

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für experimentelle Medizin, Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

## **Geschlechtsspezifische Regulation der Expression hippocampaler Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren durch Sexualhormone**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Sascha Rogalski  
aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.06.2020**

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

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Tim Magnus**

# **I Inhaltsverzeichnis**

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Neurotrophine .....	1
1.2	Neurotrophin-Rezeptoren.....	2
1.3	Sexualhormone und ihr Einfluss auf die neuronale Entwicklung und Plastizität.....	4
1.4	Östrogen- und Androgen-Rezeptoren.....	6
1.5	Sexualhormone und Neurotrophine .....	7
1.6	Klinischer Bezug .....	9
1.7	Fragestellung und experimentelles Modell.....	10
<b>2</b>	<b>Material und Methodik .....</b>	<b>11</b>
2.1	Tiere.....	11
2.2	Anlage organotypischer Gewebekulturen .....	11
2.3	Ernte der Hippocampus-Gewebekulturen .....	13
2.4	Proteinaufarbeitung.....	13
2.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	14
2.6	SDS-Page .....	15
2.7	Western Blot mittels Nassblotverfahren .....	16
2.8	Entwicklung der Western Blots.....	18
2.9	Auswertung der Western Blots.....	19
2.10	Statistische Auswertung .....	20
<b>3</b>	<b>Material .....</b>	<b>21</b>
3.1	Chemikalien .....	21
3.2	Apparative und technische Hilfsmittel .....	22
3.3	Software.....	23
3.4	Lösungen .....	24
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
4.1	Repräsentative Western Blots.....	28
4.2	Auswertung der E2- und DHT-Behandlung.....	30
4.3	Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen.....	33
4.4	Bewertung der Ergebnisse .....	36

<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>37</b>
5.1	Methodische Beschränkungen der Studie.....	38
5.2	Wirkungen von Sexualhormonen auf Neurotrophine.....	39
5.3	Wirkungen von Sexualhormonen auf Neurotrophine im klinischen Kontext .....	41
5.4	Geschlechtsspezifische Effekte im Gehirn .....	42
5.5	Ausblick.....	44
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>45</b>
6.1	Summary.....	46
V	Literaturverzeichnis	
VI	Danksagung	
VII	Lebenslauf	
VIII	Eidesstattliche Versicherung	

## **II Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b> Neurotrophine, ihre Rezeptoren und Signalwege .....	2
<b>Abb. 2:</b> Regulation der BDNF-Expression durch Östrogene .....	8
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung des Verfahrens zur Präparation, Kulturanlage und Inkubation mit Nährmedien. ....	12
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung des Nassblot-Verfahrens.....	17
<b>Abb. 5:</b> Exemplarische Darstellung der Ergebnisse von Western-Blots.....	29
<b>Abb. 6:</b> Auswertung der E2- und DHT Behandlung für p75.....	30
<b>Abb. 7:</b> Auswertung der E2- und DHT Behandlung für TrkA .....	30
<b>Abb. 8:</b> Auswertung der E2- und DHT Behandlung für TrkB .....	31
<b>Abb. 9:</b> Auswertung der E2- und DHT Behandlung für TrkC.....	31
<b>Abb. 10:</b> Auswertung der E2- und DHT Behandlung für BDNF .....	32
<b>Abb. 11:</b> Auswertung der E2- und DHT Behandlung für NT-3.....	32
<b>Abb. 12:</b> Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen für p75 .....	33
<b>Abb. 13:</b> Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen für TrkA.....	33
<b>Abb. 14:</b> Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen für TrkB.....	34
<b>Abb. 15:</b> Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen für TrkC.....	34
<b>Abb. 16:</b> Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen für BDNF.....	35
<b>Abb. 17:</b> Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen für NT-3.....	35

### **III Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b> Lösungen der Primärantikörper und Trägersubstanzen .....	18
<b>Tab. 2:</b> Chemikalien.....	21
<b>Tab. 3:</b> Apparative und technische Hilfsmittel.....	23
<b>Tab. 4:</b> Software .....	23

#### IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ad libidum	Nach Belieben
AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BDNF	<i>Brain-derived-neurotrophic-factor</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
C	Lat. Carbo (Kohlenstoff)
C°	Grad Celsius
d.h.	das heißt
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECL	Electrochemolumineszenz
Et al.	Lat. Et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
E2	17 $\beta$ -Estradiol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
g	Gramm
h	Lat. Hora (Stunde)
HCl	Hydrogenchlorid
Ig	Immunglobulin
in vitro	Im Glas
in vivo	Im Lebenden
K	Kontrolle
l	Liter
Lat.	Lateinisch

Let	Letrozol
LTP	<i>Long-term-Potentialiation</i> (Langzeitpotenzierung)
M	Molar
max.	Maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
N	Lat. Nitrogenium (Stickstoff)
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT-3	Neurotrophin 3
MP	Milchpulver
p75-NTR	p75 Neurotrophinrezeptor
p-Wert	<i>Probability-Wert</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered Saline-Tween</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
pH	Pondus hydrogenii
P5	5. postnataler Tag
%	Prozent
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
SDS-Page	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamid gelelectrophoresis</i>
sec	Sekunde

sog.	So genannt
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Trk A	Tyrosinkinase-rezeptor A
Trk B	Tyrosinkinase-rezeptor B
Trk C	Tyrosinkinase-rezeptor C
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Unit	Einheit
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	Zum Beispiel

## 1 Einleitung

### 1.1 Neurotrophine

Die Proteinfamilie der Neurotrophine enthält strukturverwandte Proteine, die von den Zielzellen von Nervenzellen ausgeschüttet werden, um im neuronalen Gewebeverband die Überlebensfähigkeit der Neurone und die Stabilität ihrer synaptischen Kontakte zu beeinflussen. Ursprünglich fand man diese neurotrophen Substanzen im peripheren Nervensystem (Levi-Montalcini 1987; Shooter 2001; Thoenen et al. 1991). Im weiteren Verlauf stellten sie sich jedoch auch für die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von Neuronen im zentralen Nervensystem als bedeutsam heraus (Huang und Reichardt 2001, 2003; Park und Poo 2013; Skaper 2018).

Bisher konnten fünf verschiedene Typen von Neurotrophinen identifiziert werden (Bothwell 1991):

1. BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*)
2. NGF (*nerve growth factor*)
3. NT-3 (Neurotrophin 3)
4. NT-4/5 (Neurotrophin 4 u. 5, aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und Eigenschaften meist zu NT-4/5 zusammengefasst).

Einer der Orte mit der höchsten Konzentration von Neurotrophinen ist der Hippocampus (Cohen-Cory et al. 2010; Davies 1994; Drake et al. 1999; Harte-Hargrove et al. 2013; Mehra et al. 2005; Milner et al. 2005; Scharfman und MacLusky 2006a, 2006b, 2014). Diese im Temporallappen des Gehirns liegende, entwicklungsgeschichtlich älteste Cortexregion, trägt als Bestandteil des Papez-Neuronenkreises maßgeblich zur Gedächtnisbildung bei. Besonders bei der Überführung von Inhalten des Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis kommt ihm eine bedeutende Rolle zu. Daher führen Ausfälle in diesem Bereich zu anterograder Amnesie bei erhaltenem Langzeitgedächtnis. Für die Funktion des Hippocampus ist die Fähigkeit zur neuronalen Plastizität essentiell. Hierunter versteht man im Allgemeinen die Fähigkeit von Nervenzellen, synaptische Kontakte untereinander zu verändern, sie also zu verstärken oder zu vermindern. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Neurotrophine nicht

nur während der Entwicklung, sondern auch im adulten Hippocampus Einfluss auf die neuronale Struktur, Funktion und Plastizität von Hippocampusneuronen ausüben (Cohen-Cory et al. 2010; Scharfman und MacLusky 2014; Waterhouse und Xu 2009; Yoshii und Constantine-Paton 2010), somit also ein wichtiger Faktor bei der Vermittlung neuronaler Plastizität sind. Als stimulierend auf die Neurotrophinsekretion wird im Allgemeinen neuronale Aktivität angesehen (Lindholm et al. 1994). Andererseits führen auch Vorgänge wie z.B. eine Schädigung des neuronalen Gewebes zu Neurotrophinfreisetzung (Day et al. 2013; Lindholm 1994). Aber nicht nur die quantitative Erhöhung der Innervationsdichte, sondern auch deren Begrenzung wird durch Neurotrophine induziert. So erkannte man beispielsweise, dass eine begrenzte Sekretion während der Entwicklungsphase zu einer optimierten Neuronen- und Innervationsdichte des Zielgewebes führt (Skaper 2018).

## 1.2 Neurotrophin-Rezeptoren

Es gibt zwei unterschiedliche Rezeptortypen, an die Neurotrophine binden können. Dem p75-Neurotrophinrezeptor (Chao 1994) stehen eine Reihe von Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk) (Barbacid 1994; Skaper 2018) gegenüber.

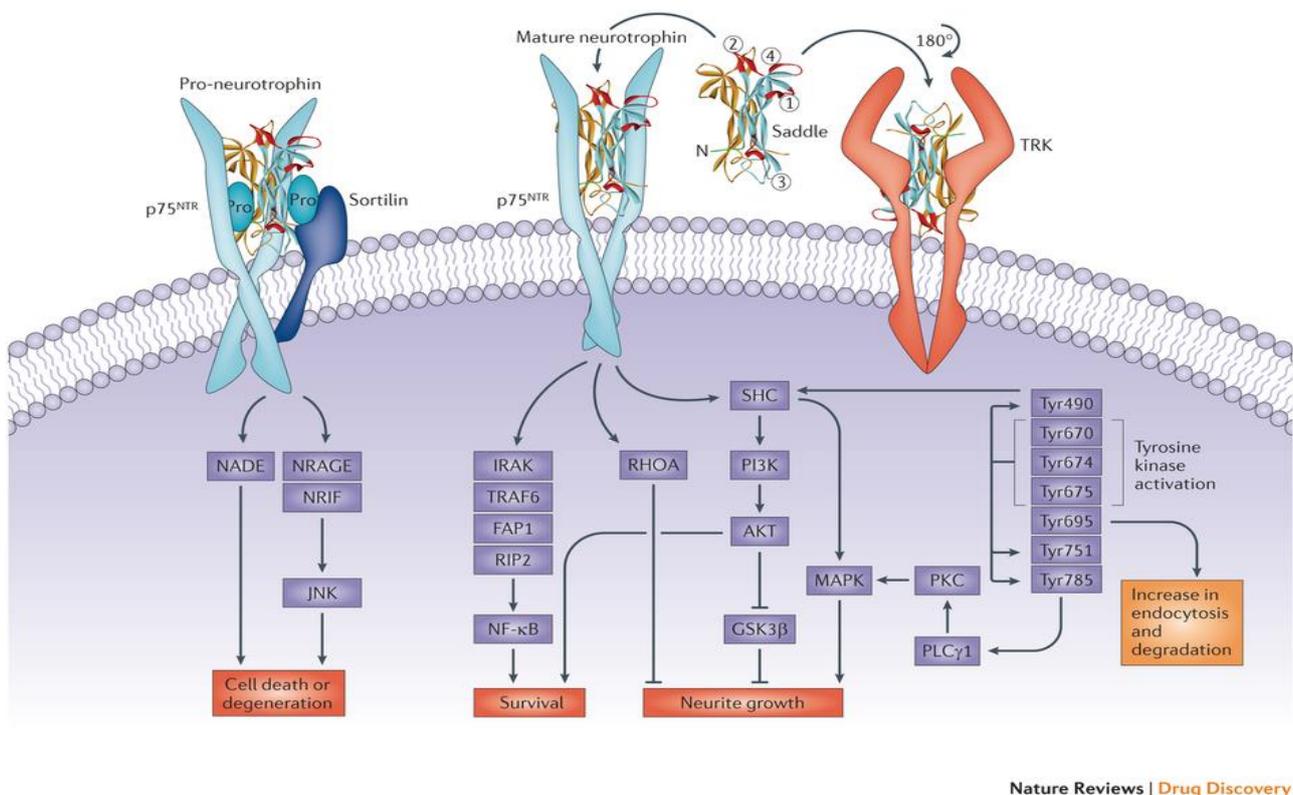


Abb. 1: Neurotrophine, ihre Rezeptoren und Signalwege (Longo und Massa 2013).

Wie in Abb.1 ersichtlich, binden die Rezeptoren der Trk Familie (TrkA, -B und -C) nur für sie spezifische Neurotrophine (TrkA: NGF, TrkB: BDNF und NT-4/5, TrkC: NT-3) und vermitteln überwiegend wachstumsverstärkende, d. h. trophische Signalwege. Durch die Bindung an Trk-Rezeptoren, Tropomyosin-verwandte Kinasen (*Trk = tropomyosin related kinase*), werden u.a. Mitose anregende Signalwege, z.B. über die Phosphatidylinositol 3-Kinase und Ras, induziert (Barbacid 1994; Skaper 2018). Hingegen werden über den p75-NTR überwiegend apoptotische Signale vermittelt (Chao 1994; Shen et al. 2017; Yi et al. 2003). Außerdem ist seine Bindungsaffinität geringer gegenüber den Rezeptoren der Trk Familie. Der p75-NTR ist jedoch in der Lage, sämtliche Neurotrophintypen als Liganden zu binden (Chao 1994; Skaper 2018).

Wie viele Wachstumsfaktoren und Hormone werden Neurotrophine als Prä-Pro-Proteine synthetisiert. Durch die Anwesenheit einer N-terminalen Sequenz, welche durch das „Prä“ gekennzeichnet ist, wird das Pro-Protein als Vorläufermolekül (oder Signal-Peptid) entweder auf den sekretorischen Weg, oder in ein intrazelluläres Kompartiment geführt (Zanin et al. 2017). Zur weiteren Prozessierung der Pro-Domäne werden intrazelluläre (z. B. Pro-Proteinkonvertasen im Golgi-Apparat) und extrazelluläre Enzyme (z.B. Matrix-Metalloproteinasen) benötigt (Mowla et al. 2001; Zanin et al. 2017). Eine funktionelle Wirkung konnte der Pro-Domäne u.a. beim direkten intrazellulären Transport, der Regulation der extrazellulären Verteilung und bei der Abschirmung der matures Domäne von den Rezeptoren zur Limitierung der Bioverfügbarkeit zugesprochen werden (Zanin et al. 2017). Dieser komplexe biochemische Prozess ist relevant für das Verständnis einer postulierten „Yin-Yang-Hypothese“ (Lu et al. 2005) nach der pro- und matures BDNF grundsätzlich gegenläufige Effekte bei der Aktivierung zweier unterschiedlicher Rezeptorsysteme auslösen. Während pro-BDNF bevorzugt an den p75-NTR bindet, interagiert matures BDNF primär mit TrkB (Chao und Bothwell 2002; Ibanez 2002; Lu et al. 2005). Eine vergleichbare Rezeptorselektivität für den p75-NTR (pro-Form) und den TrkC-Rezeptor (mature Form) wurde auch für das in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte NT-3 beobachtet (Bothwell 1991; Yano et al. 2009).

### **1.3 Sexualhormone und ihr Einfluss auf die neuronale Entwicklung und Plastizität**

Östrogene und Gestagene als wichtigste weibliche Sexualhormone entstammen der Gruppe der Steroidhormone, welche sich grundsätzlich vom Cholesterin ableiten lassen. Die vier Formen des Östrogens sind Estron (E1), 17 $\beta$ -Estradiol (E2), Estriol (E3) und Esterol (E4). E2, das potenteste Östrogen und Gegenstand dieser Arbeit, wird bei der Frau zum größten Teil in den Granulosazellen der Ovarien, aber auch in Knochen und im Fettgewebe über die Zwischenstufen Testosteron und Androstendion aus Cholesterol synthetisiert. Den abschließenden Schritt der Synthese übernimmt dabei das Enzym Aromatase (auch CYP19A1). E2 fördert im weiblichen Zyklus sowohl die zelluläre Proliferation, als auch Wachstum und Differenzierung der weiblichen Reproduktionsorgane, um diese für die Aufnahme eines Embryos zu präparieren. Neben seiner Bedeutung im Zusammenhang mit Geschlechterdifferenzierung und Reproduktion nimmt E2 auch in der Regulation des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels, der Knochendichte, des Elektrolythaushaltes, des kardiovaskulären Organsystems und insbesondere im zentralen Nervensystem eine wichtige Funktion ein (Nilsson und Gustafsson 2011; Woolley und McEwen 1992; Zhu et al. 2017). Dabei wurde festgestellt, dass nicht nur von peripheren Quellen (Ovarien, Knochen, etc.) stammendes E2 auf Neurone im Gehirn einwirken kann, sondern dass in beiden Geschlechtern Neurone in der Lage sind, E2 selbst *de novo* zu synthetisieren, da sie über die notwendigen Enzyme verfügen (Fester et al. 2011; Furukawa et al. 1998; Hojo et al. 2004; Prange-Kiel et al. 2003; Wehrenberg et al. 2001).

Besonders gut untersucht ist die Rolle des neuronalen E2 im Hippocampus. Hier spielt von Hippocampusneuronen gebildetes E2 eine entscheidende Rolle z. B. bei der Synaptogenese und bei der Langzeitpotenzierung (*long-term-potentialiation, LTP*) (Bender et al. 2010; Bender et al. 2017; Kretz et al. 2004; Meseke et al. 2018; Vierk et al. 2012). Allerdings unterliegen auch neuronal gebildete Sexualhormone der zyklischen Regulation durch Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), was in weiblichen Versuchstieren eine Zyklusabhängigkeit der Effekte auf das hippocampale Gewebe erklärt (Prange-Kiel et al. 2008).

Analog zu den Östrogenen/Gestagenen bei der weiblichen Entwicklung, steuern Androgene als natürliche (aber auch synthetisierte) Hormone die Entwicklung der

männlichen Geschlechtsorgane. Zu den natürlichen Androgenen zählen neben Androsteron und Dehydroepiandrosteron (DHEA) auch Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT).

Testosteron, welches unter dem Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH) primär in den Leydig-Zellen des Hodens (Wen et al. 2016), aber auch in der Zona reticularis der Nebenniere produziert wird, weist im männlichen Reproduktionstrakt die höchste Konzentration auf (Matsumoto 2013). Es ist das am besten untersuchte Androgen und ist an der Ausbildung der männlichen Geschlechtsorgane, an der Spermatogenese und der sexuellen Differenzierung entscheidend beteiligt (Swerdloff et al. 2017). Zusätzlich zur Entwicklung der primären Geschlechtsmerkmale ist Testosteron auch für die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale wie anabole Mechanismen, den Stimmbruch, das Haar-, Muskel- und Skelettwachstum verantwortlich (Nassar und Leslie 2019).

DHT, das aus Testosteron über das Enzym  $5\alpha$ -Reduktase synthetisiert wird (Swerdloff et al. 2017), stellt den metabolisch aktivsten Metaboliten des Testosterons dar (Heinlein und Chang 2002; Oettel 2004). Die  $5\alpha$ -Reduktase kommt in zwei verschiedenen Isoformen vor: Typ 1 findet sich in der Leber, in der Muskulatur, in Talgdrüsen der Haut und insbesondere im Gehirn (Castelli et al. 2013; Ellis et al. 2005; Thigpen et al. 1993). Typ 2 findet sich dagegen primär in den männlichen Reproduktionsorganen (Prostata, Nebenhoden, Samenbläschen). Somit lässt sich zusammenfassen, dass Typ 2 überwiegend in der Peripherie lokalisiert ist, während Typ 1 der dominierende Typ im ZNS ist und Neurone selbst in der Lage sind, über die  $5\alpha$ -Reduktase DHT zu produzieren (Castelli et al. 2013; Stuart et al. 2001). Wie E2 hat DHT Einfluss auf den neuronalen Gewebeverband, insbesondere auf die Synapsendichte im Hippocampus (Gould et al. 1990; Leranath et al. 2004).

Auch während der frühen postnatalen Entwicklung üben Sexualhormone großen Einfluss auf die Entwicklung des ZNS aus. Hierbei ist vor allem E2 essentiell für die Reifung und Differenzierung sowohl bei Männern als auch bei Frauen, da es die geschlechtsspezifische Entwicklung des Gehirns mit reguliert (Bakker und Baum 2008; Beyer 1999; McCarthy 2008). Der Serumspiegel von E2 ist beim weiblichen Embryo/Foetus pränatal erhöht und fällt mit der Geburt ab, während beim männlichen Embryo/Foetus das Testosteron prä- und postnatal deutliche Maxima erreicht (Gillies und McArthur 2010). Entscheidend für die Entwicklung ist aber offenbar, dass pränatal beim weiblichen Embryo kaum E2 im Gehirn

ankommt, u.a. weil es durch  $\alpha$ -Fetoprotein gebunden wird (Gillies und McArthur 2010). Männliche Individuen hingegen erleben neben dem oben beschriebenen, zwischenzeitlichen prä- und postnatalen Maximum und in der Pubertät einen Anstieg des Testosteronspiegels im Serum (Rhoda et al. 1984; Weisz und Ward 1980). E2 wird beim männlichen Foetus im zentralen Nervensystem aus diesem Testosteron aromatisiert und führt (und nicht das Testosteron selbst) zur Maskulinisierung. Das bedeutet, es werden neuronale Schaltkreise moduliert und organisiert, die später für männliche Verhaltensweisen verantwortlich sind (Wu et al. 2009). Beiden Geschlechtern gemein ist jedoch eine Art Ruhephase, beginnend wenige Wochen nach der Geburt bis zum Eintritt der Pubertät, wo sich sowohl bei E2 in der Frau als auch bei Testosteron im männlichen Individuum exponentielle Wachstumskurven nachweisen lassen (Gillies und McArthur 2010; Konkle und McCarthy 2011; Rhoda et al. 1984). Die Sexualhormonexposition ändert sich somit also drastisch während des Eintritts in die Pubertät, in der bei Frauen der Einfluss von Östrogen und bei Männern der von Testosteron bzw. seines Derivats DHT überwiegt (Gillies und McArthur 2010).

### **1.4 Östrogen- und Androgen-Rezeptoren**

Es ist bekannt, dass E2-Bindung an Östrogen-Rezeptoren sowohl genomische (Adams et al. 2002; Balthazart et al. 2006; Foster 2005; McEwen 2002) als auch nicht-genomische Effekte (Lubin et al. 2008; Timmusk et al. 1993; Tongiorgi und Baj 2008) hervorruft. Diese Effekte werden über drei verschiedene Rezeptortypen vermittelt:

Die Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sind kerngängige Rezeptoren, die meist im Zytoplasma lokalisiert sind und nach E2-induzierter Dimerisierung eine Aktivierung von Genen hervorrufen, die über ein *Estrogen-Response-Element* (ERE) verfügen (Levin 2005). Beachtenswert ist dabei, dass eines der bekannten Gene mit der ERE-Sequenz innerhalb der Promotorregion das BDNF-Gen ist (Sohrabji et al. 1995). Daneben wurde vor einiger Zeit auch ein membranständiger Östrogenrezeptor, der GPER1 (*G protein-coupled estrogen receptor 1*) beschrieben, (Alexander et al. 2017; Vajaria und Vasudevan 2018), der über die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden schnelle E2-Wirkungen hervorrufen kann, die unabhängig von einer Gentranskription erfolgen. Tatsächlich treten E2-induzierte Effekte an Neuronen innerhalb von Minuten auf. Für all diese Rezeptoren (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPER1) ist belegt, dass sie im Hippocampus exprimiert werden (Bender et al. 2010; Meseke et al. 2018; O'Keefe et al. 1995; Oriksa et al. 2000; Waters et al. 2015).

Im Gegensatz zu den Östrogenen ist für die Androgene bislang nur ein Rezeptortyp bekannt: der Androgenrezeptor (AR), ein ligandenabhängiger Transkriptionsaktivator, der jedoch über die Aktivierung von Signalkaskaden auch schnelle (nicht-genomische) Effekte hervorrufen kann (Sarkey et al. 2008; Toocheck et al. 2016).

### **1.5 Sexualhormone und Neurotrophine**

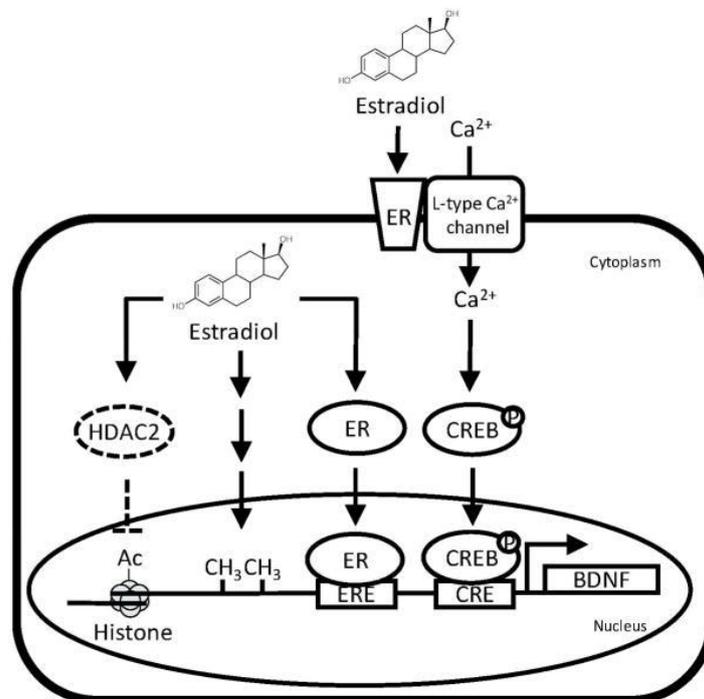
Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass der Einfluss von Sexualhormonen auf die neuronale Plastizität im Hippocampus unter anderem über Neurotrophine vermittelt wird. In diesem Zusammenhang wurde insbesondere die Wirkung von E2 auf die Expression von BDNF, dessen Gen über eine ERE-Sequenz verfügt (Sohrabji et al. 1995), bereits ausführlich untersucht. Im Hippocampus ist BDNF das häufigste Neurotrophin.

Es beeinflusst dort u. a. die Körnerzell-Neurogenese (Larsson et al. 2002; Scharfman und Maclusky 2005), die Bildung von dendritischen Dornfortsätzen (Alonso et al. 2004), die Langzeit-Potenzierung (Korte et al. 1995) sowie andere Mechanismen der neuronalen Plastizität (von Bohlen und Halbach 2018). Interessanterweise sind die Effekte von BDNF und E2 dabei im Hippocampus hinsichtlich Wirkung und Signaltransduktionsweg sehr ähnlich (Scharfman und Maclusky 2005). So wurden beispielsweise sowohl nach BDNF- als auch nach E2-Gabe vergleichbare Veränderungen der Aktivität oder Expression von NMDA-Rezeptoren (Foy et al. 1999; Levine und Kolb 2000; Smith und McMahon 2005; Sun et al. 2001; Zhou et al.) und von Calcium-modulierten Kalium-Kanälen beobachtet (Carrer et al. 2003; Kramar et al. 2004). Ähnlichkeiten finden sich auch in den Wirkungen von BDNF und E2 auf die Synapsendichte im Hippocampus (Alonso et al. 2004; Gould et al. 1990; Ji et al. 2005; Kretz et al. 2004; Woolley und McEwen 1992; Zhou et al. 2010).

Da außerdem gezeigt werden konnte, dass E2 auf die Transkription von BDNF stimulierend wirkt (Ivanova et al. 2001; Scharfman et al. 2007; Solum und Handa 2002), liegt die Vermutung nahe, dass das im Hippocampus gebildete E2 seine Wirkung auf die neuronale Plastizität - zumindest teilweise - über die Expression von BDNF vermittelt. Neuere Studien weisen hier auch auf eine Beteiligung des membranständigen Östrogenrezeptor GPER1 hin, dessen Aktivierung im Hippocampus die BDNF-Freisetzung fördert (Briz et al. 2015). Weiterhin regulieren Östrogenrezeptoren die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*). Studien zeigten hier in kultivierten Hippocampusneuronen einen Estradiol-induzierten Zustrom von extrazellulärem Calcium,

welcher über eine CREB-Aktivierung die BDNF-Expression steuern kann (vgl. Abb .2) (Chan und Ye 2017).

Im Vergleich zur E2-BDNF-Interaktion ist die Rolle männlicher Sexualhormone weniger gut untersucht. Mehrere Studien deuten jedoch darauf hin, dass Testosteron, das quantitativ häufigste Androgen, ein positiver Regulator der BDNF-Expression oder -Produktion (z. B. in Rückenmarksneuronen, in der CA1-Region des Hippocampus, im Cortex) sein kann, insbesondere nach ischämischem Schlaganfall (Chan und Ye 2017; Fanaei et al. 2014; Li et al. 2012; Ottem et al. 2007).



**Abb. 2:** Regulation der BDNF-Expression durch Östrogene (Chan und Ye 2017).

### **1.6 Klinischer Bezug**

Zahlreiche neurologische Erkrankungen zeigen eine geschlechtsspezifische Ausprägung, was den Verdacht nahelegt, dass die unterschiedliche Sexualhormon-Ausstattung von Männern und Frauen dabei eine Rolle spielen könnte. Multiple Sklerose beispielsweise ist eine chronisch entzündliche bzw. degenerative Erkrankung der Myelinscheiden des zentralen Nervensystems mit sexuellem Dimorphismus (Geschlechterverteilung von 3:1 weibl./männl.) (Bove et al. 2014). Von klinischer und epidemiologischer Relevanz sind weiterhin Mechanismen der neuronalen Regeneration bei bzw. nach einem Schlaganfall. In Deutschland ist der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache und die häufigste Ursache für Langzeitbehinderung (Statistisches Bundesamt 2014). Studien aus den USA zeigen beispielsweise, dass Frauen vor der Menopause ein signifikant geringeres Schlaganfallrisiko und darüber hinaus auch ein geringeres Risiko für schwerwiegende Behinderungen nach einem Schlaganfall haben als gleichaltrige Männer (Murphy et al. 2004). Auch bei einem Schädelhirntrauma (*engl. traumatic brain injury, TBI*), einer der häufigsten Ursachen für schwere Verletzungen mit oder ohne Todesfolge, insbesondere bei jüngeren Männern und Frauen, gibt es Hinweise auf eine bessere klinische Prognose bei weiblichen Betroffenen (Arevalo et al. 2015; Ley et al. 2013; Phelan et al. 2007). An der Ausprägung dieser Geschlechtsunterschiede könnten Einflüsse von Sexualhormonen auf die Neurotrophin-Expression beteiligt sein. Neurotrophine werden generell mit der Stimulation neuronaler Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht. So wurde BDNF bereits in klinischen Studien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen (ALS, diabetische Neuropathie) getestet (Lu et al. 2013). Für NGF fand man beispielsweise, dass eine erhöhte Konzentration im Liquor nach Schädel-Hirn-Trauma mit einer besseren Prognose korrelierte (Chiaretti et al. 2008; Chiaretti et al. 2009).

Befunde aus experimentellen Tiermodellen scheinen eine derartige Annahme zu stützen. So wurde in einem Tiermodell für Schädel-Hirn-Trauma kürzlich herausgefunden, dass die Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren nach experimentell induzierter Schädigung geschlechtsspezifisch verändert war (Gölz et al. 2019). Gleichzeitig wurden in diesem Tiermodell unterschiedliche Läsionsgrößen in männlichen und weiblichen Mäusen gefunden (Gölz et al. 2019). Dies deutet auf einen möglichen Einfluss von Sexualhormonen auf den Verlauf der Schädigung hin.

### **1.7 Fragestellung und experimentelles Modell**

Wie oben ausgeführt, ist inzwischen gut belegt, dass zwischen Sexualhormonen und Neurotrophinen eine funktionelle Beziehung besteht. Ein relativ neues Forschungsfeld folgt jedoch zunehmend aus Beobachtungen, dass die Wirkung von Sexualhormonen auf Neurone je nach Geschlecht unterschiedlich ausfallen kann. So wurde im Hippocampus (Vierk et al. 2012) und in der Amygdala (Bender et al. 2017) festgestellt, dass eine Gabe des Aromatase-Inhibitors Letrozol (er verhindert die Bildung von E2) in weiblichen Mäusen die Langzeitpotenzierung unterbindet, in männlichen jedoch nicht. Ähnliche Geschlechtsunterschiede wurden kürzlich auch in Gedächtnis-bezogenen Verhaltenstests gefunden (Wang et al. 2018). Diese Befunde lassen vermuten, dass die während der Geschlechtsdifferenzierung geprägten Geschlechtsunterschiede auch Sexualhormon-responsive, neuronale Signalmechanismen umfassen könnten.

Um diese Möglichkeit im Hinblick auf die Regulation der Neurotrophine durch Sexualhormone zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Fragen untersucht:

- 1) Bewirken die Sexualhormone E2 bzw. DHT im Hippocampus eine Expressionsänderung von Neurotrophinen oder Neurotrophin-Rezeptoren?
- 2) Erfolgt diese Expressionsänderung geschlechtsspezifisch?

Als Untersuchungsmodell wurden organotypische hippocampale Gewebekulturen verwendet, die den Vorteil einer leichten experimentellen Zugänglichkeit haben, d. h. die zu untersuchenden Substanzen – E2 und DHT – können kontrolliert hinzugegeben und somit systematisch ihre Wirkungen bestimmt werden.

Die Expressionsbestimmung wurde mit Hilfe der Western-Blot-Methode durchgeführt. Untersucht wurden die Neurotrophine BDNF und NT-3, sowie die Rezeptoren, TrkA, TrkB, TrkC und p75-NTR. Nicht untersucht wurde die Expression der Neurotrophine NGF und NT-4/5, da deren geringes Expressionsniveau im Hippocampus eine verlässliche Analyse mit der Western-Blot-Methode nicht erlaubte. Das Anlegen und die Pflege der Gewebekulturen wurde von Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt. Meine Aufgabe bestand in der nachfolgenden Proteinaufarbeitung und Durchführung der Western-Blots.

## **2 Material und Methodik**

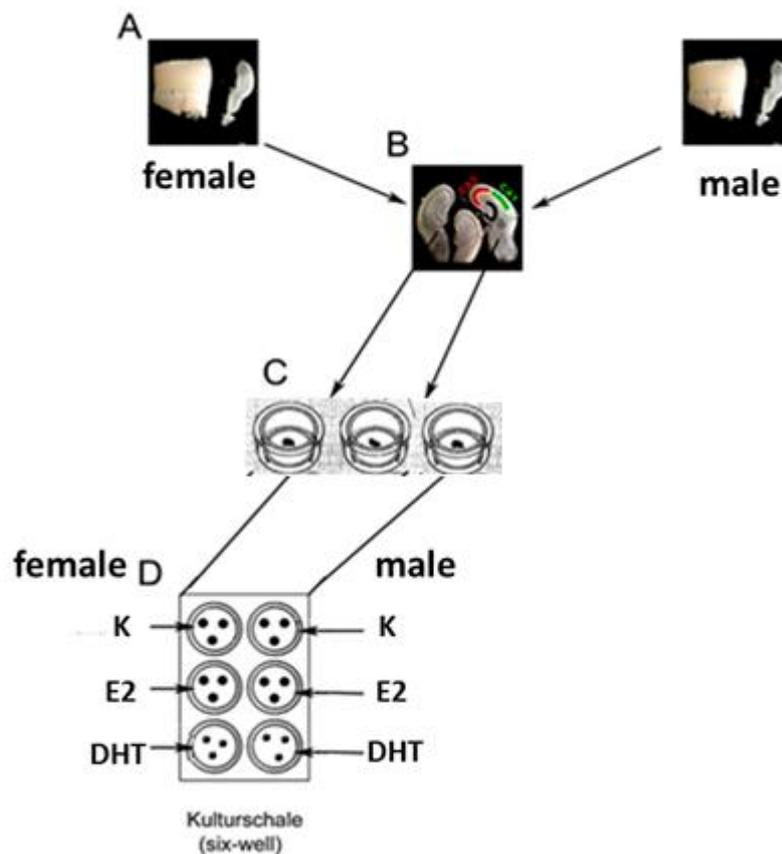
### **2.1 Tiere**

Im Rahmen der Experimente wurden insgesamt 54 Ratten aus dem Zuchtstamm Wistar (lat. *Rattus norvegicus*) verwendet. Sie stammten aus der Tierzucht und -haltung des UKE. Es wurden fünf Tage alte Ratten (P5) beider Geschlechter (je 27 männlich bzw. weiblich) für die Anlage von Gewebekulturen verwendet. Die Muttertiere wurden unter kontrollierten Bedingungen im Tierstall gehalten: Tag/Nacht, bzw.- Hell/Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden, sowie Wasser und Nahrung nach Belieben. Es wurden keine Experimente am lebenden Tier durchgeführt. Alle gesetzlichen Bestimmungen bezüglich Tierhaltung und Tierexperiment wurden ordnungsgemäß beachtet.

### **2.2 Anlage organotypischer Gewebekulturen**

Die Gewinnung der hippocampalen Gewebekulturen erfolgte durch Präparation unter semisterilen Bedingungen. Die fünf Tage alten Ratten wurden mittels Schere dekapitiert. Danach wurde die Kopfschwarte eröffnet und mit einer spitzen Pinzette nach lateral mobilisiert, bis der kraniale Anteil des knöchernen Schädels vollständig einsehbar war. Die in diesem Entwicklungsstadium noch sehr weiche Schädeldecke konnte ebenfalls mit der Schere eröffnet werden.

Im darauffolgenden Schritt wurde das Gehirn aus der Kalotte mittels sog. Heidemannspatel entfernt und auf einer mit Eis gekühlten Petrischale zwecks weiterer Präparation platziert. Dann wurden Kleinhirn und Frontalhirn entfernt und die beiden verbliebenen Hemisphärenanteile mit einem Skalpell durch einen Median-sagittal-Schnitt getrennt. Der nun sichtbare Hippocampus wurde unter der Stereolupe mit Hilfe von Pinzette und Spatel von Resten des übrigen Gehirns gesäubert und auf die Verarbeitungsplattform des Gewebeschniders („*tissue-chopper*“) überführt. Dort transversal platziert, wurden die Hippocampi in 10-15 0,4 mm dünne Scheiben geschnitten und im Anschluss 3 benachbarte Hippocampusscheiben (sog. Schwesterkulturen, „*triplets*“) einander zugeordnet, von denen jede einer anderen experimentellen Bedingung (E2, DHT oder unbehandelt = Kontrolle) Siehe Abb. 3) unterworfen wurde. Durch diese Vorgehensweise wurde die Variabilität zwischen den Gewebekulturen minimiert und dadurch eine optimale Vergleichbarkeit der experimentellen Gruppen gewährleistet.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Verfahrens zur Präparation, Kulturanlage und Inkubation mit Nährmedien.

A: Hippocampusscheibe im Tissue-Chopper, B: Erstellung von Schwesterkulturen, C: Einbringen in Schalen mit Mikromembran, D: Anlage in experimenteller Anordnung in „Six Well“- Kulturschalen. Nach M. Nottebohm (2012) „Einfluß von 17 $\beta$ -Östradiol auf die Expression des Neuronalen Wachstumsfaktors BDNF und seines Rezeptorproteins TrkB“ modifiziert durch den Verfasser.

Die Kultivierung der organotypischen Gewebekulturen wurde mit der Methode von Stoppini (Stoppini et al. 1993) durchgeführt. Die Hippocampusscheiben wurden hierbei zusammen mit Präparationsmedium auf Membranen überführt, die über 0,4  $\mu\text{m}$  große Poren verfügen. Das Präparationsmedium wurde daraufhin abgesaugt und die Hippocampusscheiben auf den Membranen liegend, unter sterilen Bedingungen in Kulturschalen (Six-well-Schalen, siehe Material) mit je 1 ml Kulturmedium pro Vertiefung eingebracht und anschließend im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dabei wurde jede Six-well-Schale mit drei Membranen von jedem Tier belegt, die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen ausgesetzt wurden: den unbehandelten Kontrollen wurden jeweils die mit E2 ( $10^{-7}$  M, Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Stammlösung/ml Medium) bzw. DHT ( $10^{-7}$  M, Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Stammlösung/ml Medium) zu behandelnden Kulturen aus demselben Tier gegenübergestellt (siehe Abb. 3). Die Hippocampusscheiben wurden *in vitro* über das durch die Poren fließende

Kulturmedium ernährt. Das Kulturmedium wurde nach 48 Stunden gewechselt und so sichergestellt, dass trotz äußerer Einflüsse (Temperatur, Metabolismus, Verdunstung etc.) eine ausreichend hohe Konzentration der Sexualhormone vorhanden war. Diese Konzentration wurde bereits erfolgreich in anderen Studien getestet (Bender et al. 2010).

### **2.3 Ernte der Hippocampus-Gewebekulturen**

Nach der Präparation wurden die Kulturen zuerst für 4 Tage unbehandelt (zur Erholung) kultiviert, bevor über insgesamt sieben Tage die experimentelle Behandlung durchgeführt wurde (siehe oben). Danach wurden die Gewebekulturen geerntet. Dazu wurden die Kulturen mittels Spatel und unter Zuhilfenahme einer Lupenleuchte von ihren Membranen gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt. Unter Sichtkontrolle wurde sichergestellt, dass sämtliches Gewebe aus dem *Six-well*-Modul in das Gefäß überführt wurde und vorzugsweise am Grund des konisch geformten Röhrchens zu liegen kommt, um beim späteren Öffnen nicht kontaminiert zu werden oder verloren zu gehen. Unmittelbar nach Befüllung und numerischer Beschriftung der Eppendorf-Röhrchen erfolgte das Schockgefrieren mit  $-196^{\circ}\text{C}$  kaltem, flüssigem Stickstoff. Anschließend folgte die Lagerung im Gefrierschrank bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum Termin der Probenaufarbeitung.

### **2.4 Proteinaufarbeitung**

Für die weitere Aufarbeitung der Gewebekulturen wurden zuerst die Proteine aus dem Gewebe extrahiert. Die Gewebeproben wurden dazu sukzessive aus der Gefrierlagerung entnommen. Um den zügigen und komplikationsarmen Ablauf zu gewährleisten, wurden nicht sämtliche Proben einer Kulturreihe gleichzeitig aufgetaut, sondern jeweils nur eine Hälfte. Im ersten Arbeitsschritt wurde dem Probenmaterial bereits im Ursprungsgefäß  $75\ \mu\text{l}$  RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation-Assay, Zusammensetzung siehe „Material“) hinzugegeben. Darüber hinaus wurden Phosphatase- und Proteaseinhibitor hinzugefügt, um intrinsische Enzymaktivitäten zu inhibieren. Danach wurde das Protein-RIPA-Gemisch zwecks Zellaufschluss mittels eines Potters unter permanenter Kühlung durch Eis homogenisiert. Weiterhin wurde die Lösung in verschiedenen Pipettenspitzen und zuletzt mit einer Insulinspritze mehrfach aufgezogen und wieder ausgestoßen, um die bestmögliche Homogenisierung zu erzielen. Danach ruhten die Proben für 30 Minuten auf Eis und wurden dabei alle 5-10 Minuten mit einem Vortex-Mischer verrührt. Nachfolgend wurde die Proteinlösung bei 13000 Umdrehungen und Kühlung auf  $4^{\circ}\text{C}$  für 20 Minuten zentrifugiert.

Vor der weiteren Aufarbeitung wurden die Probenröhrchen auf Eis zwischengelagert. Danach wurde der flüssige Überstand mittel 100 µl-Pipette in ein vorbereitetes und mit einer laufenden Nummer versehenes Eppendorf-Röhrchen überführt, sogleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Gefrierschrank bei -80°C bis zur Verwendung im Western-Blot aufbewahrt. Das Pellet aus Zelltrümmern wurde im Ursprungsgefäß belassen und verworfen.

### **2.5 Proteinbestimmung nach Bradford**

Um zu gewährleisten, dass stets gleiche Proteinmengen in den Analysen zum Einsatz kommen, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dazu wurde das standardisierte Verfahren nach Bradford verwendet (Bradford 1976). Hierfür wurden die tiefgefrorenen Proben aufgetaut und erneut mittels Vortex-Mischer verrührt. Danach folgte eine Lagerung auf Eis. Für die Proteinbestimmung wurde nun zuerst das Bradford Reagenz 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Im Anschluss wurde für die photometrische Bestimmung eine Standardverdünnungsreihe angesetzt. Dazu wurden sechs Eppendorf-Röhrchen folgendermaßen bestückt: 1) 20 µl Wasser + 0 µl bovine Serumalbumin-Lösung (0,5 µg/µl BSA). 2) 17,5 µl Wasser + 2,5 µl BSA. 3) 15 µl Wasser + 5 µl BSA. 4) 10 µl Wasser + 10 µl BSA. 5) 5 µl Wasser + 15 µl BSA. 6) 0 µl Wasser + 20 µl BSA.

Dies entspricht in etwa der Verteilungsbreite des zu erwartenden Proteingehalts der jeweiligen Proben. Die erstellten Proben wurden als Standardreihe für die nun folgende Proteinbestimmung am Photometer eingelesen und gespeichert. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Um nun den Proteingehalt der Gewebekulturen zu ermitteln, wurden jeweils 19 µl Wasser in Eppendorf-Röhrchen vorgelegt und 1µl Proteinprobe hinzu pipettiert. Wurde bereits während der Ernte der Kulturen wenig Material extrahiert, wurden 1,5-2 µl der Proteinlösung auf entsprechend 18,5 bzw. 18 µl Wasser pipettiert, um die Reliabilität der Messung zu erhalten. Das Ergebnis wurde dann durch den jeweiligen Faktor (1,5 oder 2) dividiert. Den 20 µl Probenvolumen wurden nun je 980 µl des fertigen Bradford-Reagenz hinzugegeben, so dass insgesamt jeweils exakt ein Milliliter Volumen gemessen werden konnte. Dabei galt es, das Gemisch zeitnah mittels Vortex-Mischer zu verrühren damit sich der Farbkomplex bilden konnte.

Im Anschluss an eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung - nach laufender Nummer geordnet - in den dafür vorgesehenen Küvetten. Das Ergebnis

wurde tabellarisch dokumentiert und den jeweiligen Kulturen zugeordnet. Im Verlauf der Laborarbeit wurde eine relativ große Verteilungsbreite des Proteingehalts ermittelt. Während die Probe mit dem höchsten Proteingehalt 7,88 µg/µl enthielt, waren es bei der dünnsten Probe lediglich 0,98 µg/µl.

### **2.6 SDS-Page**

Diese Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung verschiedener Proteine eines Proteingemisches. Durch Anlage eines elektrischen Stromes innerhalb einer geeigneten Elektrophorese-Einheit werden diese Proteine bezüglich der Größe bzw. ihrer Ladung aufgetrennt. Dafür wurden stets zwei verschiedene Glasplatten, nämlich eine einfache Glasplatte und eine mit seitlichen Platzhaltern („*Spacer*“), auf einer Gummiabdichtung platziert und in einen Gießstand für Gele eingespannt.

In den entstandenen Spalt wurde zunächst ein Gemisch pipettiert, welches nach Auspolymerisierung das Trenngel darstellt. Unmittelbar danach, noch vor der Auspolymerisierung, wurde Aqua dest. hinzu pipettiert. Aufgrund der geringeren Dichte des Aqua dest. schwimmt dieses oberhalb des Trenngel-Puffers und sorgt während des Aushärtens für eine glatte und gerade Begrenzung des Trenngels. Nach ca. 30 min Auspolymerisierung kann das Aqua dest. abgegossen werden und der Bereich für das Sammelgel nun vorsichtig mit einem Papiertuch getrocknet werden. Im Anschluss wird der Sammelgel-Puffer hinzu pipettiert. Das Verhältnis von Trenngel zu Sammelgel beträgt dabei 4:1. Direkt im Anschluss müssen die taschenbildenden Gelkämme blasenfrei in den noch flüssigen Sammelgel-Puffer eingebracht werden.

Im Anschluss daran musste auch das Sammelgel für 30-45 min auspolymerisieren. Nach diesem Arbeitsschritt konnten die fertigen Gele entweder in feuchte Tücher gewickelt, bei 4°C gekühlt und zu einem beliebigen Zeitpunkt bis zu 7 Tage nach Herstellung verwendet oder sofort für das Nassblot-Verfahren eingesetzt werden. Dazu wurde das Gel mit den Glasplatten unter permanenter Feuchthaltung in eine Elektrophorese-Kammer überführt. Für die verschiedenen Nachweise mussten unterschiedliche Proteinkonzentrationen eingesetzt werden. Für den Nachweis von TrkA und p75 reichten bereits 10 µg Protein aus, wohingegen bei TrkB und TrkC 25 µg Material nötig waren, damit der Protein-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden konnte. Den Proben wurde entsprechend Volumen und Konzentration noch Aqua dest. und jeweils 25 % des Gesamtvolumens Laemmli-Probenpuffer hinzugefügt, so dass ein Gesamtvolumen von

max. 25 µl (i.d.R. aber 15-20 µl) erreicht wurde, was in etwa der Kapazitätsgrenze der Geltaschen entsprach. Die Proteinlösungen wurden danach mittels 20 µl-Eppendorf-Pipette und langer Pipettenspitze unter größtmöglicher Präzision in die Geltaschen eingebracht.

Die zehn Taschen eines Gels wurden stets nach dem gleichen Schema befüllt:

**Laufweitenmarker--Ktr.--E2--DHT--Ktr.--E2--DHT--Ktr.--E2--DHT**

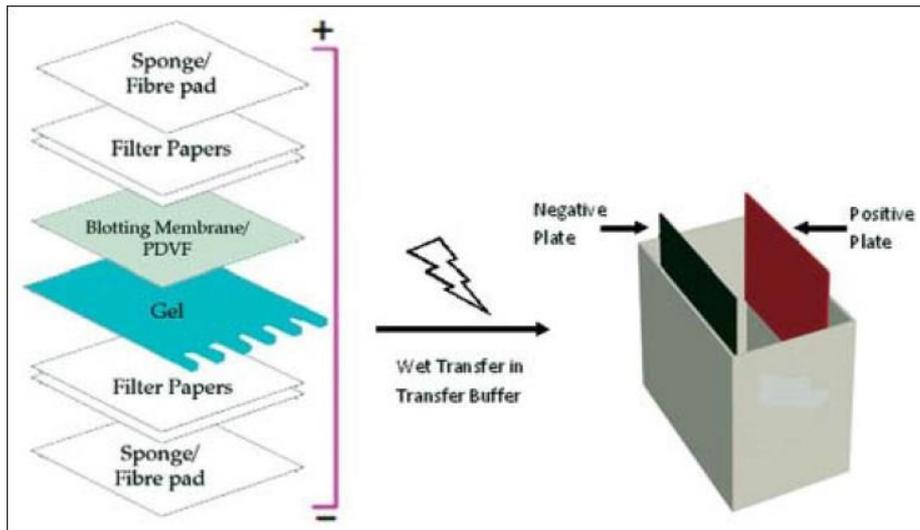
wobei eine Ktr.-E2-DHT Gruppe immer den Schwesterkulturen („Triple“) aus einem Tier (siehe 2.2) entsprach. Zunächst wurde der Transformator auf 100 W bei 150 mA eingestellt, bis die Proteinprobe vom Sammelgel ins Trenngel übergetreten war. Sobald dies geschehen war, wurde eine Leistung von 200 W angelegt. Unter regelmäßiger Sichtkontrolle wurde nun so lange aufgetrennt bis erste Teile der Proteinlösung unten aus dem Gel austraten. Dies konnte guten Gewissens so gehandhabt werden, da je nach Zielprotein die ungefähre Laufweite entsprechend bekannt war. Die Gesamtdauer für den Trennvorgang belief sich je nach Außentemperatur, Flüssigkeitstemperatur etc. auf ca. 45-60 min. Im Anschluss erfolgte die Trennung des Gels von den Glasplatten. Hierbei musste sehr behutsam vorgegangen werden, um das 0,5 mm dicke Gel nicht zu beschädigen. Es wurden zuerst die Geltaschen des Sammelgels mittels Skalpell vom Trenngel separiert und dann mit einem Kunststoffspachtel von der Glasplatte gekratzt.

## **2.7 Western Blot mittels Nassblotverfahren**

Nach der oben beschriebenen Prozedur wurde das Gel behutsam auf doppeltes Filterpapier in einer vorbereiteten Wanne mit vorgekühltem Nassblot-Puffer gelegt. Darunter befand sich ein Kunststoffschwamm. Ein vorgeschchnittenes Stück Nitrozellulosemembran von ca. 5 x 7,5 cm wurde nun formschlüssig auf das Gel platziert und mit zwei weiteren Stücken Filterpapier abgedeckt. Auch auf die Oberseite wurde nun ein weiterer Kunststoffschwamm gelegt. Mittels eines Reagenzröhrchens wurden durch walzenartige Bewegungen Luftblasen zwischen den verschiedenen Schichten des Versuchsaufbaus entfernt, damit die Proteinbanden später vollständig abgebildet werden konnten.

Direkt im Anschluss wurde der beschriebene Aufbau mittels Fixierkassette in die Nassblot-Zelle überführt. Dabei war wichtig, dass die korrekte Ausrichtung bzgl. des elektrischen Feldes beachtet wurde, so dass die Nitrozellulosemembran auf der Seite des Plus-Pols und

das SDS-Gel auf der Seite des Minus-Pols war (siehe Abbildung 4). Die Nassblot-Zelle wurde nun mit Nassblotpuffer und Kühlelementen befüllt und danach in eine mit Eis gefüllte Wanne platziert, um für die Gesamtdauer des Blot-Vorgangs eine ausreichende Kühlung der Apparatur zu gewährleisten. Die Nassblot-Zelle ist so konstruiert, dass zwei Fixierkassetten und somit zwei Proteingele gleichzeitig geblottet werden konnten, so dass die beschriebene Prozedur mit zwei Gelen durchgeführt wurde.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Nassblot-Verfahrens aus „Western Blot, Theory and Technique“ North American Journal of Medical Science (Mahmood und Yang 2012)

Bei 100 V und 150 mA wurden jeweils zwei Protein-Gele für die Dauer von 90 min dem elektrischen Feld ausgesetzt. Der automatische Transformator stoppte die Stromzufuhr nach Ablauf der vorher eingestellten Zeit, und im Anschluss erfolgte die Färbung der Membranen mit Panceau-Rot für 3 min und eine Waschung mit Aqua dest. Nach einer kurzen Trocknung auf Filterpapier wurden die Blotabschnitte und Markerbanden mittels Kugelschreiber beschriftet (Laufweite, kDa) und für die Inkubationswannen zurechtgeschnitten und hineingelegt. Die Blockierung der Blotabschnitte erfolgte, je nach Zielprotein, für die TrkA und p75 -Rezeptoren mit Milchpulver (MP), für TrkB und TrkC sowie für die Neurotrophine BDNF und NT-3 mit bovinem Serumalbumin (BSA) für jeweils 60 min. Nach Abgießen wurden die auf Eis vorbereiteten Antikörperlösungen mittels Glaspipette hinzu pipettiert und über Nacht bei 5°C inkubiert.

Die Konzentrationen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Primärantikörper	Konzentration	Blockierung
Rabbit-anti-TrkA	1:2500	MP
Mouse-anti-TrkB	1:100	BSA
Mouse-anti-TrkC	1:200	BSA
Rabbit-anti P75	1:1000	MP
Mouse-anti-GAPDH	1:10.000	MP
Rabbit-anti-BDNF	1:200	BSA
Rabbit-anti-NT3	1:500	BSA
Anti $\alpha$ -Tubulin	1:10.000	MP

**Tab. 1:** Lösungen der Primärantikörper und Trägersubstanzen

Am Folgetag wurden die Antikörper, die nicht gebunden hatten, durch 30-minütiges Waschen unter mehrfachem Tausch der PBS-T Waschsubstanz entfernt. Danach wurden die Blots für 60 min mit jeweils 3 ml einer spezie-spezifischen Sekundärantikörperlösung inkubiert. Die Sekundärantikörper waren mit Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish-peroxidase*, HRP) gekoppelt. (Carlsson et al. 2005). Die in BSA oder Milchpulver angesetzten Sekundärantikörperlösungen wurden stets mit einer Verdünnung von 1:2.500 aufgetragen. Entsprechend den zuvor verwendeten Primär-Antikörpern wurden an HRP gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-igG (Immunglobulin G) und Ziege-anti-Maus-IgG verwendet.

## **2.8 Entwicklung der Western Blots**

Für die Entwicklung der Blots wurden lichtsensible Chemielumineszenzen verwendet. Für die Rezeptoren TrkA und p75 waren andere Fabrikate nötig als für TrkB, TrkC und die Neurotrophine BDNF und NT-3. Diese durch HRP aktivierten Substanzen koppeln lichtsensibel an die über Antikörper markierten Proteinbanden und können in einer Dunkelkammerapparatur entwickelt werden. Jeder Blotabschnitt wurde mit jeweils 1 ml Lösung beträufelt und zwischen drei und fünf Minuten inkubiert, bevor er in eine Folie eingelegt und in die Entwicklungsapparatur eingebracht werden konnte.

Die Belichtungszeiten differierten je nach Zielprotein zwischen 15 Sekunden ( $\alpha$ -Tubulin) und 30 Minuten (TrkB, TrkC). Es wurden jeweils eine Positiv-Aufnahme und ein Negativ erstellt, um diese dann bildbearbeitungstechnisch übereinander zu legen und die Markerbanden am Blotrand gemeinsam mit den Proteinbanden in einem Bild darstellen zu können. Für die Auswertung mit dem Programm ImageJ wurden später nur die Negative verwendet.

## **2.9 Auswertung der Western Blots**

Die Auswertung der Western Blots erfolgte digital mit den Programmen ImageJ, MS Excel und GraphPad Prism. Die Bilddateien konnten direkt über ImageJ geladen und bearbeitet werden. Über die Bestimmung von Graustufenpixelwerten konnten die Proteinbanden quantifiziert werden. Für die Auswertung wurden stets nur Banden miteinander verglichen, die auf demselben Gel liefen. Die jeweiligen Werte für TrkA, TrkB und TrkC, p75 sowie BDNF und NT-3 wurden in einem Zahlenwert abgebildet und durch Division mit dem dazugehörigen GAPDH- (TrkA-C, p75) oder  $\alpha$ -Tubulin (BDNF, NT-3) Proteinstandard normalisiert. Die daraus resultierenden Zahlenwerte wurden in MS Excel tabellarisch abgebildet. Anschließend wurden aus jedem „Triple“ die Kontrollwerte als 100% normiert und die Werte der E2-bzw. DHT-behandelten Schwesterkulturen dazu ins Verhältnis gesetzt (Angabe als „% der Kontrolle“).

## **2.10 Statistische Auswertung**

Entsprechend der beiden Fragestellungen der Arbeit (siehe 1.7.) wurden zwei Arten der Auswertung durchgeführt:

- 1) Um Effekte von E2 oder DHT auf die Expression zu bestimmen, wurden die Messungen aus E2- bzw. DHT-behandelten Kulturen untereinander und mit den (als 100% gesetzt; siehe oben) Werten der Kontrollkulturen aus demselben Tier verglichen. Da es sich hierbei um prinzipiell gleichartige „Schwesterkulturen“ handelte (siehe 2.2, Abb. 1), wurde für die statistische Analyse der „Friedman-Test“ (Test für mehr als zwei „gepaarte“, nicht normalverteilte Daten) eingesetzt, gefolgt von „Dunn’s Multiple Comparison (Post-hoc)-Test“ für den Vergleich einzelner Gruppen.
  
- 2) Um eventuelle Geschlechtsunterschiede in der Reaktion auf die Behandlung zu ermitteln, wurden in einem 2. Auswertungsschritt die korrespondierenden Werte (jeweils normiert zu den Kontrollen) von „weiblichen“ und „männlichen“ Kulturen miteinander verglichen. Hier erfolgte die statistische Analyse mit dem „unpaired t-Test“ (bei normalverteilten Werten) bzw. dem Mann-Whitney-U-Test (bei nicht normalverteilten Werten).

Für die Darstellung wurden Balkendiagramme gewählt, die den Mittelwert und den Standardfehler (*standard error of the mean*) zeigen. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet und mit (\*) gekennzeichnet.  $p$ -Werte  $< 0,1$  wurden als „Trend“ ebenfalls im Diagramm vermerkt.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Ammoniumpersulfat	SIGMA
Biorad Protein Assay	BIORAD LABORATORIES GmbH
Bromphenolblau	MERCK
bovines Serumalbumin	SIGMA
DHT (Dihydrotestosteron)	SIGMA
ECL Western Blotting substrate	THERMO SCIENTIFIC
E2 (17 $\beta$ -Estradiol)	SIGMA
ETOH (95%)	UKE KLINIKAPOTHEKE
Glycerin	SIGMA
Magermilchpulver	HEIRLER
Methanol	J.T.BAKER
Stickstoff (N <sub>2</sub> )	UKE KLINIKAPOTHEKE
PBS-Tabletten	MERCK
Phostop	ROCHE
Ponceau-Rot	MERCK
Prestained Page Ruler (SDS-Gel-Marker)	FERMENTAS
Proteaseinhibitor	ROCHE
Rotiphoresegel 30%	ROTH
Sodium Dodecyl Sulfat	FLUKA
Sterilium	BODE
TEMED	SIGMA
Tris	ROTH
Tween	SIGMA

**Tab. 2:** Chemikalien

### 3.2 Apparative und technische Hilfsmittel

Gerät/Produkt	Hersteller
Accujet compact	BRAND
Analysenwaage	SARTORIUS
Biophotometer	EPPENDORF
Centrifuge	EPPENDORF
Electrophorese-Powersupply ECPS	PHARMACIE
Pipettenspitzen	EPPENDORF
Erlenmeyerkolben	SCHOTT
Filterpapier (dünn)	SCHLEICHER-SCHÜLL
Folienstift	FABER-CASTELL
Gefrierschrank (-20°C)	BOSCH, LIEBHERR
Gefrierschrank (-80°C)	KRYOTEC
Gel-Apparatur	BIORAD
Gel-Gießstand	BIORAD
Gel Kämme 0,75 mm	BIORAD
Glaspipette (5,10, 25 ml)	FALCON
HC High-Current Power Supply	BIORAD
Heidemannspatel	FST
Kugelschreiber	div. Hersteller
Kühlschrank (5°C)	BOSCH
Küvetten	VWR
Laborflaschen Duraglas (0,5-1,0-2,0 l)	SCHOTT
MACS-Mix-Tube-Rotator	MILTENYL BIOTECH GmbH
Magnetrührfisch	VWR
Magnetrührer	HEIDOLPH
Mikroliter-Pipetten 2, 20, 200, 1000 µl	EPPENDORF
Millicell-Kulturmembranen	MILLIPORE
Multiwell-Zellkulturplatten (Six-well)	BD-FALCON
Nitrocellulosemembran	MILLIPORE
Plastik-Pipetten, 10 ml	EPPENDORF

Pinzette, feine Spitze	FST
Pinzette, gebogen	FST
Mikro Homogenisator (Potter)	NOVODIRECT
pH-Meter	KNICK
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF
Sauger	MILLIPORE
Schere (groß, klein)	FST
Skalpell	BRAUN
Spatel	MILLIPORE
Spritzflasche	VWR
Sterile Werkbank	HERAEUS INSTRUMENTS
Tissue-Kosmetiktücher	WEPA
Tissue-Chopper	MCILWAIN
Untersuchungshandschuhe	HARTMANN
Wärmeschrank	MEMMERT

**Tab. 3: Apparative und technische Hilfsmittel**

### 3.3 Software

Programm	Hersteller
Windows 2000 professional	Microsoft Inc.
Windows 7	Microsoft Inc.
Windows 10	Microsoft Inc.
Excel 2010	Microsoft Inc.
Word 2010	Microsoft Inc.
EndNote	Thomson Reuters
Fusion	Vilber
ImageJ	Wayne Rasband
Graphpad Prism6	Graphpad Software inc.

**Tab. 4: Software**

### **3.4 Lösungen**

#### **E2-Stammlösung ( $10^{-7}$ M)**

2,71 mg  $17\beta$ -Estradiol in 1 ml Aqua dest. = Konzentration

Konzentration mit Aqua dest., steril, 1:100 verdünnen = Stammlösung ( $10^{-7}$ M)

1  $\mu$ l Stammlösung in 1 ml Inkubationsmedium ( $10^{-7}$  M)

#### **DHT-Stammlösung ( $10^{-7}$ M)**

290 mg in 10ml EtOH =  $10^{-1}$  M

weiter verdünnen auf  $10^{-4}$  M in 0,5% EtOH,

1 $\mu$ l Stammlösung in 1 ml Inkubationsmedium ( $10^{-7}$  M)

#### **Inkubationsmedium (pH 7,25)**

Für die Herstellung von 100 ml:

23 ml Aqua dest.

25 ml Hanks *balanced Salts*

25 ml *Minimum essential medium*, steril

1 ml Glutamin 200 mM, steril

1 ml Pferdeserum (*horse serum*), steril

580  $\mu$ l Natrium bicarbonate Lösung (7,5%), steril

Titration mittels NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l) auf pH 7,35

#### **PBS-Lösung**

500 ml Aqua dest.

1 PBS Tablette

Titration mittels NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l) auf pH 7,4

#### **RIPA-Puffer**

1,5 ml NaCl 150 mM

2,5 ml Tris (pH 7,5) 50 mM

5 ml NP 40 1%

500  $\mu$ l SDS 0,1%

2,5 ml Desoxycholat 0,5 %

## Material

---

5 ml EDTA (5 mM)

50 ml Aqua dest.

Vor Verwendung: Zugabe von Protease-Inhibitor 1:25 und für entspr. Aliquot: Zugabe Phosphatase-Inhibitor „Phos/Stop“ 1:10

### **Laemmli-Laufpuffer**

30 g Tris-Base

144 g Glycin

10 g SDS (10%)

Aqua dest. ad 1000 ml.

### **Laemmli-Probenpuffer**

1,54 g DTT 0,5 M

2 g SDS 10%

8 ml Tris-HCl pH 6,8 (0,4 M)

10 ml Glycerin

1 Spatelspitze BPB

### **Nassblotpuffer (Stammlösung)**

29 g Glycin

58 g Tris

37 ml 10% SDS

ad 800 ml

### **Zur Verwendung für den Western Blot (1 Liter)**

80 ml Stammlösung

720 ml Aqua dest.

200 ml MeOH

**Sammelgel (z.B. 10%)**

5,5 ml Aqua dest.  
1,7 ml Acrylamid (30%)  
2,5 ml Tris pH 6,8 (0,5 M)  
100 µl SDS 10%  
100 µl BPB  
100 µl APS  
10 µl TEMED

**Trenngel (z.B. 10%)**

8 ml Aqua dest.  
6,6 ml Acrylamid (30%)  
5 ml Tris pH 8,8 (1,5 M)  
200 µl SDS 10%  
200 µl APS 10%  
8 µl TEMED

**PBS-Tween (0,3%)**

100 ml PBS 10%  
30 ml Tween-20 10%  
Aqua dest. ad 1000 ml

**Bovines Serumalbumin (BSA) 5% (in PBS-Tween)**

0,02% Thimerosal auf 10 g BSA (Granulat):  
400 µl Thimerosal 10% auf 200 ml BSA

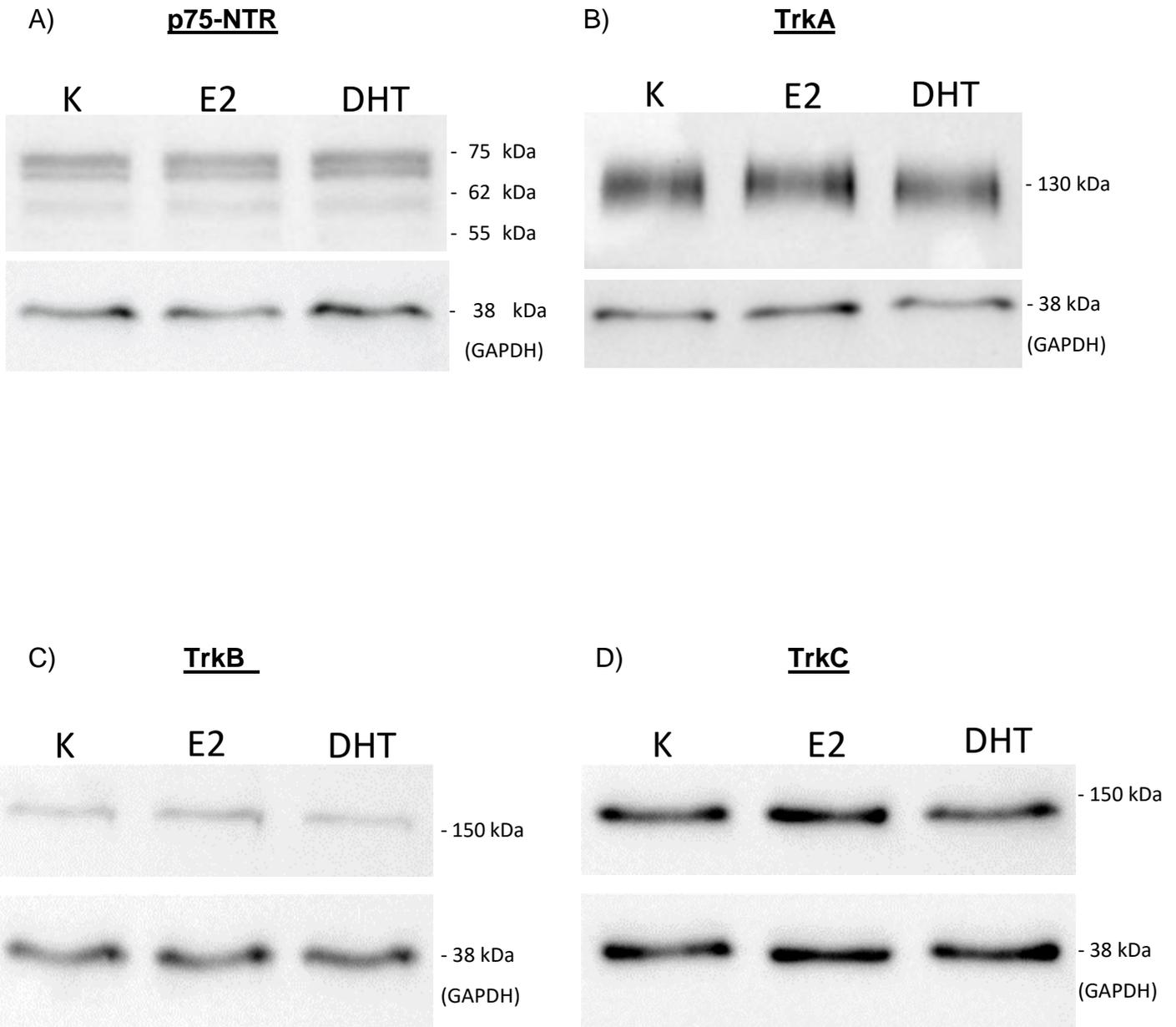
**Magermilchpulver 5% in PBS-Tween**

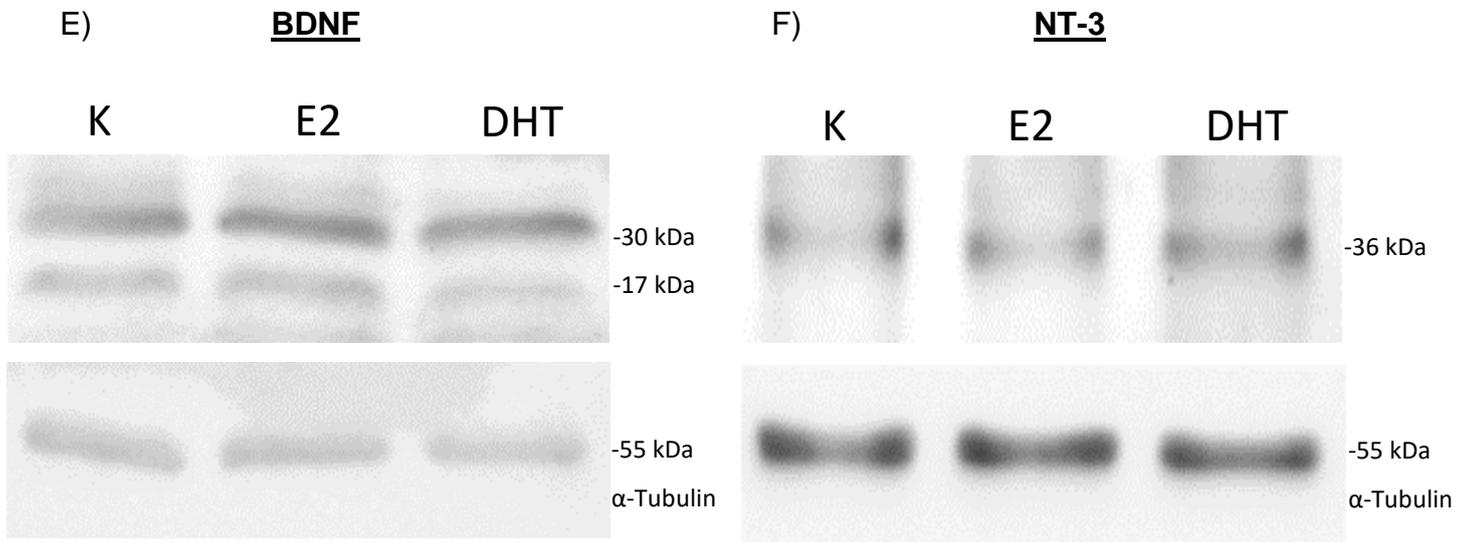
2 g Magermilchpulver  
38 ml PBS-Tween

## 4 Ergebnisse

Um die beiden Fragestellungen dieser Arbeit zu adressieren (siehe 1.7), wurden Western Blot-Analysen mit Proteinlysate aus hippocampalen Gewebekulturen durchgeführt, die über den Zeitraum von 7 Tagen entweder mit E2 ( $10^{-7}$ M) oder DHT ( $10^{-7}$ M) behandelt wurden. In den Western Blots wurden die Expressionsniveaus der Neurotrophine BDNF und NT-3 sowie der Neurotrophin-Rezeptoren TrkA-C und p75-NTR mit Hilfe von Antikörpern bestimmt und durch Vergleich der Bandenintensitäten der behandelten Kulturen mit denen der unbehandelten Kontrollkulturen die Auswirkungen von E2 bzw. DHT auf die Expression ermittelt. Die Ergebnisse werden nachfolgend für jeden einzelnen Faktor graphisch dargestellt und mit den relevanten statistischen Daten versehen. Eine Bewertung der Ergebnisse erfolgt im Anschluss daran (Abschnitt 4.4). Die Abbildungen 6-11 illustrieren die Wirkungen von E2 bzw. DHT auf die Expression, nach Geschlechtern getrennt (Fragestellung 1), während in den Abbildungen 12-17 Vergleiche zwischen den Geschlechtern dargestellt sind (Fragestellung 2). Abbildung 5 zeigt für jedes untersuchte Protein die Resultate eines exemplarischen Western Blots.

#### 4.1 Repräsentative Western Blots





**Abb. 5:** Exemplarische Darstellung der Ergebnisse von Western Blots zum Nachweis von p75 (A), TrkA (B), TrkB (C), TrkC (D), BDNF (E), NT-3 (F). Beachte: A) p75-NTR zeigt charakteristischerweise zwei Banden auf Höhe von 75 und ca. 70 kDa, wobei es sich bei der 75 kDa-Bande um das vollständige Protein handelt und bei der kleineren Bande um eine verkürzte („truncated“) Version des Rezeptors, die funktionslos ist (Chao 1994), nur die vollständige Form wurde bei der Auswertung berücksichtigt. B-D: Die Banden der Trk-Rezeptoren sind typischerweise in Höhe von 130 kDa. sichtbar. E) Der BDNF-Nachweis ergab meist zwei Banden in Höhe von ca. 34 kDa und 15 kDa. Bei der Bande auf Höhe von 34 kDa handelt es sich um das Vorläuferprotein pro-BDNF, bei der Bande auf Höhe von ca. 15 kDa um das mature BDNF (mBDNF). Wenn vorhanden, wurden beide Banden in die Auswertung einbezogen (bei einer stichprobenartig durchgeführten, separaten Quantifizierung von pro-BDNF und mBDNF zeigten sich keine signifikanten Unterschiede). F) Beim NT-3-Nachweis wurde nur eine klare Bande auf Höhe von ca. 35 kDa sichtbar, was dem Molekulargewicht von pro-NT-3 entspricht. Als Ladekontrollen wurden GAPDH (A-D) oder  $\alpha$ -Tubulin (E,F) eingesetzt. Abkürzungen: K=Kontrolle, E2=Estradiol, DHT=Dihydrotestosteron, w=weiblich, m=männlich.

## 4.2 Auswertung der E2- und DHT-Behandlung

### p75-NTR

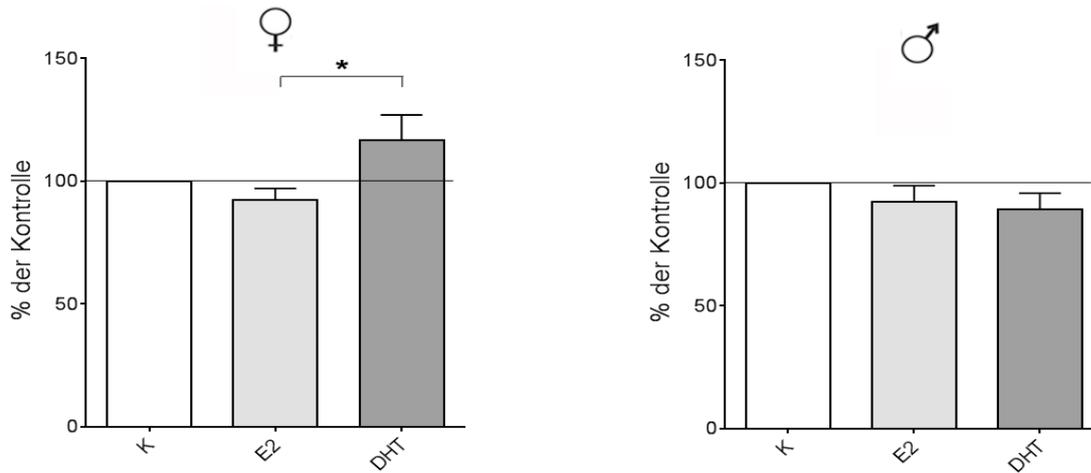


Abb.6 p75-NTR	K	E2w	DHTw	E2m	DHTm
Mittelwert	100	92,5	116,8	92,4	89,4
Standardabweichung	-	17,9	39,9	25,7	25,0
Standardfehler	-	4,6	10,3	6,4	6,5
N	15	15	15	15	15

Friedman-Test (w):  $p=0,038$ ; Friedman-Statistic: 6,533; Post-hoc: E2 vs. DHT\*:  $p=0,016$   
 Friedman-Test (m):  $p=0,424$ ; Friedman-Statistic: 1,733; Post-hoc: keine Signifikanz

### TrkA

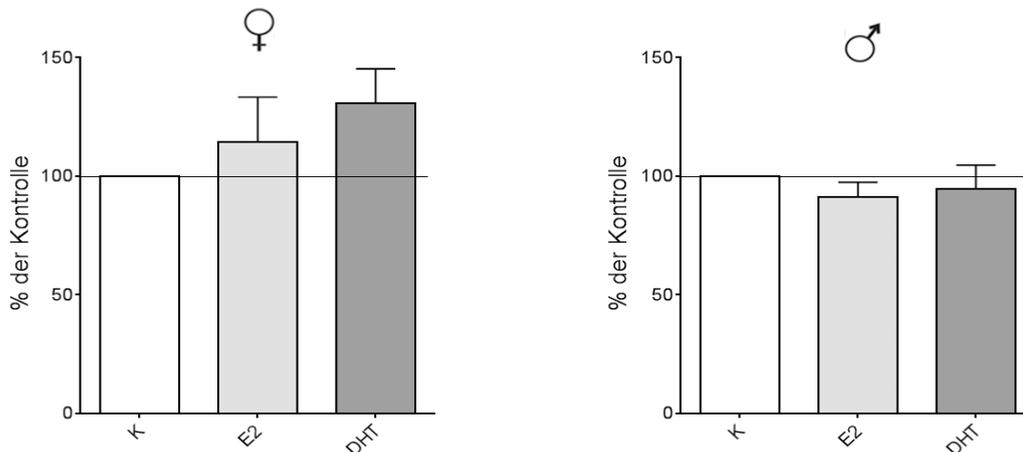


Abb. 7 TrkA	K	E2w	DHTw	E2m	DHTm
Mittelwert	100	114,4	130,4	91,2	94,7
Standardabweichung	-	78,3	60,6	26,5	42,3
Standardfehler	-	18,9	14,7	6,3	9,9
N	17/18	17	17	18	18

Friedman-Test (w):  $p=0,291$ ; Friedman-Statistic: 2,471; Post-hoc: keine Signifikanz  
 Friedman-Test (m):  $p=0,311$ ; Friedman-Statistic: 2,333; Post-hoc: keine Signifikanz

**TrkB**

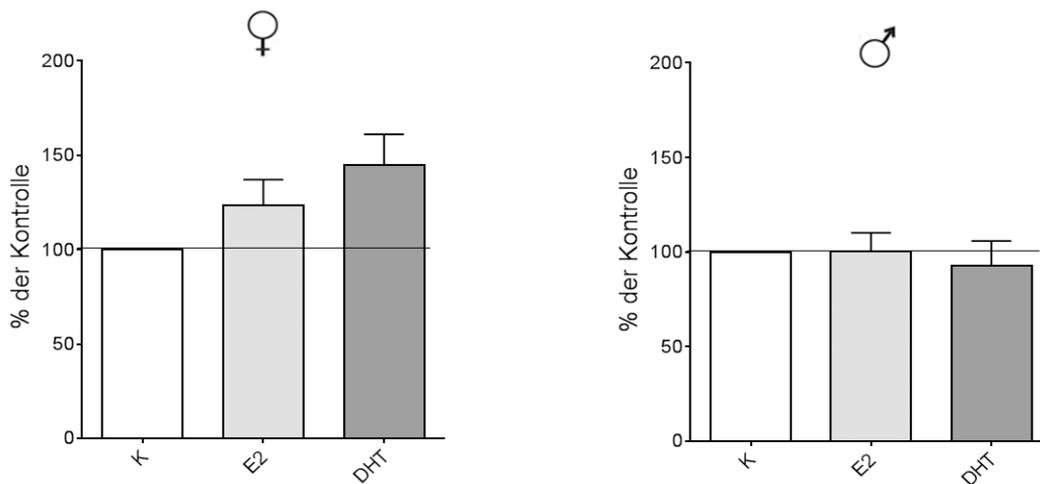


Abb. 8 TrkB	K	E2w	DHTw	E2m	DHTm
Mittelwert	100	123,6	145,1	100,5	92,8
Standardabweichung	-	54,3	64,2	40,1	53,8
Standardfehler	-	13,9	16,0	9,7	13,1
n	16/17	16	16	17	17

Friedman-Test (w):  $p=0,099$ ; Friedman-Statistic: 4,625; Post-hoc: keine Signifikanz  
 Friedman-Test (m):  $p=0,327$ ; Friedman-Statistic: 2,235; Post-hoc: keine Signifikanz

**TrkC**

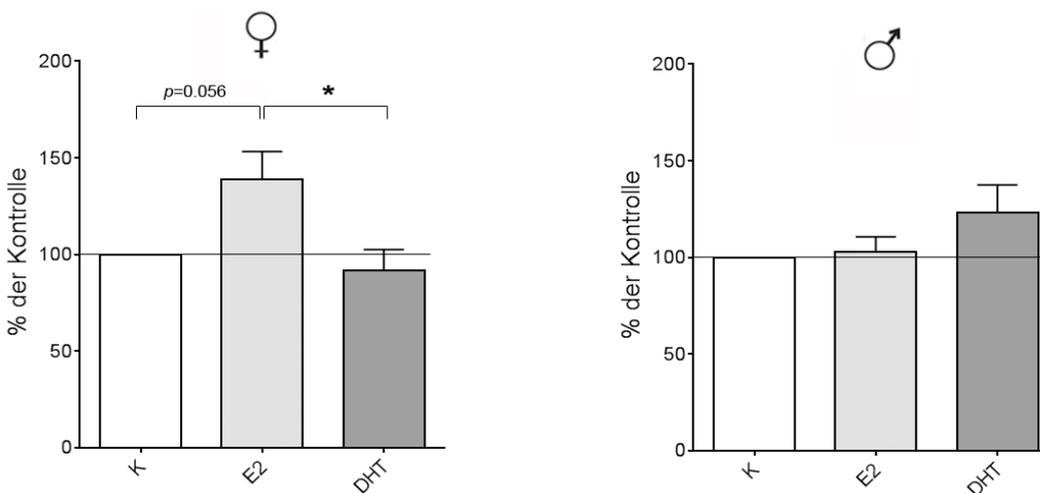


Abb. 9 TrkC	K	E2w	DHTw	E2m	DHTm
Mittelwert	100	139,1	91,7	102,7	123,3
Standardabweichung	-	54,8	42,5	32,2	57,1
Standardfehler	-	14,2	10,9	8,1	14,3
n	15/16	15	15	16	16

Friedman-Test (w):  $p=0,022$ ; Friedman-Statistic: 7,600; Post-hoc: E2 vs. DHT\*:  $p=0,012$   
 Friedman-Test (m):  $p=0,570$ ; Friedman-Statistic: 1,125; Post-hoc: keine Signifikanz

**BDNF**

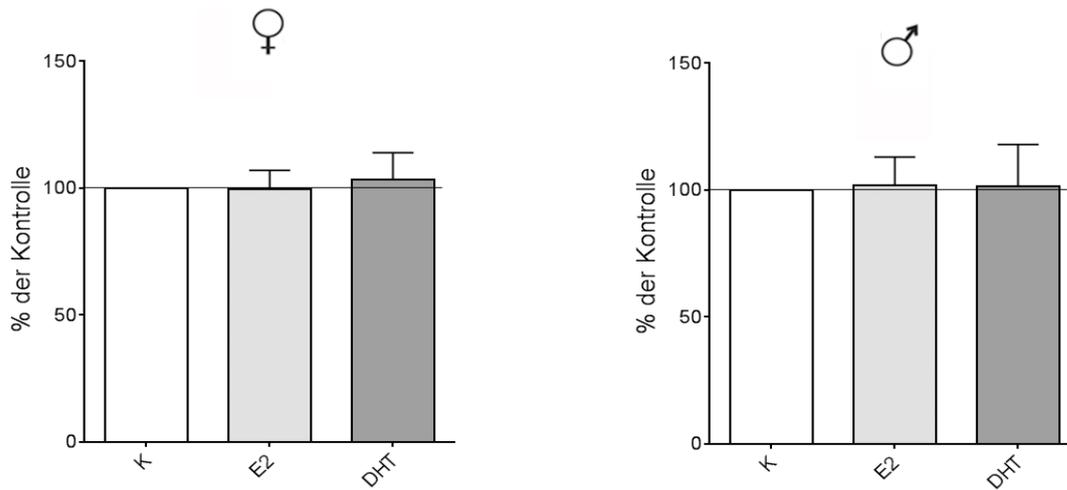


Abb. 10 BDNF	K	E2w	DHTw	E2m	DHTm
Mittelwert	100	99,5	103,3	102,1	101,4
Standardabweichung	-	29,5	41,3	44,3	66,5
Standardfehler	-	7,6	10,7	11,1	16,6
N	15/16	15	15	16	16

Friedman-Test (w):  $p=0,766$ ; Friedman-Statistic: 5,333; Post-hoc: keine Signifikanz  
 Friedman-Test (m):  $p=0,779$ ; Friedman-Statistic: 5,000; Post-hoc: keine Signifikanz

**NT-3**

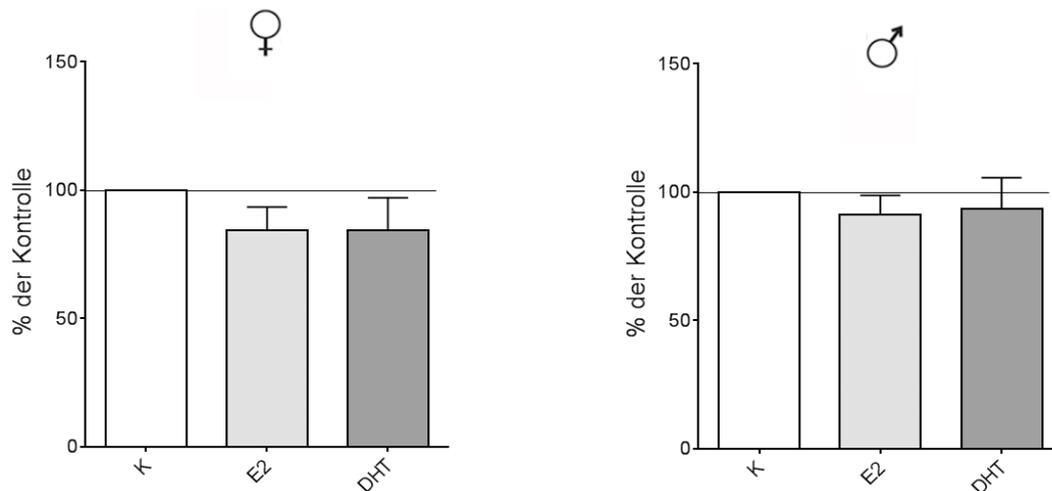


Abb. 11 NT-3	K	E2w	DHTw	E2m	DHTm
Mittelwert	100	84,4	84,3	91,4	93,6
Standardabweichung	-	35,1	49,4	29,7	48,2
Standardfehler	-	9,1	12,8	7,4	12,1
N	15/16	15	15	16	16

Friedman-Test (w):  $p=0,038$ ; Friedman-Statistic: 6,533; Post-hoc: keine Signifikanz  
 Friedman-Test (m):  $p=0,039$ ; Friedman-Statistic: 6,500; Post-hoc: keine Signifikanz

**4.3 Vergleich männlicher und weiblicher Gewebekulturen**  
**p75-NTR**

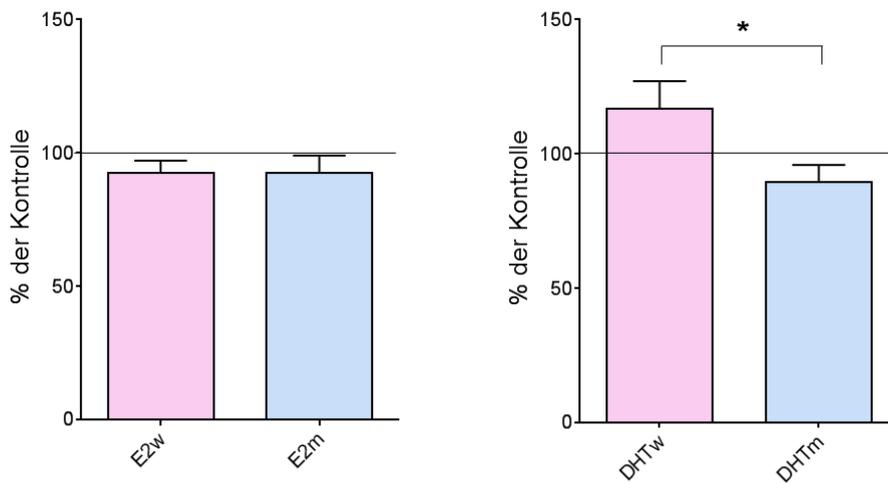


Abb. 12 p75-NTR	E2w	E2m	DHTw	DHTm
Mittelwert	92,5	92,4	116,8	89,4
Standardabweichung	17,9	25,7	39,9,1	25,0
Standardfehler	4,6	6,4	10,3	6,5
n	15	15	15	15

unpaired t-Test (E2):  $p=0,99$  unpaired t-Test (DHT):  $p=0,03^*$

**TrkA**

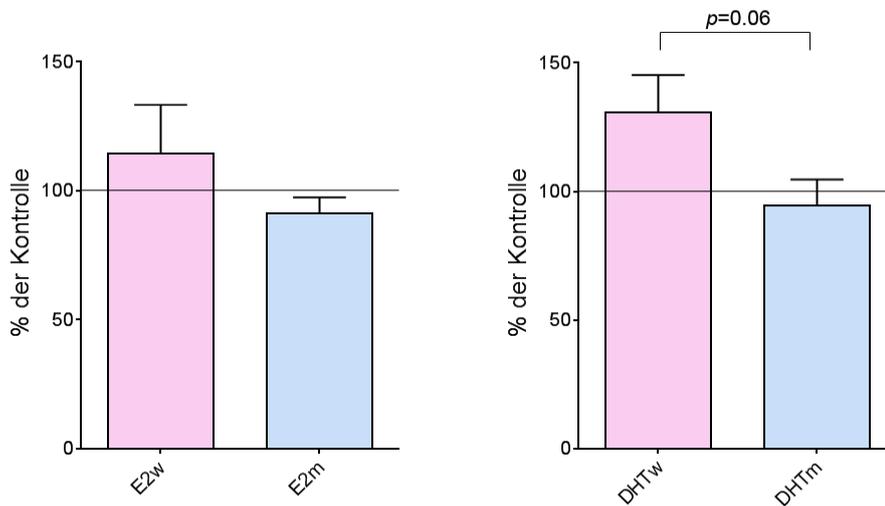


Abb. 13 TrkA	E2w	E2m	DHTw	DHTm
Mittelwert	114,4	91,2	130,4	94,7
Standardabweichung	78,3	26,5	60,6	42,3
Standardfehler	18,9	6,3	14,7	9,9
n	17	18	17	18

Mann-Whitney-U-Test (E2):  $p=0,42$  Mann-Whitney-U-Test (DHT):  $p=0,06$

**TrkB**

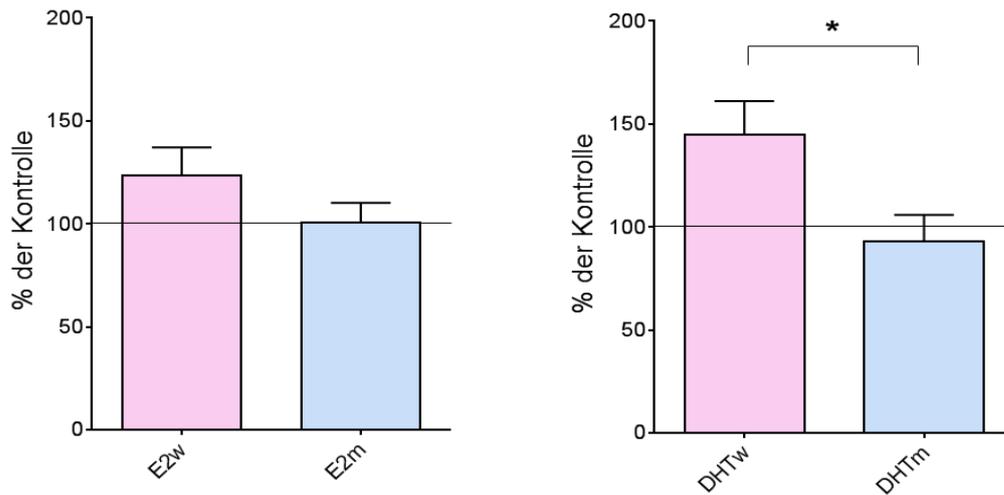


Abb. 14 TrkB	E2w	E2m	DHTw	DHTm
Mittelwert	123,6	100,5	145,1	92,8
Standardabweichung	54,3	40,1	64,2	53,8
Standardfehler	13,9	9,7	16,0	13,1
N	16	17	16	17

unpaired t-Test (E2):  $p=0,17$  unpaired t-Test (DHT):  $p=0,02^*$

**TrkC**

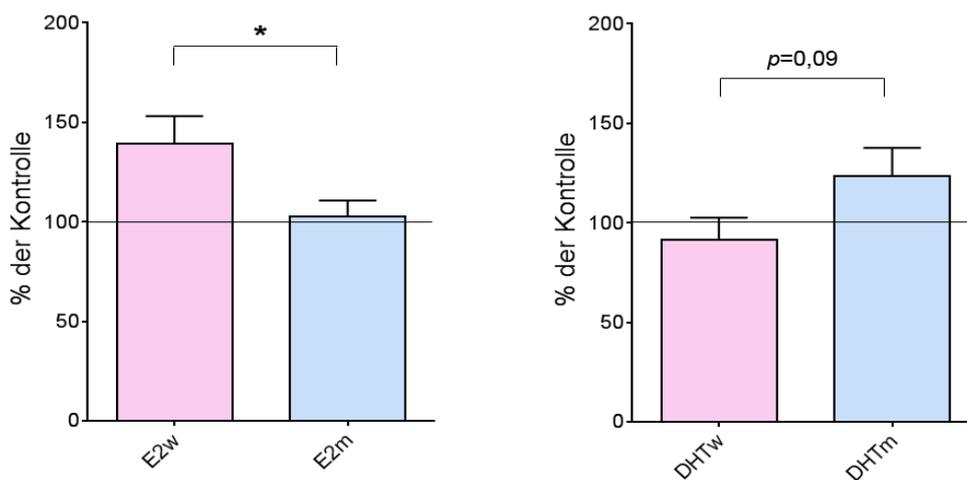


Abb.15 TrkC	E2w	E2m	DHTw	DHTm
Mittelwert	139,1	102,7	91,7	123,3
Standardabweichung	54,8	32,2	42,5	57,1
Standardfehler	14,2	8,1	10,9	14,3
N	15	16	15	16

unpaired t-Test (E2):  $p=0,03^*$  unpaired t-Test (DHT):  $p=0,09$

**BDNF**

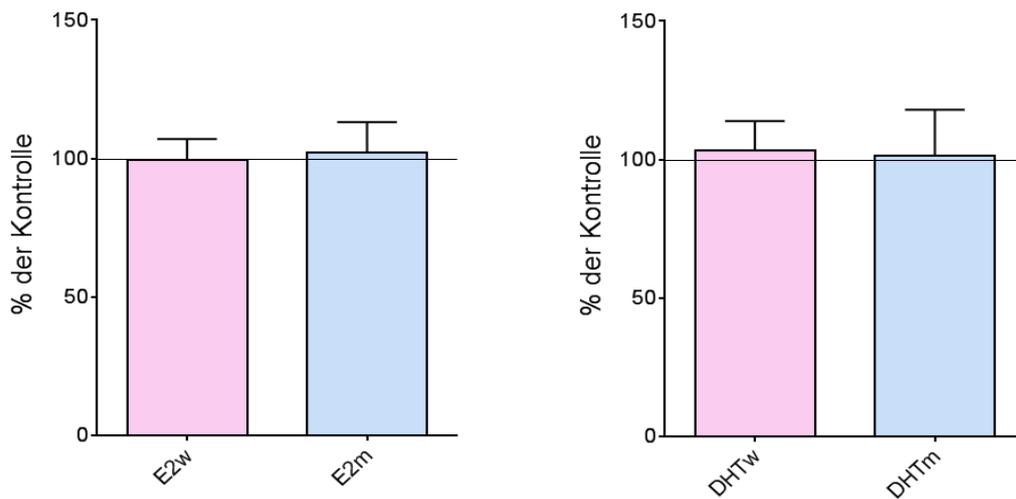


Abb. 16 BDNF	E2w	E2m	DHTw	DHTm
Mittelwert	99,5	102,1	103,3	101,4
Standardabweichung	29,5	44,3	41,3	66,5
Standardfehler	7,6	11,1	10,7	16,6
n	15	16	15	16

Mann-Whitney-U-Test (E2):  $p=0,91$     Mann-Whitney-U-Test (DHT):  $p=0,47$

**NT-3**

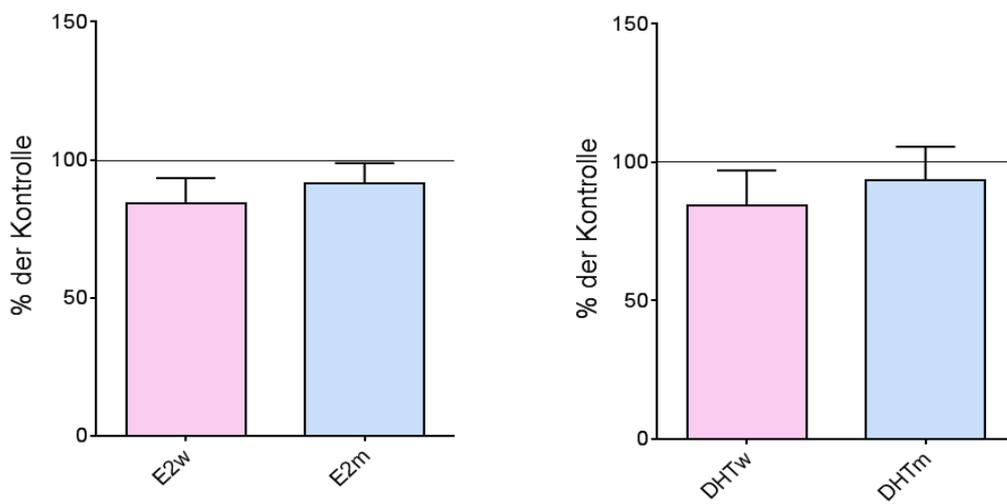


Abb. 17 NT-3	E2w	E2m	DHTw	DHTm
Mittelwert	84,4	91,4	84,3	93,6
Standardabweichung	35,1	29,7	49,4	48,2
Standardfehler	9,1	7,4	12,8	12,1
n	15	16	15	16

Mann-Whitney-U-Test (E2):  $p=0,49$     Mann-Whitney-U-Test (DHT):  $p=0,24$

#### **4.4 Bewertung der Ergebnisse**

*Fragestellung 1: Bewirken die Sexualhormone E2 bzw. DHT im Hippocampus eine Expressionsänderung von Neurotrophinen oder Neurotrophin-Rezeptoren?*

Die Auswertung des Vergleichs „E2 vs. DHT vs. Kontrolle“ (Abb. 6-11) ergab nur in wenigen Fällen deutliche Hinweise auf eine Wirkung der Hormone. So war die p75-NTR-Expression nach DHT-Gabe signifikant erhöht, aber nur im Vergleich zur Expression in E2-behandelten Kulturen und nicht im direkten Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 6). In ähnlicher Weise war die TrkC-Expression nach E2-Gabe signifikant gegenüber DHT-behandelten Kulturen erhöht, erreichte im Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht ganz das Signifikanzniveau (Abb. 9). Auch für TrkA und TrkB wurden tendenziell erhöhte Expressionswerte (insbesondere nach DHT-Gabe) gemessen (Abb. 7 und 8), die jedoch ebenfalls das Signifikanzniveau nicht erreichten. Dies könnte an der Stringenz des gewählten Friedman-Testes liegen (siehe dazu: Diskussion, Abschnitt: 5.1) Interessanterweise wurden alle tendenziellen Veränderungen nur in Kulturen von weiblichen Ratten beobachtet. In Kulturen der männlichen Ratten traten nach E2 bzw. DHT keine auffälligen Abweichungen der Expressionswerte von den Kontrollen auf. Bei den Neurotrophinen BDNF und NT-3 wurden weder bei den weiblichen, noch bei den männlichen Kulturen Auswirkungen der Hormonbehandlung beobachtet.

*Fragestellung 2: Erfolgen Expressionsänderungen geschlechtsspezifisch?*

Um diese Frage zu beantworten, wurden die relativen Expressionswerte nach E2- bzw. DHT-Behandlung (normiert auf die Kontrollen) von weiblichen und männlichen Kulturen direkt miteinander verglichen. Hier zeigten sich mit Hilfe des unpaired t-Tests (bei normalverteilten Werten) bzw. des Mann-Whitney-U-Tests (bei nicht normalverteilten Werten) deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede. So war die Expression von p75-NTR (Abb. 12) und TrkB (Abb. 14) nach DHT-Gabe in weiblichen Kulturen signifikant stärker erhöht als in den männlichen Kulturen (mit deutlichem Trend auch bei TrkA, Abb. 13). Vergleichbar dazu sprach die Expression von TrkC (Abb. 15) in weiblichen Kulturen auf E2 signifikant stärker an als in männlichen Kulturen. Diese Befunde bekräftigen den Eindruck aus dem „E2 vs. DHT vs. Kontrolle“-Vergleich (siehe oben), dass das hippocampale

Gewebe von weiblichen Ratten (zumindest im gewählten Entwicklungszeitraum) Sexualhormon-responsiver ist, als das von männlichen.

## **5 Diskussion**

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Expression von Neurotrophinen (BDNF, NT-3) und Neurotrophin-Rezeptoren (TrkA, TrkB, TrkC, p75-NTR) durch die Sexualhormone E2 und DHT im Hippocampus untersucht, wobei ein spezielles Augenmerk auf mögliche Geschlechtsunterschiede gelegt wurde. Die Motivation zu dieser Untersuchung lieferten Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Regulation von Neurotrophinen bzw. ihrer Rezeptoren im klinischen Kontext (z. B. Schädel-Hirn-Trauma, Multiple Sklerose, Epilepsie; Reddy 2004; Scharfman und MacLusky 2006b), die durch die unterschiedliche Exposition der Geschlechter zu Sexualhormonen erklärt werden könnte. Tatsächlich erbrachte die vorliegende Untersuchung Hinweise darauf, dass Neurone des Hippocampus auf Sexualhormone geschlechtsspezifisch reagieren. So waren signifikante Expressionsänderungen der Neurotrophin-Rezeptoren nach Sexualhormon-Exposition zu beobachten, jedoch stets nur in weiblichen Gewebekulturen. Das männliche Gewebe war nicht responsiv. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse der Studie zu drei Hauptbefunden zusammenfassen:

- 1) Die Expression der Neurotrophin-Rezeptoren war durch Sexualhormone nur in weiblichem Hippocampusgewebe beeinflussbar.
- 2) Die Expression der Rezeptoren war im weiblichen Gewebe hormonselektiv: p75 (und tendenziell auch TrkA und TrkB) reagierte auf DHT, TrkC auf E2.
- 3) Die Expression der Neurotrophine BDNF und NT-3 wurde von E2 bzw. DHT weder im weiblichen, noch im männlichen Hippocampusgewebe beeinflusst.

Diese Befunde sollen nachfolgend diskutiert werden.

### **5.1 Methodische Beschränkungen der Studie**

Für die vorliegende Studie wurde das *in vitro*-Modell der organotypischen Gewebekultur gewählt, da es eine gute experimentelle Zugänglichkeit mit dem Erhalt des neuronalen Netzwerkes im Hippocampus verbindet (Frotscher und Heimrich 1993; Stoppini et al. 1993). Letzteres ist wichtig, da die neuronale Konnektivität selbst ein wichtiger Regulator der hippocampalen Neurotrophin-Expression ist (Baudry et al. 2013). Die Wirkung der Sexualhormone konnte in diesem Modell somit durch die einfache, kontrollierte Zugabe definierter Mengen von E2 und DHT in das Kulturmedium untersucht werden. Allerdings hat das Modell auch Nachteile: So ist das Anlegen von hippocampalen Gewebekulturen nur mit nicht vollständig differenziertem Gewebe möglich (ca. 1. und 2. postnatale Woche bei der Ratte). Dies bedeutet, dass die Aussagekraft der Ergebnisse streng genommen auf dieses Entwicklungsstadium begrenzt ist. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt zu berücksichtigen, dass Erkrankungen mit geschlechtsspezifischer Ausprägung (ausgenommen das Schädel-Hirn-Trauma) eher mit fortgeschrittenem Alter auftreten. Zwar kann angenommen werden, dass Mechanismen der Neurotrophin-Regulation, die während der Entwicklung von Bedeutung sind, auch im späteren Leben eine Rolle spielen. Jedoch kann auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass entwicklungsbedingte Faktoren, wie ein unterschiedlicher Expressionsbeginn von Östrogen- oder Androgenrezeptoren oder Unterschiede in der endogenen Östrogenproduktion (Nunez und McCarthy 2009), für die in der vorliegenden Studie beobachteten Geschlechtsunterschiede verantwortlich sind. Um darüber Klarheit zu erhalten, müssten weitere Experimente an älterem Gewebe durchgeführt werden, was allerdings nur im Tierversuch möglich ist. Hinweise ergibt jedoch eine jüngst durchgeführte Studie im klinischen Kontext (Golz et al. 2019), die nachfolgend diskutiert wird (siehe Abschnitt 5.3).

Weiterhin hing der Erfolg der Studie sehr von der Qualität der verwendeten Antikörper ab, die gelegentlich mehr als eine Bande im Western Blot zeigten. Auf Grund der bekannten Molekülgrößen der Trk-Rezeptoren (ca. 130 kDa), des p75-NTR (75 kDa) sowie der Neurotrophine (unprozessierte Vorläuferproteine bei ca. 35 kDa) konnten die Banden meist verlässlich den nachzuweisenden Proteinen zugeordnet werden. War dies nicht der Fall, so wurde auf eine Auswertung verzichtet. Auch markante Doppelbanden, wie im Falle von p75 oder BDNF (siehe: Abschnitt 4.1) konnten auf Grund der bekannten Molekülgrößen

des *truncated* p75-Rezeptors (Chao 1994) bzw. des prozessierten BDNF (Dieni et al. 2012) verlässlich zugeordnet werden. Dennoch waren substantielle Werte-Schwankungen zwischen den Experimenten nicht zu vermeiden. Um den Einfluss der Variabilität auf die Interpretation der Ergebnisse weit möglichst zu reduzieren, wurden daher verschiedene Maßnahmen durchgeführt:

1) Die Anzahl der für eine sinnvolle Auswertung erforderlichen Einzelmesswerte (n) wurde bei mindestens 15 pro experimenteller Gruppe angesetzt („n=1“ entspricht dabei den gesammelten Gewebekulturen pro experimenteller Gruppe von einem Tier). 2) Es wurden stets nur Kulturen vom selben Tier in den experimentellen Gruppen (Kontrolle, E2, DHT) miteinander verglichen. 3) Die Gewebeschnitte aus den verschiedenen Regionen des Hippocampus wurden gleichmäßig auf die experimentellen Gruppen verteilt („Schwesterkulturen“; siehe Abschnitt 2.2: Abb. 3). Die Kontrollgruppe konnte dadurch als Normgruppe für E2- bzw. DHT-Effekte dienen. 4) Die Proteinlysate aus den experimentellen Gruppen von einem Tier wurden stets im selben Gel analysiert. 5) Bei der statistischen Analyse wurde der konservative Friedman-Test (Vergleich von >2 gepaarten Gruppen nicht normalverteilter Werte) einer Einzel-Testung der hormonbehandelten Gruppen jeweils gegen die Kontrolle (durch den Wilcoxon-signed-rank-Test: Vergleich von 2 gepaarten Gruppen nicht normalverteilter Werte) vorgezogen. Dadurch wird die Wirkung der Behandlung möglicherweise an manchen Stellen unterschätzt (z. B. bei TrkB: DHT vs. K,  $p=0,02$ , nach Wilcoxon-signed-rank-Test). Angesichts dieser Maßnahmen können die beobachteten Effekte jedoch als einigermaßen robust angesehen werden.

### **5.2 Wirkungen von Sexualhormonen auf Neurotrophine**

Bisherige Untersuchungen zur Interaktion zwischen Sexualhormonen und Neurotrophinen im Hippocampus konzentrierten sich auf BDNF und E2. Erste Hinweise auf einen Zusammenhang erbrachten Beobachtungen, wonach während der reproduktiven Alterung und einem unregelmäßigen Zyklus (oder Azyklizität) mit sinkenden E2 Spiegeln auch sinkende Konzentrationen von reifem BDNF und TrkB im Hippocampus nachweisbar sind (Chakraborty und Gore 2004; Huang und Meites 1975; Lu et al. 1979). Experimentell fanden Murphy et al. (1998) an dissoziierten Neuronenkulturen des fetalen Hippocampus nach 24- und 48-stündiger E2-Behandlung eine Reduktion der BDNF-Expression. Im Gegensatz dazu fanden Aguirre und Baudry (2009) in postnatalen Gewebekulturen des Hippocampus nach E2-Gabe eine Steigerung der BDNF-Expression.

Interessanterweise widersprechen die Befunde der vorliegenden Studie – ebenso wie die einer Vorläufer-Studie mit gemischt-geschlechtlichen Kulturen (Nottebohm, 2012) – beiden experimentellen Ergebnissen, da weder für E2 noch für DHT ein Effekt auf die BDNF-Expression nachweisbar war. Dies ist angesichts der Tatsache, dass das BDNF-Gen über eine ERE-Sequenz verfügt (Sohrabji et al. 1995), sowie Berichten zufolge, dass E2-Gabe die hippocampale BDNF-Expression im Hippocampus ovariectomierter Ratten rekonstituiert (Solum und Handa 2002), überraschend. Eine Erklärung könnte der sogenannte „*Ceiling*-Effekt“ bieten, der besagt, dass, wenn bereits eine ausreichende Menge E2 im Gewebe vorliegt (durch die Aktivität der endogenen Aromatase; Kretz et al., 2004), eine weitere Zugabe von E2 keine zusätzliche Wirkung mehr hervorruft. Sollte dieser Effekt in den vorliegenden Experimenten eine Rolle spielen, würde dadurch jedoch nicht die Regulation der TrkC-Rezeptoren beeinflusst, da hier Auswirkungen einer E2-Gabe zu beobachten waren. Eine Klärung der Frage könnten Experimente liefern, in denen der Aromatase-Inhibitor Letrozol und E2 kombiniert gegeben werden. Tatsächlich liefern Ergebnisse aus der Arbeit von Nottebohm (2012) Hinweise auf die Existenz eines „*Ceiling*“-Effektes hinsichtlich der BDNF-Expression. In der vorliegenden Arbeit wurden derartige Experimente jedoch nicht durchgeführt, da hier der Fokus auf dem Geschlechtervergleich lag.

Weiterhin legen experimentelle Befunde eine Regulation von TrkA- (Gibbs 1998; Miranda et al. 1996) und TrkB-Rezeptoren (Carrer und Cambiasso 2002; Spencer et al. 2008; Spencer-Segal et al. 2012) durch E2 nahe, wofür in der vorliegenden Studie keine unterstützenden Belege gefunden wurden. Hingegen war der TrkC-Rezeptor in weiblichen Kulturen nach E2-Gabe signifikant erhöht (Abb. 9). Für diesen Rezeptor liegen in der Literatur keine experimentellen Befunde vor. Jedoch zeigten Untersuchungen an Mammakarzinom-Tumorzellen eine erhöhte Expression sowohl von NT-3 als auch von TrkC (Blasco-Gutierrez et al. 2007), was ein Hinweis auf Östrogen-Responsivität sein könnte.

Auch hinsichtlich des Einflusses von Androgenen auf die Neurotrophin- und Neurotrophinrezeptor-Expression sind experimentelle Belege bislang selten. Hinweise auf einen Einfluss auf die BDNF- und TrkB-Expression liefern Befunde aus dem frontalen Cortex von Ratten, die orchidektomiert wurden (Purves-Tyson et al. 2015). Weiterhin konnten Bronzetti und Kollegen (2008) in Tumorzellen des Prostatakarzinoms und in hyperplastischem Prostatagewebe erhöhte Werte für BDNF und seinen Rezeptor TrkB

nachweisen, was wie im Fall des Mammakarzinoms und TrkC/NT-3 (siehe oben) auf einen Einfluss von Androgenen hinweist. Es liegen jedoch keine detaillierten *in vitro*-Untersuchungen über die Wirkungen von Androgenen auf die Neurotrophin-Expression vor. Auch wurden in bisherigen Untersuchungen zu Sexualhormon-Einflüssen keine Geschlechtervergleiche vorgenommen (Ausnahme: Gölz et al., 2019; siehe unten). Hier beschreibt die vorliegende Untersuchung Neuland. Der Befund einer erhöhten p75-NTR-Expression nach DHT-Gabe in weiblichen Kulturen (Abb. 6) müsste im Kontext dieser Befunde weiter untersucht werden.

### **5.3 Wirkungen von Sexualhormonen auf Neurotrophine im klinischen Kontext**

Wie einleitend bereits erwähnt, lassen indirekte Evidenzen eine Wirkung der Sexualhormone auf die Prognose neurologischer Erkrankungen oder Schädigungen vermuten. So haben Frauen vor der Menopause im Vergleich zu gleichaltrigen Männern offenbar ein geringeres Risiko einen schweren Schlaganfall zu erleiden (Murphy et al. 2004). Umgekehrt ist bei der entzündlich-neurodegenerativen Erkrankung Multiple Sklerose (MS) bei Frauen das Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Männern um das Dreifache erhöht und zumindest eine Krankheitsprogredienz bzw. die Symptomverschlechterung steht (vermutlich) im Zusammenhang mit dem Östrogenspiegel (Bove et al. 2014). Bei den Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas wird ein schützender Einfluss von Östrogenen diskutiert (Brotfain et al. 2016; Spani et al. 2018), jedoch kontrovers, da nicht alle durchgeführten klinischen Studien eine Geschlechterdifferenz bestätigen konnten (Renner et al. 2012). Zudem wird bei manchen Epilepsieformen die Anfallsschwelle durch Steroidhormone (Neurosteroide) wie  $3\alpha$ -Androstendiol, das wiederum aus DHT synthetisiert wird, sowie durch E2 moduliert (Reddy 2004; Scharfman und MacLusky 2006b).

Sexualhormon-abhängige Einflüsse auf den Verlauf einer neurologischen Erkrankung oder Schädigung könnten über Neurotrophine vermittelt werden (da Silva Meirelles et al. 2017), was u. a. durch die Beobachtung unterstützt wird, dass Medikamente, die die Produktion von BDNF über die Induktion von Typ-1 und Typ-2 T-Helferzellen vermitteln (Blanco et al. 2006; De Santi et al. 2011; Ziemssen et al. 2002) zur Schubprophylaxe eingesetzt werden, oder durch den Befund, dass nach Schädel-Hirntrauma bei Kindern im Liquor erhöhte NGF-Werte gefunden werden, die mit einer besseren Prognose korreliert sind (Chiaretti et al. 2008 und 2009). Um den Zusammenhang zwischen Sexualhormon-Status, Neurotrophin-Expression und den Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas experimentell zu untersuchen,

wurden kürzlich im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Neuroanatomie des UKE (Prof. Rune/Prof. Bender) und dem Institut für Anästhesiologie der Universität Mainz (Prof. Schäfer) Experimente durchgeführt, in denen Mäusen vor experimentell induziertem Schädel-Hirn-Trauma entweder der Aromatase-Inhibitor Letrozol, der 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitor Finasterid oder nur das Lösungsmittel systemisch appliziert wurden (Gölz et al. 2019). Drei Tage nach dem Eingriff wurde an den Mäusen das Ausmaß der induzierten Schädigung, das Ausmaß reaktiver Vorgänge (Astrogliose, Calpain-induzierte Protein-Spaltung), der „Neuroscore“ (motorische und kognitive Verhaltenstests) sowie die Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren untersucht. Es fanden sich geschlechtsspezifische Effekte der Inhibitoren. So verstärkte Letrozol die GFAP-Bildung, d. h. Astrogliose, nur bei den Weibchen, während Finasterid die Calpain-induzierte Protein-Spaltung nur bei den Männchen reduzierte. Zusätzlich war das Ausmaß der Läsion in den Männchen signifikant größer als bei den Weibchen. Hier war jedoch kein Einfluss der Inhibitoren nachweisbar. Spezifische Effekte der Inhibitoren zeigten sich auch bei der Neurotrophin- und Rezeptor-Expression. Hier wurde eine Verstärkung der TrkB-Expression durch Letrozol und eine Reduktion der TrkA-Expression durch Finasterid im Läsionsgewebe gefunden. Interessanterweise fanden sich signifikante Effekte nur bei Männchen. Somit entsprechen diese Resultate im Detail also nicht den sich aus der vorliegenden Studie ergebenden Erwartungen, wonach die weiblichen Ratten stärker auf eine Veränderung des Hormonstatus reagieren müssten als die Männchen. Jedoch bestätigen sie, dass mit Sexualhormon-bedingten, geschlechtsspezifischen Reaktionen grundsätzlich zu rechnen ist. Die beiden experimentellen Modelle – organotypische Gewebekultur mit postnatalem Gewebe und Schädel-Hirn-Trauma-Modell mit adultem Hirngewebe (inklusive Hippocampus) – sind aber vermutlich zu unterschiedlich, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

### **5.4 Geschlechtsspezifische Effekte im Gehirn**

Es stellt sich jedoch die Frage, wodurch diese geschlechtsspezifischen Effekte im Gehirn vermittelt werden. Verschiedene Ursachen kommen in Betracht. So könnte eine unterschiedliche Expression von Östrogen- oder Androgenrezeptoren in männlichen bzw. weiblichen Hippocampi eine Erklärung für die unterschiedliche Responsivität bieten. Jedoch liegen dafür bislang keine Hinweise vor. Alternativ wäre denkbar, dass eine geschlechtsabhängige Prägung die Verarbeitungsmechanismen hormoneller Reize in

hippocampalen Neuronen geschlechtsspezifisch festlegt. Belege dafür bieten kürzlich erfolgte Studien, die zeigen, dass wichtige Mechanismen der neuronalen Plastizität (Regulation der Synapsendichte, Langzeitpotenzierung), die im Hippocampus weiblicher und männlicher Mäuse unter Normalbedingungen nicht unterscheidbar sind, nach Behandlung mit dem Aromatase-Inhibitor Letrozol stark differieren. So war eine Langzeitpotenzierung im Hippocampus weiblicher Mäuse nach Letrozol-Behandlung nicht mehr auslösbar, während sie bei den männlichen Mäusen noch unverändert stattfand (Vierk et al. 2012). Ähnliche Befunde ergaben sich auch in der basolateralen Amygdala, einer wichtigen Region für die Regulation des Angstverhaltens (Bender et al. 2017). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass in den Neuronen weiblicher bzw. männlicher Hippocampi die Signalmechanismen geschlechtsspezifisch ausgebildet (d.h. „geprägt“) sind, was unter normalen Bedingungen nicht zwingend erkennbar sein muss, unter experimentellen (oder pathologischen) Bedingungen aber hervortritt. Eine derartige, geschlechtsspezifische Prägung könnte somit auch den in der vorliegenden Studie beobachteten Effekten zu Grunde liegen.

Dabei ist zu vermuten, dass diese Unterschiede bereits früh in der Entwicklung angelegt werden. So findet man bereits nach kurzer Zeit 4- bis 20-fach höhere E2 Konzentrationen im männlichen Hippocampus als im weiblichen (Hojo et al. 2008; Ooishi et al. 2012). Auch für DHT wird dieses Phänomen beschrieben (Ooishi et al. 2012). Interessanterweise liegen die Konzentrationen sowohl von E2, als auch von DHT im Hippocampus deutlich über den jeweiligen Serumkonzentrationen (Ooishi et al. 2012), was auf eine besondere Rolle der endogenen Hormonproduktion hinweist. Die erhöhten Sexualhormon-Werte bei männlichen Individuen könnten eine Erklärung dafür liefern, dass sowohl in früheren Studien (Briz et al. 2015; Harte-Hargrove et al. 2013; Scharfman und MacLusky 2006a; Solum und Handa 2002), als auch in der vorliegenden Arbeit weibliche Neurone stärker auf die Stimulation mit Sexualhormonen reagieren als die männlichen, da diese bereits an höhere E2- und DHT Spiegel adaptiert sind. Insbesondere DHT scheint hier die weiblich geprägten Neurone zu Veränderungen anzuregen.

## **5.5 Ausblick**

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, die Auswirkungen des potentesten Östrogens (E2) und des potentesten Androgens (DHT) auf die Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren im Hippocampus in Abhängigkeit vom Geschlecht zu untersuchen. Sie erbrachte Belege für eine geschlechtsspezifische Wirkung dieser Sexualhormone auf die Regulation der Neurotrophine, die, obwohl auf das Stadium der postnatalen Entwicklung der Ratte beschränkt, sich in bislang vorliegende Erkenntnisse einfügen. Für ein detaillierteres Verständnis der Bedeutung dieser Regulation bedarf es weiterer Untersuchungen, zumal auch die Rolle der Neurotrophine selbst vielseitig sein kann und noch nicht vollständig verstanden ist. Interessant wäre beispielsweise zu untersuchen, welche Auswirkungen Sexualhormon-bedingte Expressionsänderungen der Neurotrophin-Rezeptoren auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Neurone hat. Gemäß der „Yin-Yang-Hypothese“ sollte eine erhöhte p75-NTR-Expression die Apoptose fördern, während eine verstärkte Trk-Rezeptoren-Expression trophisch wirkt (Lu et al. 2005; siehe dazu auch Abschnitt 1.2). Diese interessante Frage konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr untersucht werden. Eine Vertiefung des Verständnisses dieser Frage könnte jedoch auch Erkenntnis bringen, die über die Funktion in Neuronen hinausreicht. So gibt es, wie oben angedeutet (Abschnitt 5. 2), Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Sexualhormonen und Neurotrophinen in Mammakarzinom- und Prostata-Tumoren. In hyperplastischem Prostatagewebe wurden beispielsweise erhöhte Werte für BDNF und TrkB nachgewiesen (Bronzetti et al., 2008). Gleichzeitig war die Expression des p75-NTR im selben Gewebe erniedrigt. Es ist anzunehmen, dass die Funktion der Neurotrophine in der Prostata (ebenso wie in der Mamma; Blasco-Gutierrez et al., 2007) über Sexualhormon-Einflüsse reguliert wird und ein besseres Verständnis dieser Regulation somit auch zu einem besseren Verständnis der Tumorgenese oder sogar Tumorkontrolle führen könnte.

## **6 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der Sexualhormone E2 und DHT auf die Expression von Neurotrophinen (BDNF, NT-3) und Neurotrophin-Rezeptoren (p75-NTR, TrkA, TrkB, TrkC) in hippocampalen Gewebekulturen der Ratte untersucht. Die Studie konzentrierte sich auf zwei Fragestellungen:

- 1) Bewirkt die Zugabe der Hormone zu den Gewebekulturen eine Veränderung der Expression der untersuchten Proteine?
  
- 2) Wenn ja: Sind diese Veränderungen geschlechtsspezifisch?

Für diesen Zweck wurden Kulturen aus weiblichen und männlichen Ratten getrennt untersucht. Die Auswertung der Experimente lieferte deutliche Hinweise auf einen geschlechtsspezifischen Effekt der Sexualhormone. So beeinflusste DHT die Expression des p75-NTR und E2 die Expression des TrkC-Rezeptors. Erkennbar waren diese Effekte jedoch jeweils nur in Kulturen von weiblichen Ratten, deren Hippocampus im untersuchten Entwicklungszeitraum (ca. 2. postnatale Woche) auf Sexualhormon-Stimulation offenbar responsiver als der von männlichen Ratten war. Diese Ergebnisse reihen sich ein in eine wachsende Anzahl von Befunden, die belegen, dass Neurone in weiblichen und männlichen Gehirnen auf Sexualhormone unterschiedlich reagieren, möglicherweise als Resultat einer geschlechtsspezifischen Prägung der die Sexualhormon-Wirkungen vermittelnden Signaltransduktionsmechanismen. Dies ist im klinischen Kontext angesichts neurologischer Erkrankungen oder Schädigungen mit auffälliger Geschlechterdiskrepanz im Hinblick auf Verlauf oder Inzidenz (z. B. Multiple Sklerose, div. Epilepsien, Schlaganfall, Schädel-Hirn-Traumata) von besonderem Interesse. Eine weiterführende Untersuchung der vorgestellten Befunde könnte somit zu einem besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen (sowie anderer mit nachgewiesener Beteiligung von Sexualhormonen und Neurotrophinen, z. B. Tumore der Mamma oder der Prostata) beitragen.

## 6.1 Summary

The present study investigated the influence of the sex hormones E2 and DHT on the expression of neurotrophins (BDNF, NT-3) and neurotrophin receptors (p75-NTR, TrkA, TrkB, TrkC) in rat hippocampal tissue cultures.

The study focused on two questions:

- 1) Does the application of hormones to tissue cultures alter the expression of neurotrophins and neurotrophin receptors?
  
- 2) If so, are these changes sex-specific?

For this purpose cultures of female and male rats were studied separately. The evaluation of the experiments provided clear evidence of a sex-specific effect of the sex hormones. Thus, DHT influenced the expression of the p75-NTR and E2 the expression of the TrkC receptor. However, these effects were only detectable in cultures of female rats whose hippocampus was apparently more responsive to sex hormone stimulation than that of male rats during the developmental period investigated (about 2nd postnatal week). These results are in line with a growing body of evidence showing that neurons in female and male brains react differently to sex hormones, possibly as a result of a gender-specific imprint of the signaling mechanisms that mediate sex hormone effects.

This is of interest in the clinical context, in view of neurological disorders showing conspicuous gender discrepancy with regard to course or incidence (e.g. multiple sclerosis, various types of epilepsy, stroke, traumatic brain injury). Further investigation of the presented findings could thus contribute to a better understanding of the pathogenesis of these diseases (as well as others with proven involvement of sex hormones and neurotrophins, e.g. tumors of the breast or the prostate).

## V Literaturverzeichnis

- Adams, M. M., et al. (2002), 'Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats', *J Neurosci*, 22 (9), 3608-14.
- Alexander, A., Irving, A. J., and Harvey, J. (2017), 'Emerging roles for the novel estrogen-sensing receptor GPER1 in the CNS', *Neuropharmacology*, 113 (Pt B), 652-60.
- Alonso, M., Medina, J. H., and Pozzo-Miller, L. (2004), 'ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons', *Learn Mem*, 11 (2), 172-8.
- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2015), 'The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors', *Nat Rev Neurosci*, 16 (1), 17-29.
- Bakker, J. and Baum, M. J. (2008), 'Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation', *Front Neuroendocrinol*, 29 (1), 1-16.
- Balthazart, J., et al. (2006), 'Rapid changes in production and behavioral action of estrogens', *Neuroscience*, 138 (3), 783-91.
- Barbacid, M. (1994), 'The Trk family of neurotrophin receptors', *J Neurobiol*, 25 (11), 1386-403.
- Baudry, M., Bi, X., and Aguirre, C. (2013), 'Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection', *Neuroscience*, 239, 280-94.
- Bender, R. A., et al. (2010), 'Roles of 17 $\beta$ -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus', *Cereb Cortex*, 20 (12), 2985-95.
- Bender, R. A., et al. (2017), 'Sex-Dependent Regulation of Aromatase-Mediated Synaptic Plasticity in the Basolateral Amygdala', *J Neurosci*, 37 (6), 1532-45.
- Beyer, C. (1999), 'Estrogen and the developing mammalian brain', *Anat Embryol (Berl)*, 199 (5), 379-90.
- Blanco, Y., et al. (2006), 'Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on the immunophenotypic and cytokine profile and BDNF production in multiple sclerosis: a longitudinal study', *Neurosci Lett*, 406 (3), 270-5.
- Blasco-Gutierrez, M. J., et al. (2007), 'TrkC: a new predictive marker in breast cancer?', *Cancer Invest*, 25 (6), 405-10.
- Bothwell, M. (1991), 'Keeping track of neurotrophin receptors', *Cell*, 65 (6), 915-8.
- Bove, R., Chitnis, T., and Houtchens, M. (2014), 'Menopause in multiple sclerosis: therapeutic considerations', *J Neurol*, 261 (7), 1257-68.
- Bradford, M. M. (1976), 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Briz, V., et al. (2015), 'A novel form of synaptic plasticity in field CA3 of hippocampus requires GPER1 activation and BDNF release', *J Cell Biol*, 210 (7), 1225-37.
- Brotfain, E., et al. (2016), 'Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury', *Curr Neuropharmacol*, 14 (6), 641-53.
- Carlsson, G. H., et al. (2005), 'Complexes of horseradish peroxidase with formate, acetate, and carbon monoxide', *Biochemistry*, 44 (2), 635-42.
- Carrer, H. F. and Cambiasso, M. J. (2002), 'Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors', *Cell Mol Neurobiol*, 22 (5-6), 479-500.
- Carrer, H. F., Araque, A., and Buno, W. (2003), 'Estradiol regulates the slow Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons', *J Neurosci*, 23 (15), 6338-44.
- Castelli, M. P., et al. (2013), 'Regional distribution of 5 $\alpha$ -reductase type 2 in the adult rat brain: an immunohistochemical analysis', *Psychoneuroendocrinology*, 38 (2), 281-93.
- Chakraborty, T. R. and Gore, A. C. (2004), 'Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function', *Exp Biol Med (Maywood)*, 229 (10), 977-87.
- Chan, C. B. and Ye, K. (2017), 'Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling and functions', *J Neurosci Res*, 95 (1-2), 328-35.
- Chao, M. V. (1994), 'The p75 neurotrophin receptor', *J Neurobiol*, 25 (11), 1373-85.
- Chao, M. V. and Bothwell, M. (2002), 'Neurotrophins: to cleave or not to cleave', *Neuron*, 33 (1), 9-12.

- Chiaretti, A., et al. (2008), 'Nerve growth factor and doublecortin expression correlates with improved outcome in children with severe traumatic brain injury', *J Trauma*, 65 (1), 80-5.
- Chiaretti, A., et al. (2009), 'NGF, DCX, and NSE upregulation correlates with severity and outcome of head trauma in children', *Neurology*, 72 (7), 609-16.
- Cohen-Cory, S., et al. (2010), 'Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity', *Dev Neurobiol*, 70 (5), 271-88.
- da Silva Meirelles, L., Simon, D., and Regner, A. (2017), 'Neurotrauma: The Crosstalk between Neurotrophins and Inflammation in the Acutely Injured Brain', *Int J Mol Sci*, 18 (5).
- Davies, A. M. (1994), 'The role of neurotrophins in the developing nervous system', *J Neurobiol*, 25 (11), 1334-48.
- Day, N. L., et al. (2013), '17beta-estradiol confers protection after traumatic brain injury in the rat and involves activation of G protein-coupled estrogen receptor 1', *J Neurotrauma*, 30 (17), 1531-41.
- De Santi, L., et al. (2011), 'Neuroinflammation and neuroprotection: an update on (future) neurotrophin-related strategies in multiple sclerosis treatment', *Curr Med Chem*, 18 (12), 1775-84.
- Dieni, S., et al. (2012), 'BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons', *J Cell Biol*, 196 (6), 775-88.
- Drake, C. T., Milner, T. A., and Patterson, S. L. (1999), 'Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity', *J Neurosci*, 19 (18), 8009-26.
- Ellis, J. A., et al. (2005), 'Androgenic correlates of genetic variation in the gene encoding 5alpha-reductase type 1', *J Hum Genet*, 50 (10), 534-7.
- Fanaei, H., et al. (2014), 'Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats', *Brain Res*, 1558, 74-83.
- Fester, L., et al. (2011), 'Estrogen synthesis in the hippocampus', *Cell Tissue Res*, 345 (3), 285-94.
- Foster, T. C. (2005), 'Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span', *Front Neuroendocrinol*, 26 (2), 51-64.
- Foy, M. R., et al. (1999), '17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation', *J Neurophysiol*, 81 (2), 925-9.
- Frotscher, M. and Heimrich, B. (1993), 'Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (21), 10400-3.
- Furukawa, A., et al. (1998), 'Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain', *J Neurochem*, 71 (6), 2231-8.
- Gibbs, R. B. (1998), 'Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement', *Brain Res*, 810 (1-2), 294.
- Gillies, G. E. and McArthur, S. (2010), 'Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines', *Pharmacol Rev*, 62 (2), 155-98.
- Golz, C., et al. (2019), 'Sex hormones modulate pathogenic processes in experimental traumatic brain injury', *J Neurochem*, 150 (2), 173-87.
- Gould, E., et al. (1990), 'Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood', *J Neurosci*, 10 (4), 1286-91.
- Harte-Hargrove, L. C., Maclusky, N. J., and Scharfman, H. E. (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, C. A. and Chang, C. (2002), 'The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions', *Mol Endocrinol*, 16 (10), 2181-7.
- Hojo, Y., et al. (2008), 'Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory', *Mol Cell Endocrinol*, 290 (1-2), 31-43.

- Hojo, Y., et al. (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.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001), 'Neurotrophins: roles in neuronal development and function', *Annu Rev Neurosci*, 24, 677-736.
- (2003), 'Trk receptors: roles in neuronal signal transduction', *Annu Rev Biochem*, 72, 609-42.
- Huang, H. H. and Meites, J. (1975), 'Reproductive capacity of aging female rats', *Neuroendocrinology*, 17 (4), 289-95.
- Ibanez, C. F. (2002), 'Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF', *Trends Neurosci*, 25 (6), 284-6.
- Ivanova, T., et al. (2001), 'Estrogen stimulates brain-derived neurotrophic factor expression in embryonic mouse midbrain neurons through a membrane-mediated and calcium-dependent mechanism', *J Neurosci Res*, 66 (2), 221-30.
- Ji, Y., et al. (2005), 'Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons', *Nat Neurosci*, 8 (2), 164-72.
- Konkle, A. T. and McCarthy, M. M. (2011), 'Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain', *Endocrinology*, 152 (1), 223-35.
- Korte, M., et al. (1995), 'Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (19), 8856-60.
- Kramar, E. A., et al. (2004), 'A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor', *J Neurosci*, 24 (22), 5151-61.
- Kretz, O., et al. (2004), 'Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis', *J Neurosci*, 24 (26), 5913-21.
- Larsson, E., et al. (2002), 'Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor', *Exp Neurol*, 177 (1), 1-8.
- Leranth, C., Hajszan, T., and MacLusky, N. J. (2004), 'Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats', *J Neurosci*, 24 (2), 495-9.
- Levi-Montalcini, R. (1987), 'The nerve growth factor 35 years later', *Science*, 237 (4819), 1154-62.
- Levin, E. R. (2005), 'Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen', *Mol Endocrinol*, 19 (8), 1951-9.
- Levine, E. S. and Kolb, J. E. (2000), 'Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons', *J Neurosci Res*, 62 (3), 357-62.
- Ley, E. J., et al. (2013), 'Gender impacts mortality after traumatic brain injury in teenagers', *J Trauma Acute Care Surg*, 75 (4), 682-6.
- Li, M., et al. (2012), 'Testosterone has sublayer-specific effects on dendritic spine maturation mediated by BDNF and PSD-95 in pyramidal neurons in the hippocampus CA1 area', *Brain Res*, 1484, 76-84.
- Lindholm, D. (1994), 'Role of neurotrophins in preventing glutamate induced neuronal cell death', *J Neurol*, 242 (1 Suppl 1), S16-8.
- Lindholm, D., et al. (1994), 'Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--implications for neuronal plasticity', *J Neurobiol*, 25 (11), 1362-72.
- Lu, B., Pang, P. T., and Woo, N. H. (2005), 'The yin and yang of neurotrophin action', *Nat Rev Neurosci*, 6 (8), 603-14.
- Lu, B., et al. (2013), 'BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases', *Nat Rev Neurosci*, 14 (6), 401-16.
- Lu, K. H., et al. (1979), 'Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states', *Biol Reprod*, 21 (1), 193-203.
- Lubin, F. D., Roth, T. L., and Sweatt, J. D. (2008), 'Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory', *J Neurosci*, 28 (42), 10576-86.
- Mahmood, T. and Yang, P. C. (2012), 'Western blot: technique, theory, and trouble shooting', *N Am J Med Sci*, 4 (9), 429-34.

- Matsumoto, A. M. (2013), 'Testosterone administration in older men', *Endocrinol Metab Clin North Am*, 42 (2), 271-86.
- McCarthy, M. M. (2008), 'Estradiol and the developing brain', *Physiol Rev*, 88 (1), 91-124.
- McEwen, B. (2002), 'Estrogen actions throughout the brain', *Recent Prog Horm Res*, 57, 357-84.
- Mehra, R. D., et al. (2005), 'Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study', *Brain Res*, 1056 (1), 22-35.
- Meseke, M., et al. (2018), 'Distal Dendritic Enrichment of HCN1 Channels in Hippocampal CA1 Is Promoted by Estrogen, but Does Not Require Reelin', *eNeuro*, 5 (5).
- Milner, T. A., et al. (2005), 'Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation', *J Comp Neurol*, 491 (2), 81-95.
- Miranda, R., et al. (1996), 'Nerve growth factor (NGF) regulation of estrogen receptors in explant cultures of the developing forebrain', *J Neurobiol*, 31 (1), 77-87.
- Mowla, S. J., et al. (2001), 'Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor', *J Biol Chem*, 276 (16), 12660-6.
- Murphy, S. J., McCullough, L. D., and Smith, J. M. (2004), 'Stroke in the female: role of biological sex and estrogen', *ILAR J*, 45 (2), 147-59.
- Nassar, G. N. and Leslie, S. W. (2019), 'Physiology, Testosterone', *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (2011), 'Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes', *Clin Pharmacol Ther*, 89 (1), 44-55.
- Nunez, J. L. and McCarthy, M. M. (2009), 'Resting intracellular calcium concentration, depolarizing Gamma-Aminobutyric Acid and possible role of local estradiol synthesis in the developing male and female hippocampus', *Neuroscience*, 158 (2), 623-34.
- O'Keefe, J. A., et al. (1995), 'Estrogen receptor mRNA alterations in the developing rat hippocampus', *Brain Res Mol Brain Res*, 30 (1), 115-24.
- Oettel, M. (2004), 'The endocrine pharmacology of testosterone therapy in men', *Naturwissenschaften*, 91 (2), 66-76.
- Ooishi, Y., et al. (2012), 'Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 131 (1-2), 37-51.
- Orikasa, C., et al. (2000), 'Estrogen receptor alpha, but not beta, is expressed in the interneurons of the hippocampus in prepubertal rats: an in situ hybridization study', *Brain Res Dev Brain Res*, 120 (2), 245-54.
- Ottens, E. N., et al. (2007), 'Androgen-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B in the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus', *Endocrinology*, 148 (8), 3655-65.
- Park, H. and Poo, M. M. (2013), 'Neurotrophin regulation of neural circuit development and function', *Nat Rev Neurosci*, 14 (1), 7-23.
- Phelan, H. A., et al. (2007), 'Use of a pediatric cohort to examine gender and sex hormone influences on outcome after trauma', *J Trauma*, 63 (5), 1127-31.
- Prange-Kiel, J., et al. (2003), 'Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons', *Hippocampus*, 13 (2), 226-34.
- Prange-Kiel, J., et al. (2008), 'Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis', *J Cell Biol*, 180 (2), 417-26.
- Purves-Tyson, T. D., et al. (2015), 'Adolescent testosterone influences BDNF and TrkB mRNA and neurotrophin-interneuron marker relationships in mammalian frontal cortex', *Schizophr Res*, 168 (3), 661-70.
- Reddy, D. S. (2004), 'Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids 3alpha-androstanediol and 17beta-estradiol', *Neuroscience*, 129 (1), 195-207.
- Renner, C., et al. (2012), 'The influence of gender on the injury severity, course and outcome of traumatic brain injury', *Brain Inj*, 26 (11), 1360-71.
- Rhoda, J., Corbier, P., and Roffi, J. (1984), 'Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 beta-estradiol', *Endocrinology*, 114 (5), 1754-60.

- Sarkey, S., et al. (2008), 'Classical androgen receptors in non-classical sites in the brain', *Horm Behav*, 53 (5), 753-64.
- Scharfman, H. E. and Maclusky, N. J. (2005), 'Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue?', *Trends Neurosci*, 28 (2), 79-85.
- (2006a), 'Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS', *Front Neuroendocrinol*, 27 (4), 415-35.
- (2006b), 'The influence of gonadal hormones on neuronal excitability, seizures, and epilepsy in the female', *Epilepsia*, 47 (9), 1423-40.
- (2014), 'Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats', *Neuropharmacology*, 76 Pt C, 696-708.
- Scharfman, H. E., et al. (2007), 'Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge', *Eur J Neurosci*, 26 (9), 2595-612.
- Shen, J., et al. (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, E. M. (2001), 'Early days of the nerve growth factor proteins', *Annu Rev Neurosci*, 24, 601-29.
- Skaper, S. D. (2018), 'Neurotrophic Factors: An Overview', *Methods Mol Biol*, 1727, 1-17.
- Smith, C. C. and McMahon, L. L. (2005), 'Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased', *J Neurosci*, 25 (34), 7780-91.
- Sohrabji, F., Miranda, R. C., and Toran-Allerand, C. D. (1995), 'Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (24), 11110-4.
- Solum, D. T. and Handa, R. J. (2002), 'Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus', *J Neurosci*, 22 (7), 2650-9.
- Spani, C. B., Braun, D. J., and Van Eldik, L. J. (2018), 'Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling', *Front Neuroendocrinol*, 50, 52-66.
- Spencer-Segal, J. L., et al. (2012), 'Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation', *Neuroscience*, 202, 131-46.
- Spencer, J. L., et al. (2008), 'Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice', *Neuroscience*, 155 (4), 1106-19.
- Stoppini, L., Buchs, P. A., and Muller, D. (1993), 'Lesion-induced neurite sprouting and synapse formation in hippocampal organotypic cultures', *Neuroscience*, 57 (4), 985-94.
- Stuart, J. D., et al. (2001), 'Pharmacokinetic parameters and mechanisms of inhibition of rat type 1 and 2 steroid 5alpha-reductases: determinants for different in vivo activities of G1198745 and finasteride in the rat', *Biochem Pharmacol*, 62 (7), 933-42.
- Sun, J. H., et al. (2001), 'Restoration of decreased N-methyl-D-aspartate receptor activity by brain-derived neurotrophic factor in the cultured hippocampal neurons: involvement of cAMP', *Arch Biochem Biophys*, 394 (2), 209-15.
- Swerdloff, R. S., et al. (2017), 'Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels', *Endocr Rev*, 38 (3), 220-54.
- Thigpen, A. E., et al. (1993), 'Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression', *J Clin Invest*, 92 (2), 903-10.
- Thoenen, H., et al. (1991), 'The synthesis of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal and cortical neurons is regulated by specific transmitter systems', *Ann N Y Acad Sci*, 640, 86-90.
- Timmusk, T., et al. (1993), 'Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene', *Neuron*, 10 (3), 475-89.
- Tongiorgi, E. and Baj, G. (2008), 'Functions and mechanisms of BDNF mRNA trafficking', *Novartis Found Symp*, 289, 136-47; discussion 47-51, 93-5.

- Toocheck, C., et al. (2016), 'Mouse Spermatogenesis Requires Classical and Nonclassical Testosterone Signaling', *Biol Reprod*, 94 (1), 11.
- Vajaria, R. and Vasudevan, N. (2018), 'Is the membrane estrogen receptor, GPER1, a promiscuous receptor that modulates nuclear estrogen receptor-mediated functions in the brain?', *Horm Behav*, 104, 165-72.
- Vierk, R., et al. (2012), 'Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice', *J Neurosci*, 32 (24), 8116-26.
- von Bohlen Und Halbach, O. and von Bohlen Und Halbach, V. (2018), 'BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function', *Cell Tissue Res*, 373 (3), 729-41.
- Wang, W., et al. (2018), 'Memory-Related Synaptic Plasticity Is Sexually Dimorphic in Rodent Hippocampus', *J Neurosci*, 38 (37), 7935-51.
- Waterhouse, E. G. and Xu, B. (2009), 'New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity', *Mol Cell Neurosci*, 42 (2), 81-9.
- Waters, E. M., et al. (2015), 'G-protein-coupled estrogen receptor 1 is anatomically positioned to modulate synaptic plasticity in the mouse hippocampus', *J Neurosci*, 35 (6), 2384-97.
- Wehrenberg, U., Prange-Kiel, J., and Rune, G. M. (2001), 'Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase', *J Neurochem*, 76 (6), 1879-86.
- Weisz, J. and Ward, I. L. (1980), 'Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring', *Endocrinology*, 106 (1), 306-16.
- Wen, Q., Cheng, C. Y., and Liu, Y. X. (2016), 'Development, function and fate of fetal Leydig cells', *Semin Cell Dev Biol*, 59, 89-98.
- Woolley, C. S. and McEwen, B. S. (1992), 'Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat', *J Neurosci*, 12 (7), 2549-54.
- Wu, M. V., et al. (2009), 'Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors', *Cell*, 139 (1), 61-72.
- Yano, H., et al. (2009), 'Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing', *J Neurosci*, 29 (47), 14790-802.
- Yi, J. S., et al. (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), 126-30.
- Yoshii, A. and Constantine-Paton, M. (2010), 'Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease', *Dev Neurobiol*, 70 (5), 304-22.
- Zanin, J. P., Unsain, N., and Anastasia, A. (2017), 'Growth factors and hormones pro-peptides: the unexpected adventures of the BDNF prodomain', *J Neurochem*, 141 (3), 330-40.
- Zhou, L., et al. 'Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice', *Endocrinology*, 151 (3), 1153-60.
- Zhu, X., et al. (2017), 'A Role of Endogenous Progesterone in Stroke Cerebroprotection Revealed by the Neural-Specific Deletion of Its Intracellular Receptors', *J Neurosci*, 37 (45), 10998-1020.
- Ziemssen, T., et al. (2002), 'Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor', *Brain*, 125 (Pt 11), 2381-91.

#### Weitere Literaturquellen:

Nottebohm, M. (2012), „Einfluß von 17 $\beta$ -Östradiol auf die Expression des Neuronalen Wachstumsfaktors BDNF und seines Rezeptorproteins TrkB“ Dissertation UKE.

Statistisches Bundesamt: (Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2014)

## **VI Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Roland Bender. Durch Auswahl eines interessanten Themas und permanente Begleitung und Unterstützung sowie punktuelle, konstruktive Kritik war mir die Umsetzung dieses Projektes erst möglich. Insbesondere möchte ich mich für die entgegengebrachte Geduld in Phasen des Gleichmutes bedanken.

Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune für die Möglichkeit, in ihrem Institut zu forschen und meine Experimente hier durchzuführen.

Mein großer Dank gilt den technischen Assistentinnen des Instituts für unermüdliche Unterstützung und Hilfe bei der praktischen Umsetzung und hier im Besonderen Frau Christiane Schröder-Birkner. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Maurice Meseke für die Erklärungen zur bildtechnischen Auswertung sowie bei Frau Dr. rer. nat. Nicola Brandt für Anregungen zur Durchführung der Western-Blots bedanken.

Herrn Daniel Küver und Frau Dr. phil. Sabine Kolbeck danke ich für die abschließende gründliche Durchsicht.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während meines Studiums und ganz besonders bei Svenja für den bedingungslosen Rückhalt und die Motivation bedanken.

## VII Lebenslauf

Wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## VIII Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....

gez. Sascha Rogalski