

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Institut für Neuroanatomie

Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Regulation der kortikalen Neurotrophin-Expression durch Sexualhormone nach experimentell induziertem Schädel-Hirn- Trauma

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jana Westerhorstmann
aus Paderborn, Nordrheinwestfalen

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.06.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende: Prof. Dr. Roland Bender

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Tobias Martens

Für meine Oma.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	6
2. Abbildungsverzeichnis.....	8
3. Einleitung.....	9
3.1 Hintergrund der Studie.....	9
3.2 Controlled Cortical Impact Model.....	11
3.3 Neurotrophine und ihre Rezeptoren.....	13
3.4 Östrogene	16
3.5 Androgene	17
3.6 Letrozol	18
3.7 Finasterid	19
3.8 Ziele der Arbeit.....	20
4. Material	22
4.1 Chemikalien	22
4.2 Antikörper.....	23
4.3 Geräte und technische Hilfsmittel	24
4.4 Software.....	25
4.5 Arzneimittel	26
4.6 Lösungen und Kulturmedien	26
5. Methoden	28
5.1 Vorbehandlung mit Letrozol (LET) und Finasterid (FINA).....	28
5.2 Unilateral Controlled Cortical Impact Model (CCI)	28
5.3 Euthanasie und Gewebepräparation	29
5.4 Western Blot	30
5.4.1 Proteinaufbereitung.....	30
5.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford	30
5.4.3 SDS-Page	30
5.4.4 Blottechnik.....	31
5.4.5 Entwicklung	33
5.4.6 Auswertung	34
5.4.7 Statistik.....	35
6. Ergebnisse.....	36
6.1 Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren	36
6.2 Auswirkungen der CCI auf Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren	39
6.3 Auswirkungen einer LET- bzw. FINA-Gabe auf die CCI-induzierten Expressionsänderungen der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren	41
6.4 Auswirkungen einer LET- bzw. FINA-Gabe auf die Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren in Sham-behandelten Tieren.....	45
7. Diskussion.....	48
7.1 Auswirkungen der CCI auf die Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren	49
7.2 Einflüsse von LET und FINA auf die Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren	50
7.3 Gibt es Geschlechtsunterschiede in der Reaktion auf CCI?	52
7.4 Gibt es Geschlechtsunterschiede in der Reaktion auf LET und FINA?	53

Inhaltsverzeichnis

7.5 Methodische Aspekte.....	54
7.6 Klinische Relevanz der Befunde	55
8. Zusammenfassung	56
8.1 Summary.....	57
9. Literaturverzeichnis	58
10. Danksagung	67
11. Curriculum Vitae	68
12. Eidesstattliche Versicherung.....	69

1. Abkürzungsverzeichnis

AI	Aromatase Inhibitor
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgenrezeptor
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovines serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CCI	<i>Controlled cortical impact</i>
CHI	<i>Closed head injury</i>
contra, con	Contralateral
CYP19A1	Aromatase
DHDOC	Dehydrodeoxykortikosteron
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHP	Dehydroprogesteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
E3	Estriol
E4	Estetrol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ER α	Estrogenrezeptor alpha
ER β	Estrogenrezeptor beta
FINA	Finasterid
FPI	<i>Fluid percussion injury</i>
GP $ER1$	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
ipsi, ip	Ipsilateral

1. Abkürzungsverzeichnis

<i>KO</i>	<i>Knock out</i>
LET	Letrozol
<i>LTP</i>	<i>Long-term potentiation</i>
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
<i>NGF</i>	<i>Nerve growth factor</i>
NT-3/-4/-5	Neurotrophin-3/-4/-5
NTR	Neurotrophin-Rezeptor
p75 ^{NTR}	p75 Neurotrophin Rezeptor
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>PBS-T</i>	<i>Phosphate Buffered Saline-Tween</i>
Pi	<i>Protease Inhibitoren-Mix complete</i>
<i>RIPA</i>	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	<i>Sodium lauryl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
<i>SDS-Page</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>Sham</i>	Kontrollversuchsgruppe, erhielten eine Scheinbehandlung (Pseudoschlag)
<i>TBI</i>	<i>Traumatic brain injury</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
<i>Trk</i>	<i>Tropomyosion-related kinase</i>
TrkA	Tyrosin-Rezeptor-Kinase A
TrkB	Tyrosin-Rezeptor-Kinase B
TrkC	Tyrosin-Rezeptor-Kinase C
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
VEH	Vehikel (<i>Vehicle</i>), Trägersubstanz
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung des unilateralen *Controlled Cortical Impact* (CCI).
- Abb. 3.3.1: Neurotrophin Rezeptoren und der Effekt ihrer Aktivierung.
- Abb. 3.6.1: Die Rolle der Aromatase in der Estradiol-Synthese.
- Abb. 3.7.1: Inhibitorische Effekte des 5 α -Reduktasehemmers Finasterid.
- Abb. 5.3.1: Zeitlicher Ablauf des Experiments (horizontal: Tage (d) vor- (-) und nach (+) dem Schlag/*Sham*-Behandlung; vertikale Pfeile: Interventionen).
- Abb. 5.4.1: Schematische Darstellung - Western-Blot Membranen und Filterpapiere.
- Abb. 6.1.1: Repräsentative Western-Blots für Neurotrophinrezeptoren (TrkA-C, p75^{NTR}) und Neurotrophine (BDNF, NT-3).
- Abb. 6.1.2: BDNF und Anti-Maus-IgG-AK versus Anti-Maus-IgG-AK alleine.
- Abb. 6.2.1: Graphische Darstellung der Expression von BDNF, NT-3, p75^{NTR} und TrkA-C im CCI-geschädigten ipsilateralen relativ zum ungeschädigten contralateralen Cortexgewebe („ipsi vs. contra“).
- Abb. 6.3.1: Graphische Darstellung der Expression von BDNF-, NT-3-, p75^{NTR}-Expression nach „CCI vs. *Sham*“-Vergleich in Tieren, die perioperativ entweder Vehikel (Veh), Letrozol (Let) oder Finasterid (Fina) injiziert bekommen haben.
- Abb. 6.3.2: Graphische Darstellung der Expression der TrkA-, TrkB- und TrkC-Expression nach „CCI vs. *Sham*“-Vergleich in Tieren, die perioperativ entweder Vehikel (Veh), Letrozol (Let) oder Finasterid (Fina) injiziert bekommen haben.
- Abb. 6.4.1: Graphische Darstellung der Resultate des „Let vs. Veh“-Vergleichs in *Sham* behandelten Tieren.
- Abb. 6.4.2: Graphische Darstellung der Resultate des „Fina vs. Veh“-Vergleichs in *Sham* behandelten Tieren.

3. Einleitung

3.1 Hintergrund der Studie

Unter einem Schädel-Hirn-Trauma (engl. *traumatic brain injury, TBI*) versteht man eine Verletzung des Schädels unter Mitbeteiligung des Gehirns. Dabei wird differenziert zwischen einem direkten und einem indirekten Schädel-Hirn-Trauma. Das direkte beschreibt eine Verletzung, bei welcher die Hirnhaut geschädigt wird. Folglich wird auch oft von einer offenen Verletzung gesprochen. Die indirekte Schädigung hingegen führt nicht zu einer derartigen Verletzung, sondern zu ödematösen Blutungen, welche subdural, epidural oder intrazerebral liegen können (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010).

Ein Schädel-Hirn-Trauma ist eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Frauen haben jedoch im Vergleich zu Männern eine bessere klinische Prognose (Phelan et al., 2007; Berry et al., 2009; Ley et al., 2013). Ein Grund hierfür könnte der Einfluss von Sexualhormonen sein, welche zwischen den Geschlechtern und im Laufe des Lebens variieren. Insbesondere für Östrogene, die vorherrschenden weiblichen Sexualhormone, wird eine neuroprotektive Funktion vermutet (Arnold und Beyer, 2009; Arevalo et al., 2015). So führte beispielsweise die systemische Applikation von 17 β -Estradiol (E2), des potentesten Östrogen, in männlichen Nagetieren, nach experimentell induzierter *TBI* zu einer verbesserten Endprognose (Emerson et al., 1993; Soustiel et al., 2005; Day et al., 2013). Auch in weiblichen Nagetieren bewirkte die Applikation von E2 eine verbesserte Regeneration (Bao et al., 2011; Naderi et al., 2015). Zudem reagierten weibliche Nagetiere mit einem regulären Sexualzyklus weniger anfällig auf eine durch ein Schädel-Hirn-Trauma erzeugte Verletzung, als männliche oder ovariectomierte weibliche Nager (Bramlett und Dietrich, 2001; O'Connor et al., 2006; Maghool et al., 2013; siehe jedoch Bruce-Keller et al., 2007). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass E2 neuroprotektive Effekte nach einem Schädel-Hirn-Trauma hat. Um die Funktion der Östrogene innerhalb des Gehirns verstehen zu können, muss jedoch noch berücksichtigt werden, dass sowohl im männlichen als auch weiblichen Gehirn Nervenzellen existieren, die Aromatase, das finale Enzym für die E2 Synthese, exprimieren und somit in der Lage sind, Testosteron zu E2 zu konvertieren (Naftolin et al., 1975; Roselli et al., 1985; Balthazart, 1991; Kawato et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004). Dies ist besonders ausgeprägt im Hippocampus der Fall, wo das endogen produzierte E2 eine wichtige Rolle bei synaptischer Plastizität spielt (Kretz et al., 2004; Hojo et al., 2004; Fester und Rune, 2014). Darüber hinaus wird bei einer

3. Einleitung

Gehirnverletzung die E2-Synthese in Gliazellen durch Aktivierung der glialen Aromatase gesteigert (Arevalo et al., 2015). Somit ist auch das im Gehirn produzierte E2 als eventuell kritischer Parameter für das Resultat des Schädel-Hirn-Traumas anzusehen. Weiterhin wird im Gehirn auch das finale Enzym der Dehydrotestosteron (DHT)-Synthese, die 5 α -Reduktase, exprimiert (Castelli et al., 2013). Somit kann von Neuronen also auch das potenteste Androgen, DHT, selbst produziert werden. Wie sich DHT auf die Ausprägung einer *TBI* auswirkt, ist bislang unbekannt.

Mögliche Ziele der Sexualhormon-Wirkung sind Neurotrophine und deren Rezeptoren. Die klassischen (Säugetier-) Neurotrophine sind kleine basische Proteine mit spezifischen Aufgaben in der neuronalen Entwicklung (Thoenen, 1991; Reichardt, 2006). Zu den klassischen Neurotrophinen gehören der Nervenwachstumsfaktor (engl.: *nerve growth factor*, NGF), der Wachstumsfaktor BDNF (engl.: *brain-derived neurotrophic factor*) und die Neurotrophine (NT) -3 und -4/5. Im erwachsenen Nervensystem unterstützen sie in erster Linie das Überleben von Neuronen und die Aufrechterhaltung ihrer Konnektivität (Park und Poo, 2013). Neurotrophine vermitteln ihre Wirkung durch Bindung und Aktivierung eines dualen Rezeptorsystems, welches aus Tyrosinkinasen (TrkA-C) und dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptor ähnlichem Molekül, dem p75 Neurotrophinrezeptor (p75^{NTR}; Bothwell, 1995), besteht. Eine Veränderung der Expression von Neurotrophinen und deren Rezeptoren wird regelmäßig nach experimentell induzierter *TBI* beobachtet (Merlio et al., 1993; Yang et al., 1996; Hicks et al., 1999; Oyesiku et al., 1999; Delbary-Gossart et al., 2016) und als neuroprotektive Reaktion durch Abschwächung der sekundären Zellbeschädigung gedeutet, obgleich die Funktionen und Wirkungsweisen der Neurotrophine nach einer *TBI* sehr komplex sind (Mattson und Scheff, 1994; Sebastiani et al., 2016; da Silva Meirelles et al., 2017). Bemerkenswert ist, dass E2 imstande ist, die Expression der Neurotrophine (Bimonte-Nelson et al., 2004; Carbone und Handa, 2013) und zugleich der Rezeptoren (Spencer et al., 2008) zu beeinflussen. Somit könnten Sexualhormone eine entscheidende Determinante für die Neurotrophin-Wirkung nach einer *TBI* sein.

In dieser Arbeit wurde diese Hypothese mit Hilfe des „*Controlled-Cortical-Impact-Modell*“ zur Erzeugung einer *TBI* in Mäusen überprüft (Thal et al., 2008). Die Mäuse bekamen dafür systemisch entweder den nicht-steroidalen Aromatase-Inhibitor Letrozol, den 5 α -Reduktase-Hemmstoff Finasterid oder nur die entsprechenden Lösungsmittel (Vehikel) als Kontrolle injiziert. Letrozol und Finasterid sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu

passieren (Dave et al., 2013) und können somit die E2- bzw. DHT-Synthese sowohl peripher als auch zentral inhibieren (Vierk et al., 2015; Bender et al., 2017).

3.2 Controlled Cortical Impact Model

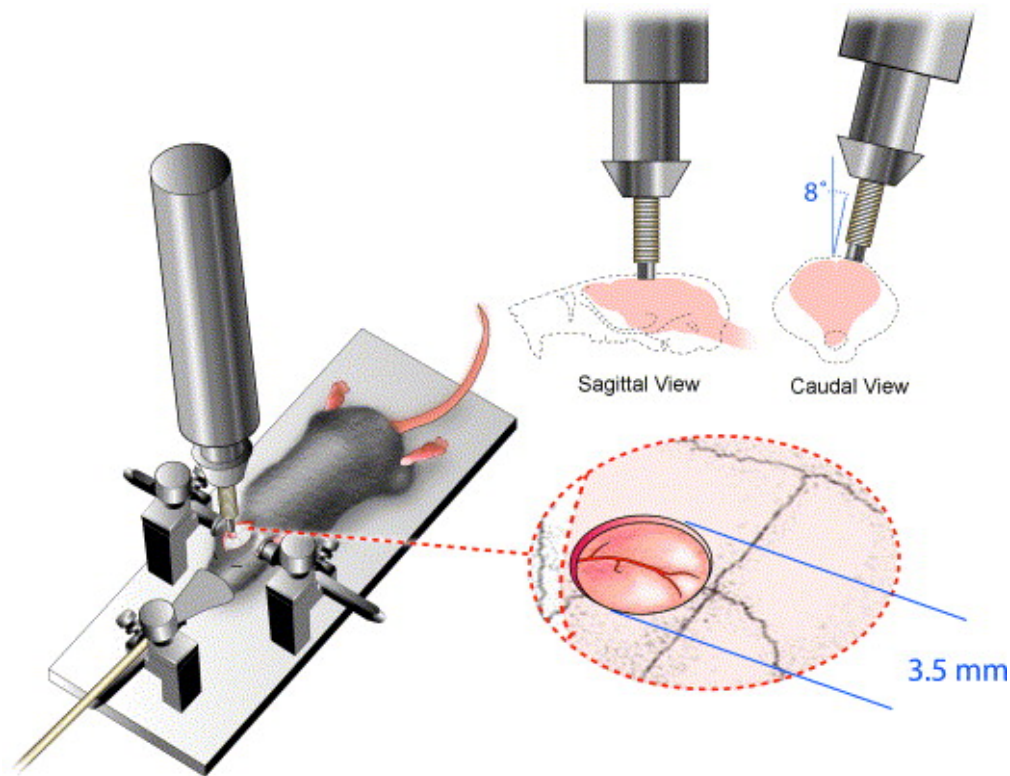


Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung des unilateralen *Controlled Cortical Impact (CCI)* (nach: Onyszchuk G et al., 2007).

Wie bereits anfänglich erwähnt, ist das Schädel-Hirn-Trauma im klinischen Alltag relativ häufig. Für Wissenschaftler, die die Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas untersuchen wollen, stellt sich die Frage, wie die Pathologie zur weiteren Klärung labortechnisch nachgestellt werden kann. Bereits 1988 wurde die erste Publikation über einen *Controlled Cortical Impact (CCI)* veröffentlicht (Lighthall, 1988). Dabei wurden Versuche zunächst an Frettchen durchgeführt. Heute ist es jedoch möglich, den Schlag auf ein Minimum zu regulieren, so dass das Modell in gleicher Weise auch, wie in dieser Arbeit, an Mäusen eingesetzt werden kann (Smith et al., 1995).

Generell kann ein Schädelhirntrauma durch einen pneumatischen Kolben oder durch einen elektromagnetischen Aktuator erzeugt werden (Febinger et al., 2015; Osier et al., 2017; Songarj et al., 2015; Dong et al., 2015; Song et al., 2016). Dabei können die Größe

3. Einleitung

und Form des Kolbens oder Aktuators sowie deren Geschwindigkeit, Verweilzeit und Eindringtiefe maßgeblich variieren (Osier und Dixon, 2017). Beide Antriebsformen sind in der Lage eine graduierte und reproduzierbare Verletzung herbei zu führen, und fanden in vielen Forschungsarbeiten Verwendung (Osier und Dixon, 2017).

In der Literatur lassen sich unterschiedliche Applikationsarten eines CCI finden:

1. *Open head Mild Traumatic Brain Injury*

Bei dieser Technik erfolgt nach einer Kraniotomie unter Anästhesie der Schlag auf die freiliegende Dura (Ferbinger et al., 2015). Durch dieses Verfahren können beispielsweise kortikale Durchblutungsveränderungen (Golding et al., 1999), Veränderungen in der Genexpression (Redell et al., 2013) und Verhaltensdefizite (Song et al., 2016; Kelso et al., 2009) untersucht werden.

2. *Closed Head Mild TBI*

Dieses Verfahren soll die präklinische Situation eines Schädel-Hirn-Traumas bei einem intakten Schädel reproduzieren (*closed head injury, CHI*). Der Schlag wird ohne vorhergehende Kraniotomie durchgeführt.

3. *Repeated TBI*

Mit diesem Testverfahren werden multiple Traumata verursacht, um den Unterschied zu einem einzigen Trauma darstellen zu können. Es lässt sich mit den beiden zuvor genannten Techniken kombinieren und soll wiederholte Traumata, wie sie zum Beispiel beim Militär oder Sport auftreten können, unter Laborbedingungen nachvollziehbar machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des *Open head mild Traumatic brain injury* angewendet. Dabei wurde, nach einer Kraniotomie, mithilfe eines pneumatischen Aktuators ein Schlag mit reproduzierbarer Geschwindigkeit, Verweilzeit und Eindringtiefe auf die rechte Seite des parietalen Kortex erzeugt. Als Kontrolltiere wurden Mäuse verwendet, bei denen lediglich eine Anästhesie und eine Eröffnung der Haut mit Abkratzung des Periosts, d. h. eine Scheinbehandlung (engl. *Sham*), durchgeführt wurde (Krämer et al., 2017).

3.3 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Neurotrophine sind strukturell verwandte Proteine, welche zuerst als Überlebens-Faktoren von sympathischen und sensorischen Neuronen im peripheren Nervensystem identifiziert worden sind (Levi-Montalcini, 1987; Thoenen, 1991; Shooter, 2001). Nachfolgend wurde jedoch auch ihre Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von Neuronen des zentralen Nervensystems erkannt (Skaper, 2018; Park und Poo, 2013; Poo et al., 2001; Huang und Reichardt, 2003). So wird beispielsweise durch eine begrenzte Ausschüttung von Neurotrophinen während der Entwicklung die Anzahl von Neuronen so eingegrenzt, dass eine optimale Innervationsdichte für die Zielregion resultiert (Skaper, 2018).

Generell können die Neurotrophine in fünf Typen unterteilt werden (Bothwell, 1995):

1. NGF (*Nerve growth factor*)
2. BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*)
3. NT-3 (Neurotrophin 3)
4. NT-4 (Neurotrophin 4)
5. NT-5 (Neurotrophin 5)

Aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften werden NT-4 und NT-5 jedoch meist zu NT-4/5 zusammen gefasst.

Neurotrophine können nach ihrer Freisetzung an zwei unterschiedliche Rezeptortypen binden: dem $p75^{\text{NTR}}$ sowie den Tyrosinkinase-Rezeptoren (Skaper, 2018). Dabei binden die Rezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie (TrkA, TrkB und TrkC) nur spezifische Neurotrophine, was zu tendenziell trophischen (d. h. das Überlebenssignal verstärkenden) Effekten in der Zelle führt. Denn durch Bindung der Neurotrophine an eine Tropomyosin-verwandte Kinase (*tropomyosin-related kinase*, *Trk*) werden beispielsweise Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Phospholipase C- und Ras-Signalwege aktiviert, welche unter anderem die Mitose anregen (Skaper, 2018) (s. Abb. 3.3.1). Generell ist die Affinität der Neurotrophine zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren deutlich stärker als zu $p75^{\text{NTR}}$, welcher alle 5 Neurotrophin-Typen binden kann. Im Gegensatz zur Trk-Familie erzeugt eine Bindung der Neurotrophine hier ein tendenziell apoptotisches Signal (Skaper, 2018, Yi et al., 2003; Shen, 2017).

Neurotrophine werden, wie viele Wachstumsfaktoren und Hormone, als Pre-Pro-Proteine synthetisiert (Zanin et al., 2017). Das „Pre“ beschreibt die Anwesenheit einer N-terminalen Sequenz, die das Pro-Protein als Vorläufermolekül auf die sekretorische Bahn oder in ein intrazelluläres Kompartiment geleitet. Aus diesem Grund wird das Pre-Peptid oft als

3. Einleitung

„Signal-Peptid“ oder „Signal-Sequenz“ bezeichnet (Zanin et al., 2017). Zur Prozessierung der Pro-Domäne werden Enzyme benötigt (Pro-Protein-Konvertasen), die intrazellulär im Golgi Apparat oder in sekretorischen Vesikeln vorzufinden sind (Mowla et al., 2001; Teng et al., 2010). Extrazelluläre Enzyme sind beispielsweise die Matrix-Metalloproteinase (Lee et al., 2001, Mizoguchi et al., 2011). Funktionell werden der Pro-Domäne Wirkungen bei folgenden Prozessen zugeordnet (Zanin et al., 2017):

- 1) Förderung der Proteinstabilität und der korrekten Faltung
- 2) Direkter intrazellulärer Transport
- 3) Unterstützung der Proteinspeicherung
- 4) Regulation der extrazellulären Verteilung
- 5) Abschirmung der maturen Domäne von den Rezeptoren zur Limitierung der Bioverfügbarkeit

Außerdem ist bekannt, dass die Pro- und die mature Form gegensätzlich wirken können. So interagiert beispielsweise pro-BDNF bevorzugt mit p75^{NTR} und matures BDNF bevorzugt mit TrkB (Chao und Bothwell, 2002; Ibáñez, 2002). Dies führte zur Formulierung einer „Yin-Yang Hypothese“, in welcher pro- und matures BDNF gegensätzliche biologische Effekte durch Aktivierung zweier individueller Rezeptorsysteme hervorrufen (Lu et al., 2005). Weniger gut untersucht ist die biologische Wirkung von pro- und maturem NT-3. Auch hier scheint der biologische Effekt unterschiedlich zu sein, denn pro-NT-3 interagiert bevorzugt mit p75 und Sortilin als Co-Rezeptor und vermittelt apoptotische Signale (Yano et al., 2009) wohingegen matures NT-3 an TrkC bindet und trophische Effekte auslöst (Bothwell, 1991).

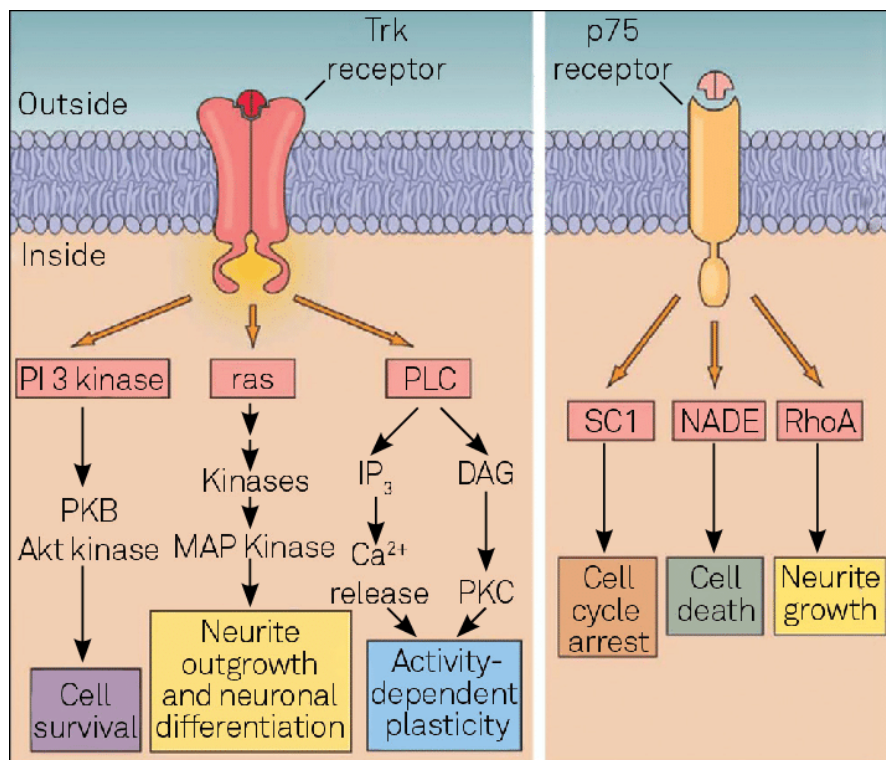


Abb. 3.3.1: Neurotrophin Rezeptoren und der Effekt ihrer Aktivierung (nach: Huang SH, 2015).

3.4 Östrogene

Östrogene gehören mit den Gestagenen zu den wichtigsten weiblichen Sexualhormonen. Biochemisch handelt es sich um Steroidhormone, die sich vom Grundgerüst des Cholesterins ableiten lassen. Insgesamt gibt es vier verschiedene Formen des Östrogens: Estron (E1), 17 β -Estradiol (E2), Estriol (E3) und Estetrol (E4). In dieser Arbeit wird der Fokus auf 17 β -Estradiol, das potenteste Östrogen, gelegt, dessen Applikation nach einem *TBI* zu einer verbesserten Endprognose sowohl in männlichen (Emerson et al., 1993; Soustiel et al., 2005; Day et al., 2013) als auch in weiblichen Nagetieren (Bao et al., 2011; Naderi et al., 2015) führt.

Synthetisiert werden Östrogene ausgehend vom Cholesterol über die Vorstufen Testosteron und Androstenedion. Den finalen Syntheseschritt übernimmt im Organismus das Enzym Aromatase (CYP19A1), das Testosteron zu E2 konvertiert (s. Abb. 3.6.1 und 3.7.1). Meist werden Östrogene als Sexualhormone der Ovarien beschrieben, welche im weiblichen Zyklus die zelluläre Proliferation und das Gewebewachstum in den weiblichen Reproduktionsorganen fördern (z. B. im Uterus), um diese für die Aufnahme des Embryos vorzubereiten. Neben dieser Funktion hat E2 jedoch auch Funktionen in der Regulation der Knochendichte, des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels, des Elektrolythaushalts, der Hautphysiologie, sowie im kardiovaskulären System und im zentralen Nervensystem (Hall et al., 2011; Nilsson et al., 2011). Synthetisiert werden Östrogene deswegen, außer in den Ovarien, auch in anderen Gewebetypen wie zum Beispiel *de novo* in Neuronen (Furukawa et al., 1998; Wehrenberg et al., 2001). Dies beinhaltet auch die Synthese in kortikalen Neuronen des Hippocampus (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004), wo endogen gebildetes E2 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Synaptogenese und der Langzeitpotenzierung (*long-term-potentialiation*, *LTP*) spielt (Kretz et al., 2004; Bender et al., 2010; Vierk et al., 2012; Bender et al. 2017).

Östrogene vermitteln ihre Effekte durch Bindung an einen von drei bisher bekannten Östrogenrezeptoren: ER α , ER β oder *GP*ER1 (*G protein-coupled estrogen receptor 1*) (Sandén et al., 2011). Die klassischen Östrogenrezeptoren, ER α und ER β , sind vorwiegend Transkriptionsfaktoren, die bei Aktivierung stimulierend auf die Expression von Zielgenen einwirken (Kretz et al., 2004; Bender et al., 2010; Vierk et al., 2012; Bender et al., 2017). ER α ist unter anderem im Uterus, in der Epidermis, in den Brustdrüsen, der Leber, der Niere, im weißen Fettgewebe, im Stroma der Prostata, im Hoden und Nebenhoden sowie in den Thecazellen der Ovarien vorzufinden (Talwar et al., 1964).

Hingegen ist ER β überwiegend im Kolon, in den Epithelien der Prostata und Harnblase, den Granulosazellen der Ovarien, der Lunge, dem Skelett sowie dem Gehirn anzutreffen (Heldring et al., 2007). Auch in kortikalen Neuronen konnte eine Expression von ER α und ER β durch immunhistochemische Verfahren (Bender et al., 2010) und *in situ* Hybridisierung (Osterlund et al., 1998; Shughrue und Merchenthaler, 2000; Bender et al., 2010) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist der membrangebundene und G-Protein-gekoppelte Rezeptor *GPER1* an zelluläre Signaltransduktionskaskaden gekoppelt und vermutlich überwiegend für die schnellen physiologischen Effekte (*rapid effects*) der Östrogene verantwortlich (Srivastava et al., 2013). Auch *GPER1* wird im Kortex exprimiert (Almey et al., 2015; Meseke et al., 2018).

3.5 Androgene

Als Androgene werden natürliche oder synthetische Hormone benannt, welche die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane steuern. Neben Androsteron und Dehydroepiandrosteron (DHEA) gehören auch Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) zu der Gruppe der natürlichen Androgene. Hauptsächlich werden sie in der Zona reticularis der Nebennierenrinde und im Hoden gebildet. Die höchste Konzentration ist in den männlichen Fortpflanzungsorganen nachzuweisen (Matsumoto, 2013).

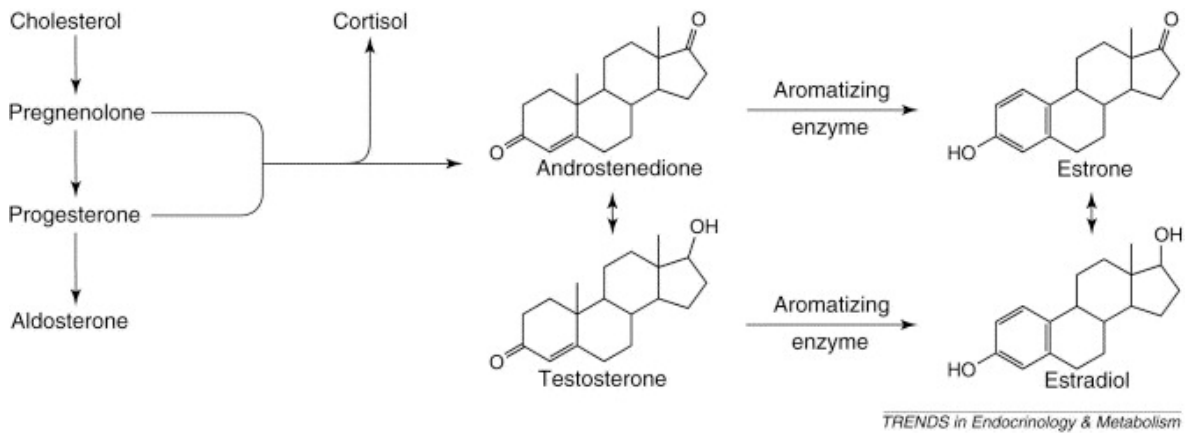
Das wichtigste und bekannteste Androgen ist das Testosteron. Es ist das primäre männliche Hormon, welches unter anderem für die sexuelle Differenzierung, die Ausbildung der männlichen Geschlechtsorgane, die Spermatogenese und die Fruchtbarkeit verantwortlich ist (Swerdloff et al., 2017). Es wird zu 95% im Hoden gebildet und durch die Leydig-Zellen freigesetzt (Wen et al., 2016). Dabei ist Testosteron nicht nur entscheidend für die Ausbildung primärer, sondern auch für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale, welche das männliche Haarwachstum, den Stimmbruch und anabolische Effekte wie vermehrtes skelettales Muskelwachstum einschließen (Nassar und Leslie, 2018). Intrazellulär ist DHT potenter als Testosteron (Winters et al., 1999; Heinlein et al., 2002; Oettel, 2004). Das DHT ist ein 5 α -reduzierter Metabolit des Testosterons, welches überwiegend in der Prostata, der Haut und der Leber durch das Enzym 5 α -Reduktase hergestellt wird (Swerdloff et al., 2017). Die 5 α -Reduktase wiederum tritt in zwei unterschiedlichen Isoformen auf: Typ 1 konnte in den Talgdrüsen der Haut, in der Leber, im Muskel und im Gehirn nachgewiesen werden (Ellis et al., 2005; Thigpen et al., 1993; Castelli et al., 2013). Hingegen ist Typ 2 vor allem in der Prostata, den Samenbläschen, im Nebenhoden, in den Haarfollikeln sowie in der Leber

3. Einleitung

vorhanden und produziert ca. zwei Drittel des zirkulierenden DHT (Thigpen et al., 1993). Ein Drittel des zirkulierenden DHT wird durch den Typ 1 der 5 α -Reduktase synthetisiert (Gisleskog et al., 1998). Folglich ist Typ 1 der 5 α -Reduktase dominierend im ZNS und Typ 2 überwiegend in der Peripherie lokalisiert (Stuart et al., 2001). Da die 5 α -Reduktase im Gehirn vorliegt, kann von Neuronen also auch das potenteste Androgen, DHT, selbst produziert werden (Castelli et al., 2013). Insgesamt werden etwa 7% des Testosterons durch die 5 α -Reduktase in dessen potenteren Metaboliten DHT umgewandelt und nur etwa 0,5% des Testosterons durch das Enzym Aromatase zu Östrogen umgesetzt (Winters et al., 1999; Heinlein et al., 2002; Oettel, 2004).

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der neben schnell auftretenden Effekten (über die Aktivierung von Signalkaskaden) analog zu den Östrogenrezeptoren ER α und ER β auch länger anhaltende Genexpressionsänderungen hervorrufen kann (Sarkey et al., 2008; Olsen et al., 2016; Toocheck et al., 2016).

3.6 Letrozol



3.6.1: Die Rolle der Aromatase in der Estradiol-Synthese, (nach: Brodie, 2002).

Letrozol ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Aromatasehemmer. Klinisch findet er Anwendung in der Behandlung von postmenopausalen Frauen mit Hormonrezeptor positivem Mammakarzinom im Frühstadium und wird auch als Ersttherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom zur palliativ endokrinen Therapie bei bereits eingetretener Metastasierung eingesetzt (Aktories et al., 2013).

Die Gruppe der Aromatase Inhibitoren (AI), zu der auch Letrozol gezählt wird, wird oftmals in der Literatur als *Neue* oder *Zweite Generation* aufgeführt (Buzdar et al., 2002). Neben Letrozol wird auch Anstozol sowie Fadrozol, eine nur in Japan zulässige Arznei, dieser

3. Einleitung

Gruppe zugeordnet (Buzdar et al., 2002). Hingegen werden zu der ersten Generation beispielsweise Exemestan und Formestan hinzugezählt, welche irreversibel an das Enzym Aromatase binden und steroidalen Ursprungs sind (Buzdar et al., 2002). Im Gegensatz zur ersten Generation hemmen die neuen Als die Umwandlung von Testosteron zu E2 reversibel (Yapura et al., 2017) und kompetetiv (Buzdar et al., 2002). Eine Inhibition wird durch Bindung an den Häm-Komplex des Cytochrom-P450 des Enzyms Aromatase ermöglicht (Yapura et al., 2017).

3.7 Finasterid

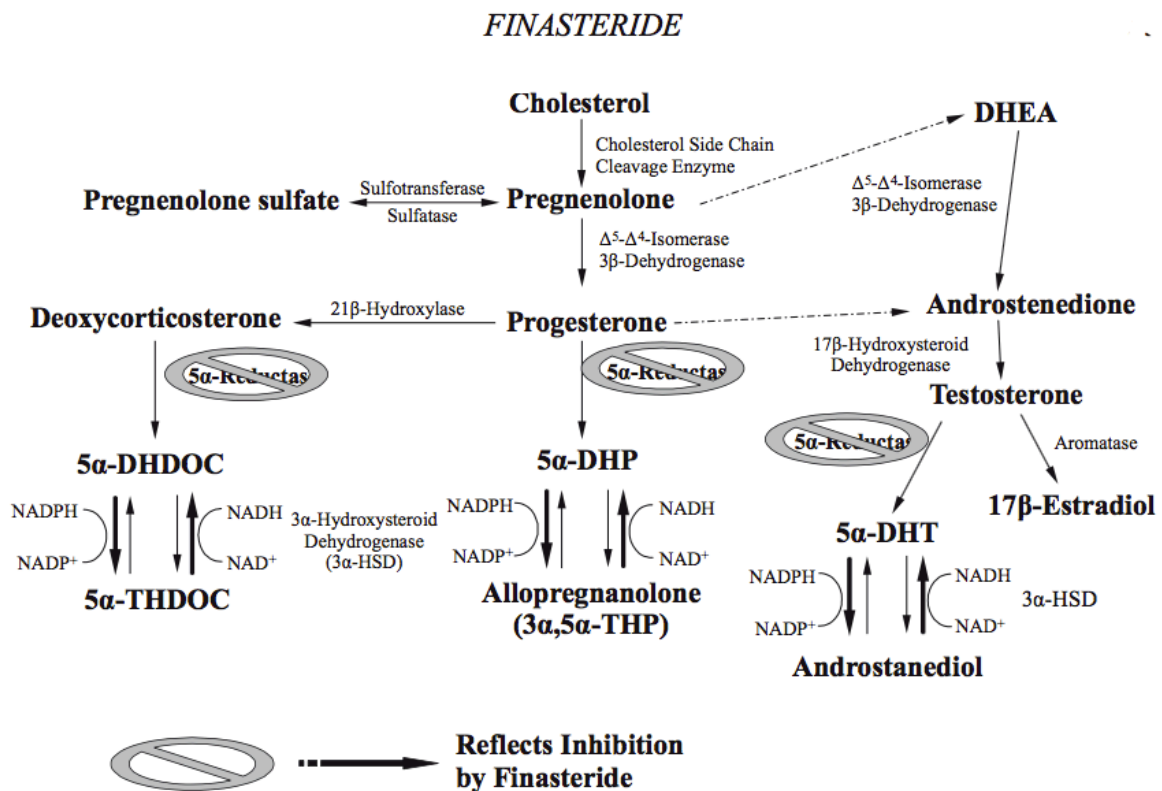


Abb. 3.7.1: Inhibitorische Effekte des 5 α -Reduktasehemmers Finasterid (nach: Finn et al., 2006).

Finasterid ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der 5 α -Reduktasehemmer. Klinisch wird diese Arznei bei gutartigen Prostatahyperplasien (Rivero, 2018) oder zur Behandlung von erblich bedingtem Haarausfall (androgenetische Alopezie) eingesetzt. Durch die Ähnlichkeit des Finasterids zum Testosteron bindet es an das Enzym 5 α -Reduktase und blockiert somit die Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) (Aktories et al., 2013) (s. Abb. 3.7.1). Im ZNS kann das Finasterid aufgrund seiner Blut-Hirn-Schranken Gängigkeit aktiv werden (Lephardt, 1995).

Die Wirkung des Finasterids in Menschen und Nagern unterscheidet sich. In Menschen wird selektiv das Typ 2 Isozym durch Finasterid inhibiert (Andersson et al., 1991), wohingegen es bei Nagern eine kompetitive Hemmung des Typ 1 und eine irreversible Hemmung der Typ 2 Enzyme hervorruft. Zurückzuführen ist dieses Phänomen auf eine Abweichung der Aminosäuresequenz für das Typ 1 Isozym bei Menschen und Ratten (Andersson, 1990). Zu beachten ist jedoch auch noch, dass Finasterid nicht nur die Umwandlung von Testosteron in DHT, sondern auch die Umwandlung von Deoxycorticosteron zu Dehydrooxycorticosteron von Progesteron zu Dehydroprogesteron (DHP) hemmt (Finn et al., 2006). Im experimentellen Einsatz kann dies die Interpretation der Ergebnisse erschweren, da auch DHP und seinem Metaboliten Allopreganolon eine neuroprotektive Wirkung nachgesagt wird (Liu et al., 2012; Cooke et al., 2013; Zhu et al., 2017).

3.8 Ziele der Arbeit

Wie einleitend erwähnt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Sexualhormone 17β -Estradiol (E2; das potenteste Östrogen) und Dihydrotestosteron (DHT; das potenteste Androgen) auf die Expression von Neurotrophinen (NT) und Neurotrophin-Rezeptoren (NTR) nach experimentell induziertem Schädel-Hirn-Trauma untersucht. Die Studie untersuchte dabei die Hypothese, dass geschlechtsspezifisch unterschiedliche Einflüsse dieser Sexualhormone auf die Expression oder Wirkung von Neurotrophinen zu den beobachteten Geschlechtsunterschieden in der Prognose nach Schädel-Hirn-Traumen beitragen könnten. Um die Untersuchung durchführen zu können, wurde den Versuchstieren über einen definierten, perioperativen Zeitraum (siehe dazu die „Zeitschiene“ in Abb. 5.3.1) entweder der Aromatase-Inhibitor Letrozol, der 5α -Reduktase-Inhibitor Finasterid oder nur das entsprechende Lösungsmittel (DMSO) intraperitoneal injiziert. Nach Ablauf der Versuchsperiode wurde den Gehirnen der Versuchstiere Gewebe entnommen und auf folgende Parameter bzw. spezifische Fragestellungen hin untersucht:

- 1) Bewirkt das Schädeltrauma (CCI) in den Kontrolltieren eine Veränderung der NT- und/oder NTR-Expression?
- 2) Beeinflusst die perioperative Gabe von Letrozol bzw. Finasterid die CCI-induzierten Veränderungen der NT- und/oder NTR-Expression?
- 3) Verändern Letrozol bzw. Finasterid selbst (d. h. ohne CCI) bereits die Expression von NT- und/oder NTR?

3. Einleitung

- 4) Lassen sich im Hinblick auf in den Fragestellungen 1) - 3) beobachteten Veränderungen der NT- und/oder NTR-Expression Unterschiede zwischen den Geschlechtern feststellen?

Alle operativen Eingriffe an den Tieren, sowie die Gewebeentnahme, wurden im Institut für Anästhesiologie der Universität Mainz von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schäfer durchgeführt. Die Western Blots wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Untersucht wurde die Expression der Neurotrophine BDNF und NT-3, sowie die aller Rezeptoren (TrkA-C, p75^{NTR}). Da durch keinen der getesteten Antikörper ein substantieller Proteinnachweis von NGF und NT-4/5 im Cortexgewebe gelang, wurde auf die Untersuchung dieser Faktoren verzichtet.

4. Material

4.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acryl-Amid	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Aqua destillata	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Elektrophoresezelle, vertikal (Mini-Protean®, Criterion™)	Biorad Laboratories, München
Ethanol (96%)	UKE Apotheke, Eppendorf, Hamburg
Gel-Kämme	Bio-Rad Laboratories, München
Immobilon Western	Merck Millipore, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver	Heirler, Radolfzell
Phos-Stop	Roche, Mannheim
<i>Phosphate Buffered Saline-</i> (PBS)- Tabletten	Merck, Darmstadt
Photonenentwicklungsmaschine	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Ponceau-Rot	Merck, Darmstadt
Prestained Page Ruler (Marker)	Fermentas
Protease Inhibitoren-Mix (<i>complete</i>)	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i> , BSA)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Rotiphoresegel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Sterilium	Bode Chemie Hamburg

4. Material

Stickstoff (N ₂)	UKE Apotheke, Eppendorf, Hamburg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt

4.2 Antikörper

Antikörper (anti-)	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung (Blockierlösung)	Herkunft (Typ)
BDNF	Icosagen (Tartu, Estland) (Clone 3C11)	1:500 (Milchpulver)	Maus (monoklonal)
NT-3	Abcam, Berlin (ab53685)	1:500 (Milchpulver)	Kaninchen (polyklonal)
p75 ^{NTR}	Merck Millipore, Darmstadt (AB1554)	1:2000 (Milchpulver)	Kaninchen (polyklonal)
TrkA	Abcam, Berlin (ab76291)	1:2500 (Milchpulver)	Kaninchen (polyklonal)
TrkB	R&D Systems, Wiesbaden (1494-TB-025)	1:200 (BSA)	Maus (monoklonal)
TrkC	R&D System, Wiesbaden (1404-TC/CF)	1:200 (BSA)	Maus (monoklonal)
α -Tubulin	Sigma-Aldrich, Hamburg (T6074)	1:10000 (Milchpulver)	Maus (monoklonal)

4.3 Geräte und technische Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
Accu-Jet Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Analysen Waage	Sartorius AG, Göttingen
Biophotometer	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Chemielumineszenz	Vilber Lourmat
<i>Electrophoresis constant power supply</i> ECPS 3000/150	Amersham Pharmacie Biotech Europe, Freiburg im Breisgau
<i>Electrophoresis constant power supply</i> EPS 3501 XL	Amersham Pharmacie Biotech Europe, Freiburg im Breisgau
Ep T.I.P.S. Standard (Pipettenspitzen)	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Folienstift	Faber-Castell, Stein
Gefrierschrank (-80C°)	Forma Scientific, Marietta, Ohio
Inkubator	Draeger, Lübeck
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Magnetrührstäbchen, Standard	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroliter-Pipetten (2/20/200/100 µl)	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Nitrocellulose-Blotting-Membranen, 0,45µm)	GE Healthcare Life Sciences
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pinzette	FST (<i>Fine Science Tools</i>), Heidelberg
Power Pac	Biorad Laboratories, München

4. Material

Schere	FST (<i>Fine Science Tools</i>), Heidelberg
Schüttler, GFL3015	Johann Otto
Skalpell	B. Braun Melsungen, Hessen
Spritze, Omnifix-F	B. Braun Melsungen, Hessen
Spritzflasche	VWR International, Darmstadt
Stempel (CCI)	L. Kopacz, Mainz
Stereotaktischer Rahmen (CCI)	Kopf Instruments, Tujunga, USA
Tissue Kosmetiktücher	Tapira, GVS Großverbraucherspezialist, Heidenheim
Tube transparent, 1,5/2 ml	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Untersuchungshandschuhe, Nitrile, Powder-Free	Micro-Touch, Ansell, Brüssel, Belgien

4.4 Software

Produkt	Hersteller
Excel für Mac Version 2011	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Image J	Waxne Rasband (NIH), Bethesda (Maryland), USA
Word für Mac Version 2011	Microsoft, Redmond, Washington, USA
OS X Yosemite 10.10.5	Apple, Cupertino, CA, USA
GraphPad Prism 7.03	GraphPad Software, San Diego, CA, USA

4.5 Arzneimittel

Arznei	Hersteller
Finasterid	Sc203954 Stanta Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Letrozol	Sc204791A, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

4.6 Lösungen und Kulturmedien

BSA (Bovine Serum Albumin)

5% BSA + 0,02%:Thimerosal in *PBS-Tween* (*Phosphate Buffered Saline-Tween*)

BSA (**Fraktion V**) einwiegen: 5 g auf 100 ml *PBS-Tween*

200 µl 10% Thimerosal in 100 ml BSA Lösung

Lämmli-Probenpuffer

1,54 g Dithiothreitol (DTT)

2 g SDS (*sodium lauryl sulfate*; Natriumlaurylsulfat)

8 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8

10 ml Glycerin

250 mg BPB

Milchpulver (5%)-PBS-Tween

80 ml: 4 g Milchpulver auf 80 ml PBS-Tween

Nassblotpuffer

80 ml 10x Nassblotpuffer:

29 g Glycin

58 g Tris

37 ml 10% SDS

800 ml H₂O

720 ml Aqua dest.

200 ml Methanol

4. Material

PBS Tween-Waschpuffer

100 ml 10x *PBS*
30 ml 10% Tween
870 ml Aqua dest., steril

RIPA-Puffer

1,5 ml 150 mM NaCl
2,5 ml 50 mM Tris pH 7,5
5 ml 1% NP40
250 µl 0,1% *SDS*

Sammelgel

H ₂ O	5,5 ml
30% Acrylamid	1,7 ml
0,5 M Tris (pH: 6,8)	2,5 ml
10% <i>SDS</i>	100 µl
BPB	100 µl
10% APS (Ammoniumpersulfat)	100 µl
TEMED	8 µl

<u>Trenngel</u> (0,75 mm dick)	<i>4 x 15% Gele</i>	<i>4 x 12,75% Gele</i>	<i>4 x 10% Gele</i>
H ₂ O	4,7 ml	6,2 ml	8 ml
30 % Acrylamid	9,9 ml	8,4 ml	6,6 ml
1,5 M Tris (pH: 8,8)	5 ml	5 ml	5 ml
10% <i>SDS</i>	200 µl	200 µl	200 µl
10% APS	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl

5. Methoden

Alle Eingriffe an Tieren wurden im Institut für Anästhesiologie der Universität Mainz von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schäfer gemäß den tierschutzrechtlichen Vorschriften des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz (G15-1-059) durchgeführt. Für die Studie wurden zwei Monate alte C57Bl6/NRj (Janvier, Saint Berthevin Cedex, France) männliche (n=48) und weibliche (n=48) Mäuse verwendet. Die Mäuse waren zu Beginn der Behandlung 11 Wochen alt und hatten ein Gewicht zwischen $24,2 \pm 1,3$ g (Männchen) und $20,8 \pm 1,3$ g (Weibchen).

5.1 Vorbehandlung mit Letrozol (LET) und Finasterid (FINA)

Die Mäuse erhielten – beginnend 3 Tage vor dem operativen Eingriff (siehe Zeitschiene, Abb. 5.3.1) – über den Zeitraum von 6 Tagen täglich Letrozol (LET, 5 µg/g Körpergewicht), Finasterid (FINA, 7,5 µg/g) oder ein entsprechendes Volumen des Lösungsmittels DMSO (VEH, 1% in *PBS*; siehe unten) intraperitoneal injiziert. Zur Herstellung der LET-Lösung wurden 50 mg/ml LET in DMSO (100%) bei 40 °C gelöst und diese Stammlösung dann schrittweise mit *PBS* (bei 40 °C) verdünnt und beschallt (Ultraschall), um eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml in DMSO (1% in *PBS*) zu erreichen. Analog wurde bei FINA vorgegangen, um eine Endkonzentration von 0,75 mg/ml zu erreichen. Das tägliche Injektionsvolumen lag somit zwischen 200 und 250 µl. Der Stress für die Tiere wurde durch die Benutzung von minimalinvasiven Injektionswegen, trainierten Experimentatoren und nur kurzen Perioden außerhalb des heimischen Käfigs auf ein Minimum reduziert.

5.2 Unilateral Controlled Cortical Impact Model (CCI)

Jeder experimentellen Gruppe (VEH, LET, FINA) wurden 16 weibliche und 16 männliche Mäuse zugeteilt. Davon erhielten jedoch nur jeweils 10 Mäuse eine CCI, während bei den verbleibenden 6 Mäusen nur die Schädeldecke eröffnet und die Dura mater exponiert wurde (*Sham*-Gruppe; siehe unten). Bei den CCI-behandelten Mäusen wurde, nach einer zuvor vollzogener Kraniotomie, ein pneumatisches Hirntrauma durch einen Stempel senkrecht zu der intakten Dura mater erzeugt (Impaktor Durchmesser: 3,5 mm, Schlaggeschwindigkeit: 8 m/s, Schlagdauer: 150 ms, Gehirnverdrängung: 1,5 mm). Die Tiere wurden zuvor mit Isofluran (4 Vol.% für 1 Min., Erhaltungsdosis: 2 Vol.%)

anästhesiert. Zusätzlich wurden sie durch einen stereotaktischen Rahmen (Kopf Instruments, Tujunga, USA) am Kopf fixiert (s. Abb. 3.2.1), um eine möglichst genaue Reproduzierbarkeit zu sichern. Die Kontrollgruppe (*Sham*) erhielt lediglich eine Kraniotomie mit Eröffnung der Haut und Abkratzung des Periosts, jedoch ohne einen Schlag (Krämer et al., 2017). Damit die Tiere während der Behandlung nicht auskühlten, wurde die Körpertemperatur durch eine *Feedback*-kontrollierte Wärmeplatte konstant auf 37 °C gehalten. Für eine optimale Genesung verbrachten die Mäuse die nächsten 1,5 Stunden nach der Operation in einem Inkubator.

5.3 Euthanasie und Gewebepreparation

Bereits 72 Stunden nach der Operation wurden die Tiere, nach 1 minütiger 1% Vol. Isofluran Anästhesie, durch eine zervikale Dislokation euthanisiert. Auf der Seite, auf der der Schlag ausgeführt wurde (ipsilateral) und – für Kontrollzwecke – auf der gegenüberliegenden, unverletzten Seite (contralateral) wurde dem Cortex Gewebe entnommen, welches Hippokampus und somatosensorischen Kortex umfasste. Dieses wurde in Eppendorf-Gefäße (2 ml) übertragen und tiefgefroren. Abbildung 5.3.1 stellt den zeitlichen Ablauf des Experiments dar, um zu veranschaulichen, wann die Injektionen, die CCI-/*Sham*-Behandlungen sowie die Euthanasie stattgefunden hat:

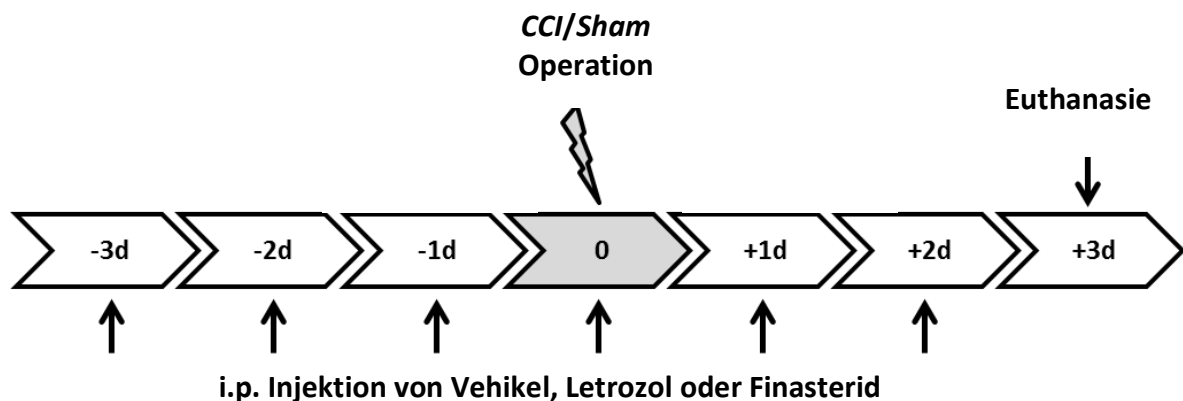


Abb. 5.3.1: Zeitlicher Ablauf des Experiments (horizontal: Tage (d) vor- (-) und nach (+) dem Schlag/*Sham*-Behandlung; vertikale Pfeile: Interventionen) (Gölz et al., 2019).

5.4 Western Blot

5.4.1 Proteinaufbereitung

Bevor die Proteine weiter für die *SDS*-Page verwendet werden konnten, mussten die Gewebeproben aufbereitet werden. Ziel war die Entfernung nicht benötigter Zellbestandteile. Zur Aufbereitung wurde das Gewebe aus dem Originalgefäß entnommen und zusammen mit 300 µl *RIPA*-Puffer, welche sowohl Phos-Stop als auch einen Proteaseinhibitor enthielt, in ein neues Gefäß gegeben, indem die Zerkleinerung des Gewebes stattgefunden hat. Zum Schutz der Proteine war die Lagerung auf Eis obligat. Nach einer halbstündigen Lagerung auf Eis wurden das Gewebe für 30 Minuten bei 13.000 rpm (*revolutions per minute*) und 4 °C zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren wurden feste Zellbestandteile unter Ausnutzung der Massenträgheit präzipitiert, so dass der Überstand mit den gelösten Proteinen isoliert werden konnte. Dieser wurde anschließend mittels Stickstoff eingefroren und die Proben wurden bei -80 °C in einem Gefrierschrank aufbewahrt.

5.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test dient der quantitativen Bestimmung einer Protein-Konzentration durch Photometrie. Er wurde durchgeführt, um im weiteren Verlauf eine gezielte Proteinmenge einsetzen zu können. Dazu wurde zu einer 5 µl Gewebeprobe, welche in *RIPA*-Puffer vorlag, 20 µl steriles Aqua dest. gegeben. Folglich entstand eine Verdünnung von 1:5. Von dieser wurden wiederum 2 µl abpipettiert und zu 18 µl sterilem Aqua dest. hinzugefügt. Der Kalibrationsbereich wurde mit 1,25-10 µg gewählt. Anschließend wurde am Photometer eine Bradford-Standardreihe erstellt indem 0 µl, 2,5 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl und 20 µl BSA-Lösung (0,5 µg/µl) auf 20 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und gemessen wurden. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 verdünnt. Jeweils 1 ml von diesem wurden zu den 18 µl Aqua dest. und 2 µl Probe in *RIPA*-Lösung gegeben. Zur Validierung der Ergebnisse wurde jede Probe zweifach angesetzt und photometrisch vermessen. Anschließend wurde die Proteinmenge durch einen Mittelwert festgelegt.

5.4.3 SDS-Page

SDS-Page ist die englische Abkürzung für *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*. Es handelt sich dabei um eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dieses

Verfahren ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand der Molekülgröße in einem elektrischen Feld.

Zunächst wurden die Gele für das *SDS* Verfahren gegossen. Dazu wurden jeweils zwei Glasplatten, von welchen die eine den 0,75 mm dicken Abstandhalter trug und die zweite als ein Deckglas fungierte, mit 96% igem Ethanol gereinigt, in den Gießstand gespannt und mit Gel aufgefüllt. Als erstes wurde das Trenngel angesetzt (siehe 4.6) und eingefüllt. Während der 30-minütigen Aushärtung wurde das Trenngel zum Schutz vor Austrocknung mit Isopropanol abgedeckt. Nach Verwerfen des Isopropanols fand eine Überschichtung des Trenngels mit dem Sammelgel statt. Dabei sollte das Verhältnis von Trenn- zu Sammelgel etwa 2:1 betragen. Das Einbringen von entsprechenden Kämme diente der Vorbereitung der Probenkammern für die darauf folgende Gelelektrophorese. Zur Aushärtung verblieben die Gele erneut für 30 Minuten in den Gießständen und wurden erst danach in Gelelektrophoresekammern eingebracht. Für den Nachweis der jeweiligen Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren wurden unterschiedliche Gele gegossen. So wurde für TrkA, TrkB, p75^{NTR} und NT-3 ein 10% iges Gel verwendet, wohingegen für TrkC und BDNF ein 12,75 bzw. 15% iges Gel angesetzt wurde. Anschließend wurden die Kammern mit Lämmli-Laufpuffer aufgefüllt. Nachdem die Kämme entnommen worden sind, wurden die Gelkammern vorsichtig mit Lämmli-Laufpuffer gespült, um Acrylamid-Reste zu entfernen. Die Proben wurden für fünf Minuten gekocht, dann kurz auf Eis gekühlt, um sie danach einzeln aufzutragen. Je 12,5 µl Proteinprobe wurden in die Tasche eingefüllt. Dabei wurden die Gele nach folgendem Schema in Abschnitt 5.4.6 bestückt. Anzumerken ist, dass die Gewebeproben der männlichen und weiblichen Tiere separat in unterschiedlichen Gelen gelaufen sind.

5.4.4 Blottechnik

Ziel des Western Blots ist es, mithilfe eines elektrischen Feldes, Proteine, welche zuvor durch die *SDS-Page* aufgetrennt worden sind, auf eine Nitrocellulose Membran zu übertragen.

Hier wurde ein Nassblotverfahren verwendet. Die Filterpapiere wurden, bevor die Kammern nach dem Schema der Abbildung 5.4.1 zusammengesetzt worden sind, für wenige Minuten in den Nassblotpuffer eingelegt. Anschließend wurden die Gele vorsichtig, unter Verwerfen des Sammelgels aus den Glasplatten entnommen. Das Schema in Abbildung 5.4.1 war streng einzuhalten, da bei Nichteinhaltung die negativ geladenen Proteine nicht auf die Membran wandern können.

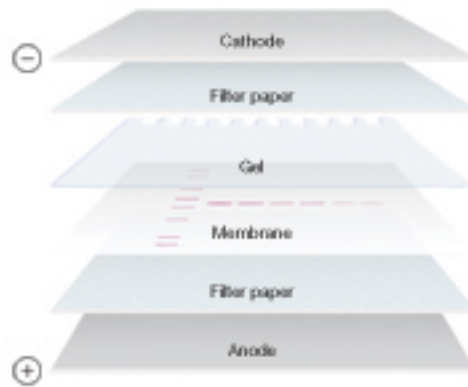


Abb. 5.4.1: Schematische Darstellung - Western-Blot Membranen und Filterpapiere.

(Quelle: <http://www.bio-rad.com/de-de/category/western-blotting-membranes-filter-paper>, Stand: 04.01.2018)

Danach wurden die Halterungen in die zuvor mit Nassblotpuffer aufgefüllten Außenkammern eingehängt. Wichtig war es Luftblasen zu vermeiden, da diese das Ergebnis und die anschließende Auswertung behindern können. Zur besseren Verteilung der Ionen wurde einen Rührfisch in die Kammern gelegt, um die Entstehung eines Gradienten zu vermeiden. Weiterhin wurden die Außenkammern durch das Einlegen von Kühl Akkus gekühlt. Die Kammern wurden der Farbkodierung entsprechend mit einem Deckel verschlossen und an den Strom angeschlossen. Bei 100 V, 400 mA und 150 W wurde für 90 Minuten geblottet. Nach Ablauf der Zeit konnten die Halterungen entnommen und die Membranen in PonceauS für etwa eine Minute gefärbt werden. Der Farbstoff wurde im Anschluss vorsichtig mit Aqua dest. abgespült und die Membranen wurden zum Trocknen und Schneiden auf ein Filterpapier gelegt. Das Schneiden fand horizontal statt, sodass jeweils TrkA, TrkB oder TrkC auf dem oberen Abschnitt (250-100 kDa), p75^{NTR} und α -Tubulin auf dem mittleren Abschnitt (100-40 kDa) und NT-3 oder BDNF auf dem unteren Abschnitt (40-0 kDa) dargestellt werden konnten. Die Beschriftung der Blots beinhaltete die Nummerierung sowie die Kennzeichnung des Geschlechts und des Antikörpers. Danach wurden die Membranen je nach verwendetem Antikörper (siehe Abschnitt 4.2) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen entweder mit Milchpulver (in *PBS-Tween*) oder 5% BSA (in *PBS-Tween*) für 60 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Blockierungslösung verworfen und für 24 Stunden der primäre Antikörper in entsprechender Konzentration (mit BSA- oder Milchpulver-Lösung verdünnt; siehe Abschnitt 4.2) aufgetragen. Pro Membranstreifen wurden jeweils 3 ml eingesetzt, sodass jeder Streifen gut und ohne Luftblasen bedeckt war. Die Lagerung fand über Nacht im Kühlschrank auf einem Schüttler statt. 24 Stunden später wurden die Antikörper mit ihrer

Lösung abgesammelt und die Membranen dreimal für jeweils zehn Minuten mit *PBS-Tween* gewaschen. Anschließend konnte der sekundäre Antikörper aufgetragen werden, welcher immer in einer Konzentration von 1:2500 in *BSA* oder Milchpulver angesetzt wurde (siehe 4.2). Entsprechend der zuvor eingesetzten Primär-Antikörper wurden als Sekundärantikörper *HRP* (*horseradish peroxidase*) -gekoppelte Antikörper gegen entweder Mäuse-IgG (Immunglobulin G) (aus der Ziege) oder Kaninchen IgG (aus dem Esel) verwendet. Wieder wurden 3 ml pro Membranstreifen angesetzt. Nach 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler fand erneut dreimal eine 10-minütige Waschung mit *PBS-Tween* statt.

5.4.5 Entwicklung

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde das *Immobilon Western Chemiluminescent HRP* Substrat verwendet und darüber eine Kopplung an eine lichtsensible Substanz hergestellt. Dazu wurden die einzelnen Komponenten im Verhältnis von 1:1 gemischt. Die Membranen wurden schließlich für 5 Minuten vollständig mit der Entwicklerflüssigkeit bedeckt. Es wurden jeweils nur die Streifen eines Antikörpers zur gleichen Zeit entwickelt. Lediglich p75^{NTR} und α -Tubulin wurden gemeinsam entwickelt. Die Membranen wurden in Klarsichtfolien gelegt und mithilfe der Photonenentwicklungsmaschine sichtbar gemacht.

5.4.6 Auswertung

Die Ergebnisse der Western Blots wurden mit der NIH Fiji (ImageJ) Software ausgewertet. Dabei fand eine Quantifizierung der jeweiligen Banden anhand der unterschiedlichen Grauwert-Intensität statt. Als Ladungs-Kontrolle wurde α -Tubulin verwendet. Für die Analyse wurden stets nur Banden auf demselben Gel verglichen. Um alle gewünschten Analysen durchführen zu können, wurden die Gele nach folgendem Schema bestückt:

Gel 1	Gel 2	Gel 3
Marker	Vehikel CCI, ipsilateral	Letrozol CCI, ipsilateral
Vehikel CCI, ipsilateral	Vehikel CCI, contralateral	Letrozol CCI, contralateral
Vehikel CCI, contralateral	Marker	Finasterid CCI, ipsilateral
Letrozol CCI, ipsilateral	Finasterid CCI, ipsilateral	Finasterid CCI, contralateral
Letrozol CCI, contralateral	Finasterid CCI, contralateral	Marker
Vehikel Sham, ipsilateral	Vehikel Sham, ipsilateral	Letrozol Sham, ipsilateral
Vehikel Sham, contralateral	Vehikel Sham, contralateral	Letrozol Sham, contralateral
Letrozol Sham, ipsilateral	Finasterid Sham, ipsilateral	Finasterid Sham, ipsilateral
Letrozol Sham, contralateral	Finasterid Sham, contralateral	Finasterid Sham, contralateral
-	-	Marker

Folgende Auswertungen wurden durchgeführt:

- 1) Zur Beurteilung eines Effektes eines *CCI* oder *Sham*-Eingriffes wurden die Werte der ipsilateralen Seite mit der contralateralen Seite des selben Tieres verglichen (Darstellung: ipsi vs. contra %; der contralaterale Wert wurde als 100% gesetzt)
- 2) Zur Beurteilung eines Effektes von LET oder FINA auf *CCI*-induzierte Veränderungen wurde die Werte von *CCI*-behandelten Tiere (getrennt nach LET, FINA oder VEH) in Relation zu den jeweils korrespondierenden Daten der *Sham*-behandelten Tiere gesetzt (Darstellung: „*CCI* vs. *Sham* %“; hier wurde der *Sham*-Wert als 100% gesetzt).
- 3) Zur Beurteilung eines generellen (d. h. von *CCI* unabhängigen) Effektes von LET oder FIN wurden nur die Werte der *Sham*-behandelten Tiere miteinander

verglichen (Darstellung: LET bzw. FINA vs. VEH; hier wurde der VEH-Wert als 100% gesetzt).

Ein Vergleich „weiblich“ vs. „männlich“ konnte bei der gewählten Vorgehensweise nicht durch Analyse von Banden desselben Gels erfolgen. Hierfür wurden nach Abschluss der Auswertungen 1-3 die Werte verschiedener Gele miteinander verglichen und auf auffällige Abweichungen untersucht.

Da lediglich 6 *Sham*-Mäuse, hingegen aber 10 *CCI*-behandelte Mäuse jedes Geschlechts in jeder Behandlungsgruppe verfügbar waren, wurden für 4 Durchgänge die Gewebe der 6 *Sham*-Mäuse derart gemischt, dass jede Maus zu gleichen Anteilen in der Mischung vertreten war. Für die Durchgänge 7-10 repräsentierte das eingesetzte *Sham*-Gewebe somit einen Durchschnittswert der Tiere 1-6.

5.4.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde zunächst überprüft, ob die Werte normal verteilt (parametrisch) oder nicht normal verteilt waren. Dazu wurde der *D'Agostino & Person Omnibus normality test* verwendet. Beim Vergleich zweier Gruppen (*CCI* und *Sham*; Abb. 6.2.1) wurde bei Normalverteilung der *Student's t-Test*, bei Nicht-Normalverteilung der *Mann-Whitney-U-Test* eingesetzt. Zusätzlich wurde mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* überprüft, ob das Ergebnis des „ipsi vs. contra“-Vergleiches signifikant von den bei Wirkungslosigkeit des Eingriffs zu erwartenden 100% abweicht. Beim Vergleich von drei Gruppen (VEH, LET und FINA; Abb. 6.3.1 und 6.3.2) wurde bei Normalverteilung der Werte eine *One-way-ANOVA* mit anschließendem *Sidak's Multiple Comparison Test* durchgeführt und bei Nicht-Normalverteilung der *Kruskal-Wallis-Test* mit anschließendem *Dunn's Multiple Comparison Test* angewendet. Für die statistische Untersuchung von Effekten einer LET- oder FINA-Behandlung auf die Expression unter *Sham*-Bedingungen (Abb. 6.4.1 und 6.4.2) wurde wiederum der *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* verwendet, um Abweichungen von den Kontrollwerten (VEH = 100%) zu bestimmen. Paarvergleiche zwischen „männlich“ und „weiblich“ wurden mit dem *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt. Als signifikant wurden *p*-Werte <0,05 angesehen (*<0.05; **<0.01, ***<0.001). *P*-Werte <0,20 wurden als Hinweis auf eine „Tendenz“ separat notiert.

6. Ergebnisse

6.1 Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

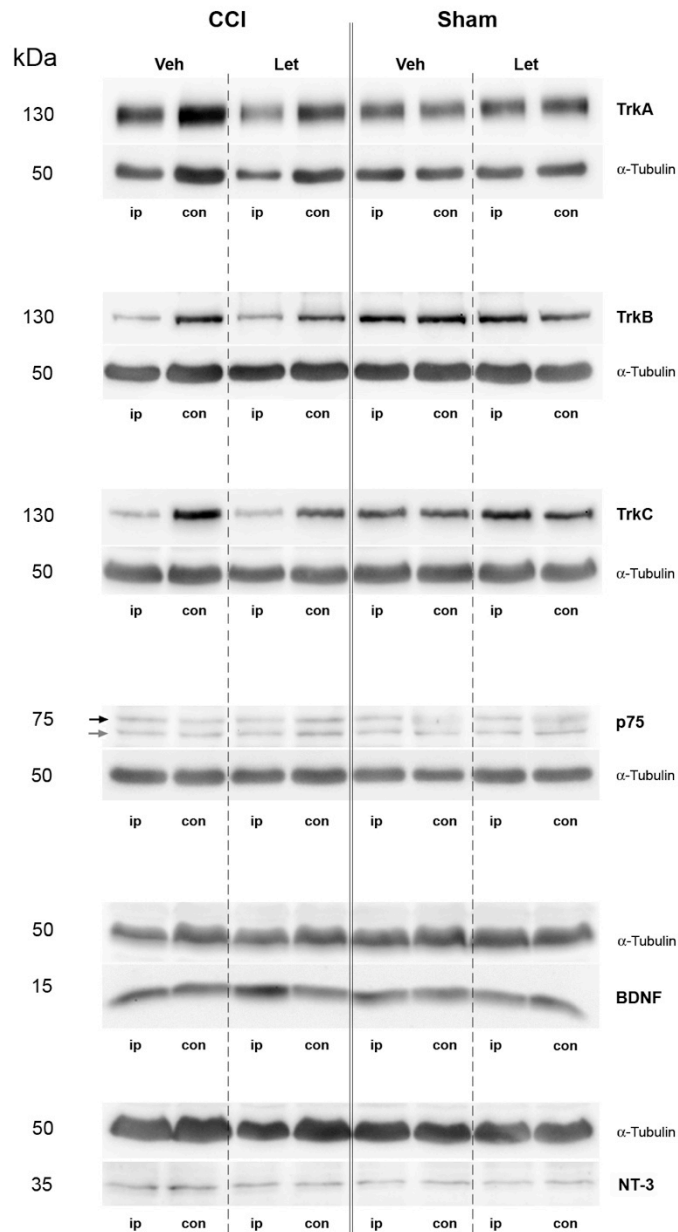


Abb. 6.1.1: Repräsentative Western-Blots für Neurotrophinrezeptoren (TrkA-C, p75^{NTR}) und Neurotrophine (BDNF, NT-3), Beispiel: männliche LET-behandelte Tiere. Abkürzungen: ip = ipsilateral; con = contralateral; LET = Letrozol-behandelt, VEH = Vehikel-behandelt. Linksseitig wird in Kilodalton (kDa) die jeweilige atomare Masseneinheit der Proteine beschrieben und rechtsseitig wird das nachgewiesene Protein benannt.

6. Ergebnisse

In einem ersten Schritt wurden die verwendeten Antikörper auf die Auswertbarkeit der erzeugten Proteinbanden getestet. Abbildung 6.1.1 zeigt beispielhaft die Ergebnisse eines Western-Blots beim Vergleich LET-behandelter mit VEH-behandelten Männchen. Dargestellt sind repräsentative Banden für die Neurotrophinrezeptoren TrkA-C sowie p75^{NTR}, sowie für die Neurotrophine BDNF und NT-3:

- Für die Trk-Rezeptoren ergaben sich charakteristische Banden, die erwartungsgemäß in Höhe der 130 Kilodalton (kDa) Markerbande erkennbar waren.
- Für p75^{NTR} wurde regelmäßig eine Doppelbande, etwa auf Höhe von 75 kDa (Abb. 6.1.1., schwarzer Pfeil) und 60 kDa (Abb. 6.1.1., grauer Pfeil), detektiert. Da der vollständige Rezeptor auf der Höhe von 75 kDa erwartet wird, wurde nur diese Bande ausgewertet. Bei der 60 kDa-Bande handelt es sich vermutlich um ein nach proteolytischer Spaltung verkürztes (*truncated*) und daher nicht mehr als Rezeptor funktionsfähiges Protein (Zampieri et al., 2005).
- Für BDNF wurden mit dem eingesetzten Antikörper regelhaft zwei Banden auf Höhe von ca. 40 kDa und 15 kDa dargestellt, die der BDNF-Proform (ca. 40 kDa) und der durch proteolytische Spaltung der Proform erzeugten, freigesetzten, maturen Form (ca. 15 kDa) entsprechen (Dieni et al., 2012). Da hierfür jedoch ein monoklonaler Antikörper aus der Maus verwendet wurde, der über gegen Maus-IgGs gerichtete Sekundärantikörper nachgewiesen wurde, die auch die Maus-eigene IgGs erkannten und diese, wie sich herausstellte, nach CCI im Gewebe stark erhöht waren (siehe dazu Abb. 6.1.2), konnte die BDNF-Proform nicht eindeutig von der leichten Kette dieser IgGs (ca. 50 kDa) abgegrenzt werden. Aus diesem Grund wurde - wie in Abb. 6.1.1 (Reihe 5) dargestellt - nur die bei ca. 15 kDa verlaufende mature BDNF-Expression ausgewertet.
- Für NT-3 wurde mit dem verwendeten Antikörper (aus Kaninchen) nur eine Bande auf Höhe von ca. 35 kDa detektiert, die der Proform von NT-3 entspricht (Seidah et al., 1996).

Abb. 6.1.1. verdeutlicht beispielhaft auch die Analyseverfahren. So wurden stets – nach Relativierung der Bandenintensität zur internen Expressionskontrolle α -Tubulin (55 kDa) –

6. Ergebnisse

Expressionswerte vom selben Gel miteinander verglichen und zueinander in Relation gesetzt: ipsi- (ip) vs. contralaterale (con) Expression (Fragestellung 1), *CCI* vs. *Sham* (für LET und VEH getrennt; Fragestellung 2) oder LET vs. VEH (nur bei *Sham*; Fragestellung 3; hierfür wurden ipsi- und contralaterale Werte zusammengefasst).

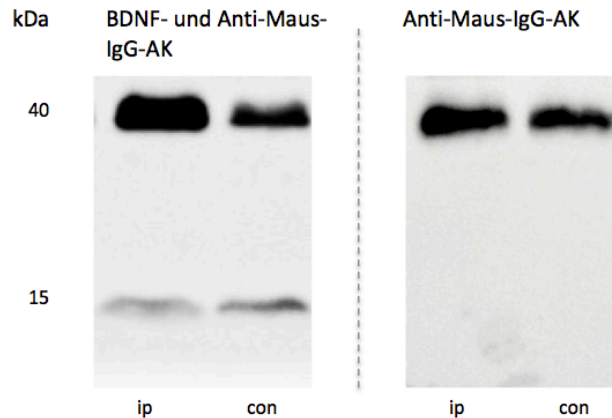


Abb. 6.1.2: BDNF und Anti-Maus-IgG-AK (links) versus Anti-Maus-IgG-AK alleine (rechts). Dargestellt ist in beiden Blots ein nach *CCI* ipsilateral erhöhtes Signal in Höhe des Verlaufs der pro-BDNF-Isoform (40-50 kDa). Da der Kontrollversuch ohne anti-BDNF-AK (rechte Seite), in welchem nur gegen Maus-IgGs gerichtete Sekundärantikörper eingesetzt wurden, ergab, dass von diesen Antikörpern auf Höhe von 40-50 kDa auch die leichten Ketten der Maus-IgGs nach *CCI* verstärkt detektiert werden, konnte dieses Signal nicht für die Auswertung verwendet werden. In diese Auswertung wurden nur die Signale für matures BDNF (15 kDa) einbezogen. Abkürzungen: ip = ipsilateral; con = contralateral; kDa = Kilodalton; AK = Antikörper; IgG = Immunglobulin G.

6.2 Auswirkungen der CCI auf Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

Um Effekte einer LET- oder FINA-Behandlung auf die Veränderung der Expression der Neurotrophine BDNF und NT-3 und ihrer Rezeptoren nach CCI feststellen zu können, wurde in einem ersten Schritt analysiert, bei welchen Neurotrophinen und Rezeptoren durch CCI eine Expressionsänderung hervorgerufen wird. Zu diesem Zweck wurde für jedes Tier die Expression im Cortex-Gewebe der experimentell behandelten Seite (ipsilateral) mit der Expression auf der nicht behandelten Seite (contralateral), die hier als Referenz diente, verglichen (ipsi vs. contra, Fragestellung 1; Abb. 6.2.1). In *Sham*-behandelten Tieren (nicht-schraffierte Balken) sollte in diesem Vergleich kein Unterschied zu bemerken sein, was sich auch bestätigte, da bei den *Sham*-behandelten Tieren auf der ipsilateralen Seite keine merklichen Expressionsänderungen festzustellen waren und das Verhältnis „ipsi vs. contra“ somit niemals signifikant von 100% abwich. Dieser Befund bestätigt die Verwendbarkeit des *Sham*-Eingriffes als experimentelle Kontrolle.

Im Gegensatz zu den *Sham*-behandelten war in den CCI-behandelten Mäusen (schraffierte Balken) die Expression der Neurotrophine und Rezeptoren ipsilateral häufig verändert. Signifikante Unterschiede zu den *Sham*-behandelten Tieren fanden sich bei der Expression von NT-3 (ipsilateral reduziert, Abb. 6.2.1 B) und bei den Rezeptoren p75^{NTR} (ipsilateral erhöht, Abb. 6.2.1 C), TrkB und TrkC (jeweils ipsilateral reduziert, Abb. 6.2.1 E und F). Auch bei BDNF zeichnete sich eine Tendenz zur ipsilateralen Erhöhung nach CCI ab, der jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte ($p=0.08$ bei der Gesamtkohorte, Abb. 6.2.1 A). Selbst die TrkA-Expression schien durch CCI ipsilateral etwas erhöht zu sein (Abb. 6.2.1 D). Hier wurde jedoch eine hohe Variabilität der Ergebnisse beobachtet, sodass eine genaue Aussage hierzu nicht möglich ist.

Interessanterweise scheinen diese Veränderungen je nach Geschlecht unterschiedlich aufzutreten. So war in dieser Untersuchung nach Aufspaltung der Gesamtkohorte (schwarze Balken) in die Geschlechter nach CCI eine Reduktion der NT-3, TrkB- und TrkC-Expression nur noch bei den Männchen zu sehen (blaue Balken), während eine Erhöhung der p75^{NTR}-Expression nur bei den Weibchen (rosa Balken) signifikant ausgeprägt war. Dies könnte auf bereits ohne LET- bzw. FINA-Einwirkung vorliegende hormonelle Unterschiede hinweisen.

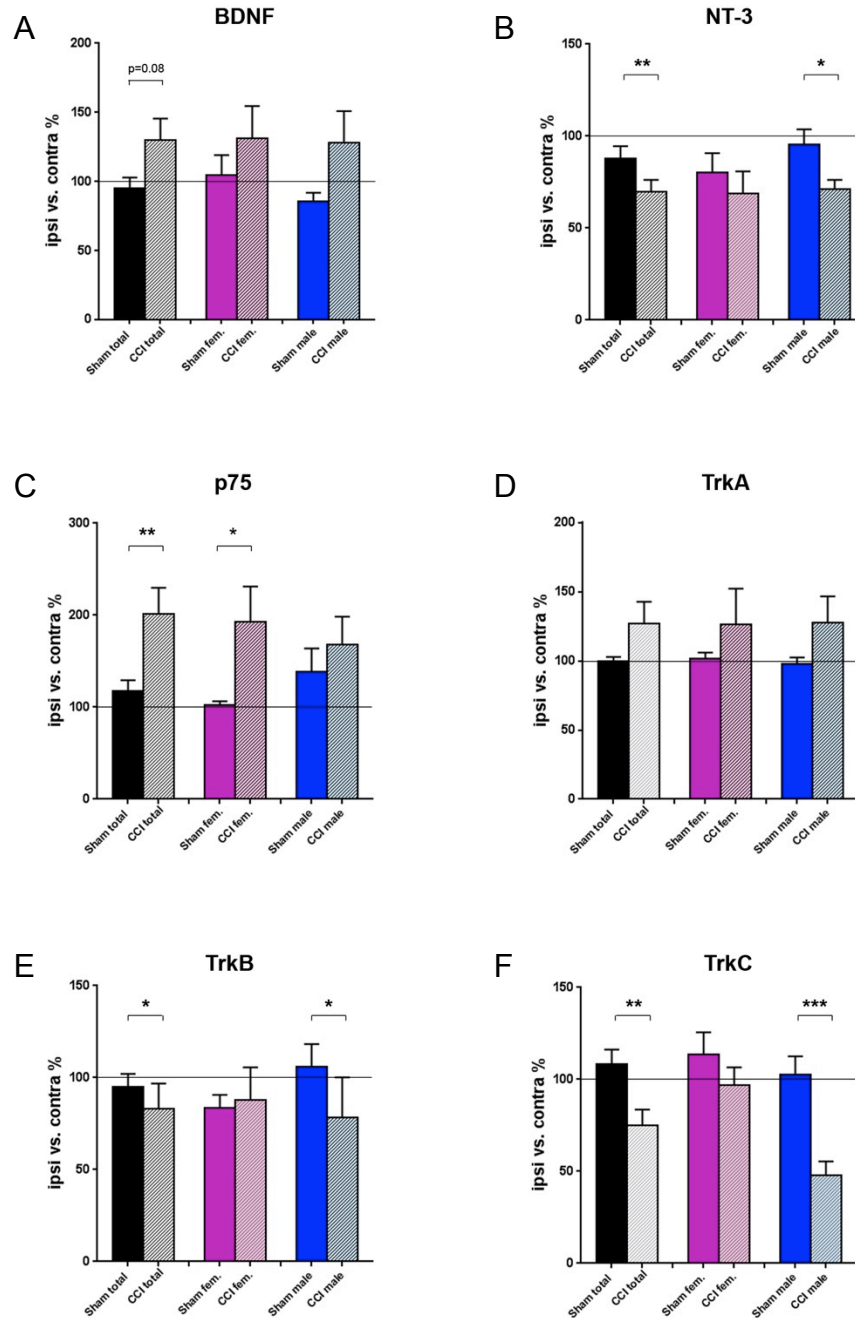


Abb. 6.2.1: Graphische Darstellung der Expression von BDNF, NT-3, p75^{NTR} und TrkA-C im CCI-geschädigten ipsilateralen relativ zum ungeschädigten contralateralen Cortexgewebe („ipsi vs. contra“). In schwarz: alle (*total*) untersuchten Tiere (Gesamtkohorte: n=20, pro Gruppe), in rosa: nur die weiblichen (*female*) Tiere (n=10), blau: nur die männlichen (*male*) Tiere (n=10). Nicht schraffierte Balken repräsentieren die Sham-behandelten Tiere, die schraffierten Balken repräsentieren die CCI-behandelten Tiere. Die statistische Auswertung: *Student's t-test* (bei Normalverteilung) oder *Mann-Whitney-U-Test* (bei nicht normal verteilten Werten). Abweichungen vom 100%-Wert wurden mit Hilfe des *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests* überprüft.

6.3 Auswirkungen einer LET- bzw. FINA-Gabe auf die CCI-induzierten Expressionsänderungen der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

Nachdem durch den „ipsi vs. contra“-Vergleich festgestellt worden war, welche Expressionswerte einer Veränderung nach CCI unterliegen, wurde in einem zweiten Analyseschritt überprüft, welche Auswirkungen eine perioperative Gabe von Letrozol oder Finasterid auf diese Expressionsänderungen hat. Dazu wurden für jedes Gel die Werte der CCI-behandelten Tiere relativ zu den Werten der korrespondierenden Sham-behandelten Tiere gesetzt (CCI vs. Sham, Fragestellung 2) und die Resultate von VEH- (nicht schraffierte Balken), LET- (schraffierte Balken) und FINA-behandelten (gepunktete Balken) Tieren miteinander verglichen (Abb. 6.3.1 und 6.3.2).

Es stellte sich heraus, dass sowohl die LET- als auch die FINA-Behandlung keinen merklichen Einfluss auf die CCI-induzierten Veränderungen bei BDNF und NT-3 hatte. Die „CCI vs. Sham“-Werte unterschieden sich hier nicht signifikant von den Werten bei VEH-behandelten Tieren (Abb. 6.3.1 A-F). Dagegen zeigte sich nach FINA-Behandlung bei TrkA ein signifikanter Unterschied zu VEH-behandelten Tieren in der Gesamtkohorte (Abb. 6.3.2 A) und bei den männlichen Tieren (Abb. 6.3.2 C), sowie ein Trend bei den weiblichen Tieren (Abb. 6.3.2 B). Interessanterweise schien dieser Unterschied in der Tendenz sowohl ipsi- als auch contralateral ausgeprägt zu sein, was möglicherweise auf einen generellen Einfluss von FINA auf die TrkA-Expression hindeutet (siehe dazu Abschnitt 6.4). Im Gegensatz dazu wurde die TrkB-Expression durch Letrozol, aber nicht durch Finasterid, signifikant beeinflusst (Abb. 6.3.2 D). Auch hier war der Effekt in der Tendenz sowohl auf der ipsi- wie auf der contralateralen Seite zu beobachten. Auch auf die TrkC- (Abb. 6.3.2 G-I) und die p75^{NTR}-Expression (Abb. 6.3.1 G-I) schienen die Inhibitoren Einfluss zu nehmen. Jedoch erreichten eventuelle, durch LET- bzw. FINA-induzierte Veränderungen dieser Expressionen an keiner Stelle Signifikanzniveau (relativ zu VEH).

Eine geschlechtsspezifische Analyse der Daten nach Aufteilung der Gesamtkohorte (graue/weiße Balken) in weibliche (rot/rosa) und männliche Tieren (blau/hellblau) erbrachte keine eindeutigen Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Wirkung der Inhibitoren. Jedoch scheinen bei der TrkA-Expression die männlichen Tiere (Abb. 6.3.2 C) etwas stärker zu reagieren als die weiblichen. Insgesamt gingen zuvor in der Gesamtkohorte festgestellte Signifikanzen bei der getrennt geschlechtlichen Analyse meist verloren (z. B. bei TrkB), was vermutlich durch die wegen der reduzierten Einzeldaten (nur 10 Tiere pro Geschlecht) verringerte „statistische Power“ der Analyse zu erklären ist. Die

6. Ergebnisse

in der Gesamtkohorte beobachteten Veränderungen waren in der Tendenz jedoch in der Regel auch in den einzelnen Geschlechtern zu erkennen.

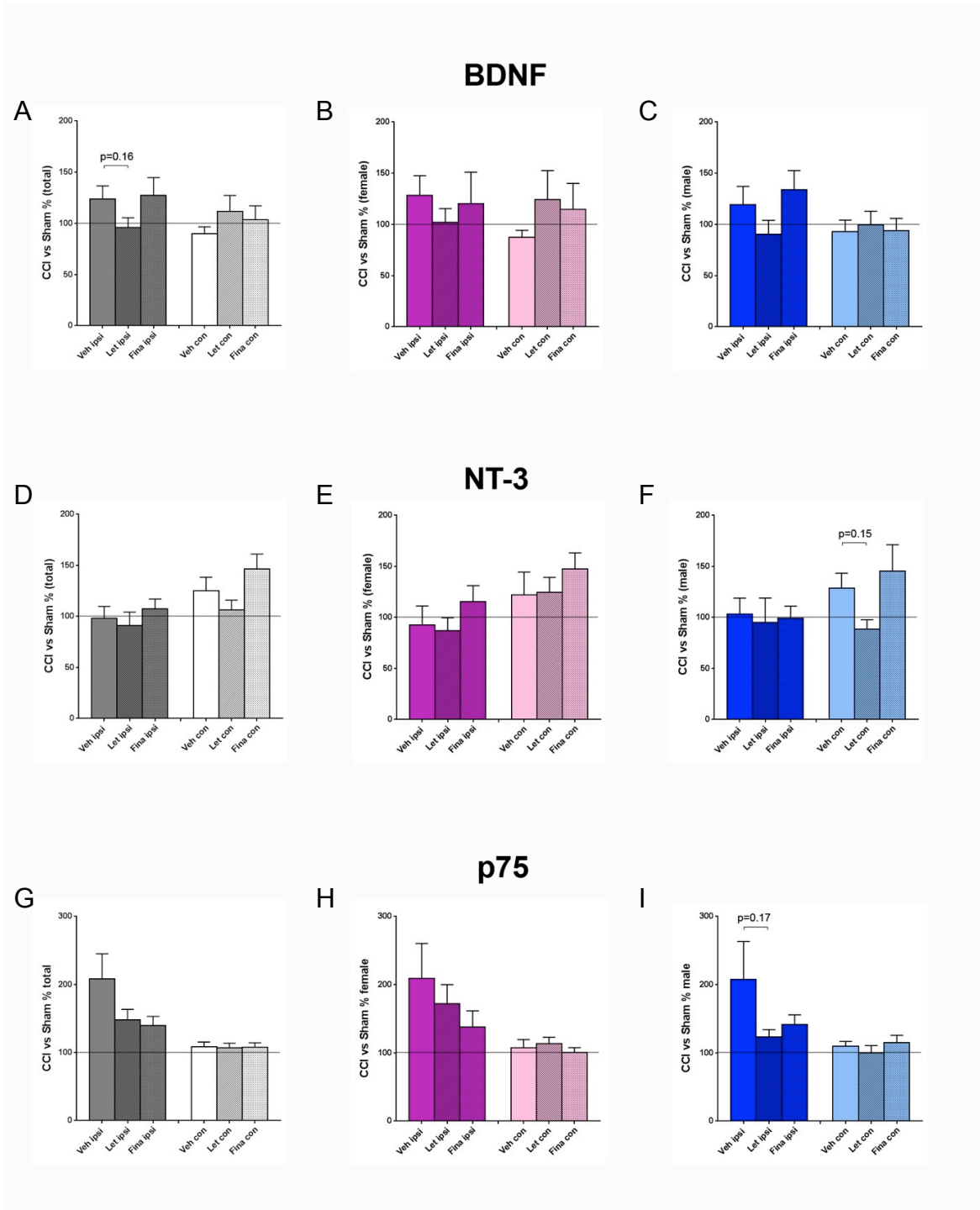


Abb. 6.3.1: Graphische Darstellung der BDNF-, NT-3- und p75^{NTR}-Expression nach „CCI vs. Sham“-Vergleich in Tieren, die perioperativ entweder Vehikel (Veh, unschraffiert), Letrozol (Let, schraffiert) oder Finasterid (Fina, gepunktet) injiziert bekommen haben: Gesamtkohorte (graue/weiße Balken, n=20 pro Gruppe), weibliche Mäuse (rote/rosa Balken, n=10), männliche Mäuse (dunkelblaue/hellblaue Balken, n=10). Die dunklen Balken illustrieren stets die Werte der ipsilateralen, die helleren Balken die der kontralateralen Seite. Die statistische Auswertung: erfolgte mit *One-Way-ANOVA* und anschließend *Sidak's Test* (C, F) oder dem *Kruskal-Wallis-Test* und anschließend *Dunn's Test* (A, B, D, E, G-I).

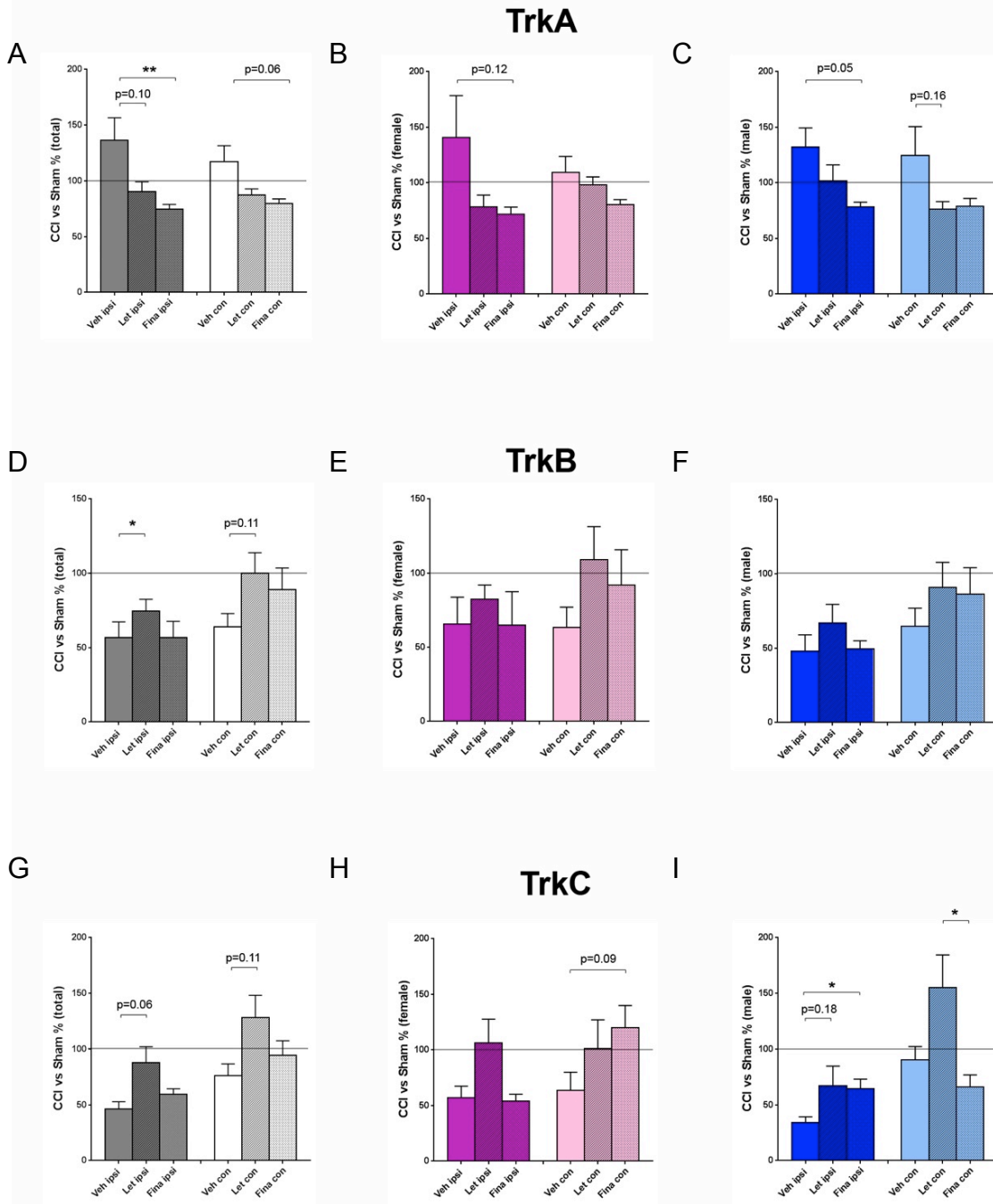


Abb. 6.3.2: Graphische Darstellung der TrkA-, TrkB- und TrkC-Expression nach „CCI vs. Sham“-Vergleich in Tieren, die perioperativ entweder Vehikel (Veh, unschraffiert), Letrozol (Let, schraffiert) oder Finasterid (Fina, gepunktet) injiziert bekommen haben: Gesamtkohorte (graue/weiße Balken, n=20 pro Gruppe), weibliche Mäuse (rote/rosa Balken, n=10), männliche Mäuse (dunkelblaue/hellblaue Balken, n=10). Die dunklen Balken illustrieren stets die Werte der ipsilateralen, die helleren Balken die der contralateralen Seite. Die statistische Auswertung: erfolgte mit *One-Way-ANOVA* und anschließendem *Sidak's Test* (C, F, G-I) oder dem *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunn's Test* (A, B, D, E).

6.4 Auswirkungen einer LET- bzw. FINA-Gabe auf die Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren in Sham-behandelten Tieren

Um die Auswirkungen von LET bzw. FINA auf die CCI-induzierten Expressionsänderungen der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren beurteilen zu können, muss jedoch berücksichtigt werden, dass bereits die Gabe der Inhibitoren alleine eine Veränderung der Expression bewirken kann. Um diesen Faktor zu berücksichtigen, wurden in einem dritten Analyseschritt nur die Expressionswerte von *Sham*-behandelten Tieren miteinander verglichen und es wurde dabei analysiert, ob eine LET- oder FINA-Gabe alleine (d. h. ohne CCI) im Vergleich zu VEH-behandelten Tieren (LET/FINA vs. VEH, Fragestellung 3) bereits zu einer Veränderung der Expression führt. Dies könnte beispielsweise den tendenziell ähnlichen Expressionsänderungen ipsilateral und contralateral nach LET oder FINA (siehe 7.3) zu Grunde liegen.

Derartige Effekte wurden sowohl für LET als auch FINA beobachtet. So scheint LET die NT-3-Expression in Männchen und Weibchen umgekehrt zu beeinflussen, was zu einem signifikanten Unterschied der Expression in den Geschlechtern nach LET-Gabe führte (Abb. 6.4.1 B). Außerdem reduzierte LET die TrkB-Expression spezifisch in den Männchen (Abb. 6.4.1 E). FINA hingegen erhöht die TrkA-Expression geschlechtsunspezifisch (Abb. 6.4.2 D).

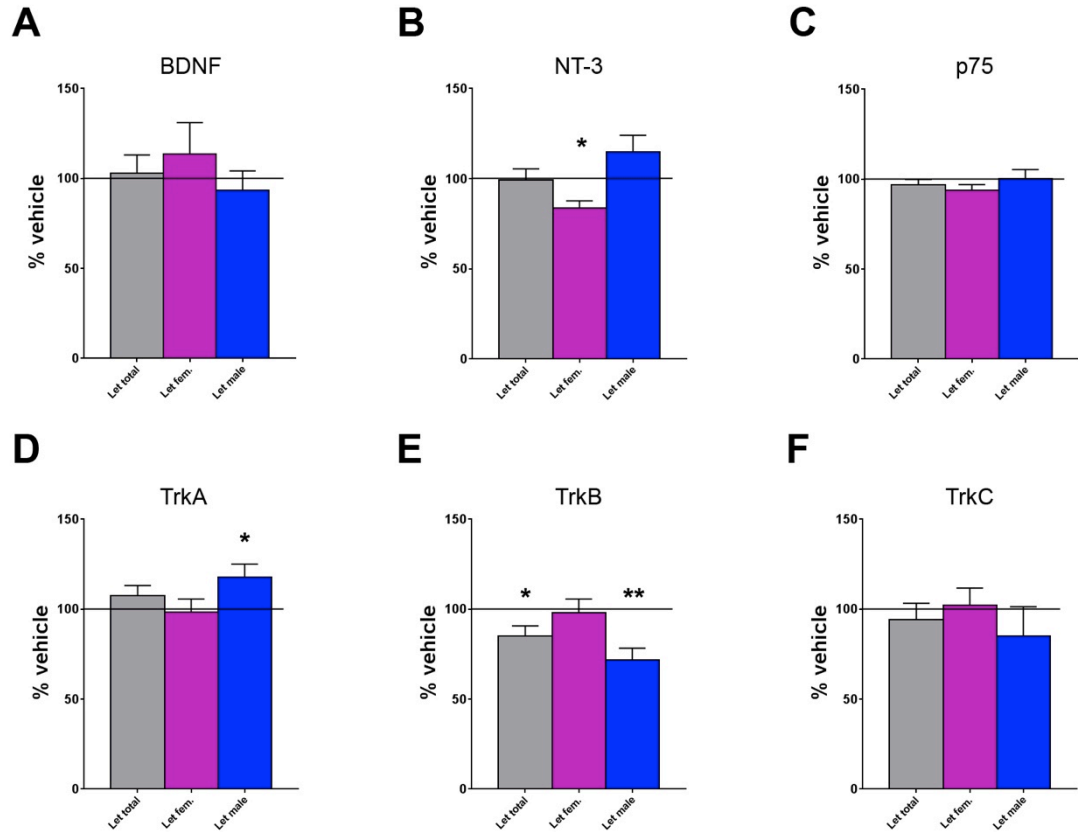


Abb. 6.4.1: Graphische Darstellung der Resultate des „Let vs. Veh“-Vergleiches (Fragestellung 3) in Sham-behandelten Tieren (ipsi- und contralaterale Werte wurden dabei zusammengefaßt; die Daten nach Vehikel-Injektion wurden als 100% gesetzt). Grau: Gesamtkohorte (n=12, pro Gruppe), rosa: nur die weiblichen Tiere (n=6), blau: nur die männlichen Tiere (n=6). Für die statistische Auswertung wurde der *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* (Abweichung von 100%) und für den Vergleich zweier Gruppen der *Mann-Whitney-U-Test* eingesetzt.

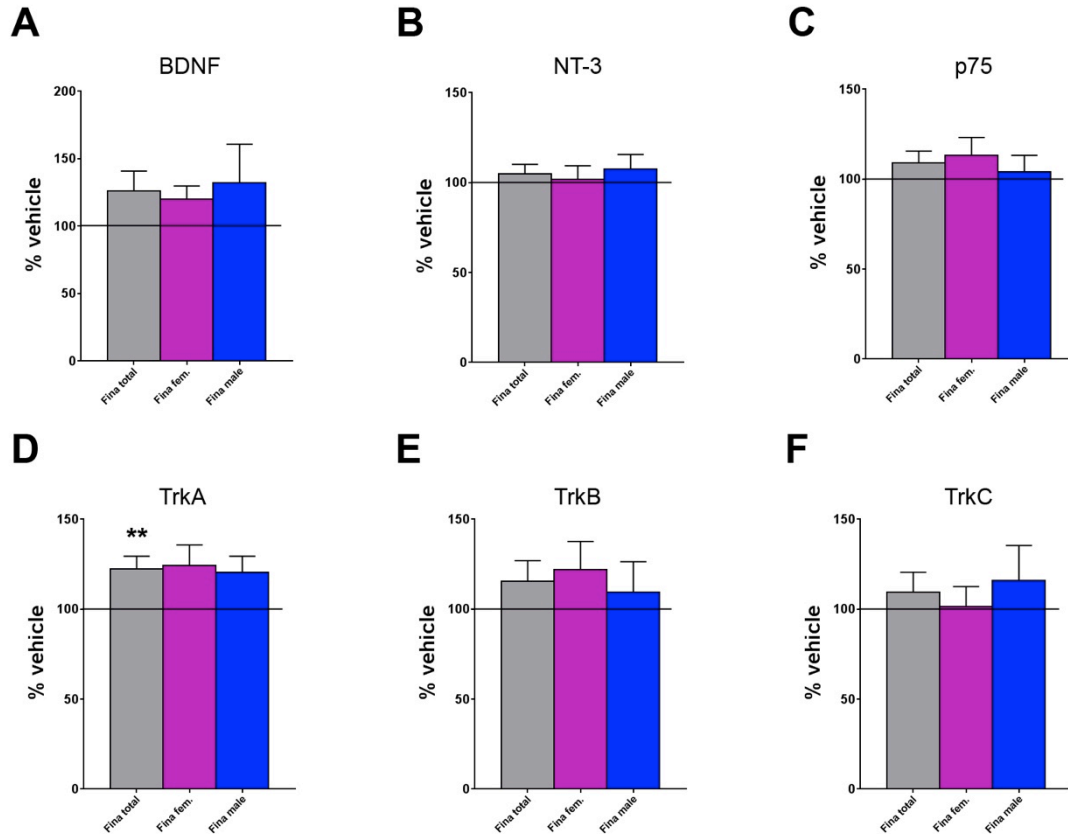


Abb. 6.4.2: Graphische Darstellung der Resultate des „Fina vs. Veh“-Vergleiches (Fragestellung 3) in *Sham*-behandelten Tieren (ipsi- und contralaterale Werte wurden dabei zusammengefaßt; die Daten nach Vehikel-Injektion wurden als 100% gesetzt). Grau: Gesamtkohorte (n=12, pro Gruppe), rosa: nur die weiblichen Tiere (n=6), blau: nur die männlichen Tiere (n=6). Für die statistische Auswertung wurde der *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* (Abweichung von 100%) und für den Vergleich zweier Gruppen der *Mann-Whitney-U-Test* eingesetzt.

7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, inwiefern die kortikale Neurotrophin- und Neurotrophin-Rezeptor-Expression nach einem experimentell induzierten Schädel-Hirn-Trauma durch Sexualhormone reguliert wird. Im Zentrum standen dabei folgende Fragestellungen:

- 1) Bewirkt das Schädeltrauma (CCI) in den Kontrolltieren eine Veränderung der NT- und/oder NTR-Expression?
- 2) Beeinflusst die perioperative Gabe von Letrozol bzw. Finasterid die CCI-induzierten Veränderungen der NT- und/oder NTR-Expression?
- 3) Verändern Letrozol bzw. Finasterid selbst (d. h. ohne CCI) bereits die Expression von NT- und/oder NTR?
- 4) Lassen sich in Hinblick auf in den Fragestellungen 1) - 3) beobachteten Veränderungen der NT- und/oder NTR-Expression Unterschiede zwischen den Geschlechtern feststellen?

Als wesentliche Ergebnisse können festgehalten werden:

Zu 1) CCI führte zu ipsilateralen Veränderungen der NT- und NTR-Expression: betroffen waren die Rezeptoren $p75^{\text{NTR}}$ (hoch reguliert), TrkB und TrkC (beide runter reguliert), sowie NT-3 (runter reguliert). Für BDNF deutete sich eine Hochregulation an, die jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte ($p=0.08$ in der Gesamtkohorte).

Zu 2) Perioperative Letrozolgabe schwächte die CCI-induzierte Reduktion der TrkB-Expression signifikant ab (und tendenziell auch die Reduktion der TrkC-Expression). Perioperative Finasteridgabe bewirkte eine signifikante Reduktion des CCI-induzierten TrkA-Anstiegs (diese ist in der Tendenz auch nach Letrozol zu sehen).

Zu 3) In *Sham*-behandelten Tieren führte Letrozolgabe bei den Männchen zu einer verminderten Expression von TrkB und einer erhöhten Expression von TrkA (relativ zu den VEH-behandelten Kontrollen). Bei den Weibchen war nach LET die NT-3-Expression signifikant reduziert. Finasteridgabe führte in *Sham*-Tieren zu einem geschlechtsunspezifischen Anstieg der TrkA-Expression.

Zu 4) Auffällig war, dass nach Aufteilung der Gesamtkohorte in weibliche und männliche Tiere einige CCI-induzierte Effekte nur bei den Männchen (Reduktion von NT-3, TrkB und TrkC), andere nur bei den Weibchen (Erhöhung von p75^{NTR}) nachweisbar waren (siehe Abb. 6.2.1). Dies könnte auf eine geschlechtsspezifische Regulation der NT- bzw. NTR-Expression nach CCI hinweisen. Perioperative LET- bzw. FINA-Gabe bewirkte jedoch bei Männchen und Weibchen jeweils ähnliche Effekte. Der abschwächende Finasterid-Effekt auf die TrkA-Expression nach CCI schien allerdings bei den Männchen etwas ausgeprägter zu sein (siehe Abb. 6.3.2). Bemerkenswert ist jedoch, dass bereits die *Sham*-Tiere geschlechtsspezifisch auf die Gabe von Letrozol reagieren. So scheint LET die Expression von TrkB in Männchen, jedoch nicht in Weibchen, zu beeinflussen, während die NT-3-Expression in Weibchen und Männchen durch LET gegenläufig beeinflusst wurde (siehe Abb. 6.4.1). Nach FINA-Gabe waren keine Geschlechtsunterschiede erkennbar (siehe Abb. 6.4.2)

Diese Resultate werden im Folgenden diskutiert.

7.1 Auswirkungen der CCI auf die Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

Es wird vermutet, dass Neurotrophine und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle bei einer *TBI* spielen (da Silva Meirelles et al., 2017; Sebastiani et al. 2015). Da sie auch durch Sexualhormone reguliert werden (Allen et al., 2015; Arevalo et al., 2015; Carbone und Handa, 2013; Chen et al. 2005; Harte-Hargrove et al., 2013; Solum und Handa, 2002), könnten Sexualhormone über den Umweg der Neurotrophinwirkung auf die Auswirkungen einer *TBI* Einfluss nehmen. Einige Befunde der vorliegenden Studie unterstützen diese Hypothese. So konnte durch Untersuchung der Fragestellung 1 bestätigt werden, dass die Expression von Neurotrophinen und Neurotrophinrezeptoren durch eine (hier durch CCI induzierte) traumatische Hirnverletzung im verletzten Gewebe verändert wird. Die dabei während der akuten Phase (d. h. 3 Tage nach Verletzung) beobachteten Veränderungen der TrkB- und TrkC-Expression (durch CCI reduziert), der p75^{NTR}-Expression (durch CCI erhöht), der NT-3-Expression (durch CCI reduziert), sowie tendenziell auch der BDNF-Expression (durch CCI erhöht) stehen grundsätzlich im Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Hicks et al., 1999; Oyesiku et al., 1999; Beattie et al., 2002; Dechant und Barde, 2002).

Interessant ist hierbei vor allem die aus diesen Veränderungen resultierende Verschiebung der Rezeptor-Expression zugunsten des p75^{NTR}. Denn es besteht die Hypothese, dass die Rezeptoren der Trk-Familie (TrkA-C) überwiegend neurotrophisch agieren (Huang und Reichardt, 2003; Nguyen et al., 2010), was bedeutet, dass sie auf morphologischer und biochemischer Ebene stimulierend wirken und somit für das Überleben der Nervenzelle mitverantwortlich sind. Die hier nachgewiesene Reduktion von TrkB und TrkC nach CCI spricht also dafür, dass weniger überlebenssichernde und fördernde Signalwege in der Nervenzelle aktiviert werden können. Im Gegensatz dazu wird der p75^{NTR} überwiegend als ein Apoptose fördernder Rezeptor angesehen, der bei Bindung eines Pro-Neurotrophins (pro-NGF, pro-BDNF) apoptotischen Zelltod initiiert (Beattie et al., 2002; Roux und Barker, 2002; Gentry et al., 2004; Underwood und Coulson, 2008). Unsere Befunde weisen somit auf eine Verschiebung der Balance zwischen trophischen und apoptotischen Signalen im verletzten Gewebe – zugunsten der Apoptose – nach CCI hin. Dies könnte in der akuten Phase des Traumas, in der die Verletzung frisch ist und verletztes Hirngewebe auf durch die geöffnete Blut-Hirn-Schranke eindringende und die Schädigung evt. noch vergrößernde Immunzellen (z. B. Makrophagen) attraktiv wirkt (Thelin et al., 2017), eine sinnvolle Strategie sein, um den apoptotischen Abbau der geschädigten Zellen zu beschleunigen. Umgekehrt bedeutet das Absterben von Neuronen jedoch auch deren dauerhaftes Verschwinden, da Neurone nicht mehr regeneriert werden (Ludwig et al., 2018). Die Anregung des Apoptose-Signalwegs hat somit sowohl positive als auch negative Seiten.

Interessanterweise war in männlichen Mäusen, in denen die Gewebeschädigung nach CCI in der Regel massiver ist (Villapol et al., 2017; Götz et al., 2019), auch die Reduktion der TrkB- und TrkC-Rezeptoren nach CCI stärker ausgeprägt als in den Weibchen, was eventuell auf eine erhöhte Apoptosetätigkeit in den Männchen hinweisen könnte.

7.2 Einflüsse von LET und FINA auf die Expression der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

Östrogene und Androgene werden in der Körperperipherie, aber auch im zentralen Nervensystem gebildet (Naftolin et al., 1975; Roselli et al., 1985; Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009; Castelli et al., 2013; Hojo und Kawato, 2018). Einflüsse auf CCI-induzierte Pathomechanismen können somit sowohl von peripher als auch von zentral gebildeten Hormonen ausgehen. Dazu kommt, dass beispielsweise die Synthese von E2 in Gliazellen nach einer neuronalen Verletzung stark

ansteigt (Arevalo et al., 2015). Untersuchungen auf Einflüsse der Sexualhormone auf den Verlauf der Verletzung müssen somit Substanzen verwenden, die Blut-Hirn-Schrankengängig sind, damit auch die im ZNS gebildeten Hormone reguliert werden. Dies ist für die hier verwendeten Inhibitoren Letrozol und Finasterid der Fall (Dave et al., 2013).

Letrozol, als Aromataseinhibitor, verhindert die Umwandlung von Testosteron in 17β -Estradiol (E2) (Yapura et al., 2017). Dies führte zu einer erhöhten Expression (relativ zu VEH-behandelten Tieren) von TrkB und (tendenziell) TrkC nach CCI. Letrozol scheint also die durch CCI induzierte Reduktion der Expression von TrkB und TrkC abzuschwächen. Dadurch würde, folgt man der oben zitierten Hypothese, das Gleichgewicht wieder zugunsten der neurotrophen Seite verschoben werden. Jedoch war in einer Begleitstudie kein Effekt einer Letrozolbehandlung auf das Ausmaß der CCI-induzierten Läsionen zu erkennen – weder bei Männchen noch bei Weibchen (Gölz et al., 2019). Es ist jedoch denkbar, dass der hier gewählte Untersuchungszeitraum (3 Tage nach CCI) nicht ausreicht, um solche Effekte zu detektieren.

Auch nach Finasterid-Gabe waren vereinzelt statistisch signifikante Effekte auf die NT- und NTR-Expression nach CCI nachzuweisen. Finasterid, als 5α -Reduktaseinhibitor, verhindert die Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) (Aktories et al., 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine FINA-Behandlung in Kombination mit einem CCI die Expression von TrkA senkt, wodurch nach der oben ausgeführten Denkweise der neurotrophe Effekt eher wieder reduziert würde. Tatsächlich wird NGF, dem vorrangigen Agonisten des TrkA-Rezeptors, eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben (Kromer, 1987), was auch bereits in klinischen Studien Unterstützung findet. So wurde festgestellt, dass Kinder nach einer TBI eine bessere Prognose haben, wenn in ihrem Liquor die Konzentration von NGF erhöht ist (Chiaretti et al., 2008, 2009). Die Auswirkungen von LET- oder FINA auf NGF konnten in der vorliegenden Arbeit allerdings mangels eines geeigneten Antikörpers nicht bestimmt werden. Jedoch wurde in der oben erwähnten Begleitstudie (Gölz et al., 2019) die NGF mRNA-Expression untersucht und dabei gefunden, dass diese spezifisch in männlichen Mäusen nach CCI erhöht ist und diese Erhöhung durch Finasterid-Gabe reduziert wird – analog zu unseren Befunden bei den TrkA-Rezeptoren. Folgt man dem Konzept einer neuroprotektiven Wirkung von NGF/TrkA, müsste die Wirkung von Finasterid somit tatsächlich negativ beurteilt werden. Allerdings waren auch nach FINA-Gabe keine Unterschiede in der Läsionsgröße nachweisbar (Gölz et al., 2019).

Die Interpretation der Finasterid-Daten wird jedoch dadurch erschwert, dass die 5 α -Reduktase nicht nur Testosteron in DHT umwandelt, sondern auch Deoxykortikosteron zu Dehydrodeoxykortikosteron (DHDOC) und Progesteron zu Dehydroprogesteron (DHP) (Finn et al., 2006). Insbesondere Progesteron werden zahlreiche neuroprotektive Wirkungen zugeschrieben (Sayeed und Stein, 2009; Baudry und Aguirre, 2013; Theis und Theiss, 2015), so dass das Endresultat einer FINA-Gabe nicht auf die Reduktion einer DHT-Verfügbarkeit reduziert werden kann. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass das nach 5 α -Reduktase-Inhibition sich anreichernde Testosteron ein Vorläufer der E2 Synthese ist und FINA demnach den Testosteronmetabolismus in Richtung einer vermehrten E2-Synthese verschieben kann, welche dann wiederum neuroprotektives Potenzial aufweisen würde (Arevalo et al., 2015) – ein Argument, das jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen auch für die Aromatase-Hemmung durch Letrozol gilt (Anreicherung von Testosteron; dadurch verstärkte DHT-Bildung).

Zu beachten ist weiterhin, dass FINA-Gabe in *Sham*-Tieren (d. h. ohne CCI) zu einem Anstieg der TrkA-Expression führt. Dies könnte bedeuten, dass die mit FINA vorbehandelten Tiere bereits eine so hohe Expression von TrkA aufwiesen, dass die CCI keine weitere Steigerung hervorbrachte. In diesem Fall wäre die nach CCI beobachtete Reduktion der TrkA-Expression nach FINA-Gabe anders zu interpretieren, nämlich nur als relative Abnahme des Verhältnisses „CCI vs. *Sham*“ im Vergleich zu VEH-behandelten Tiere, aber nicht als generelle Reduktion der TrkA-Expression nach CCI. Diese Interpretationsproblematik lässt sich mit der hier gewählten methodischen Vorgehensweise nicht auflösen. Ähnliche Phänomene müssen evt. auch bei der Interpretation der TrkB-Expressionsdaten nach Letrozolgabe berücksichtigt werden, da Letrozol ohne CCI zu einer Reduktion der TrkB-Expression führte (allerdings nur bei männlichen Mäusen).

7.3 Gibt es Geschlechtsunterschiede in der Reaktion auf CCI?

Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der Studie war die Frage, ob männliche und weibliche Tiere auf die Behandlungen unterschiedlich reagieren. Denn Ausgangspunkt und Stimulus für die Studie war die klinische Beobachtung, dass Frauen im Vergleich zu Männern nach einer TBI eine bessere Prognose haben. Sollten dabei Neurotrophine oder ihre Rezeptoren eine Rolle spielen, wäre dies im CCI-Modell eventuell nachweisbar. Tatsächlich wurden Unterschiede zwischen den Geschlechtern im „ipsi vs. contra“-

Vergleich nach CCI beobachtet. So war bei den Männchen, jedoch nicht bei den Weibchen, die Expression von NT-3 und der Rezeptoren TrkB und TrkC auf der geschädigten, ipsilateralen Seite deutlich herunter reguliert. Umgekehrt war nur bei den Weibchen die Expression des p75^{NTR} nach CCI ipsilateral hochreguliert. Dies könnte auf eine geschlechtsspezifische Regulation hinweisen, die möglicherweise über Sexualhormone vermittelt wird. Unterstützung findet diese These durch weitere Befunde der Begleitstudie (Gölz et al., 2019) in der beispielsweise gezeigt wurde, dass nach CCI in weiblichen (aber nicht in männlichen) Mäusen die Expression des Östrogenrezeptors ER α angeregt wird, während in männlichen (aber nicht in weiblichen) die Expression des Androgenrezeptors (AR) reduziert wird. In beiden Geschlechtern resultiert daraus ein Übergewicht der als neuroprotektiv eingeschätzten Östrogenrezeptoren, jedoch wird dieses Ergebnis über unterschiedliche Mechanismen erreicht. Geschlechtsspezifische Vorgänge nach CCI könnten somit auch eine unterschiedliche Regulation der NT- oder NTR-Expression hervorrufen. Es bleibt jedoch noch zu klären, ob und wie diese Mechanismen zur Ausprägung einer geschlechtsspezifischen Pathologie, wie beispielsweise der wiederholt beobachteten vergrößerten Läsion nach CCI in männlichen Mäusen (Villapol et al., 2017; Gölz et al., 2019), beitragen können.

7.4 Gibt es Geschlechtsunterschiede in der Reaktion auf LET und FINA?

Zweck der Verwendung der Inhibitoren Letrozol und Finasterid war die Hemmung der Synthese von E2 bzw. DHT, die in der Peripherie, aber auch im weiblichen und im männlichen Gehirn *de novo* gebildet werden, da beide Geschlechter die für die Synthese zuständigen Enzyme Aromatase (E2 aus Testosteron) und 5 α -Reduktase (DHT aus Testosteron) neuronal exprimieren (Naftolin et al., 1975; Roselli et al., 1985; Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009; Castelli et al., 2013; Bender et al., 2017; Hojo und Kawato, 2018). Trotz der gleichartigen Ausstattung der Geschlechter mit beiden Enzymen deutet sich in der Literatur jedoch an, dass E2 das vorherrschende Sexualhormon im weiblichen Gehirn ist (Bender et al., 2017; Tabatadze et al., 2015; Vierk et al., 2012), während DHT vermutlich einige seiner Funktionen im männlichen Gehirn übernimmt (Hajszan et al., 2008). In diesem Fall sollte die Hemmung der Enzyme in männlichen und weiblichen Versuchstieren unterschiedliche Reaktionen hervorrufen. Darauf erbrachte die vorliegende Studie vereinzelt Hinweise. So stellte sich in Sham-behandelten Tieren heraus, dass eine Letrozolgabe die TrkB-Expression zwar in männlichen Tieren beeinflusst, nicht jedoch in weiblichen. Außerdem war die Expression

von NT-3 nach Letrozolgabe in weiblichen und männlichen Mäusen signifikant unterschiedlich und schien durch Letrozol gegenläufig reguliert worden zu sein. Als Erklärung wäre denkbar, dass die Expression dieser Faktoren in unterschiedlichem Maße über Sexualhormone reguliert wird und die Reduktion der E2-Level (oder die damit verbundene Erhöhung von Testosteron und DHT-Leveln; Harden und MacLusky, 2005; Simpson et al., 2005) diese Expression geschlechtsspezifisch beeinflusst. Zusätzliche Experimente wären nötig, um diese Möglichkeit näher zu untersuchen. Durch Einsatz der oben genannten Inhibitoren, sowie spezifischer Sexualhormonrezeptoragonisten bzw. – antagonisten in geeigneten *in vitro*-Systemen (z. B. organotypischen Gewebekulturen) könnte diese Frage jedoch wissenschaftlich untersucht und evtl. aufgeklärt werden.

7.5 Methodische Aspekte

Die hier eingesetzte Methode der Western Blot-Analyse ist stark abhängig von der Verfügbarkeit guter Antikörper. Dies schränkte die Analyse an verschiedenen Stellen merklich ein. So wurden verschiedene Antikörper für den Nachweis von NGF getestet, von denen jedoch keiner verwendbar war. Ebenso stellte sich im Verlauf der Studie heraus, dass der verwendete monoklonale Antikörper für den BDNF-Nachweis für eine CCI-Studie nur eingeschränkt geeignet ist, weil die Nachweismethode mit den über die Verletzung ins Gewebe eingedrungenen Maus-Antikörpern interagiert und somit eine Analyse von pro-BDNF nicht möglich war (siehe Abb. 6.1.2). Gerade der Nachweis von pro-BDNF wäre aber von großem Interesse gewesen, weil der p75^{NTR} bevorzugt die pro-Formen der Neurotrophine bindet und darüber seine Apoptose-fördernde Wirkung ausübt (Chao und Bothwell, 2002; Ibáñez, 2002; Lu et al., 2005; Yano et al., 2009).

Eine weitere Einschränkung der Studie kommt durch die Anzahl der verwendeten Tiere zu Stande (n=20 in der Gesamtkohorte; n=10 in den nach Geschlechtern getrennten Analysen). So wurde in den Analysen zwar häufig eine Tendenz zu einer Veränderung ($p < 0.20$) relativ zu den Kontrollen fest gestellt. Signifikant unterschiedliche Werte waren jedoch meist nicht zu detektieren. Es ist daher zu vermuten, dass mancher Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen mangels ausreichender „statistischer Power“ der eingesetzten Tierzahlen nicht statistisch gesichert wurde und die Studie die tatsächlichen Differenzen unterschätzt. Umgekehrt lässt die Varianzbreite der Western Blot-Methode auch die Möglichkeit offen, dass Tendenzen fehl interpretiert werden. Um die Varianzbreite weitestmöglich einzuschränken, wurden für die Auswertung stets nur

Expressionsbanden nach vorgegebenem Schema verglichen, die im selben Gel liefen (siehe 5.4.6 und Abb. 6.1.1). Dennoch sollten die hier vorgestellten Ergebnisse unter Berücksichtigung der genannten Einschränkungen vorrangig als Hinweise auf mögliche Vorgänge nach *CCI*, angesehen, deren weitere Überprüfung durch alternative Methoden wünschenswert wäre.

7.6 Klinische Relevanz der Befunde

Schädel-Hirn-Traumen sind ein nicht zu unterschätzendes gesellschaftliches Gesundheitsproblem. In der Bundesrepublik Deutschland wird jährlich mit über 260.000 Schädel-Hirn-Verletzten aller Schweregrade gerechnet. Zudem zählt das Schädel-Hirn-Trauma als häufigste Todesursache der 45-jährigen (Rickels, 2014). Trotz vieler Ansätze gibt es bislang noch keine Therapie, die diese Situation verlässlich verbessert (Day et al., 2013). Sexualhormone rücken in der Bekämpfung der Spätfolgen nach einem *TBI* vermehrt in den Fokus. Dabei ist insbesondere das 17β -Estradiol zu nennen, das in Wirbeltieren häufigste und potenteste Östrogen (Arevalo et al., 2015). Ein Nachweis, dass neurotrophe Aspekte durch E2 gefördert werden und dies die Prognose nach *TBI* begünstigt, wäre ein Schritt in Richtung gezielter *TBI*-Therapie. Der Befund, dass pubertierende Mädchen mit vermehrter endogener Hormonproduktion im Vergleich zu präpubertierenden Mädchen eine reduzierte Mortalität bei moderater bis schwerer *TBI* aufweisen (Ley et al., 2013), ist in diesem Kontext ermutigend. Analoges gilt für DHT, dessen Wirkung im Rahmen einer *TBI* zu verstehen, sicher von Wert wäre. Die vorliegende Untersuchung stellt somit einen wissenschaftlicher Ansatz dar, um die Bedeutung der Sexualhormone für die Entwicklung der Schäden nach einer *TBI* im Tiermodell nachzuvollziehen und zu verstehen. Ihre Aussagekraft ist auf Grund der gewählten kurzen, auf die Akutphase (3 Tage nach *CCI*) beschränkten Anwendungsdauer der Inhibitoren, sowie der – wie oben ausgeführt – begrenzten Tierzahlen beschränkt. Auf Grund der vorgeführten Befunde, die durch in der Begleitstudie (Gölz et al., 2019) erhobene Wirkungen von LET und FINA auf die Pathomechanismen einer *TBI* ergänzt werden, wäre eine Durchführung des Ansatzes (oder eines ähnlichen) über einen längeren Zeitraum zur Klärung der Frage, welche Langzeitwirkung die Modulation der Sexualhormone nach sich zieht, jedoch als sinnvolle Fortsetzung denkbar.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die kortikale Neurotrophin (NT)- und Neurotrophin-Rezeptor (NTR)- Expression nach einem experimentell induzierten Schädel-Hirn-Trauma (*traumatic brain injury, TBI*) durch Sexualhormone reguliert wird. Die Studie prüfte dabei die Hypothese, ob geschlechtsspezifisch unterschiedliche Einflüsse der Sexualhormone auf die Expression von Neurotrophen zu den beobachteten Geschlechtsunterschieden in der Prognose nach Schädel-Hirn-Traumen beitragen könnten. Zur Durchführung der Studie wurden weibliche und männliche C57Bl/6N Mäuse einem kontrollierten kortikalen Schlag (*controlled cortical impact, CCI*) ausgesetzt und beginnend 3 Tage präoperativ bis 2 Tage postoperativ täglich mit einem Inhibitor, entweder der 17 β -Estradiol (E2)- Synthese (Letrozol, LET) oder der Dihydrotestosteron (DHT)- Synthese (Finasterid, FINA), oder zur Kontrolle nur mit dem Lösungsmittel, behandelt.

Es konnte mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden, dass die NT- und NTR- Expression im kortikalen Gewebe während der akuten Phase (d. h. 3 Tage nach der *TBI*) im Vergleich zu dem Kontrollgewebe verändert ist und dass die Inhibitoren auf die *TBI*- induzierten Veränderungen spezifisch Einfluss nehmen. So zeigte sich nach LET eine Erhöhung der TrkB- (und tendenziell TrkC-) Expression, was eine Verstärkung der neurotrophen Effekte der NTR bedeuten könnte. FINA hingegen scheint durch eine Erniedrigung der Expression von TrkA die neurotrophe Wirkung eher zu reduzieren. Darüber hinaus erbrachte die Studie Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Regulation der NT- und NTR Expression durch Sexualhormone, auch unabhängig von einer *TBI*. Da die Sexualhormone E2 und DHT in weiblichen und männlichen Gehirnen in unterschiedlichem Ausmaß aktiv sind, könnte dies zu einer geschlechtsspezifischen Beeinflussung der Neurotrophin-Wirkungen nach *TBI* führen und somit zur Ausprägung einer geschlechtsspezifischen Pathologie. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können somit als Anregung zu einer vertiefenden Untersuchung der Rolle der Sexualhormone bei traumatischen Hirnverletzungen dienen (siehe dazu auch: Götz et al., 2019).

8.1 Summary

The objective of the present study was to examine whether the cortical neurotrophin (NT) and neurotrophin receptor (NTR) expression after an experimentally induced traumatic brain injury (TBI) is regulated by sex hormones. The study investigated the hypothesis that gender-specific influences of sex hormones on the expression of neurotrophins may contribute to the observed gender differences in the prognosis after craniocerebral trauma. To conduct the study, female and male C57Bl/6N mice were exposed to a controlled cortical impact (CCI) and injected with an inhibitor of either 17 β -estradiol (E2) synthesis (letrozole, LET) or dihydrotestosterone (DHT) synthesis (finasteride, FINA), or with the solvent only, starting 3 days preoperatively to 2 days postoperatively daily.

Western blot analysis showed that NT and NTR expression in cortical tissue is altered during the acute phase (i.e. 3 days after TBI) compared to control tissue and that inhibitors specifically influence TBI-induced changes. Thus, LET showed an increase in TrkB (and tends to TrkC) expression, which could mean an increase in the neurotrophic effects of NTR. FINA, on the other hand, seems to reduce the neurotrophic effect by lowering the expression of TrkA. In addition, the study provided evidence of gender-specific regulation of NT and NTR expression by sex hormones, also independent of TBI. Since the sex hormones E2 and DHT are active to different degrees in female and male brains, this could lead to a gender-specific influence on the neurotrophin effects after TBI and thus to the development of a gender-specific pathology. The results of the present study can thus serve as a stimulus for an in-depth investigation of the role of sex hormones in traumatic brain injuries (see also: Gölz et al., 2019).

9. Literaturverzeichnis

- Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11., überarbeitete Auflage 2013, *Elsevier GmbH München, Urban Fischer Verlag*, S. 684, Abschnitt 29.12.2, S.668.
- Allen KM, Purves-Tyson TD, Fung SJ, Shannon Weickert C (2015) The effect of adolescent testosterone on hippocampal BDNF and TrkB mRNA expression: relationship with cell proliferation. *BMC Neurosci*, **16**: 4.
- Almey A, Milner TA, Brake WG (2015) Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Horm Behav*. **74**: 125-138.
- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW (1991) Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* **354**: 159-161.
- Andersson S, Russell DW (1990) Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3640–3644.
- Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2015) The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci* **16**: 17-29.
- Arnold S, Beyer C (2009) Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target. *J Neurochem* **110**: 1-11.
- Balthazart J, Foidart A, Surlemont C, Harada N (1991) Distribution of aromatase-immunoreactive cells in the mouse forebrain. *Cell Tissue Res*. **263**(1): 71-79.
- Bao YJ, Li LZ, Li XG, Wang YJ (2011) 17 β -estradiol differentially protects cortical pericontusional zone from programmed cell death after traumatic cerebral contusion at distinct stages via non-genomic and genomic pathways. *Mol Cell Neurosci* **48**: 185-194.
- Baudry M, Bi X, Aguirre C (2013) Progesterone-estrogen interaction in synaptic plasticity and neuroprotection. *Neuroscience* **239**: 280-294.
- Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO (2002) ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*. **36**(3): 375-86.
- Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC (2002) Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res*. **137**: 37-47.
- Bender RA, Zhou L, Vierk R, Brandt N, Keller A, Gee CE, Schäfer MKE, Rune GM (2017) Sex-dependent regulation of aromatase-mediated synaptic plasticity in the basolateral amygdala. *J Neurosci* **37**: 1532-1545.
- Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski JS, Paysen D, König A, Rune GM (2010) Roles of 17 β -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex* **20**(12): 2985-2995.
- Berry C, Ley EJ, Tillou A, Cryer G, Margulies DR, Salim A (2009) The effect of gender on patients with moderate to severe head injuries. *J Trauma* **67**: 950-953.
- Bimonte-Nelson HA, Nelson ME, Granholm AC (2004) Progesterone counteracts estrogen-induced increases in neurotrophins in the aged female rat brain. *Neuroreport* **15**: 2569-2573.
- Bothwell M (1991) Keeping track of neurotrophin receptors. *Cell* **65**: 915-918.

- Bothwell M (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* **18**: 223-253.
- Bramlett HM, Dietrich WD (2001) Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *J Neurotrauma* **18**: 891-900.
- Brodie A (2002) Aromatase inhibitors in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* **13**(2): 61-65.
- Bruce-Keller AJ, Dimayuga FO, Reed JL, Wang C, Angers R, Wilson ME, Dimayuga VM, Scheff SW (2007) Gender and estrogen manipulation do not affect traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **24**: 203-215.
- Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz JM (2002) An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. *Cancer.* **95**(9): 2006-16.
- Carbone DL, Handa RJ (2013) Sex and stress hormone influences on the expression and activity of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* **239**: 295-303.
- Castelli MP, Casti A, Casu A, Frau R, Bortolato M, Spiga S, Ennas MG (2013) Regional distribution of 5 α -reductase type 2 in the adult rat brain: an immunohistochemical analysis. *Psychoneuroendocrinology.* **38**(2): 281-293.
- Chao MV, Bothwell M (2002) Neurotrophins: To cleave or not to cleave. *Neuron* **33**: 9-12.
- Chen X, Li Y, Kline AE, Dixon CE, Zafonte RD, Wagner AK (2005) Gender and environmental effects on regional brain-derived neurotrophic factor expression after experimental traumatic brain injury. *Neuroscience*, **135**: 11-17.
- Chiaretti A, Antonelli A, Genovese O, Pezzotti P, Rocco CD, Viola L, Riccardi R (2008) Nerve growth factor and doublecortin expression correlates with improved outcome in children with severe traumatic brain injury. *J Trauma*, **65**: 80-85.
- Chiaretti A, Barone G, Riccardi R, Antonelli A, Pezzotti P, Genovese O, Tortorolo L, Conti G (2009) NGF, DCX, and NSE upregulation correlates with severity and outcome of head trauma in children. *Neurology*, **72**: 609-616.
- Cooke PS, Nanjappa MK, Yang Z, Wang KK (2013) Therapeutic effects of progesterone and its metabolites in traumatic brain injury may involve non-classical signaling mechanisms. *Front Neurosci* **7**: 108.
- Da Silva Meirelles L, Simon D, Regner A (2017) Neurotrauma: the crosstalk between neurotrophins and inflammation in the acutely injured brain. *Int J Med. Sci* **18**: pii: E1082. doi: 10.3390/ijms18051082.
- Dave N, Gudelsky GA, Desai PB (2013) The pharmacokinetics of letrozole in brain and brain tumor in rats with orthotopically implanted C6 glioma, assessed using intracerebral microdialysis. *Cancer Chemother Pharmacol* **72**: 349-357.
- Day NL, Floyd CL, d'Alessandro TL, Hubbard WJ, Chaudry IH (2013) 17 β -estradiol confers protection after traumatic brain injury in the rat and involves activation of G protein-coupled estrogen receptor 1. *J Neurotrauma* **30**: 1531-1541.
- Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci.* **5**(11): 1131-1136.
- Delbary-Gossart S, Lee S, Baroni M, Lamarche I, Arnone M, Canolle B, Lin A, Sacramento J, Salegio EA, Castel MN, Delesque-Touchard N, Alam A, Laboudie P, Ferzaz B, Savi P, Herbert JM, Manley GT, Ferguson AR, Bresnahan JC, Bono F, Beattie MS

- (2016) A novel inhibitor of p75-neurotrophin receptor improves functional outcomes in two models of traumatic brain injury. *Brain* **139**: 1762-1782.
- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol.* **196**(6): 775-788.
- Dong T, Zhang Q, Hamblin MR, Wu MX (2015) Low-level light in combination with metabolic modulators for effective therapy of injured brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**: 1435-1444.
- Ellis JA, Panagiotopoulos S, Akdeniz A, Jerums G, Harrap SB (2005) Androgenic correlates of genetic variation in the gene encoding 5 α -reductase type 1. *J Hum Genet* **50**: 534-537.
- Emerson CS, Headrick JP, Vink R (1993) Estrogen improves biochemical and neurologic outcome following traumatic brain injury in male rats, but not in females. *Brain Res* **608**: 95-100.
- Febinger HY, Thomasy HE, Pavlova MN, Ringgold KM, Barf PR, George AM, Grillo JN, Bachstetter AD, Garcia JA, Cardona AE, et al. (2015) Time-dependent effects of CX3CR1 in a mouse model of mild traumatic brain injury. *J. Neuroinflamm.* **12**: 154.
- Fester L, Rune GM (2014) Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Res.* **1621**: 162-169.
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* **19**: 692-705.
- Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gililand KR, Gorin-Meyer RE, Wiren KM (2006) A New Look at the 5 α -Reductase Inhibitor Finasteride. *CNS Drug Reviews* **12**(1): 53-76.
- Furukawa A, Myatake 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 XIA1), and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Rat Brain. *J Neurochem*; **71**: 2231-2238.
- Gentry JJ, Barker PA, Carter BD (2004) The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog Brain Res.* **146**: 25-39.
- Gisleskog PO, Hermann D, Hammarlund-Udenaes M, Karlsson MO (1998) A model for the turnover of dihydrotestosterone in the presence of the irreversible 5 α -reductase inhibitors G198745 and finasteride. *Clin Pharmacol Ther* **64**: 636-647.
- Golding EM, Steenberg ML, Contant CF, Krishnappa I, Robertson CS, Bryan RM (1999) Cerebrovascular reactivity to CO₂ and hypotension after mild cortical impact injury. *Am. J. Physiol.* **277**: H1457–H1466.
- Hajszan T, MacLusky NJ, Leranth C (2008) Role of androgens and the androgen receptor in remodeling of spine synapses in limbic brain areas. *Hormones and behavior*, **53**: 638-646.
- Hall JE (2011) Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
- Harden C MacLusky NJ (2005) Aromatase inhibitors as add-on treatment for men with epilepsy. *Expert review of neurotherapeutics*, **5**: 123-127.

- Harte-Hargrove LC Maclusky NJ Scharfman HE (2013) Brain-derived neurotrophic factor-estrogen interactions in the hippocampal mossy fiber pathway: implications for normal brain function and disease. *Neuroscience*, **239**: 46-66.
- Heinlein CA Chang C (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol.* **16**: 2181-2187.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Har- tman J, et al. (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* **87**: 905-31.
- Hicks RR, Martin VB, Zhang L, Seroogy KB (1999) Mild experimental brain injury differentially alters the expression of neurotrophin receptor mRNAs in the hippocampus. *Exp Neurol* **160**: 469-478.
- Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(3): 865-70.
- Hojo Y, Kawato S (2018) Neurosteroids in Adult Hippocampus of Male and Female Rodents: Biosynthesis and Actions of Sex Steroids. *Front Endocrinol (Lausanne)* **23**(9): 183.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **72**: 609-42.
- Huang SH. Neurotrophic factors and their receptors [35 slides]. [date unknown] [cited 2015/03/14]. Available from: <http://www.neurobio.sdu.edu.cn/download/ppt/Neurotrophic%20factors%20and%20Their%20receptors.pdf>
- Ibáñez CF (2002) Jekyll-Hyde neurotrophins: The story of proNGF. *Trends Neurosci* **25**: 284-286.
- Kawato S, Hojo Y, Kimoto T (2002) Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain. *Methods Enzymol* **357**: 241-249.
- Kelso ML, Scheff SW, Pauly JR, Loftin CD (2009) Effects of genetic deficiency of cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2 on functional and histological outcomes following traumatic brain injury in mice. *BMC Neurosci.* **10**: 108.
- Krämer T, Grob T, Menzel L, Hirnet T, Griemert E, Radyushkin K, Thal SC, Methner A, Schaefer MKE (2017) Dimethyl fumarate treatment after traumatic brain injury prevents depletion of antioxidative brain glutathione and confers neuroprotection. *J Neurochem.* **143**: 523-533.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* **24**: 5913-5921.
- Kromer LF (1987) Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science (New York, N.Y.)* **235**: 214-216.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945-1948.
- Lephart ED (1995) Age-related changes in brain and pituitary 5α-reductase with finasteride (Proscar) treatment. *Neurobiol Aging* **16**: 647-650.

- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J.* **6**(5): 1145-1154.
- Ley EJ, Short SS, Liou DZ, Singer MB, Mirocha J, Melo N, Bukur M, Salim A (2013) Gender impacts mortality after traumatic brain injury in teenagers. *J Trauma Acute Care Surg* **75**: 682-686.
- Lighthall JW (1988) Controlled Cortical Impact: A New Experimental Brain Injury Model. *J. Neurotrauma* **5**: 1-15.
- Liu A, Margaiil I, Zhang S et al. (2012) Progesterone receptors: a key for neuroprotection in experimental stroke. *Endocrinology* **153**: 3747-3757.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* **6**: 603–614.
- Ludwig PE, Thankam FG, Patil AA, Chamczuk AJ, Agrawal DK (2018) Brain injury and neural stem cells. *Neural Regen Res.* **13**(1): 7-18.
- Maghool F, Khaksari M, Khachki AS (2013) Differences in brain edema and intracranial pressure following traumatic brain injury across the estrous cycle: involvement of female sex steroid hormones. *Brain Res* **1497**: 61-72.
- Matsumoto AM (2013) Testosterone administration in older men. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **42**: 271–286.
- Mattson MP, Scheff SW (1994) Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy. *J Neurotrauma* **11**: 3-33.
- Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith ML, Siesjö BK, Hunter T, Lindvall O, Persson H (1993) Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* **10**: 151-164.
- Meseke M, Neumüller F, Brunne B, Li X, Anstötz M, Pohlkamp T, Rogalla MM, Herz J, Rune GM, Bender RA (2018) Distal Dendritic Enrichment of HCN1 Channels in Hippocampal CA1 Is Promoted by Estrogen, but Does Not Require Reelin. *eNeuro.* **5**(5).
- Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M et al. (2011) Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J. Neurosci.* **31**: 12963-12971.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG and Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* **276**: 12660–12666.
- Naderi V, Khaksari M, Abbasi R, Maghool F (2015) Estrogen provides neuroprotection against brain edema and blood brain barrier disruption through both estrogen receptors α and β following traumatic brain injury. *Iran J Basic Med Sci* **18**: 138-144.
- Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Petro Z, Kuhn M (1975) The formation and metabolism of estrogens in brain tissue. *Adv Biosci.* **15**: 105-121.
- Nassar GN, Leslie SW (2018) Physiology, Testosterone. *StatPearls [Internet]*.
- Nguyen TL, Kim CK, Cho JH, Lee KH, Ahn JY (2010) Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7/IGF-IR [corrected]. *Exp Mol Med.* **42**(8): 583-95.
- Nilsson S, Gustafsson J (2011) Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther* **89**: 44-55.

- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* **81**: 1535-1565.
- O'Connor CA, Cernak I, Vink R (2006) The temporal profile of edema formation differs between male and female rats following diffuse traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl* **96**: 121-124.
- Oettel M (2004) The endocrine pharmacology of testosterone therapy in men. *Naturwissenschaften* **91**: 66–76.
- Olsen JR, Azeem W, Hellem MR, Marvyin K, Hua Y, Qu Y, Li L, Lin B, Ke X, Øyan AM, Kalland K (2016) Context dependent regulatory patterns of the androgen receptor and androgen receptor target genes. *BMC Cancer* **16**: 377.
- Onyszchuk G, Al-Hafez B, He YY, Bilgen M, Berman NE, Brooks WM (2007) „A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology.” *J Neurosci Methods* **160**:187-196.
- Osier N, Dixon EC (2017) Mini Review of Controlled Cortical Impact: A Well-Suited Device for Concussion Research. *Brain Sci.* **7**(7): 88.
- Osier ND, Pham L, Pugh BJ, Puccio A, Ren D, Conley YP, Alexander S, Dixon CE (2017) Brain injury results in lower levels of melatonin receptors subtypes MT1 and MT2. *Neurosci. Lett.* **650**: 18-24.
- Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL (1998) Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* **54**(1): 175-180.
- Oyesiku NM, Evans CO, Houston S, Darrell RS, Smith JS, Fulop ZL, Dixon CE, Stein DG (1999) Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain. *Brain Res* **833**: 161-172.
- Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* **14**: 7-23.
- Phelan HA, Shafi S, Parks J, Maxson T, Ahmad N, Murphy JT, Minei JP (2007) Use of a pediatric cohort to examine gender and sex hormone influences on outcome after trauma. *J Trauma* **63**: 1127-1131.
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* **2**(1): 24-32.
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* **13**: 226-234.
- Redell JB, Moore AN, Grill RJ, Johnson D, Zhao J, Liu Y, Dash PK (2013) Analysis of functional pathways altered after mild traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **30**: 752-764.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-mediated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 1545-1564.
- Rickels E, Wild K, Wenzlaff P (2010) Head injury in Germany: a population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head injury severity in two distinct areas. *Brain Inj* **24**: 1491-1504.
- Rivero JR, Thompson IM, Liss MA, Kaushik D (2018) Chemoprevention in Prostate Cancer: Current Perspective and Future Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med. Cold Spring Harb Perspect Med* October 2018;8:a030494.

- Roselli CE, Horton LE, Resko JA (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology*. **117**: 2471-2477.
- Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*. **67**(3): 203-33.
- Sandén C, Broselid S, Cornmark L, Andersson K, Daszkiewicz- Nilsson J, Mårtensson UE, et al. (2011) G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments. *Mol Pharmacol* **79**: 400-10.
- Sarkey S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D, DonCarlos LL (2008) Classical androgen receptors in non-classical sites in the brain. *Horm. Behav.* **53**: 753-764.
- Sayed I, Stein DG (2009) Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. *Prog Brain Res*. **175**: 219-237.
- Schwenzer, Ehrenfeld (2010) Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (ZMK-Heilkunde) 4. Ausgabe, (S. 282- ff.), Georg Thieme Verlag ISBN: 978-3-13-593504-1.
- Sebastiani A, Golz C, Werner C, Schafer MK, Engelhard K, Thal SC (2015) Proneurotrophin Binding to P75 Neurotrophin Receptor (P75ntr) Is Essential for Brain Lesion Formation and Functional Impairment after Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, **32**: 1599-1607.
- Sebastiani A, Granold M, Ditter A, Sebastiani P, Götz C, Pöttker B, Luh C, Schaible EV, Radyushkin K, Timaru-Kast R, Werner C, Schäfer MK, Engelhard K, Moosmann B, Thal SC (2016) Posttraumatic propofol neurotoxicity is mediated via the pro-brain-derived neurotrophic factor-p75 neurotrophin receptor pathway in adult mice. *Crit Care Med* **44**: e70-82. doi: 10.1097/CCM.0000000000001284.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chrétien M, Murphy RA (1996) Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* **379**(3): 247-250.
- Shen J, Chen X, Li H, Wang Y, Huo K, Ke K (2017) p75 neurotrophin receptor and its novel interaction partner, NIX, are involved in neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage. *Cell Tissue Res*. **368**(1): 13-27.
- Shooter EM (2001) Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci*. **24**: 601-29.
- Shughrue PJ, Merchenthaler I (2000) Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience*. **99**(4): 605-612.
- Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, Kovacic A, Zhou J, Clyne CD (2005) "Estrogen – the good, the bad, and the unexpected." *Endocr Rev* **26**: 322-330.
- Skaper SD (2018) Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol*. **1727**: 1-17.
- Smith D, Soares H, Pierce J, Perlman K, Saatman K, Meaney D, Dixon C, McIntosh T (1995) A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: Cognitive and histopathologic effects. *J. Neurotrauma* **12**: 169-178.
- Solum DT and Handa RJ (2002) Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**: 2650-2659.
- Song S, Kong X, Acosta S, Sava V, Borlongan C, Sanchez-Ramos J (2016) Granulocyte colony-stimulating factor promotes behavioral recovery in a mouse model of traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res*. **94**: 409-423.

- Songarj P, Luh C, Staib-Lasarak I, Engelhard K, Moosmann B, Thal SC (2015) The antioxidative, non-psychoactive tricyclic phenothiazine reduces brain damage after experimental traumatic brain injury in mice. *Neurosci. Lett.* **584**: 253-258.
- Soustiel JF, Palzur E, Nevo O, Thaler I, Vlodavsky E (2005) Neuroprotective anti-apoptosis effect of estrogens in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **22**(3): 345-352.
- Spencer JL, Waters EM, Milner TA, McEwen BS (2008) Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, Lim kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. *Neuroscience* **155**: 1106-1119.
- Srivastava DP, Woolfrey KM, Penzes P (2013) Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. *Pharmacol. Rev.* **65**: 1318-1350.
- Stuart JD, Lee FW, Simpson Noel D, et al. (2001) Pharmacokinetic parameters and mechanisms of inhibition of rat type 1 and 2 steroid 5 α -reductases: Determinants for different in vivo activities of GI198745 and finasteride in the rat. *Biochem Pharmacol* **62**: 933-942.
- Swerdlow RS, Dudley RE, Page ST, Wand C, Salameh WA (2017) Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels. *Endocrine Reviews* **38**: 220-254.
- Tabatadze N, Huang G, May RM, Jain A, Woolley CS (2015) Sex Differences in Molecular Signaling at Inhibitory Synapses in the Hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **35**: 11252-11265.
- Talwar GP, Segal SJ, Evans A, Davidson OW (1964) The binding of estradiol in the uterus: a mechanism for depression of RNA Synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **52**: 1059-1066.
- Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL (2010) Understanding proneurotrophin actions: recent advances and challenges. *Dev. Neurobiol.* **70**: 350-359.
- Thal CS, Wyschkon S, Pieter D, Engelhard K, Werner C (2008) Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J Neurotrauma* **25**: 785-794.
- Theis V, Theiss C (2015) Progesterone: a universal stimulus for neuronal cells? *Neuronal regeneration research* **10**(4): 547-549.
- Thelin EP, Tajsic T, Zeiler FA, Menon DK, Hutchinson PJA, Carpenter KLH, Morganti-Kossmann MC, Helmy (2017) Monitoring the Neuroinflammatory Response Following Acute Brain Injury. *Front Neurol.* **8**: 351.
- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW (1993) Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. *J Clin Invest* **92**: 903–910.
- Thoenen H (1991) The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* **14**(5): 165-170.
- Toocheck C, Clister T, Shupe J , Crum C, Ravindranathan P, Lee TK, Ahn JM, Raj GV, Sukhwani M, Orwig KE, Walker WH (2016) Mouse spermatogenesis requires classical and nonclassical testosterone signaling. *Biol. Reprod* **94**(1): 11.
- Underwood CK, Coulson EJ (2008) The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**(9): 1664-1668.

- Vierk R, Bayer J, Freitag S, Muhia M, Kutsche K, Wolbers T, Kneussel M, Sommer T, Rune GM (2015) Structure-function-behavior relationship in estrogen-induced synaptic plasticity. *Horm Behav* **74**: 139-148.
- Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM (2012) Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci*. **32**(24): 8116-26.
- Villapol S, Loane DJ, Burns MP (2017) Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury. *Glia*. **65**(9): 1423-1438.
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem*; **76**: 1879-1886.
- Wen Q, Cheng CY, Liu YX (2016) Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**: 89–98.
- Winters SJ, Takahashi J, Troen P (1999) Secretion of testosterone and its delta4 precursor steroids into spermatid vein blood in men with varicocele-associated infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 997-1001.
- Yang K, Perez-Polo JR, Mu XS, Yan HQ, Xue JJ, Iwamoto Y, Liu SJ, Dixon CE, Hayes RL (1996) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 mRNA in rat brain after cortical impact injury. *J Neurosci Res* **44**: 157-164.
- Yano H, Torkin R, Martin LA, Chao MV, Teng KK (2009) Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *J Neurosci* **29**(47): 14790-14802.
- Yapura MJ, Zwiefelhofer EM, Pierson RA, Adams GP (2017) Aromatase inhibitors: A new approach for controlling ovarian function in cattle. *Theriogenology* **112**: 18-25.
- Yi JS, Lee SK, Sato TA, Koh JY (2003) Co-induction of p75^{NTR} and the associated death executor NADE in degenerating hippocampal neurons after kainate-induced seizures in the rat. *Neurosci Lett*. **347**(2): 126-130.
- Zampieri N, Xu CF, Neubert TA, Chao MV (2005) Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J Biol Chem*. **280**(15): 14563-14571.
- Zanin JP, Unsain N, Anastasia A (2017) Growth factors and hormones pro-peptides: the unexpected adventures of the BDNF proddomains. *J. Neurochem*. **141**: 330-340.
- Zhu X, Frechou M, Liere P et al. (2017) A Role of Endogenous Progesterone in Stroke Cerebroprotection Revealed by the Neural-Specific Deletion of Its Intracellular Receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **37**: 10998-11020.

Eigene Publikation:

- Gölz C, Kirchhoff FP, Westerhorstmann J, Schmidt M, Hirnet T, Rune GM, Bender RA, Michael KE Schäfer (im Druck) Sex hormones modulate pathogenic processes in experimental traumatic brain injury. *J Neurochem*, Epub ahead of print.

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Roland Bender, danken, der mich bei dieser Studie mit viel Geduld und Verständnis begleitet hat. Seine unermüdliche Betreuung zu jedem Zeitpunkt weiß ich sehr zu schätzen und hätte sie mir nicht besser wünschen können.

Ich danke Frau Prof. Dr. Gabriele Rune, dass ich meine Experimente in ihrem Institut für Neuroanatomie durchführen durfte und Frau Christiane Schröder für die technische Unterstützung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern für den emotionalen und finanziellen Rückhalt während meiner Dissertation und meines Studiums.

Mein außerordentlicher Dank gilt Max Hüsch für die liebevolle Unterstützung.

11. Curriculum Vitae

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen oder 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:
