prevot et al., 2000; Shughrue and Dorsa, 1993; Shughrue and Dorsa, 1994; Singer et al., 1996).

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass heterozygote GAP43-Knockoutmäuse (homozygote sterben meist perinatal), eine um ca. die Hälfte reduzierte GAP43-Expression zeigen und ebenfalls eine signifikant verminderte Gedächtnisleistung haben, was die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien bestätigt (erhöhte Gedächtnisleistung bei transgenen Mäusen mit GAP43-Überexpression; Rekart et al., 2005). Auch im Rahmen einiger pathogener Prozesse ist GAP43 Gegenstand von Untersuchungen: Nach epileptischen Anfällen konnte ein reaktiv höhere Expression von GAP43 im Hippocampus gefunden werden, diese Reaktion ist jedoch bei älteren Ratten nicht mehr in dem Maße möglich (Schmoll et al., 2005; Tolner et al., 2003). Durch chronische cerebrale Minderperfusion konnte eine erhöhte GAP43-Expression erzielt werden (Liu et al., 2005). In einer *post-mortem*-Studie konnte bei Schizophrenie-Patienten eine verminderte hippocampale GAP43-Expression gezeigt werden, sodass u. a. dieser Proteinmangel im Verdacht steht, zu den kognitiven Defiziten, die mit der Schizophrenie-Krankheit einhergehen, beizutragen (Chambers et al., 2005). Bei Experimenten mit neuronalen Stammzellen im Rahmen des Versuchs, Läsionen des Rückenmarks zu therapieren, konnte eine Beteiligung von GAP43 an Reparaturprozessen nachgewiesen werden (Wang et al., 2005).

Während der embryonalen Entwicklung spielt GAP43 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der serotonergen Neurone der Raphe-Kerne, welche zu den ersten das Tel- und Diencephalon innervierenden Strukturen gehören (Donovan et al., 2002). Außerdem führt Vitamin-A-Mangel zu einer verminderten GAP43-Expression und damit zu cerebralen Funktionsdefiziten (Husson et al., 2004).

II. 8. Fragestellung

Estradioleffekte auf die GAP43-Expression konnten bereits in vielen verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen werden (McEwen, 2002). In der vorliegenden Arbeit sind wir der Frage nachgegangen, ob GAP43 auch im Hippocampus durch Estradiol reguliert wird. Wenn es einen Effekt auf präsynaptische Proteine gibt, die eine verstärkte Synaptogenese erzeugen, müsste diesem Prozess ein verstärktes Axonwachstum vorausgehen.

Auf dem Hintergrund der *de novo* Synthese von Estradiol soll die Arbeit außerdem zur Klärung der Frage beitragen, welche Bedeutung endogenes (hippocampal synthetisiertes) Estradiol im Vergleich zu peripherem (z. B. ovariell) Estradiol bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen hippocampaler Neurone spielt. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Effekte von Estradiol auf GAP43 ER-abhängig sind, also ob die bekannten ER in den Signalweg involviert sind.

III. Material und Methoden

III. 1. Material

III. 1. a) Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Aluminiumfolie	LAGER UKE
Brutschrank WTC	BINDER
Cutfix Surgical Disposable Scalpel	BRAUN
Deckgläser, 21 · 26 mm	MARIENFELD
Deckgläser, rund, Ø 12 mm	MARIENFELD
Digital Still Camera DSC-P20	SONY
diverse PC-/ Macintosh-Systeme	VERSCHIEDENE HERSTELLER
Einmalspritzen, verschiedene Größen	BRAUN
ep T.I.P.S. Standard, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Excel 2000 (Software)	MICROSOFT
Falcon Cell Stainer, 40 µm Nylon	BECTON DICKINSON LABWARE
Falcon Tissue Cultur Plate, 24 well	BECTON DICKINSON LABWARE
Falcon Tubes, 50 und 15 ml	BECTON DICKINSON LABWARE
FotoCanvas 2.0 (Software)	ACD
Gefrierschrank, -25°C	LIEBHERR
Handschuhe, verschiedene Größen	KIMBERLY-CLARK
Heidemannspatel	AESFULAP DE
Histobond Adhäsions-Objektträger	MARIENFELD
ImageTool 3.0 für Windows (Software)	UNIVERSITY OF TEXAS HEALTH SCIENCE CENTER/ SAN ANTONIO
Instrumentenkasten	MERCK
Kosmetiktücher Samtess	WEPA
Kühlschrank, 4°C	BOSCH
Mikroskop Axiovert 2 (Objektive: Plan- Apochromat 20x/ Plan-Neofluar 40x) mit	

Axiocam HRc und Anschluss an Daten- verarbeitung im PC-Programm	
Axiovision 3.1	ZEISS
Mikroskop Axiovert 25	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
PCR-Tubes, 0,5 ml	EPPENDORF AG
Photoshop 7.0 (Software)	ADOBE
Pinzette nach Dumont	MERCK
Pipetten, 2, 20, 100 und 1 000 µl	GILSON
Pipettenspitzen für Pipetus, 5, 10 und 25 ml	BECTON DICKINSON LABWARE
Pipetus-Classic	HIRSCHMANN LABORGERÄTE
Prism 4.03 (Software)	GRAPHPAD
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	EPPENDORF AG
See 5.0 (Software)	ACD
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
Spritzenfiltervorsatz, 0,22 µm	MILLEX GP
SPSS für Windows (Software)	SPSS GMBH SOFTWARE
USB-Stick „Memorybird“ 1024 MB	FUJITSU SIEMENS
Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Wasserbad mit Schüttler	GFL
Windows 2000 (Software)	MICROSOFT
Windows XP (Software)	MICROSOFT
Word 2000 (Software)	MICROSOFT
Zellstofftücher	WEPA
Zentrifuge Universal 32R	HETTICH

III. 1. b) Chemikalien

Albumine, bovine	SIGMA
Alexa Fluor 488, polyklonal, donkey anti-goat IgG	INVITROGEN
Alexa Fluor 488, polyklonal, goat anti-rabbit IgG	INVITROGEN
anti-CD11b, monoclonal, mouse	SEROTEC
anti-GAP43, monoclonal, mouse	SIGMA
anti-GFAP, polyclonal, rabbit	CHEMICON
anti-Ki-67, monoclonal, mouse	DAKO CYTOMATION
anti-MAP2, polyclonal, rabbit	CHEMICON
anti-MOSP, monoclonal, mouse	CHEMICON
anti- τ , polyclonal, goat	CHEMICON
Aqua ad iniectabilia, 1 l	BAXTER DEUTSCHLAND
B27 Supplement	GIBCO
Barrycidal 36, Desinfektionsmittel	HELMUT SCHRÖDER
β -Estradiol-Water soluble, 100 mg	SIGMA
Cy3, monoclonal, goat anti-mouse IgG	JACKSON IMMUNO RESEARCH
DABCO	SIGMA
DAPI	SIGMA
Ethanol, 70% und 96%	APOTHEKE UKE
Femara [®] Letrozol	NOVARTIS
Formaldehydlösung, 37%	MERCK
Human FGF-basic, 50 μ g	PEPRO TECH
ICI 182,780	TOCRIS
L-Glutamin, 200 mM	SIGMA
Neurobasal A Medium	GIBCO
Neurobasal A Medium ohne Phenolrot	GIBCO
PBS Tablets	GIBCO
Penicilin/ Streptomycin	GIBCO
Poly-D-Lysin	SIGMA
Tris	INVITROGEN
Trypsin/ EDTA	BIOCHROM

III. 1. c) Lösungen

bFGF:

- 5 mM Tris in Aqua dest. gelöst, pH = 7,6, steril filtern
- 50 µl bFGF in 1 000 µl Tris-Lösung, vortexen, aliquotieren
- bei -25°C lagern

BSA:

- 3 g bovines Albumin in 100 ml PBS lösen, suspendieren

DABCO:

- Glycerol 1:2 in PBS
- 250 mg DABCO pro ml Glycerol-PBS

Kulturmedium für Dispersionskulturen:

- 50 ml Neurobasal A Medium ohne Phenolrot
- 500 µl B27
- 125 µl L-Glutamin (200 mM)
- 500 µl Penicillin/ Streptomycin

PBS:

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

III. 2. Methoden

III. 2. a) Präparation der Hippocampi

Die Präparation der Hippocampi wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Wir verwendeten in den Experimenten 5 Tage alte Ratten des Zuchtstammes WISTAR, denen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung stand. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt.

Wir dekapitierten die Ratten und anschließend wurde die Haut über dem Schädeldach entfernt. Das Schädeldach öffneten wir mit einer feinen geraden Schere. Reste des Schädeldachs wurden vorsichtig mit einer Pinzette entfernt, um eine Verletzung der cerebralen Strukturen zu vermeiden. Die Entfernung des Gehirns führten wir mit einem Heidemannspatel durch, sodass das Gehirn auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt werden konnte (siehe Abb. 6).

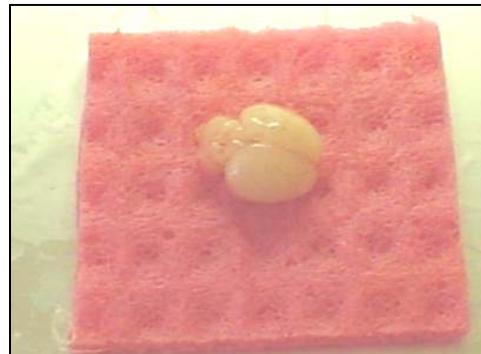


Abb. 6: Frisch präpariertes Gehirn einer Ratte (5 Tage postnatal, Schwamm 4 • 4 cm)

Es schloss sich die Entfernung der freiliegenden Teile des Hirnstamms mit Kleinhirn durch ein Skalpell an, mit dem ebenfalls ein median-sagittaler Schnitt zwischen beiden Hemisphären erfolgte. Daraufhin wurden in beiden Hemisphären mit dem Heidemannspatel die weiteren Reste des Hirnstamms (Diencephalon, etc.) entfernt, sodass der Blick auf den Hippocampus frei war. Abschließend „schälten“ wir die Hippocampi mit dem Heidemannspatel aus den Hemisphären und gaben sie in auf Eis gekühltes PBS, um Ischämieschäden möglichst zu minimieren.

III. 2. b) Hippocampale Dispersionskultur

Die Präparation hippocampaler Zellen als Dispersionskultur führten wir nach der Methode von G. J. Brewer (Brewer, 1997) mit einigen Modifikationen nach J. Prange-Kiel (Prange-Kiel et al., 2003) durch und wird daher hier nur kurz beschrieben.

Einen Tag vor der Präparation der Hippocampi gaben wir in eine Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten je *well* ein Glasplättchen. Pro *well* wurden dann 600 µl Poly-D-Lysin hinzugefügt, das nach 1 h entfernt wurde. Die Glasplättchen wurden anschließend mit Neurobasal A gespült und über Nacht bei RT in einer Sicherheitswerkbank verwahrt. Am nächsten Tag wurde vor der Präparation der Hippocampi das Poly-D-Lysin mit einer Pipette entnommen, dann spülten wir die Kavitäten mit Neurobasal A Medium, um anschließend die Zellkulturplatte in der Sicherheitswerkbank trocknen zu lassen.

Am Präparationstag spülten wir die entnommenen Hippocampi unter sterilen Bedingungen mehrmals mit PBS, um möglichst viel überschüssiges Gewebe und Erythrozyten zu entfernen. Es folgte eine grobe Zerkleinerung der Hippocampi mittels einer scharfen Klinge. Den Zellbrei überführten wir mit ca. 25 ml PBS in ein 50 ml Falconröhrchen. Die Zellsuspension wurde so bei 4°C mit 5 000 U/ min für 10 min zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wurde verworfen. Es folgte ein kurzer Verdau der extrazellulären Matrixproteine: Das Zellpellet wurde pro Hippocampus mit 250 µl Trypsin/ EDTA versehen, resuspendiert und unter mehrmaligem Schütteln in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt, sodass sich die Zellen während dieses 2,5-minütigen Verdaus voneinander lösen konnten und somit vereinzelt wurden. Anschließend pipettierten wir ca. 25 ml Neurobasal A hinzu, sodass der Verdau stoppte. Die Zellsuspension wurde über ein 40 µm Zellsieb gegeben, um größere unverdaute Bestandteile zu entfernen.

Es folgten zwei weitere Zentrifugationen bei 4°C mit 5 000 U/ min für 5 min mit nachfolgender Verwerfung des Überstandes. Vor der zweiten Zentrifugation fügten wir jedoch nicht Neurobasal A Medium, sondern ca. 25 ml selbiges ohne Phenolrot hinzu, da dieses im Verdacht steht, eine estradiolähnliche Wirkung zu haben und daher durch Phenolrot die folgenden Untersuchungen behindert worden wären (auch im weiteren Verlauf verwendeten wir Neurobasal A Medium ohne Phenolrot). Nach der zweiten Zentrifugation wurde wieder der Überstand verworfen, eine definierte Menge Neurobasal A

in das Falconröhrchen gegeben und das Zellpellet resuspendiert.

Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Nach entsprechender Auffüllung der Zellsuspension wurde je nach erhaltener Zellzahl pro Kavität auf die Poly-D-Lysin beschichteten Glasplättchen 1 ml Suspension mit 100 000 Zellen gegeben. Dies ist die Zelldichte, mit der wir bei den hier beschriebenen Untersuchungen stets arbeiteten.

Anschließend wurde – um ein Absetzen und Anheften der Zellen an die Glasplättchen zu ermöglichen – die Zellkulturplatte für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ in den Brutschrank gestellt. Nach einer Stunde überführten wir die Glasplättchen mit den haftenden Zellen in eine neue Zellkulturplatte und gaben pro Kavität 1 ml Neurobasal A Kulturmedium (KM) (37°C) mit 1 µl bFGF hinzu. Der erste KM-Wechsel wurde nach 24 h durchgeführt, weiterhin erfolgte ein Wechsel alle 48 h. So führten wir nach viertägiger Vorkultur – die Zellen hatten sich nach dieser Zeit von der Präparation erholt und erste Fortsätze gebildet, womit ein funktioneller Zellverband *in vitro* entstanden war – die Untersuchungen mit der Behandlung fort.

III. 2. c) Stimulation und Inhibition

Nach vier Tagen Vorkultur erfolgte die Stimulation bzw. Inhibition. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, führten wir die Inhibition mit Letrozol durch, wobei wir mit einer Konzentration von 10⁻⁷ M arbeiteten. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass bei dieser Konzentration die Estradiolsynthese der hippocampalen Neurone nahezu eliminiert ist (Prange-Kiel et al., 2003).

Um die Auswirkungen von 17β-Estradiol auf die GAP43-Expression der hippocampalen Neurone zu simulieren und untersuchen zu können, setzten wir 17β-Estradiol mit der Konzentration 10⁻⁷ M ein. Die Stimulation bzw. Inhibition wurde nach 3, 5 oder 7 Tagen mit der Fixierung der Zellen beendet, da hier auch eine eventuelle zeitliche Komponente gezeigt werden sollte.

Um das Proliferationsniveau hippocampaler Dispersionskulturen unter Einfluss eines

Aromataseinhibitoren und eines ER-Antagonisten vergleichen zu können, wurden Kulturen mit Letrozol (10^{-7} M) und ICI 182,780 (10^{-6} M) versetzt und nach 6 Tagen fixiert.

Zur Klärung der Frage, ob die Estradioleffekte auf GAP43 über den ER oder einen anderen Signalweg vermittelt werden, starteten wir eine weitere Versuchsreihe: Hier wurden Zellen nach den üblichen 4 Tagen Vorkultur neben dem oben erwähnten Estradiol (10^{-7} M) und Letrozol (10^{-7} M) mit ICI 182,780 (10^{-6} M) und kombiniert mit ICI 182,780 (10^{-6} M) und Estradiol (10^{-7} M) versetzt und nach 7 Tagen fixiert.

Unbehandelte Kulturen lieferten bei allen Experimenten das Kontrollniveau, sodass die Veränderungen nach der Auswertung interpretiert werden konnten. Die Kulturcharakterisierung wurde ebenfalls mit unbehandelten Kulturen durchgeführt.

III. 2. d) Fixierung der hippocampalen Dispersionskultur

Nach erfolgter viertägiger Vorkultur und anschließender Behandlung von 3, 5, 6 oder 7 Tagen wurde eine Fixierung mit Formaldehydlösung (3,7% in PBS) durchgeführt. Initial ersetzten wir das Neurobasal A KM für 5 min durch PBS. Es folgte eine Fixierung von 10 min mit der Formaldehydlösung. Anschließend wurde die Fixierungslösung wieder gegen PBS ausgetauscht, womit dann eine 3-malige und 5 min dauernde Spülung der Kavitäten erfolgte. Somit konnten die fixierten Neurone bis zu 1 Monat bei 4°C in PBS im Kühlschrank gelagert werden.

Bei dem vergleichenden Experiment bezüglich der Proliferation unter Letrozol und ICI 182,780 fixierten wir die Kulturen alle nach 6 Tagen Behandlung. Bei dem Versuch zur Klärung, ob eine Einflussnahme von Estradiol auf GAP43 über den ER oder einen anderen Signalweg stattfindet, wurde auf den oben erwähnten zeitlichen Verlauf verzichtet und die Kulturen wurden nach 7 Tagen Behandlung fixiert. Für die Charakterisierung der Kultur wurde eine Fixierung nach 4 und 10 Tagen ohne Behandlung durchgeführt.

III. 2. e) Immuncytochemie der Dispersionskulturen

Die Immuncytochemie wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Initial blockierten wir die Kulturen bei RT mit 3%-igem BSA in PBS für 30 min, um unspezifische Immunreaktionen zu verhindern. Nach Ablauf der Zeit wurde die BSA-Lösung durch die Primärantikörper-Lösung ersetzt. Hier setzten wir einen monoklonalen GAP43-Antikörper in der Verdünnung 1:1 000 in PBS ein. Nach Entfernung der BSA-Lösung wurden hiervon in jedes *well* 250 µl gegeben, sodass die Inkubation für 12 h bei 4°C im Kühlschrank erfolgen konnte.

Anschließend wurden die Kulturen je 3-mal 5 min mit 1 ml PBS gespült. Nun folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers, wobei wir einen monoklonalen Cy3-Antikörper 1:350 verdünnt in PBS benutzten. Die Kulturen wurden so 1 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Es folgte wieder ein 3-mal 5-minütiges Spülen mit PBS, woraufhin wir die Kernfärbung mit DAPI (Verdünnung 1:100 000 in PBS) für 3 min durchführten.

Nach einem abschließenden Spülen (3-mal 5 min mit PBS) entnahmen wir die Glasplättchen den Kavitäten, legten sie auf einen Objektträger, versahen sie mit einem Tropfen DABCO (fluoreszenzfreies Eindeckmedium) und deckten sie mit einem Deckglas ein.

Die soeben beschriebene Vorgehensweise entspricht dem Standard der vorliegenden Arbeit. Einige Kulturen wurden zum Nachweis der Spezifität des GAP43-Antikörpers einer Doppelinkubation unterzogen:

- Doppelinkubation mit dem monoklonalen GAP43-Antikörper und einem polyklonalen GFAP-Antikörper, einem Astrozytenmarker (1:1 000 in PBS; Raff et al., 1979); als Sekundärantikörper fungierten Cy3 (monoclonal, anti-mouse; 1:350 in PBS) und ein Alexa-488-Antikörper (polyclonal, anti-rabbit; 1:500 in PBS).
- Doppelinkubation mit dem monoklonalen GAP43-Antikörper und einem polyklonalen MAP2-Antikörper, einem Dendriten- und Perikaryenmarker (1:1 000 in PBS; Ferreira et al., 1987); die Sekundärantikörper stellten Cy3 (monoclonal, anti-mouse; 1:350 in PBS) und ein Alexa-488-Antikörper (polyclonal, anti-rabbit; 1:500 in PBS) dar.

- Doppelinkubation mit dem monoklonalen GAP43-Antikörper und einem polyklonalen τ -Antikörper, einem Axonmarker (1:1000 in PBS; Ferreira et al., 1987); als Sekundärantikörper agierten Cy3 (monoclonal, anti-mouse; 1:350 in PBS) und ein Alexa-488-Antikörper (polyclonal, anti-goat; 1:500 in PBS).

Der Ablauf dieser Doppelinkubationen glich dem der vorher beschriebenen Immuncytochemien, lediglich wurde bei Gabe des Primär- bzw. Sekundärantikörpers der jeweils zusätzlich angegebene Antikörper additiv appliziert.

Die Kulturen des vergleichenden Versuchs mit Letrozol und ICI 182,780 wurden ebenfalls einer Immuncytochemie unterzogen, die dem oben beschriebenen Schema folgte. Um das Proliferationsniveau beurteilen zu können, setzten wir hier jedoch als Primärantikörper einen monoklonalen Ki-67-Antikörper (mouse, 1:500 in PBS) sowie einen Cy3-Antikörper (monoclonal, anti-mouse; 1:350 in PBS) als Sekundärantikörper ein. Ki-67 ist ein nukleäres Protein, das sich nur bei proliferierenden Zellen findet (G_1 -/ S-/ G_2 -/ M-Phase), aber bei ruhenden Zellen fehlt (G_0 -Phase).

Vor dem Beginn der Experimente wurde eine Kulturcharakterisierung durchgeführt: Hierzu wurden unbehandelte Kulturen nach dem oben vorgestellten Schema immuncytochemisch behandelt, um den Anteil der einzelnen Zellpopulationen im Hippocampus bestimmen zu können. Folgende Primärantikörper wurden eingesetzt: anti-GFAP (Astrozytenmarker: Raff et al., 1979; 1:1 000 in PBS), anti-MAP2 (neuronaler Marker: Ferreira et al., 1987; 1:1 000 in PBS), anti-MOSP (Oligodendrozytenmarker: Dyer et al., 1991; 1:2 500 in PBS) und anti-CD11b (Mikroglia marker: Jensen et al., 1997; 1:500 in PBS).

III. 2. f) Bildanalyse

Folgend fotografierten wir die Immuncytochemien mit Hilfe einer ZEISS Axiocam HRC am Axioskop 2 und dem dazugehörigen PC-Programm Axiovision 3.1 digital. Hierzu wurden die Objektträger-Beschriftungen unkenntlich gemacht, sodass die Fotos blind – ohne Kenntnis, welche Kulturbehandlung vorlag – gespeichert wurden und somit keine subjektiven Einflüsse die Ergebnisse der vorgenommenen Untersuchungen verfälschten.

Die Aufnahmen wurden bei jeweils gleicher Wellenlänge – d. h. 370 nm für DAPI, 488 nm für Alexa und 546 nm für Cy3 – und Belichtungszeit gemacht; wir nutzten folgende Vergrößerungen für die Immuncytochemien „anti-GAP43“: Bei 200-facher Vergrößerung wurden die Kulturen nach dem Zufallsprinzip digital aufgenommen, um die GAP43-Expression in der gesamten Dispersionskultur bewerten zu können (auf diesen Teil der Messung wurde bei dem Versuch zur Klärung des Signalweges der Estradiolwirkung auf GAP43 verzichtet). Anschließend wurden bei 400-facher Vergrößerung gezielt Neurone mit GAP43-positiven Axonen aufgenommen, deren GAP43-Expression ebenso wie bei obigen Bildern im Macintosh-Programm Openlab 3.1.5 ausgewertet wurde. Hierzu wurde die Fläche jedes GAP43-Signals mit der jeweiligen Intensität multipliziert, sodass sich der *staining index* (Färbungsintensität) ergab. Diesen *staining index* dividierten wir bei den Bildern 200-facher Vergrößerung noch durch die Zellzahl, die durch Messung der Signalanzahl auf den DAPI-Bildern erhalten wurde. Bei den Bildern 400-facher Vergrößerung wurde nur das *staining* der Axone erfasst. Des Weiteren maßen wir in den Bildern 400-facher Vergrößerung die Länge der Axone mit dem Programm Axiovision 3.1.

Die digitalen Bilder des Letrozol-ICI 182,780-Experiments wurden bei 200-facher Vergrößerung gespeichert. Es folgte die Messung der Anzahl der Proliferations- und Zellkernsignale mit Hilfe von Openlab 3.1.5, sodass sich ein prozentualer Wert für das Proliferationsniveau ergab.

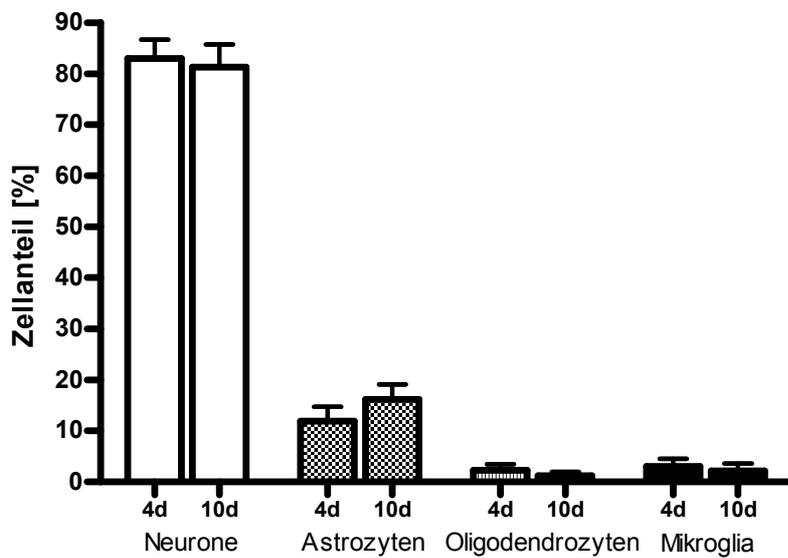
Die weiteren statistischen Auswertungen führten wir mit dem Programm SPSS für Windows durch. SPSS errechnete für die jeweilige Versuchsreihe den Mittelwert, die Standardabweichung und das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) für die verschiedenen behandelten Kulturen im Vergleich zur Kontrollreihe mit Hilfe der ANOVA durch einen *post-hoc*-Test nach Dunnett (zweiseitig). Die Diagramme im Kapitel Ergebnisse (siehe Kapitel IV) wurden mit dem Programm Prism erstellt.

IV. Ergebnisse

IV. 1. Charakterisierung hippocampaler Dispersionskulturen

Um die Kulturbedingungen, unter denen die hier beschriebenen Experimente durchgeführt wurden, beschreiben und die Aussagekraft der Ergebnisse interpretieren zu können, wurde eine Charakterisierung der hippocampalen Dispersionskulturen durchgeführt. Hierzu wurden nach 4 und 10 Tagen unbehandeltem Wachstum Kulturen fixiert und nach oben (siehe Kapitel III. 2. e) beschriebenem Schema immunocytochemisch untersucht. Wir zählten bei 49 *wells* aus insgesamt 4 verschiedenen Tierpräparationen die Anzahl der einzelnen Zellpopulationen. Die Charakterisierung ergab nach beiden Wachstumszeiten ein zu mehr als 80% aus Neuronen bestehendes Zellbild. Die restlichen Zellen waren zum überwiegenden Teil Astrozyten, wohingegen die gefundene Anzahl der übrigen Gliazell-Populationen sehr gering war (siehe Tab. 1 und Abb. 7).

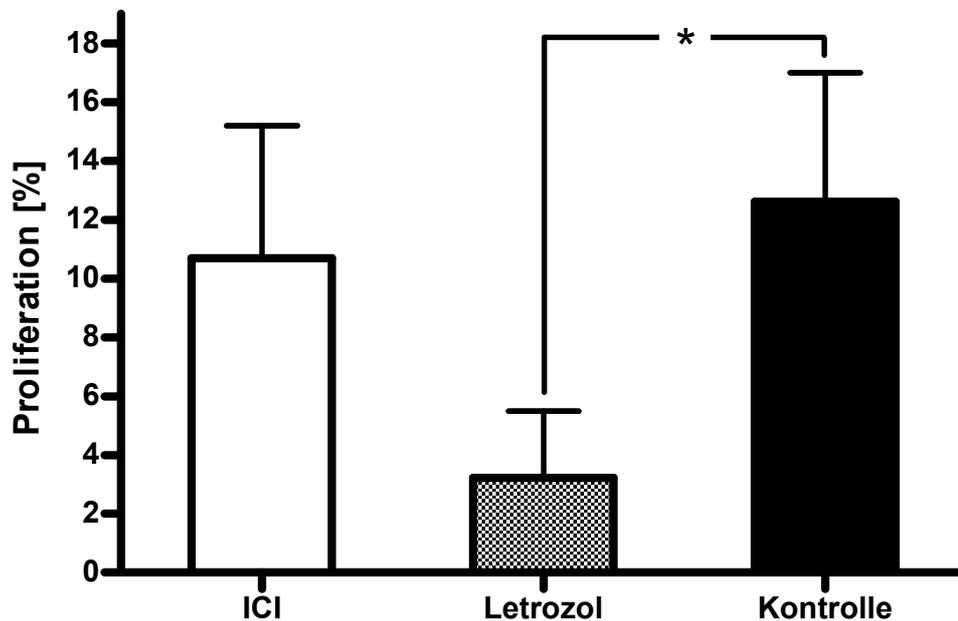
Tab. 1	4 Tage		10 Tage	
	%	sd [%]	%	sd [%]
MAP2-positiv	83	3,7	81	4,4
GFAP-positiv	12	2,8	16	2,9
MOSP-positiv	2	1,1	1	0,8
CD11b-positiv	3	1,5	2	1,4

Abb. 7: Kulturcharakterisierung (4 und 10 Tage Kulturwachstum)

IV. 2. Proliferationsniveau unter Letrozol und ICI 182,780

Mit diesem Experiment sollte die Proliferationsrate in hippocampalen Dispersionskulturen unter dem Einfluss verschiedener Antiöstrogene verglichen werden. Nach 6 Behandlungstagen konnten wir unter Letrozoleinfluss eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate messen. Die Applikation des ER-Antagonist ICI 182,780 hatte keine signifikanten Effekte zur Folge (siehe Tab. 2 und Abb. 8).

Tab. 2	6 Tage (* = p < 0,05)		
	Proliferation [%]	n	sd [%]
ICI 182,780	10,70	26	4,50
Letrozol	3,22 *	24	2,28
Kontrolle	12,60	25	4,39

Abb. 8: Proliferation (6 Tage Kulturwachstum)

IV. 3. Nachweis der Spezifität des GAP43-Antikörpers

Die Spezifität des GAP43-Antikörpers wurde durch Doppelinkubationen evaluiert:

IV. 3. a) GAP43 – GFAP

GFAP ist ein Astrozytenmarker (Raff et al., 1979), GAP43 sollte daher nicht in GFAP-positiven Zellen vorkommen. Abb. 9 (siehe unten) zeigt auf dem linken Bild mittig ein Neuron mit einem GAP43-positiven Axon (Pfeil), das keine GFAP-Färbung aufweist. Auf dem linken Bild ist ein GFAP-positiver (Pfeil) Astrozyt zu erkennen, der kein GAP43 exprimiert. Somit ist keine Kolo-kalisation vorhanden (beide Bilder sind Überlagerungen aller drei Farbstoffe).

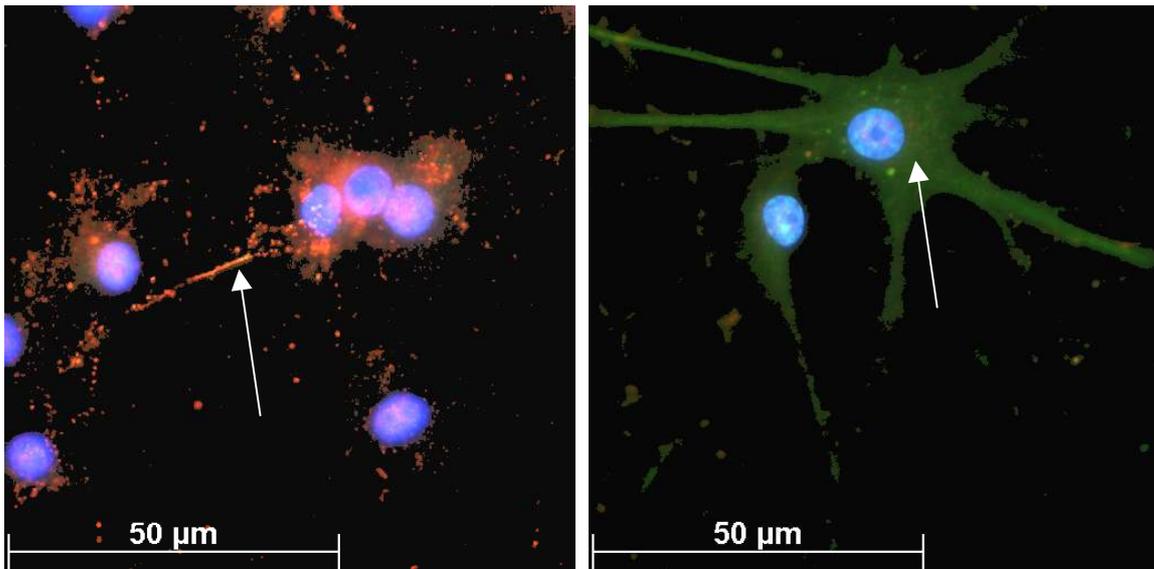


Abb. 9: Immunocytochemische Doppelinkubation mit GAP43- (rot) und GFAP-Antikörper (grün), DAPI-Kernfarbstoff (blau)

IV. 3. b) GAP43 – MAP2

MAP2 ist ein Dendriten- und Perikaryenmarker (Ferreira et al., 1987), der daher nicht in GAP43-positiven Axonen vorkommen sollte. Abb. 10 zeigt links die Überlagerung der zwei Antikörper und des Kernfarbstoffs. Auf dem linken und dem mittleren (Einzelaufnahme des GAP43-Antikörpers) Bild sind unterhalb des Zellbandes mehrere GAP43-positive axonale *growth cones* zu sehen (Pfeile), die aber – wie die Einzelaufnahme des MAP2-Antikörpers rechts zeigt – im Gegensatz zu den Dendriten und Perikaryen nicht MAP2-positiv ist.

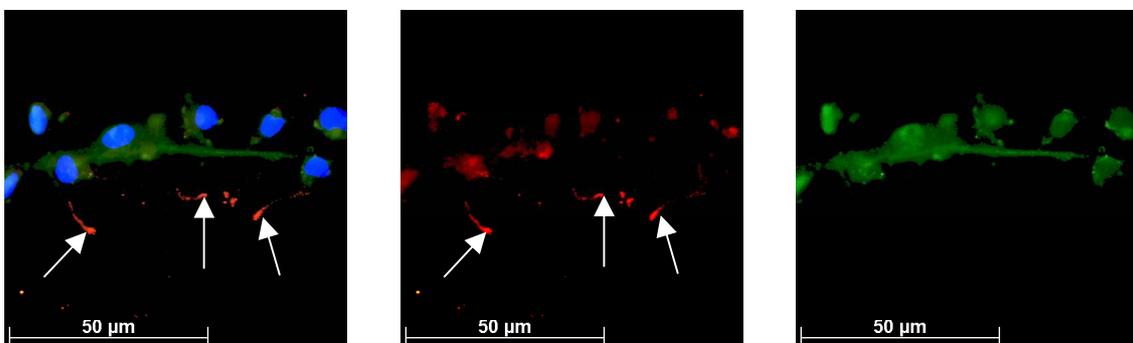


Abb. 10: Immunocytochemische Doppelinkubation mit GAP43- (rot) und MAP2-Antikörper (grün), DAPI-Kernfarbstoff (blau)

IV. 3. c) GAP43 – τ (Tau)

τ ist ein Axonmarker (Ferreira et al., 1987), der daher mit GAP43 kolokalisieren sollte. Abb. 11 zeigt links die Überlagerung der 2 Antikörper und des Kernfarbstoffs. Sowohl auf dem linken Bild als auch auf den Einzelaufnahmen des GAP43-Antikörpers (mittig) und des τ -Antikörpers (rechts) ist die Kolokalisation des GAP43- und des τ -Antikörpers im Axon zu erkennen (ovale Markierungen).

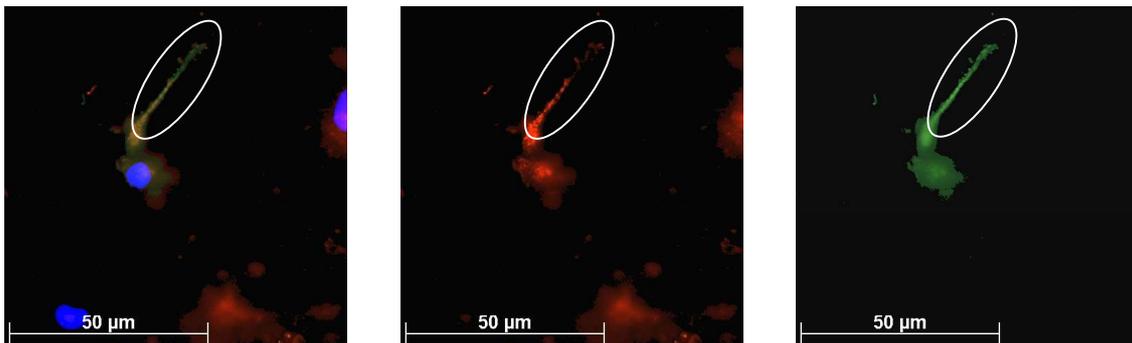


Abb. 11: Immuncytochemische Doppelinkubation mit GAP43- (rot) und τ -Antikörper (grün), DAPI-Kernfarbstoff (blau)

IV. 4. GAP43-Expression in hippocampalen Dispersionskulturen

In dieser Auswertung wurde der *staining index* als Maß für die GAP43-Expression in der gesamten Kultur gemessen, d. h. es wurde der *staining index* der gesamten digitalen Aufnahme der Dispersionskultur ausgewertet und durch die Zellzahl dividiert. Die Kulturen fixierten wir nach einem Zeitraum von 3, 5 und 7 Tagen.

Es zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der GAP43-Expression durch Letrozol nach allen drei Behandlungszeiträumen. Eine signifikante GAP43-Heraufregulation war jedoch erst nach 7 Behandlungstagen zu sehen. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und den Letrozolbehandlungen ist größer als die Differenz zwischen Estradiol- und Kontrollkulturen. Auffallend waren die hohen Standardabweichungen in nahezu allen Messergebnissen dieser Versuchsreihe (siehe Tab. 3 und Abb. 12-14).

Tab. 3	3 Tage (* = p < 0,05)			5 Tage (* = p < 0,05)		
	<i>staining index/ Zelle</i>	n	sd	<i>staining index/ Zelle</i>	n	sd
Estradiol	2 971	29	1 595	5 021	27	4 291
Letrozol	897 *	27	2 135	1 080 *	26	1 017
Kontrolle	2 482	27	2 303	3 397	23	1 737
	7 Tage (* = p < 0,05)					
	<i>staining index/ Zelle</i>	n	sd			
Estradiol	5 347 *	36	4 603			
Letrozol	1 173 *	35	1 071			
Kontrolle	3 447	31	2 413			

Abb. 12: GAP43-Expression (3 Tage Kulturwachstum)

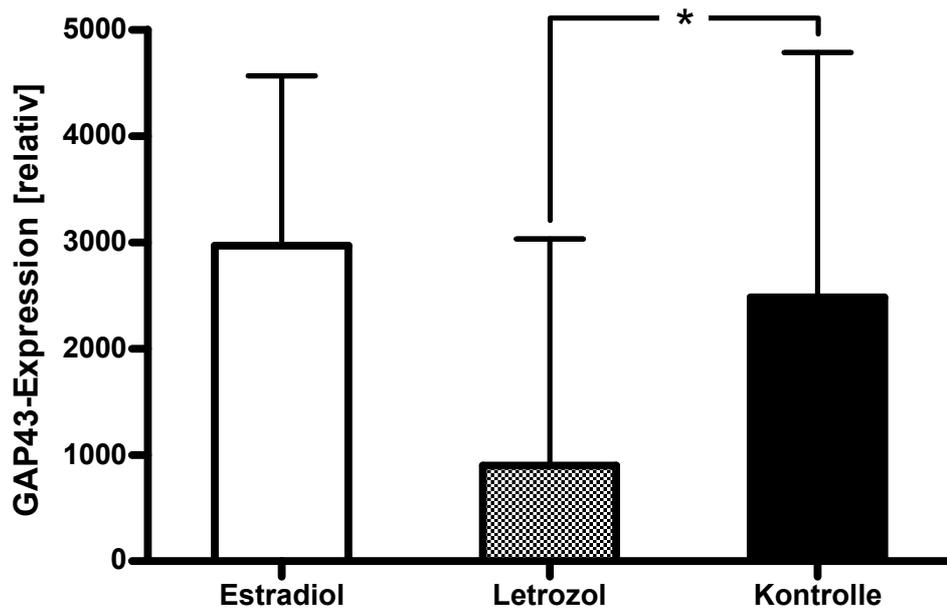
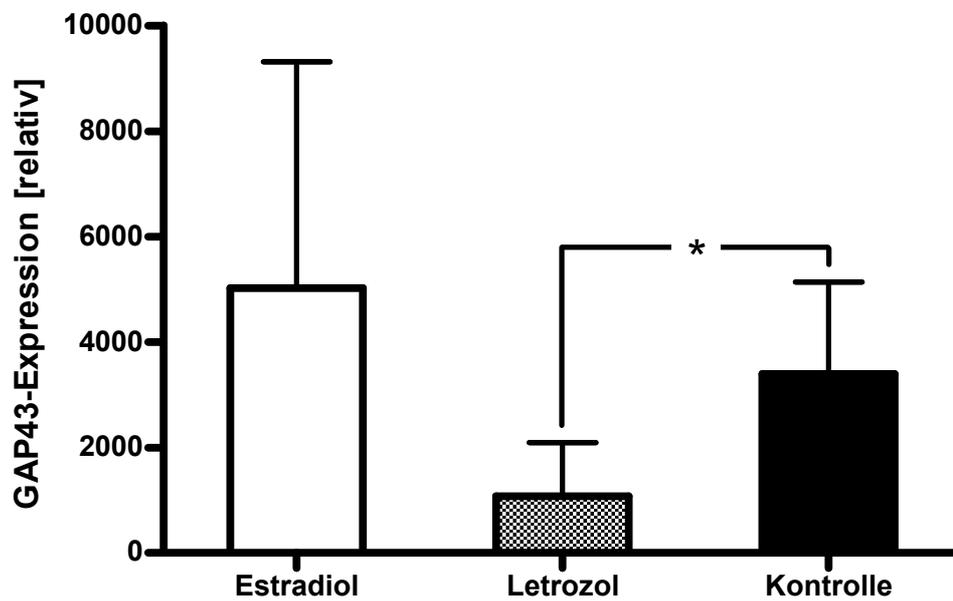
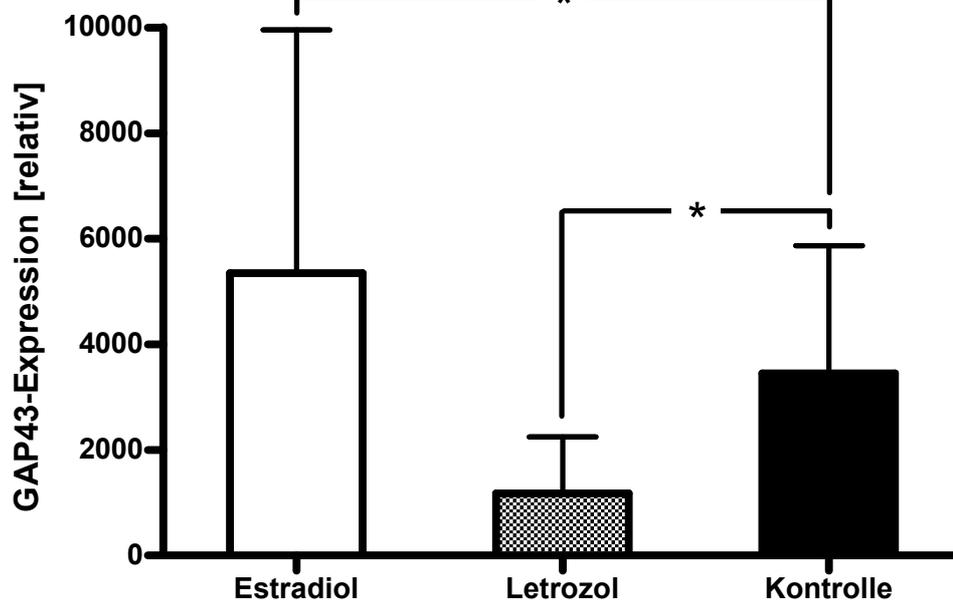


Abb. 13: GAP43-Expression (5 Tage Kulturwachstum)**Abb. 14: GAP43-Expression (7 Tage Kulturwachstum)**

In Abb. 15 (siehe unten) ist die signifikante Herunterregulation der GAP43-Expression deutlich zu erkennen. Ein Unterschied zwischen Kontroll- und Estradiolkultur ist zwar immer noch zu erkennen, aber er ist nicht so deutlich wie zur Letrozolkultur. Auffällig ist, dass der GAP43-Antikörper z. T. kernmembranständige Signale zeigt.

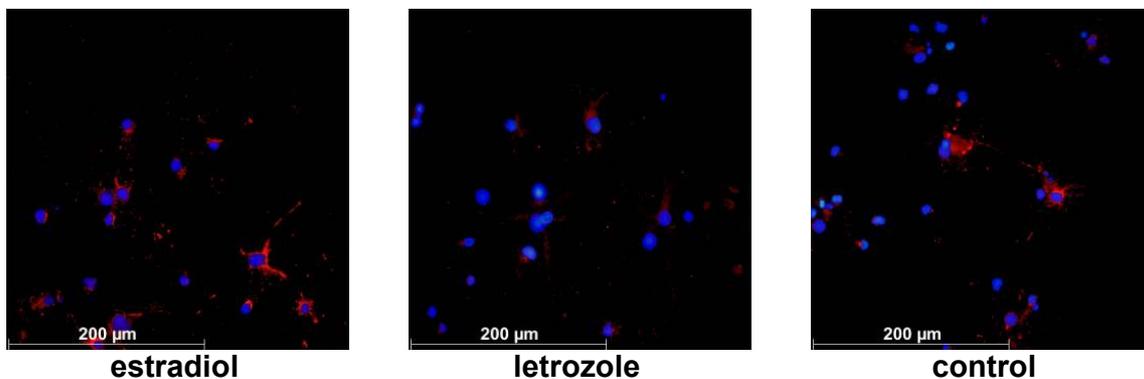


Abb. 15: Immuncytochemien mit GAP43-Antikörper, DAPI-Kernfarbstoff blau (Aufnahmen nach 7 Tagen Kulturwachstum)

Die hohen Standardabweichungen im Rahmen dieser Messung zwangen zu einer exakteren Methodik, sodass wir GAP43-positive Axone bei 400-facher Vergrößerung digital aufnahmen und hier nur das *staining* (Färbung) des Axons maßen. Wieder wurde ein zeitlicher Vergleich durch Abbruch der Stimulation bzw. Inhibition nach 3, 5 und 7 Tagen durchgeführt.

Auch in dieser Messung zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der GAP43-Expression durch Letrozol nach allen drei Behandlungszeiträumen (siehe Tab. 4 und Abb. 16-18). Eine signifikante GAP43-Heraufregulation im Axon war nach 5 und 7 Tagen Stimulation mit Estradiol zu erkennen. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und den Letrozolbehandlungen war wieder größer als die Differenz zwischen Estradiol- und Kontrollkulturen. Insgesamt ergab die statistische Auswertung hier kleinere Standardabweichungen als bei der Messung bei 200-facher Vergrößerung, sodass wir hier von einer größeren Aussagekraft ausgehen (siehe Kapitel V. 1.).

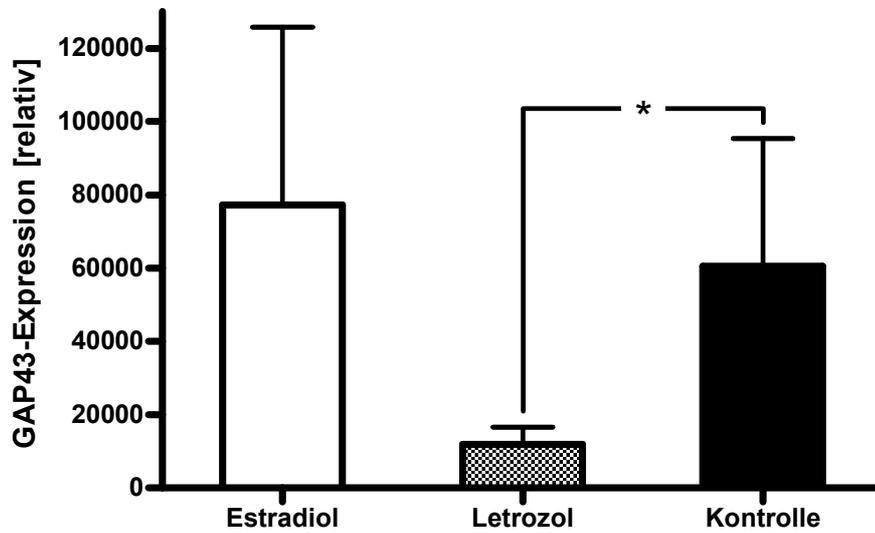
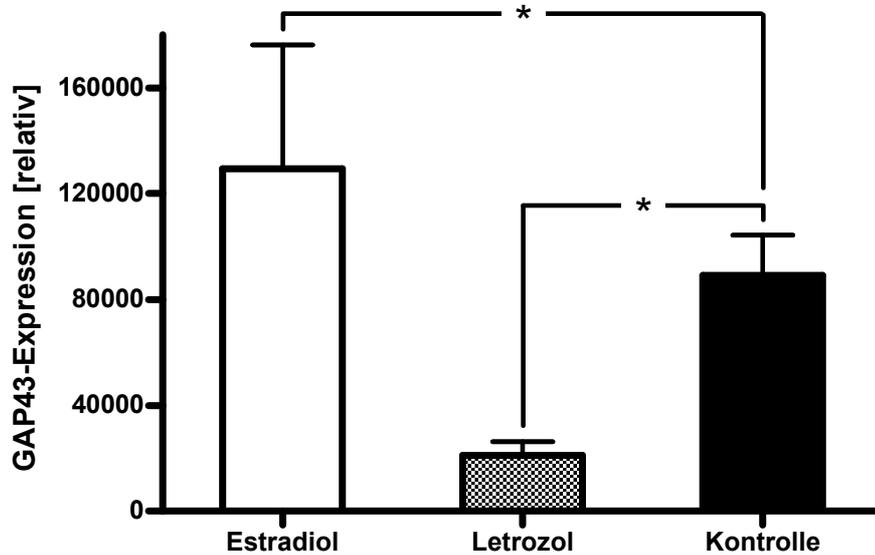
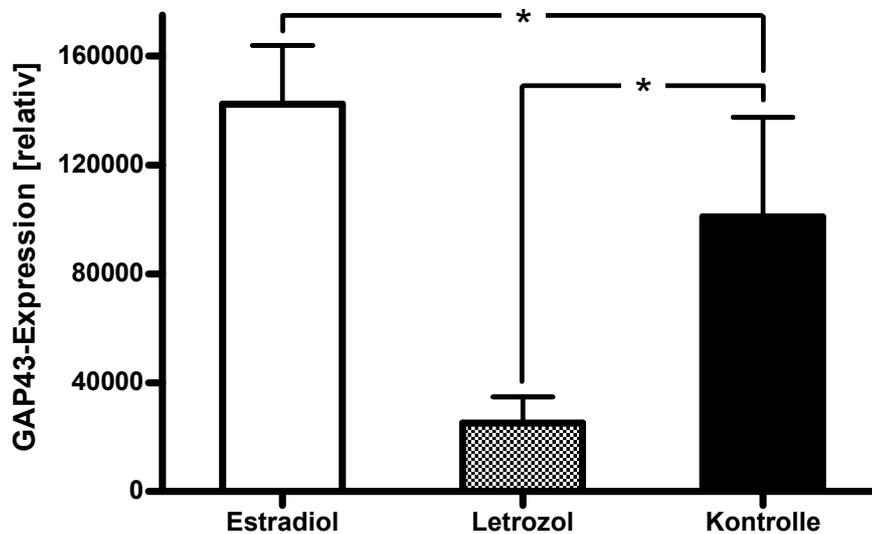
Abb. 16: GAP43-Expression im Axon (3 Tage Kulturwachstum)**Abb. 17: GAP43-Expression im Axon (5 Tage Kulturwachstum)**

Abb. 18: GAP43-Expression im Axon (7 Tage Kulturwachstum)

Tab. 4	3 Tage (* = p < 0,05)			5 Tage (* = p < 0,05)		
	<i>staining index</i>	n	sd	<i>staining index</i>	n	sd
Estradiol	77 313	30	48 539	129 476 *	32	46 696
Letrozol	11 931 *	27	4 733	21 044 *	27	5 244
Kontrolle	60 482	31	34 854	89 169	30	15 138
	7 Tage (* = p < 0,05)					
	<i>staining index</i>	n	sd			
Estradiol	142 292 *	33	21 598			
Letrozol	25 202 *	28	9 610			
Kontrolle	100 947	35	36 667			

In Abb. 19 (siehe unten) sind die oben beschriebenen statistischen Daten exemplarisch an digitalen Aufnahmen zu erkennen. Die extrem starke Herunterregulation der GAP43-Expression unter Letrozoleinfluss ist an der nahezu nicht mehr sichtbaren Cy3-Färbung (rot) zu erkennen. Auch die Zunahme der GAP43-Expression im Vergleich zwischen Estradiol und Kontrolle ist sichtbar.

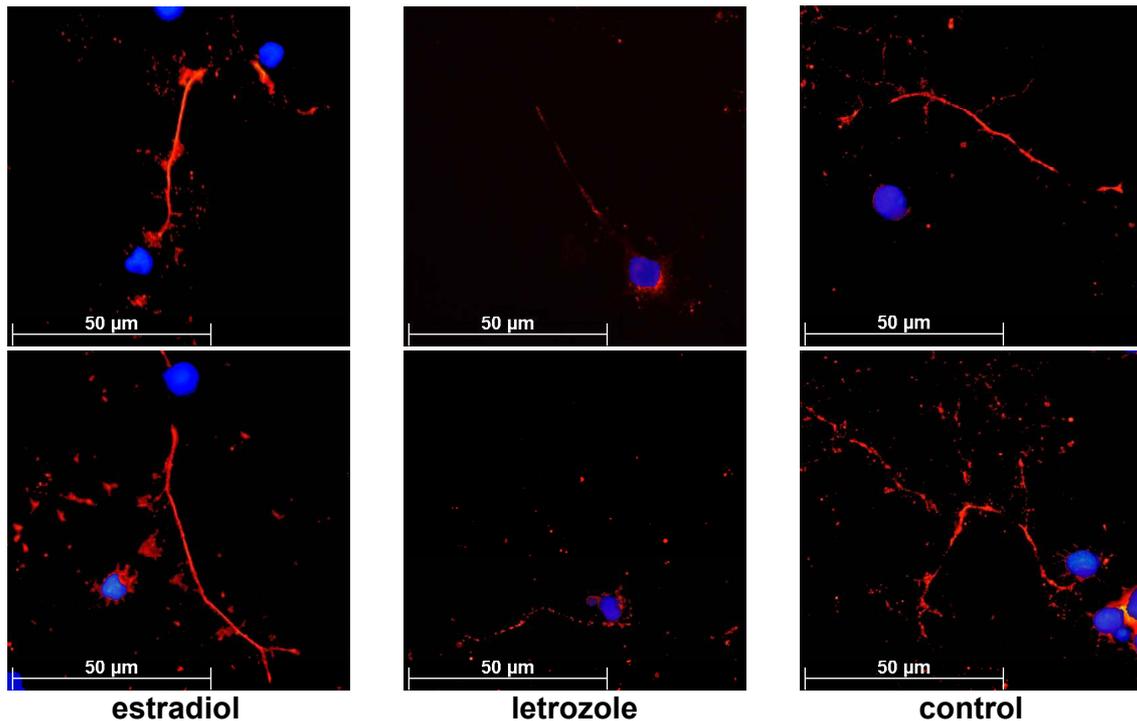


Abb. 19: Immunocytochemien mit GAP43-Antikörper, DAPI-Kernfarbstoff blau (Aufnahmen nach 5 (oben) und 7 (unten) Tagen Kulturwachstum)

IV. 5. Axonlänge in hippocampalen Dispersionskulturen

Zusätzlich zur GAP43-Expression wurden die Axonlängen von estradiol- und letrozolbehandelten Dispersionskulturen mit den unbehandelten Kontrollkulturen verglichen. Eine Fixierung der Zellen nach 3, 5 und 7 Tagen ermöglichte den zeitlichen Vergleich.

Die Ergebnisse dieser Messung zeigten das morphologische Korrelat zur GAP43-Expression: Die Axonlänge zeigte eine signifikante Heraufregulation der Estradiolkulturen und Herunterregulation der Letrozolkulturen nach allen drei Behandlungszeiträumen. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und den Letrozolbehandlungen war größer als die Differenz zwischen Estradiol- und Kontrollkulturen. Der zeitliche Vergleich ergab im Verlauf eine weitere Manifestation der Ergebnisse, die auch schon nach 3 Tagen Stimulation bzw. Inhibition zu sehen sind (siehe Tab. 5 und Abb. 20-22).

Tab. 5	3 Tage (* = p < 0,05)			5 Tage (* = p < 0,05)		
	Länge [μm]	n	sd [μm]	Länge [μm]	n	sd [μm]
Estradiol	47,45 *	29	13,3	56,9 *	30	7,51
Letrozol	23,96 *	25	6,22	25,15 *	26	7,33
Kontrolle	39,07	27	9,15	44,32	31	7,05
	7 Tage (* = p < 0,05)					
	Länge [μm]	n	sd [μm]			
Estradiol	58 *	28	13,12			
Letrozol	27,12 *	25	9,53			
Kontrolle	47,06	35	9,84			

Abb. 20: Axonlänge (3 Tage Kulturwachstum)



Abb. 21: Axonlänge (5 Tage Kulturwachstum)

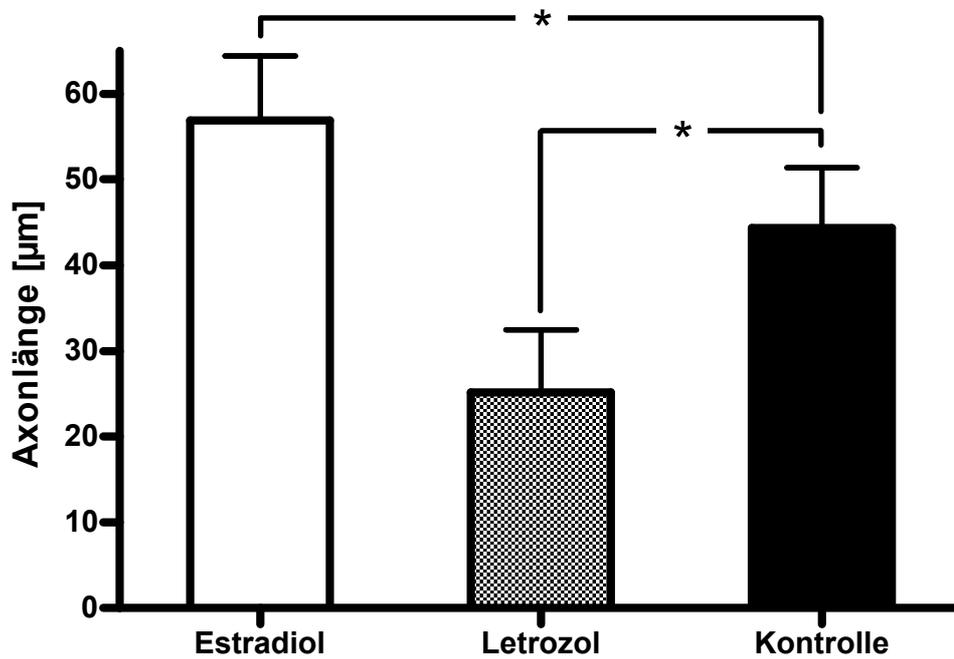


Abb. 22: Axonlänge (7 Tage Kulturwachstum)



IV. 6. Axonlänge und GAP43-Expression unter Einfluss verschiedener Antiöstrogene

Hier wurde vergleichend der Einfluss der Antiöstrogene Letrozol und ICI 182,780 auf die GAP43-Expression und Axonlänge nach 7 Tagen Behandlung gezeigt. In diesem Versuch konnten die bereits oben gezeigten Effekte bezüglich Estradiol und Letrozol bestätigt werden. Darüber hinaus bewirkte der ER-Antagonist ICI 182,780 hier ebenso wie Letrozol eine signifikante Herunterregulation der Axonlänge und GAP43-Expression. Die additive Applikation von Estradiol zu ICI 182,780 führte zu keiner Veränderung gegenüber der Behandlung nur mit ICI 182,780 (keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Letrozol, Estradiol + ICI 182,780 und ICI 182,780; siehe Tab. 6 und Abb. 23-24).

Tab. 6	GAP43-Expression (* = p < 0,05)		
	<i>staining index</i>	n	sd [μ m]
Estradiol	7 303 *	30	3 249
Letrozol	622,7 *	31	447,7
Estradiol + ICI 182,780	886,1 *	32	662,2
ICI 182,780	667,5 *	30	453,9
Kontrolle	4 382	35	2 365
	Axonlänge (* = p < 0,05)		
	Länge [μ m]	n	sd [μ m]
Estradiol	183,3 *	30	82,46
Letrozol	37,98 *	31	12,54
Estradiol + ICI 182,780	38,56 *	32	14,68
ICI 182,780	32,3 *	30	13,99
Kontrolle	114,1	35	43

Abb. 23: GAP43-Expression (7 Tage Kulturwachstum)

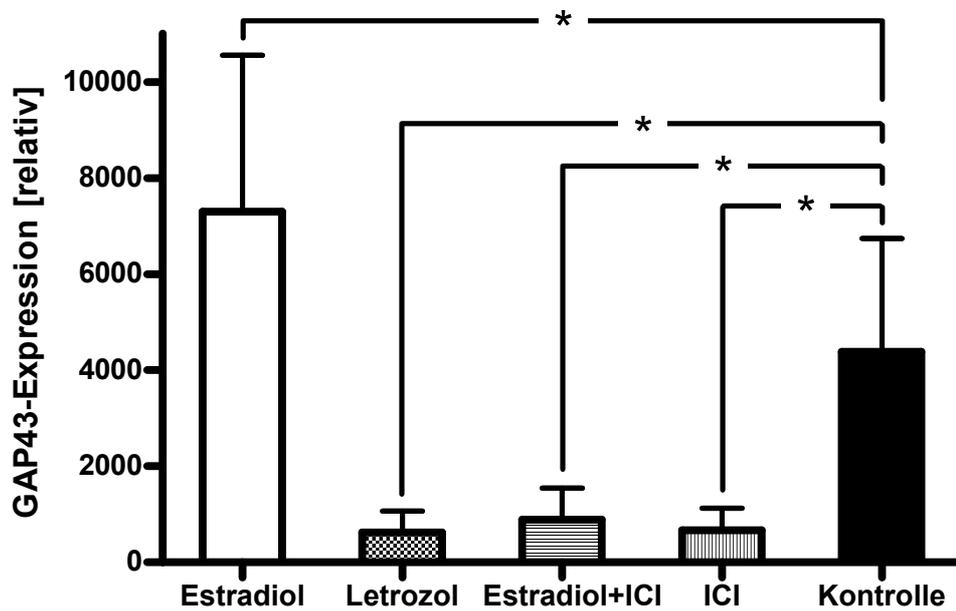
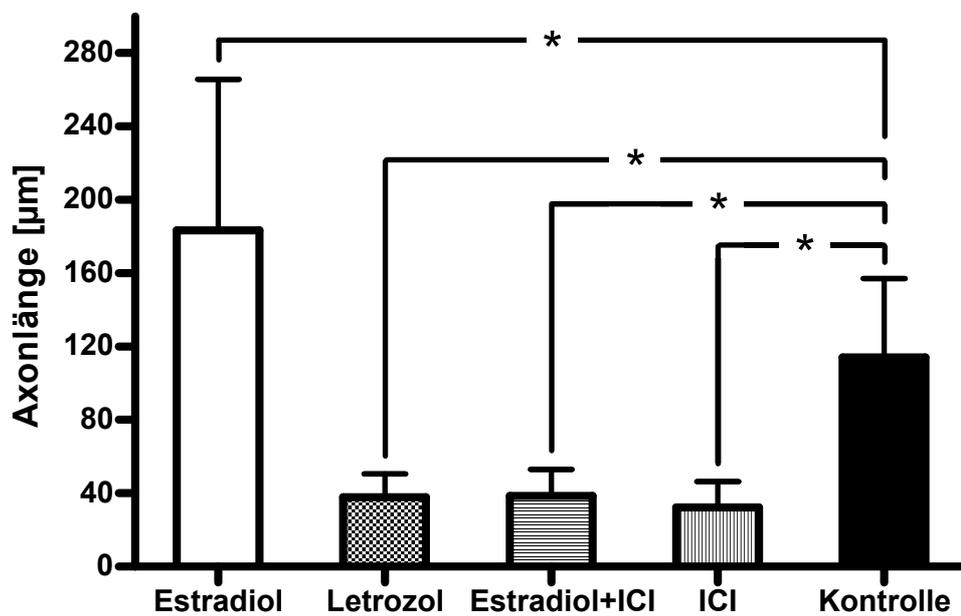


Abb. 24: Axonlänge (7 Tage Kulturwachstum)



V. Diskussion

In dieser Arbeit konnten wir erstmalig zeigen, dass das *growth-associated protein* GAP43 unter Estradiol-Einfluss in neonatalen hippocampalen Primärkulturen der Ratte vermehrt exprimiert wird und nach Inhibition der endogenen Estradiol-Synthese mit Letrozol die GAP43-Expression herunterreguliert ist. Dabei besteht eine sehr hohe positive Korrelation zwischen der GAP43-Expression und der Axonlänge in hippocampalen Dispersionskulturen.

Die Ergebnisse zeigten sowohl für die Messung der Axonlänge als auch für die Messung der GAP43-Expression im Axon und in der gesamten Dispersionskultur eine vorliegende Heraufregulation zu allen drei Untersuchungszeitpunkten für Estradiol, jedoch war der Unterschied nach Estradiolbehandlung wesentlich geringer als nach Letrozolbehandlung.

Zusätzlich konnten in dieser Arbeit ein weiteres Mal Hinweise auf die differenzierte Wirkungsweise von Estradiol geliefert werden, da hier nachgewiesen werden konnte, dass estradiolinduzierte Proliferation nicht über ER vermittelt wird. Dementgegen weist die vorliegende Arbeit nach, dass beim estradiolinduzierten Axonwachstum ER involviert sind.

V. 1. Methodische Überlegungen

Im Gegensatz zu der Arbeit von Prange-Kiel et al. (2003) wurde hier eine Dichtegradienten-Zentrifugation bei Anlage der Kultur nicht durchgeführt, da dies bei postnatalen Tieren nur sehr schwer möglich ist, sodass einerseits eine größere Zellausbeute entstand, andererseits jedoch auch die zelluläre Heterogenität hoch war: Man kann davon ausgehen, dass sich in den hier untersuchten Dispersionskulturen Prinzipalneurone des hippocampalen Pyramidenzellbandes, Körnerzellen des Gyrus dentatus, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia vorhanden waren – und dies zu einem höheren Anteil als in Kulturen adulter Tiere (Prange-Kiel et al, 2003).

Die durchgeführte Charakterisierung der hippocampalen Dispersionskulturen ergab dennoch einen sehr großen Anteil an Neuronen (81% nach 10 Tagen *in vitro*) sowie einen

entsprechenden Restanteil Astrozyten (16% nach 10 Tagen). Die Zahl der weiteren Gliazellen erwies sich als vernachlässigbar klein (1% Oligodendrozyten und 2% Mikroglia nach 10 Tagen). Unsere Kultur erwies sich damit als adäquates Modell, da mit GAP43 ein neuronspezifisches Protein zentraler Bestandteil der Untersuchungen ist.

Die dennoch vorhandene Heterogenität der Zellausbeute spiegelte sich in den Ergebnissen für die Messung der GAP43-Expression in der gesamten Kultur wider: Zwar war bei Inhibition der hippocampalen Estradiolsynthese durch Letrozol eine signifikante Herunterregulation zu erkennen, jedoch war die in den anderen Untersuchungen zu sehende Heraufregulation der GAP43-Expression in den estradiolbehandelten Kulturen erst nach 7 Tagen Stimulation zu erkennen (nach 3 und 5 Tagen ist dies nur tendenziell zu beobachten). Diese Tatsache lässt sich einerseits auf die verschiedene Zusammensetzung der Kulturschalen zurückführen, da nicht immer davon auszugehen ist, dass bei der großen hippocampalen Zellvielfalt in jeder Kultur eine absolut gleiche Zahl von Neuronen vorlag, was wiederum das Zellmilieu beeinflusst haben könnte. Zu erkennen war das besonders an den relativ großen Standardabweichungen in diesen Messungen der gesamten Kultur (siehe Kapitel IV. 4). Da in dieser Untersuchung das *staining* der gesamten Kultur gemessen wurde, können wir andererseits nicht mit Sicherheit ausschließen, dass auch z. T. unspezifische Signale oder durch Fehlreaktionen der Antikörper begründeter „Hintergrund“ in die Messung Eingang fand.

Ein weiterer Grund für die relativ großen Standardabweichungen und die im Bereich der Estradiol-Behandlung erst nach 7 Tagen Signifikanz zeigenden Ergebnisse kann die Tatsache sein, dass hier die Bilder nach dem Zufallsprinzip aufgenommen wurden. So kann es sein, dass viele Neurone in die Messungen Eingang fanden, bei denen die Ausbildung der neuronalen Polarität (Goslin and Banker, 1990) noch gar nicht abgeschlossen war. Im Gegensatz dazu wurden bei den Messungen der Axonlänge und der GAP43-Expression spezifisch im Axon GAP43-positive Axone gescannt, sodass diese Ergebnisse eine größere Aussagekraft über die GAP43-Regulation durch Estradiol haben. Somit kann festgestellt werden, dass dieser Teil der Untersuchungen, bei dem die GAP43-Expression in der gesamten Kultur gemessen wurde, sich hier von der Methodik her als weniger aussagekräftig erwies und somit nur tendenziellen Charakter besitzt. Daher nahmen wir eine spezifischere Messung der GAP43-Expression in Axonen vor und verzichteten auf diesen weniger aussagekräftigen Teil der Messung bei dem Versuch zur Klärung des Signalweges

der Beeinflussung von GAP43 durch Estradiol.

Jedoch muss einschränkend hinzugefügt werden, dass durch das explizite Suchen GAP43-positiver Axone besonders in den letrozol- und ICI 182,780-behandelten Dispersionskulturen eine methodisch bedingte Ungenauigkeit auftritt: GAP43-positive Axone waren in den Letrozol- und ICI 182,780-Kulturen extrem schwer aufzufinden, daher gehen in die Untersuchungen für die Axonlänge und die GAP43-Expression spezifisch im Axon nur die Axone der Letrozol- und ICI 182,780-Populationen mit vergleichsweise besonders hoher GAP43-Expression ein, sodass objektiv von einer noch stärkeren Herunterregulation des GAP43 durch Letrozol und ICI 182,780 auszugehen ist. Diese Überlegung lässt sich auch auf die Messung der Axonlänge übertragen.

Im Vergleich der Versuchsreihen mit zeitlichem Verlauf mit denen zur Klärung des Signalweges der Estradiolwirkung auf GAP43 fällt auf, dass z. T. andere Maximalwerte beim Neuritenwachstum in den einzelnen Kulturtypen zu erkennen sind. Dies ist durch den unterschiedlichen Stand der Etablierung der Primärkultur zu erklären. Dennoch sind in beiden Versuchsreihen die gleichen signifikanten Effekte zu sehen und diese bestätigen sich somit gegenseitig.

Da diese Arbeit sich auf die Spezifität des hier benutzten GAP43-Antikörpers stützt, wurde der Antikörper in drei verschiedenen Versuchsreihen einer immunhistochemischen Doppelinkubation unterzogen. In allen drei Untersuchungen mit den Inkubationspartnern anti-GFAP, anti-MAP2 und anti- τ zeigte sich die Spezifität des GAP43-Antikörpers: Neurone mit GAP43-positiven Axonen wiesen keine GFAP-Färbung vor; bezüglich GAP43 und MAP2 war eine differenzierte subzelluläre Expression zu finden (GAP43 im Axon, MAP2 in Dendriten und im Perikaryon); GAP43 und τ zeigten eine Kolo-kalisation im Axon; dies entspricht jeweils dem in der Literatur beschriebenen zellulären Lokus (Ferreira et al., 1987; Raff et al., 1979) und somit kann von einer hohen Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse ausgegangen werden.

In den Immuncytochemien zeigte sich eine Auffälligkeit: Viele (aber nicht alle) Nuclei von Neuronen zeigten eine GAP43-Immunfärbung, die ebenfalls schon in anderen Arbeiten beobachtet wurde (Aigner and Caroni, 1993; Goslin and Banker, 1990). Die GAP43-Signale schienen kernmembranständig zu sein und weisen damit entweder auf eine bisher

nicht bekannte Kreuzreaktivität des GAP43-Antikörpers oder auf eine weitere Rolle von GAP43 im Rahmen des Zellmetabolismus hin. Weitere Untersuchungen in diese Richtung sind daher erforderlich.

V. 2. GAP43-Regulation und axonales Wachstum durch Estradiol

Die Messungen der Axonlänge und der GAP43-Expression spezifisch im Axon zeigen eindeutig eine starke Abhängigkeit des GAP43 und der Axonlänge von Estradiol. In beiden Untersuchungen war zu erkennen, dass eine signifikante Herunterregulation des Expressions-Niveaus der Ietrozolbehandelten Kulturen in allen Behandlungszeiträumen stattfand. Auch das Estradiolniveau war meist signifikant heraufreguliert, wobei bei den Estradiolkulturen zwischen 3 und 5 Tagen Stimulation ein starkes Wachstum zu beobachten war, welches dann im Zeitraum zwischen 5 und 7 Tagen nicht mehr in dem Maße erfolgte. Dies zeigt eine sehr hohe positive Korrelation zwischen der GAP43-Expression und der Axonlänge und bestätigt somit die Ergebnisse von diversen Arbeiten (Aigner and Caroni, 1993; Goslin et al., 1988; Goslin and Banker, 1989; Goslin and Banker, 1990; Goslin et al., 1990; He et al., 1997). Aufgrund der starken Zunahme der GAP43-Expression und der Axonlänge zwischen 3 und 5 Tagen kann vermutet werden, dass die Effekte hier über den klassischen ER und nicht über einen anderen nichtgenomischen bzw. schnellen Weg gesteuert werden, da beim klassischen ER die *de novo* Proteinbiosynthese involviert ist und daher hier mit einer langen Latenzzeit zu rechnen ist, die Stunden oder gar Tage in Anspruch nimmt.

Die Messungen der GAP43-Expression in der gesamten Kultur sind hier als weniger aussagekräftig anzusehen – dies wird allein schon durch die hohen Standardabweichungen deutlich. Diese Untersuchung hat daher nur richtungsweisenden Charakter, obwohl hier trotz der oben erwähnten methodischen Schwierigkeiten die gleichen Tendenzen zu erkennen waren wie in den Messungen spezifisch im Axon.

Die vorliegenden Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass für die Regulation des GAP43 und damit assoziiert der Axonlänge im Hippocampus also sowohl endogen hippocampal synthetisiertes als auch exogenes (z. B. ovariell) Estradiol verantwortlich ist, wobei wir

hier vermuten, dass es für jede Wirkung von Estradiol eine bestimmte Konzentrationsspanne gibt (siehe unten).

Neben der Beschreibung von GAP43 als Axonmarker wird es durch seine Lokalisation im axonalen *growth cone* ebenso als präsynaptisches Protein angesehen und damit als involviert in synaptische Plastizität. Es konnte oftmals gezeigt werden, dass durch Estradiol die Heraufregulation diverser präsynaptischer Proteine (Synaptophysin, Synaptotagmin, Syntaxin, etc.) unterstützt wird (Kretz et al., 2004; Rune et al., 2002; Yokomaku et al., 2003). Jedoch konnte elektronenmikroskopisch keine Heraufregulation der präsynaptischen *boutons* unter Estradioleinfluss gefunden werden (Kretz et al., 2004). Wir vermuten daher, dass die estradiolinduzierte vermehrte Expression von GAP43 die Bildung von neuen Synapsen zwar erleichtert aber nicht unbedingt darin resultieren muss. Diese Hypothese wird durch eine kürzlich erschienene Publikation gestützt: In heterozygoten GAP43-Knockoutmäusen konnten keine qualitativen Veränderungen in den neuronalen Strukturen und keine quantitativen Veränderungen in der Synaptophysin-Expression gefunden werden (Rekart et al., 2005).

V. 3. Bedeutung von exogenem und endogenem Estradiol

Die Arbeit von Prange-Kiel et al. (2003) konnte zeigen, dass hippocampale Neurone in der Lage sind, Estradiol *de novo* zu synthetisieren. Auch konnte gezeigt werden, dass Estradiol die ER α -Expression erhöht und die ER β -Expression erniedrigt. Der Inhibitor der Estradiolsynthese Letrozol induziert ein dazu exakt umgekehrtes Verhalten. Diese Befunde zeigen, dass östrogene Wirkung im Hippocampus auto- und parakrin vermittelt werden.

Die vorliegende Arbeit beweist die Wirkung sowohl des endogenen hippocampal synthetisierten als auch exogenen Estradiols auf die GAP43-Expression und Axonlänge. Im Gegensatz dazu konnten Fester et al. (2006) zeigen, dass nur das endogene Estradiol Einfluss auf die Regulation der Apoptose und Proliferation im Hippocampus nimmt. Auch der Erhalt von *spine*-Synapsen kann nur durch endogenes Estradiol gesichert werden (Kretz et al., 2004). Dies deutet auf eine differenzierte Wirkungsweise des endogenen und exogenen Estradiols hin. Daher untersuchten wir hier die Proliferationsrate in

hippocampalen Dispersionskulturen unter Applikation verschiedenener Antiöstrogene.

Unter Letrozol konnte die schon bekannte Herunterregulation der Proliferationsrate (Fester et al., 2006) und damit die wichtige Rolle des endogenen Estradiols bezüglich der Proliferation bestätigt werden. Überraschend war, dass im Gegensatz dazu der Antagonismus an ER durch ICI 182,780 (Fulvestrant, Faslodex[®]) keine Effekte auf die Proliferation hat. Somit kann hier vermutet werden, dass ein weiterer Signalweg für Estradiol existiert (ICI 182,780 ist Antagonist an zytosolischen und membranständigen ER; Fitzpatrick et al., 2002).

Zusammengenommen führen diese und andere Ergebnisse (Fester et al., 2006; Prange-Kiel et al., 2003; Rune et al., 2002) zu unserer Vermutung, dass die hier vorgenommene Unterteilung in endogenes und exogenes Estradiol nicht von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf ihren Syntheselokus ist, sondern dass vielmehr für jede Wirkung von Estradiol eine bestimmte Konzentrationsspanne existiert.

V. 4. Genomische und nichtgenomische Estradioleffekte

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die vielfältigen Signalwege des Estradiols (Behl and Manthey, 2000; Beyer, 1999; Farach-Carson and Davis, 2003; Walters and Nemere, 2004). Hier konnte gezeigt werden, dass Estradioleffekte auf die Proliferation nicht über die bekannten ER (zytosolisch oder membranständig), sondern über einen anderen Signalweg vermittelt werden.

Im Gegensatz dazu konnte aufgeklärt werden, dass die Wirkung auf GAP43-Expression und Axonlänge sehr wohl vom bekannten ER vermittelt wird. Zu erkennen ist dies an den Untersuchungen mit ICI 182,780. Vermutlich ist hier der klassische zytosolische ER involviert, da das estradiolinduzierte Axonwachstum vor allem im Bereich zwischen 3 und 5 Tagen Kulturwachstum zu sehen ist (klassische oder genomische Estradioleffekte beeinflussen die *de novo* Proteinbiosynthese und sind daher durch eine lange Latenzzeit gekennzeichnet, die Stunden oder gar Tage in Anspruch nimmt; Behl and Manthey, 2000; Beyer, 1999; Lee and McEwen, 2001).

V. 5. Aromatase als neuroprotektiver Faktor

Vielfach wurde in der Vergangenheit nachgewiesen, dass Estradiol sowohl neuroprotektive als auch neurotrophische Effekte im ZNS hat (Garcia-Segura et al., 2001; Saunders-Pullman, 2003). Die neuroprotektive Komponente von Estradiol zeigt sich bei vielen neurodegenerativen Krankheiten, da z. B. beim Morbus Alzheimer, bei der Schizophrenie und bei der Regeneration nach cerebralen Traumata wie Schlaganfällen eine bessere Prognose unter der Anwesenheit von Estradiol zu beobachten ist (Cho et al., 2003; Garcia-Segura et al., 2001).

Vernachlässigt wurde bisher die Auswirkung der kürzlich bewiesenen hippocampalen Estradiolsynthese (Azcoitia et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Veiga et al., 2003). Inaktivierung der Aromatase im Rahmen neurodegenerativer Prozesse zeigt, dass die Induktion dieses Enzyms eine protektive Rolle spielen (Azcoitia et al., 2001) und somit pharmakologisch genutzt werden könnte. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen diese Thesen: Neben den von Fester et al. (2006) gefundenen proliferationsfördernden Effekten hat das endogene Estradiol eine wachstuminduzierende Wirkung – hier gezeigt an der GAP43-Expression und der Axonlänge. Die extrem stark herunterregulierten Axonlängen in letrozolbehandelten Kulturen weisen auf die enorme Bedeutung des endogenen Estradiols und damit der Aromatase für das Wachstum von Neuronen hin.

Die hier zusätzlich gezeigten Effekte des exogenen Estradiols auf das Axonwachstum zeigen wiederum, dass die Zusammenhänge und Mechanismen der cerebralen Estradiolwirkung sehr komplex sind, sodass hier weitere Arbeiten in diesem Zusammenhang nötig sind – nicht nur, um eventuell Therapien für neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Krankheitsbilder des epileptischen und schizophrenen Formenkreises) entwickeln zu können, sondern auch um die Bedeutung der endogenen hippocampalen Estradiolsynthese und der cerebralen Aromatase differenziert von der des peripheren Estradiols zu verstehen.

VI. Zusammenfassung

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass Estradiol im Hippocampus neuronale Plastizität beeinflusst und außerdem in einigen cerebralen Abschnitten entscheidend für die Entwicklung ist. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass hippocampale Neurone Estradiol *de novo* synthetisieren. Das *growth-associated protein* GAP43 ist ein axonspezifisches wachstumassoziiertes Protein, welches vor allem im *growth cone* des Axons exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Estradioleffekte auf die GAP43-Expression und die Axonlänge hippocampaler Neurone der neonatalen Ratte in Dispersionskulturen untersucht. Dazu wurden hippocampale Dispersionskulturen mit Estradiol, Letrozol (Aromataseinhibitor), welches die hippocampale Estradiolsynthese zum Erliegen bringt, oder ICI 182,780 (Fulvestrant, Estradiolrezeptor-Antagonist) behandelt. Zusätzlich wurde die Proliferationsrate der Kulturen unter Einfluss der Antiöstrogene Letrozol und ICI 182,780 verglichen.

Die Untersuchungen zeigten eine signifikante Abnahme der GAP43-Expression und Axonlänge unter Letrozol- und ICI 182,780-Einfluss. Ebenso signifikante Effekte zeigte Estradiol, indem es die GAP43-Expression und die Axonlänge heraufregulierte. Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl endogen hippocampal synthetisiertes Estradiol als auch exogenes (z. B. ovariell) Estradiol das GAP43-vermittelte Axonwachstum reguliert und somit Estradiol und das Enzym Aromatase existenziell für hippocampale Neurone sind. Die Estradioleffekte auf Axonlänge und GAP43-Expression werden über Estradiolrezeptoren vermittelt, da unter ICI 182,780-Behandlung die beschriebenen Estradiolwirkungen nicht mehr zu erzielen sind.

Durch Letrozol konnte eine extreme Abnahme der Proliferationsrate der Zellen erreicht werden, was erstaunlicherweise unter ICI 182,780-Einfluss nicht zu beobachten war. Dies weist neben den bekannten Estradiolrezeptoren auf die Existenz eines weiteren Signalweges für die Estradiolwirkungen hin.

VII. Literaturverzeichnis

VII. 1. Wissenschaftliche Publikationen

Aigner L, Caroni P (1993)

Depletion of 43-kD Growth-associated Protein in Primary Neurons Leads to Diminished Formation and Spreading of Growth Cones. *J Cell Biol* 123: 417-429

Amateau SK, McCarthy MM (2002)

A Novel Mechanism of Dendritic Spine Plasticity Involving Estradiol Induction of Prostaglandin-E₂. *J Neurosci* 22: 8586-8596

Azcoitia I, DonCarlos LL, Garcia-Segura LM (2002)

Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res* 4: 235-245

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM (2001)

Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47: 318-329

Bagri A, Gurney T, He X, Zou Y, Littman DR, Tessier-Lavigne M, Pleasure SJ (2002)

The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development* 129: 4249-4260

Baulieu EE (1997)

Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog in Horm Res* 52: 1-32

Behl C, Manthey D (2000)

Neuroprotective Activities of Estrogen: an Update. *J Neurocytol* 29: 351-358

Benowitz LI, Routtenberg A (1997)

GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20: 84-91

Beyer C (1999)

Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol* 199: 379-390

Brewer GJ (1997)

Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 71: 143-155

Brito VI, Carrer HF, Cambiasso MJ (2004)

Inhibition of tyrosine kinase receptor type B synthesis blocks axogenic effect of estradiol on rat hypothalamic neurones in vitro. *Eur J Neurosci* 20: 331-337

- Cambiasso MJ, Colombo JA, Carrer HF (2000)
Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur J Neurosci* 12: 2291-2298
- Carrer HF, Cambiasso MJ, Brito V, Gorosito S (2003)
Neurotrophic Factors and Estradiol Interact To Control Axogenic Growth in Hypothalamic Neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 306-316
- Chambers JS, Thomas D, Saland L, Neve RL, Perrone-Bizzozero NI (2005)
Growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin alterations in the dentate gyrus of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 283-290
- Chirwa S, Aduonum A, Pizarro J, Reasor J, Kawai Y, Gonzales M, McAdory BS, Onaivi E, Barea-Rodriguez EJ (2005)
Dopaminergic DA₁ signaling couples growth-associated protein-43 and long-term potentiation in guinea pig hippocampus. *Brain Res Bull* 64: 433-440
- Cho JJ, Iannucci FA, Fraile M, Franco J, Alesius TN, Stefano GB (2003)
The role of the estrogen in neuroprotection: implications for neurodegenerative diseases. *Neuro Endocrinol Lett* 24: 141-147
- Dekker LV, de Graan PN, Versteeg DH, Oestreicher AB, Gispen WH (1989)
Phosphorylation of B-50 (GAP43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 52: 24-30
- Dominguez R, Jalali C, de Lacalle S (2004)
Morphological Effects of Estrogen on Cholinergic Neurons in Vitro Involves Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases. *J Neurosci* 24: 982-990
- Donovan SL, Mamounas LA, Andrews AM, Blue ME, McCasland JS (2002)
GAP-43 Is Critical for Normal Development of the Serotonergic Innervation in Forebrain. *J Neurosci* 22: 3543-3552
- Duzel E, Kaufmann J, Guderian S, Szentkuti A, Schott B, Bodammer N, Hopf M, Kanowski M, Tempelmann C, Heinze HJ (2004)
Measures of hippocampal volumes, diffusion and 1H MRS metabolic abnormalities in temporal lobe epilepsy provide partially complementary information. *Eur J Neurol* 11: 195-205
- Dyer CA, Hickey WF, Geisert Junior EE (1991)
Myelin/ oligodendrocyte-specific protein: a novel surface membrane protein that associates with microtubules. *J Neurosci Res* 28: 607-613
- Farach-Carson MC, Davis PJ (2003)
Steroid Hormone Interactions with Target Cells: Cross Talk between Membrane and Nuclear Pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 839-845

- Ferreira A, Busciglio J, Caceres A (1987)
An immunocytochemical analysis of the ontogeny of the microtubule-associated proteins MAP-2 and Tau in the nervous system of the rat. *Brain Res* 431: 9-31
- Ferrini M, Bisagno V, Piroli G, Grillo C, Deniselle MC, de Nicola AF (2002)
Effects of estrogens on choline-acetyltransferase immunoreactivity and GAP-43 mRNA in the forebrain of young and aging male rats. *Cell Mol Neurobiol* 22: 289-301
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M, Rune GM (2006)
Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells requires local estrogen synthesis. *J Neurochem* (im Druck)
- Fitzparick JL, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM (2002)
Estrogen-mediated neuroprotection against β -amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor α or β and activation of MAPK pathway. *J Neurochem* 82: 674-682
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998)
Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Transcripts Constitutively Expressed in the Adult Rat Central Nervous System: Colocalization of StAR, Cytochrome P-450_{scc} (CYP XIA1), and 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Rat Brain. *J Neurochem* 71: 2231-2238
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001)
Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60
- K. Goslin, G. Banker (1989)
Experimental Observations on the Development of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture. *J Cell Biol* 108: 1507-1516
- Goslin K, Banker G (1990)
Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal development and under experimental conditions. *J Cell Biol* 110: 1319-1331
- Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G (1988)
Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature*, 336: 672-674
- Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G (1990)
Changes in the distribution of GAP-43 during the development of neuronal polarity. *J Neurosci* 10: 588-602
- Harrison PJ, Law AJ, Eastwood SL (2003)
Glutamate Receptors and Transporters in the Hippocampus in Schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 94-101
- He Q, Dent EW, Meiri KF (1997)
Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J Neurosci* 17: 3515-3524

- Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H, Mukai H, Morrison JH, Janssen WGM, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004)
Adult male rat hippocampus synthesizes Estradiol from pregnolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 865-870
- Howell A, Robertson JFR, Quaresma Albano J, Aschermannova A, Mauriac L, Kleeberg UR, Vergote I, Erikstein B, Webster A, Morris C (2002)
Fulvestrant, Formerly ICI 182,780, Is as Effective as Anastrozole in Postmenopausal Woman With Advanced Breast Cancer Progressing after Prior Endocrine Treatment. *J Clin Oncol* 16: 3396-3403
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret P (2004)
Expression of neurogranin und neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res Mol Brain Res* 123: 7-17
- Jacobs KM, Neve RL, Donoghue JP (1993)
Neocortex and hippocampus contain distinct distributions of calcium-calmodulin protein kinase II and GAP43 mRNA. *J Comput Neurosci* 336: 151-160
- Jareb M, Banker G (1997)
Inhibition of axonal growth by Brefeldin A in hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 17: 8955-8963
- Jensen MB, Finsen B, Zimmer J (1997)
Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with blood-brain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol* 143: 103-116
- Kadish I, van Groen T (2002)
Low Levels of Estrogens Significantly Diminish Axonal Sprouting after Entorhinal Cortex Lesions in the Mouse. *J Neurosci* 22: 4095-4102
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004)
Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *J Neurosci* 24: 5913-5921
- Kurz JE, Rana A, Parsons JT, Churn SB (2003)
Status epilepticus-induced changes in the subcellular distribution and activity of calcineurin in rat forebrain. *Neurobiol Dis* 14: 483-493
- Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D, Caroni P (2000)
GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P₂ at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* 149: 1455-1471
- Lee SJ, McEwen B (2001)
Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 569-591

- Liu HX, Zhang JJ, Zheng P, Zhang Y (2005)
Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Brain Res Mol Brain Res* 139: 169-177
- Martin ED, Pozo MA (2003)
Valproate suppresses status epilepticus induced by 4-aminopyridine in CA1 hippocampus region. *Epilepsia*, 44: 1375-1379
- McEwen B (2002)
Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57: 357-384
- Meiri KF, Saffell JL, Walsh FS, Doherty P (1998)
Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) phosphorylation in growth cones. *J Neurosci* 18: 10429-10437
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA (2001)
Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev*, 37: 3-12
- Murphy DD, Cole NB, Greenberger V, Segal M (1998)
Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 2550-2559
- Murphy DD, Segal M (1996)
Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16: 4059-4068
- Nathan BP, Barsukova AG, Shen F, McAsey M, Struble RG (2004)
Estrogen Facilitates Neurite Extension via Apolipoprotein E in Cultured Adult Mouse Cortical Neurons. *Endocrinology* 145: 3065-3073
- Nelson RB, Routtenberg A (1985)
Characterization of protein F1 (47 kDa, 4.5 pI): a kinase C substrate directly related to neural plasticity. *Exp Neurol* 89: 213-224
- Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD (1999)
Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca^{2+} transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* 81: 1404-1411
- Prange-Kiel J, Rune GM, Leranath C (2004)
Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats. *Eur J Neurosci* 19: 309-317
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003)
Para/autocrine regulation of estrogen receptor in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13: 184-192

Prevot V, Bouret S, Croix D, Alonso G, Jennes L, Mitchel V, Routtenberg A, Beauvillain JC (2000)

Growth-associated protein-43 messenger ribonucleic acid expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 141: 1648-1657

Raff MC, Fields KL, Hakomori SI, Mirsky R, Pruss RM, Winter J (1979)

Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res* 174: 283-308

Rekart JL, Meiri K, Routtenberg A (2005)

Hippocampal-Dependent Memory Is Impaired in Heterozygous GAP-43 Knockout Mice. *Hippocampus* 15: 1-7

Revankar CM, Cimino FC, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005)

A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signalling. *Science* 307: 1625-1630

Rosner H, Vacun G (1999)

1,2-dioctanoyl-s,n-glycerol-induced activation of protein kinase C results in striking, but reversible growth cone shape changes and an accumulation of f-actin and serine 41-phosphorylated GAP-43 in the axonal process. *Eur J Cell Biol* 78: 698-706

Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002)

Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113: 167-175

Sanes JR, Lichtman JW (1999)

Can molecules explain long-term potentiation? *Nat Neurosci* 2: 597-604

Saunders-Pullman R (2003)

Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both? *Endocrine* 21: 81-87

Schmoll H, Ramboiu S, Platt D, Herndon JG, Kessler C, Popa-Wagner A (2005)

Age Influences the Expression of GAP-43 in the Rat Hippocampus following Seizure. *Gerontology* 51: 215-224

Shughrue PJ, Dorsa DM (1993)

Estrogen modulates the growth-associated protein GAP-43 (Neuromodulin) mRNA in the rat preoptic area and basal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 57: 439-447

Shughrue PJ, Dorsa DM (1993)

Gonadal steroids modulate the growth-associated protein GAP-43 (neuromodulin) mRNA in postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 73: 123-132

Shughrue PJ, Dorsa DM (1994)

Estrogen and androgen differentially modulate the growth-associated protein GAP-43 (Neuromodulin) messenger ribonucleic acid in postnatal rat brain. *Endocrinology* 134: 1321-1328

- Singer CA, Pang PA, Dobie DJ, Dorsa DM (1996)
Estrogen increases GAP-43 (Neuromodulin) mRNA in the preoptic area of aged rats. *Neurobiol Aging* 17: 661-663
- Smith IE (1999)
Aromatase inhibitors: a dose-response effect? *Endocr Relat Cancer* 6: 245-249
- Spiers HJ, Maguire EA, Burgess N (2001)
Hippocampal amnesia. *Neurocase* 7: 357-382
- Stoffel-Wagner B (2001)
Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145: 669-679
- Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM (2003)
Signaling Pathways of Apoptosis by Aromatase Inhibitors and Antiestrogens. *Cancer Res* 63: 8037-8050
- Tolner EA, van Vliet EA, Holtmaat AJGD, Aronica E, Witter MP, Lopes da Silva F, Gorter JA (2003)
GAP-43 mRNA and protein expression in the hippocampal and parahippocampal region during the course of epileptogenesis in rats. *Eur J Neurosci* 17: 2369-2380
- van Hooff COM, Holthuis JCM, Oestreicher AB, Boonstra J, de Graan PNE, Gispen WH (1989)
Nerve Growth Factor-induced Changes in the Intracellular Localization of the Protein Kinase C Substrate B-50 in Pheochromocytoma PC12 Cells. *J Cell Biol* 108: 1115-1125
- van Lookeren Campagne M, Dotti CG, Jap Tjoen San ER, Verkleij AJ, Gispen WH, Oestreicher AB (1992)
B-50/GAP43 localization in polarized hippocampal neurons in vitro: an ultrastructural quantitative study. *Neuroscience* 50: 35-52
- van Lookeren Campagne M, Oestreicher AB, van Bergen en Henegouwen PM, Gispen WH (1990)
Ultrastructural double localization of B-50/GAP43 and synaptophysin (p38) in the neonatal and adult rat hippocampus. *J Neurocytol* 19: 948-961
- Veiga S, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2003)
Neuroprotection by the steroids pregnolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. *J Neurobiol* 56: 398-406
- Walters MR, Nemere I (2004)
Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci* 61: 2309-2321
- Wang Y, Lu G, Li L, Han Z, Yang M, Huang T (2005)
Effects of neural stem cells transplantation on glial cell line-derived neurotrophic factor and growth associated protein 43 after spinal cord injury in rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 19: 416-419

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

Yokomaku D, Numakawa T, Numakawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Adachi N, Nishio C, Taguchi T, Hatanaka H (2003)
Estrogen Enhances Depolarization-Induced Glutamate Release through Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase in Cultured Hippocampal Neurons. *Mol Endocrinol* 17: 831-844

Zwain IH, Yen SSC (1999)
Neurosteroidogenesis in Astrocytes, Oligodendrocytes, and Neurons of Cerebral Cortex of Rat Brain. *Endocrinology* 140: 3843-3852

VII. 2. Ergänzende Fachliteratur

Berg JM, Biochemistry. 5th Edition, 2002, W. H. Freeman and Company, New York

Böcker W, Pathologie. 2. Aufl., 2001, Urban & Fischer, München

Claasen M, Innere Medizin. 5. Aufl., Urban & Fischer, München

Löffler G, Biochemie & Pathobiochemie. 7. Aufl., 2003, Springer, Berlin

Mutschler E, Arzneimittelwirkungen. 8. Aufl., 2001, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Purves D, Neuroscience. 1st Edition, 1997, Sinauer Associates Inc., Sunderland

Rang HP, Pharmacology. 5th Edition, 2003, Churchill Livingstone, Edinburgh

Steward O, Functional Neuroscience. 1st Edition, 2000, Springer, New York

VIII. Danksagung

Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune gab mir im Rahmen dieser Doktorarbeit die Möglichkeit, in ihrer Forschergruppe experimentell zu arbeiten. Ihr gilt mein besonderer Dank für die Formulierung des Themas und die vielen Gespräche, die mir einerseits wertvolle Denkanstöße gaben und mich andererseits aus einigen „geistigen Sackgassen“ retteten. Auch möchte ich mich für ihre nette aufgeschlossene Art bedanken, die mir ebenso bei den weiteren Mitarbeitern in ihrem Institut begegnete: Herr Diplom-Humanbiologe Lars Fester stand mir immer mit außerordentlichem Engagement durch Rat und Tat zur Seite, half mir über viele Hindernisse – besonders im Bereich der Primärkulturen – hinweg und bewahrte mich so vor allem anfangs vor der ein oder anderen Verzweiflung.

Auch Herrn PD Dr. Uwe Wehrenberg möchte ich für seinen steten fachlichen Beistand und die Geduld bei seinen Erklärungen im Rahmen meiner ersten Tage im Labor danken. Frau PD Dr. Janine Prange-Kiel danke ich für ihre Unterstützung und ihre wertvollen Ratschläge bei der Auswertung der Immuncytochemien mit dem Programm Improvision. Den weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern, Herrn Dr. Lepu Zhou und Frau Diplom-Humanbiologin Nadine Lehan, danke ich für die vielen netten gemeinsamen Arbeitsstunden und Gespräche, die das sehr gute Arbeitsklima in Frau Prof. Runes Institut widerspiegeln.

Auf keinen Fall vergessen möchte ich Frau Herdis Hamann, die mir nicht nur mit ihrem ständigen technischen Rat half, sondern auch durch ihre heitere Art etliche Stunden im Labor wie im Fluge vergehen ließ, und Frau Sonja Gelhaar, die sowohl durch ihr organisatorisches Talent die Arbeit im Institut erheblich erleichterte, als auch durch ihr sympathisches Wesen die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe unterstützte. Auch den weiteren medizinisch-technischen Assistenten, Frau Helga Herbort und Frau Meike Köhler, möchte ich für ihre Hilfe danken. Die lange Dankesliste symbolisiert die ausgezeichnete Betreuung, die mir während meiner Tätigkeit in Frau Prof. Runes Institut widerfuhr.

Weiterhin danke ich Herrn cand. med. C. Benedikt Westphalen und Herrn cand. med. Jan K. Hennigs für einige gute Ratschläge und Hinweise, Herrn cand. pharm. Paul W. Elsinghorst für die Bereitstellung der 3D-Strukturformeln und Herrn cand. med. dent.

Sebastian P. Trost für seine moralische Unterstützung und technische Assistenz.

Außerdem möchte ich meinem Vater Kurt – dem ich für das Korrekturlesen der Arbeit danke – und meiner Mutter Marion und deren Partnern sowie natürlich meiner lieben Schwester Ann-Katrin und meiner weiteren Verwandtschaft danken, dass sie meist sehr verständnisvoll auf die langen Phasen fehlender Anrufe und Besuche meinerseits nicht nur während meines Studiums sondern verstärkt auch während meiner Doktorarbeit reagiert haben.

Last but not least danke ich der Bundeswehr, die mir durch die finanzielle Unterstützung während meines Studiums im Rahmen meiner Tätigkeit als Sanitätsoffizieranwärter zeitliche Freiräume schuf, sodass ich Studium und Dissertation auf einem Niveau gestalten konnte, das mir andernfalls nicht möglich gewesen wäre.

IX. Lebenslauf

Vor- und Familienname: Christian von Schassen
Familienstand: ledig
derzeitige Anschrift: Fruchttallee 136 in 20259 Hamburg
Geburtstag und -ort: 12. November 1980 in Stade, Niedersachsen
Name des Vaters: Kurt Bernhard von Schassen (Beruf: Lehrer/ Konrektor)
Geburtsname der Mutter: Marion Magda Inge von Allwörden (Beruf: Bankkauffrau)
Geschwister: Ann-Katrin, geboren am 23. August 1991
Schulbildung: 1987-1991 Grundschule Bützfleth
1991-1993 Orientierungsstufe Camper Höhe/ Stade
1993-2000 Vincent-Lübeck-Gymnasium/ Stade
Schulabschluss: Abitur (Note: 1,8)
Berufsausbildung: seit 01. Juli 2000 Zeitsoldat bei der Bundeswehr, Offizierlehrgang
im November/ Dezember 2000, April 2001 bis Juni 2007 Studium,
aktueller Dienstgrad: Stabsarzt
Studium: April 2001 bis Juni 2007 Studium der Humanmedizin am
Universitätsklinikum Eppendorf/ Hamburg
Examina: Vorärztliche Prüfung (Physikum) im März 2003 (Note: 2)
2. Staatsexamen nach neuer Approbationsordnung im Juni 2007
(Note: 1)
Krankenpflegepraktika: 12. - 30. Januar 1998 im Elbe-Klinikum Stade (Chirurgie)
11. Februar - 25. März 2002 im Bundeswehrkrankenhaus (Bwk)
Hamburg (Innere Medizin)
Famulaturen: 21. Juli - 25. August 2003 im Bwk Hamburg (Truppenarzt)
26. August - 25. September 2003 im Universitätsklinikum
Eppendorf/ Hamburg (Labormedizin)
11. Februar - 10. März 2004 im Bwk Hamburg (Innere Medizin)
26. Juli - 24. August 2004 im Facharztzentrum München des Bwk
Amberg (Chirurgie)
18. Juli - 16. August 2005 im Bwk Hamburg (Chirurgie)
Veröffentlichungen: Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C,
Böttner M, Rune GM (2006)
Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells requires
local estrogen synthesis. J Neurochem 97: 1136-1144
von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C,
Böttner M, Rune GM (2006)
Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth.
J Neuroendocrinol 18: 847-856
Vorträge: 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie
und Neuroanatomie in Graz/ Österreich (6. Oktober 2005):
Fester L, von Schassen C, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J,
Lohse C, Huber C, Rune GM
Neuroprotective effects in hippocampal neurons vary with
estrogen concentrations.

X. 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.

gez. Christian von Schassen