

Aus der Abteilung Anatomie I:  
Zelluläre Neurobiologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

Direktorin Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune

# **Einfluss verschiedener Metaboliten der Steroidbiosynthese auf die Expression von Synaptophysin und Spinophilin im Hippocampus der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Andrea Bütow

aus Barth

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 10.12.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. Jörg Heeren

**Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1 Der Hippocampus	5
2.2 Synaptophysin und Spinophilin	7
2.3 Cholesterol	8
2.4 Östrogen-Synthese und Wirkungsweise	9
2.5 Hemmung der Östrogen-Synthese	10
2.6 Fragestellung	11
<b>3. Material, Geräte, Chemikalien und Lösungen</b>	<b>12</b>
3.1 Material und Geräte	12
3.2 Chemikalien	13
3.3 Lösungen	14
<b>4. Methoden</b>	<b>16</b>
4.1 Hippocampale Dispersionskultur	16
4.1.1 Präparation des Hippocampus aus der Ratte	16
4.1.2 Dispersionskultur neuronaler Zellen	16
4.1.3 Inhibition und Stimulation	17
4.1.4 Fixierung der Kultur	17
4.1.5 Immunhistochemie	18
4.2 Mikroskopische Messung und Auswertung	18

---

<b>5. Ergebnisse</b>	19
5.1 Synaptophysin-Expression	19
5.1.1 Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Cholesterol und Mevastatin	19
5.1.2 Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Testosteron und Trilostan	20
5.1.3 Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Östrogen und Letrozol	22
5.1.4 Zusammenfassung der Synaptophysin-Daten	23
5.2 Spinophilin-Expression	25
5.2.1 Spinophilin-Expression unter Einfluss von Cholesterol und Mevastatin	25
5.2.2 Spinophilin-Expression unter Einfluss von Testosteron und Trilostan	26
5.2.3 Spinophilin-Expression unter Einfluss von Östrogen und Letrozol	28
5.2.4 Zusammenfassung der Spinophilin-Daten	29
<b>6. Diskussion</b>	31
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	38

## 1. Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
17 $\beta$ -HOR	17 $\beta$ -Hydroxysteroidoxidoreduktase
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase
Abb.	Abbildung
Aufl.	Auflage
aro	Aromatase
bFGF	Human FGF-basic
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA 1-3	Cornu ammonis 1-3
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Chol	Cholesterol
°C	Grad Celsius
d. h.	das heißt
E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor Alpha
ER $\beta$	Östrogenrezeptor Beta
GFAP	glial-fibrillary acid protein als Astrozytenmarker
HCl	Salzsäure
HMG-CoA	Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA-Reduktase
kBp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
Let	Letrozol
LTP	long term potentiation
M	Molar
MAP-2	microtubule-associated protein-2 als neuronaler Marker

---

MEM	minimal essential medium
Meva	Mevastatin
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NGS	normal goat serum
nM	Nanomolar
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyd
pg	Picogramm
RT	Raumtemperatur
sog.	so genannte
StAR	Steroidogenetic Acute Regulatory Protein
Test	Testosteron
Tril	Trilostan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü. N.	über Nacht
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 2. Einleitung

Die Gonaden stellen die Hauptquelle der Sexualhormone dar, deren Effekte hauptsächlich endokrin reguliert werden und ihre Ziele über Plasmatransport erreichen. Die für die Östrogen-Synthese benötigten Enzyme sind aber auch in den hippocampalen Neuronen des Gehirns vorhanden (Furukawa et al., 1998; Wehrenberg et al., 2001) und Östrogen wird in diesen produziert und freigesetzt (Prange-Kiel et al., 2003). Östrogen-Wirkungen innerhalb des Gehirns sind in zahlreichen Studien beschrieben (Beyer, 1999). Aufgrund ihrer Bedeutung für die neuronale und synaptische Plastizität sind sie zunehmend zum Gegenstand neuroanatomischer Forschungen geworden. Die Tatsache, dass hippocampale Neurone fähig sind, selbst Östrogene zu bilden, begründet die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieses endogenen Steroids. Die neuroprotektive Funktion von Östrogen wurde besonders im Kontext mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen demonstriert. Östrogene sollen das Risiko einer Alzheimer-Erkrankung mindern und das Auftreten einer Demenz verzögern bzw. hemmen (Garcia-Segura et al., 2001). In Hinblick auf eine Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass das Gehirn die Östrogen-Synthese und Östrogen-Rezeptorexpression im Falle einer Verletzung reguliert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die lokale Östrogen-Synthese eine große Bedeutung für die Regeneration traumatischer neuronaler Verletzungen hat (Azcoita et al., 2002; Vaiga et al., 2003). Auch die Aromatase, ein Enzym, das Testosteron in Östrogen umwandelt und somit den Endschritt der Östrogen-Synthese darstellt, wird nach Gehirnläsionen vermehrt gebildet. Die Induktion dieses Enzyms im Gehirn repräsentiert möglicherweise ein neues Ziel für therapeutische Ansätze bei neurodegenerativen Krankheiten.

An zentraler Stelle steht bei der Beschreibung der protektiven Östrogen-vermittelten Effekte die Wirkung des Steroids auf die synaptische Plastizität im Hippocampus (Woolley und McEwen, 1992; McEwen, 2002). Nach Östrogen-Applikation wurde eine Zunahme der Spines an den apikalen Dendriten der CA1- Pyramidenzellen sowie eine Erhöhung synaptischer Proteine und Förderung der Synaptogenese nachgewiesen.

### 2.1 Der Hippocampus

Der Hippocampus liegt in der Tiefe der medialen Fläche des Temporallappens. Im Gegensatz zum Menschen befindet sich der Hippocampus der Ratte weiter oberhalb, links und rechts des Balkens und dicht unter dem Kortex. Die mikroskopische Struktur ist der des Menschen ähnlich. Man erkennt die Regionen des Gyrus dentatus (DG) und der Pyramidenzellschicht CA1-CA3. (Abb.1)

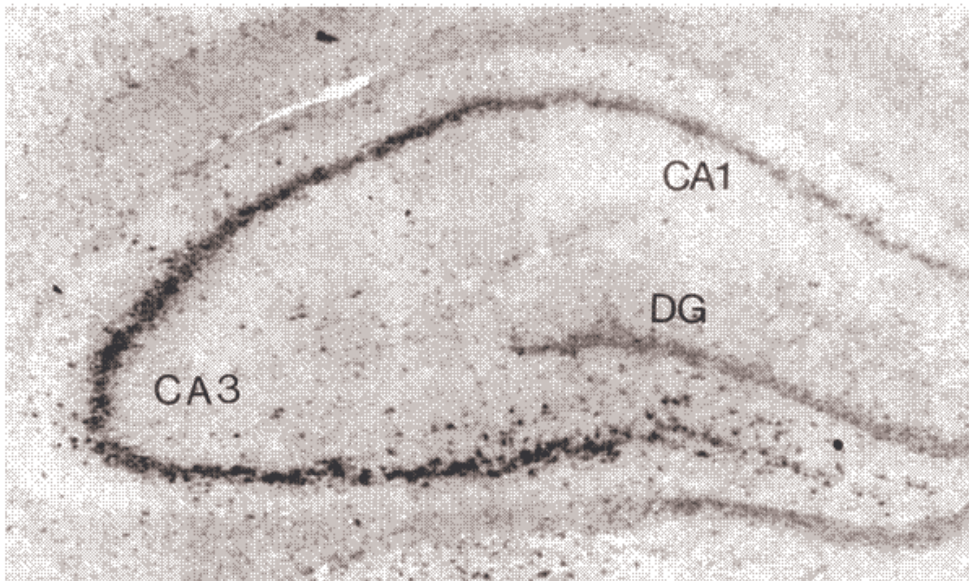


Abb. 1 Hippocampus einer adulten Ratte; in situ-Hybridisierung von ER $\alpha$   
Rune et al., 2002

CA1 enthält vorherrschend kleine Pyramidenzellen. Das Feld CA2 zeichnet sich durch große Pyramidenzellen aus, die ein dichtes, schmales Band bilden. An diesem schließt sich die CA3-Stratum pyramidale Region an, welche durch eine lockere Anordnung großer Pyramidenzellen gekennzeichnet ist. Diese Struktur des Ammonshorns setzt sich fort und bildet den aufgelockerten Abschluss. Das schmale Band dicht gepackter Körnerzellen des Gyrus dentatus umgreift das auslaufende Pyramidenzellband. Die Pyramidenzellen bilden das Stratum Pyramidale, das innen vom Stratum molekulare und außen vom Stratum oriens begrenzt wird. Afferenzen erhält der Hippocampus aus der Regio entorhinalis. Über diese fließen dem Hippocampus Impulse aus dem Riechhirn, Corpus amygdaloideum und Neokortex zu. Weiterhin enden afferente Fasern aus dem Thalamus, Gyrus cinguli und dem Septum im Hippocampus. Die Efferenzen verlaufen im Fornix, der auf seinem Weg Faserzüge an das Septum, Corpus amygdaloideum und dem Hypothalamus abgibt und mit seinem Hauptteil in den Corpora mamillaria endet. Es bildet sich hierbei der sog. *Papez-Neuronenkreis*. Der Hippocampus projiziert über den Fornix in die Corpora mamillaria, diese in den Nucleus anterior des Thalamus, der wiederum in den Gyrus cinguli. Dieser sendet Fasern zurück zum Hippocampus, so dass sich der Kreis schließt. Vor dem Verlassen des Hippocampus geben die Pyramidenzellaxone der CA3-Region Kollateralen ab, die sog. Schaffer-Kollateralen, die an den Dendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region enden.



Zelluläre und molekulare Grundlagen von Lern- und Gedächtnisprozessen im Gehirn von Säugetieren sind in ersten Ansätzen verstanden. Während zur Kurzspeicherung keine großen Umstrukturierungen stattfinden müssen, verändern sich bei der Etablierung des Langzeitgedächtnisses sowohl die Anzahl der Synapsen als auch das Muster der dendritischen Verzweigungen. Der Hippocampus spielt eine entscheidende Rolle für das Gedächtnis, das Verhalten sowie emotionale und vegetative Funktionen. Für die Gedächtnisfunktion des Hippocampus ist das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) von großer Bedeutung. Nach erneuter aber gleichstarker Stimulation der CA1-Pyramidenzellen fällt die Reizantwort intensiver aus und hält noch Wochen an. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei der Aufrechterhaltung der LTP neue Synapsen entstehen und so funktionelle in strukturelle Veränderungen übersetzt werden können. Die Langzeitpotenzierung ist demnach Ausdruck synaptischer Plastizität, die das Langzeiterinnerungsvermögen initiiert und die Antwortfähigkeit der Synapsen auf Signale vergrößert.

## **2.2 Synaptophysin und Spinophilin**

Bei der Signalübertragung von Neuron zu Neuron wird die Information durch meist niedermolekulare chemische Verbindungen übermittelt. In der präsynaptischen Nervenendigung finden sich neben Mitochondrien in großer Anzahl Vesikel, die mit Neurotransmitter gefüllt sind. Die Depolarisation der präsynaptischen Nerven führt zur Freisetzung der Neurotransmitter durch Exozytose. Im synaptischen Spalt werden schnell hohe Konzentrationen des Neurotransmitters erreicht, der an entsprechende Rezeptoren der postsynaptischen Membran bindet. Somit wird die Erregung weitergeleitet.

Synaptophysin ist ein charakteristischer Bestandteil der Vesikelmembran und für das Anheften an die Plasmamembran notwendig (Brake et al., 2001; Tarsa und Goda, 2001). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 38 kDa und besitzt vier Transmembrandomänen. Die terminalen Amino- und Carboxylgruppen sind zur zytoplasmatischen Seite der Vesikel gerichtet, wodurch die zwei Schleifen des Proteins zur luminalen Seite der Vesikel zeigen. Jeder dieser Schleifen wird durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten stabilisiert. Während der Synaptogenese wird Synaptophysin in enormer Quantität exprimiert und ist eines der ersten Proteine, das sich in den Zellkulturen anreichert (Tarsa und Goda, 2001). Dieses für die synaptischen Vesikel essentielle Protein ermöglicht in sich entwickelnden Synapsen eine individuelle Anpassung an erhöhte und verminderte Transmitterfreisetzung. Synaptophysin wird als präsynaptischer Marker angesehen.

In den Neuronen des Hippocampus ist Spinophilin fast ausschließlich in den Spines der Dendriten lokalisiert und für die Bildung und Funktion der Spines verantwortlich (Allen et al., 1997; Feng et al., 2000; Hao et al., 2003; Muly et al., 2004). Deshalb kann Spinophilin als indirekter Marker für Spines betrachtet werden (Brake et al., 2001; Alves et al., 2002). Man geht davon aus, dass eine Veränderung der Spinophilin-Expression die veränderte Spine-Dichte widerspiegelt (Amateau and McCarthy, 2002). Spinophilin bündelt Actinfilamente und reguliert die Produktion von F-Actin, das für die Bildung, Aufrechterhaltung und Gestalt der Spines unerlässlich ist (Kaech et al., 2001). Außerdem bindet Spinophilin die katalytische Untereinheit von Protein-Phosphatase 1, einem Enzym, das die Aktivität verschiedener Ionenkanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren der dendritischen Spines reguliert.

Die im Zentrum unserer Untersuchungen stehenden Proteine sind mit Hilfe von spezifischen Antikörpern immunhistochemisch nachweisbar.

### 2.3 Cholesterol

Cholesterol ist ein essentieller Bestandteil der Zellmembran und liegt als ein sehr hydrophobes Molekül innerhalb der Lipiddoppelschicht. Es ist dabei nicht gleichmäßig in der Membran vorhanden, sondern verteilt sich auf ein Mosaik aus nebeneinander vorliegenden cholesterolreichen und -armen Domänen (Liscum und Munn et al., 1999). Cholesterol dient aber nicht nur der Aufrechterhaltung der Membranfluidität und gleichzeitigen Stabilisierung der Membranstruktur (Brown et al., 1998). Als Ausgangsstoff der Östrogen-Synthese ist Cholesterol von besonderer Bedeutung. Zelluläres Cholesterol wird in den Neuronen und Gliazellen hippocampaler Zellkulturen *de novo* aus Acetyl-CoA gebildet (Pfrieger, 2003).

Die Cholesterol-Synthese wird hauptsächlich auf der Stufe der  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) reguliert, dem Enzym, das die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt und Acetyl-CoA zu Mevalonsäure reduziert. Diese wird nach Phosphorylierung und Decarboxylierung zu Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat. Die Kondensation dieser Isoprene bewirkt die Entstehung von Isoprenoiden, die durch erneute Kondensation das aus 30 C-Atomen bestehende Squalen liefern. Letzteres wird cyclisiert und zu Cholesterol umgelagert. Eine Darstellung der Verteilung von Cholesterol ergab, dass in der Membran der synaptischen Vesikel mehr Cholesterol enthalten ist als in anderen intrazellulären Organellen (Yeagle, 1985; Schmitz et al., 2001). Dies lässt einen Zusammenhang zwischen Syntheseleistung von Vesikeln und Cholesterol-Konzentrationen vermuten.

Der neuronale Cholesterol-Metabolismus ist in Hinblick auf die Beeinflussung der Synaptogenese von besonderer Bedeutung. Neurone selbst produzieren genug Cholesterol, um wachsen und überleben, aber scheinbar zu wenig, um ausreichend synaptische Kontakte knüpfen zu können (Pfrieger, 2001). Gliazellen dagegen sollen Cholesterol im Überschuss bilden und die Nervenzellen damit beliefern. Es wurde gezeigt, dass Cholesterol die Synapsenbildung fördert (Mauch et al., 2001) und die Verfügbarkeit von Cholesterol das Ausmaß der Synaptogenese begrenzt. Demnach wird durch Störungen im Cholesterol-Stoffwechsel die Entwicklung und Funktion des Gehirns beeinträchtigt.

## 2.4 Östrogen-Synthese und Wirkungsweise

Die Steroidsynthese findet in verschiedenen Zellkompartimenten hippocampaler Neurone statt (Prange-Kiel et al., 2003). Der wichtigste Schritt ist die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon in den Mitochondrien durch eine Desmolase. Dazu wird Cholesterol von dem Trägerprotein *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) an die innere mitochondriale Membran transportiert (Sugawara et al., 1996), was zugleich den *rate limiting step* in der Östrogen-Synthese darstellt. Die meisten Enzyme der Steroidbiosynthese gehören zur Familie der Cytochrom-P450-Mischoxygenasen und katalysieren die verschiedenen Hydroxylierungen aus den Vorläufermolekülen. Das Pregnenolon verlässt das Mitochondrium und wird im Endoplasmatischen Retikulum, indem die folgenden enzymatischen Schritte ablaufen, durch das Enzym P450c-17 irreversibel in 17-Hydroxy-Pregnenolon und weiter in das Dehydroepiandrosteron (DHEA) umgewandelt. Das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase (17 $\beta$ -HOR) katalysiert den reversiblen Syntheseschritt vom DHEA zum Androstendion. Letzteres wird durch Reduktion der 17-Ketogruppe mit Hilfe der 3 $\beta$ -Hydrosteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) irreversibel in Testosteron überführt. 17 $\beta$ -HOR und 3 $\beta$ -HSD gehören nicht zur Gruppe der Cytochrom-P450-Enzyme. Der entscheidende Schritt ist nun die Aromatisierung von Testosteron und damit die Bildung von Östrogen. Die Cytochrom-P450aro (Aromatase) spaltet die Methylgruppe (C19) ab und aromatisiert Ring A.

Die klassische Wirkung der Östrogene erfolgt über intrazelluläre Rezeptoren. Die Bindung des steroidalen Signalmoleküls an den spezifischen zytoplasmatischen Rezeptor führt dessen Konformationsänderung herbei. Der durch Östrogen aktivierte Rezeptor wird in den Zellkern transloziert und fungiert dort als Transkriptionsfaktor (Klinge, 2001). Die Bindung an die DNA regt spezifische DNA-Sequenzen an und damit die Änderung der Transkriptionsrate spezifischer Gene.

Im Hippocampus existieren die Östrogenrezeptor-Subtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$ , die sowohl in den Interneuronen (Weiland et al., 1997) als auch in den Neuronen der Pyramidenzellschicht und den Körnerzellen des Gyrus dentatus exprimiert werden (Shughrue and Merchenthaler, 2000, 2001; Wehrenberg et al., 2001; Rune et al., 2002). Die Neurone der CA3-Region stellen den Hauptangriffspunkt für Östrogen dar (Rune et al., 2002), denn die m-RNA-Expression von ER $\alpha$  und ER $\beta$  war in CA3 höher als in CA1. In mit Östrogen stimulierten hippocampalen Slicekulturen wurde nukleär der Anstieg von ER $\alpha$ , nicht aber von ER $\beta$  beobachtet. Im Vergleich dazu stellte man in hippocampalen Dispersionskulturen nach Östrogen-Stimulation das Ansteigen von ER $\alpha$  und gleichzeitig das Abfallen von ER $\beta$  fest (Prange-Kiel et al., 2003). Beide Rezeptor-Isoformen unterliegen scheinbar unterschiedlichen Regulationsmechanismen.

## 2.5 Hemmung der Östrogen-Synthese

Alle für die Östrogen-Synthese notwendigen Enzyme sind im Gehirn nachgewiesen (Funkawa et al., 1998; Wehrenberg et al., 2001; Stoffel-Wagner, 2001). Hippocampale Neurone sind in der Lage, Östrogen *de novo* zu synthetisieren (Prange-Kiel et al., 2003), wobei die Zellen der Dispersionskulturen unter steroid- und serumfreien Bedingungen kultiviert werden, um Wechselwirkungen mit darin enthaltenden Bestandteilen zu verhindern. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, die Östrogen-Synthese zu inhibieren. Man kann beispielsweise die Aktivität des Schlüsselenzyms (die HMG-CoA-Reduktase) und damit den ersten Schritt der Cholesterolsynthese blockieren. Der Gesamtgehalt der Zellen an Cholesterin nimmt ab und die Bereitstellung des Vorläufers aller Steroide wäre demnach nicht gewährleistet. Bei der Verstoffwechslung von Cholesterin zu Östrogen können verschiedene Enzyme, z. B. 3 $\beta$ -HSD gehemmt werden. StAR und Aromatase spielen in der Östrogen-Synthese eine Schlüsselrolle. Verhindert man die Aktivität von StAR durch Transfektion hippocampaler Neurone mit siRNA gegen StAR, wird der Transport von Cholesterin in das Mitochondrium unterbunden und die Metabolisierung von Cholesterin unmöglich. Die Aromatase synthetisiert Testosteron zu Estradiol und stellt den letzten Schritt der Östrogen-Synthese dar. Der Aromatase-Enzymkomplex ist im ganzen Körper des Menschen verbreitet, v. a. im Ovar, den Gonaden, im peripheren Gewebe, in der Muskulatur und dem Fettgewebe, aber auch im Gehirn. In hippocampalen Neuronen wurde Aromatase sowohl auf RNA-Ebene (Abdelgadir et al., 1994; Wehrenberg et al., 2001) als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen (Sanghera et al., 1991; Garcia-Segura et al., 1999, 2001).

Der Einsatz von Hemmstoffen der Aromatase-Reaktion verhindert die Bildung von Östrogen, was therapeutisch bei hormonabhängigen Formen des Mammacarcinoms ausgenutzt wird. Ein sehr potenter, reversibler und nicht-steroidaler Aromatasehemmer ist Letrozol, welches die Menge des zirkulierenden Estradiols reduziert (Foidart et al., 1995; Geisler et al., 2002). Dabei bindet Letrozol mit seiner hemmenden Untereinheit kompetitiv an dem Cytochrom-P450- Enzym. Im Vergleich zu anderen Inhibitoren der Steroidsynthese beeinträchtigt Letrozol die ER-Funktion nicht (Puddefoot et al., 2002; Prange- Kiel et al., 2003).

## 2.6 Fragestellung

Neurone produzieren *de novo* Östrogen. Die Inhibierung dieser Östrogen-Synthese zieht eine veränderte Expression von Synaptophysin und Spinophilin nach sich (Kretz et al., 2004). Nach Hemmung der Steroidsynthese durch den Aromatasehemmer Letrozol wurde die Herunterregulation beider Proteine und gleichzeitig eine verminderte Anzahl von Spine-Synapsen in hippocampalen Neuronen beobachtet (Kretz et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, wie spezifisch Östrogen als neuromodulatorische Substanz im Hippocampus fungiert und ob auch Vorläuferstufen der Östrogen-Synthese Einfluss auf die synaptische Plastizität haben. Zu diesem Zweck werden hippocampale Ratten-Dispersionskulturen mit Cholesterin und Mevastatin (Hemmer der Cholesterin-Synthese), Testosteron und Trilostan (Hemmer der  $3\beta$ -HSD) und Östrogen und Letrozol (Hemmer der Aromatase) behandelt. In den Kulturen werden immunhistochemisch das präsynaptische Markerprotein Synaptophysin und das postsynaptische Markerprotein Spinophilin nachgewiesen.

### 3. Material, Geräte, Chemikalien und Lösungen

#### 3.1 Material und Geräte

Adhäsions Objektträger, Histobond	MARIENFELD
Aluminiumfolie	LAGER UKE
Brutschrank WTC	BINDER
Cutfix Surgical Disposable Skalpell	BRAUN
Deckgläser, 21x26 mm	MARIENFELD
Deckgläser, 24x60 mm	MARIENFELD
Einmalspritzen, verschiedene Größen	BRAUN
ep T.I.P.S. Standard 500-1000 µl	EPPENDORF AG
Falcon Cell Stainer, 40 µm Nylon	BECTON DICKINSON
Falcon Tissue Cultur Platte, 24 well	BECTON DICKINSON
Falcon Tubes, 15 ml, 50 ml	BECTON DICKINSON
Gefrierschrank, -25°C, -80°C	LIEBHERR
Handschuhe	KIMBERLY-CLARK
Heidemannspatel M	AESCLAP DE
Hettrich Zentrifuge, EBA 1R	HETTRICH
Hettrich Zentrifuge, Universal 32R	HETTRICH
Instrumentenkasten	MERCK
Kühlschrank, 4°C	BOSCH
Mikroskop Axiovert 2	ZEISS
Mikroskopische Deckgläser, rund, Ø12 mm	ASSISTENT
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm <sup>2</sup>	BRAND GERMANY
Normal goat serum 2 % (NGS), S 2007	SIGMA
Pasteurpipetten, 25 cm	MERCK
Pinzette nach Dumont	MERCK
Pipettenspitzen	BECTON DICKINSON LABWARE
Reaktionsgefäße 3810X, 1,5 ml	EPPENDORF AG
Schere	AESCLAP DE
Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm	MERCK
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
Tissue Culture Dish, 35x10 mm	BECKTON DICKINSON

---

Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Waage	SATORIUS
Wasserbad mit Schüttler	GFC
Zellstofftücher	WEPA

### 3.2 Chemikalien

Albumine, Bovine, BSA, A 7906	SIGMA
Aqua ad iniectabilia, 1L	BAXTER Deutschland
B27 Supplement, 0578	GIBCO
BARRYCIDAL 36, Desinfektionsmittel	Helmut Schröder, Stuttgart
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	GIBCO
$\beta$ -Estradiol-Water-soluble, 100 mg, E 4389	SIGMA
Cholesterol, C 8667	SIGMA
Cy3, monoclonal, goat anti mouse, 67082	JACKSON
Cy3, polyclonal, goat anti rabbit, 63886	JACKSON
DAKO, S 3023	DAKO CYTOMATION
DAPCO, D 2522	SIGMA
DAPI	SIGMA
Ethanol, 70 %, 96 %	Apotheke UKE
Formaldehydlösung, 37 %	MERCK
2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin, C 0926	SIGMA
Letrozol	NOVARTIS
L-Glutamin, 200 mM, 67513	GIBCO
Mevastatin	SIGMA
Natronlauge	MERCK
Neurobasal A Medium 21969-035	GIBCO
Neurobasal A Medium ohne Phenolrot 12349-015	GIBCO
Penicillin/Streptomycin 15140-122	GIBCO
PBS Tabletten	GIBCO
Poly-d-Lysin, P-6407	SIGMA

---

Salzsäure, UN 1789	MERCK
Spinophilin, polyklonal, 27939	UPSTATE
Synaptophysin, monoklonal, 902322	CHEMICON
Testosteron, T 6147	SIGMA
Trilostan	BIOINVITATION; SANOFI
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	INVITROGEN
Trypsin/EDTA, L 2163	BIOCHROM

### 3.3 Lösungen

#### Beschichtung der Platten

- 600 µl Poly-d-Lysin (0,1 mg/ml Aqua dest.) pro Kavität
- 12 h inkubieren
- abpipettieren und mit Neurobasal A spülen (mit Phenolrotzusatz)
- mindestens 2 h trocknen lassen

#### bFGF

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

#### Cholesterol ansetzen

- 500 µg 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin ad 5 ml Aqua dest. lösen
- 100 mg Cholesterol in Cyclodextrinlösung auflösen

#### DABCO

- 50 % Glycerol in PBS
- 2,5 g DAPCO auf 10 ml Glycerol-PBS

#### Fixierung

- 5 ml Formaldehyd 37 %
- 45 ml PBS



**Kulturmedium für Dispersionskultur**

- 500 µl B27
- 125 µl L-Glutamin
- 500 µl Penicillin/Streptomycin
- 50 µl bFGF
- ad 50 ml Neurobasal A

**PBS**

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

## 4. Methoden

### 4.1 Hippocampale Dispersionskultur

#### 4.1.1 Präparation des Hippocampus aus der Ratte

In den Experimenten wurden 5 Tage alte Ratten des Zuchtstamms *WISTAR* verwendet. Die Präparation erfolgte unter semisterilen Bedingungen. Die Ratten wurden decapitiert und die Haut über der Schädelkalotte entfernt. Das Schädeldach wurde mit einer feinen geraden Schere median sagittal eröffnet, das freigelegte Gehirn vorsichtig mit Hilfe eines Heidemannspatels entnommen und auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt. Nach Entfernung von Kleinhirn und Hirnstamm mit einem Skalpell wurden beide Hemisphären voneinander getrennt. Aus den Hirnhälften wurden nun nacheinander die Hippocampi mit einem Heidemannspatel herausgeschält und auf gekühltes PBS gegeben.

#### 4.1.2 Dispersionskultur neuronaler Zellen

Der Präparation hippocampaler Dispersionskulturen diente die Methode von G. J. Brewer (Brewer, 1997). Einen Tag vor der Präparation wurde in jede Kavität einer 24 *well* Titerplatte ein Glasplättchen plaziert und anschließend für eine Stunde mit 600 µl Poly-d-Lysin beschichtet. Nach Absaugen des Poly-d-Lysins und Spülen jeder Kavität mit Neurobasal A verblieb die Titerplatte über Nacht zum Trocknen im Inkubator bei 37°C.

Die Weiterbehandlung der zuvor entnommenen Hippocampi fand unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank statt. Zur Entfernung überschüssigen Gewebes wurden die Hippocampi mehrmals mit PBS gespült, mit einer Klinge grob zerkleinert und in ein Falconröhrchen mit 25 ml PBS überführt. Diese Zellsuspension wurde bei 4°C mit 5000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert.

Der Überstand über dem Pellet wurde verworfen. Anschließend erfolgte der Verdau der extrazellulären Proteine. Dem Pellet fügte man 37°C vorgewärmtes Trypsin/EDTA (500 µl pro präpariertes Gehirn) hinzu und schüttelte die Zellsuspension alle 30 Sekunden. Nach zweieinhalb Minuten wurde der Verdau durch Zugabe von Neurobasal A gestoppt. Um unverdaute Bestandteile zurückzuhalten, filterte man die Zellsuspension über ein Nylon-Sieb (Cell Stainer, 40 µm) in ein neues Falconröhrchen. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 5000 U/min für fünf Minuten. Der Überstand wurde verworfen und durch Phenolrot-freies Neurobasal A Medium ersetzt. Erneut wurde bei 4°C mit 5000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes fügte man 20 ml Neurobasal A Medium (ohne Phenolrot) hinzu und bestimmte die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer.

Dies ist entscheidend für die spätere Zelldichte der Kultur. Auf die Poly-d-Lysin-beschichteten Deckgläschen wurde je 1 ml Zellsuspension (entspricht 100 000 Zellen) gegeben. In den Versuchen wurde immer mit einer Zelldichte von 100 000 Zellen/ml gearbeitet.

Für eine Stunde verblieben die Kulturplatten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. In dieser Zeit konnten sich die Zellen absetzen und hafteten nun an den Deckgläschen. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine neue Kulturplatte übertragen und jedem *well* 1 ml Kulturmedium mit 1 µl bFGF Wachstumsfaktor zugegeben. Der erste Wechsel des serum- und steroidfreiem Nährmediums erfolgte nach 24 Stunden und dann alle 48 Stunden. Nach vier Tagen Vorkultur begann die Stimulation der Zellen.

#### **4.1.3 Inhibition und Stimulation**

Die Zellen wurden nach der Vorkultur dreimal im Abstand von 48 Stunden stimuliert.

In den Versuchsansätzen wurden die neuronalen Zellen mit Cholesterol 10 µg/ml, Testosteron und 17β-Estradiol jeweils in einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M stimuliert. Zur Inhibition der Cholesterol-Synthese eignete sich Mevastatin 10<sup>-7</sup> M, das die Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) in der Cholesterol-Synthese hemmt. Anderen Dispersionskulturen wurde Trilostan 10<sup>-7</sup> M zugesetzt, um die Testosteron-Synthese zu inhibieren.

Die Hemmung der Aromatase in der Östrogen-Synthese erfolgte durch Letrozol in einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M. Unbehandelte Kontrollgruppen wurden jeweils nur mit neuem Kulturmedium versorgt. Während der Inkubationszeit befanden sich die Kulturplatten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **4.1.4 Fixierung der Dispersionskultur**

Nach Herstellung einer 3,7 prozentigen Formaldehydlösung wurde das Nährmedium aus jedem *well* vorsichtig abgesaugt und durch die Formaldehydlösung ersetzt. Zehn Minuten später wurde die Fixierung gegen PBS ausgetauscht und 3 x 5 min mit PBS gespült. Dem letzten Waschschrift folgte die Zugabe von 1 ml PBS in jede Kavität und die Lagerung der Kulturplatte im Kühlschrank bei 4°C.

#### 4.1.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erfolgte unter semisterilen Bedingungen. Zu Beginn mussten die fixierten Zellen 3 x 5 Minuten mit PBS gespült werden. Danach wurden die Kulturen mit NGS 2 % für 30 min bei RT blockiert, um unspezifische Reaktionen zu verhindern. Als Primär-Antikörper verwendete man Synaptophysin [monoklonal] im Verhältnis 1:1000 und Spinophilin [polyklonal] im Verhältnis 1:750. Der primäre Antikörper wurde in PBS gelöst und nach Absaugen der NGS-Lösung in jede Kavität gegeben. Die Inkubation der mit Parafilm verschlossenen Kultur erfolgte 24 Stunden ü. N. bei 4°C im Kühlschrank.

Am folgenden Tag wurde der Primär-Antikörper abgesaugt und die Kultur erneut 3 x 5 Minuten mit PBS gespült. Im nächsten Arbeitsschritt musste der Fluorochrom-markierte Sekundär-Antikörper in PBS gelöst und in jede Kavität überführt werden. Für Synaptophysin benutzte man den Cy3-markierten goat-anti-mouse-Antikörper und für Spinophilin den Cy3-markierten goat-anti-rabbit-Antikörper jeweils im Verhältnis 1:350. Die Inkubation dauerte eine Stunde und fand bei Raumtemperatur im Dunkeln statt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung entfernt und es folgten drei Spülschritte mit PBS. Für die Kernfärbung diente DAPI in einer Verdünnung von 1:100 000. Nach dreiminütiger Inkubation musste die Färbung entfernt und wieder gründlich (3 x 5min) gespült werden. Die Glasplättchen wurden auf einen Objektträger überführt, mit zwei Tropfen DAKO beschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt.

#### 4.2 Mikroskopische Messung und Auswertung

Die Intensitätsmessung der Immunhistochemie wurde mit Hilfe des LEICA *Laser Scanning Microscope* SP2 durchgeführt. Die Fluorochrom-markierten Antikörper wurden bei gleicher Wellenlänge und Intensität des Lasers gemessen. Mit dem Programm OPENLAP 2.2.5 (Improvisation) auf einem Mac 9.1 wurden die gescannten Bilder semiquantitativ ausgewertet.

Es wurden immer fünf definierte Areale pro Nervenzelle ausgeschnitten, die die Größe der fluorochrom-markierten Fläche (dargestellt durch die Menge der Pixel) präsentierten. Die Fläche jedes Synaptophysin- bzw. Spinophilin-Signals wurde mit der jeweiligen Intensität multipliziert und ergab so den *staining index*.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Windows-Programm SPSS, welches den Mittelwert, die Standardabweichung und die Signifikanz ( $p < 0,05$ ) jeder Versuchsreihe ermittelte.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Synaptophysin-Expression

#### 5.1.1 Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Cholesterol und Mevastatin

Wie zuvor beschrieben wurden Dispersionskulturen nach vier Tagen Vorkultur sieben Tage mit Cholesterol 10  $\mu\text{g/ml}$  stimuliert. Cholesterol in höheren Konzentrationen führte in anderen Versuchsreihen zur Apoptose der Neuronen. In Mevastatin-behandelten Kulturen wurde die Cholesterol-Synthese in den Neuronen gehemmt. Weiterhin sind Neurone mit beiden Substanzen versetzt worden, wobei die Cholesterol-Synthese gehemmt und gleichzeitig Cholesterol hinzugefügt wurde. Mit diesem Versuch sollte getestet werden, ob ein sog. "Rescue" stattfindet, das heißt, die Wirkung von Mevastatin aufgehoben und die ursprüngliche Kontrollsituation wiederhergestellt wird. Nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-Synaptophysin (rot) erfolgte die im Methodenteil beschriebene Auswertung. Abbildung 2 zeigt die unterschiedlichen Synaptophysin-Signale. In Mevastatin-behandelten Zellen sind diese deutlich schwächer als in Cholesterol-stimulierten.

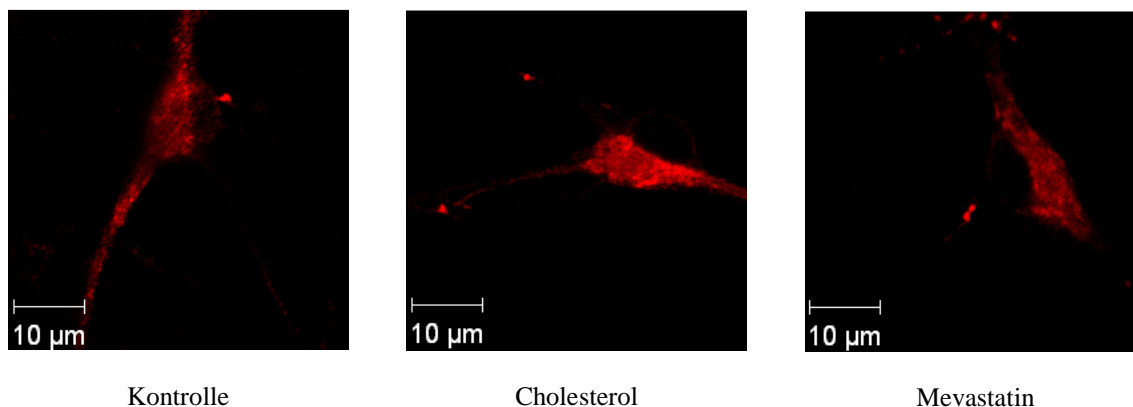


Abb. 2 Synaptophysin-Signale neuronaler Zellen aus der Dispersionskultur

Im Diagramm in Abbildung 3 ist die Immunreaktion als *staining index* (siehe 4.2) dargestellt (Kontrolle, Mevastatin-behandelt, Cholesterol-behandelt, "Rescue"-Versuch: je  $n=24$ ). Die Messwerte zeigen einen Anstieg von Synaptophysin in Cholesterol-behandelten Kulturen im Verhältnis zur Kontrolle. Die Unterschiede zwischen nicht behandelten und simultan mit Cholesterol- und Mevastatin-behandelten Zellen waren nicht signifikant.

### Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Cholesterol und Mevastatin

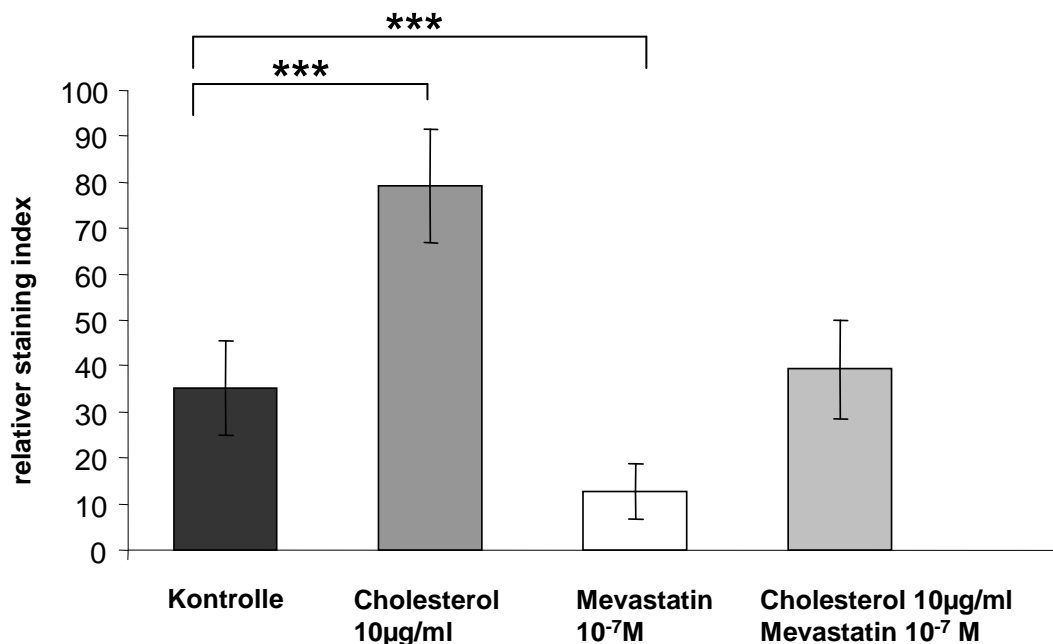


Abb. 3 Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptophysin-Antikörper in Dispersionskulturen nach Cholesterol- und Mevastatin-Behandlung  
Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ )

#### 5.1.2 Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Testosteron und Trilostan

Um die Auswirkungen von Testosteron und Trilostan auf die Immunreaktivität von Synaptophysin in den hippocampalen Dispersionskulturen zu untersuchen, wurde ein Teil der Kultur über sieben Tage mit Testosteron stimuliert. Zur Hemmung der Testosteron-Synthese erfolgte in einem anderen Teil der Kultur ebenso lange die Behandlung mit Trilostan, einem Inhibitor der  $3\beta$ -HSD. Zum Vergleich diente eine unbehandelte Kontrollkultur.

Abbildung 4 zeigt die verschiedenen Intensitäten der Synaptophysin-Signale. In den Testosteron-behandelten Zellen sind diese stärker, in den Trilostan-behandelten dagegen weniger intensiv als in den unbehandelten Zellen.

Nach Auswertung der gescannten Bilder mit dem Openlap-Programm wurden die Daten mit dem post-hoc (Dunnet)-Test ermittelt. Abbildung 5 stellt die Ergebnisse von insgesamt  $n=76$  gemessenen Neuronen und deren Synaptophysin *staining index* in einem Diagramm dar. Nach Inhibition der Testosteron-Synthese durch Trilostan ist die Synaptophysin-Expression im Vergleich zur Kontrolle und zur Testosteron-behandelten Kultur herunterreguliert. Die Behandlungen der Kulturen mit Testosteron und auch der "Rescue"-Versuch führen zu einer signifikanten Zunahme des *staining index*.

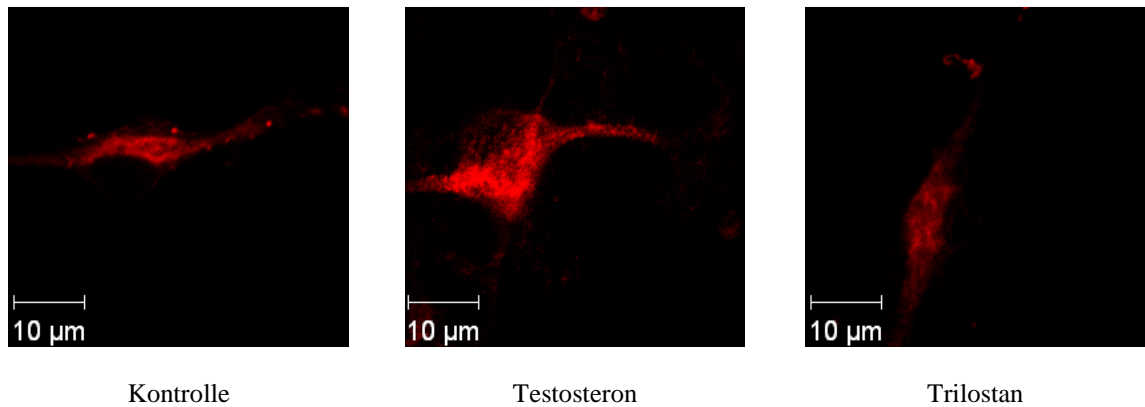


Abb. 4 Immunoreaktivität Synaptophysin-positiver Zellen

### Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Testosteron und Trilostan

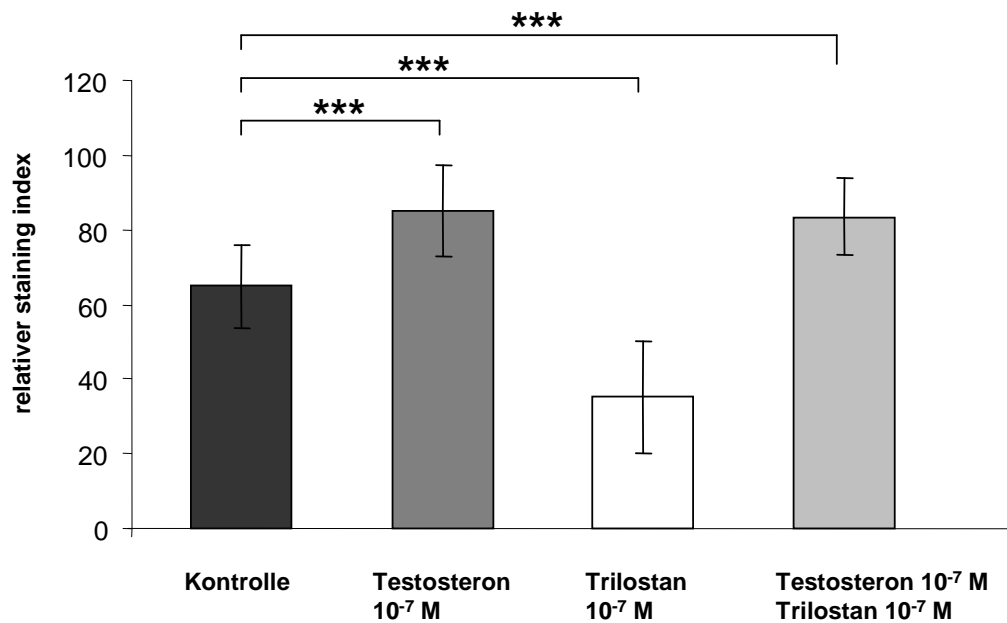


Abb. 5 Immunreaktion mit Anti-Synaptophysin-Antikörper in Testosteron- und Trilostan-behandelten hippocampalen Dispersionskulturen  
Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ )

### 5.1.3 Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Östrogen und Letrozol

Im folgenden Experiment wurden hippocampale Dispersionskulturen mit  $17\beta$ -Estradiol und Letrozol behandelt. Als Inhibitor der Östrogen-Synthese eignete sich Letrozol, das die Aromatase und damit die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen hemmt. Die mit dem Laser-Scanning-Mikroskop angefertigten Fotos (Abb. 6) machen die unterschiedlichen Immunreaktivitäten der einzelnen Synaptophysin-positiven Zellen deutlich. Die Synaptophysin-Intensität ist in Letrozol-behandelten Kulturen im Verhältnis zur Kontrolle stark runterreguliert. In Östrogen-stimulierten Kulturen sind die Zellen dagegen intensiver gefärbt.

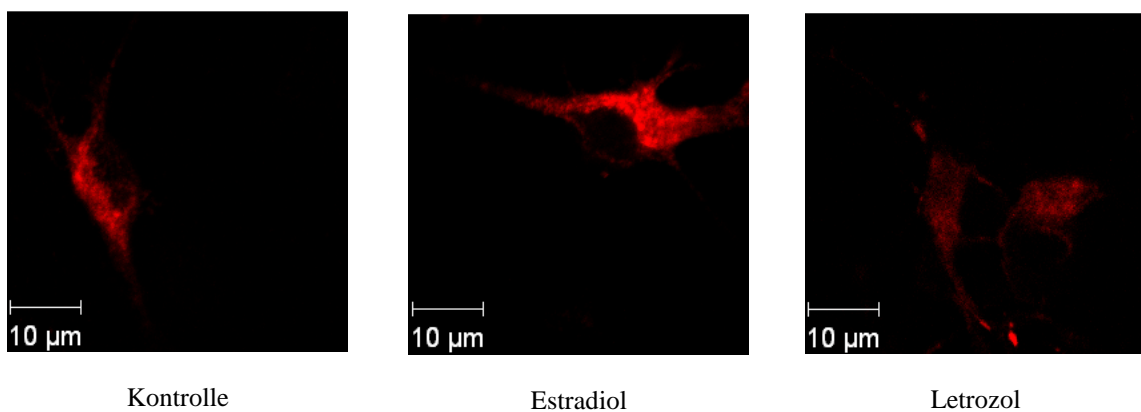


Abb. 6 neuronale Zellen aus Dispersionskultur, Synaptophysin-Signale (rot)

In Abbildung 7 sind die Messwerte nach sieben Tagen Stimulation mit Östrogen bzw. Inhibition mit Letrozol, der "Rescue"-Versuch und die unbehandelte Kontrolle der hippocampalen Dispersionskultur dargestellt. Der *staining index* der Letrozol-behandelten Kultur weist auf eine signifikante Verringerung der Synaptophysin-Expression hin, dagegen ist Synaptophysin in Östrogen-behandelten Kulturen hochreguliert.



### Synaptophysin-Expression unter Einfluss von Östrogen und Letrozol

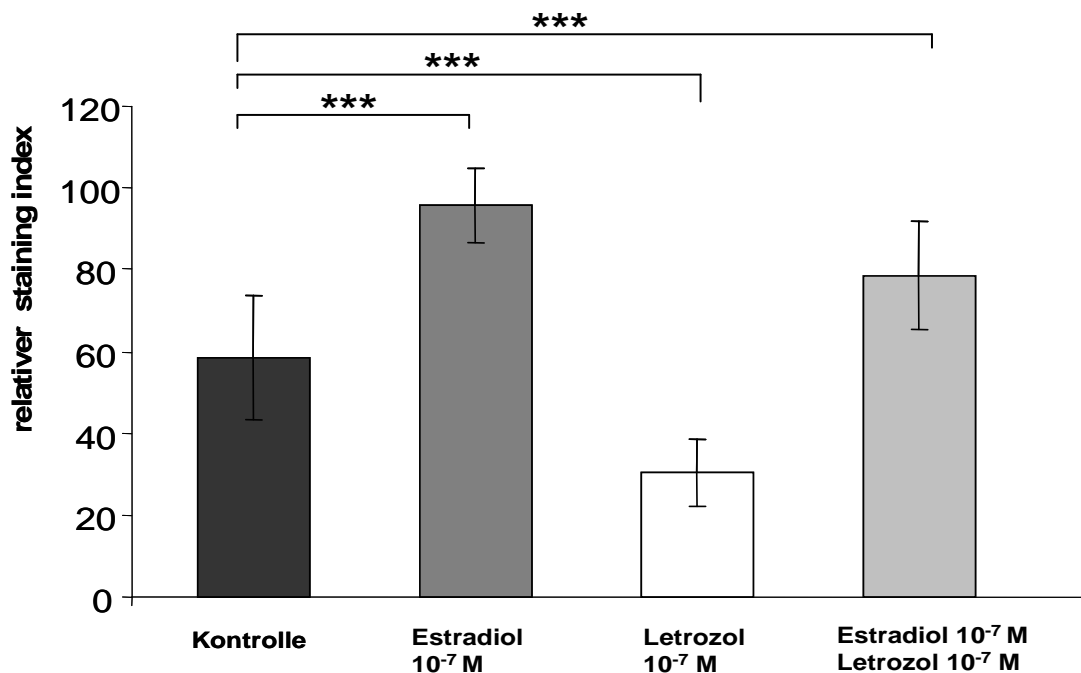


Abb. 7 Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptophysin Antikörper in Dispersionskulturen nach Estradiol- und Letrozol-Behandlung  
Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ )

#### 5.1.4 Zusammenfassung der Synaptophysin-Daten

In Abbildung 8 sind alle Messergebnisse nach Stimulation bzw. Inhibition der Dispersionskulturen zusammengestellt. Die Intensität der Synaptophysin-Immunreaktion ist als *staining index* in Prozent aufgetragen. Es wurden unabhängige Kulturen ausgewertet, wobei die Kontrolle gleich 100 % und die jeweils behandelten Kulturen prozentual in Beziehung gesetzt wurden. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aller Versuche. Die mit dem post-hoc (Dunnet)-Test ermittelte Signifikanz ist zum besseren Überblick nicht nach hoch oder sehr hoch signifikant unterschieden worden.  $P \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und mit einem Stern versehen. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Abnahme der Synaptophysin-Expression im Verhältnis zur Kontrolle in den Mevastatin-, Trilostan- und Letrozol-behandelten Kulturen. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Synaptophysin in den Cholesterol-, Testosteron- und Estradiol-stimulierten Kulturen hochreguliert. In allen "Rescue"-Versuchen konnte durch simultane Applikation des Substrats und seinem Inhibitor

die ursprüngliche Kontrollsituation wiederhergestellt und somit die Wirkung des Hemmstoffs rückgängig gemacht werden. Ein weiteres Experiment sollte zeigen, wie sich die Behandlung des Kulturmediums mit Letrozol nach Zugabe von Cholesterol bzw. Testosteron auf die Expression auf Synaptophysin auswirkt. Beide Steroide konnten keine signifikante Erhöhung des Proteins erzielen. In einem letzten Versuch wurden die Dispersionskulturen mit allen bisher verwendeten Inhibitoren Mevastatin, Trilostan und Letrozol und gleichzeitig entweder mit Cholesterol oder Estradiol behandelt. Nur in den mit Estradiol versorgten Kulturen ist eine Heraufregulation der Synaptophysin-Expression zu erkennen, in den mit Cholesterol behandelten Kulturen weist der *staining index* auf eine signifikante Verringerung der Synaptophysin-Expression hin.

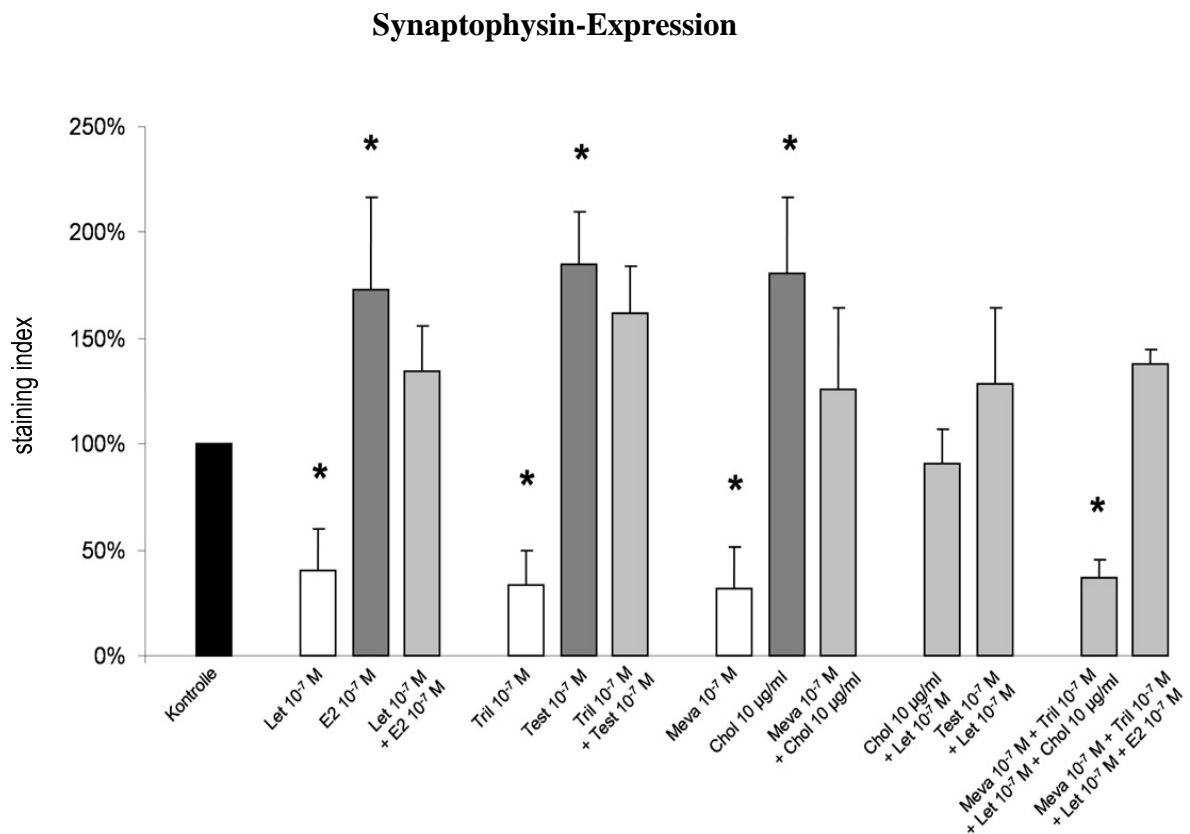


Abb.8 Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Synaptophysin-Antikörper in Dispersionskulturen nach Behandlung mit Cholesterol, Mevastatin, Testosteron, Trilostan, Estradiol und Letrozol

## 5.2 Spinophilin-Expression

### 5.2.1 Spinophilin-Expression unter Einfluss von Cholesterol und Mevastatin

In den weiteren Experimenten wurden Dispersionskulturen wie im Methodenteil beschrieben kultiviert. Um die Auswirkungen von Cholesterol und Mevastatin auf die Immunreaktivität von Spinophilin zu untersuchen, wurde ein Teil der Kulturen sieben Tage mit Cholesterol und ein anderer Teil mit Mevastatin behandelt. Zum Vergleich diente eine Kultur, die die gesamte Zeit unbehandelt blieb.

Die Dispersionskulturen wurden immunhistochemisch mit Anti-Spinophilin (rot) gefärbt und wie im Methodenteil 4.2 beschrieben ausgewertet. Abbildung 9 zeigt die mit dem Fluoreszenz-Mikroskop angefertigten Fotos. Die Spinophilin-Signale sind in den Cholesterol-behandelten Neuronen deutlich stärker als in der Kontrollkultur bzw. den Mevastatin-behandelten Zellen.

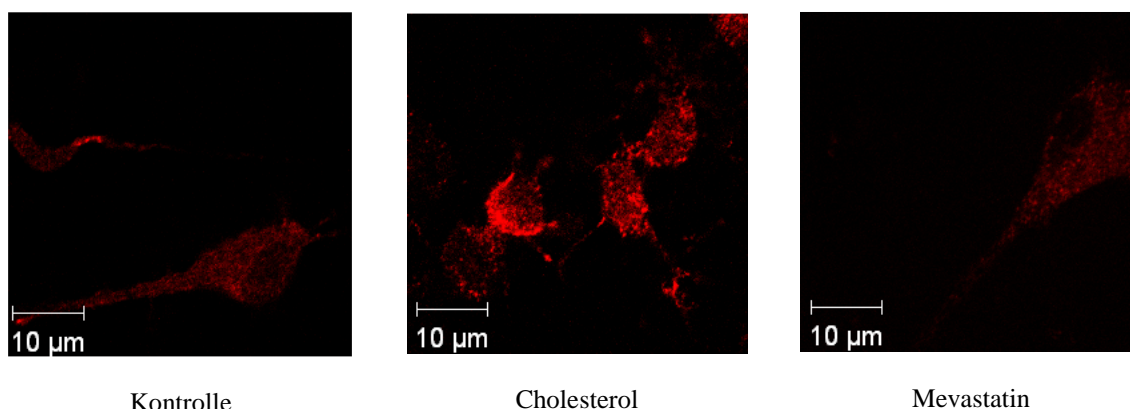


Abb. 9 Spinophilin-Signale neuronaler Zellen aus der Dispersionskultur

Das Diagramm in Abbildung 10 stellt die Immunreaktion als *staining index* dar (Kontrolle, Cholesterol-behandelt, Mevastatin-behandelt, simultane Behandlung: n=18). In der mit Mevastatin-behandelten Kulturen ist die Spinophilin-Expression im Verhältnis zur Kontrolle runterreguliert, womit sich das Resultat mit dem schwächeren Spinophilin-Signal in Abb. 9 deckt. In der Cholesterol-stimulierten Kultur ist eine signifikante Zunahme der Spinophilin-Expression zu erkennen.

### Spinophilin-Expression unter Einfluss von Cholesterol und Mevastatin

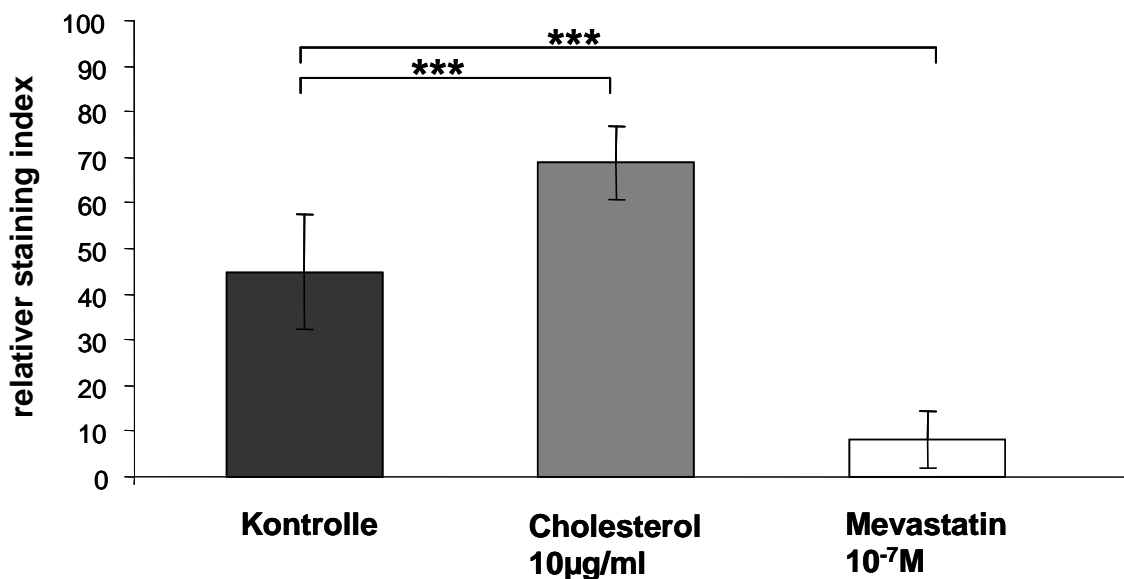


Abb. 10 Immunreaktion mit Anti-Spinophilin-Antikörper in Cholesterol- und Mevastatin-behandelten hippocampalen Dispersionskulturen  
Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ )

#### 5.2.2 Spinophilin-Expression unter Einfluss von Testosteron und Trilostan

In Abbildung 11 sind Spinophilin-positive Neurone dargestellt; die Immunreaktion ist mit Cy3-markiert (rot). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signalintensität in Testosteron-behandelten Kulturen stärker ist als in der Kontrolle. In Trilostan-behandelten Kulturen fällt die Färbung viel schwächer aus. Die digital gescannten Bilder wurden anschließend semiquantitativ mit dem Openlap-Programm ausgewertet. Die Werte sind im Diagramm Abbildung 12 als *staining index* eingetragen, wobei insgesamt  $n=72$  Neurone auf Intensität gemessen und statistisch ausgewertet wurden. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme der Spinophilin-Expression in den Testosteron-stimulierten Kulturen im Vergleich zur Kontrolle. In den Kulturen, in denen die Testosteron-Synthese mit Trilostan gehemmt wurde, findet sich dagegen eine deutliche Abnahme der Spinophilin-Expression. Die Unterschiede zwischen nicht behandelten Zellen und denen mit gleichzeitiger Behandlung mit Testosteron und Trilostan waren nicht signifikant.

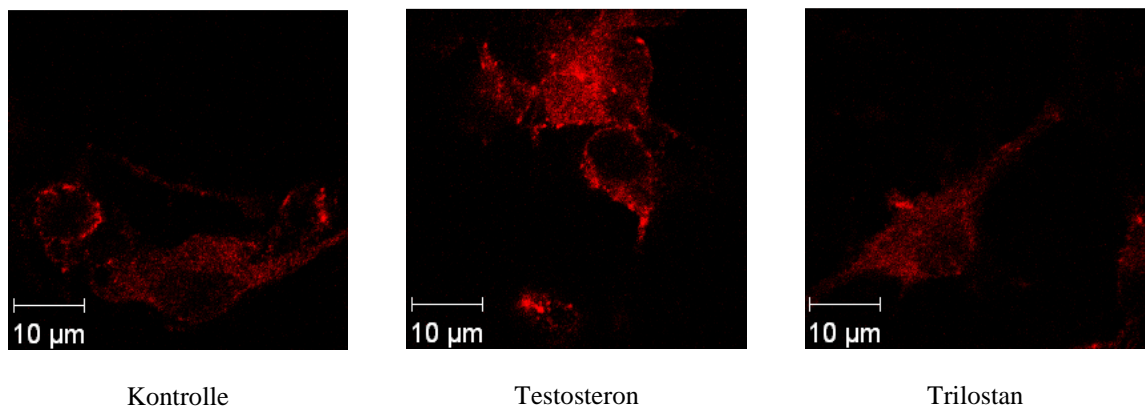


Abb. 11 Neuronale Zellen einer Dispersionskultur, die mit Testosteron und Trilostan behandelt wurde, sowie einer unbehandelten Kontrolle

### Spinophilin-Expression unter Einfluss von Testosteron und Trilostan

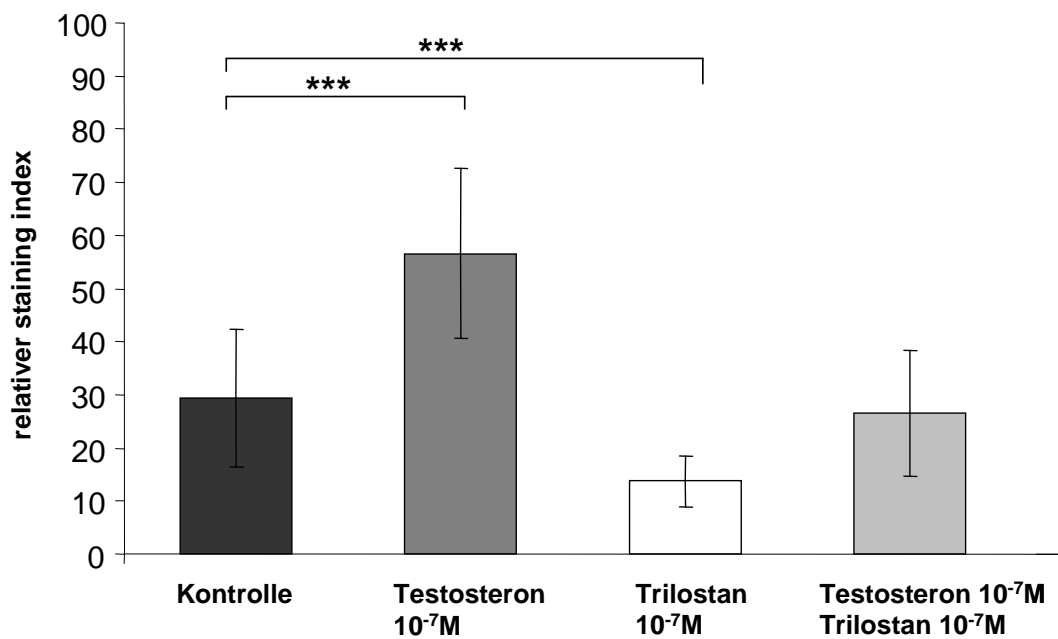


Abb. 12 Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Spinophilin-Antikörper in Dispersionskulturen nach Behandlung mit Testosteron und Trilostan  
Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ )

### 5.2.3 Spinophilin-Expression unter Einfluss von Östrogen und Letrozol

Die Abbildung 13 zeigt die mit dem Laser-Scanning-Mikroskop angefertigten Bilder und verdeutlicht die unterschiedlichen Immunreaktivitäten der verschiedenen Spinophilin-positiven Zellen. Im Vergleich zur Kontrollkultur ist die Signaldichte in den Letrozol-behandelten Kulturen reduziert. Dagegen ist die Spinophilin-Intensität in Neuronen von Östrogen-stimulierten Kulturen stark raufreguliert. In dem Diagramm in Abbildung 14 sind die Messergebnisse nach sieben Tagen Östrogen- und Letrozol-Behandlung der Dispersionskultur dargestellt. Insgesamt wurden n=72 Neurone ausgewertet und die Werte als *staining index* eingetragen. Die Spinophilin-Expression ist im Vergleich zur Kontrolle in Östrogen-behandelter Kultur signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu bewirkt die Letrozol-Behandlung eine signifikante Herunterregulation der Spinophilin-Expression.

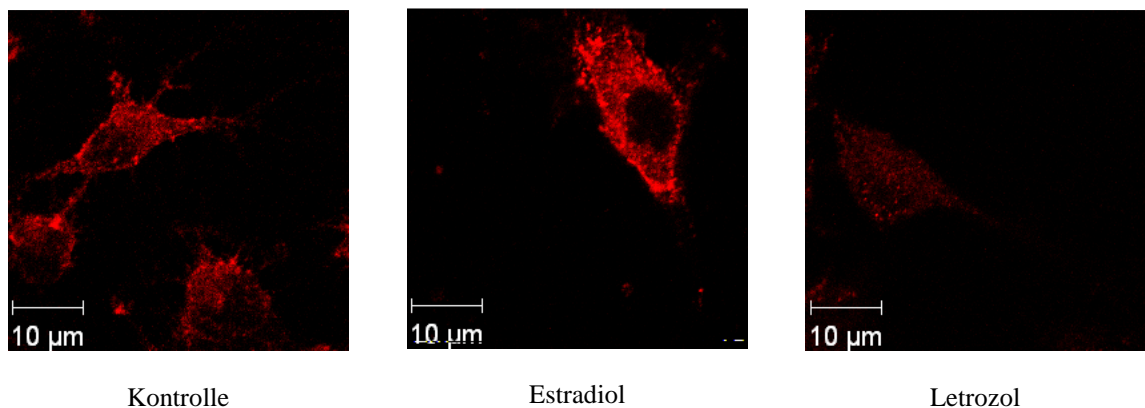


Abb. 13 Immunoreaktivität Spinophilin-positiver Neurone

### Spinophilin-Expression unter Einfluss von Estradiol und Letrozol

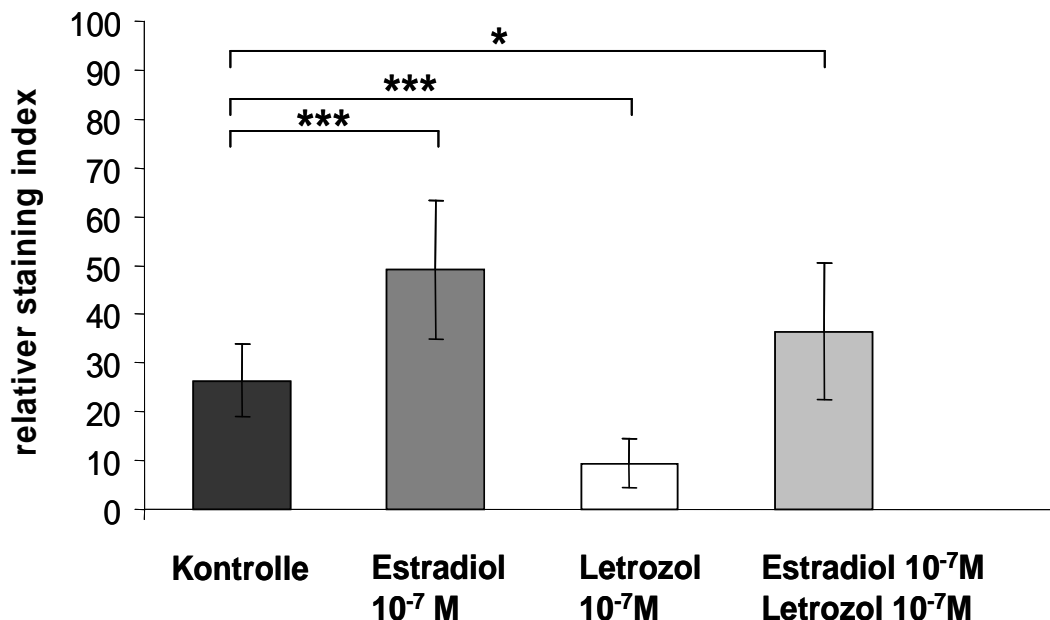


Abb. 14 Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Spinophilin-Antikörper in Estradiol- und Letrozol-behandelten hippocampalen Dispersionskulturen  
Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ )

#### 5.2.4 Zusammenfassung der Spinophilin-Daten

In Abbildung 15 sind alle nach Stimulation bzw. Inhibition der Dispersionskulturen ermittelten Messergebnisse dargestellt. Auf der y-Achse ist die Intensität der Spinophilin-Immunreaktion als *staining index* in Prozent aufgetragen. Die von den unabhängig ausgewerteten Kulturen erzielten Werte der Kontrolle wurden gleich 100 % und die jeweils behandelten Kulturen dazu prozentual in Beziehung gesetzt. In dem Diagramm werden die Mittelwerte aller Versuche gezeigt. Zur besseren Übersicht ist die mit dem post-hoc (Dunnet)-Test errechnete Signifikanz nicht nach hoch bzw. sehr hoch signifikant unterschieden worden.  $P \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ergebnisse machen deutlich, dass alle Inhibitoren der Steroidbiosynthese eine signifikante Abnahme der Spinophilin-Expression bewirken. In den Kulturen, die dagegen mit Cholesterol, Testosteron oder Estradiol stimuliert wurden, ist die Expression von Spinophilin hochreguliert.

Die simultane Applikation der Kulturmedien mit Substrat und seinem Inhibitor zeigt eine der Kontrolle ähnlichen Spinophilin-Expression; die hemmende Wirkung kann also durch das Substrat wiederaufgehoben werden. In einem weiteren Experiment wurde die Behandlung des Kulturmediums mit Letrozol nach Zugabe von Cholesterol bzw. Testosteron auf die Expression von Spinophilin geprüft. Beide Steroide konnten keine signifikante Erhöhung der Proteinbildung erreichen. Zum Schluss sollte die Frage geklärt werden, inwieweit sich Cholesterol und Estradiol in ihrer Wirkung auf die Spinophilin-Expression unterscheiden. Dazu wurden die Dispersionskulturen mit allen Inhibitoren (Mevastatin, Trilostan und Letrozol) und gleichzeitig entweder mit Cholesterol oder Estradiol behandelt. Die Zugabe von Estradiol führt zu einer Hochregulation der Expressionsrate von Spinophilin. Es kann folglich die Wirkung der hemmenden Substanzen aufheben. In den Cholesterol-behandelten Kulturen weist der *staining index* im Vergleich zur Kontrolle auf eine Abnahme der Spinophilin-Expression hin.

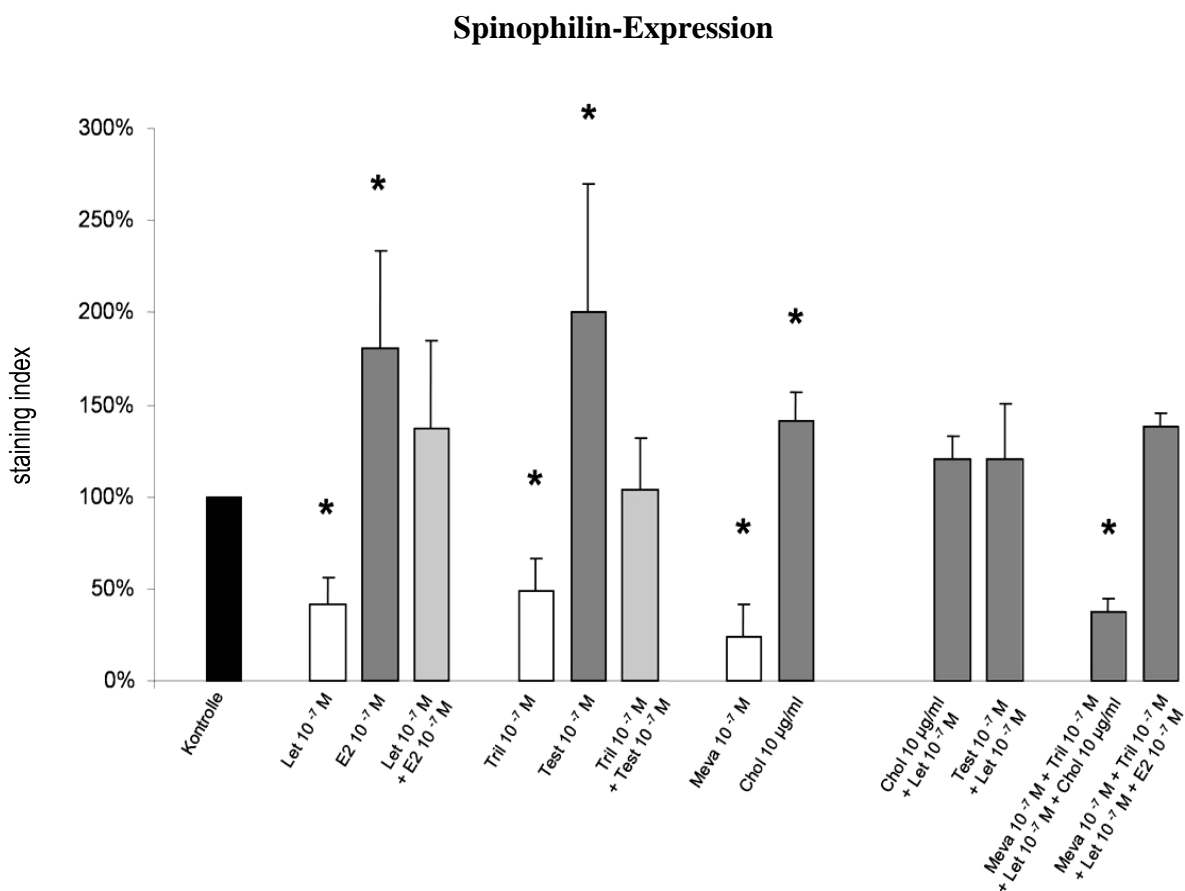


Abb.15 Auswertung der Immunreaktion mit Anti-Spinophilin Antikörper in Dispersionskulturen nach Behandlung mit Cholesterol, Mevastatin, Testosteron, Trilostan, Estradiol und Letrozol



## 6. Diskussion

Es ist bekannt, dass *de novo* in hippocampalen Neuronen gebildetes Östrogen Einfluss auf Synapsen, dendritische Spines und die Expression synaptischer Proteine hat. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob auch Cholesterol und Testosteron als Vorläuferstufen der Östrogen-Synthese die synaptische Plastizität beeinflussen. Cholesterol wurde als ein in Neuronen und Gliazellen produzierter Faktor identifiziert, der für die Ausreifung der Synapsen im ZNS verantwortlich ist (Barres et al., 2001). Wir stellten uns die Frage, ob die fördernde Wirkung von Cholesterol auf die Synaptogenese nur möglich ist, weil Cholesterol als Substrat für die Östrogen-Synthese zur Verfügung steht. Bei der Aufrechterhaltung der Synapsendichte spielt auch Testosteron eine wichtige Rolle (MacLusky et al., 2006). Unsere Ergebnisse zeigen, dass der stimulierende Einfluss von Cholesterol auf die Bildung der Synapsen aufgehoben ist, wenn die von uns verwendeten Dispersionskulturen simultan mit Cholesterol und Letrozol behandelt wurden. Demzufolge kann Cholesterol seine Effekte nicht ausüben, wenn der letzte Schritt der Östrogen-Synthese mit einem potenten Inhibitor der Aromatase (Letrozol) blockiert wird. Wurden die Kulturen mit verschiedenen Hemmstoffen der Steroidsynthese versorgt, konnte nur die Zugabe von Estradiol, nicht aber die Applikation von Cholesterol, der Herunterregulation der synaptischen Proteine entgegenwirken. Vergleichbare Ergebnisse erhielten wir bei der Verwendung von Testosteron. Nach der Stimulation unserer Kulturen mit Testosteron konnten wir eine signifikante Erhöhung der von uns markierten prä- und postsynaptischen Proteine messen. Die gleichzeitige Behandlung mit Testosteron und Letrozol bewirkte eine Abnahme der Protein-Expression, so dass auch Testosteron seine fördernden Effekte nicht zeigen kann, wenn keine Aromatisierung zu Östrogen erfolgt. Eine Induktion der Synaptogenese findet folglich nur statt, wenn Cholesterol als Ausgangsstoff bzw. Testosteron als Zwischenprodukt der Östrogen-Synthese zu Östrogen verstoffwechselt werden. Wir konnten somit erstmals nachweisen, dass die Cholesterol-bedingte Stimulation der Synapsenbildung (Pfrieger et al., 2002) allein daraus resultiert, dass Cholesterol in Östrogen umgewandelt wird.

Untersuchungen von Hojo et al. (2004) zufolge, ist die Konzentration von Östrogen im männlichen Hippocampus sechsmal höher als die durchschnittliche Konzentration im Plasma. Prange-Kiel et al. (2003) konnten zeigen, dass adulte hippocampale Neurone in der Lage sind, Östrogene *de novo* zu synthetisieren. In einem identischen Kulturmodell mit neonatalen hippocampalen Zellen wurde ebenfalls eine *de novo* Östrogen-Synthese festgestellt (Fester, 2003; Hojo et al., 2004). Bei der Herstellung unserer Dispersionskulturen haben wir keine

Dichtegradienten-Zentrifugation vorgenommen, um eine größere Zellausbeute zu erzielen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass sich die postnatalen Kulturen sowohl aus Prinzipalneuronen des Pyramidenzellbandes, Körnerzellen des Gyrus dentatus als auch Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia zusammensetzen. Die Problematik der Heterogenität der zellulären Zusammensetzung wirft die Frage auf, wie die proportionale Verteilung von Neuronen und Gliazellen in der Dispersionskultur aussieht. Zur Testung der Reinheit der Dispersionskultur bestimmten Fester und Mitarbeiter (2006) die einzelnen Zelltypen mittels Immunhistochemie. Nach zehntägiger Kultivierung wurden die Kulturen mit verschiedenen Antikörpern (GFAP als Astrozytenmarker, MAP-2 als neuronaler Marker und MOSP als Oligodendrozyten-Marker) behandelt. Die Auswertung ergab, dass die Dispersionskultur zu 80 % aus Neuronen, 12 % Astrozyten und wenigen Oligodendrozyten und Mikroglia besteht. Garcia-Segura et al. (1999) und Zwain and Yen (1999) identifizierten neben Neuronen auch Astrozyten als derzeit bekannte Gliazellen, die ebenfalls Steroide synthetisieren können.

Die Wirkung von Östrogen auf die synaptische Plastizität ist bei der Beschreibung der neuroprotektiven Effekte dieses Steroids von zentraler Bedeutung. Vorausgegangene Untersuchungen belegen, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Östrogene eine Zunahme von Spines an den apikalen Dendriten von Neuronen der CA1-Region im Hippocampus induzieren (Woolley and McEwen, 1993, 2002; Murphy and Segal, 1996). Neben dem Anstieg der postsynaptischen Strukturen zeigte sich auch eine Zunahme der präsynaptischen Boutons. Östrogene können ihre protektiven Wirkungen durch genomische und nicht-genomische Mechanismen erzielen (Garcia-Segura et al., 2001). Letztere sind so genannte `rapid activities`, d. h. die Antwort erfolgt nach Sekunden bis Minuten und ist nicht auf die klassisch definierten ER angewiesen. Östrogen kann aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften oxidativen Stress in Neuronen unterdrücken und diese beispielsweise gegen  $\beta$ -amyloid hervorgerufenen Zelltod schützen (Behl und Manthey, 2000). Diese Schutzfunktion von Östrogen wurde v. a. bei sehr hohen Konzentrationen ( $10^{-5}$  M) beobachtet und ist unabhängig von der Aktivität der ER (Behl et al., 1995/1997). Weitere nicht-genomische Effekte basieren auf einen an einer Membran gebundenen Östrogen-Rezeptor, der nach Östrogenbindung eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst (Ravankar et al., 2005). Die beiden im Hippocampus nachgewiesenen Östrogenrezeptor-Subtypen, Östrogen-Rezeptor alpha ( $ER\alpha$ ) und Östrogen-Rezeptor beta ( $ER\beta$ ) vermitteln klassische und membrangebundene Effekte des Steroids.

Nach Bindung von Östrogen an einen nukleären Rezeptor-Subtyp, bindet dieser ein Östrogen-`responsive, element`, welches schließlich die Transkriptionsrate des Östrogen Ziel- Gens steigert (Klinge, 2001). Östrogen-Rezeptoren existieren in Interneuronen, in Pyramidenzellen und Körnerzellen des Hippocampus (Österlund et al., 1998; Azcoita et al., 1999; Hösli and Hösli, 1999; Shungrue and Merchenthaler, 2000, 2001; Wehrenberg et al., 2001). Rune und Mitarbeiter (2002) konnten in ihren Arbeiten die Neurone der CA3-Region als Hauptziel von Östrogen identifizieren. Nach Östrogen-Behandlung beobachtete man eine stärkere mRNA-Expression beider ER-Subtypen in CA3 gegenüber CA1. Zusätzlich belegen die Ergebnisse von Prange-Kiel et al. (2003) eine differentielle Regulation der Östrogen-Rezeptoren. In mit Östrogen stimulierten hippocampalen Slicekulturen wurde immunhistochemisch nukleär eine Erhöhung von ER $\alpha$ , aber nicht von ER $\beta$  gemessen. In hippocampalen Dispersionskulturen, die mit Östrogen behandelt wurden, stellte man dagegen einen Anstieg von ER $\alpha$  und gleichzeitig ein Absinken von ER $\beta$  fest. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Östrogen einen stärkeren Einfluss auf ER $\alpha$  der CA3- Region, jedoch nicht auf CA1 besitzt. Neben der Östrogen-induzierten ausschließlich in CA1 beobachteten Spine-Bildung, ist auch das Vesikelprotein Synaptophysin nach Östrogen-Behandlung dominant in CA1 hochreguliert. Anhand dieser Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass die Aktivierung von ER $\alpha$  in CA3 die Bildung von Boutons in den CA3- Pyramidenzellen anregt, die über Schaffer-Kollaterale an den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen terminieren und dort die Bildung neuer Spines induzieren. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnten Prange-Kiel und Mitarbeiter (2006) zeigen, dass die Expression von StAR und Aromatase in hippocampalen Slicekulturen in der CA3- Region dreimal höher ist als in der CA1- Region und den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Der Vergleich der Aktivität der steroidogenen Enzyme in den verschiedenen Regionen lässt eine variable Östrogen-Synthese und region-spezifische Östrogen-Konzentration vermuten. Neben den Wirkungen von Östrogen auf Spines und Boutons konnten Veränderungen der synaptischen Proteine nach Östrogengabe demonstriert werden (Crispino et al., 1999). Auf der präsynaptischen Seite wurde eine Heraufregulation von Vesikelproteinen (Brake et al., 2001; Rune et al., 2002; Yokomaku et al., 2003) und auf der postsynaptischen Seite die Hochregulation von Spinophilin nachgewiesen (Amateau et al., 2002). Prange-Kiel et al. (2006) konnten beim Vergleich der Immunreaktivitäten von Synaptophysin und Spinophilin die Herunterregulation beider synaptischen Proteine durch Letrozol nachweisen. Auch hier wurden regionale Unterschiede festgestellt. Die Expression von Synaptophysin war signifikant reduziert in den Pyramidenzellen der CA3- Region, wo die Schaffer-Kollaterale, die in der CA1- Region enden, ihren Ursprung haben.

Die Analyse der Spinophilin-Expression ergab eine deutliche Verringerung des postsynaptischen Markers in CA1 und im Gyrus dentatus.

Die region-spezifische Expression der steroidogenen Enzyme und die region-spezifische Herunterregulation der synaptischen Proteine nach Behandlung mit Letrozol unterstreicht die dominante Rolle der CA3- Region des Hippocampus für die Östrogen-Synthese und -Sensitivität. Des Weiteren lassen die Ergebnisse von Prange-Kiel et al. (2006) darauf schließen, dass die Effekte von Östrogen auf die hippocampale Spinogenese indirekt vermittelt werden. Die exogene Applikation von Östrogen bewirkte nicht den erwarteten Anstieg der Spine-Synapsen-Dichte. Die Behandlung von in den Hippocampus projizierenden Strukturen mit Östrogen dagegen, führte zu einer Zunahme der Spine-Dichte.

Die Arbeiten von Prange-Kiel et al. (2003) und Wehrenberg et al. (2001) belegen, dass in hippocampalen Neuronen die Expression von steroidogenen Enzymen stattfindet und diese anhand ihrer Enzymausstattung zur Östrogenbildung fähig sind. Um die *de novo* Östrogen-Synthese in hippocampalen Dispersionskulturen zu unterbrechen und die Wirkung eines Östrogenmangels auf die synaptischen Proteine Synaptophysin und Spinophilin zu untersuchen, verwendeten wir in dieser Arbeit Letrozol. Dieser reversible Aromatasehemmer reduziert die Menge an zirkulierendem Östrogen (Foidart et al., 1995; Geisler et al., 2002), indem der letzte Schritt der Östrogen-Synthese, nämlich die Aromatisierung von Testosteron zu Östrogen inhibiert wird. In seiner Wirkung beeinträchtigt Letrozol die ER-Funktion nicht (Puddefoot et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003). In hippocampalen Dispersionskulturen kann die Östrogen-Synthese durch eine Letrozol-Dosis von  $10^{-9}$  M fast vollständig gehemmt werden (Prange-Kiel et al., 2003). Die stärksten Effekte von Letrozol wurden allerdings bei einer Dosis von  $10^{-7}$  M beschrieben (Kretz et al., 2004). Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Zugabe von Letrozol zum Medium eine signifikante Herunterregulation beider Proteine bewirkt. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der Aromatase und die endogene Östrogen-Synthese für die Synapsenbildung. Um zu beweisen, dass Letrozol spezifisch auf die Aromatase wirkt und somit toxische Effekte auszuschließen sind, wurden diese Kulturen gleichzeitig mit Östrogen und Letrozol behandelt. Kretz et al. (2004) wiesen nach, dass die simultane Applikation von Östrogen und seinem Inhibitor die Wirkung von Letrozol aufhebt. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein. Die in unseren Versuchen verwendeten Kulturen zeigten nach sieben Tagen Östrogen-Behandlung eine signifikante Hochregulation von Synaptophysin und Spinophilin. Wir benutzten nicht die physiologischen Serumkonzentrationen  $10^{-10}$  M bei weiblichen bzw.  $10^{-11}$  M bei männlichen Ratten,

sondern eine pharmakologische Dosis von  $10^{-7}$  M. Rune und Mitarbeiter (2006) testeten die Effekte von Östrogen auf die synaptische Plastizität in verschiedenen Konzentrationen. Das Ergebnis dieser Studie belegte, dass niedrige gonaden-äquivalente Konzentrationen wirkungslos blieben. Die Applikation von pharmakologischen, aber nicht toxischen Östrogen-Dosen ( $10^{-7}$  M) stimulierte die Expression von Synaptophysin, wohingegen die Anzahl der Boutons nicht signifikant anstieg. Es ist davon auszugehen, dass das für die synaptische Plastizität essentielle Östrogen nicht peripheren Quellen entstammt, sondern im Hippocampus gebildet wird.

Testosteron wirkt im adulten männlichen Rattenhippocampus via Umwandlung in Östrogen durch Aromatisierung und auch durch Bindung an intranukleäre Androgenrezeptoren (AR). Folglich sind Testosteron-Effekte sowohl über Aromatase-abhängige als auch Aromatase-unabhängige Mechanismen möglich. Leranth et al. (2003, 2004) beobachteten, dass die Gonadektomie adulter männlicher und weiblicher Ratten zu einer Reduktion der Spine-Synapsen-Dichte in der CA1- Region des Hippocampus führte. Die anschließende Substitution von Testosteron konnte diesen Synapsenverlust in beiden Geschlechtern wieder aufheben. Diese Daten unterstreichen die Bedeutung von Testosteron für die Aufrechterhaltung der Spine-Synapsen in der CA1- Region des Rattenhippocampus. Die Ergebnisse von Pike et al. (2001) belegen, dass auch Testosteron neuroprotektive Effekte auf hippocampale Neurone hat, indem es die  $\beta$ -amyloid Toxizität in kultivierten Nervenzellen reduziert. Ein wichtiges Ziel der neurowissenschaftlichen Forschung ist die Gedächtnisfunktion, für die der Hippocampus lebensnotwendig ist. Untersuchungen zufolge wirkte sich eine Testosteron-Behandlung sowohl bei Mäusen (Flood et al., 1995) als auch bei jungen (Ross et al., 2003) und postmenopausalen (Wisniewski et al., 2002) Frauen fördernd auf die Erinnerungsfähigkeit aus. Eine positive Assoziation zwischen endogenem Testosteronspiegel und kognitiven Leistungen wurden bei Männern (Yaffe et al., 2002) und Frauen (Barrett-Connor et al., 1999) gefunden. In unseren Versuchen untersuchten wir die Wirkung von Testosteron auf die Synapsenbildung in neonatalen Dispersionskulturen. Nach Zugabe von Testosteron zum Kulturmedium konnte eine signifikante Heraufregulation von Synaptophysin und Spinophilin gemessen werden.

Bei der Behandlung von Mammacarcinomen mit positivem Östrogen-Rezeptorstatus werden derzeit v. a. Anti-Östrogene und Enzyminhibitoren eingesetzt. Östrogen wirkt häufig als Wachstumsfaktor und fördert somit die Proliferation des Tumors. In mehr als 70 % der Mammacarcinome wurde eine erhöhte Aromataseaktivität nachgewiesen.

In diesem Fall kann im Rahmen einer adjuvanten Therapie mit der Hemmung der Aromatase mittels Letrozol eine Reduktion des Carcinoms erreicht werden. Anti-Östrogene stellen eine weitere Therapieoption dar. Dazu zählt der kompetitive Inhibitor Tamoxifen, der an der Liganden-Bindung-Seite den ER bindet. Im Falle einer Tamoxifen-Resistenz sind alternative Anti-Hormontherapien notwendig. Puddefoot et al. (2002) untersuchten die Wirkung von Trilostan, einem Inhibitor der  $3\beta$ -HSD und damit der Testosteron-Synthese und konnten ebenfalls eine Hemmung der Proliferation der Krebszellen beobachten. Die Beeinflussung des Tumorwachstums wurde unter anderem der Inhibition von ER $\alpha$  und ER $\beta$  an die `responsive elements` zugeschrieben. Vermutlich ist die positive Wirkung von Trilostan bei der Behandlung des Mammacarcinoms bedingt durch die Kombination aus seiner ausführlich dokumentierten Unterdrückung der Steroidsynthese und Anti-Östrogeneffekten. Die Applikation von Trilostan zu unseren postnatalen Dispersionskulturen führte zu einer Verringerung der Expression beider von uns untersuchten Proteine. Dieser Effekt konnte durch die simultane Gabe von Hemmstoff (Trilostan) und seinem Substrat (Testosteron) wieder aufgehoben werden.

Um *de novo* Östrogene synthetisieren zu können, muss in den hippocampalen Zellkulturen Cholesterol als Ausgangsstoff vorliegen. Die Ergebnisse von Mauch et al. (2001) konnten nachweisen, dass Nervenzellen selbst genug Cholesterol produzieren, um überleben und wachsen, aber zu wenig, um genügend synaptische Kontakte knüpfen zu können. Die ausreichende Menge an Cholesterol wird von den Gliazellen bereitgestellt und anschließend von den Neuronen aufgenommen. Besonders Astrozyten tragen durch die Freisetzung von Cholesterol im ZNS wie auch in der Zellkultur zur synaptischen Stabilität bei (Barres and Smith et al., 2001; Mauch et al., 2001). Diese Arbeiten deuten darauf hin, dass Cholesterol die Synaptogenese im ZNS fördert und die Verfügbarkeit von Cholesterol scheinbar das Ausmaß der synaptischen Verschaltung begrenzt. In unseren Experimenten führte der Zusatz von Cholesterol in den Dispersionskulturen zu einem signifikanten Anstieg der Expression von Synaptophysin und Spinophilin. Die Inkubation der hippocampalen Zellkulturen mit Mevastatin blockierte die Cholesterol-Synthese in den Neuronen und kokultivierten Gliazellen. Somit wurde die Versorgung der gesamten Zelle mit Cholesterol eingeschränkt und der Cholesterolbedarf nur durch zelleigene Cholesterolspeicher versorgt, bis diese aufgebraucht waren und die Zellen schließlich in einen Cholesterolmangelzustand übergingen. Dies erklärt, warum die Expressionsrate von Synaptophysin und Spinophilin in den Mevastatin-behandelten Zellkulturen deutlich geringer war als nach Behandlung von Trilostan oder Letrozol.

**Zusammenfassung**

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob außer Östrogen auch Vorläufermoleküle der Östrogen-Synthese die synaptische Plastizität im Hippocampus der Ratte beeinflussen. Wir verwendeten zu diesem Zweck neonatale hippocampale Dispersionskulturen, die über sieben Tage mit Cholesterol, Testosteron und Östrogen bzw. mit Mevastatin, Trilostan und Letrozol behandelt wurden. Durch Immunhistochemie und anschließender semiquantitativer Bildanalyse konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate der von uns benutzten prä- und postsynaptischen Marker sowohl unter Einfluss von Östrogen als auch der Vorläuferstufen von Östrogen -Cholesterol und Testosteron- signifikant erhöht war. Die korrespondierenden Inhibitoren der Steroidsynthese - Mevastatin, Trilostan, Letrozol- bewirkten entgegengesetzte Effekte, die aber durch die simultane Applikation von Substrat und dem jeweiligen Hemmstoff wiederhergestellt wurden. Darüber hinaus stellten wir fest, dass die Expression von Synaptophysin und Spinophilin nach Behandlung der Kulturen mit Testosteron und Cholesterol nicht erhöht werden konnte, wenn die Aromatase mittels Letrozol gehemmt wurde. Diese Ergebnisse liefern deutliche Hinweise darauf, dass Cholesterol und Testosteron die Synapsenbildung nicht direkt induzieren, sondern stimulierende Wirkungen nur möglich sind, weil sie als Substrat für die Aromatase zur Verfügung stehen. Zusammenfassend unterstreicht diese Entdeckung die Bedeutung der Östrogen-induzierten synaptischen Plastizität im Hippocampus.

## 7. Literaturverzeichnis

**Allen P. B., Ouimet C. C., Greengard P (1997)**

Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; 94:9956-9961

**Abdelgadir E. S., Resko J. A., Ojeda S. R., Lephart E. D., McPaul M. J., Roselli C. E. (1994)**

Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in brain.  
*Endocrinology*; 135:395-401

**Amateau S. K., McCarthy M. M. (2002)**

A Novel Mechanism of Dendritic Spine Plasticity Involving Estradiol Induction of Prostaglandin-E2. *J Neurosci.*; 22(19):8586-8596

**Azcoitia I., Sierra A., Garcia-Segura L. M. (1999)**

Localization of estrogen receptor  $\beta$ -immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain.  
*Glia*; 26:260-267

**Azcoitia I., Sierra A., Veiga S., Honda S. Harada N., Garcia-Segura L. M. (2001)**

Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol.*; 47:318-29

**Barres B. A., Smith S. J. (2001)**

Cholesterol- Making or Breaking the Synapse: *Science*; 294:1296-1297

**Barrett-Connor E., Goodman-Gruen D (1999)**

Cognitive function and endogenous sex hormones in older women.  
*J Am Geriatr Soc*; 47:1289-1293

**Baulieu E. E. (1997)**

Neurosteroids: Of the Nervous System, by the Nervous System, for the Nervous System.  
*Recent Progress in Hormone Research*; 52:0-31

**Behl, C., Manthy D. (2000)**

Neuroprotective activities of estrogen: An update. *J. Neurocytology*; 29:351-359



**Beyer C. (1999)**

Estrogen and the developing mammalian brain. *Anatomy and Embryology*; 199:379-390

**Brake W. G., Alves S. E., Dunlop J. C., Lee S. J., Bulloch K., Allen P. B., Grenngard P., McEwen B. S. (2001)**

Novel Target Sites for Estrogen Action in the Dorsal Hippocampus: An Examination of Synaptic Proteins. *Endocrinology*; 142:1284-1289

**Brewer G. J. (1997)**

Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Methods*; 71:1443-155

**Brown P. D. (1998)**

Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat*; 52:125-36

**Compagnone N. A. and Mellon S. H. (2000)**

Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*; 21:1-56

**Crispino M., Stone D. J., Wei M., Anderson C. P., Tocco G., Finch C. E., Baudry M. (1999)**

Variations of Synaptotagmin I, Synaptotagmin IV, and synaptophysin mRNA Levels in Rat Hippocampus during the Estrous Cycle. *Experimental Neurology*; 159: 574-583

**Daly C., Ziff E. B. (1997)**

Post- Transcriptional Regulation of Synaptic Vesicle protein Expression and the Developmental Control of Synaptic Vesicle Formation. *J Neurosci.*; 17(7): 2365-2375

**Feng J., Yang Z., Ferreira A., Tomizawa K., Liauw J. A., Zhuo M., Allen P. B., Quimet C. C., Greengard P. (2000)**

Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:9287-9296

**Fester L. (2003)**

Funktionelle Bedeutung der Aromatase bei der lokalen Östrogen Synthese im Hippocampus.  
*Diplom-Arbeit, Universität Greifswald*

**Flood J. F., Farr S. A., Kaiser F. E., La Regina M., Morley J. E. (1995)**

Age-related decrease of plasma testosterone in SAMP8 mice: replacement improves age-related impairment of learning and memory. *Physiol Behav*; 57:669-673

**Foidart A., Tlemcani O., Harada N., Abe-Dohmae S., Balthazart J. (1995)**

Pre- and post-translational regulation of aromatase and non-steroidal aromatase inhibitors. *Brain Res*; 701:267-278

**Furukawa A., Miyatake A., Ohnishi T., Ichikawa Y. (1998)**

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in adult rat central nervous system: Colocalization of StAR, cytochrome P-450 SCC (Cyp XIA1) and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem*; 71:22331-2238

**Garcia-Segura L. M., Azcoitia I., Don Carlos L. L. (2001)**

Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*; 63: 29-60

**Garcia-Segura L. M., Wozniak A., Azcoitia I., Rodriguez J. R., Hutchison R. E., Hutchison J. B. (1999)**

Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*; 89(2): 567-578

**Geisler J., Haynes B., Anker G., Dowsett M., Lonning P. E. (2002)**

Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol*; 20: 751-757

**Gould E., Woolley C. S., Frankfurt M., McEwen B. S. (1990)**

Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*; 10:1286-1291

**Harris K. M., Sorra K. E. (2000)**

Overview on the Structure, Composition, Function, Development, and Plasticity of Hippocampal Dendritic Spines. *Biology Department, Boston University*

**Hao J., Janssen W., Tang Y., Roberts J. A., McKay H., Lasley B., Allen B. P., Greengard P., Rapp P. R., Kordower J. H., Hof P. R., Morrison J. H. (2003)**

Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *J Comp Neurol*; 465:540-550

**Hojo Y., Hattori T. A., Enami T., Furukawa A., Suzuki K., Ishii H. T., Mukai H., Morrison J. H., Janssen W. G., Kominami S., Harada N., Kimoto T., Kawato S. (2004)**

Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 $\alpha$  and P450 aromatase localized in neurones. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:865-870

**Hösli E., Hösli L. (1999)**

Cellular localization of estrogen receptors on neurons in various regions of cultured rat CNS: coexistence with cholinergic and galanin receptors. *Int Dev Neurosci*; 4:317-330

**Kaech S., Parmar H., Roelandse M., Bornmann C., Matus A. (2001)**

Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:7086-7092

**Kerr J. E., Allore R. J., Beck S. G., Handa R. J. (1995)**

Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology*; 136(8):3213-21

**Klinge C. M. (2001)**

Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*; 29: 2905-2919

**Kretz O., Fester L., Wehrenberg U., Zhou L., Brauckmann S., Zhao S., Prange-Kiel J., Naumann T., Jarry H., Frotscher M., Rune G. M. (2004)**

Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *J. of Neuroscience*; 24:5913-5921

**Leranth C., Petnehazy O., MacLusky N. J. (2003)**

Gonadal Hormones Affect Spine Synaptic Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Male Rats. *J. of Neuroscience*; 23(5):1588-1592

**Leranth C., Hajszan T., MacLusky N. J. (2004)**

Androgens Increase Spine Synapse Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Ovariectomized Female Rats. *J. of Neuroscience*; 24(2): 495-499

**Liscum L., Munn N. J. (1999)**

Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1438:19-37

**Mac Lusky N. J., Hajszan T., Prange-Kiel J., Leranth C (2006)**

Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *J. of Neuroscience*; 138:957-965

**Mauch D. H., Nägler K., Schumacher S., Göritz C., Müller E. C., Otto A., Pfrieder F. W. (2001)**

CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science*; 294:1354-1357

**McEwen B. S. (2002)**

Estrogen Actions Throughout the Brain. *Recent Prog Horm Res.*; 57:357-384

**Mitropoulou T. N., Tzanakakis G. N., Kletsas D., Kalofonos H. P., Karamanos N. K. (2003)**

Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int. J. Cancer*; 104:155-160

**Muly E. C., Smith Y., Allen P., Greengard P. (2004)**

Subcellular distribution of spinophilin immunolabeling in primate prefrontal cortex: localization to and within dendritic spines. *J Com Neurol*; 469:185-197

**Murphy D. D., Segal S. (1996)**

Regulation of Dendritic Spine Density in Cultured Rat Hippocampal Neurons by Steroid Hormones. *J Neuroscience*; 16:4059-4068

**Murphy D. D., Cole N. B., Greenberger V., Segal M. (1998)**

Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neuroscience*; 18:2550-2559

**Österlund M., Kuiper G. G. J. M., Gustafsson J. A., Hurd Y. L. (1998)**

Differential distribution and regulation of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA within the female brain. *Mol. Brain Res.*; 54:175-180

**Pike C. J. (2001)**

Testosterone attenuate  $\beta$ -amyloid toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.*; 919:160-165

**Pfrieger F. W. (2003)**

Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochemica et Biophysica Acta*; 1610:271-280

**Pfrieger F. W. (2003)**

Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *CMLS*; 60:1158-1171

**Prange-Kiel J., Rune G. M. (2006)**

Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience*;138(3):765-72

**Prange-Kiel J., Fester L., Zhou L., Lauke H., Carrétero J., Rune G. M. (2006)**

Inhibition of Hippocampal Estrogen Synthesis Causes Region-Specific Downregulation of Synaptic Protein Expression in Hippocampal Neurons. *Hippocampus*; 16:464-471

**Prange Kiel J., Wehrenberg U., Jarry H., Rune G. M. (2003)**

Para/Autocrine Regulation of Estrogen Receptor in Hippocampal Neurons. *Hippocampus*; 13:184-192

**Puddefoot J. R., Barker S., Glover H. R., Malouitre S. D. M., Vinson G. P. (2002)**

Non-competitive steroid inhibition of estrogen receptor functions. *Int. J. Cancer*; 101:17-22

**Revankar C. M., Cimino D. F., Sklar L. A., Arterburn J. B., Prossnitz E. R. (2005)**

A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling.

*Science*; 307:1625-1630

**Ross J. L., Roeltgen D., Stefanatos G. A., Feuillan P., Kushner H., Bondy C., Cutler Jr G. B. (2003).**

Androgen-responsive aspects of cognition in girls with Turner syndrome.

*J Clin Endocrinol Metab*; 88:292-296

**Rune G. M., Lohse C., Prange-Kiel J., Fester L., Frotscher M. (2006)**

Synaptic Plasticity in the Hippocampus: Effects of Estrogen from Gonads or Hippocampus?

*Neurochem Res*; 31:145-155

**Rune G. M., 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(1):167-75

**Sanghera M. K., Simpson E. R., McPhaul M. J., Kozlowski G., Conley A. J., Lephart E. D. (1991)**

Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*; 129:2834-2844

**Schmitz G., Orso E. (2001)**

Intracellular cholesterol and phospholipid trafficking: comparable mechanisms in macrophages and neuronal cells. *Neurochem. Res.*; 26:1045-1068

**Segal M., Murphy D. D. (2001)**

Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates.

*Horm Behav*; 40:156-159

**Shunghrue P. J., Merchenthaler I. (2000b)**

Estrogen is more than just a „sex hormone“: Novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Front Neuroendocrinol*; 21:95-101

**Shunghrue P. J., Merchenthaler I. (2001)**

Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system.

*J. Comp. Neurol.*; 436:64-81

**Stoffel-Wagner B (2001)**

Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol.*; 145:669-679

**Sugawara T., Holt J. A., Kiriakidou M., Strauss J. F. 3rd (1996)**

Steroidogenic factor-1 dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene; *Biochemistry*; 35:9052-9

**Tarsa L., Goda Y. (2002)**

Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *PNAS*; 99(2):1012-1016

**Toran-Allerand C. D., Singh M., Sétáló Jr. G. (1999)**

Novel mechanisms of oestrogen action in the brain: new players in an old story.

*Front Neuroendocrinol*; 20:97-121

**Wehrenberg U., Prange-Kiel J., Rune G. M. (2001)**

Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem*; 76:1879-1886

**Weiland N. G., Orikasa C., Hayashi S., McEwen B. S. (1997)**

Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol*; 388:603-612

**Wisniewski A. B., Nguyen T. T., Dobs A. S. (2002)**

Evaluation of high-dose estrogen and high-dose estrogen plus methyltestosterone treatment on cognitive task performance in postmenopausal women. *Horm Res*; 58:150-155

**Woolley C. S. (1999)**

Electrophysiological and cellular effects of estrogen on neuronal function. *Critical reviews in Neurobiology*; 13(1):1-20

**Woolley C. S., McEwen B. S. (1992)**

Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*; 12:2549-2554

**Woolley C. S., McEwen B. S. (1993)**

Roles of Estradiol and Progesterone in Regulation of Hippocampus Dendritic Spine Density During the Estrous Cycle in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*; 336:293-306

**Yaffe K., Lui L. Y., Zmuda J., Cauley J. (2002)**

Sex hormones and cognitive function in older men. *J Am Geriatr Soc*; 50:707-712

**Yeagle P. L. (1985)**

Cholesterol and the cell membrane. *Biochim.Biophys. Acta*; 822: 267-287

**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 I. H., Yen S. S. C. (1999)**

Neurosteroidogenesis in Astrocytes, Oligodendrocytes, and Neurons of Cerebral Cortex of Rat Brain. *Endocrinology*; 140(8):3843-3850



## Danksagung

---

Mein Dank gilt allen, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen danke ich Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune für die Überlassung des Themas und ihrer weitreichenden Unterstützung. Sie war immer für mich erreichbar und förderte meine wissenschaftliche Arbeit durch ihre engagierte Betreuung.

Ein großer Dank geht an die freundlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des anatomischen Instituts, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders danken möchte ich Helga Herbort, die mir während meiner Labortätigkeit eine wertvolle Unterstützung war und mich bei Fehlschlägen aufmunterte.

Ich danke Lars Fester für seine uneingeschränkte Hilfe bei der experimentellen Arbeit und dafür, dass er meine Fragen stets geduldig und kompetent beantwortete.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Janine Prange-Kiel und Nadine Lehan, die mir bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herzlich danken möchte ich Holger Rammelberg, der einen wesentlichen Anteil an der optischen Gestaltung der Arbeit hat und mir bei allen Herausforderungen mit dem PC professionell weiterhalf sowie Christine Schimanski und Andrea Bütow, die die vorliegende Dissertation gelesen und wertvolle Ratschläge gegeben haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die die Entstehung der Dissertation immer interessiert verfolgt haben und mir in schwierigen Situationen emotional beistanden.

## **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 Angabe (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.

.....

Andrea Bütow