

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Neuroanatomie

Direktorin: Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Die Beeinflussung von Proliferation und Apoptose hippocampaler Neurone durch Gonadotropin-Releasing-Hormon

Dissertation

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

vorgelegt von:

Julia-Theresa Hannig
geb. am 17.12.1985
in Halle/Saale

Hamburg, Dezember 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.02.2013**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Prange-Kiel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. G. Rune

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. P. Arck

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	1
II. Einleitung	4
II.1 Der Hippocampus.....	5
II.2 Hippocampale Estradiolsynthese	7
II.3 Inhibitoren der Estradiolsynthese.....	8
II.4 Wirkung von Estradiol im Hippocampus.....	9
II.5 Regelkreislauf der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse	11
II.6 Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH).....	12
II.7 GnRH-Antagonist Antide.....	13
II.8 Einfluss von GnRH auf Estradiolsynthese und synaptische Plastizität im Hippocampus	14
II.9 Fragestellung	14
III. Material und Methoden	15
III.1 Material	15
III.1.1 Arbeitsmaterialien und Geräte	15
III.1.2 Software	16
III.1.3 Chemikalien	16
III.1.4 Lösungen	17
III.2 Methoden	19
III.2.1 Präparation von Hippocampi neonataler Ratten.....	19
III.2.2 Hippocampale Dispersionskultur	19
III.2.3 Behandlung mit Letrozol, GnRH und Antide	20
III.2.4 Fixierung hippocampaler Dispersionskultur	21
III.2.5 Immunhistochemie	22
III.2.6 Apoptosetest TUNEL an hippocampalen Dispersionskulturen	23
III.2.7 Bildanalyse	24
III.2.8 Statistische Auswertung	25
IV. Ergebnisse	26
IV.1 Proliferationsrate hippocampaler Neurone	26
IV.1.1 Proliferationsrate unter dem Einfluss verschiedener GnRH Konzentrationen	26
IV.1.2 Proliferationsrate unter dem Einfluss von Letrozol	28

IV.1.3 Proliferationsrate unter dem Einfluss von Antide.....	29
IV.2 Apoptoserate hippocampaler Neurone	31
IV.2.1 Apoptoserate unter dem Einfluss verschiedener GnRH-Konzentrationen ..	31
IV.2.2 Apoptoserate unter dem Einfluss von Letrozol.....	32
IV.2.3 Apoptoserate unter dem Einfluss von Antide	33
V. Diskussion.....	35
V.1 Proliferation und Neurogenese hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von GnRH	35
V.2 Proliferation und Neurogenese hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Letrozol	38
V.3 Proliferation und Neurogenese hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Antide.....	41
V.4 Apoptoserate hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von GnRH	43
V.5 Apoptoserate hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Letrozol	44
V.6 Apoptoserate hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Antide.....	45
V.7 Wie gelangt GnRH in den Hippocampus?	47
VI. Zusammenfassung	48
VII. Literaturverzeichnis	49
VIII. Danksagung	56
IX. Lebenslauf	58
X. Eidesstattliche Versicherung	59

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BAX	Bcl-2-assoziiertes Protein x
BCL-X _L , -X _S	<i>b-cell lymphoma-x_L, -x_S</i>
BCL-2	<i>b-cell lymphoma-2</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-19 Methylgruppe	Methylgruppe an Kohlenstoffatom 19
CA1-4	Cornu ammonis Region 1-4
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Cy3	Indocarbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destillata (destilliert)
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
E2	17-β-Estradiol
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Estrogenrezeptor
et al.	et alii (und andere)
F _c -Fragment	<i>fragment crystalline</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
G _{0/1/2} -Phase	G für <i>gap</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GnRH-R	Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor
G-Protein	G für Guaninnukleotid-bindend
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure

HHG-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
3-β-HSD	3-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
17-β-HSD	17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
Ig	Immunglobulin
JPEG	<i>joint photographic experts group</i>
KCl	Kaliumchlorid
Ki-67	Antikörper, der proliferierende Zellen markiert, Ki für Kiel als Stadt des Ursprungs
KM	Kulturmedium
KO	<i>knock out</i>
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
M-Phase	Mitose-Phase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol (1 mol=6,023 x 10 ²³ Moleküle)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NGS	<i>normal goat serum</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Signifikanzniveau
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

pH	pondus Hydrogenii
pM	picomolar
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S-Phase	Synthese-Phase
SCC	<i>sidechain-cleavage-enzyme</i>
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
Tab.	Tabelle
TUNEL	<i>terminal desoxynucleotidyl mediated desoxyuridin triphosphat nick end labeling</i>
U	Umdrehung
UTHSCSA	<i>University of Texas Health Science Center San Antonio</i>
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

II. Einleitung

Aus der Grundlagenforschung wie auch aus verschiedenen klinischen Studien ist bekannt, dass Estrogene, neben ihrer Bedeutung für die weibliche Reproduktionsbiologie, zahlreiche neuroprotektive Eigenschaften haben. So vermindern Estrogene, insbesondere 17- β -Estradiol (E2), nicht nur das Risiko bestimmter Krankheiten, wie zum Beispiel Morbus Alzheimer (Paganini-Hill und Henderson, 1996), sondern verzögern auch deren Beginn und Verlauf (Henderson et al., 1994). Weiterhin scheinen Estrogene eine Rolle in der Genesung nach neurologischen Traumata, wie zum Beispiel eines Schlaganfalles, zu spielen (Garcia-Segura et al., 2001). Über die Beeinflussung verschiedener Neurotransmittersysteme nehmen die Estrogene auch Einfluss auf Kognition, Lernen und Gedächtnis (zur Übersicht siehe Prange-Kiel, 2006).

Somit sind die Estrogenwirkungen im Gehirn sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die angewandte Forschung von besonderem Interesse. Die Wirkungsweisen und –mechanismen der Estrogene im Gehirn wurden bislang vor Allem in Tierexperimenten und an Zellkulturmodellen untersucht. Darüber hinaus existieren aber auch Studien, die neuroprotektive Effekte von Estrogenen im menschlichen Gehirn vermuten lassen. Auf zellulärer Ebene beeinflussen Estrogene unter anderem Zellproliferation, Zellüberleben und Apoptose sowie Synapsenbildung und Axonwachstum von Neuronen.

Sehr intensiv sind neuroprotektive Effekte von Estrogenen auf den Hippocampus untersucht worden.

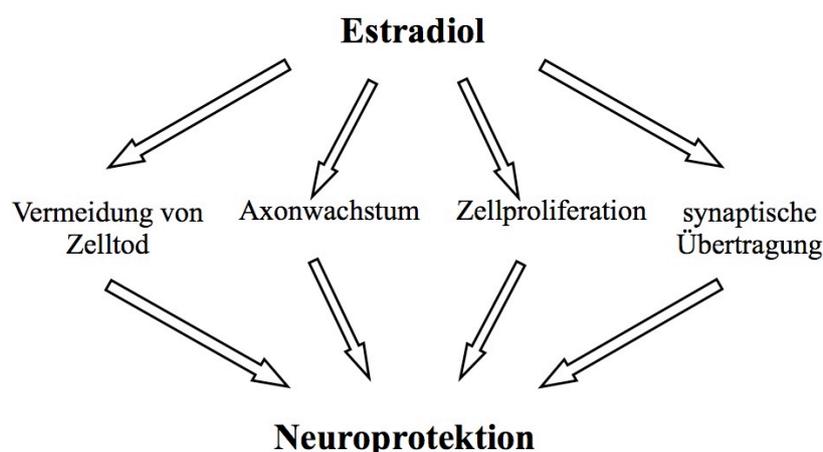


Abb. 1: Einfluss von Estradiol auf Neuroprotektion
Bildquelle: eigene Bearbeitung, nach: Garcia-Segura et al., 2001

II.1 Der Hippocampus

Der Hippocampus spielt eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung und nimmt Einfluss auf Emotionen. Außerdem kommen ihm als einem Teil des limbischen Systems wichtige Aufgaben beim Zustandekommen von Affektverhalten, Bewusstsein und Motivation zu.

Der Hippocampus bildet den Hauptanteil des Archikortex, einer stammesgeschichtlich älteren Region des Cortex cerebri. Der paarige Hippocampus befindet sich jeweils im Temporallappen beider Hemisphären und begrenzt das Seitenventrikelunterhorn medial. Das Endstück des Hippocampus bildet, nach vorne durch die Amygdala begrenzt, das Pes hippocampi. Der Hippocampus setzt sich nach posterior und superior in einem Bogen bis zum kaudalen Ende des Balkens fort. Unterhalb des Balkens geht die Fimbria des Hippocampus in die Faserstruktur des Fornix über, welcher bogenförmig über dem dritten Ventrikel nach vorne zieht und in den Corpora mamillaria (Abb. 2) endet.

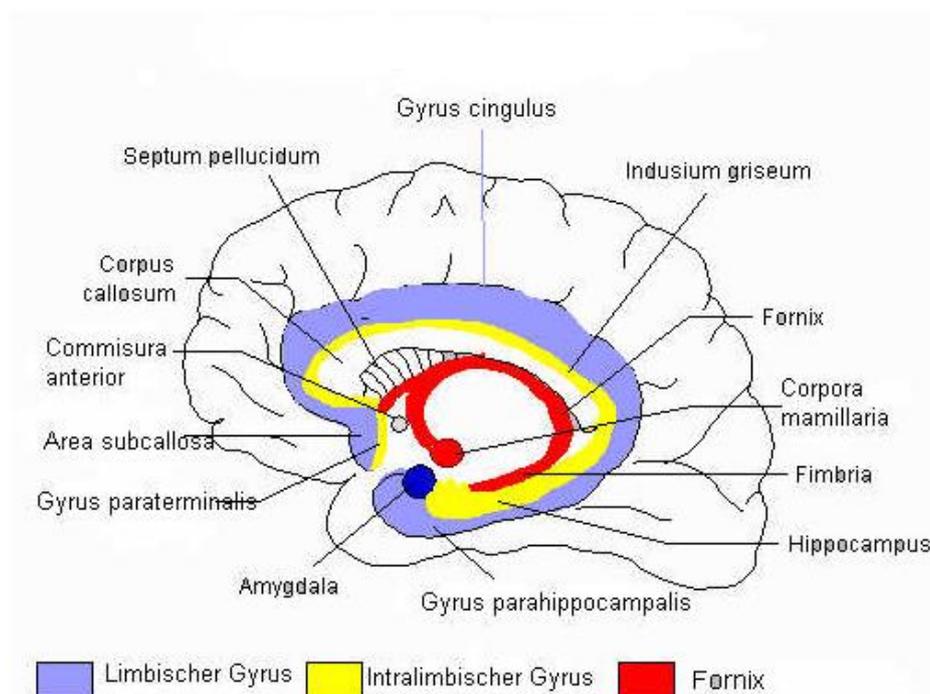


Abb. 2: Lage des Hippocampus im Sagittalschnitt
Bildquelle: <http://www.neuro24.de/bilder6/limbisch.jpg> [Stand: 22.05.2010]

Histologisch kann man den Hippocampus in Gyrus dentatus, Cornu ammonis, Subiculum und Präsubiculum gliedern (Abb. 3). Die Neurone sind in zwei sich umgreifenden C-förmigen Zellbändern, dem Körnerzellband des Gyrus dentatus und dem Pyramidenzellband des Cornu ammonis (CA) organisiert. Die kleinen Neurone des Gyrus dentatus, sogenannte

Körnerzellen, bilden ein dichtes Zellband, während die größeren, pyramidenförmigen Neurone des Cornu ammonis eher locker angeordnet sind. Bei Menschen wird das Pyramidenzellband aufgrund unterschiedlicher Anordnung und Größe der Neurone weiterhin in die Regionen CA1 - CA4 eingeteilt, während man bei Nagern in der Regel nur CA1 und CA3 unterscheidet. Das Cornu ammonis ist regelmäßig, vierschichtig aufgebaut: Oberflächlich gelegen befindet sich die Korbzellschicht (Stratum oriens). Darunter liegt die Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale), welche von den Perikarya der Pyramidenzellen gebildet wird. Es folgen nach innen Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare. In den beiden letztgenannten zellarmen, faserreichen Schichten findet vor allem die Verschaltung zuführender Axone auf die Dendriten der Pyramidenzellen statt. Viele der zuführenden Fasern des Hippocampus haben ihren Ursprung im entorhinalen Kortex und erreichen den Hippocampus über den angrenzenden Gyrus parahippocampalis, das Präsubiculum und das Subiculum (Abb. 3).

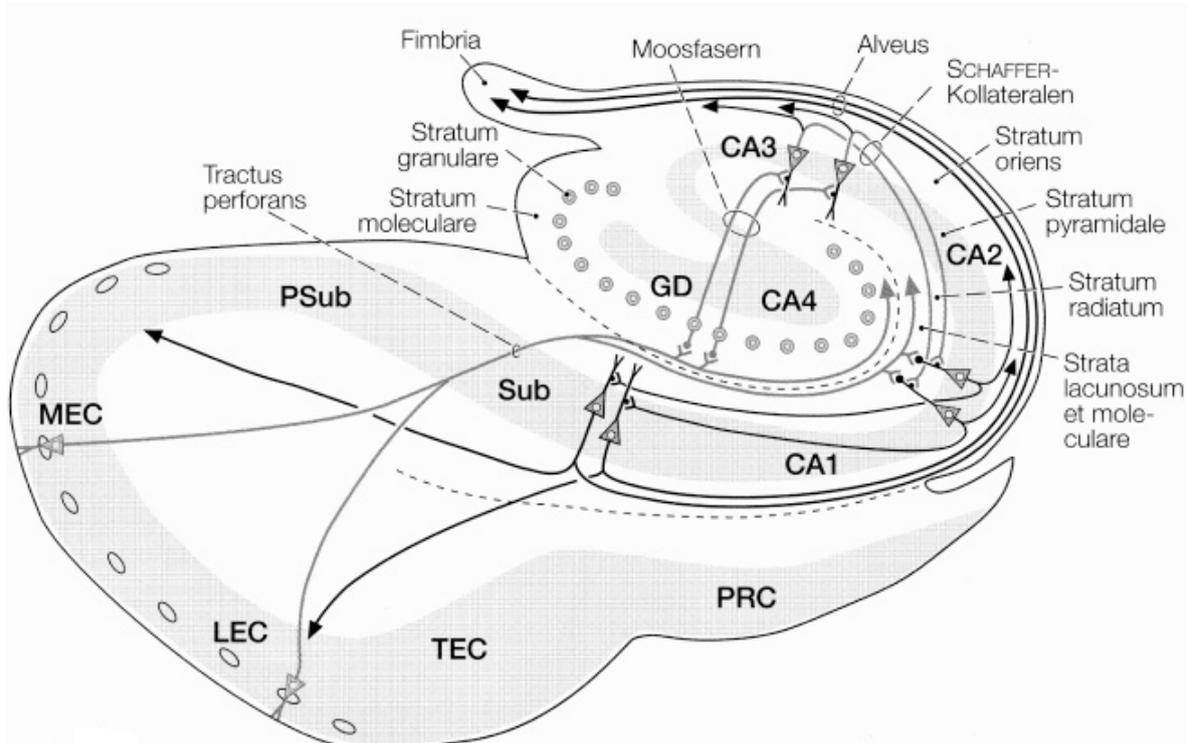


Abb. 3: Schematische Darstellung der Hauptverbindungswege im Hippocampus, Coronarschnitt
 Bildquelle: Benninghoff (2004, S. 503): Anatomie Bd. 2, Urban & Fischer Verlag
 Abkürzungen: GD: Gyrus dentatus, CA1-CA4: Cornu ammonis 1-4, Sub: Subiculum, PSub: Präsubiculum, MEC/LEC: medialer/lateraler entorhinaler Kortex, TEC: transentorhinaler Kortex, PRC: perirhinaler Kortex

II.2 Hippocampale Estradiolsynthese

Die Vorstellung, dass das zentrale Nervensystem (ZNS) nicht nur Zielorgan, sondern auch Syntheseort von Steroiden ist, stammt bereits aus dem Jahre 1971, als Naftolin erstmals die Aktivität des Enzyms Aromatase im ZNS beschrieb. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Androgenen zu Estrogen und somit die Umwandlung von Testosteron zu Estradiol (E2). In den letzten Jahren konnten in den Neuronen des Hippocampus alle zur Steroid-/Estradiolsynthese nötigen Enzyme nachgewiesen werden (Furukawa et al., 1998; Mellon et al., 2001; Stoffel-Wagner, 2001; Wehrenberg et al., 2001). Untersuchungen von Hojo et al. (2004) zeigten bei männlichen Ratten eine 6-fach höhere E2-Konzentration im Hippocampus als im Serum, was darauf hindeutet, dass der Hippocampus eine eigene Neurosteroidsynthese betreibt. Die Voraussetzung für die Steroidogenese ist die Verfügbarkeit von Cholesterin. Cholesterin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren (Björkhem und Meaney, 2004), aber der Cholesterinbedarf in diesem Gewebe ist sehr hoch. Folglich ist das Gehirn selbst in der Lage Cholesterin *de novo* zu synthetisieren. Wie auch in den Ovarien findet der erste Schritt der Estradiolsynthese in den Mitochondrien statt. Dazu wird das hydrophobe Cholesterin vom *steroidogenic acute regulatory protein (StAR)* durch die Mitochondrienmembran transportiert. An der inneren mitochondrialen Membran dient Cholesterin dem ersten Enzym der Steroidbiosynthese, *P-450 sidechain-cleavage-enzyme (SCC)*, als Substrat zur Pregnenolonsynthese. Die weiteren Syntheseschritte finden im endoplasmatischen Retikulum statt. Das Enzym 17- α -Hydroxylase (P-450_{C17}) wandelt das entstandene Pregnenolon irreversibel in Dehydroepiandrosteron (DHEA) um. In den folgenden Schritten entstehen nun die Androgene Androstendion und Testosteron. Das Enzym Aromatase (P-450_{aro}) katalysiert im letzten Schritt der Estradiolsynthese die Abspaltung der C-19-Methylgruppe und die Aromatisierung des A-Ringes und somit die Umwandlung von Testosteron zu 17- β -Estradiol (Abb. 4).

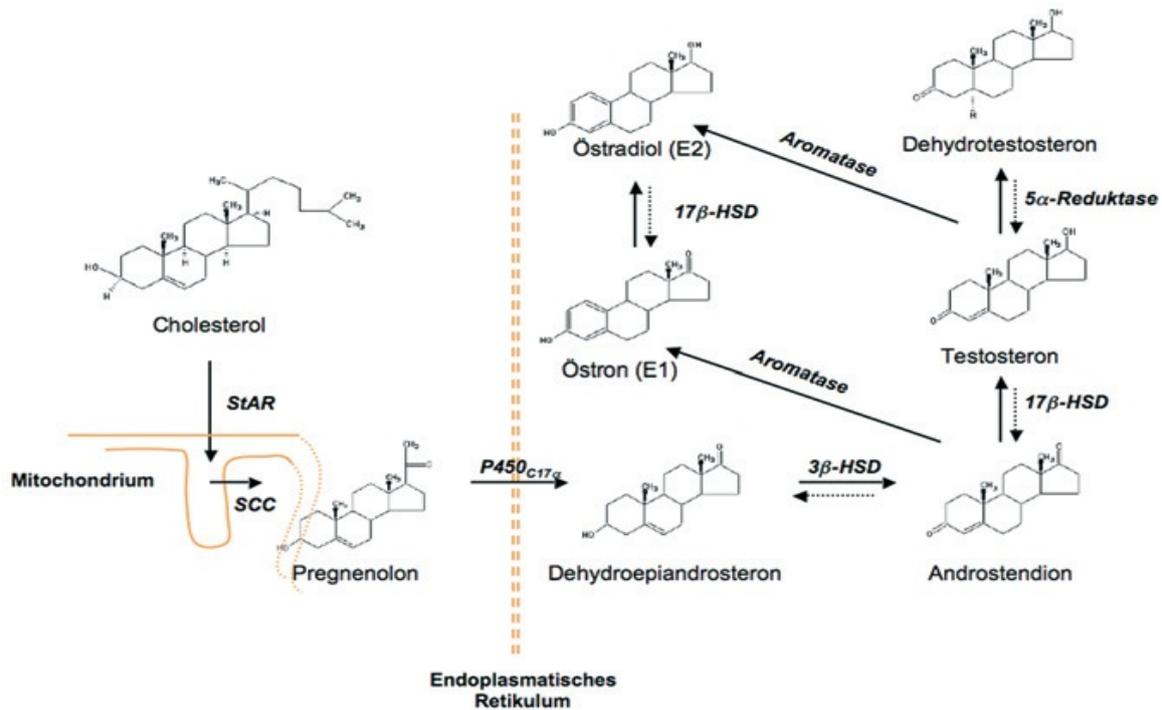


Abb. 4: Das Enzym Aromatase katalysiert im letzten Schritt der Estradiolsynthese die Umwandlung von Testosteron zu 17-β-Estradiol (E2). Bildquelle: Rune et al., 2007, S. 128

II.3 Inhibitoren der Estradiolsynthese

Um den letzten Schritt der Estradiolsynthese zu hemmen, kommen sogenannte nichtsteroidale reversible Aromataseinhibitoren zum Einsatz. Sie binden kompetitiv an eine Untereinheit der Aromatase und verhindern somit die Umwandlung von Testosteron zu 17-β-Estradiol. Zu ihren Vertretern gehören Aminoglutethimid (Orimeten®), Anastrozol (Arimidex®) und Letrozol (Femara®). Letrozol besitzt von allen zurzeit verfügbaren Aromataseinhibitoren die stärkste hemmende Wirkung und führt zu einer Abnahme der Serum-Estrogenspiegel um mehr als 95% (Koch und Gysling, 1999).

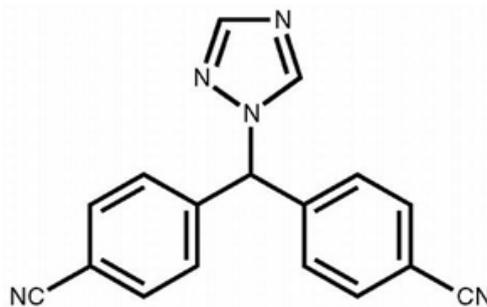


Abb. 5: Strukturformel von Letrozol
Bildquelle: <http://www.drugs.com/pro/femara.html> [Stand: 22.05.2010]

Im klinischen Alltag spielt Letrozol eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Mammakarzinomen. Viele der Tumore sind Estrogenrezeptor (ER)-positiv und Estradiol wirkt als ein Wachstumsstimulans für diese ER-positiven Tumore. Als Estrogensynthesehemmende Substanz, findet Letrozol in der Therapie fortgeschrittener metastasierter Mammakarzinome sowie in der Rezidivprophylaxe des Mammakarzinoms Verwendung (Gibson et al., 2007; Barnadas et al., 2011; Obiorah und Jordan 2011).

II.4 Wirkung von Estradiol im Hippocampus

Adulte Neurogenese

Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus von adulten Ratten wurde zum ersten Mal von Altman im Jahre 1962 beschrieben. Der Prozess der Neurogenese wird sowohl durch die Proliferation von neuronalen Stammzellen als auch durch das Heranreifen und Überleben dieser neu entstandenen Zellen zu Neuronen definiert. Der Zellzyklus der proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen ist präzise gesteuert und steht unter anderem unter dem Einfluss äußerer Faktoren, wie dem Vorhandensein eines ausreichenden Angebots an Nährstoffen, Enzymen und Wachstumsfaktoren. Das Überleben der Zellen ist abhängig von der darauffolgenden Differenzierung der Zellen (Galea, 2008). Dass Estradiol bei der adulten Neurogenese von Körnerzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus eine potentielle Rolle spielt, wurde bereits von Tanapat et al., (1999) beschrieben. Die Autoren zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Neurogenese hippocampaler Neurone mit dem Zyklus weiblicher Ratten korreliert und postulierten, dass gonadales Estradiol für diese Schwankungen der Neurogenese verantwortlich ist. Die Tatsache, dass hippocampale Neurone auch selbst Estradiol produzieren (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004), veranlassten Fester und Mitarbeiter (2006) dazu, den Einfluss hippocampal synthetisierten Estradiols auf adulte Neurogenese zu untersuchen. In ihren Experimenten mit Dispersionskulturen von Rattenhippocampi hatte zugefügtes Estradiol in einer Konzentration, welche der Konzentration im Serum der Tiere entsprach, keinen Einfluss auf die Neurogenese. Die Inhibierung der lokalen hippocampalen Estradiolsynthese mit dem Aromatasehemmer Letrozol führte jedoch zu einer reduzierten Proliferation hippocampaler Körnerzellen. Fester und Mitarbeiter schlussfolgerten, dass nicht gonadales E2, sondern im Hippocampus produziertes Estradiol die Neurogenese entscheidend beeinflusst.

Apoptose

Ein weiterer Aspekt estrogenabhängiger Neuroprotektion beinhaltet die Betrachtung von Apoptose hippocampaler Neurone. Unter Apoptose versteht man den programmierten Tod einer Zelle, welcher aktiv und genetisch kontrolliert abläuft. Es existieren zwei Signalwege, die im Prozess der Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Beim extrinsischen Weg kommt es zur Aktivierung von Membranrezeptoren, die auch „Todesrezeptoren“ genannt werden (Mak und Yeh, 1999; Hengartner, 2000), während beim intrinsischen Weg das Zusammenspiel der Proteine der BCL-2 (B-Zell Lymphom-2) Familie (Cory, 1995) sowie die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Cytoplasma (Liu et al., 1996) eine bedeutende Rolle spielen. Morphologische Änderungen, denen Zellen während des Apoptoseprozesses unterliegen, resultieren aus einer Aktivierung von Caspase-Kaskaden (Green, 1998). Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific proteases*) sind Proteasen, welche die Aminosäure Cystein in ihrem aktiven Zentrum haben. Spezifisch spalten sie Peptidbindungen der Aminosäure Aspartat und aktivieren im Apoptoseprozess letztlich eine Nuklease, ein Enzym zur Spaltung nukleärer DNA (*Desoxyribonucleic acid*). Bestimmte Stressoren, wie z.B. Hitze, Strahlung, Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration oder oxidativer Stress können Apoptose induzieren. Bezüglich estrogenen Wirkungen auf Apoptose existieren bereits viele Untersuchungen, in denen neuroprotektive Effekte von Estradiol gegenüber einer Vielzahl dieser Stressoren nachgewiesen werden konnten. *In vitro* erhöhte Estradiol zum Beispiel die Überlebensrate hippocampaler Neuronen-Kulturen, die dem Aminosäurederivat N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) ausgesetzt waren. Durch Blockade dieser Glutamat-Rezeptoren konnte Estradiol einen erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle verhindern (Weaver et al., 1997). Als Antioxidans schützte Estradiol hippocampale Neurone vor Lipidperoxidation (Vedder et al., 1999) sowie vor neurotoxischen β -Amyloid Effekten (Bonfont et al., 1998) und konnte so die Einleitung des Apoptoseprozesses verhindern. Der Einfluss hippocampalen Estradiols auf die Apoptoserate von Körnerzellen des Gyrus dentatus wurde von Fester und Mitarbeitern (2006) untersucht. Die Hemmung der lokalen E₂-Synthese durch den Aromatasehemmer Letrozol führte in hippocampalen Dispersionskulturen fünf Tage alter Ratten zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate, woraus Fester et al. schlussfolgerten, dass im Hippocampus lokal synthetisiertes Estradiol die Apoptoserate hippocampaler Neurone zu reduzieren vermag.

Lokal im Hippocampus synthetisiertes Estradiol scheint neben der Beeinflussung von Neurogenese und Apoptoserate hippocampaler Neurone (Fester et al., 2006) auch noch andere

Faktoren zu regulieren. So führte der Aromatasehemmer Letrozol in hippocampalen Slice- und Dispersionskulturen zu einer signifikanten Abnahme der Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus sowie zu einer signifikanten Reduktion der synaptischen Proteine Synaptophysin und Spinophilin (Kretz et al., 2004). Weiterhin regulierte Letrozol die Expression des GAP43 (*growth-associated protein 43*), einem Marker für Axonwachstum, signifikant herunter (von Schassen et al., 2006).

Effekte von lokal synthetisiertem E2 vs. E2 aus dem Serum

Es zeigt sich somit ein Widerspruch zwischen *in vivo* und *in vitro* Befunden bezüglich der Neurogenese: *in vivo* schwankt die Neurogenese zyklisch mit wechselnden E2-Serumspiegeln (Tanapat et al., 1999), wohingegen Befunde aus unserer Arbeitsgruppe deutlich zeigen, dass lokal im Hippocampus synthetisiertes E2 die Proliferation reguliert. Dieser Widerspruch lässt sich dadurch auflösen, dass man einen Faktor postuliert, der die zyklisch schwankenden E2-Serumspiegel mit der hippocampalen Estradiolsynthese synchronisiert. Ergebnisse von Prange-Kiel et al. (2008) haben gezeigt, dass Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) dieser Faktor sein könnte.

II.5 Regelkreislauf der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse

Die Produktion und Freisetzung ovarieller Estrogene unterliegt einem fein abgestimmten Regelkreislauf zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden. GnRH wird aus dem Hypothalamus freigesetzt (s. II.6) und führt zur Sekretion der Gonadotropine FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) aus der Hypophyse. Die Gonadotropine wirken auf die Ovarien und fördern dort die Bildung von Estrogenen und Gestagenen, die ihrerseits den menstruellen Zyklus steuern. Das von den Gonaden sezernierte Estrogen gelangt über die Blutbahn, gebunden an das Testosteron-Estrogen-bindende Protein, zum Hypothalamus und zur Hypophyse. Dort nimmt es, abhängig von der Phase des Menstruationszyklus, einen fördernden oder hemmenden Einfluss auf die Gewebe der Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse (HHG-Achse) und wirkt mittels positiver oder negativer Rückkopplung auf die Sekretion der Gonadotropine (Abb. 6).

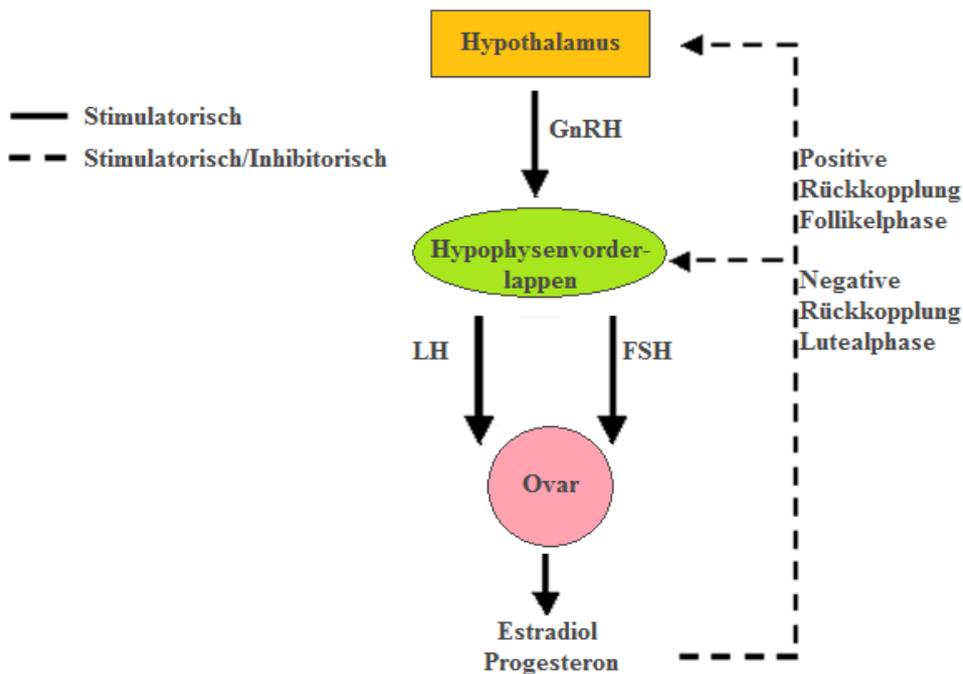


Abb. 6: HHG-Achse

Bildquelle: eigene Bearbeitung, nach: <https://webapp.walgreens.com/cePharmacy/programsHTML/images/Image28.gif> [Stand: 28.08.2010]

In der ersten Hälfte des weiblichen Zyklus (Follikelphase) bewirkt das FSH aus der Hypophyse das Heranreifen östrogenproduzierender Follikel im Ovar, wodurch der Estradiolspiegel ansteigt und durch eine positive Rückkopplung zum Hypothalamus und zur Hypophyse sowohl die GnRH-Ausschüttung als auch die FSH- und LH-Sekretion erhöht. In der zweiten Hälfte des Zyklus (Gelbkörperphase) führen Estradiol und Progesteron durch negative Rückkopplung zum Hypothalamus und zur Hypophyse zur Verminderung der FSH- und LH-Synthese und -Freisetzung (Abb. 6).

II.6 Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)

Bei dem Hormon GnRH handelt es sich um ein Dekapeptid, welches in den Nuclei preoptici des Hypothalamus gebildet wird. Die Fortsätze der GnRH-produzierenden Neurone enden an der Eminentia mediana an portalen Gefäßen, welche den Hypothalamus mit dem Hypophysenvorderlappen verbinden. So gelangt das GnRH an seine Zielzellen, die FSH- und LH-produzierenden gonadotropen Zellen. Die Ausschüttung von GnRH aus hypothalamischen Neuronen erfolgt pulsatil, in Abständen von 90-120 min, unter der Kontrolle des Nucleus arcuatus. Diese pulsatile Freisetzung hat eine große Bedeutung für die

FSH- und LH-Sekretion; die gonadotropen Zellen der Hypophyse müssen in regelmäßigen Abständen unter dem Einfluss von GnRH stehen, um physiologische Mengen an FSH und LH auszuschütten. Sowohl bei fehlenden GnRH-Pulsen als auch bei dauerhafter GnRH-Stimulation, kommt es zu einer Herunterregulation der GnRH-Rezeptoren (GnRH-R) in der Hypophyse, was zur Folge hat, dass die Hypophyse kein FSH und LH mehr ausschüttet (Schmidt et al., 2005).

Die Wirkungen von GnRH werden über einen GnRH-Rezeptor vermittelt, welcher zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus der Familie der 7-Transmembranrezeptoren gehört. G-Proteine sind Guaninnukleotid-bindende-Proteine mit einer zentralen Rolle in der Signalweiterleitung zwischen Rezeptoren und *second-messenger*-Systemen. Zwei Formen von GnRH und GnRH-Rezeptoren wurden bislang identifiziert. GnRH-I und sein Rezeptor Typ-I kommen nicht nur weit verbreitet im Zentralnervensystem vor (zur Übersicht Skinner et al., 2009), sondern auch in reproduktiven Geweben wie den Ovarien (Kang et al., 2001), dem Endometrium (Irmer et al., 1994), den Testes (Bahk et al., 1995) und der Prostata (Finch et al., 2008). Auch GnRH-II und der Typ-II-Rezeptor wurden beim Menschen unter anderem in den Ovarien (Choi et al., 2001) und im Endometrium (Cheon et al., 2001) nachgewiesen.

Von Stewart und Mitarbeitern (2009) konnte jedoch gezeigt werden, dass Laborratten und –mäuse keine funktionsfähigen Gene für GnRH-II oder den Typ-II-Rezeptor besitzen, weswegen sich unsere Untersuchungen auf das GnRH-I-System beschränken.

II.7 GnRH-Antagonist Antide

Während GnRH-Agonisten durch zunehmende Desensibilisierung die Anzahl an GnRH-Rezeptoren in der Zellmembran reduzieren, wirken GnRH-Antagonisten direkt über eine kompetitive Blockade des GnRH-Rezeptors (Parborell et al., 2005). Die Sekretion der Gonadotropine aus der Hypophyse wird unterdrückt, was folglich zu verminderten Estrogen- und Testosteronspiegeln führt. Anwendung finden GnRH-Agonisten und –Antagonisten in der Fortpflanzungsmedizin sowie bei malignen Erkrankungen. Im Gegensatz zu den Agonisten wirken die GnRH-Antagonisten sofort, was sich in einer kürzeren Behandlungsdauer und höherer Akzeptanz durch die Patienten widerspiegelt (Tan und Bukulmez, 2011). Der GnRH-Antagonist Antide ist ein Dekapeptid mit hoher Wirkungspotenz und langer Wirkdauer.

II.8 Einfluss von GnRH auf Estradiolsynthese und synaptische Plastizität im Hippocampus

Prange-Kiel und Mitarbeiter (2008) beobachteten in hippocampalen Dispersionskulturen einen dosisabhängigen Einfluss von GnRH auf die hippocampale Estradiolsynthese. Mittlere Dosen von GnRH (10 nM und 100 nM) führten dabei zu einer signifikanten Steigerung der Estradiolsynthese im Vergleich zur Kontrollgruppe, während unter hohen Dosen von 500 nM GnRH kein Unterschied in der Estradiolsynthese im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten war. Weiterhin war in hippocampalen Slicekulturen sowohl die Expression des postsynaptischen Proteins Spinophilin als auch die Synapsendichte in der CA1-Region des Hippocampus (Prange-Kiel et al., 2008) abhängig von GnRH. Mittlere Konzentrationen von GnRH führten dabei zu einer verstärkten Spinophilin-Expression sowie Synapsendichte, während die hohe Dosis von 500 nM GnRH keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Prange-Kiel und Mitarbeiter schlussfolgerten aus diesen Beobachtungen, dass GnRH die synaptische Plastizität im Hippocampus über die Regulierung der Estradiolsynthese beeinflusst.

II.9 Fragestellung

Bei Untersuchungen von Tanapat et al. (1999) korrelierte die hippocampale Neurogenese in weiblichen Ratten mit dem ovariellen Zyklus der Tiere. Versuche aus unserer Arbeitsgruppe hingegen haben gezeigt, dass lokal im Hippocampus synthetisiertes Estradiol die Proliferationsrate hippocampaler Neurone erhöht und die Apoptoserate reduziert, während zugefügtes Estradiol keinen Effekt auf diese Parameter hatte (Fester et al., 2006). Bereits in vorherigen Experimenten von Kretz et al., 2004 wurde beobachtet, dass auch synaptische Proteine und Synapsendichte über die Beeinflussung einer lokalen hippocampalen Estradiolsynthese reguliert werden. Prange-Kiel et al. (2008) konnten in ihren Experimenten zeigen, dass Gonadotropin-Releasing-Hormon dosisabhängig die E2-Synthese hippocampaler Neurone reguliert und weiterhin über diesen Mechanismus die synaptische Plastizität im Hippocampus reguliert. So könnte eine pulsatile GnRH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus nicht nur über die hypothalamo-hypophysär-gonadale Achse zu einer zyklusabhängigen E2-Sekretion aus den Gonaden führen, sondern auch zu einer dosisabhängig regulierten hippocampalen Estradiolsynthese. Gleichmaßen könnte GnRH über diese dosisabhängige Regulation der hippocampalen Estrogensynthese Einfluss auf die Neurogenese im Hippocampus nehmen. In der vorliegenden Dissertation soll untersucht werden, ob die Behandlung hippocampaler Dispersionskulturen mit GnRH zu einer Aromatase-vermittelten, dosisabhängigen Veränderung der Proliferations- und Apoptoserate führt.

III. Material und Methoden

III.1 Material

III.1.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

Aluminiumfolie	LAGER UKE
Brutschrank WTC	BINDER
Einwegskalpelle	BRAUN
Deckgläser 24×40 mm	MARIENFELD
Falcon Cell Strainer, 40 µm Nylon	BECTON DICKINSON
Falcon Tissue Cultur Plate, 24 well	BECTON DICKINSON
Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml	BECTON DICKINSON
Gefrierschrank, -25 °C und -80 °C	LIEBHERR
Glasplättchen, autoklaviert	ASSISTENT
Handschuhe	KIMBERLY-CLARK
Heidemannspatel	AESFULAP DE
Instrumentenkasten	MERCK
Kosmetiktücher Samtess	WEPA
Kühlschrank	BOSCH
Mikroskop Axiovert 2 mit AxioCam HRc	CARL ZEISS
Neubauer Zählkammern	BRAND GERMANY
Objektträger 75×25×1 mm	MARIENFELD
Parafilm M	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
Pasteurpipetten, 25 cm	MERCK
Petrischalen	FALCON
Pinzetten nach Dumont	MERCK
Pipetten, diverse Größen	GILSON
Pipettenspitzen, diverse Größen	BECTON DICKINSON
Rasierklingen	PILLING WECK
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	EPPENDORF AG
Scheren, diverse	AESFULAP DE
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Waage	SATORIUS

Wasserbad mit Schüttler	GFC
Zellstofftücher	WEPA
Zentrifuge Universal 32R	HETTICH

III.1.2 Software

Axio Vision 3.1	CARL ZEISS
Excel 2007	MICROSOFT
ImageTool 3.0 für Windows	UNIVERSITY OF TEXAS HEALTH SCIENCE CENTER SAN ANTONIO
Photoshop 7.0	ADOBE
PowerPoint 2007	MICROSOFT
See 5.0	ACD
Stata, Version 11.1	STATACORP LP
Windows Vista	MICROSOFT
Windows XP	MICROSOFT
Word 2007	MICROSOFT

III.1.3 Chemikalien

Anti-Ki67 Antikörper, monoklonal, Maus	DAKO
Antide	SIGMA
Aqua ad iniectabilia	BAXTER DEUTSCHLAND
B27 Supplement	GIBCO
Barrycidal 36, Desinfektionsmittel	HELMUT SCHRÖDER
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	GIBCO
Anti-mouse IgG, monoklonal, Ziege, Cy3-markiert	JACKSON IMMUNO RESEARCH
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO CYTOMATION
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	SIGMA
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK
Ethanol, 70 %	APOTHEKE UKE
Formaldehydlösung, 37 %	MERCK
Essigsäure	MERCK
GnRH	SIGMA
Kaliumchlorid	MERCK

Kaliumhydrogenphosphat	MERCK
L-Glutamin, 200 mM	GIBCO
Letrozol	NOVARTIS
Natriumacetat 0, 1 %	MERCK
Natriumchlorid	J. T. BAKER
Natronlauge	MERCK
Neurobasal A Medium	GIBCO
Neurobasal A Medium ohne Phenolrot	GIBCO
Ziegenserum (NGS), 2 %	SIGMA
PBS Tabletten	GIBCO
Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Poly-D-Lysin	SIGMA
Salzsäure	MERCK
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	INVITROGEN
Triton X-100; 0,1 %	UNITED STATES BIOCHEMICAL
Trypsin/EDTA	BIOCHROM
TUNEL Kit	ROCHE
Enzym Solution TdT	
Label Solution dUTP	

III.1.4 Lösungen

PBS (*phosphat-buffered saline*):

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

alternativ:

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

bFGF (human basic fibroblast growth factor) :

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

Kulturmedium für Dispersionskultur:

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

Beschichtung der 48-well Zellkulturplatten:

- ein rundes Glasplättchen in jede Kavität legen
- 600 µl Poly-d-Lysin (0,1 mg/ml Aqua dest.) pro Kavität
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur
- abpipettieren der Poly-d-Lysin Lösung und spülen mit Neurobasal A (mit Phenolrotzusatz), 1 ml pro Kavität
- mind. 1 h trocknen lassen bei Raumtemperatur
- Lagerung dicht mit Parafilm verschlossen bei 4 °C

Fixierungslösung (3,7 %):

- 5 ml Formaldehyd 37 %
- 45 ml PBS

III.2 Methoden

III.2.1 Präparation von Hippocampi neonataler Ratten

Für unsere Experimente verwendeten wir 5 Tage alte Ratten des Zuchtstammes *WISTAR*. Die Präparation der Hippocampi wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Ratten dekapitiert und die Haut mit einer feinen, geraden Schere vom Schädel entfernt. Im nächsten Schritt wurde das Schädeldach mit einer Schere median eröffnet und mit einer Pinzette nach rechts und links weggeklappt. Mit einem Heidemannspatel wurde das Gehirn entnommen und auf einen mit PBS (*phosphate buffered saline*) getränkten Schwamm gelegt. Es folgte die Entfernung des freiliegenden Hirnstammes und Kleinhirnes mit Hilfe eines Skalpell. Mit einem medianen Schnitt trennten wir anschließend die beiden Hemisphären, sodass die im Hirninneren liegenden Teile des Hirnstammes und das Diencephalon sichtbar wurden. Im weiteren Verlauf entnahmen wir diese Strukturen mit einem Heidemannspatel und legten so in beiden Hemisphären den Hippocampus frei. Anschließend präparierten wir die Hippocampi aus dem Gewebe und gaben sie in eine auf Eis gekühlte, mit PBS gefüllte Petrischale.

III.2.2 Hippocampale Dispersionskultur

Sowohl die Arbeit zur Vorbereitung als auch zur Herstellung hippocampaler Dispersionskultur fand unter einer sterilen Sicherheitswerkbank statt. Bei der Durchführung hielten wir uns an die Methode nach Brewer (Brewer, 1997) mit einigen Modifikationen nach Prange-Kiel (Prange-Kiel et al., 2003).

Die frisch präparierten Ratten-Hippocampi (vgl. III.2.1) wurden unter der Sicherheitswerkbank in eine große Petrischale überführt und PBS wurde hinzugegeben. Mit einer 25 ml Pipette saugten wir überschüssiges, nicht-hippocampales Hirngewebe und Erythrozyten auf. Anschließend zerkleinerten wir mit einer scharfen Klinge die Hippocampi, gaben neues PBS hinzu und überführten dann den Zellbrei mit ca. 50 ml PBS in ein 50 ml Falconröhrchen, welches bei 1000 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl Trypsin/EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*) pro Hippocampus resuspendiert. Es folgte ein 2,5-minütiger Verdau extrazellulärer Matrixproteine in einem 37 °C warmen Wasserbad unter mehrmaligem Schütteln. Um die Trypsinaktivität und damit den Verdau zu stoppen, gaben wir 20-25 ml Neurobasal A zur Zellsuspension. Wir filterten die Zellsuspension über ein Zellsieb mit 40 µm

Maschenweite in ein neues 50 ml Falconröhrchen um größere, unverdaute Gewebestückchen zu entfernen. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Neurobasal A auf 50 ml aufgefüllt und erneut bei 1000 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Auch nach dieser Zentrifugation verwarfen wir den Überstand und resuspendierten das Pellet. Diesmal allerdings mit 25 ml Neurobasal A Medium ohne Phenolrot, da es Untersuchungen gibt, die eine estrogenähnliche Wirkung von Phenolrot beschreiben (Berthois et al., 1986). Die Suspension wurde ein letztes Mal für weitere 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend gaben wir 20 ml Neurobasal A ohne Phenolrot auf das Pellet. Aus der entstandenen Zellsuspension entnahmen wir ca. 50 µl und bestimmten die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Abhängig von der ermittelten Zellzahl wurde die Suspension mit Neurobasal A ohne Phenolrot aufgefüllt, um eine Zelldichte von 100,000 Zellen/ml einzustellen. Die Kavitäten der am Vortag vorbereiteten Zellkulturplatte, die jeweils ein mit Poly-d-Lysin beschichtetes Deckgläschen enthielten, wurden mit je 1 ml Zellsuspension gefüllt. Um das Anheften der Zellen an die Glasplättchen zu gewährleisten, stellten wir die Zellkulturplatte für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ (Kohlendioxid) in den Brutschrank. Danach wurden die Glasplättchen mit den anhaftenden Zellen in eine neue, nicht vorbehandelte Zellkulturplatte überführt und pro Kavität 1 ml Neurobasal Kulturmedium (KM) hinzugefügt. Da die Gliazellen länger als 1h für die Anhaftung benötigen, werden durch dieses Vorgehen neuronale Zellen selektioniert.

Der erste KM-Wechsel wurde 24 h nach der Präparation durchgeführt. Dazu wurde die Zellkulturplatte zunächst vorsichtig an eine Tischkante gestoßen, um Debris zu lösen. Dann wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und neues zugegeben. Nach drei Tagen Vorkultur fanden ab dem vierten Tag weitere KM-Wechsel im 48 h Rhythmus insgesamt dreimal statt. Hierbei wurden die Zellen zusätzlich entweder mit GnRH, Letrozol oder Antide behandelt.

III.2.3 Behandlung mit Letrozol, GnRH und Antide

Nach drei Tagen Vorkultur waren die Zellen fest adhärirt und hatten Ausläufer gebildet, was mit dem Lichtmikroskop beurteilt werden konnte. Ab dem vierten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen.

Für die Inhibition der hippocampalen Estradiolsynthese behandelten wir die Zellkulturen mit 100 nM Letrozol. In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass diese Konzentration zu einer Hemmung der Estradiolsynthese hippocampaler Neurone führt (Prange-Kiel et al., 2003).

Die GnRH-Behandlung der Dispersionskulturen erfolgte mit drei verschiedenen Konzentrationen: 10 nM, 100 nM und 500 nM. In vorangegangenen Versuchen wurde bereits festgestellt, dass GnRH in den Konzentrationen 10 nM und 100 nM zu einer signifikanten Steigerung der Estradiolsynthese in hippocampalen Dispersionskulturen führt, während die Konzentration 500 nM zu keinem signifikanten Unterschied der Estradiolsynthese im Vergleich zur Kontrolle führt (Prange-Kiel et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die stimulierenden Effekte von GnRH (10 nM) auf die Estradiolsynthese hippocampaler Neurone durch die gleichzeitige Zugabe von Letrozol (100 nM) wieder aufgehoben werden (Prange-Kiel et al., 2008). Deshalb verwendeten wir in unseren Experimenten ebenfalls die Kombination von GnRH (10 nM) und Letrozol (100 nM) zur Behandlung der Dispersionskulturen.

In weiteren Versuchsreihen behandelten wir Zellkulturen mit dem GnRH-Antagonist Antide in einer Konzentration von 100 nM bzw. mit der Kombination von GnRH (10 nM) und Antide (100 nM). In vorherigen Experimenten führte die gleichzeitige Behandlung der Kulturen mit GnRH (10 nM) und Antide (100 nM) im Gegensatz zur alleinigen GnRH Behandlung, nicht zu einer erhöhten Estradiolsynthese, Antide (100 nM) allein hatte keinen Effekt auf die Estradiolsynthese hippocampaler Neurone (Prange-Kiel et al., 2008).

Bei allen Kulturen dienten unbehandelte Zellen als Kontrollen, so dass Veränderungen von Proliferation und Apoptose in hippocampalen Neuronen auf diese Kontrollzellen bezogen werden konnten.

III.2.4 Fixierung hippocampaler Dispersionskultur

Nach Behandlung der Kulturen am vierten, sechsten und achten Tag nach der Präparation wurden diese schließlich am elften Tag (8 Tage nach Behandlungsbeginn) mit Formaldehydlösung (3,7 % in PBS) fixiert. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und für 10 min durch die 3,7 %ige Formaldehydlösung ersetzt (500 µl/Kavität). Nach erfolgter Fixierung wurde noch einmal mit PBS für 10 min gespült (500 µl/Kavität). Anschließend pipettierten wir ein zweites Mal jeweils 500 µl PBS in die Kavitäten. Die kultivierten Zellkulturplatten wurden mit Parafilm fest verschlossen und konnten bei 4°C bis zur weiteren Analyse gelagert werden.

III.2.5 Immunhistochemie

Prinzip der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf Antigen-Antikörper-Reaktionen. Spezifische Zellbestandteile, wie z.B. Proteine können mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Die Proteine dienen als Antigene, an welche sog. Primärantikörper hochspezifisch binden. In einem zweiten Reaktionsschritt wird dann ein Sekundärantikörper eingesetzt, der spezifisch an das F_c -Fragment (*fragment crystalline*) des ersten Antikörpers bindet. Dieser Zweitantikörper ist fluorochrom-markiert. Die Fluoreszenz kann man mit Hilfe einer Quecksilberdampfampe und geeigneten Filtern bei entsprechender Wellenlänge anregen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten. In unseren Experimenten verwendeten wir einen Carbocyanin 3 (Cy3)-markierten Sekundärantikörper. Das Absorptionsmaximum von Cy3 liegt bei 550 nm und das Emissionsmaximum bei 570 nm (rot), (Dianova [online], 2005, S.4).

In unseren Experimenten verwendeten wir als Primärantikörper einen monoklonalen Maus-anti-Ratte Ki67-Antikörper (Antikörper, der proliferierende Zellen markiert, Ki für Kiel als Stadt des Ursprungs) in einer Verdünnung 1:500 in PBS. Das Ki67-Antigen ist ein zellulärer Proliferationsmarker und wird während des Zellzyklus in den Phasen $G_1/S/G_2$ (G =*gap*, S =*synthesis*) und M (=mitosis) exprimiert, während es in ruhenden Zellen, die sich in der G_0 -Phase befinden, nicht zu finden ist. So dient Ki67 der Darstellung der Wachstumsfraktion in Zellpopulationen. Als Sekundärantikörper nutzten wir einen Ziege-anti-Maus Cy3-Antikörper in einer Verdünnung 1:350 in PBS.

Durchführung der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie führten wir an den fixierten Zellkulturen durch. Im ersten Schritt wurden die Kavitäten 2×5 min mit PBS gespült (500 μ l/Kavität). Zur Sättigung unspezifischer Bindungen folgte die Blockierung der Kulturen mit 2%igem Ziegen Serum in PBS für 30 min (250 μ l/Kavität) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Glasplättchen aus der Blockierlösung genommen, auf Objektträger überführt und jeweils mit 40 μ l Primärantikörperlösung beschickt. Auf die Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers 40 μ l PBS pipettiert. Es erfolgte die Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag überführten wir die Glasplättchen zurück in die Kavitäten der Zellkulturplatte und spülten 3×10 min mit PBS. Jetzt inkubierten wir die Zellen für 60 Minuten im Dunkeln mit der lichtempfindlichen Sekundärantikörperlösung (250 μ l/Kavität). Auch danach wurden die Kavitäten wieder 3×5 min mit PBS gespült, bevor die

Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) stattfinden konnte. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung der Zellkerne eingesetzt wird. Er bindet spezifisch an adenin- und thymineiche DNA und hat im DAPI/DNA-Komplex sein Absorptionsmaximum bei 364 nm und sein Emissionsmaximum bei 454 nm (blau) (Sigma-Aldrich [online], 2011), so dass auch andere Fluoreszenzfarbstoffe mit langwelligeren Emissionsmaxima am selben Präparat eingesetzt werden können, ohne dass es zu Überschneidungen der Signale kommt. Jede Kavität der Zellkulturplatte wurde für 3 min mit 250 µl DAPI (Verdünnung 1:100 000 in PBS) inkubiert. Nach abschließendem Spülen mit PBS für 3×5 min überführten wir die Glasplättchen auf Objektträger und deckten sie mit einem Fluoreszenzmedium (DAKO) ein. Die Objektträger wurden unter Lichtabschluss im Kühlschrank gelagert.

III.2.6 Apoptosetest TUNEL an hippocampalen Dispersionskulturen

Prinzip des Apoptosetests

TUNEL steht für TdT-mediated dUTP Nick End Labeling und dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Die bei der Apoptose entstehenden DNS-Einzelfragmente werden hierbei an ihren freien 3'-OH-Enden mit Fluoreszein markiertem Desoxy-Uridin-Triphosphat (dUTP) versehen. Das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert dabei die Verknüpfung der Nukleotide. Fluoreszein ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 494 nm und einem Emissionsmaximum von 518 nm (grün) (Life Technologies Corporation [online], 2011).

Durchführung des Apoptosetests

Die fixierten Zellen in den Zellkulturplatten wurden zunächst für 3×10 min mit PBS (500 µl/Kavität) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X-100 in 0,1% Natriumacetat für 2 min auf Eis permeabilisiert (200 µl/Kavität). Es wurde nochmals für 2×5 min mit PBS gespült. Darauf folgte die Inkubation mit dem TUNEL-Reagenz. Die Glasplättchen wurden hierfür auf Objektträger überführt und mit dem TUNEL-Reagenz versehen. Die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) wurde in einer 1:8 Verdünnung mit der *Label Solution* gemischt, welche dann nochmal in einer 1:2 Verdünnung mit PBS gemischt wurde. Auf jedes Glasplättchen wurden 20 µl dieses TUNEL-Reagenz pipettiert. Die Negativkontrolle wurde mit 10 µl unverdünnter *Label Solution* (ohne TdT)

behandelt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer, um die Plättchen vor Austrocknung zu schützen. Im nächsten Schritt wurden die Glasplättchen wieder zurück in die Kavitäten der Zellkulturplatte überführt und 3×10 min mit PBS gewaschen. Es folgte die 3 minütige DAPI-Färbung (300 µl/Kavität), bevor im letzten Schritt nochmals für 3×10 min mit PBS gespült wurde. Jetzt konnten die Glasplättchen wieder auf die mit 70%igem Ethanol gereinigten Objektträger überführt werden und mit DAKO Fluoreszenzmedium eingedeckt werden.

III.2.7 Bildanalyse

Von den immunhistochemischen Färbungen und den Apoptosetests wurden pro Versuch jeweils eine Negativkontrolle, drei unbehandelte Kontrollen und drei Objektträger pro behandelter Gruppe mit dem Axioskop 2 betrachtet und mit Hilfe einer AxioCam HRc und dem zugehörigen Programm Axiovision 3.1 digital fotografiert. Die Objektträger wurden codiert, so dass bei der Auswertung keine Rückschlüsse auf Gruppenzugehörigkeit gezogen werden konnten. Von jedem Objektträger wurden dabei 20 zufällig gewählte Ausschnitte mit 400-facher Vergrößerung fotografiert. Die Negativkontrolle wurde nicht fotografiert, sondern diente lediglich zur Überprüfung des Ki67-Antikörpers und des TUNEL-Tests. Bei den immunhistochemischen Färbungen wurde von jedem Ausschnitt zuerst eine Aufnahme mit dem DAPI-Filtersatz gemacht, um alle vorhandenen Kerne zu erfassen. Anschließend wurde eine Aufnahme mit dem Cy3-Filtersatz gemacht, bei dem die Ki-67 positiven Zellen erfasst wurden. Alle Cy3-Aufnahmen wurden bei einer feststehenden Belichtungszeit von 1 s durchgeführt.

Um die Bilder auszuwerten, wurden sie mit der Software Adobe Photoshop in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt und als JPEG-Dateien abgespeichert.

Mit Hilfe des Programmes UTHSCSA ImageTool 3.0 wurde nun die Anzahl der Zellen auf jedem fotografierten Bild bestimmt. Mit der Option Treshold wurde ein Schwellenwert für die Zellzählung festgelegt, um die positiven Zellen standardisiert zählen zu können. Der ausgewählte Schwellenwert blieb für alle Untersuchungsgruppen gleich. Pro Zellkultur und behandelter Gruppe wurde die Anzahl Ki67- bzw. TUNEL-positiver Zellen zu der Anzahl DAPI-positiver Zellen desselben Bildausschnittes ins Verhältnis gesetzt und in einer Microsoft Office Excel Tabelle erfasst. Die Kontrollen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die prozentuellen Unterschiede der einzelnen Gruppen im Vergleich dazu bestimmt.

III.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Beratung durch Fr. Lena Herich, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg. Für jedes ausgewertete Bild wurde der Prozentsatz positiver Zellen errechnet. Die so ermittelten Prozentzahlen dienten als Grundlage für die statistische Auswertung des jeweils zu untersuchenden Parameters (Proliferations- bzw. Apoptoserate). Die Prozentzahlen wurden jeweils logarithmiert, um eine Normalverteilung der Daten zu erzielen. Anschliessend wurde eine Poisson Regression (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) mit gemischten Effekten und einem Faktor „Behandlung“ gerechnet. Die Analyse wurde mit dem Programm Stata, Version 11.1 durchgeführt. Die sich ergebenden Differenzen der Behandlungseffekte wurden in Prozent-Änderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle zurückgerechnet und im Ergebnisteil in Tabellenform sowie als Graphiken dargestellt (Kapitel IV Ergebnisse). Die errechneten Standardfehler wurden ebenfalls in Prozentwerte zurückgerechnet und als Fehlerbalken in den Graphiken aufgetragen. Das jeweilige „n“ ergibt sich aus der Anzahl der pro Versuchsgruppe ausgewerteten Bilder.

IV. Ergebnisse

IV.1 Proliferationsrate hippocampaler Neurone

IV.1.1 Proliferationsrate unter dem Einfluss verschiedener GnRH Konzentrationen

Um den Einfluss von GnRH auf die Proliferation hippocampaler Neurone zu untersuchen, behandelten wir hippocampale Dispersionskulturen für 8 Tage mit drei verschiedenen GnRH Konzentrationen. Nach Färbung der Zellen mit dem Ki67-Antikörper wurden von je drei Objektträgern pro behandelter Gruppe einer Kultur sowie der unbehandelten Kontrollen jeweils 20 mikroskopische Aufnahmen gemacht (= 60 Bilder pro Gruppe einer Zellkultur). Mit dem Computerprogramm ImageTool wurden dann die Ki67-markierten Zellen auf den fotografierten Objektträgerausschnitten gezählt und ins Verhältnis zu den DAPI markierten Zellen gesetzt. Die Kontrollen wurden anschließend 100 % gesetzt und der prozentuelle Unterschied der Gruppen zur Kontrolle berechnet. Die ermittelten Prozentzahlen dienten als Grundlage für die statistische Auswertung zur Untersuchung der Proliferationsrate. Um die Proliferationsrate nach statistischer Auswertung graphisch darzustellen, wurden dann die errechneten Differenzen der Behandlungseffekte in Prozent-Änderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle zurückgerechnet. Alle nachfolgenden Experimente wurden nach gleicher Methode beurteilt und ausgewertet.

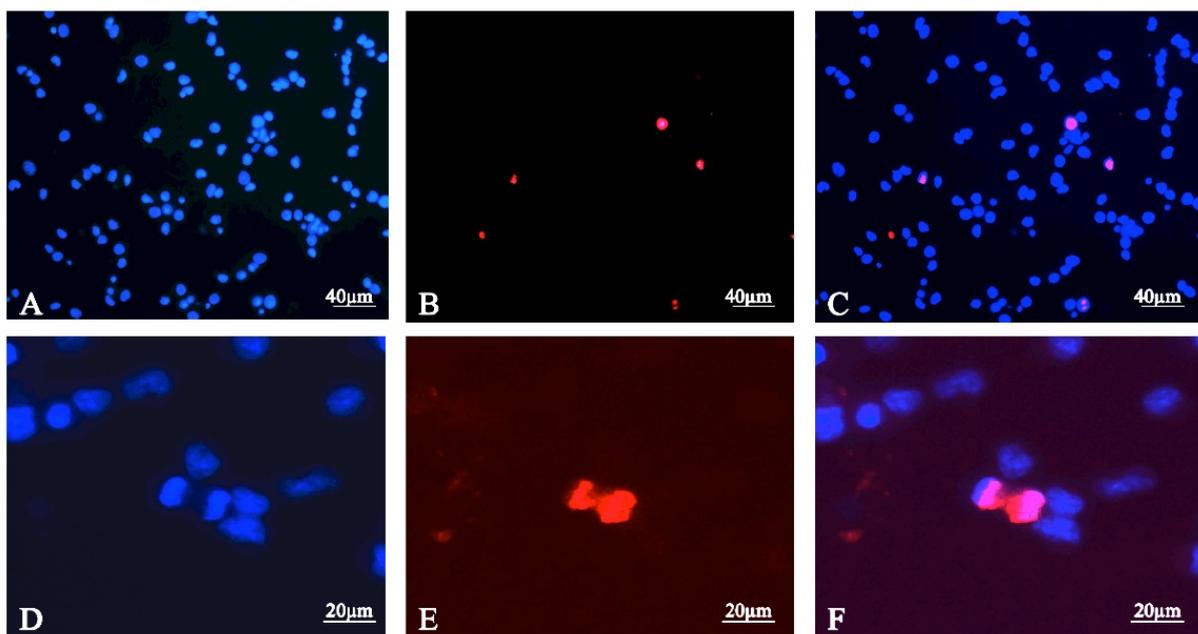


Abb. 7: Immunhistochemie an unbehandelten hippocampalen Dispersionskulturen mit Ki67-Antikörper. Dargestellt sind die gleichen Bildausschnitte bei A, B bzw. D, E sowie jeweils beide überlagert bei C, F. Kerne erscheinen blau (DAPI Färbung, A, D) und Ki67-positive Zellen erscheinen rot (Cy3, B, E).

Nach 8 Tagen Behandlung der Kulturen mit den verschiedenen GnRH Konzentrationen (10 nM, 100 nM und 500 nM) konnte bei allen drei Behandlungen ein signifikanter Unterschied in der Proliferation hippocampaler Neurone im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (s. Tab. 1, Abb. 8). Die Behandlung mit niedrigen (10 nM) und mittleren (100 nM) GnRH-Konzentrationen hob die Proliferationsrate an, während die hohe GnRH-Konzentration (500 nM) die Proliferationsrate reduzierte.

Tabelle 1 – Proliferationsrate unter dem Einfluss von GnRH

	8 Tage GnRH Behandlung		
	Proliferationsrate [%]	n	Standardfehler [%]
Kontrolle	100	480	-
10 nM GnRH	117,9	240	5,6
100 nM GnRH	135,8	180	5,4
500 nM GnRH	70,5	180	9,5

Tab. 1: Aufgelistet sind hier die Mittelwerte der Proliferationsrate in % nach GnRH Behandlung unterschiedlicher Konzentration gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit dazugehörigem n (= zur Zellzählung fotografierte Bildausschnitte aller Kulturen einer Behandlungsgruppe) und Standardfehler.

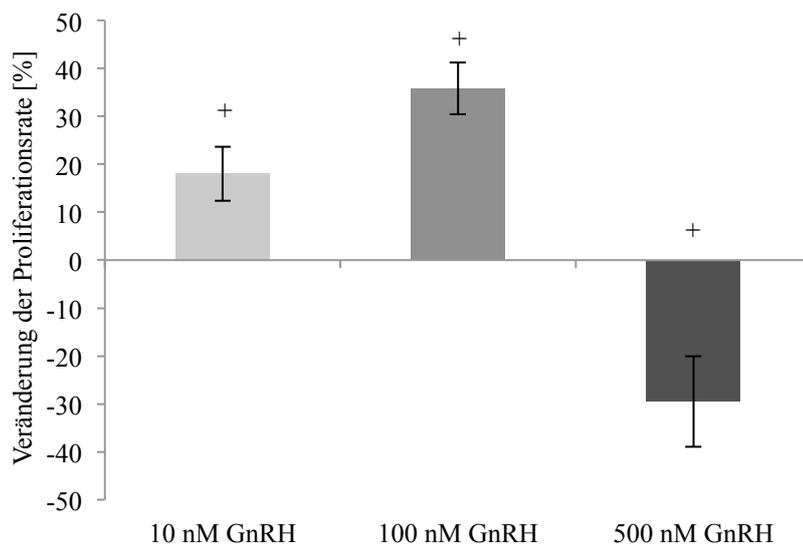


Abb. 8: Änderung der Proliferationsrate hippocampaler Neurone in % nach 8 Tagen Behandlung mit GnRH (10 nM, 100 nM und 500 nM) gegenüber der Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. (+)= Signifikanz ($p \leq 0,05$)

IV.1.2 Proliferationsrate unter dem Einfluss von Letrozol

In diesem Experiment wurde die Proliferationsrate hippocampaler Neurone unter dem Einfluss des Aromataseinhibitors Letrozol bestimmt. Auch bei diesem Experiment wurde jede Versuchsreihe für 8 Tage behandelt. Die Zugabe von 100 nM Letrozol zu unseren Dispersionskulturen führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate (Tab. 2, Abb. 9). Zusätzlich zu der mit Letrozol behandelten Gruppe, behandelten wir einige Kulturen mit Letrozol (100 nM) + GnRH (10 nM). Die Kombination aus Aromatasehemmer plus GnRH in niedriger Konzentration führte im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Veränderung in der Proliferationsrate. Die GnRH-induzierte Anhebung der Proliferationsrate konnte jedoch durch die Kombination GnRH und Letrozol geblockt werden (Tab. 2, Abb. 9).

Tabelle 2 – Proliferationsrate unter dem Einfluss von GnRH und Letrozol

	8 Tage GnRH;Letrozol;Letrozol+GnRH Behandlung		
	Proliferationsrate [%]	n	Standardfehler [%]
Kontrolle	100	480	-
10 nM GnRH	117,9	240	5,6
100 nM Letrozol	61,2	300	7,1
10 nM GnRH + 100 nM Letrozol	86,2	180	9,1

Tab. 2: Mittelwerte der Proliferationsrate in % unter 10 nM GnRH, 100 nM Letrozol und 100 nM Letrozol + 10 nM GnRH mit dazugehörigem n (= zur Zellzählung fotografierte Bildausschnitte aller Kulturen einer Behandlungsgruppe) und Standardfehler.

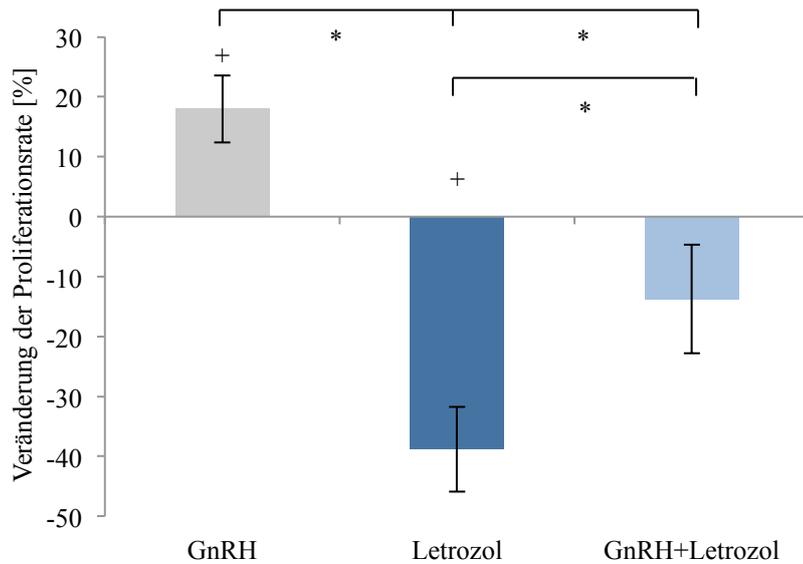


Abb. 9: Änderung der Proliferationsrate hippocampaler Neurone in % nach 8 Tagen Behandlung mit 10 nM GnRH, 100 nM Letrozol und 100 nM Letrozol + 10 nM GnRH im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler, (*)= Gruppen sind untereinander signifikant verschieden ($p \leq 0,05$), (+)=signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

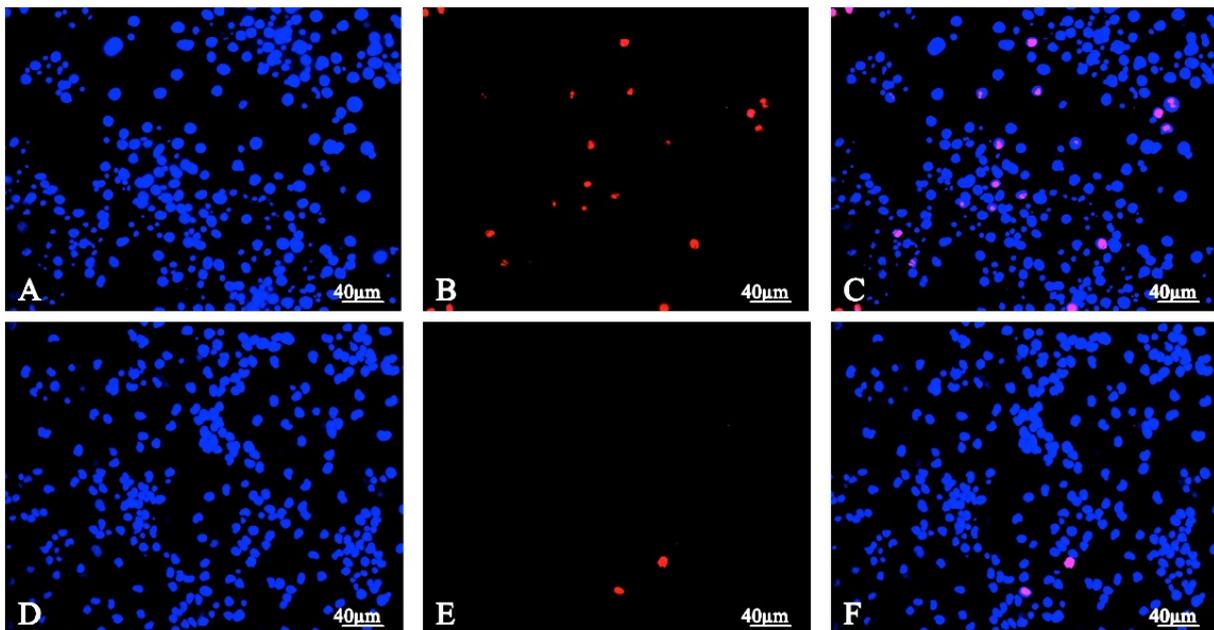


Abb. 10: Immunhistochemien an Dispersionskulturen mit Ki67-Antikörper unter GnRH-Einfluss (10 nM) (A, B, C) und unter Letrozol-Einfluss (D, E, F). Kerne erscheinen blau (DAPI Färbung, A, D) und Ki67-positive Zellen erscheinen rot (Cy3, B, E). Bild C: A u. B überlagert; F: D u. E überlagert. Die Behandlung mit Letrozol senkt den Anteil Ki67-positiver Zellen (E) im Vergleich zur Behandlung mit GnRH (10 nM) signifikant (B).

IV.1.3 Proliferationsrate unter dem Einfluss von Antide

Um zu testen, ob der zuvor gezeigte GnRH-Effekt spezifisch war, behandelten wir hippocampale Dispersionskulturen für 8 Tage zusätzlich mit dem GnRH-Antagonisten Antide

(100 nM). Die Kombination von GnRH (10 nM) und Antide (100 nM) führte dabei zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate (Tab. 3, Abb. 11), was die spezifische Wirkung von GnRH auf die Proliferationsrate zeigt. Auch die alleinige Behandlung der Kulturen mit Antide führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate (Tab. 3, Abb. 11).

Tabelle 3 – Proliferationsrate unter dem Einfluss von GnRH und Antide

	8 Tage GnRH;Antide;Antide + GnRH Behandlung		
	Proliferationsrate [%]	n	Standardfehler [%]
Kontrolle	100	480	-
10 nM GnRH	117,9	240	5,6
100 nM Antide	59,1	240	10,6
10 nM GnRH + 100 nM Antide	71,5	180	13,2

Tab. 3: Mittelwerte der Proliferationsrate in % unter 10 nM GnRH, 100 nM Antide und 100 nM Antide + 10 nM GnRH mit zugehörigem n (= zur Zellzählung fotografierte Bildausschnitte aller Kulturen einer Behandlungsgruppe) und Standardfehler.

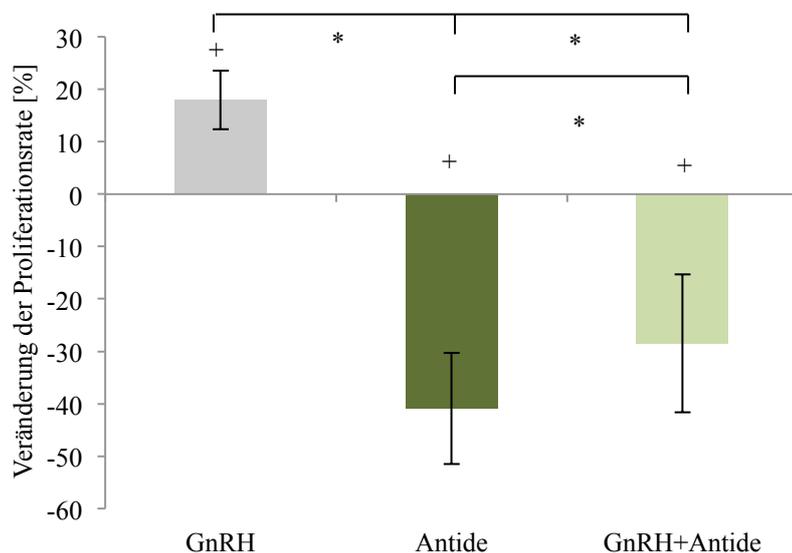


Abb. 11: Änderung der Proliferationsrate hippocampaler Neurone in % nach 8 Tagen Behandlung mit 10 nM GnRH, 100 nM Antide und 100 nM Antide + 10 nM GnRH im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. (*)= Gruppen sind untereinander signifikant verschieden ($p \leq 0,05$), (+)=signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

IV.2 Apoptoserate hippocampaler Neurone

IV.2.1 Apoptoserate unter dem Einfluss verschiedener GnRH-Konzentrationen

Um zu testen, ob GnRH einen Einfluss auf die Apoptose hippocampaler Neurone hat, führten wir mit den Zellkulturen einen TUNEL Apoptosetest durch. Jeweils 3 Kavitäten einer Zellkulturplatte wurden mit den unterschiedlichen Konzentrationen von GnRH (10, 100 und 500 nM) behandelt und dann für den Apoptosetest verwendet wurden. Die Zellen wurden nach Abschluß der Färbung unter dem Mikroskop betrachtet und pro Objektträger 20 Ausschnitte fotografiert und ausgewertet (= 60 Bilder pro Gruppe einer Zellkultur).

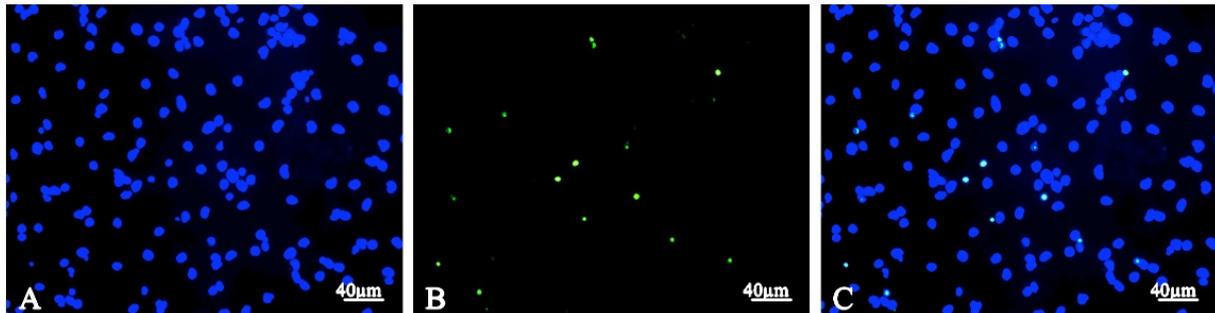


Abb. 12: TUNEL-Apoptosetest an unbehandelter hippocampaler Dispersionskultur. Kerne erscheinen blau (DAPI Färbung, A) und TUNEL-positive Zellen erscheinen grün (Fluoreszein, B). A u. B überlagert ist in Bild C zu sehen.

Die achttägige Behandlung hippocampaler Dispersionskulturen mit den verschiedenen GnRH-Konzentrationen (10 nM, 100 nM und 500 nM) zeigte in allen drei Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede in der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle. Unter niedrigen und mittleren GnRH Konzentrationen war die Apoptoserate hippocampaler Neurone reduziert, während die hohe GnRH-Konzentration zu einer Steigerung der Apoptoserate führte (Tab. 4, Abb. 13).

Tabelle 4 – Apoptoserate unter dem Einfluss von GnRH

	8 Tage GnRH Behandlung		
	Apoptoserate [%]	n	Standardfehler [%]
Kontrolle	100	600	-
10 nM GnRH	87,2	360	1,2
100 nM GnRH	88,2	300	1,6
500 nM GnRH	113,6	300	1,9

Tab. 4: Gezeigt sind hier die Mittelwerte der Apoptoserate in % nach Behandlung mit GnRH unterschiedlicher Konzentration mit zugehörigem n (= zur Zellzählung fotografierte Bildausschnitte aller Kulturen einer Behandlungsgruppe) und Standardfehler.

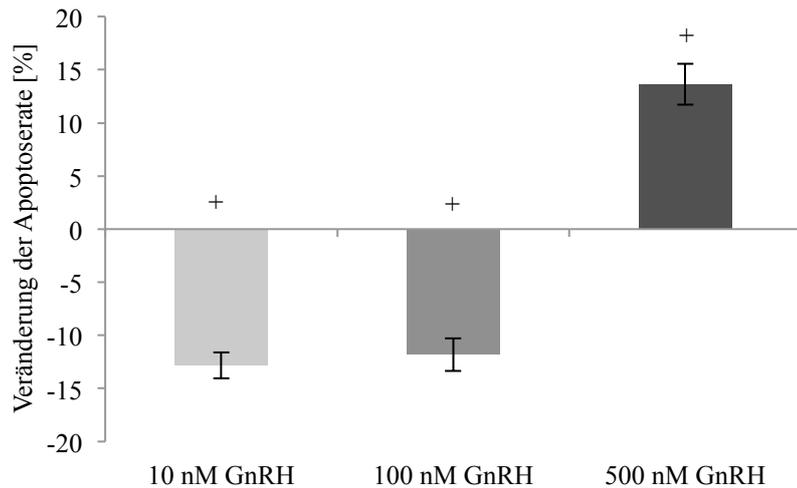


Abb. 13: Änderung der Apoptoserate hippocampaler Neurone in % nach GnRH Behandlung verschiedener Konzentration (10 nM, 100 nM und 500 nM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. (+) = signifikant zur Kontrolle ($p \leq 0,05$)

IV.2.2 Apoptoserate unter dem Einfluss von Letrozol

Bei diesen Experimenten testeten wir die Apoptoserate der Dispersionskulturen unter dem Einfluss des Aromatasehemmers Letrozol. Wie bei den Proliferationsexperimenten, setzten wir hier Letrozol mit einer Konzentration von 100 nM ein. Die Apoptoserate hippocampaler Neurone war nach Letrozolbehandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant gesteigert. Die GnRH induzierte Senkung der Apoptoserate wurde durch die Kombination von GnRH und Letrozol wieder aufgehoben (Tab. 5, Abb. 14).

Tabelle 5 – Apoptoserate unter dem Einfluss von GnRH und Letrozol

	8 Tage GnRH;Letrozol;Letrozol+GnRH Behandlung		
	Apoptoserate [%]	n	Standardfehler [%]
Kontrolle	100	600	-
10 nM GnRH	87,2	360	1,2
100 nM Letrozol	126,5	300	1,7
10 nM GnRH + 100 nM Letrozol	97,1	180	2,4

Tab. 5: Gezeigt sind hier die Mittelwerte der Apoptoserate in % nach Behandlung mit 10 nM GnRH, 100 nM Letrozol und 100 nM Letrozol + 10 nM GnRH mit zugehörigem n (= zur Zellzählung fotografierte Bildausschnitte aller Kulturen einer Behandlungsgruppe) und Standardfehler.

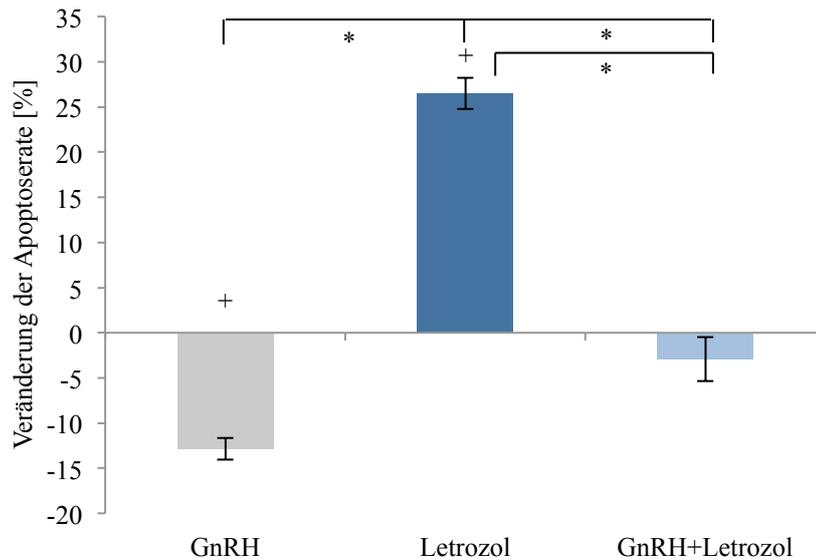


Abb. 14: Änderung der Apoptoserate hippocampaler Neurone in % nach 8 Tagen Behandlung mit 10 nM GnRH, 100 nM Letrozol und 100 nM Letrozol + 10 nM GnRH im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. (*)= Gruppen sind untereinander signifikant verschieden ($p \leq 0,05$) (+)=signifikant im Vergleich zur Kontrolle

IV.2.3 Apoptoserate unter dem Einfluss von Antide

Um die Apoptoserate unter dem GnRH-Antagonist Antide beurteilen zu können, führten wir an den Dispersionskulturen nach achttägiger Behandlung mit 100 nM Antide und 100 nM Antide + 10 nM GnRH einen TUNEL Test durch. Die Kombination von Antide und GnRH zeigte eine signifikante Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Reduktion der Apoptoserate unter alleiniger GnRH-Behandlung wurde durch die Kombination von Antide und GnRH wieder signifikant gesteigert, was spezifische Wirkungen von GnRH, auch auf die Apoptoserate, zeigt. Die alleinige Behandlung der Kulturen mit Antide führte ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate (Tab. 6, Abb. 15).

Tabelle 6 – Apoptoserate unter dem Einfluss von GnRH und Antide

	8 Tage GnRH;Antide;Antide + GnRH Behandlung		
	Apoptoserate [%]	n	Standardfehler [%]
Kontrolle	100	600	-
10 nM GnRH	87,2	360	1,2
100 nM Antide	118,2	240	2,5
10 nM GnRH + 100 nM Antide	110,3	180	3,4

Tab. 6: Mittelwerte der Apoptoserate in % unter 10 nM GnRH, 100 nM Antide und 100 nM Antide + 10 nM GnRH mit dazugehörigem n (= zur Zellzählung fotografierte Bildausschnitte aller Kulturen einer Behandlungsgruppe) und Standardfehler.

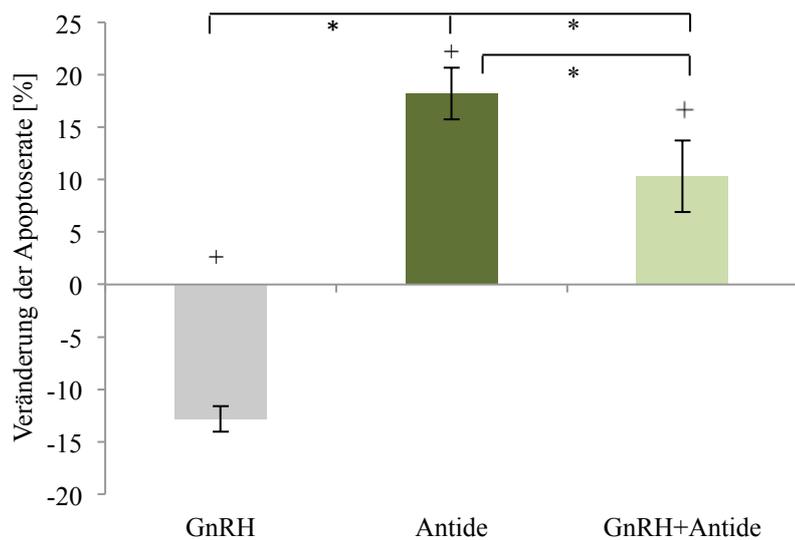


Abb. 15: Änderung der Apoptoserate hippocampaler Neurone in % nach 8 Tagen Behandlung mit 10 nM, 100 nM Antide und 100 nM Antide plus 10 nM GnRH im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. (*)=signifikant ($p \leq 0,05$), (+)=signifikant zur Kontrolle

V. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob GnRH Proliferation und Apoptose von hippocampalen Neuronen beeinflusst und ob diese Regulation über die Regulierung der neuronalen Estradiolsynthese erfolgt.

V.1 Proliferation und Neurogenese hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von GnRH

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass GnRH einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation hippocampaler Neurone nimmt, wobei die Effekte konzentrationsabhängig waren (vgl. Abb. 8). GnRH in den Konzentrationen von 10 nM und 100 nM fördert dabei die Proliferation hippocampaler Neurone, während GnRH in der Konzentration von 500 nM den umgekehrten Effekt hat. GnRH-Bindungsstellen und GnRH-R-mRNA (*messenger ribonucleic acid*) konnten bereits in einer Vielzahl von Geweben wie dem Endometrium, den Ovarien und den Testes sowie auch in der Harnblase, Niere, Leber und im Herz (zur Übersicht siehe Skinner et al., 2009) nachgewiesen werden. Auch im Zentralnervensystem, speziell im Hippocampus von Ratten, zeigten schon einige Experimente sowohl GnRH-Bindungsstellen (Badr und Pelletier, 1987; Reubi et al., 1987; Jennes et al., 1988; Leblanc et al., 1988) als auch GnRH-R-mRNA (Jennes und Woolums, 1994; Prange-Kiel et al. 2008). Die GnRH-Rezeptor-mRNA Expression im Hippocampus adulter Ratten ist dreimal höher als im Hypothalamus und fünfmal höher als im Neocortex, was darauf hindeutet, dass besonders der Hippocampus sensitiv gegenüber GnRH ist (Prange-Kiel et al. 2008).

Während beim Menschen zwei verschiedene GnRH-Systeme (GnRH-I und GnRH-R-I, sowie GnRH-II und GnRH-R-II) beschrieben sind, scheint bei Nagern nur das GnRH-I-System aktiv zu sein. Genomsequenzanalysen von Laborratten und Mäusen zeigten nämlich, dass die Gene sowohl für GnRH-II als auch für den GnRH-II-Rezeptor nicht auf den für das GnRH-II-System relevanten Chromosomenabschnitten vorhanden sind (Pawson et al., 2003; Morgan und Millar, 2004). Die Inaktivierung der GnRH-II- und GnRH-II-Rezeptor-Gene lassen sich durch das Vorhandensein von Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen im Genom erklären (Stewart et al., 2009). Entsprechend kann an unserem Zellkulturmodell nur das GnRH-I-System untersucht werden.

Ursprünglich wurde GnRH als ein Dekapeptid im Hypothalamus identifiziert, welches die Freisetzung der Gonadotropine FSH und LH aus der Hypophyse bewirkt (Matsuo et al., 1971; Amoss et al., 1971). Neben der Beeinflussung der HHG-Achse, scheint GnRH auch

extrahypothalamisch eine Rolle zu spielen. Entsprechend der Tatsache, dass verschiedene Gewebe GnRH-Rezeptoren exprimieren, wurde in vielen dieser Gewebe auch eine GnRH-Funktion nachgewiesen. Genannt sei hierfür z.B. die Beeinflussung der Follikelreifung in den Ovarien und der Spermatogenese in den Testes (Hsueh und Schaeffer, 1985). Am Herzen beeinflusste GnRH positiv die Kontraktilität von Kardiomyozyten (Dong et al., 2011) und an der Harnblase weiblicher Hunde förderte es die Kontinenz (zur Übersicht Skinner et al., 2009).

In verschiedensten Geweben und Zelllinien wurde gezeigt, dass GnRH auch die Proliferation beeinflusst. Besonders gut untersucht ist dieser Zusammenhang in den Granulosazellen im Ovar. Inhibitorische Effekte von GnRH wurden von Takekida et al. (2003) an Granulosazellen von Schweinen gefunden. Sie zeigten in ihren Untersuchungen, dass unreife Granulosazellen kleiner und mittelgroßer Follikel unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten eine verringerte Proliferation aufwiesen, während reife Granulosazellen keine Veränderungen in der Proliferationsrate aufwiesen. Die antiproliferative Beeinflussung war dabei dosisabhängig. Die geringste Dosis von 10 pM GnRH-Agonist hatte dabei noch keinen Effekt, während 1 nM GnRH-Agonist bereits zu einer signifikanten Senkung der Proliferation führte. Die höchste von Takekida und Mitarbeitern genutzte Konzentration von 100 nM wirkte am stärksten antiproliferativ. Auch auf humane ovarielle Granulosazellen wirkte die GnRH-Konzentration von 100 nM antiproliferativ, wie Untersuchungen von Hong et al. (2008) zeigten. Damit hat GnRH im Hippocampus der Ratte einen umgekehrten Effekt auf die Proliferation als im Ovar von anderen Säugern.

In anderen Zelltypen, z.B. Thymozyten, Splenozyten und Lymphozyten (Marchetti et al., 1989; Batticane et al., 1991; Azad et al., 1997) hat GnRH, wie in unseren hippocampalen Neuronenkulturen, fördernde Wirkungen auf die Zellproliferation. Gewebeunterschiede können somit als Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Effekte von GnRH auf die Proliferation dienen. Besonders bei Tumorzellen zeigen sich deutliche Gewebeunterschiede im Hinblick auf GnRH-regulierte Proliferation (Batticane et al., 1991; Azad et al., 1997; Enomoto et al., 2004) (zur Übersicht White et al., 2008). In Experimenten von Enomoto et al. (2004) wirkte GnRH auf humane Endometriumkarzinomzellen antiproliferativ, während es auf humane Prostatakarzinomzellen und leukämische Zelllinien proliferativ wirkte. Auf welche Art und Weise GnRH diese gegensätzlichen Effekte hervorruft ist bislang ungeklärt und bleibt weiterhin Gegenstand vieler Untersuchungen.

Vor allem die Untersuchungen von Enomoto et al. (2004) legen nahe, dass das Verhältnis der beiden GnRH-R-Typen in einem bestimmten Gewebe festlegt, ob GnRH die Proliferation fördert oder inhibiert. Während der GnRH-Typ-I-Rezeptor und sein entsprechender Genlocus charakterisiert und als funktionstüchtig beschrieben wurden (Kakar et al., 1992; Faurholm et al., 2001), bleibt der Typ-II-Rezeptor noch als vollständig funktionsfähig zu identifizieren (Hong et al., 2008). Obwohl bisher keine komplette zu kodierende Sequenz für den Typ-II-Rezeptor entdeckt werden konnte, fanden Enomoto und Mitarbeiter (2004), dass der Typ-II-Rezeptor durchaus GnRH-Effekte vermittelt. In ihren Untersuchungen zeigten sie, dass durch den GnRH-I- und GnRH-II-Rezeptor in unterschiedlichen Tumorzelllinien entweder fördernde oder hemmende Einflüsse auf die Zellproliferation vermittelt werden. GnRH-I war bei den proliferierenden Tumorzellen effektiver, während GnRH-II bei den Zelllinien effektiver war, die sich antiproliferativ verhielten. Es wäre also theoretisch möglich, dass die gegensätzlichen Effekte über die verschiedenen GnRH-Rezeptoren ausgeübt werden. In den Experimenten von Enomoto et al. (2004) erzielte GnRH-II nur bei gleichzeitiger Funktionsfähigkeit beider Rezeptortypen seine Wirkungen, während GnRH-I ausschließlich auf das Vorhandensein des Typ-I-Rezeptor angewiesen war. Weiterhin zeigten sie, dass eine Splicevariante des GnRH-II-R für die stimulatorischen Effekte auf die Proliferation der Zellen verantwortlich zu sein scheint. Nach Knockdown der Gene für die Splicevariante mittels RNA-Interferenz vermittelten GnRH-I und -II lediglich antiproliferative Effekte. Die genannten Ergebnisse machen ein komplexes Zusammenspiel des GnRH-II-Rezeptors und seiner Splicevariante mit dem GnRH-I-Rezeptor wahrscheinlich. Auch die Bildung von Rezeptor-Heterodimeren sowie eine Überschneidung der Signale der verschiedenen Rezeptor-Typen könnte erklären, warum GnRH in manchen Zelltypen proliferative und in anderen Zelltypen antiproliferative Wirkung hat (Enomoto et al. 2004, AbdAlla et al., 2001 a, b). Auch könnte die Beeinflussung von intrazellulären Signalkaskaden durch nicht kodierende RNAs (Storz, 2002) des GnRH-II-Rezeptors in Betracht gezogen werden (Enomoto et al., 2004). Die Frage nach der Bedeutung der verschiedenen GnRH-Rezeptor-Typen kann in unserem Tiermodell, in dem ja nur das GnRH-I-System funktionsfähig ist, leider nicht getestet werden.

Neben der Wirkung von GnRH auf seine eigenen Rezeptoren, könnte das Signal zur Zellproliferation auch über andere Rezeptoren vermittelt werden. An humanen ovariellen Karzinomzellen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der GnRH-Agonist Triptorelin durch Rezeptorantagonisierung des Wachstumsfaktors EGF (*epidermal growth factor*) dessen stimulierenden Effekt auf die Zellteilung abschwächt (Emons et al., 1996). Im Gegensatz zur

GnRH-Rezeptor-Aktivierung und folgender Signaltransduktion über Phospholipase- und Proteinkinase C in der Hypophyse geht man bei Tumorzellen von einer Beeinflussung Tyrosinkinase-vermittelter Aktivität durch GnRH aus. So sollen GnRH-Agonisten an Tumorzellen mit dem MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg interferieren und Zellproliferation reduzieren (zur Übersicht Tang et al., 2002). Weiterhin sollen in peripheren Tumorzellen andere GTP (Guanosintriphosphat)-bindende Proteine zur GnRH-Signalvermittlung vorhanden sein als in der Hypophyse (zur Übersicht Imai et al., 1998).

Im Hippocampus weiblicher Ratten kam es in Experimenten von Jennes (1990) unter GnRH-Einfluss zu einer Erhöhung c-Fos positiver Neurone. C-Fos kodiert als Proto-Onkogen für einen Transkriptionsfaktor, der zur Synthese verschiedenster Proteine führt, welche wiederum die Proliferation von Zellen erhöhen könnte.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion (niedrige und mittlere GnRH-Konzentrationen bewirken eine Erhöhung der Proliferation, wohingegen die höchste verwendete Konzentration eine Reduktion der Proliferationsrate auslöst) kann durch eine zunehmende Rezeptor-Desensibilisierung erklärt werden. Für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde nämlich gezeigt, dass diese bei zunehmender Ligandenkonzentration auch zunehmend internalisiert werden (McArdle et al., 2002).

V.2 Proliferation und Neurogenese hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Letrozol

Anlass zu der Vermutung einer Beeinflussung der Neurogenese im Hippocampus durch eine GnRH-gesteuerte lokale Estradiolsynthese geben Untersuchungen von Fester et al. (2006) sowie von Prange-Kiel und Mitarbeitern (2008). Fester et al. (2006) beobachteten nämlich, dass die Behandlung mit Estradiol zu einer Proliferationssteigerung in hippocampalen Dispersionskulturen führt. Anschließend zeigten Prange-Kiel et al. (2008), dass GnRH konzentrationsabhängig die hippocampale E₂-Synthese reguliert (Abb. 16). Dabei führten die Konzentrationen von 10 nM und 100 nM zu einer signifikanten Steigerung der Estradiolsynthese, während die Konzentration von 500 nM keinen Effekt hatte. An ovariellen Granulosazellen konnte bereits 1988 von Parinaud und Mitarbeitern gezeigt werden, dass GnRH in niedrigen Dosen stimulierend und in hohen Dosen inhibierend auf die Estradiolproduktion wirkt.

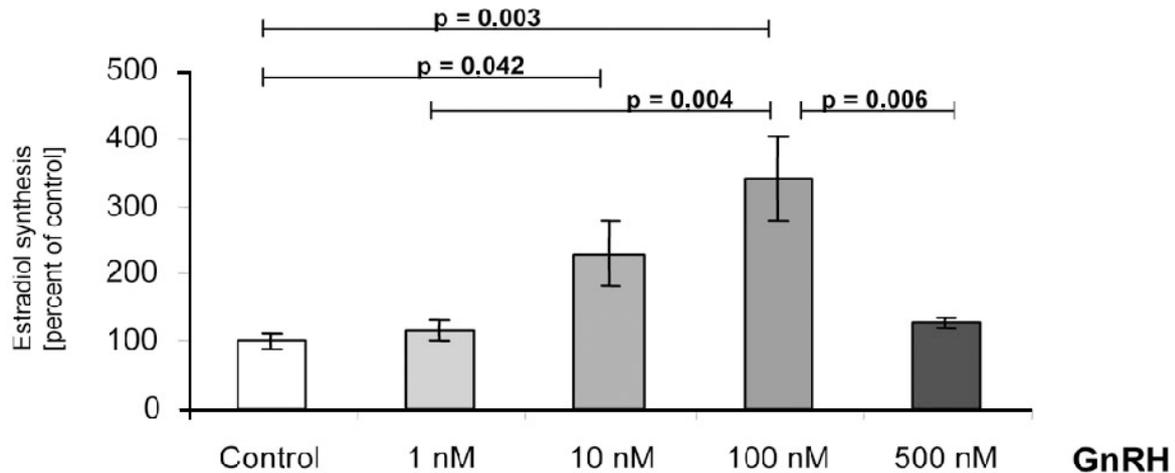


Abb. 16: Dosisabhängige Regulierung der Estradiolsynthese in hippocampalen Dispersionskulturen 5 Tage alter Ratten unter verschiedenen GnRH Konzentrationen. $p \leq 0,05$ signifikant. Quelle: Prange-Kiel et al., 2008

Die von Prange-Kiel und Mitarbeitern (2008) beschriebene signifikante Erhöhung der Estradiolsynthese unter dem Einfluss von GnRH (10 nM u. 100 nM), könnte in unseren Kulturen möglicherweise die Erhöhung der Proliferationsrate hippocampaler Neurone unter GnRH (10 nM u. 100 nM, s. Abb. 8) erklären. Für diesen Erklärungsansatz sprechen auch weitere Untersuchungen von Prange-Kiel et al. (2008), die zeigen konnten, dass über den genannten Mechanismus der Beeinflussung der E2-Synthese durch GnRH ebenfalls die Spinedichte in der CA1-Region hippocampaler Slicekulturen sowie die Expression des Proteins Spinophilin, welches als ein verlässlicher Marker für Spines gilt (Tang et al., 2004), gesteuert werden.

Um unsere Hypothese zu testen, dass GnRH die Proliferation der Neurone über die Regulation der Estradiolsynthese beeinflusst, behandelten wir die Kulturen zusätzlich mit dem Aromatasehemmer Letrozol. Die Behandlung der hippocampalen Dispersionskulturen nur mit Letrozol (100 nM) führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate (vgl. Abb. 9). Auch die Kombination aus Letrozol und GnRH (10 nM) senkte die Proliferationsrate. Dabei war die Proliferationsrate sowohl im Vergleich zu alleiniger Letrozol-Behandlung als auch im Vergleich zur GnRH-Behandlung signifikant verschieden (s. Abb. 9).

Schon Experimente von Fester et al. (2006) zeigten, dass die Behandlung hippocampaler Dispersionskulturen mit dem Aromatasehemmer Letrozol zu einer Senkung der Proliferationsrate führt. Die Mitarbeiter dieser Studie machten im Hippocampus synthetisiertes Estradiol für eine hippocampale Neurogenese verantwortlich. Anlass zu dieser

Vermutung geben mehrere Experimente aus unserem Labor, die bereits die Bedeutung einer lokalen hippocampalen Estradiolsynthese durch Inhibition des Enzyms Aromatase mit dem Aromatasehemmer Letrozol untersuchten. Unter serum- und steroidfreien Bedingungen regulierte Letrozol in hippocampalen Zellkulturen die Estrogensynthese dosisabhängig herunter (Prange-Kiel et al, 2003; Kretz et al. 2004). Bei Fester und Mitarbeitern (2006) kam es unter Letrozol Behandlung schließlich ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der E2-Synthese in hippocampalen Dispersionskulturen sowie zu einer dadurch bedingten Abnahme der Proliferationsrate (Abb. 17). Die Effekte der Aromatasehemmung konnten nur durch hohe Dosen von E2 (100 nM) wieder aufgehoben werden, jedoch nicht mit einer Konzentration wie sie normalerweise im Serum vorhanden ist, was die Bedeutung der endogenen, hippocampalen Estradiolsynthese unterstreicht (Fester et al. 2006). Diese Hypothese wird durch frühere Experimente an männlichen Ratten gestützt, welche zeigen konnten, dass die Estradiolkonzentration im Hippocampus bedeutend höher ist als im Serum (Hojo et al. 2004).

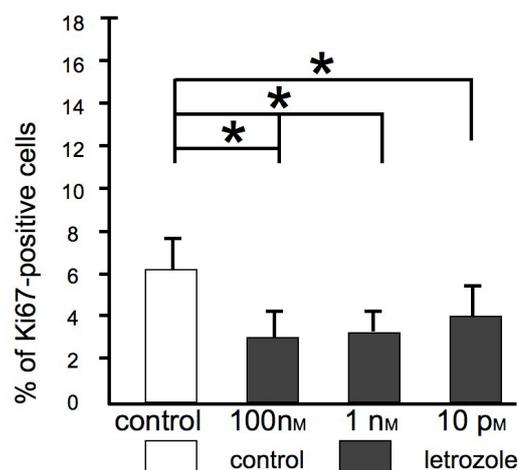


Abb. 17: Quantitative Zählung Ki67 positiver Zellen nach hippocampaler Dispersionskultur 5 Tage alter Ratten unter Letrozol Behandlung.
 *=Signifikante Senkung der Proliferationsrate unter Letrozol dosisabhängig.
 Bildquelle: eigene Bearbeitung, nach: Fester et al., 2006

Aufgrund dieser Beobachtungen gehen wir auch bei unseren Experimenten davon aus, dass durch Hemmung der Aromatase mit Letrozol die herunterregulierte Estradiolsynthese hippocampaler Neurone zu einer Abnahme der Proliferationsrate führte.

Schon in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Letrozol die GnRH-induzierte Synthese von Estradiol in hippocampalen Dispersionskulturen inhibiert (Prange-Kiel et al., 2008). Wir gehen also davon aus, dass in unseren Versuchen bei simultaner Behandlung der

Kulturen mit Letrozol und GnRH (s. Abb. 9) die Blockierung der Estradiolsynthese durch Letrozol dazu führt, dass GnRH nicht mehr in der Lage ist die Proliferation über die Steuerung einer lokalen Estradiolproduktion im Hippocampus zu beeinflussen.

Trotz der Annahme, dass GnRH über die Beeinflussung der Estradiolsynthese indirekt auf die Proliferation hippocampaler Neurone wirkt, können wir direkte Wirkungen von GnRH auf die Proliferation nicht ausschließen.

Es ist weiterhin wichtig zu erwähnen, dass Estradiol in der Lage ist, die GnRH-Rezeptor-Dichte in Hippocampi von Ratten zu modulieren. Die Hemmung der E2-Synthese mit einem Aromatasehemmer führte in hippocampalen Dispersionskulturen zu einer signifikanten Zunahme der GnRH-R-Expression, woraus geschlossen wurde, dass lokal im Hippocampus sezerniertes Estradiol die GnRH-Rezeptor-Expression zu begrenzen scheint (Prange-Kiel et al. 2008). In Experimenten von Badr et al. (1988) führte Kastration weiblicher Ratten zu einer Erhöhung der GnRH-R-Dichte im Hippocampus, welche nach systemischer Estradiolbehandlung wieder sank. Entsprechend führten subkutane Estradiolinjektionen bei ovariectomierten Ratten (Osada und Kimura, 1995) zu einer Inhibierung GnRH-vermittelter neuronaler Aktivitätssteigerung in Pyramidenzellen des Hippocampus. Es ist zu vermuten, dass eine Beeinflussung der hippocampalen Neurogenese durch stattfindende Interaktionen zwischen GnRH und Estradiol zustande kommt.

V.3 Proliferation und Neurogenese hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Antide

Die Behandlung der hippocampalen Dispersionskulturen mit der Kombination von GnRH (10 nM) und dem GnRH-Antagonisten Antide reduzierte die Proliferationsrate im Vergleich zu den Kulturen unter alleiniger Behandlung mit GnRH (10 nM) signifikant (vgl. Abb. 11). In Zusammenfassung mit bereits gezeigten Experimenten von Prange-Kiel und Mitarbeitern (2008), bei denen die Kombination von Antide und GnRH eine GnRH-induzierte Steigerung der hippocampalen Estradiolsynthese wieder abschwächte, kann man anhand dieser Ergebnisse von spezifischen GnRH-Wirkungen auf die Estradiolsynthese ausgehen, welche über die GnRH-Rezeptoren vermittelt werden. Die durch Antide erzielte Blockade von GnRH-Rezeptoren scheint folglich über die Blockierung der GnRH-vermittelten hippocampalen Estradiolsynthese auch die Proliferationsrate in hippocampalen Neuronen zu reduzieren.

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen an hippocampalen Dispersionskulturen, bei denen Antide (100 nM) die Proliferationsrate reduzierte, kam es an humanen luteinisierten Granulosazellen zu einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate unter dem GnRH-Antagonisten Antide (Vitale et al., 2006). Diese Befunde stehen im Einklang mit den Befunden von Takekida et al. (2003) und Hong et al. (2008), die eine antiproliferative Wirkung von GnRH bzw. GnRH-Agonisten auf ovarielle Granulosazellen zeigen.

Erstaunlicherweise führte auch die alleinige Behandlung unserer Zellkulturen mit Antide zu einer Senkung der Proliferationsrate (s. Abb. 11). Zunächst könnte man diesen Befund so interpretieren, dass hippocampale Neurone auch selbst GnRH produzieren können. Eine lokale GnRH-Produktion im Hippocampus ist jedoch eher unwahrscheinlich, denn Versuche von Prange-Kiel und Mitarbeitern konnten zeigen, dass zum Einen die Menge von GnRH-mRNA im Hippocampus ca. 20mal niedriger ist als die Konzentration im Hypothalamus und zum Anderen kaum GnRH-positive Neurone im Hippocampus vorhanden sind. Das konnte in Experimenten mit Mäusen, die GFP (*green fluorescent protein*) unter dem GnRH-Promotor exprimieren, gezeigt werden (persönliche Mitteilung, J. Prange-Kiel). Außerdem fanden Prange-Kiel et al. (2008), als sie hippocampale Neurone ausschließlich mit Antide behandelten, keine Senkung der Estradiolsynthese in den Zellen. Auch die Expression synaptischer Proteine, die von der hippocampalen Estradiolsynthese abhängt, war nach Antide-Behandlung unverändert (Prange-Kiel et al., 2008).

Eine antiproliferative Wirkung von Antide im Hippocampus könnte man sich möglicherweise auch GnRH-unabhängig erklären. Antide könnte auch direkte Wirkungen auf die Proliferation besitzen, vermittelt über GnRH-unabhängige Rezeptoren. Auch an Tumorzellen verschiedenster Zelllinien wie z.B. dem Endometrium, der Mamma, den Ovarien oder der Prostata wurden schon in mehreren Studien direkte inhibitorische Effekte von GnRH-Antagonisten auf das Zellwachstum diskutiert (zur Übersicht Tang et al., 2002). So führte beispielsweise der GnRH-Antagonist Cetrorelix an humanen epithelialen ovariellen Karzinomzellen über die Beeinflussung des Zellzyklus zu einer reduzierten Tumorpherationsrate. Im Zusammenhang damit wird z.B. eine verstärkte Expression des Proteins p53 unter Antide-Einfluss diskutiert, welches als Tumorsuppressor im Zellzyklus eine entscheidende Rolle spielt (Tang et al., 2002).

Zusammenfassend lassen unsere Befunde darauf schließen, dass GnRH über die Beeinflussung der Estradiolproduktion die Proliferation im Hippocampus reguliert.

V.4 Apoptoserate hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von GnRH

Neben der konzentrationsabhängigen Beeinflussung der Proliferation hippocampaler Neurone unter GnRH, kam es weiterhin zu einer dosisabhängigen Beeinflussung der Apoptoserate. In unseren Experimenten führten die GnRH-Konzentrationen von 10 nM und 100 nM zu einer Reduktion der Apoptoserate, während die Konzentration von 500 nM eine Steigerung der Apoptoserate bewirkte (Tab. 4, Abb. 13). Wie bei der Betrachtung der Proliferationsrate, gehen wir auch bei der Apoptoserate von einer GnRH-vermittelten konzentrationsabhängigen Einflussnahme auf eine lokale hippocampale Estradiolsynthese (Prange-Kiel et al., 2003) aus, welche wiederum für die Beeinflussung von Apoptose im Hippocampus verantwortlich zu sein scheint. So würde die gesteigerte Estradiolproduktion in hippocampalen Dispersionskulturen unter GnRH-Konzentrationen von 10 nM und 100 nM (Prange-Kiel et al., 2008) zu einer Reduktion der Apoptose führen. Dass Estradiol mittels Regulierung der Genexpression Einfluss auf Apoptose nehmen kann, konnte schon mehrfach gezeigt werden. Durch Aktivierung von Apoptose-Suppressorgenen wie BCL-2 oder BCL-X_L ist Estradiol zum Beispiel in der Lage neuronalen Zelltod oder Neurotoxizität zu verringern (Pike, 1999; Fujita et al., 2006).

Die Konzentration von 500 nM GnRH zeigte in unseren Experimenten an hippocampalen Dispersionskulturen sowohl antiproliferative als auch apoptotische Effekte. Bei Versuchen von Prange-Kiel und Mitarbeitern (2008) hatte GnRH (500 nM) keinen messbaren Einfluss auf eine im Hippocampus stattfindende, mögliche Apoptose-beeinflussende Estradiolproduktion. Es ist aber denkbar, dass die Effekte der hohen GnRH-Konzentration auf die Estradiolsynthese vergleichsweise gering, und damit mittels verwendeten *Radioimmunoassay* (RIA) nicht messbar waren, sich aber trotzdem in einer physiologischen Reaktion, hier einem Anstieg der Apoptoserate, niederschlagen. Es sind aber auch noch andere Erklärungen denkbar. Neben dem bereits erwähnten möglichen ursächlichen Antwortverhalten des G-Protein-gekoppelten-GnRH-Rezeptors (McArdle et al., 2002) sowie einer Begrenzung der GnRH-R-Expression unter steigenden Estradiolspiegeln (Badr et al., 1988; Prange-Kiel et al., 2008), käme es auch in Betracht, dass GnRH in hoher Konzentration nicht indirekt über eine Beeinflussung der Estradiolproduktion wirkt, sondern direkte Apoptose-fördernde Effekte zu erzielen vermag. An ovariellen Granulosazellen von Ratten konnte gezeigt werden, dass GnRH Apoptose induziert (Parborell et al., 2002). Parborell und Mitarbeiter zeigten in ihren Untersuchungen, dass die GnRH-Behandlung mit Veränderungen im Mengenverhältnis von Mitgliedern der BCL-2-Familie korreliert. Das Gleichgewicht

zwischen antiapoptotischen (BCL-X_L) und proapoptotischen (BCL-X_S) Proteinen verschob sich unter GnRH zu Gunsten der proapoptotischen Proteine, was in einer Induktion von Apoptose resultierte. An humanen endometrialen und ovariellen Tumorzellen beobachteten Imai et al. (1998), dass GnRH-Rezeptoraktivierung zu einer erhöhten Expression des Apoptose-einleitenden Proteins FasLigand führt, welches dann wiederum durch Interaktion mit Fas-Rezeptor tragenden Tumorzellen antiproliferativ wirken könnte. In humanen Granulosazellen konnten Hong et al. (2008) zeigen, dass GnRH in einer mittleren Dosis von 100 nM über eine Aktivierung der Caspase-Kaskade Apoptose zu induzieren vermag. Die gleiche Dosis von 100 nM GnRH senkte in unseren Experimenten an hippocampalen Neuronen jedoch die Apoptoserate. Insgesamt könnte man davon ausgehen, dass GnRH sowohl direkte Apoptose-fördernde als auch indirekte Apoptose-reduzierende Effekte, abhängig vom Gewebetyp und verwendeter Dosis, ausüben kann. Eine mögliche direkte Einflussnahme könnte zum Beispiel über die Regulierung der Genexpression sowie über Signaltransduktionswege des Zellteilungs- und Apoptoseapparates erfolgen (White et al., 2008). Um zu testen, ob GnRH auch Aromatase-unabhängige, direkte Wirkungen auf die Apoptose im Hippocampus besitzt, müsste man konditionelle Aromatase-KO (*knock out*)-Mäuse untersuchen, die keine Aromatase im Gehirn exprimieren.

V.5 Apoptoserate hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Letrozol

Die alleinige Behandlung mit dem Aromatasehemmer Letrozol führte in unseren Versuchen mit hippocampalen Dispersionskulturen zu einer signifikant gesteigerten Apoptoserate (s. Ergebnisse Abb. 14). Bereits Fester und Mitarbeiter (2006) zeigten in ihren Experimenten, dass die Hemmung der E2-Synthese in hippocampalen Dispersionskulturen mit dem Aromatasehemmer Letrozol dosisabhängig zu einer signifikant gesteigerten Apoptoserate führte (Abb. 18). Diese Befunde zeigen, dass das in den hippocampalen Zellkulturen lokal produzierte E2 anti-apoptotisch wirkt, zumal exogen zugeführtes Estradiol die Apoptoserate nicht senkte.

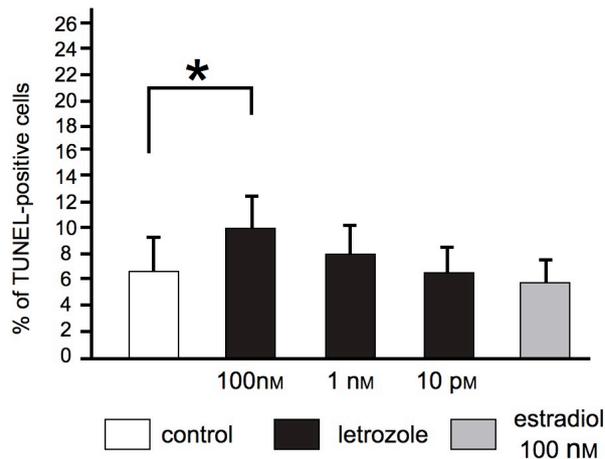


Abb. 18: Quantitative Zählung TUNEL positiver Zellen nach hippocampaler Dispersionskultur 5 Tage alter Ratten unter Letrozol und Estradiolbehandlung mit 100 nM. *=Signifikante Steigerung der Apoptose unter Letrozol 100 nM. Quelle: bearbeitet nach Fester et al., 2006

Bei Behandlung der Kulturen mit der Kombination aus Aromatasehemmer und 10 nM GnRH wurde die Apoptoserate verglichen mit der Letrozolbehandlung wieder reduziert, was dafür spricht, dass GnRH über die Regulierung der Estradiolsynthese nicht nur Einfluss auf die Proliferation zu nehmen scheint, sondern ebenfalls auf die Apoptoserate hippocampaler Neurone. Möglicherweise kam es unter dem Einfluss von Letrozol in unseren Kulturen zu einer Zunahme der GnRH-R-Expression (Prange-Kiel et al., 2008), was auch erklären könnte, warum jeweils die Kombinationen von Letrozol und GnRH in der Lage waren die Apoptoserate in hippocampalen Dispersionskulturen im Vergleich zur Behandlung mit Letrozol allein (siehe Abb. 14) wieder zu senken. GnRH würde in diesem Fall die hippocampale Estradiolproduktion erhöhen, was dem Aromatasehemmer-Effekt durch Konzentrationserhöhung des Estradiols entgegen wirken würde.

V.6 Apoptoserate hippocampaler Neurone unter dem Einfluss von Antide

Die Behandlung der hippocampalen Dispersionskulturen mit Antide (100 nM) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate. Die gleichzeitige Behandlung der Kulturen mit GnRH (10 nM) und dem GnRH-Antagonist Antide konnte die GnRH- induzierte Reduktion der Apoptoserate wieder signifikant steigern, woraus sich auf die Spezifität GnRH-vermittelter Wirkungen schließen lässt. Die alleinige Behandlung hippocampaler Dispersionskulturen mit GnRH (10 nM) hatte bei Versuchen von Prange-Kiel et al. (2008)

eine gesteigerte Estradiolsynthese zur Folge, welche durch die gleichzeitige Gabe von 10 nM GnRH und dem GnRH-Antagonist Antide wieder verringert war. GnRH könnte so über die Beeinflussung der Estradiolsynthese die Apoptoserate hippocampaler Neurone reduzieren, während es bei GnRH-Rezeptor-Blockade durch Antide keine Erhöhung der E2-Synthese erzielen kann und als Folge davon die Apoptoserate wieder ansteigt.

Abhängig von Gewebe und Zelltypus sowie von einer direkten oder indirekten Einflussnahme von GnRH dürfte auch der GnRH-Antagonist Antide sowohl fördernde als auch hemmende Einflüsse auf Apoptose nehmen. Da Antide spezifisch über eine GnRH-R-Blockade wirkt, sind die Wirkungen sicher ähnlich vielfältig wie die von GnRH selbst. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass GnRH-Analoga neben Wirkungen auf die HHG-Achse auch außerhalb der Hypophyse Effekte ausüben, insbesondere auf ovarielle Gewebe (Hsueh und Erickson, 1979; Fraser et al., 1986; Bauer-Dantoin und Jameson, 1995). Der GnRH-Antagonist Antide konnte in Experimenten mit Ratten die Anzahl präovulatorischer Follikelzellen erhöhen und die Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollgruppen senken (Parborell et al., 2005). Die Mitarbeiter dieser Studie erklärten diese Ergebnisse mit der Einflussnahme des GnRH-Antagonisten auf Mitglieder der Apoptosekaskade. Das Apoptose-induzierende Protein BAX (BCL-2-assoziiertes Protein x) wurde unter Antide-Behandlung im Zytosol der Follikelzellen zurückgehalten. Im apoptotischen Prozess wird BAX nämlich vom Zytosol in die Mitochondrien transloziert und bewirkt dort die Cytochrom C Ausschüttung, welche folglich zur Apoptose der Zellen führt (Shimizu et al., 1999; Saito et al., 2000). Antide konnte die BAX-Translokation in ovariellen Follikelzellen vollständig verhindern (Parborell et al., 2005). Bei Experimenten an menschlichen Tumorzellen des Endometriums und der Ovarien konnte Antide durch GnRH-Rezeptorblockade die Expression des Apoptose-fördernden Proteins FasLigand begrenzen (Imai et al., 1998). Diesen antiapoptotischen Effekten von Antide stehen unsere Beobachtungen gegenüber. Auf hippocampale Dispersionskulturen zeigte der GnRH-Antagonist eher eine Apoptose-fördernde Tendenz. Die unter alleinigem GnRH-Einfluss reduzierte Apoptoserate wurde durch die Kombination von GnRH und Antide wieder angehoben, was dafür spricht, dass die durch GnRH-induzierte Erhöhung der E2-Synthese und daraus folgende Senkung der Apoptoserate bei Blockade mit einem GnRH-Antagonist verhindert wird. Die alleinige Behandlung der Kulturen mit Antide führte zu einer Steigerung der Apoptoserate, was direkte GnRH-unabhängige Effekte von Antide auf die Apoptose hippocampaler Neurone denkbar macht.

V.7 Wie gelangt GnRH in den Hippocampus?

Obwohl GnRH ganz offensichtlich regulatorische Wirkungen im Hippocampus hat, bleibt unklar, wie das Peptidhormon, das bekanntermaßen im Hypothalamus gebildet wird, an seinen Wirkort gelangt. Skinner und Caraty (2002) konnten GnRH im Liquor nachweisen. In Untersuchungen mit Schafen konnte gezeigt werden, dass GnRH an der Eminentia mediana in den dritten Ventrikel ausgeschüttet wird (Skinner et al., 1995), wodurch es theoretisch möglich wird, hippocampale Strukturen über den Liquor zu erreichen. Neueste Befunde von Prange-Kiel et al. (nicht veröffentlicht) deuten darauf hin, dass nach Injektionen von GnRH in den dritten Ventrikel eine signifikante Erhöhung von Spinesynapsen in der CA1-Region des Hippocampus stattfindet, was eine Beeinflussung synaptischer Plastizität im Hippocampus durch GnRH über den Liquor wahrscheinlich macht. Witkin und Mitarbeiter (1982) zeigten in ihren Experimenten an weiblichen und männlichen adulten Ratten mittels GnRH-Antikörper GnRH-Fasern in unterschiedlichen Regionen des ZNS, unter anderem assoziiert mit den Ventrikelwänden aller vier Ventrikel, aber auch mit Blutgefäßen des Gehirn sowie seiner Oberfläche.

Jennes und Stumpf (1980) konnten in Experimenten mit männlichen Goldhamstern mittels GnRH-Antiserum GnRH-Fasern im Hippocampus nachweisen, welche es ermöglichen, dass GnRH über Projektionen von Neuronen anderer Hirnregionen den Hippocampus erreicht. Prange-Kiel und Mitarbeiter konnten in Experimenten mit Mäusen und Ratten immunhistochemisch nur sehr sporadisch GnRH-immunopositive Fasern und Neurone im Hippocampus darstellen (nicht veröffentlicht). Diese Befunde lassen vermuten, dass zumindest bei Mäusen und Ratten das GnRH über den Liquor oder das Blutplasma zum Hippocampus gelangt.

VI. Zusammenfassung

Wir beschäftigten uns mit der Frage, ob GnRH einen Einfluss auf die Proliferations- und Apoptoserate hippocampaler Neurone ausübt. Unsere Beobachtungen zeigten, dass GnRH dosisabhängig sowohl die Proliferationsrate als auch die Apoptoserate in hippocampalen Dispersionskulturen zu regulieren vermag. Niedrige und mittlere Konzentrationen förderten dabei die Proliferationsrate und reduzierten die Apoptoserate, während hohe Konzentrationen an GnRH einen gegenteiligen Effekt erzielten.

Um zu testen, ob die Veränderungen von Proliferations- und Apoptoserate durch GnRH über die Regulierung der hippocampalen Estradiolsynthese erfolgte, behandelten wir unsere hippocampalen Dispersionskulturen nicht nur mit dem Aromatasehemmer Letrozol, sondern auch mit der Kombination aus Letrozol und GnRH. Letrozol führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate sowie zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate in unseren Kulturen. Diese Effekte konnten jeweils durch die Kombination von Letrozol und GnRH wieder aufgehoben werden, was uns vermuten lässt, dass GnRH seine Wirkungen über die Beeinflussung einer hippocampalen E2-Synthese erzielt.

Weiterhin behandelten wir die hippocampalen Dispersionskulturen mit dem GnRH-Antagonisten Antide. Die Kombination von Antide und GnRH konnte die jeweiligen Effekte von GnRH allein abschwächen, was spezifische GnRH-vermittelte Wirkungen auf die hippocampalen Neurone verdeutlicht. Unter alleinigem Antide-Einfluss reduzierte sich die Proliferationsrate, während die Apoptoserate sich erhöhte, was möglicherweise für direkte Effekte von Antide auf die Proliferationsrate sowie Apoptoserate hippocampaler Neurone spricht. Die Schwankungen der Neurogenese mit dem ovariellen Zyklus (Tanapat et al., 1999) könnte man möglicherweise mit der pulsatilen Sekretion von GnRH aus dem Hypothalamus erklären. Demnach würde nicht nur die gonadale E2-Synthese von GnRH über die HHG-Achse beeinflusst, sondern vielmehr auch die hippocampale E2-Synthese, die die Neurogenese und die Apoptoserate hippocampaler Neurone zu regulieren vermag.

VII. Literaturverzeichnis

- ABDALLA, S.; LOTHER, H.; ABDEL-TAWAB, A. M.; QUITTERER, U. (2001a): *The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist*. In: The Journal of biological chemistry, Jg. 276, H. 43, S. 39721–39726.
- ABDALLA, S.; LOTHER, H.; EL MASSIERY, A.; QUITTERER, U. (2001b): *Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness*. In: Nature medicine, Jg. 7, H. 9, S. 1003–1009.
- ALTMAN, J. (1962): *Are new neurons formed in the brains of adult mammals?* In: Science (New York, N.Y.), Jg. 135, S. 1127–1128.
- AMOSS, M.; BURGUS, R.; BLACKWELL, R.; VALE, W.; FELLOWS, R.; GUILLEMIN, R. (1971): *Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin*. In: Biochemical and biophysical research communications, Jg. 44, H. 1, S. 205–210.
- AZAD, N.; LAPAGLIA, N.; KIRSTEINS, L.; UDDIN, S.; STEINER, J.; WILLIAMS, D. W. et al. (1997): *Jurkat cell proliferative activity is increased by luteinizing hormone-releasing hormone*. In: The Journal of endocrinology, Jg. 153, H. 2, S. 241–249.
- BADR, M.; PELLETIER, G. (1987): *Characterization and autoradiographic localization of LHRH receptors in the rat brain*. In: Synapse (New York, N.Y.), Jg. 1, H. 6, S. 567–571.
- BADR, M.; MARCHETTI, B.; PELLETIER, G. (1988): *Modulation of hippocampal LHRH receptors by sex steroids in the rat*. In: Peptides, Jg. 9, H. 2, S. 441–442.
- BAHK, J. Y.; HYUN, J. S.; CHUNG, S. H.; LEE, H.; KIM, M. O.; LEE, B. H.; CHOI, W. S. (1995): *Stage specific identification of the expression of GnRH mRNA and localization of the GnRH receptor in mature rat and adult human testis*. In: The Journal of urology, Jg. 154, H. 5, S. 1958–1961.
- BARNADAS, A.; ESTÉVEZ, L. G.; LLUCH-HERNÁNDEZ, A.; RODRIGUEZ-LESCURE, A.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, C.; SANCHEZ-ROVIRA, P. (2011): *An Overview of Letrozole in Postmenopausal Women with Hormone-Responsive Breast Cancer*. In: Advances in therapy.
- BATTICANE, N.; MORALE, M. C.; GALLO, F.; FARINELLA, Z.; MARCHETTI, B. (1991): *Luteinizing hormone-releasing hormone signaling at the lymphocyte involves stimulation of interleukin-2 receptor expression*. In: Endocrinology, Jg. 129, H. 1, S. 277–286.
- BAUER-DANTOIN, A. C.; JAMESON, J. L. (1995): *Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle*. In: Endocrinology, Jg. 136, H. 10, S. 4432–4438.
- BENNINGHOFF, A.; DRENCKHAHN, D. (HRSG.) (2004): *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie (Band 2). Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut: 16., völlig neu bearbeitete Auflage*. München: Urban & Fischer Verlag; Elsevier GmbH.
- BERTHOIS, Y.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S. (1986): *Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 83, H. 8, S. 2496–2500.
- BJÖRKHEM, I.; MEANEY, S. (2004): *Brain cholesterol: long secret life behind a barrier*. In: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, Jg. 24, H. 5, S. 806–815.

- BONNEFONT, A. B.; MUÑOZ, F. J.; INESTROSA, N. C. (1998): *Estrogen protects neuronal cells from the cytotoxicity induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes*. In: FEBS letters, Jg. 441, H. 2, S. 220–224.
- BREWER, G. J. (1997): *Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons*. In: Journal of neuroscience methods, Jg. 71, H. 2, S. 143–155.
- CHEON, K. W.; LEE, H. S.; PARHAR, I. S.; KANG, I. S. (2001): *Expression of the second isoform of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle*. In: Molecular human reproduction, Jg. 7, H. 5, S. 447–452.
- CHOI, K. C.; AUERSPERG, N.; LEUNG, P. C. (2001): *Expression and antiproliferative effect of a second form of gonadotropin-releasing hormone in normal and neoplastic ovarian surface epithelial cells*. In: The Journal of clinical endocrinology and metabolism, Jg. 86, H. 10, S. 5075–5078.
- CORY, S. (1995): *Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family*. In: Annual review of immunology, Jg. 13, S. 513–543.
- DONG, F.; SKINNER, D. C.; WU, T. John; REN, J. (2011): *The heart: a novel gonadotrophin-releasing hormone target*. In: Journal of neuroendocrinology, Jg. 23, H. 5, S. 456–463.
- EMONS, G.; MULLER, V.; ORTMANN, O.; GROSSMANN, G.; TRAUTNER, U.; STUCKRAD, B. et al. (1996): *Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines*. In: International journal of oncology, Jg. 9, H. 6, S. 1129–1137.
- ENOMOTO, M.; ENDO, D.; KAWASHIMA, S.; PARK, M. K. (2004): *Human type II GnRH receptor mediates effects of GnRH on cell proliferation*. In: Zoological science, Jg. 21, H. 7, S. 763–770.
- FAURHOLM, B.; MILLAR, R. P.; KATZ, A. A. (2001): *The genes encoding the type II gonadotropin-releasing hormone receptor and the ribonucleoprotein RBM8A in humans overlap in two genomic loci*. In: Genomics, Jg. 78, H. 1-2, S. 15–18.
- FESTER, L.; RIBEIRO-GOUVEIA, V.; PRANGE-KIEL, J.; SCHASSEN, C. von; BÖTTNER, M.; JARRY, H.; Rune, G. M. (2006): *Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis*. In: Journal of neurochemistry, Jg. 97, H. 4, S. 1136–1144.
- FINCH, A. R.; SEDGLEY, K. R.; CAUNT, C. J.; MCARDLE, C. A. (2008): *Plasma membrane expression of GnRH receptors: regulation by antagonists in breast, prostate, and gonadotrope cell lines*. In: The Journal of endocrinology, Jg. 196, H. 2, S. 353–367.
- FRASER, H. M.; BRAMLEY, T. A.; MILLER, W. R.; SHARPE, R. M. (1986): *Extra pituitary actions of LHRH analogues in tissues of the human female and investigation of the existence and function of LHRH-like peptides*. In: Progress in clinical and biological research, Jg. 225, S. 29–54.
- FUJITA, K.; KATO, T.; SHIBAYAMA, K.; IMADA, H.; YAMAUCHI, M.; YOSHIMOTO, N. et al. (2006): *Protective effect against 17beta-estradiol on neuronal apoptosis in hippocampus tissue following transient ischemia/recirculation in mongolian gerbils via down-regulation of tissue transglutaminase activity*. In: Neurochemical research, Jg. 31, H. 8, S. 1059–1068.

- 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-450SCC (CYP XI1A1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain*. In: *Journal of neurochemistry*, Jg. 71, H. 6, S. 2231–2238.
- GALEA, L. A. M. (2008): *Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents*. In: *Brain research reviews*, Jg. 57, H. 2, S. 332–341.
- GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L. L. (2001): *Neuroprotection by estradiol*. In: *Progress in neurobiology*, Jg. 63, H. 1, S. 29–60.
- GIBSON, L. J.; DAWSON, C. K.; LAWRENCE, D. H.; BLISS, J. M. (2007): *Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women*. In: *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, H. 1, S. CD003370.
- GREEN, D. R. (1998): *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. In: *Cell*, Jg. 94, H. 6, S. 695–698.
- HENDERSON, V. W.; PAGANINI-HILL, A.; EMANUEL, C. K.; DUNN, M. E.; BUCKWALTER, J. G. (1994): *Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects*. In: *Archives of neurology*, Jg. 51, H. 9, S. 896–900.
- HENGARTNER, M. O. (2000): *The biochemistry of apoptosis*. In: *Nature*, Jg. 407, H. 6805, S. 770–776.
- HOJO, Y.; HATTORI, T.-A.; ENAMI, T.; FURUKAWA, A.; SUZUKI, K.; ISHII, HIRO-TAKA et al. (2004): *Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 101, H. 3, S. 865–870.
- HONG, I.-S.; CHEUNG, A. P.; LEUNG, P. C. K. (2008): *Gonadotropin-releasing hormones I and II induce apoptosis in human granulosa cells*. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 93, H. 8, S. 3179–3185.
- HSUEH, A. J.; ERICKSON, G. F. (1979): *Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone: direct inhibition ovarian steroidogenesis*. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 204, H. 4395, S. 854–855.
- HSUEH, A. J.; SCHAEFFER, J. M. (1985): *Gonadotropin-releasing hormone as a paracrine hormone and neurotransmitter in extra-pituitary sites*. In: *Journal of steroid biochemistry*, Jg. 23, H. 5B, S. 757–764.
- IMAI, A.; TAKAGI, A.; HORIBE, S.; TAKAGI, H.; TAMAYA, T. (1998): *Evidence for tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulated Fas ligand expression in reproductive tract tumors: possible mechanism for hormonal control of apoptotic cell death*. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 83, H. 2, S. 427–431.
- IRMER, G.; BÜRGER, C.; ORTMANN, O.; SCHULZ, K. D.; EMONS, G. (1994): *Expression of luteinizing hormone releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines*. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 79, H. 3, S. 916–919.
- JENNES, L. (1990): *Effects of gonadotropin releasing hormone and estradiol on c-fos expression in the rat hippocampus*. In: *Molecular and cellular neurosciences*, Jg. 1, H. 2, S. 139–145.

- JENNES, L.; STUMPF, W. E. (1980): *LHRH-systems in the brain of the golden hamster*. In: Cell and tissue research, Jg. 209, H. 2, S. 239–256.
- JENNES, L.; WOOLUMS S. (1994): *Localization of gonadotropin-releasing-hormone receptor messenger-RNA in rat-brain*. In: Endocrine, Jg. 2, H. 6, S. 521–528.
- JENNES, L.; DALATI, B.; CONN, P. M. (1988): *Distribution of gonadotropin releasing hormone agonist binding sites in the rat central nervous system*. In: Brain research, Jg. 452, H. 1-2, S. 156–164.
- KAKAR, S. S.; MUSGROVE, L. C.; Devor, D. C.; SELLERS, J. C.; NEILL, J. D. (1992): *Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor*. In: Biochemical and biophysical research communications, Jg. 189, H. 1, S. 289–295.
- KANG, S. K.; TAI, C. J.; NATHWANI, P. S.; LEUNG, P. C. (2001): *Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells*. In: Endocrinology, Jg. 142, H. 1, S. 182–192.
- KOCH, T.; GYSLING, E. (1999): *Neue Aromatasehemmer*. In: pharma-kritik, Jg. 20, H. 7.
- KRETZ, O.; FESTER, L.; WEHREBERG, U.; ZHOU, L.; BRAUCKMANN, S.; ZHAO; SHANTING et al. (2004): *Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis*. In: The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, Jg. 24, H. 26, S. 5913–5921.
- LEBLANC, P.; CRUMEYROLLE, M.; LATOUCHE, J.; JORDAN, D.; FILLION, G.; L'HERITIER, A. et al. (1988): *Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus*. In: Neuroendocrinology, Jg. 48, H. 5, S. 482–488.
- LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. (1996): *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. In: Cell, Jg. 86, H. 1, S. 147–157.
- MAK, T. W.; YEH, W. C. (1999): *Genetic analysis of apoptotic and survival signals*. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Jg. 64, S. 335–342.
- MARCHETTI, B.; GUARCELLO, V.; MORALE, M. C.; BARTOLONI, G.; RAITI, F.; PALUMBO, G. et al. (1989): *Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist restoration of age-associated decline of thymus weight, thymic LHRH receptors, and thymocyte proliferative capacity*. In: Endocrinology, Jg. 125, H. 2, S. 1037–1045.
- MATSUO, H.; BABA, Y.; NAIR, R. M.; ARIMURA, A.; SCHALLY, A. V. (1971): *Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence*. In: Biochemical and biophysical research communications, Jg. 43, H. 6, S. 1334–1339.
- MCARDLE, Craig A.; FRANKLIN, J.; GREEN, L.; HISLOP, J. N. (2002): *Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors*. In: The Journal of endocrinology, Jg. 173, H. 1, S. 1–11.
- MELLON, S. H.; GRIFFIN, L. D.; COMPAGNONE, N. A. (2001): *Biosynthesis and action of neurosteroids*. In: Brain research. Brain research reviews, Jg. 37, H. 1-3, S. 3–12.
- MORGAN, Kevin; MILLAR, Robert P. (2004): *Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species*. In: General and comparative endocrinology, Jg. 139, H. 3, S. 191–197.
- NAFTOLIN, F.; RYAN, K. J.; PETRO, Z. (1971): *Aromatization of androstenedione by the diencephalon*. In: The Journal of clinical endocrinology and metabolism, Jg. 33, H. 2, S. 368–370.

- OBIOERAH, I.; JORDAN, V. C. (2011): *Progress in endocrine approaches to the treatment and prevention of breast cancer*. In: *Maturitas*, Jg. 70, H. 4, S. 315–321.
- OSADA, T.; KIMURA, F. (1995): *LHRH effects on hippocampal neurons are modulated by estrogen in rats*. In: *Endocrine journal*, Jg. 42, H. 2, S. 251–257.
- PAGANINI-HILL, A.; HENDERSON, V. W. (1996): *Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease*. In: *Archives of internal medicine*, Jg. 156, H. 19, S. 2213–2217.
- PARBORELL, F.; PECCI, A.; GONZALEZ, O.; VITALE, A.; TESONE, M. (2002): *Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes*. In: *Biology of reproduction*, Jg. 67, H. 2, S. 481–486.
- PARBORELL, F.; IRUSTA, G.; VITALE, A.; GONZALEZ, O.; PECCI, A.; TESONE, M. (2005): *Gonadotropin-releasing hormone antagonist antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary*. In: *Biology of reproduction*, Jg. 72, H. 3, S. 659–666.
- PARINAUD, J.; BEAUR, A.; BOURREAU, E.; VIEITEZ, G.; PONTONNIER, G. (1988): *Effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells*. In: *Fertility and sterility*, Jg. 50, H. 4, S. 597–602.
- PAWSON, A. J.; MORGAN, K.; MAUDSLEY, S. R.; MILLAR, R. P. (2003): *Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology*. In: *Reproduction (Cambridge, England)*, Jg. 126, H. 3, S. 271–278.
- PIKE, C. J. (1999): *Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease*. In: *Journal of neurochemistry*, Jg. 72, H. 4, S. 1552–1563.
- PRANGE-KIEL, J. (2006): *Östrogenwirkungen im Gehirn*. In: *Gynäkologische Endokrinologie*, Ausgabe 4, 2006, S. 6–11.
- PRANGE-KIEL, J.; WEHRENBURG, U.; JARRY, H.; RUNE, G. M. (2003): *Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons*. In: *Hippocampus*, Jg. 13, H. 2, S. 226–234.
- PRANGE-KIEL, J.; JARRY, H.; SCHOEN, M.; KOHLMANN, P.; LOHSE, C.; ZHOU, L.; RUNE, G. M. (2008): *Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis*. In: *The Journal of cell biology*, Jg. 180, H. 2, S. 417–426.
- REUBI, J. C.; PALACIOS, J. M.; MAURER, R. (1987): *Specific luteinizing-hormone-releasing hormone receptor binding sites in hippocampus and pituitary: an autoradiographical study*. In: *Neuroscience*, Jg. 21, H. 3, S. 847–856.
- RUNE, G. M.; PRANGE-KIEL, J.; FESTER, L. (2007): *Hippocampale Estrogensynthese und synaptische Plastizität*. In: *Neuroforum*, Ausgabe 4, 2007, S. 127–134.
- SAITO, M.; KORSMEYER, S. J.; SCHLESINGER, P. H. (2000): *BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes*. In: *Nature cell biology*, Jg. 2, H. 8, S. 553–555.
- SCHASSEN, C. von; FESTER, L.; PRANGE-KIEL, J.; LOHSE, C.; HUBER, C.; BÖTTNER, M.; RUNE, G. M. (2006): *Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth*. In: *Journal of neuroendocrinology*, Jg. 18, H. 11, S. 847–856.

- SCHMIDT, R. F.; LANG, F.; THEWS, G. (2005): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*; mit 78 Tabellen; [neue Approbationsordnung]. 29., vollst. neu bearb. und aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg S.496-499 (Springer-Lehrbuch).
- SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. (1999): *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. In: *Nature*, Jg. 399, H. 6735, S. 483–487.
- SKINNER, D. C.; CARATY, A. (2002): *Measurement and possible function of GnRH in cerebrospinal fluid in ewes*. In: *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, Jg. 59, S. 25–39.
- SKINNER, D. C.; MALPAUX, B.; DELALEU, B.; CARATY, A. (1995): *Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe: correlation with LH pulses and the LH surge*. In: *Endocrinology*, Jg. 136, H. 8, S. 3230–3237.
- SKINNER, D. C.; ALBERTSON, A. J.; NAVRATIL, A.; SMITH, A.; MIGNOT, M.; TALBOTT, H.; SCANLAN-BLAKE, N. (2009): *Effects of gonadotrophin-releasing hormone outside the hypothalamic-pituitary-reproductive axis*. In: *Journal of neuroendocrinology*, Jg. 21, H. 4, S. 282–292.
- STEWART, A. J.; KATZ, A. A.; MILLAR, R. P.; MORGAN, K. (2009): *Retention and silencing of prepro-GnRH-II and type II GnRH receptor genes in mammals*. In: *Neuroendocrinology*, Jg. 90, H. 4, S. 416–432.
- STOFFEL-WAGNER, B. (2001): *Neurosteroid metabolism in the human brain*. In: *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, Jg. 145, H. 6, S. 669–679.
- STORZ, G. (2002): *An expanding universe of noncoding RNAs*. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 296, H. 5571, S. 1260–1263.
- TAKEKIDA, S.; MATSUO, H.; MARUO, T. (2003): *GnRH agonist action on granulosa cells at varying follicular stages*. In: *Molecular and cellular endocrinology*, Jg. 202, H. 1-2, S. 155–164.
- TAN, O.; BUKULMEZ, O. (2011): *Biochemistry, molecular biology and cell biology of gonadotropin-releasing hormone antagonists*. In: *Current opinion in obstetrics & gynecology*, Jg. 23, H. 4, S. 238–244.
- TANAPAT, P.; HASTINGS, N. B.; REEVES, A. J.; GOULD, E. (1999): *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat*. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Jg. 19, H. 14, S. 5792–5801.
- TANG, X.; YANO, T.; OSUGA, Y.; MATSUMI, H.; YANO, N.; XU, J. et al. (2002): *Cellular mechanisms of growth inhibition of human epithelial ovarian cancer cell line by LH-releasing hormone antagonist Cetrorelix*. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 87, H. 8, S. 3721–3727.
- TANG, Y.; JANSSEN, W. G. M.; HAO, J.; ROBERTS, J. A.; MCKAY, H.; LASLEY, B. et al. (2004): *Estrogen replacement increases spinophilin-immunoreactive spine number in the prefrontal cortex of female rhesus monkeys*. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, Jg. 14, H. 2, S. 215–223.

- VEDDER, H.; ANTHES, N.; STUMM, G.; WÜRZ, C.; BEHL, C.; KRIEG, J. C. (1999): *Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system*. In: Journal of neurochemistry, Jg. 72, H. 6, S. 2531–2538.
- VITALE, A. M.; ABRAMOVICH, D.; PELUFFO, M. C.; MERESMAN, G.; TESONE, M. (2006): *Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist on proliferation and apoptosis of human luteinized granulosa cells*. In: Fertility and sterility, Jg. 85, H. 4, S. 1064–1067.
- WEAVER, C. E.; PARK-CHUNG, M.; GIBBS, T. T.; FARB, D. H. (1997): *17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors*. In: Brain research, Jg. 761, H. 2, S. 338–341.
- WEHRENBERG, U.; PRANGE-KIEL, J.; RUNE, G. M. (2001): *Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase*. In: Journal of neurochemistry, Jg. 76, H. 6, S. 1879–1886.
- WHITE, C. D.; STEWART, A. J.; LU, Z.-L.; MILLAR, R. P.; MORGAN, K. (2008): *Antiproliferative effects of GnRH agonists: prospects and problems for cancer therapy*. In: Neuroendocrinology, Jg. 88, H. 2, S. 67–79.
- WITKIN, J. W.; PADEN, C. M.; SILVERMAN, A. J. (1982): *The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain*. In: Neuroendocrinology, Jg. 35, H. 6, S. 429–438.

Verwendete Internetadressen:

- DIANOVA (2005): Immunologie: Sekundäntikörper. [Online im Internet] URL: http://www.dianova.com/downloads/Im2AK/dianova_Mehrfach_002.pdf [Stand: 06.12.2011, 10:46 Uhr]
- LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (2011): Invitrogen. [Online im Internet] URL: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/tables/Amine-reactive-xanthene-derivatives-in-this-section.html> [Stand: 06.12.2011, 11:34 Uhr]
- SIGMA-ALDRICH (2011): 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride. [Online im Internet] URL: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=D9542|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC [Stand: 06.12.2011, 11:14 Uhr]

VIII. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Janine Prange-Kiel für eine wunderbare Betreuung der Doktorarbeit und tolle Zusammenarbeit. Zu jeder Zeit hab ich mich vollkommen unterstützt gefühlt. Auch die im Verlauf der Doktorarbeit aufgetretene räumliche Trennung stellte keinerlei Beeinträchtigung oder Hindernisse beim Bewältigen des schriftlichen Verfassens der Doktorarbeit dar.

Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune, der Direktorin des Institutes für Neuroanatomie. Als Prüferin in meiner Physikumsprüfung konnte sie bereits damals mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten wecken. Unter ihrer Leitung des Institutes wurde mir die Forschung zu meinem Thema überhaupt möglich gemacht.

Auch möchte ich mich sehr bei Dr. Lars Fester für die Einarbeitung ins wissenschaftliche Arbeiten und die Unterstützung beim Auswerten meiner Daten bedanken. Auch durch ihn habe ich mich immer unterstützt gefühlt. Er stand mir bei allen Fragen stets zur Seite.

Das wissenschaftliche Arbeiten haben mir zudem Helga Herbort und Herdis Hamann durch deren stetige Hilfestellung im alltäglichen Laborbetrieb ermöglicht, wofür ich den beiden sehr dankbar bin. Von ihnen habe ich gelernt, hippocampale Dispersionskulturen herzustellen sowie die Immunhistochemien und die Apoptosetests durchzuführen.

Ich danke allen Mitarbeiteren des Institutes für Neuroanatomie für eine freundliche und angenehme Zusammenarbeit. Ich habe mich als Doktorandin im Institut immer willkommen gefühlt, was einen entscheidenden Beitrag zum Gelingen des Projektes und zum Verfassen der Doktorarbeit geleistet hat.

Ein großer Dank gilt auch Frau Lena Herich, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institutes für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, welche mir hinsichtlich der statistischen Auswertung der Daten eine große Hilfestellung war.

Ganz besonders danke ich meinem Freund Michael Werner, welcher einige Stunden über meiner verfassten Doktorarbeit gesessen hat. Mit viel Geduld hat er mich beim Bearbeiten von Graphiken und Texten sowie beim Korrekturlesen unterstützt.

Schlussendlich gilt meinen Eltern, Dr. Bernd Hannig und Daisy Hannig, ein ganz besonders großer Dank für die jahrelange Unterstützung während der Schulzeit und besonders während des Studiums. Nicht nur finanziell, sondern mit ausgesprochen viel Liebe standen sie immer hinter mir und ich habe mich zu jeder Zeit vollstens verstanden und unterstützt gefühlt. Ich danke Ihnen für die Liebe und das Vertrauen in mich und meine Arbeit.

IX. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Hamburg, Dezember 2012,

Julia-Theresa Hannig