

DISS. ETH NO. 18836

NEUROPROTECTIVE ACTIONS OF ESTRADIOL: POTENTIAL ROLE OF ESTRADIOL
RECEPTORS AND METABOLISM

a dissertation submitted to
ETH, ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
SARA A. SCHAUFELBERGER
dipl. natw. ETHZ

Date of birth
31.01.1981

citizen of
Fiscenthal ZH

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Sabine Werner, examiner
Prof. Dr. Christian Frei, co-examiner
Prof. Dr. Raghendra K. Dubey, co-examiner

2010

Summary

Several *in vivo* and *in vitro* studies provide evidence that E2 protects against neurological diseases; however, the mechanism(s) involved remain unclear. Microglia and oligodendrocytes play a key role in defining the brain's health by acting as immunocompetent cells and as insulators of neuronal axons, respectively.

Since E2 is known to act anti-inflammatory and to regulate proliferation in several cell types, we hypothesized that (1) E2 may induce its anti-inflammatory effects by inhibiting proliferation of microglial cells (BV2) and thereby limiting the generation of cytotoxic molecules which target the CNS and (2) E2 may induce proliferation in oligodendrocytes (Oli-neu) which would be beneficial for the remyelination of lesion sites.

In support of our first hypothesis we provided evidence that E2 inhibits mitogen-induced growth of BV2 cells via both ER-dependent and ER-independent mechanisms. Indeed, the growth-inhibitory effect of E2 were abrogated by ICI (non specific ER- α/β antagonist). Furthermore, using specific agonists for ER- α (PPT) and ER- β (DPN) we demonstrated that the antimitogenic effects of E2 are ER- β but not ER- α mediated. Additionally, we demonstrated that the antimitogenic action of E2 is partially ER-independent and involves the sequential conversion of E2 to 2OE and 2ME. In this regard, the growth inhibitory effects of E2 were significantly abrogated by the CYP450 inhibitors ABT and Pyrene (inhibit E2 to 2OE conversion) and of E2 and 2OE by OR486 (inhibit 2OE to 2ME conversion). Locally applied 2ME was more potent than E2 and 2OE in inhibiting BV2 growth. Furthermore, 2ME induced anti-inflammatory actions in BV2 cells by inhibiting iNOS and COX expression, NO secretion and the phagocytotic activity of microglia, known to be induced following inflammation. Finally our results provide evidence that 2ME pretreatment abrogates the generation of molecules by BV2 cells that are cytotoxic to a neuroblastoma cell line (SH-SY5Y).

In support of our second hypothesis we provide evidence that E2 induces mitogenesis in Oli-neu cells. Under starvation, E2 prolongs MAPK (ERK1/2) phosphorylation and simultaneously increases p21 expression, a negative regulator of cell cycle known to be upregulated in oligodendrocytes not only during differentiation but also during S-phase entry. Additionally, we demonstrated that, in contrast to E2, 2ME and 2OE inhibit Oli-neu cell growth and this is associated with increased p21 and p27 expression. Since p21 and p27 are implicated in oligodendrocyte differentiation, we speculate that 2OE and 2ME might be involved in oligodendrocyte differentiation, however this needs to be further investigated.

Finally, since 2ME is being tested in clinical phase I/II trials, we investigated the impact of pharma-

cological (high) concentrations of 2ME on microglia and oligodendrocytes. At high concentrations ($> 2 \mu\text{M}$) 2ME induced endoreduplication in Oli-neu cells, upregulated cyclin A, B, D2, and E expression and increased hyperphosphorylation of Rb. We provide evidence that 2ME induced endoreduplication is p53-dependent, as inhibition of p53 by Pifithrin- α abrogates 2ME-induced endoreduplication. In the BV2 cells, high concentrations of 2ME ($> 2 \mu\text{M}$) induced cell death and this is associated with externalization of phosphatidylserines, fragmentation of caspase 3 and caspase 7, and PARP cleavage. Taken together, our results provide evidence that high concentrations of 2ME may induce apoptosis in BV2 cells and endoreduplication in Oli-neu cells, however whether these actions would result in protective or deleterious actions remains to be further investigated.

In conclusion, the results from the present study indicate that E2 may be neuroprotective by decreasing microglial proliferation via an ER- β -dependent and an ER-independent mechanism (2ME formation), and by increasing oligodendrocyte cell growth. Additionally, high concentrations of 2ME were shown to induce apoptosis in microglia and endoreduplication in oligodendrocytes, however, the pathophysiologic significance of these effects needs to be further investigated.

Zusammenfassung

Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien zeigen, dass E2 neuroprotektive Eigenschaften besitzt; jedoch ist ungeklärt welche molekularen Mechanismen hierbei eine Rolle spielen. Mikroglia, die Immunzellen des Hirns, und Oligodendrozyten, welche die Nervenzellen umhüllen und isolieren, sind mitverantwortlich für die Gesundheit des Nervensystems.

Da E2 entzündungshemmend und antiproliferativ wirkt, stellten wir folgende Hypothesen auf. (1) E2 wirkt durch antiproliferative Wirkung auf Mikroglia (BV2) entzündungshemmend, wodurch die Entstehung von toxischen Molekülen, welche das ZNS angreifen, vermindert wird. (2) E2 fördert die Proliferation von Oligodendrozyten (Oli-neu), welche die Remyelinisierung von Nervenzellen begünstigen.

Unsere erste Hypothese stützt sich auf unsere Forschungsergebnisse, die eine Inhibition des Wachstums von BV2 Zellen durch E2 zeigen - sowohl durch einen ER-abhängigen, als auch einen ER-unabhängigen Weg. Die Abhängigkeit vom ER konnte durch Verminderung des antiproliferativen Effekts von E2 durch ICI, einen unspezifischen ER- α/β Antagonisten, belegt werden. Zudem zeigte sich anhand von Experimenten mit PPT (ER- α Agonist) und DPN (ER- β Agonist), dass nur der ER- β für die Vermittlung der antiproliferativen Wirkung von E2 verantwortlich ist. Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass E2 auch über einen ER unabhängigen Mechanismus wirkt, der auf der Metabolisierung von E2 zu 2OE und 2ME, dem stärksten Inhibitor des BV2-Zellwachstums, basiert. Hierfür spricht, dass die antiproliferative Wirkung von E2 durch die CYP450 Inhibitoren ABT und Pyren (inhibieren die Umwandlung von E2 zu 2OE) und die Effekte von E2 und 2OE durch OR486 (inhibiert die Umwandlung von 2OE zu 2ME) signifikant vermindert wurden. Ausserdem konnten wir die entzündungshemmende Wirkung von 2ME nachweisen, da in BV2 Zellen die iNOS und COX Expression, die NO Sekretion und die Phagozytose durch 2ME inhibiert wurden. Unsere Resultate deuten also darauf hin, dass eine Behandlung mit 2ME die Entstehung toxischer Moleküle in BV2 Zellen vermindert.

Unsere zweite Hypothese stützt sich auf das Ergebnis, dass E2 das Wachstum von Oli-neu Zellen erhöht. In serumfrei kultivierten Oli-neu Zellen erhielt E2 die MAPK (ERK1/2) länger aufrecht und erhöhte gleichzeitig die p21 Expression. Die Konzentration von p21, normalerweise ein negativer Regulator des Zellzyklus, war in Oligodendrozyten nicht nur während der Differenzierung, sondern auch beim Eintritt in die S-Phase erhöht. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass 2ME und 2OE die Proliferation in Oli-neu Zellen hemmen, im Gegensatz zu E2. Diese Proliferationshemmung war assoziiert mit erhöhter p21 und p27 Expression. Da p21 und p27 bei der Oligodendrozytendifferenzierung beteiligt sind, könnte es sein, dass auch 2OE und 2ME die Differenzierung beeinflussen. Dies muss jedoch weiter untersucht werden.

Ausserdem haben wir untersucht, welchen Effekt 2ME auf Mikroglia und Oligodendrozyten in pharmakologischen (hohen) Konzentrationen hat, da 2ME zur Zeit in klinischen Phase 1/2 Studien getestet wird. Hierbei zeigte sich, dass hohe Konzentrationen von 2ME ($> 2 \mu\text{M}$) zur Endoreduplikation in Oligodendrozyten führt, begleitet von einer Hochregulation der Zyklinen A, B, D2, und E und erhöhter Hyperphosphorylierung von pRB. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass die Endoreduplikation p53 abhängig ist, da Pifithrin- α die Endoreduplikation inhibierte. In BV2 Zellen führten hohe Konzentrationen von 2ME ($> 2 \mu\text{M}$) zur Apoptose begleitet von der Umlagerung von Phosphatidylserin, Fragmentierung von Caspase 3 und Caspase 7 und PARP Spaltung.

Zusammenfassend deuten unsere Resultate darauf hin, dass E2 eine neuroprotektive Wirkung besitzt, die durch Verminderung des Wachstums von Mikroglia Zellen - ER- β abhängig als auch ER-unabhängig - und durch Wachstumsförderung von Oligodendrozyten begründet werden kann. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine hohe Konzentration von 2ME apoptotisch auf Mikroglia Zellen wirkt und Endoreduplikation in Oligodendrozyten hervorruft. Welche pathophysiologischen Konsequenzen sich davon ableiten lassen, muss jedoch weiter untersucht werden.