

Aus dem Institut für Anatomie I,
zelluläre Neurobiologie,
des Universitätsklinikums Eppendorf
Institutsdirektorin: Prof. Dr. Gabriele M. Rune

**Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Dichte von Spinesynapsen
in hippocampalen Schnittkulturen nach Behandlung mit Substraten
der Östrogensynthese**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Richard von Lossow

Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 29.10.2009
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg am:
Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Rune
Prüfungsausschuss, 2.Gutachter: Prof. Dr. J.Heeren
Prüfungsausschuss, 3.Gutachter: Prof. Dr.J. Prange-Kiel

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABELLENVERZEICHNIS | V |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VII |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Östrogenwirkung auf Neurotransmittersysteme | 2 |
| 1.2 Östrogensynthese im Hippocampus | 3 |
| 1.3 Inhibitoren der hippocampalen Estradiolsynthese | 5 |
| 1.4 Neuronenwachstum und Apoptose in Abhängigkeit von Östrogenen | 6 |
| 1.5 Axonwachstum in hippocampalen Neuronen | 7 |
| 1.6 Genomische und nichtgenomische Wirkungsweisen von Östrogenen | 8 |
| 1.7 Der Hippocampus | 9 |
| 1.8 Definition, Variabilität und Funktionen von Synapsen | 11 |
| 1.9 Arbeitshypothese und Fragestellung | 12 |
| 2 METHODEN | 14 |
| 2.1 Hippocampale Slicekultur | 14 |
| 2.1.1 Präparationstechnik des Hippocampus der Ratte | 14 |
| 2.1.2 Kultivierung der Slicekulturen mit verschiedenen Metaboliten der | 15 |
| 2.2 Semidünnschnitte | 15 |
| 2.3 Ultradünnschnitte, elektronenmikroskopische Bilder und deren Auswertung | 15 |
| 2.4 Material | 16 |
| 2.4.1 Material und Geräte | 16 |
| 2.4.2 Chemikalien | 17 |
| 2.4.3 Lösungen und Kulturmedien | 18 |
| 3 ERGEBNISSE | 20 |
| 3.1 Bestimmung der Spinesynapsenanzahl | 20 |
| 4 DISKUSSION | 29 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG | 38 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 39 |
| DANKSAGUNG | 49 |

| | | |
|----------------------------|-------------------|----|
| LEBENS LAUF | RICHARD V. LOSSOW | 50 |
| EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG: | | 51 |

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der Versuchsergebnisse _____21

Abbildungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: Östrogensynthese (nach Keller, Thieme, 1991) | 4 |
| Abb. 2: Letrozol | 6 |
| Abb. 3: Hippocampus | 9 |
| Abb. 4: Vergleich zweier paralleler, elektronenmikroskopischer Bilder | 20 |
| Abb. 5: Graphische Darstellung der gesamten Versuchsreihe | 22 |
| Abb. 6: Darstellung der einzelnen Östrogenvorstufen | 23 |
| Abb. 7: Hemmstoffe der einzelnen Östrogenvorstufen | 24 |
| Abb. 8: Gegenüberstellung von Hemmstoff und Östrogenvorstufe | 24 |
| Abb. 9: Rescuedarstellung der Versuchsreihe | 25 |
| Abb. 10: Östrogenvorstufen in Kombination mit Letrozol | 26 |
| Abb. 11: Letrozolwirkungen mit und ohne Steroidzusatz | 27 |
| Abb. 12: Östrogenrescue | 28 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|------------------------------------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| AMPA-Rezeptor | α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure |
| ANOVA | analysis of variance (Varianzanalyse) |
| Aro | Aromatase |
| Aufl. | Auflage |
| Bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| MP | cyclic adenosine monophosphate |
| ca. | circa (ungefähr) |
| Ca ²⁺ | Kalziumion |
| CA1 | Cornu ammonis 1 |
| CA2 | Cornu ammonis 2 |
| CA3 | Cornu ammonis 3 |
| cAMP | Cyclo Adenosinmonophosphat |
| CD | cluster of differentiation |
| cm | Zentimeter |
| d | day/days |
| d.h. | das heißt |
| DHEA | Dehydroepiandrosteron |
| EDTA | ethylene diamine tetraacetic acid |
| ER | Östrogenrezeptor/-en |
| ER α | Östrogenrezeptor alpha |
| ER β | Östrogenrezeptor beta |
| et al. | et alii (und andere) |
| etc. | et cetera (und so weiter) |
| GABA | Gamma-Aminobuttersäure |
| GAP43 | growth-associated protein 43 |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein |
| GnRH | gonadoliberin-releasing-hormon |
| GPR30 | G Protein-coupled Receptor 30 |

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| h | hour (Stunde) |
| HBSS | Hanks Balanced Salts |
| HCl | Salzsäure |
| ICI 182,780 | Östrogenantagonist am zytosolischen und membranständigen Östrogenrezeptor |
| Ig | Immunglobulin |
| IP ₃ | Inositole 1,4,5-triphosphate |
| kDA | Kilodalton |
| KM | Kulturmedium |
| l | Liter |
| LSD | least significant difference |
| LTP | Long Term Potentiation |
| LTD | Long Term Depression |
| M | Molar |
| MAP | mitogen activated protein |
| MAP ₂ | microtubule-associated protein 2 |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| mol | Mol(1mol = 6.023 x 10 ²³ Teilchen) |
| mRNA | messenger-ribonucleic acid |
| n | Anzahl |
| NaOH | Natriumhydroxid (Natronlauge) |
| Nm | Nanometer |
| NMDA | N-methyl-d-aspartat |
| NMDAR | N-methyl-d-aspartat receptor |
| Nr. | Nummer |
| Nr2A | NMDAR-Untereinheit liegt innerhalb der Synapsen |
| Nr2B | NMDAR-Untereinheit liegt außerhalb der |

| | |
|-------|---------------------------------------------|
| OmU3 | Synapsen |
| P | Ultradünnschnittgerät |
| pH | Pigment |
| PBS | pondus Hydrogenii |
| PB | Phosphate Buffered Saline |
| RT | Phosphate Buffered |
| S. | Raumtemperatur |
| Scc | Seite |
| sd | side chain cleavage enzyme |
| SEM | standard deviation |
| siRNA | standard deviation of mean |
| SPSS | small interfering RNA |
| StAR | Statistical Package for the Social Sciences |
| u.a. | steroidogenic acute regulatory protein |
| ZNS | unter anderem |
| | zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

Die Substanzklasse der Steroide besitzt eine Vielzahl an cerebralen Wirkungen. Diese Eigenschaften sind durch zahlreiche Studien belegt (Baulieu, 1997; Behl und Manthey, 2000; Cambiasso et al., 2000; Stoffel-Wagner, 2001).

Einen wesentlichen Gegenstand aktueller Forschung stellen Östrogene dar, welche zur Klasse der Steroide gehören. Neben ihren Eigenschaften als Sexualhormon, bzw. ihrer Bedeutung für die weibliche Reproduktionsbiologie, besitzen sie auch neuroprotektive Eigenschaften. So sollen Östrogene das Risiko an Alzheimer oder Schizophrenie zu erkranken senken. Darüber hinaus wird ihnen ein positiver Einfluss auf die Regeneration traumatischer, neuronaler Verletzungen z.B. nach einem Schlaganfall, zugeschrieben (Garcia-Segura et al., 2001; Cho et al., 2003; Saunders-Pullman, 2003). Auch bei der Entwicklung des ZNS gilt Estradiol als wichtiger Differenzierungsfaktor (Beyer, 1999). Daneben konnten zahlreiche Studien eine Erhöhung der synaptischen Plastizität in hippocampalen Geweben und durch Östrogene zeigen (Woolley und McEwen, 1993; Murphy und Segal, 1996; Lee und McEwen, 2001; McEwen, 2002; Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2004). Neuesten Untersuchungen zufolge haben endogen produzierte Östrogene sogar eine heilende und schützende Funktion bei Epilepsie. Mit Östrogenen Epilepsie zu behandeln, könnte daher ein neuer therapeutischer Ansatz sein (Zhou et al., 2007). Die meisten dieser Effekte wurden am Hippocampus untersucht.

Auch wenn viele der molekularbiologischen Mechanismen für neuroprotektive Effekte von Östrogenen noch nicht hinreichend aufgeklärt sind, so wurde doch von Yokomaku und Mitarbeitern z.B. in Kulturen hippocampaler Neurone gezeigt, dass Östrogene präsynaptische Funktionen über eine vermehrte Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat steigern sowie die Hochregulierung präsynaptischer Proteine, wie Synapsin, Synaptophysin, Synaptotagmin und Syntaxin bewirken (Yokomaku et al., 2003; Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004). Eine Blockierung des NMDA-Rezeptors (des Rezeptors für den erregenden Transmitter Glutamat) führte zu einer Blockade der östrogeninduzierten Synaptogenese an dendritischen Spines. Nach Östrogenbehandlung war die NMDA-Rezeptordichte erhöht (McEwen, 2002).

1.1 Östrogenwirkung auf Neurotransmittersysteme

Östrogene bewirken durch indirekte Acetylcholinbildung eine Verbesserung kognitiver Fähigkeiten bei weiblichen Ratten (McEwen, 2002; Dominguez et al., 2004). Im serotonergen System bewirken sie u.a. eine Regulierung des „serotonin reuptake transporters“ und üben so Einfluss auf Stimmungen, Lernen und Gedächtnis aus (McQueen et al., 1997). Im dopaminergen System sind Östrogeneinflüsse auf Dopaminsynthese und -freisetzung sowie Dopaminrezeptoren beschrieben (McEwen und Alves, 1999; Cyr et al., 2002). Entsprechende Auswirkungen auf Parkinson werden noch diskutiert.

1990 wurde von Gould, Woolley und Mitarbeitern zum ersten Mal gezeigt, dass bei ovariectomierten, weiblichen Ratten eine Abnahme der Spinesynapsendichte im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus zu beobachten war (Gould et al., 1990). Im Gegenzug führte eine anschließende, systemische Östradiolapplikation zu einer Hochregulation jener Spinesynapsen. Eine Variabilität der Spinesynapsendichte in Abhängigkeit von schwankenden Östrogenspiegeln während des Östrogenzyklus weiblicher Ratten konnte von Woolley et al. ebenfalls 1990 entdeckt werden (Woolley et al., 1990). Diese Ergebnisse ließen zunächst die Schlussfolgerung zu, dass eine systemische Östradiolapplikation einen direkten positiven Effekt auf die Spinebildung im Hippocampus haben könnte. Untersuchungen an subkortikalen Strukturen, wie z.B. der medianen Raphe zeigen jedoch, dass systemische Östrogeneffekte wohl eher über verschiedene subkortikale Regionen vermittelt werden (Lam und Leranth, 2003; Prange-Kiel et al., 2004). Auch die Arbeiten von Kretz und Mitarbeitern können einen signifikanten Einfluss von exogenen Östrogenen auf die hippocampale Spinesynapsenentstehung nicht bestätigen (Kretz et al., 2004). Hier wird eher die Bedeutung der endogenen Östrogenproduktion im Hippocampus zunehmend deutlich. Endogene Östrogene induzieren im Hippocampus die Synthese von synaptischen Proteinen (Kretz et al., 2004). Indirekte Effekte führen zu morphologischen Änderungen hippocampaler Neurone (Prange-Kiel et al., 2004).

Amateau und McCarthy entdeckten 2002, dass Östrogene in der präoptischen Region von Ratten die Synthese von Prostaglandin E₂ induzieren, was zu einer Erhöhung der Spinedichte führt (Amateau und McCarthy, 2002).

In der CA3-Region des Hippocampus (s. Abb.3, S.9) ist im Vergleich zur CA1-Region eine erhöhte Expression von ER α , ER β und Synaptophysin zu finden (Rune et al., 2002). In Slicekulturen konnte nun durch Östrogengabe eine Hochregulation von ER α in CA3 und eine Hochregulation von Synaptophysin im Stratum radiatum von CA1 beobachtet werden, wo die Schaffer-Kollaterale (Axone der CA3-Neurone zur CA1-Region) enden (Rune et al., 2002). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Östrogene hier direkt auf die CA3-Region wirken und so indirekt eine Erhöhung präsynaptischer Markerproteine in den Schaffer-Kollateralen bewirken. Es konnte nach diesen Ergebnissen vermutet werden, dass östrogeninduzierte Spinebildung über präsynaptische Markerproteine vermittelt wird.

Mit dem kürzlich erbrachten Nachweis der endogenen Östrogensynthese im Hippocampus gelang ein weiterer Schritt zur Aufdeckung des Zusammenhangs zwischen dem Hippocampus und Östrogenen (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004). Durch diese Studie konnte belegt werden, dass Östrogene die ER α -Expression erhöhen, die der ER β -Expression jedoch erniedrigen. Der reversible Aromatasehemmer Letrozol ließ ein reziprokes Verhalten erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Östrogene im Hippocampus auto- und parakrin wirken. Zahlreiche, frühere Studien belegten bereits, dass die für die Östradiolsynthese nötigen Enzyme in den Neuronen des Hippocampus vorhanden sind (Furukawa et al., 1998; Zwain und Yen, 1999; Mellon und Vaudry, 2001; Stoffel-Wagner, 2001; Wehrenberg et al., 2001).

1.2 Östrogensynthese im Hippocampus

Die Synthese aller Steroide beginnt in den Neuronen mit der Bereitstellung von Cholesterol, welches durch Gliazellen produziert wird, durch apoE enthaltende Lipoproteine dann zur äußeren Mitochondrienmembran transportiert wird und dort mittels des Proteins Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran gelangt.

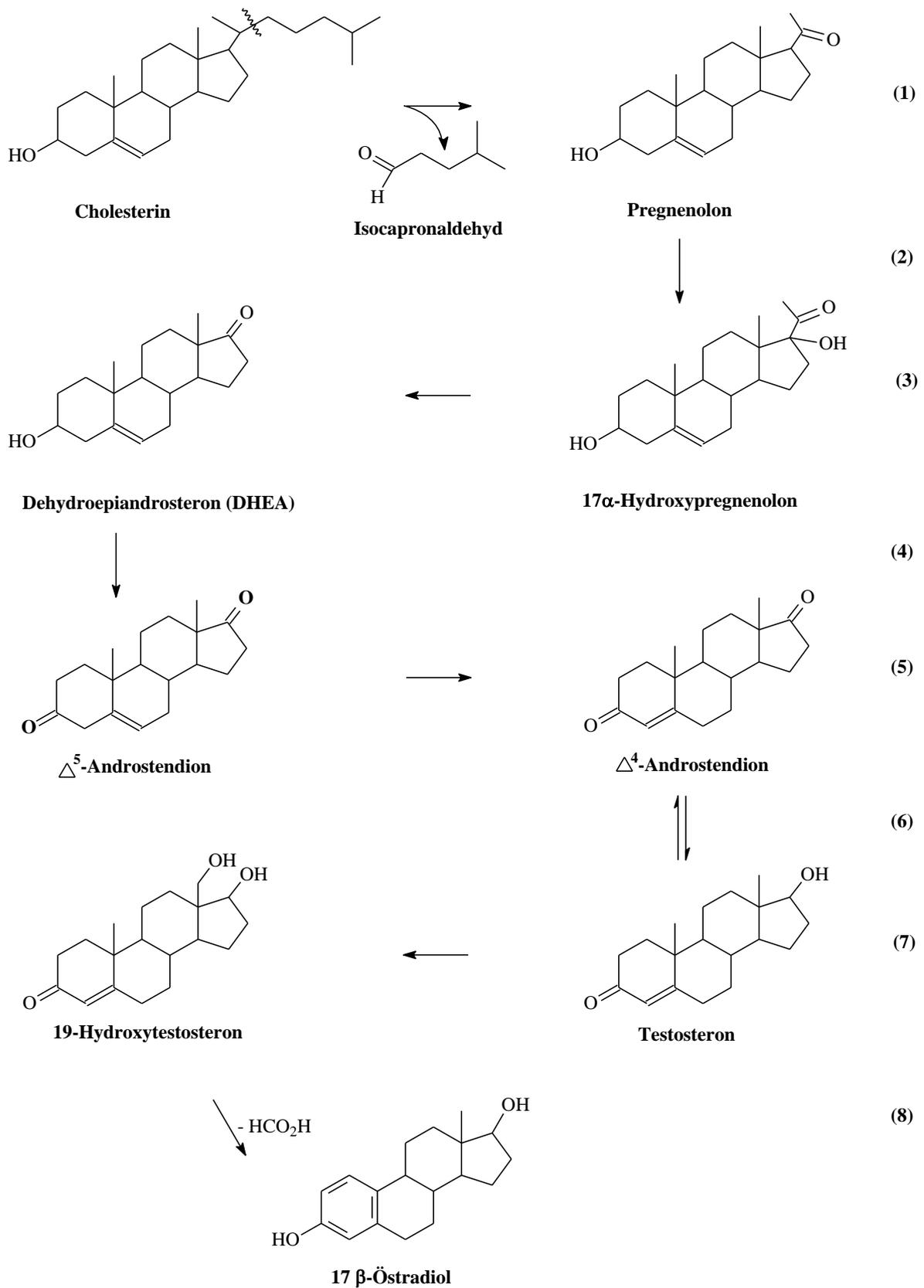


Abb. 1: Östrogensynthese (nach Keller, Thieme, 1991)

(1) Nach diesem *rate limiting step* wandelt die Hydroxylase P450_{scc} (side chain cleavage), ein Enzym aus der Familie der Cytochrom P450 Enzyme, welches

durch ein einzelnes Gen (CYP11A1-Gen) auf dem Chromosom 15 lokalisiert ist, Cholesterol in Pregnenolon um.

(2;3) Das Enzym Cytochrom P450_{c17} (17alpha Hydrolase/ c17,20-Lyase) katalysiert die irreversible Umwandlung über den Zwischenschritt 17-Hydroxy-Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA).

(4) Aus DHEA wird nun in einem reversiblen Schritt Androstendion mittels der 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase gebildet, welche nicht zur Gruppe der P450 Enzyme gehört.

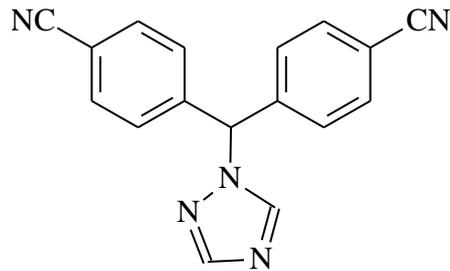
(5) Durch einen Umlagerungsschritt entsteht durch die Isomerase aus Δ⁵-Androstendion Δ⁴-Androstendion.

(6) Die 17β-Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, ebenfalls nicht zu der Gruppe der P450 Enzyme gehörig, ist für die irreversible Synthese des Testosterons verantwortlich.

(7;8) Im letzten Schritt der Östradiolsynthese katalysiert das Enzym Cytochrom P450_{aro} (CYP19A1, Aromatase) reversibel die Abspaltung der C19-Methylgruppe und die Aromatisierung des Ringes A, woraus dann 17β-Estradiol entsteht.

1.3 Inhibitoren der hippocampalen Estradiolsynthese

Mittlerweile sind eine Reihe verschiedener, nichtsteroidaler, reversibler Aromataseinhibitoren gefunden worden: Aminoglutethimid (Orimeten), Anastrozol (Arimidex) und Letrozol (Femara) sind in der Lage, mit ihrer hemmenden Untereinheit kompetitiv an die Aromatase zu binden, wodurch deren katalytische Interaktion verhindert wird.



Letrozol

Abb. 2: Letrozol

In einer *in vivo* Testreihe erwies sich Letrozol als ein 10000-fach potenterer Inhibitor als Aminoglutethimid und 10-fach stärker in seiner Wirkung als Anastrozol (Smith, 1999).

Demnach ist Letrozol der potenteste und wirkungsvollste der aufgeführten Aromataseinhibitoren. Ein weiterer Vorteil ist die kompetitive Inhibition, da hier nach Entfernung des Letrozol die *de novo*-Synthese von Estradiol erneut beginnen kann, weil eine reversible Bindung vorliegt. Darüber hinaus unterliegen andere Syntheseleistungen der Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit keiner Hemmung durch Letrozol, da keine Wechselwirkung mit anderen Enzymen bekannt ist (Smith, 1999).

Darüberhinaus findet Letrozol auch in der Rezidivprophylaxe des Mammakarzinoms Verwendung, da Mammakarzinome häufig ER-positiv sind und somit Östradiol als ein die Prognose des Patienten verschlechterndes Wachstumsstimulans wirkt. Letrozol kommt bei der Therapie des metastasierten, postmenopausalen Mammakarzinoms zum Einsatz (Thiantanawat et al., 2003).

1.4 Neuronenwachstum und Apoptose in Abhängigkeit von Östrogenen

In aktuellen Studien ist der Einfluss von Östrogenen auf Neurogenese und Apoptose im Hippocampus untersucht worden (Fester et al., 2006). Die Ergebnisse zeigen, dass Neurogenese und Apoptose im Hippocampus eine begrenzte Östrogenkonzentrationsspanne erfordern, welche durch

hippocampale und nicht durch gonadale Zellen bereitgestellt wird. Durch Letrozolbehandlungen oder siRNA gegen StAR (StAR transportiert Cholesterol von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran), kommt es zu vermehrter Apoptose und einer Verminderung von proliferativen Körnerzellen. In Rescue-Experimenten kann dieser Effekt durch Östradiol wieder aufgehoben werden. (Tanapat et al., 2005).

1.5 Axonwachstum in hippocampalen Neuronen

GAP-43 ist ein in den Wachstumskolben von Axonen vorkommendes Protein, das als Marker für Axonwachstum genutzt werden kann, um damit Auswirkungen von Östrogenen auf Axonwachstum im Hippocampus zu untersuchen.

Östrogene bewirken eine vermehrte Expression von GAP-43 im heranwachsenden und erwachsenen Gehirn (Lustig et al., 1991; Ferrini et al., 2002).

Untersuchungen an hippocampalen und hypothalamischen Dispersionskulturen konnten eine östradiolinduzierte Hochregulierung von GAP-43 bestätigen. Läsioneninduziertes Wachstum war in ovariectomierten Ratten gehemmt und konnte durch systemische, physiologische Östrogenkonzentrationen wieder aufgehoben werden (Garcia-Segura, 2001). Entorhinale Kortexläsionen führen wahrscheinlich zu einer Herunterregulierung der hippocampalen Östrogensynthese. Demnach imitieren niedrige Östrogenkonzentrationen (ovarektomiert) eine derartige Situation. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede zwischen gemäßigten (di-oestrus-level) und hohen Östrogenkonzentrationen (pro-oestrus-level) hinsichtlich des Axonwachstums gefunden werden. Niedrige Östrogenserumkonzentrationen zeigten keine Effekte. Hier wird ein weiteres Mal die herausragende Rolle von im Hippocampus synthetisierten Östrogenen bei der Vermittlung neuronaler Plastizität und der Umgestaltung des Gyrus dentatus deutlich. Axonwachstum und GAP-43 Expression waren in Abhängigkeit von Letrozol und nach Knock-down von StAR signifikant reduziert. Niedrige Östrogenserumkonzentrationen, die auf periphere Ursprünge zurückzuführen sind, haben keinen Effekt, während die endogene Östrogensynthese und hohe exogene Dosen

Neuritenwachstum regulieren. Diese Effekte werden über den klassischen Weg der Östrogenrezeptoren vermittelt (von Schassen et al., 2006).

Diese Befunde bestätigen den Einfluss von Östrogenen auf neuronale Plastizität mittels GAP-43-Expression und die herausragende Rolle von hippocampalem Östradiol.

1.6 Genomische und nichtgenomische Wirkungsweisen von Östrogenen

Im klassischen Sinne wird davon ausgegangen, dass Östradiol an zytosolische Rezeptoren bindet, von denen zwei Isoformen bekannt sind (ER α und ER β) und welche zur Gruppe der Steroide gehören. Ligandenaktivierte Rezeptordimere gelangen in den Zellkern, wo die Transkription entsprechender Zielgene durch Bindung an spezifische DNS-Sequenzen stattfindet. ER α und ER β weisen trotz hoher Homologie im Aufbau einige Unterschiede auf. So hat 17 β -Östradiol z.B. eine höhere Affinität zum ER α (Rune et al., 2002). Diese als klassische oder als genomisch bezeichneten Effekte beeinflussen die *de novo* Proteinsynthese, welche erst nach Stunden oder Tagen ihre Wirkung entfaltet (Beyer, 1999; Behl und Manthey, 2000; Lee und McEwen, 2001).

Neben diesen genomischen Wirkungen von Östrogenen sind mittlerweile auch eine Vielzahl nichtgenomischer Effekte beschrieben worden. So ist Estradiol innerhalb von Sekunden in der Lage, die Physiologie von Nervenzellen zu verändern. Beispielhaft seien hier die Stimulation der cAMP- und IP₃ – Produktion, die Aktivierung des MAP-Kinaseweges und die Erhöhung des Ca²⁺-Ausstromes aus dem endoplasmatischen Retikulum über den IP₃-Signalweg aufgeführt (Beyer, 1999). Als Mediatoren für diese Form der Östrogenwirkung werden u.a. membranständige Rezeptoren (z.B. GPR30) postuliert (Behl und Manthey, 2000; Lee und McEwen, 2001; McEwen, 2002; Toran-Allerand et al., 2002; Beyer et al., 2003; Farach-Carson und Davis, 2003; Walters und Nemere, 2004; Revankar et al., 2005). Die Wirkungen über diese membranständigen Rezeptoren setzen innerhalb von Sekunden bis Minuten ein und werden als „rapid effects“ den genomischen Wirkungen gegenübergestellt.

1.7 Der Hippocampus

Der vom Archipallium phylogenetisch abstammende Hippocampus der Ratte befindet sich im Gegensatz zu dem des Menschen weiter oberhalb, links und rechts des Balkens und dicht unter dem Kortex. Die mikroskopische Struktur hingegen ist der menschlichen sehr ähnlich und lässt ein Pyramidenzellband erkennen, welches sich in drei Abschnitte gliedern lässt.

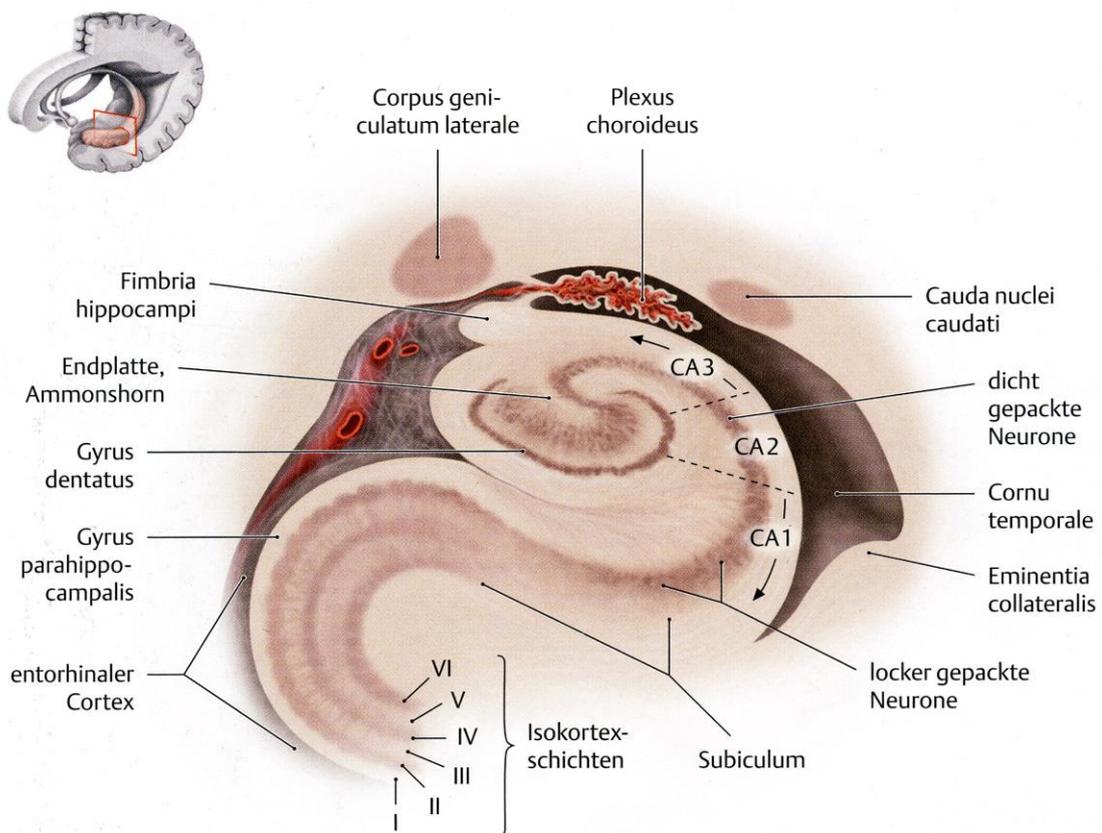


Abb. 3: Hippocampus

Quelle: Prometheus Lernatlas der Anatomie, Thieme New York 2006,
M.Schünke, E. Schulte, U. Schumacher (Hrsg), S.375

In der CA1-Region befinden sich vorwiegend kleine Pyramidenzellen. An diesen schließen sich die großen Pyramidenzellen der CA2-Region an, die eine sehr dichte Struktur bilden. Darauf folgt die CA3-Region mit einer lockeren Anordnung großer Pyramidenzellen. Das auslaufende Pyramidenzellband wird von einem schmalen Band dicht gepackter Körnerzellen umgriffen, dem Gyrus

dentatus. Die Pyramidenzellen bilden das Stratum pyramidale et oriens. Dieses Stratum pyramidale wird durch die Strata oriens et radiatum umschlossen.

Kleine (Körnerzellen des Gyrus dentatus) und große (Pyramidenzellen) Neurone sowie Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) sind die zellulären Bestandteile des Hippocampus. Gliazellen sind für die Funktion der Neurone wichtig, da sie neben ihrer konstitutionellen Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke (Astrozyten) die Pyramidenzellen einerseits vor neurotoxischen Substanzen schützen und andererseits mit Hormonen und Nährstoffen wie z.B. Glukose und Cholesterol versorgen. Diese Nährstoffe könnten dann nicht nur für den Eigenbedarf der Neurone, sondern auch für den Aufbau von Hormonen, wie z.B. Estradiol, genutzt werden.

Afferente Fasern erhält der Hippocampus aus der Regio enthorhinalis. Es sind Impulse aus dem Riechhirn und dem Neokortex sowie afferente Fasern aus dem Gyrus cinguli und dem Septum, die somatische, visuelle, auditorische, olfaktorische und motorische Informationen übertragen. Diese Fasern enden in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und im Ammonshorn. Deren Axone haben als Moosfasern Kontakt mit den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen. Von den Axonen der CA3-Pyramidenzellen gehen rückläufig die Schaffer-Kollaterale ab, die mit den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen Synapsen bilden.

Die Efferenzen verlaufen nahezu alle in den Fornix, der wiederum Fasern an den Thalamus, den Hypothalamus und das Septum abgibt. Ein Teil der Fasern des Fornix laufen in die Corpora mammillaria, wo sich nun der „Papez-Neuronenkreis“ erkennen lässt.

Der Hippocampus projiziert über den Fornix in die corpora mammillaria, welche über das Vicq-d'Azyr-Bündel (Tractus mamillothalamicus) die nuclei anteriores des dorsalen Thalamus erreichen und von dort aus über den Gyrus cinguli wieder zurück in den Hippocampus gelangen. Dieser Neuronenkreis soll eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Langzeitgedächtnisses spielen.

Astrozyten und Gliazellen spielen bei der Versorgung der Neurone eine wichtige Rolle. Glukose, Cholesterol und auch Hormone werden durch das Endothel der Gefäße zu den Neuronen transportiert. Die Stoffe werden von den Neuronen zur Energiegewinnung, für den Auf- und Abbau von Proteinen, zur

Funktionsaufrechterhaltung sowie für die *de novo*-Synthese von Hormonen wie Östrogen genutzt.

1.8 Definition, Variabilität und Funktionen von Synapsen

Die terminalen Aufzweigungen (Telodendron) eines Axons weisen kleine, knötchenförmige Auftreibungen auf, welche als synaptische Endknöpfchen bezeichnet werden. Diese bilden zusammen mit der Zellmembran der nachfolgenden Zelle und dem dazwischen liegenden Spalt die sogenannten Synapsen. Hier findet die Erregungsübertragung von einem Neuron zum nächsten statt. Eine an den Endknöpfchen ankommende Erregung führt zu einem Einstrom von Kalziumionen an der präsynaptischen Zellmembran. Dies führt zu einer Verschmelzung von synaptischen Vesikeln, welche sich in den Endknöpfchen befinden. Darauf folgt eine Ausschüttung von Transmittern in den synaptischen Spalt, welche erregend oder hemmend auf die Rezeptoren der nachfolgenden Zelle wirken kann.

Man unterscheidet drei Formen von Synapsen: Boutonsynapsen, Schaftsynapsen und Spinesynapsen. Spinesynapsen sind der überwiegend vorkommende Synapsentyp im ZNS.

Spines sind kleine Vorsprünge auf der Oberfläche von Dendriten und stellen die postsynaptische Komponente von exzitatorischen Synapsen dar. Ihr Cytoskelett besteht hauptsächlich aus Actinfilamenten und ihre ausgedehnten Köpfe sind über einen schmalen Hals mit einem Dendriten verbunden. Jeder Spine kann zum Teil als unabhängige Einheit angesehen werden (Ethell und Pasquale, 2005).

Sie vermehren sich auf dendritischen Schäften und ihre Anzahl erreicht im frühen Leben ein Maximum, welches dann im Erwachsenenalter auf ein konstantes Niveau abfällt. Der genaue Zeitpunkt, in der sich die Spinedichte ändert, variiert unter den verschiedenen Spezies (Galofre und Ferrer, 1987; Petit et al., 1988; Lubke und Albus, 1989; Anderson et al., 1995), bzw. zwischen männlichen und weiblichen Individuen innerhalb einer Spezies. Jedoch ist bei allen ein ähnliches Entwicklungsprofil erkennbar (Munoz-Cueto et al., 1990).

Um die Jahrhundertwende entdeckte Ramon y Cajal Spines, (Ramon y Cajal, 1893), welche einige Jahre später aufgrund ihrer verschiedenen Formen in vier

verschiedene Gruppen eingeteilt wurden: Dünn, pilzförmig, wurstfingerartig und verzweigt (Jones und Powell, 1969; Peters und Kaiserman-Abramof, 1970).

Die Ergebnisse von Harris und dessen Mitarbeitern lassen vermuten, dass sich in der CA1-Region des Hippocampus zunächst Schaftsynapsen bilden, welche sich dann über „wurstförmige“ bzw. pilzartige, schließlich zu dünnen und verzweigten Spines weiterentwickeln (Harris und Stevens, 1989).

Zev Parnass und dessen Mitarbeiter vertreten jedoch die Ansicht, dass verschiedene Spinepopulationen das Ergebnis von morphologischen Änderungen eines einzelnen Spines innerhalb einer gewissen Zeitspanne sein könnten (Parnass et al., 2000).

Muller und Mitarbeiter gehen davon aus, dass morphologische Änderungen von Spines mit Langzeitpotenzierungen (LTP) assoziiert sind (Muller et al., 2000). Darüber hinaus machen sie deutlich, dass synaptische Aktivität und Kalzium zu Formänderungen und Neubildungen von Spines führen und dass diese möglicherweise auch zur Erhöhung der synaptischen Transmission beitragen.

Durch die Elektronenmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass dendritische Spines hauptsächliche Ziele exzitatorischer Synapsen im ZNS sind (Gray, 1959). Strukturänderungen im Halsbereich eines Spines wurden mit Modulationen synaptischer Übertragungen assoziiert (Scheibel und Scheibel, 1968; Harris und Stevens, 1989; Desmond und Levy, 1990). In der CA1-Region des Hippocampus haben Spines einen „Halsdurchmesser“ von 0,4-0,5 μm , während ihre Länge zwischen 0,2-2 μm schwankt. Der Körperdurchmesser schwankt zwischen 0,32 μm und 0,85 μm (Harris und Stevens, 1989).

1.9 Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit werden zum Einen die Auswirkungen der endogenen und exogenen Östradiolbildung hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Bildung von Spinesynapsen gegenübergestellt. Zum Anderen soll geprüft werden, ob sich bei den jeweiligen Vorstufen der Östrogensynthese Unterschiede hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Zahl der Spinesynapsen ergeben. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob die Aktivität der Aromatase den entscheidenden Schritt bei östrogeninduzierter Bildung von Spinesynapsen darstellt. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden u.a. die Auswirkungen der einzelnen Östrogenvorstufen

untersucht, welche durch eine vermehrte Substratbereitstellung für die Aromatase eine Effizienzsteigerung möglich machen.

2 Methoden

2.1 Hippocampale Slicekultur

2.1.1 Präparationstechnik des Hippocampus der Ratte

Die Hippocampi wurden unter semisterilen Bedingungen präpariert (Heimrich und Frotscher, 1994). Es wurden dabei drei bis fünf Tage alte, sowohl männliche als auch weibliche Ratten decapitiert. Anschließend wurde die Haut des Schädeldachs vom Nacken aus aufgetrennt. Mit einer feinen Schere wurde der Schädel geöffnet, um dann das Gehirn mittels eines Heidemannspatels herauszulösen und es auf einem PBS getränkten Schwämmchen zu platzieren. Die beiden Hemisphären wurden voneinander getrennt, nachdem das Kleinhirn mittels eines Skalpells entfernt wurde. Diesem Schritt folgte die Präparation beider Hippocampi mit einem Heidemannspatel unter Stereolupeneinsicht. Diese Präparation und die anschließende Kultivierung wurden in Anlehnung an die Methode von Stoppini durchgeführt (Stoppini et al., 1991).

Mit einem Tissue Chopper (H.Sauer) konnten die einzelnen Hippocampi nun in 400µm dicke Frontalschnitte zerteilt werden. Die ausgewählten Schnitte wurden für 30-60 Minuten in ein auf 4°C gekühltes Präparationsmedium gegeben (Minimal Essential Medium, MEM und 2mM glutamine). Anschließend wurden die Schnitte mit einem Heidemannspatel unter einer Stereolupe voneinander getrennt. Ungefähr 10 Slices wurden im Folgenden auf einem Kultursieb verteilt, wobei die Slices glatt auf diesem liegen mussten. Diese Slices wurden nun in eine 6 well Platte gesetzt, mit MEM-Inkubationsmedium versetzt und anschließend in den Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% gestellt. Pro well benötigt man 1.0-1.2 ml Medium. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Mit der Stimulation wurde nach vier Tagen begonnen.

2.1.2 Kultivierung der Slicekulturen mit verschiedenen Metaboliten der Steroidbiosynthese

Die Slicekulturen wurden nach oben beschriebener Präparation und anschließender Vorbereitung in den Brutschrank überführt. Das Inkubationsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis am vierten Tag mit der Stimulation begonnen werden konnte. Dabei ist einer well jeweils ein Substrat aus folgender Liste zugeteilt worden (Cholesterol, Mevastatin, Cholesterol/Mevastatin, Testosteron, Trilostan, Testosteron/Trilostan, Östrogen, Letrozol, Östrogen/Letrozol, Cholesterol/Letrozol, Testosteron/Letrozol). Die Konzentrationen der zugesetzten Substanzen betragen $10^{-7}M$. Diese Behandlung wurde nach zwei Tagen noch einmal wiederholt. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, konnte zunächst mit PBS (Phosphatpuffer: $NaH_2HPO_4= 0.5M$, $Na_2HPO_4 = 0.5M$) bei $37^{\circ}C$ zweimal, dann mit PBS bei $4^{\circ}C$ einmal gespült werden. Im nächsten Schritt folgte die Fixierung mit 2.5 %-iger Glutaraldehydlösung für drei Stunden bei $4^{\circ}C$ und einem pH-Wert von 7.4. Im Folgenden wurde ein weiteres Mal mit 0.1M Phosphatpuffer bei $4^{\circ}C$ gespült. Eine aufsteigende Alkoholreihe (beginnend mit 30%) wurde zum Flüssigkeitsentzug angeschlossen. Abschließend wurden die fixierten Slices flach zwischen zwei Folien in Epon 820 eingebettet.

2.2 Semidünnschnitte

Mittels eines Diamanten wurden $1\mu m$ dicke Schnitte auf einem Reichert-Jung OmU3 Ultramikrotom angefertigt. Anschließend folgte eine schwimmende Färbung mit 1%iger Toloidinblaulösung sowie ein paar Tropfen Pyronin zum Erreichen einer Zweifarbigkeit. Diese Färbung musste im Heißen ($60-80^{\circ}C$) erfolgen. Im weiteren Verlauf wurde dann filtriert.

2.3 Ultradünnschnitte, elektronenmikroskopische Bilder und deren Auswertung

Die einzelnen Blöcke wurden so zurechtgeschnitten, dass nur das Stratum pyramidale und das Stratum radiatum der CA1-Region erhalten blieben. Anschließend wurden ca. 90nm dicke Ultradünnschnitte aus den Semidünnschnitten angefertigt. Dabei wurden Serien von paarigen

Ultradünnschnitten angefertigt, welche aus dem oberen und mittleren Drittel der CA1-Region des Stratum radiatum stammten. Das CM 100, PW 6021 Elektronenmikroskop von Philips besaß eine 6600-fache Vergrößerung. Regionen mit großen Dendriten oder Blutgefäßen wurden ausgespart, um so eine mögliche Fehlerquelle beim späteren Auszählen zu minimieren. Um objektive Messungen zu erhalten, wurde die Disectortechnik angewendet (Sterio, 1984). Es wurden jetzt lediglich die Spinesynapsen gezählt, die nur in einem der Bilder zu identifizieren waren (Braendgaard und Gundersen, 1986). Anhand von Vesikeln in den terminalen Axonen sowie einer postsynaptischen Dichte konnten die Synapsen eindeutig identifiziert werden. Bei den Auszählungen wurden übereinstimmende Bereiche ausgewählt, diese auf einen Referenzwert umgerechnet, um anschließend eine Vergleichbarkeit unter den Bildern zu erzielen. Die bei den Zählungen entstehenden Standardabweichungsfehler +/- (SEM) wurden mit einkalkuliert. Aus diesen Ergebnissen wurden Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen ermittelt. Im Anschluss daran wurden die Mittelwerte mit ANOVA verglichen, um dann in einem post hoc test (LSD) auf Signifikanz geprüft zu werden. Das zulässige Konfidenzintervall ist standardmäßig auf $p < 0,05$ gesetzt worden.

2.4 Material

2.4.1 Material und Geräte

| | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| AxioCam | HRcZEISS, Oberkochen |
| Brutschrank, WTC | BINDER, Tuttlingen |
| Cryogenic Vials | NALGENE BRAND Rochester, USA |
| Cutfix Scalpell | BRAUN, Melsungen |
| epT.I.P.S. Standard 500-1000µl | EPPENDORF AG, Hamburg |

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| Epon 820 | Serva, Heidelberg, Germany |
| Heidemannspatel M | AESCU LAPDE (Braun), Melsungen |
| Nuclon Surface, 24 Wellplatte | NUNC BRAND PRODUCTS Rochester, USA |
| Stereolupe | ZEISS, Oberkochen |
| Tissue chopper | H. SAUER, USA |
| Wasserbad mit Schüttler | Memmert |
| Semidünnschnittgerät | Leica RM 2065 |
| Ultradünnschnittgerät | Ultra Cut, Reichert-Jung OmU3 |
| Elektronenmikroskop | CM 100, Philips, PW 6021 |

2.4.2 Chemikalien

| | |
|------------------------|-----------------------|
| Cholesterol | C 3045, Sigma-Aldrich |
| Ethanol 70%-ig | Apotheke UKE, Hamburg |
| Glutaraldehyd 2,5 %-ig | Merck |
| HCl 1M | Merck |
| Letrozol | Novartis |
| Mevastatin | M 2537, Sigma Aldrich |
| NaOH 1M | Merck |

| | |
|--------------|-----------------------------|
| Östrogen | E 4389 Beta-Estradiol-Water |
| | Soluble, Sigma-Aldrich |
| Pyronin | Merck |
| Testosteron | T 5035 Sigma-Aldrich |
| Toloidinblau | Merck |
| Trilostan | Sanofi Winthrop 220/510 |

2.4.3 Lösungen und Kulturmedien

PBS (Phosphate Buffered Saline):

8g Natriumchlorid
0.2g Kaliumchlorid
1.44g Dinatriumhydrogenphosphat
0.2g Kaliumhydrogenphosphat
Ad 1000ml mit aqua bidest.
pH 7.4 bei Raumtemperatur

PB (0,1M)

4.9g Kaliumhydrogenphosphat
29.2g Dinatriumhydrogenphosphat
ad 2000ml mit aqua bidest.
pH 7.4 bei Raumtemperatur

Präparationsmedium für Slicekulturen:

Ansatz für 100ml:
50 ml Minimal Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert
1ml Glutamin 200mM, steril
49ml Wasser pro Kultur aqua bidest. Alternativ Tissue culture water, steril

Durch Zugabe von steriler 1M NaOH oder 1M HCl wird das Präparationsmedium auf einen pH-Wert von 7.35 eingestellt.

Das Präparationsmedium wird im Kühlschrank aufbewahrt und sollte zur Präparation 4°C kühl sein.

Kulturmedium für Slicekulturen :

Ansatz für 100ml:

25 ml Minimal Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert

1ml Glutamin 200mM, steril

580µl 7.5%ige Natrium Bicarbonat Lösung, steril

23.42 ml Wasser pro Ansatz oder Tissue Kulturwasser, steril

25ml Hanks Balanced Salts (HBSS)

25ml Pferdeserum, steril, hitzeinaktiviert

Pro well werden 1.0ml Inkubationsmedium eingesetzt

Der pH des Inkubationsmediums muß vor jedem Mediumwechsel neu eingestellt werden mit 1M NaOH, steril oder 1M HCl, steril auf pH 7.4.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Spinesynapsenanzahl

Zunächst wurden wie zuvor beschrieben Slicekulturen angelegt (Stoppini et al., 1991). Nach vier Tagen Inkubationszeit wurde mit der Stimulation begonnen, welche nach zwei Tagen wiederholt wurde. Anschließend folgten Fixierung und Einbettung der verschiedenen Slices. Semidünn- und Ultradünnschnitte schlossen sich danach an. Aus den Ultradünnschnitten konnten elektronenmikroskopische Bilder angefertigt werden, die dann zum Auszählen von Spinesynapsen genutzt wurden. Dabei wurden die Synapsen gezählt, die nur in einem von zwei Parallelschnitten auftauchten.

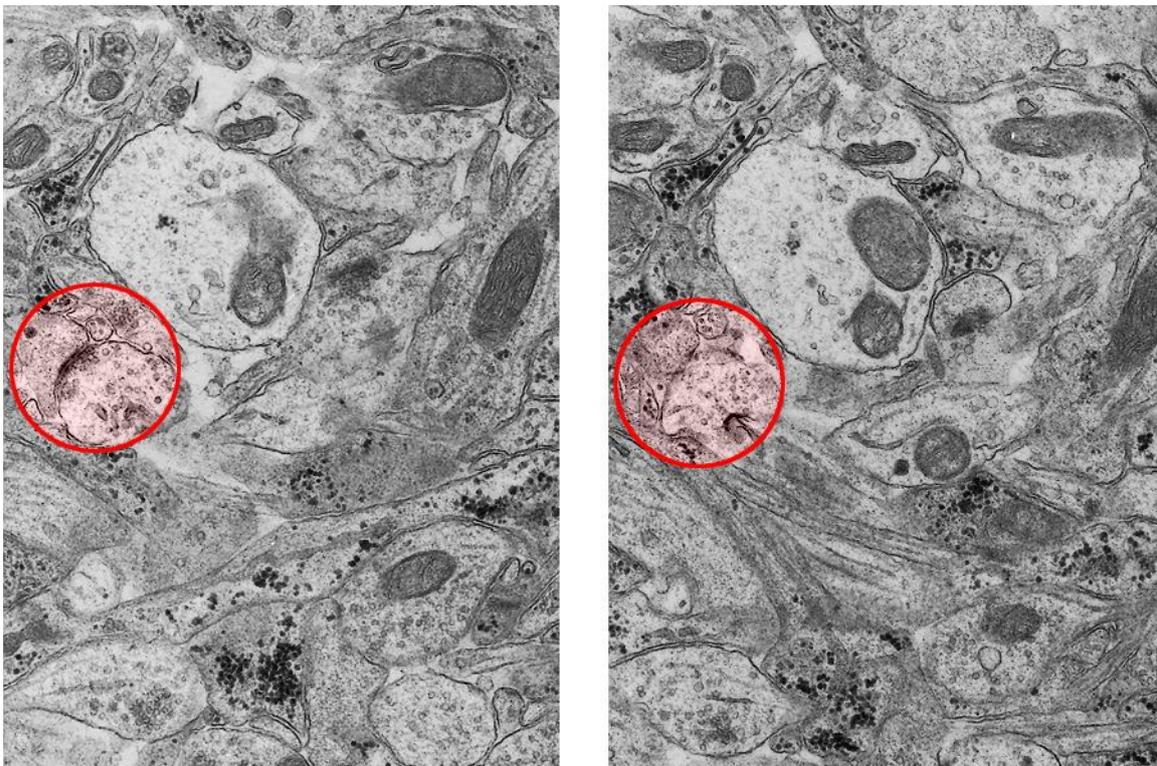


Abb. 4: Vergleich zweier paralleler, elektronenmikroskopischer Bilder

Um einen Vergleich innerhalb der Versuchsreihe zu ermöglichen, wurden die Bildausschnitte, die Verwendung finden konnten, auf eine Fläche von $500\mu\text{m}^2$ umgerechnet. Daran anschließend wurden für die einzelnen Stimulationen die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen errechnet und in den folgenden Diagrammen aufgetragen (* in den folgenden Diagrammen weisen auf Signifikanzen gegenüber der Kontrolle hin $p < 0,05$).

| | Anzahl (n) | Mittelwert Spinesynapsen | Standardabweichung (SD) |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Kontrolle | 40 | 7,1 | 1,1 |
| Cholesterol | 16 | 11,4 | 2,9 |
| Mevastatin | 32 | 4,0 | 1,3 |
| Cholesterol/Mevastatin | 17 | 8,8 | 2,5 |
| Testosteron | 26 | 9,6 | 2,6 |
| Trilostan | 25 | 3,6 | 1,3 |
| Testosteron/Trilostan | 14 | 8,3 | 1,6 |
| Östrogen | 16 | 7,9 | 3,0 |
| Letrozol | 16 | 4,5 | 1,0 |
| Östrogen/Letrozol | 16 | 6,1 | 1,2 |
| Cholesterol/Letrozol | 18 | 4,0 | 1,2 |
| Testosteron/Letrozol | 14 | 5,3 | 1,5 |

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der Versuchsergebnisse

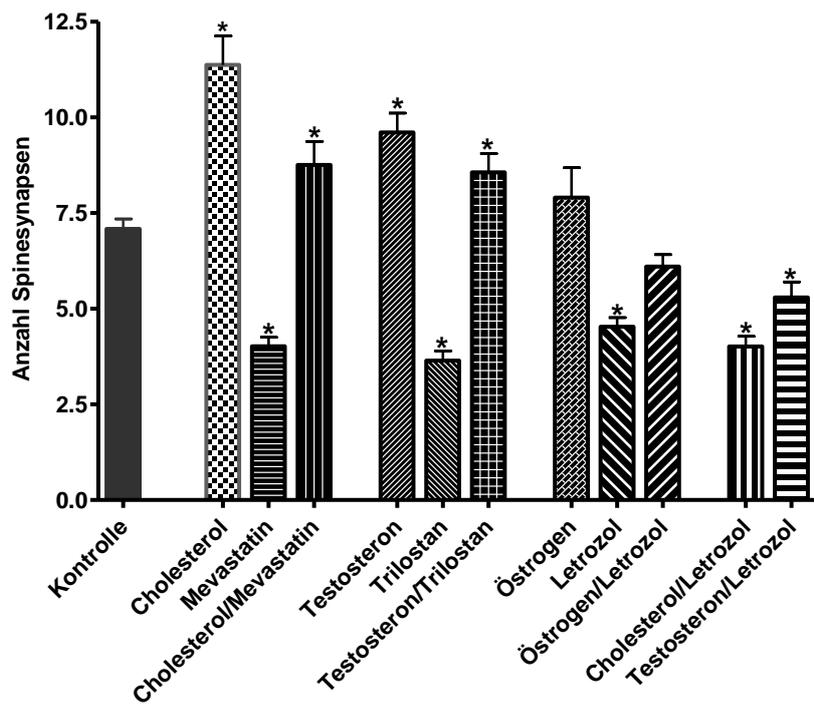


Abb. 5: Graphische Darstellung der gesamten Versuchsreihe

In der Abbildung 5 sind auf der X-Achse zunächst die Kontrolle und anschließend die Metaboliten der Steroidbiosynthese den Synthesestufen nach geordnet dargestellt. Zusätzlich zu den Metaboliten sind die jeweiligen Hemmstoffe einer Östrogenvorstufe sowie der entsprechende Rescue mit aufgenommen worden (z.B. Cholesterol = Östrogenvorstufe, Mevastatin = Cholesterolsynthesehemmer, Mevastatin + Cholesterin = Rescue). Die letzten beiden Komponenten der X-Achse sind Cholesterol bzw. Testosteron in Kombination mit Letrozol, dem reversiblen Hemmer der Östrogensynthese. Diese zusätzliche Versuchsreihe dient der näheren Untersuchung von Letrozol bzw. Cholesterol und Testosteron.

Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Spinesynapsen aufgetragen.

Aus dem Diagramm ist zu entnehmen, dass sich Cholesterol, Mevastatin, Testosteron, Trilostan, Letrozol, Cholesterol/Letrozol und Testosteron/Letrozol gegenüber der Kontrolle signifikant unterscheiden. Unter Cholesterol und Testosteron ist eine signifikante Hochregulierung der Spinesynapsen zu verzeichnen, während Mevastatin, Trilostan, Letrozol bzw. Cholesterol/Letrozol und Testosteron/Letrozol eine signifikante Reduzierung der Spinesynapsen erkennen lassen.

Die Behandlungen der Kulturen mit Östrogen und die Kombination von Östrogen und Letrozol in der Kombination haben zu keiner signifikanten, numerischen Veränderung der Spinesynapsen geführt.

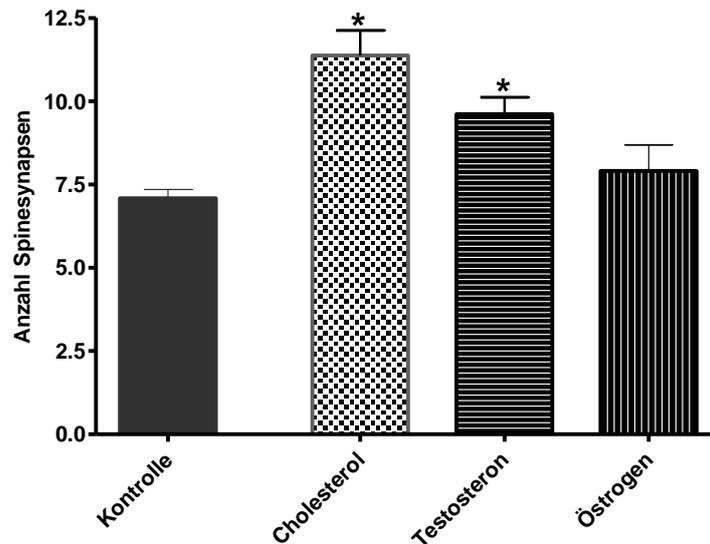


Abb. 6: Darstellung der einzelnen Östrogenvorstufen

In der Abbildung 6 sind die Östrogenvorstufen ihrer Synthesereihenfolge nach geordnet. Wie bereits erwähnt, ist bei Cholesterol und Testosteron eine signifikante Erhöhung der Spinesynapsen, im Gegensatz zu Östrogenen, gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Darüber hinaus ist auffällig, dass Cholesterol zu der größten Hochregulierung der Spinesynapsen führt.

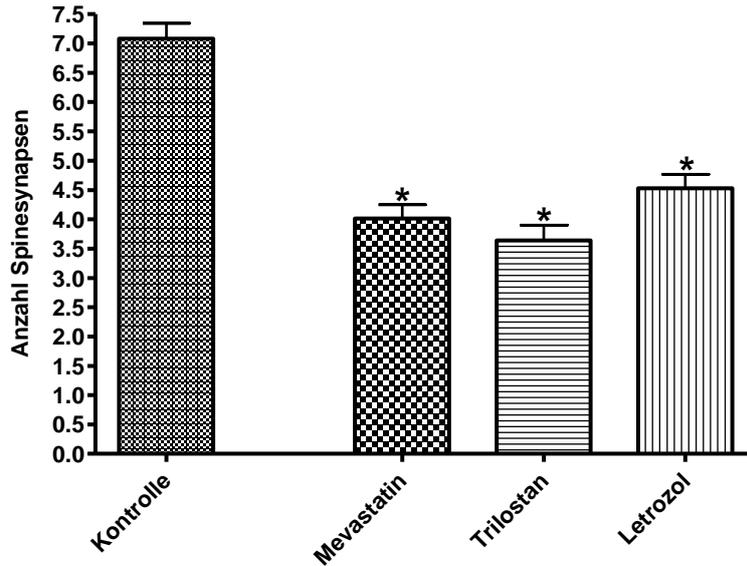


Abb. 7: Hemmstoffe der einzelnen Östrogenvorstufen

Abbildung 7 zeigt die Auswirkungen der spezifischen Hemmungen der einzelnen Metaboliten. Mevastatin als Hemmer der Cholesterinsynthese, Trilostan als Hemmer der Testosteronsynthese und Letrozol als Hemmer der Östrogensynthese bewirken alle eine signifikante Senkung der Spinesynapsenanzahl gegenüber der Kontrolle.

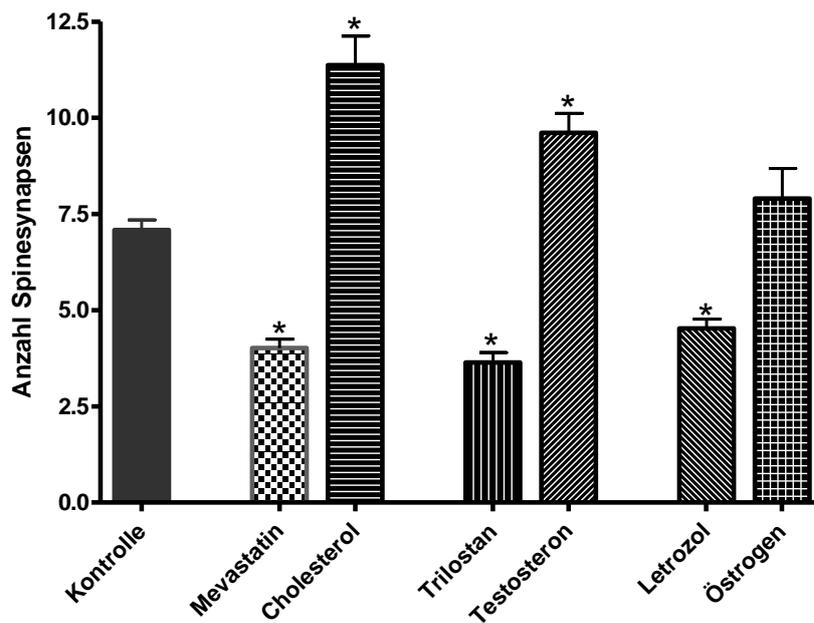


Abb. 8: Gegenüberstellung von Hemmstoff und Östrogenvorstufe

Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der letzten beiden Diagramme noch einmal in der Zusammenfassung.

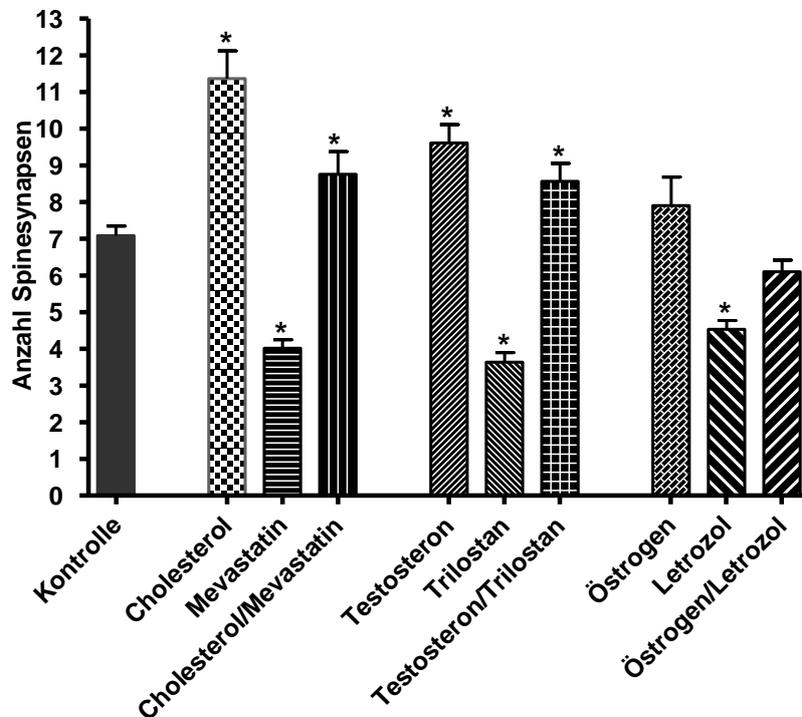


Abb. 9: Rescuedarstellung der Versuchsreihe

Der Rescueversuch wurde für die drei Synthesestufen durchgeführt. Beim Rescueversuch wird geprüft, ob die Effekte eines spezifischen Hemmers einer Vorstufe, z.B. Mevastatin als Hemmer von Cholesterol, durch die Kombination mit dem Substrat in einem Versuch wieder aufgehoben werden können.

Aus dem Diagramm ist zunächst zu entnehmen, dass sich bis auf Östrogen und Östrogen/Letrozol, alle Metaboliten der Kontrolle gegenüber signifikant unterscheiden. Die hemmenden Effekte von Letrozol, Trilostan und Mevastatin konnten durch die Kombinationen Letrozol/Östrogen, Trilostan/Testosteron und Mevastatin/Cholesterol annähernd wieder aufgehoben werden. Sowohl Östrogen als auch der entsprechende Rescue Letrozol/Östrogen verhalten sich der Kontrolle gegenüber nicht signifikant unterschiedlich. Die hemmende Wirkung von Letrozol konnte also durch gleichzeitige Zugabe von Östrogenen aufgehoben werden. Testosteron, Trilostan/Testosteron bzw. Cholesterol und Mevastatin/Cholesterol sind gegenüber der Kontrolle alle signifikant erhöht.

Demnach wurden auch hier die spezifischen Hemmeffekte von Trilostan und Testosteron durch die jeweiligen Östrogenvorstufen wieder aufgehoben.

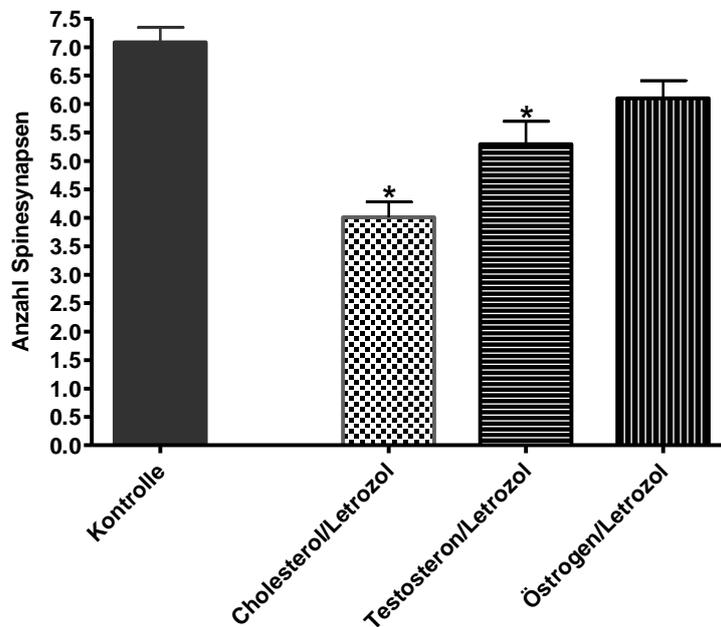


Abb. 10: Östrogenvorstufen in Kombination mit Letrozol

Abbildung 10 macht deutlich, dass beim Vergleich der Östrogensynthesestufen in jeweiliger Kombination mit Letrozol, die Cholesterolkombination am stärksten gehemmt wird. Beim Östrogen kann die Hemmung am wenigsten Wirkung entfalten. Sie ist sogar im Gegensatz zu beiden anderen Kombinationen nicht mehr im signifikanten Bereich gegenüber der Kontrolle. Im folgenden Diagramm 11 ist Letrozol mit zum Vergleich aufgetragen. Die Letrozolwerte gleichen (annäherungsweise) denen von Cholesteroll/Letrozol. Demnach kann Letrozol seine hemmende Wirkung in Anwesenheit von Cholesteroll ungehindert entfalten. Für Testosteron/Letrozol trifft dies ebenfalls annäherungsweise zu, d.h. die Hemmung ist noch im signifikanten Bereich gegenüber der Kontrolle, jedoch ist sie nicht so stark wie bei Cholesteroll/Letrozol.

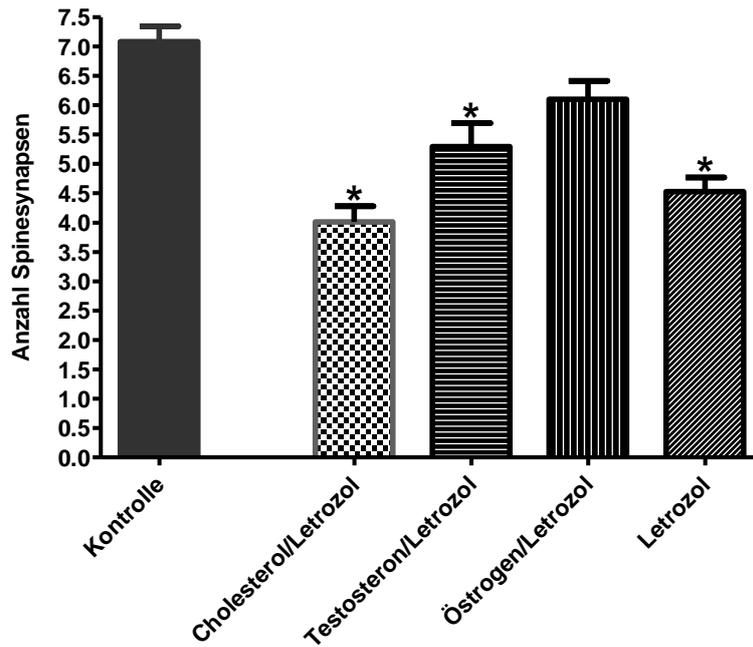


Abb. 11: Letrozolwirkungen mit und ohne Steroidzusatz

Das Diagramm Nr. 12 verdeutlicht noch einmal die isolierten Letrozoleffekte. Zum einen tritt durch den Zusatz von Letrozol eine signifikante Reduzierung der Spinesynapsen ein, zum anderen können durch den Rescueversuch mit Letrozol und Östrogen in der Kombination die Hemmeffekte annäherungsweise wieder aufgehoben werden. Sowohl Östrogen als auch Letrozol/Östrogen verhalten sich der Kontrolle gegenüber nicht signifikant erhöht.

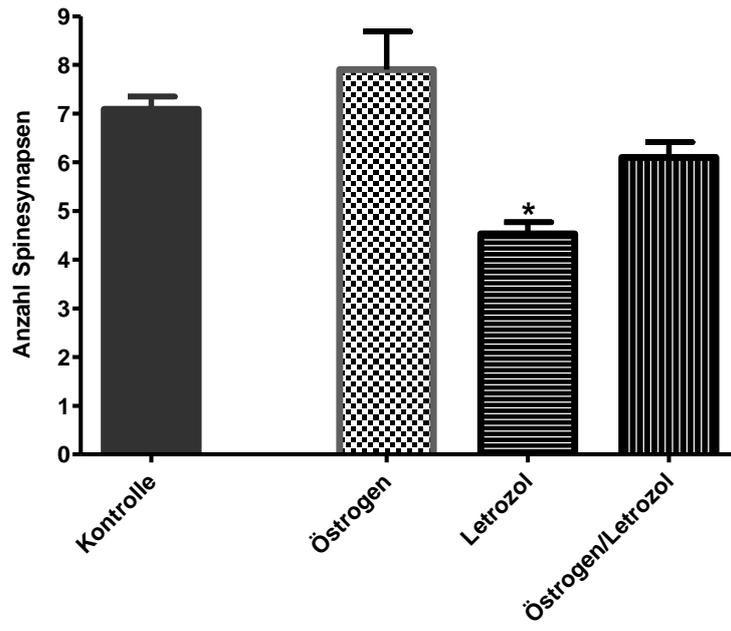


Abb. 12: Rescue durch Östrogen

4 Diskussion

Bei der Betrachtung der Auswirkungen von Östrogenen auf die Bildung von Spinesynapsen sind unterschiedliche Positionen bezogen worden. Gould und Wolley waren 1990 der Meinung, dass eine systemische Östradiolapplikation bei ovariectomierten Ratten zu einer Hochregulation von Spinesynapsen im Hippocampus führen würde (Gould et al., 1990). Die Variabilität der Spinesynapsendichte in Abhängigkeit von schwankenden Östrogenspiegeln, während des Östrogenzyklus bei weiblichen Ratten, die von Wolley et al. ebenfalls 1990 entdeckt wurde, ließen zunächst die Schlussfolgerung zu, dass exogene Östrogene einen direkten Effekt auf die Bildung von Spinesynapsen haben könnten. Die Untersuchungen von Prange-Kiel an der medianen Raphe deuten jedoch eher darauf hin, dass exogene Östrogene ihre Wirkung über subkortikale Regionen vermitteln (Lam und Leranth, 2003; Prange-Kiel et al., 2004)

Kretz und Mitarbeiter konnten im Jahre 2004 einen signifikanten Einfluss von exogenen Östrogenen ebenfalls nicht bestätigen (Kretz et al., 2004). Sie machen eher auf die Bedeutung der endogenen Östrogenproduktion im Hippocampus aufmerksam. Diese führen zur Bildung von synaptischen Proteinen im Hippocampus. Nach Hemmung der Aromatase kam es zu einer Reduktion von Spinesynapsen und einer Herunterregulation von synaptischen Proteinen.

Darüber hinaus wurde kürzlich entdeckt, dass die hippocampale Östrogensynthese ausreicht, um hippocampale Langzeitpotenziale zu erhöhen (Mukai et al., 2006). Parakrine Östrogenregulationen wurden in der Neurogenese und dem Axonwachstum gezeigt (Fester et al., 2006; von Schassen et al., 2006).

Hippocampale Kulturen, die mit physiologischen Östrogendosen behandelt wurden, zeigten keine signifikanten Effekte im Hippocampus. Dies macht deutlich, dass eher hippocampales Östrogen als gonadales Östrogen essenziell für die hippocampale Synaptogenese ist (Fester et al., 2006; Kretz et al., 2004; von Schassen et al., 2006). Kurzzeitbehandlungen von frischen Slices (von männlichen, erwachsenen Ratten) mit Östradiol in einer Konzentration von 1 nM, welche annähernd physiologischen Serumkonzentrationen entsprechen, konnten lediglich eine Zunahme in dünnen, nicht jedoch in ausgereiften Spines

erzielen (Mukai et al., 2007). Der Autor macht jedoch deutlich, dass diese dünnen Spines als Basis für die Entstehung von neuen Spinesynapsen nach mehr als 24 Stunden angesehen werden können. Zyklische Schwankungen in der Spinesynapsendichte bleiben jedoch weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

Östrogenregulierte Feedbackmechanismen funktionieren über eine hypothalamo-hypophysär-gonadale Achse, welche eine GnRH-vermittelte zyklische Abgabe von gonadalen Östrogenen bedingen. GnRH kann aber auch als direkter Regulator der Östrogensynthese in ovariellen Granulosazellen fungieren. Niedrige Östrogendosen führen zur GnRH-Stimulation, während hohe Dosen die Abgabe hemmen (Janssens et al., 2000; Parinaud et al., 1988). GnRH-Bindungsstellen sind sowohl in den Ovarien, als auch im Hippocampus von Ratten durch Autoradiographie identifiziert worden (Badr und Pelletier, 1987; Jennes et al., 1988; Leblanc et al., 1988; Reubi et al., 1987), wie auch GnRH-R mRNA-Expression durch in situ Hybridisierung verifiziert werden konnte (Jennes et al., 1995). Diese Erkenntnisse legen einen potenziellen, gemeinsamen Regulationsmechanismus in beiden Systemen, den Ovarien und dem Hippocampus, nahe.

Darüber hinaus konnten überwiegend exzitatorische Effekte nach Behandlung hippocampaler Sliceulturen mit GnRH und auch nach Behandlungen mit Östradiol festgestellt werden, welche wiederum durch adäquate GnRH-Antagonisten geblockt werden konnten (Wong et al., 1990; Yang et al., 1999). Diese Erkenntnisse deuten u.a. die neuroregulierende Rolle von GnRH auf die synaptische Transmission an. Die jüngsten Ergebnisse von Prange-Kiel und Mitarbeitern zeigen, dass zyklische GnRH-Abgaben und nicht gonadale Östrogene für zyklische, hippocampale Synapsenfluktuationen verantwortlich sind (Prange-Kiel et al., 2008). GnRH könnte die gonadale und hippocampale Östrogensynthese synchronisieren und für die Korrelation von hippocampaler Synaptogenese und den gonadalen Zyklus verantwortlich sein. GnRH war unter Anwesenheit von Aromataseinhibitoren oder GnRH-Antagonisten ineffektiv. Umgekehrt wurde eine erhöhte GnRH-Expression nach Hemmung der hippocampalen Aromatase beobachtet. Da zyklische Östrogenveränderungen und zyklische Spinedichteveränderungen im Hippocampus beobachtet werden konnten, nicht jedoch im Neocortex, ist davon auszugehen, dass die zyklische

Synaptogenese im weiblichen Hippocampus durch zyklische GnRH-Abgaben hervorgerufen wird.

In der vorliegenden Arbeit diente die Elektronenmikroskopie zur Untersuchung der eingangs erwähnten Arbeitshypothese. Die hier erbrachten Ergebnisse zeigen, dass exogene Östrogene keine signifikante Spinesynapsenzunahme bewirken. Die von Kretz und Mitarbeitern sowie die von Prange-Kiel erbrachte These wird somit bestätigt (Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2004).

Beim Blick auf die Östrogenvorstufen ist jedoch auffällig, dass Cholesterol als erste Vorstufe im Vergleich zu Testosteron und Östrogen die größten, positiven Auswirkungen auf die Bildung von Spinesynapsen hat. Die Behandlung mit Letrozol, dem reversiblen Hemmer der Aromatase, führt wiederum zu einer signifikanten Verminderung der Spinesynapsen.

Aus diesen ersten Ergebnissen kristallisiert sich zunehmend die Schlüsselrolle der Aromatase heraus. Je mehr Substrat der Aromatase angeboten wird, in dieser Untersuchung durch Cholesterol, desto mehr Östrogene werden endogen produziert und desto mehr Spinesynapsen können gebildet werden. Wird die Aromatase jedoch direkt gehemmt, werden diese Wirkungen wieder aufgehoben. Testosteron liefert ebenfalls Substrat für die Aromatase und führt somit ebenso zu einer signifikanten Spinesynapsenzunahme.

Während Cholesterol frei durch die Zellmembran diffundieren kann, wird Testosteron in einem aktiven, limitierten Transport durch die Zellmembran befördert (Lin und Scalan, 2005). Hier liegt möglicherweise eine Ursache für die Unterschiede zwischen den zwei Substraten bezüglich ihrer Auswirkung auf die endogene Östrogensynthese beziehungsweise auf die Spinesynapsenbildung.

Aus meinen Untersuchungsergebnissen entnehme ich, dass die Stimulation mit exogenem Östrogen die Aromatase nicht zu einer gesteigerten Tätigkeit anregt. Unter exogenem Östrogenzusatz kommt es zwar zu einer Spinesynapsenzunahme, jedoch ist diese nicht signifikant erhöht.

Sowohl Mevastatin als auch Trilostan führen zu einer signifikanten Spinesynapsenverminderung. Beide führen letztlich durch ihre spezifische Hemmung einer Östrogenvorstufe zu einer Senkung der Substratbereitstellung für die Aromatase. Die jeweiligen Rescues heben diese Hemmeffekte wieder auf. Bei der Kombination von Mevastatin und Cholesterol hemmt Mevastatin zwar die Cholesterolsynthese, jedoch nicht das parallel hinzugefügte

Cholesterol, welches seine Wirkung frei entfalten kann. Es stimuliert schließlich die Aromatase und führt dadurch zu einer Spinesynapsenbildung im Hippocampus. Trilostan und Testosteron verhalten sich in der Kombination vergleichbar.

Cholesterol und Testosteron jeweils in der Kombination mit Letrozol führen jedoch zu einer signifikanten Verminderung der Spinesynapsen. In diesem Fall fällt zwar mehr Substrat für die Aromatase an, doch können die entsprechenden Auswirkungen auf die Bildung von Spinesynapsen aufgrund der spezifischen Aromataseblockierung nicht umgesetzt werden.

Die erbrachten Ergebnisse stützen die Beobachtungen von Kretz und Mitarbeitern insofern als die Schlüsselrolle der endogenen Östrogensynthese, speziell die Rolle der Aromatase, im Hinblick auf die Entstehung von Spinesynapsen im Hippocampus deutlich wird (Kretz et al., 2004).

Östrogen und Letrozol in der Kombination führen wie auch Östrogen alleine nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Spinesynapsen gegenüber der Kontrolle. Die Letrozoleffekte werden durch das exogene Östrogen wieder aufgehoben. Da die Spinesynapsenanzahl durch Letrozol signifikant reduziert wird und im Rescueversuch mit Östradiol wieder annähernd der Ausgangswert erreicht wird, ist zu vermuten, dass exogene Östrogene grundsätzlich schon einen positiven Effekt auf die Bildung von Spinesynapsen haben, dieser aber möglicherweise konzentrationsabhängig ist. Fügt man einer Kultur lediglich Östrogen hinzu, so ist das „System“ wahrscheinlich übersättigt, da ja schon auf endogenem Wege genügend Östrogene produziert werden. Dies ist zum einen durch den grundsätzlichen Nachweis der endogenen Östrogensynthese durch hippocampale Neurone (Prange-Kiel et al., 2003; Wehrenberg et al., 2001) und zum anderen durch den Nachweis der sechsfach erhöhten Östradiolkonzentration im Hippocampus im Vergleich zu Serumkonzentrationen von Hojo und Mitarbeitern belegt (Hojo et al., 2004). Durch einen abgesenkten Östradiolspiegel mittels Letrozol können exogene Östrogene (10^{-7} M) jedoch ohne Überschreitung einer vermuteten Konzentrationsspanne ihre positive Wirkung auf die Bildung von Spinesynapsen erreichen. Welche Konzentrationen hierfür erforderlich sind, bleibt bis zu diesem Zeitpunkt noch ungeklärt.

Eine weitere mögliche Ursache für die nichtsignifikanten Auswirkungen des exogenen Östradiols auf die Bildung von Spinesynapsen liegt darin, dass Östrogene vergleichbar wie Testosteron aktiv durch die Plasmamembran transportiert werden müssen (Lin und Scalan, 2005; Hammes et al., 2005). Dieser Transportprozess ist limitiert und deshalb wohl einer der begrenzenden Faktoren für die freie Entfaltung überschüssiger, exogener Östrogene.

In Anlehnung daran wurde herausgefunden, dass hohe Östrogenkonzentrationen ($10^{-7}M$) über einen membrangebundenen, nichtgenomischen Signalweg zu einer Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern führen (Zhao et al., 2005). Diese Kalziumfreisetzung führt zu einer Herunterregulierung der Aromataseaktivität über kalziumabhängige Kinasen (Balthazart et al., 2006; Balthazart und Ball, 2006). Demnach würden hohe exogene Östrogendosen die Östrogensynthese in Neuronen inhibieren.

Jüngste Forschungsergebnisse beschreiben darüber hinaus die Auswirkungen von Östrogen auf die Bildung von Langzeitpotenzialen (LTP). Dabei wurde von Rune und ihren Mitarbeitern herausgefunden, dass östradiolinduzierte Langzeitpotenziale über NMDAR (NR2b) in hippocampalen Slicekulturen vermittelt werden. Letrozolbehandlungen führten ähnlich wie bei Spinesynapsen zu einer signifikanten Reduktion der Langzeitpotenziale sowie der NMDAR-Rezeptoren. Aus diesen Erkenntnissen wird auch die Bedeutung der hippocampalen Östrogene auf Lernprozesse im Allgemeinen und das Gedächtnis deutlich.

Aromataseinhibitoren wie z.B. Letrozol werden in der Brusttumorthherapie postmenopausaler Frauen mit hormonabhängigen Tumoren seit längerem eingesetzt (Geisler et al., 2002; Puddefoot et al., 2002). Klinische Pilotstudien demonstrierten, dass Frauen, mit Aromatasehemmern behandelt, an Erinnerungsdefiziten litten und ihre kognitiven Fähigkeiten vermindert waren (Shilling et al., 2005; Dowsett et al., 2005). Diese unerwünschten Nebenwirkungen in der Brustkrebstherapie mit Aromataseinhibitoren erscheinen vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse in einem neuen Licht.

Gegenüberstellung von exogenem und endogenem Estradiol

Durch die Arbeit von Prange-Kiel und ihren Mitarbeitern ist im Jahr 2003 der Nachweis erbracht worden, dass hippocampale Neurone in der Lage sind, Östrogene *de novo* zu synthetisieren (Prange-Kiel et al., 2003). Die Tatsache, dass die ER α -Expression durch Östrogene erhöht und die der ER β erniedrigt wird sowie Letrozol ein reziprokes Verhalten erkennen lässt, erlaubt die Schlussfolgerung, dass östrogene Wirkungen im Hippocampus auto- und parakrin vermittelt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt den positiven, signifikanten Einfluss von endogenem Östrogen auf die Entstehung von Spinesynapsen. Ein vergleichbarer Effekt durch exogene Östrogene konnte jedoch nicht erzielt werden. Fester und dessen Mitarbeiter konnten sogar einen Einfluss endogener Östrogene auf Apoptose und Proliferation im Hippocampus entdecken (Fester et al., 2006). Forschungen über den Einfluss von Östrogenen auf die GAP43-Expression und Axonlänge im Hippocampus beweisen, dass sowohl endogene als auch exogene Östrogene hier einen positiven Effekt haben (von Schassen et al., 2006).

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, dass sowohl endogene als auch exogene Östrogene eine differenzierte Wirkungsweise besitzen.

Um dieser Frage intensiver nachzugehen, wurden Proliferationsraten in hippocampalen Dispersionskulturen unter Applikation verschiedener Antiöstrogene untersucht.

Unter Letrozol konnten Proliferationsraten gesenkt werden, was durch ICI 162,780 (Fulvestrant, Faslodex), einem Östrogenantagonisten am zytosolischen und membranständigen ER (Fitzpatrick et al., 2002), jedoch nicht wiederholt werden konnte (Fester et al., 2006). Es ist daher zu vermuten, dass für Östradiol ein weiterer Signalweg existiert.

Ein Blick auf die eigenen Ergebnisse und die von Rune und ihren Mitarbeitern läßt vermuten, dass für die Östrogenwirkung eher die lokale Konzentration als der Ort der Entstehung von Bedeutung ist (Fester et al., 2006; Prange-Kiel et al., 2003; Rune et al., 2002).

Alternativ ist es möglich, dass exogene Östrogene nur begrenzt ihre Wirkungen entfalten können, weil sie mittels eines limitierten, aktiven Transportprozesses

(Megalin) die Zellmembran passieren können (Hammes et al., 2005). Die positiven Einflüsse von Östrogenen auf die Bildung von Spinesynapsen und Langzeitpotenzialen kann durch vorherige Letrozolbehandlungen deutlich gemacht werden. Aus dieser reduzierten Östrogenkonzentration lassen sich positive, signifikante Effekte von Östrogenen hinsichtlich der Bildung von Spinesynapsen und Langzeitpotenzialen erzielen. Östrogenabhängige Spinebildungen und die Expression von synaptischen Proteinen ist wiederum von hochregulierten ER α -Konzentrationen abhängig (Mukai et al., 2007; Jelks et al., 2007).

Die Idee, dass die Spinesynapsendichte eher endogen als exogen beeinflusst wird, wird durch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse untermauert (Ivonen et al., 2006).

In der Tat wurde herausgefunden, dass GnRH, der Regulator des Östrogenzyklus, auch als Regulator der Östrogensynthese im Hippocampus fungiert und dieser Einfluss ebenfalls zyklisch abläuft (Prange-Kiel et al., 2008). Die Entdeckungen von Rune und Mitarbeitern stimmen mit vorherigen Ergebnissen überein, welche zeigen, dass die Langzeitpotenziale in akuten Slicekulturen, die man von ovariectomierten, östrogenbehandelten Tieren erhielt, sich verstärken (Cordoba-Montoyer und Carrer, 1997; Smith und McMahon, 2005; Smith und McMahon, 2006) und vom Östrogenzyklus abhängig sind (Warren et al., 1995).

In Anlehnung an die Entdeckungen von Ivonen und Mitarbeitern sowie von Prange-Kiel und Mitarbeitern würden Ovariectomierungen zu einer Reduzierung der Östrogensynthese im Hippocampus führen (Ivonen et al., 2006; Prange-Kiel et al., 2008). Demnach würde eine Behandlung von akuten Slices ovariectomierter Tiere mit Östradiol zu einem Rescueeffekt führen. Dies ähnelt meinen Ergebnissen zur Spinesynapsendichte und Erkenntnissen zu Langzeitpotenzialen durch Östradiol nach Letrozolbehandelten Kulturen.

Eine lange Zeit als gültig anerkannte Hypothese sagte aus, dass eine GABAerge Inhibierung durch Östrogene ein unterstützender Mechanismus für erhöhte, neuronale Aktivität sein soll (Murphy et al., 1998), was wiederum die Bildung von Spinesynapsen fördert. Die jüngsten Ergebnisse zu diesem Thema stellen diese Hypothese jedoch in Frage (Rune et al., 2002; Zhou et al., 2007; Ikeda et al., 2006).

Die Induktion von Langzeitpotenzialen in Abhängigkeit von Östrogenen hat sich dabei in Anwesenheit von GABA-Rezeptoren nicht verändert, was einen Einfluss von GABAerger Inhibierung in östrogeninduzierter, synaptischer Plastizität sehr unwahrscheinlich macht.

Darüber hinaus fanden Smith und McMahon im Jahre 2005 heraus, dass der zeitliche Ablauf der Spinesynapsenzunahme nicht mit Veränderungen bei den Langzeitpotenzialen einhergeht (Smith und McMahon, 2005). Obwohl sich die Spinesynapsenzahl nach entsprechender Hormonbehandlung erhöhte, normalisierten sich die Langzeitpotenziale mit der Zeit. Die Normalisierung tritt ein, sobald die erhöhte NMDA-Rezeptortransmission von einer verspäteten Zunahme der AMPA-Rezeptortransmission begleitet wird. Die Tatsache, dass nach einem Synapsenverlust von 40 % eine LTP-Induzierung nicht mehr möglich ist, zeigt, dass für die Induzierung von Langzeitpotenzialen ein Spinesynapsengrenzwert erforderlich sein muß. Auch wenn hier nicht zwingend von einem linearen Zusammenhang auszugehen ist, so ist in Anlehnung an Smith und McMahon und jüngsten Ergebnissen von Rune und Mitarbeitern anzunehmen, dass die Spinedichte auch der synaptischen Funktion unterliegt (Smith und McMahon, 2005; Smith und McMahon, 2006).

Mit Blick auf die synaptische Plastizität ist herausgefunden worden, dass NMDA-Rezeptorsubtypen sowohl LTP als auch LTD beeinflussen (Liu et al., 2004). Es ist jedoch weiterhin unklar, welcher NMDA-R-Subtyp in den plastischen Prozess involviert ist (Berberich et al., 2007; Morishita et al., 2007; Bartlett et al., 2007). Überexpression von NR2B und NMDARs erhöht die Langzeitpotenziale (Yang et al., 1999). Diese erhöhte Plastizität wird wieder rückgängig gemacht, wenn NR2B- durch NR2A- Untereinheiten ersetzt wird (Barria und Malinow, 2005). Die robusteren, hippocampalen Langzeitpotenziale in NR2B-überexprimierenden Mäusen korrelieren mit verbessertem Lernen und Gedächtnisleistungen (Cao et al., 2007).

Die östradiolinduzierte Zunahme der Langzeitpotenziale wird durch die Blockade der NMDARs unterbunden (Smith und McMahon, 2006). Zusätzlich wurden vergleichbare, signifikante Effekte durch Aromatasehemmer im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus erzielt. Die Reduktion der Spinesynapsenzahl ist sehr wahrscheinlich auf die Herunterregulierung der NR2B-Expression nach Inhibierung der Aromatase mit Letrozol zurückzuführen,

da in beiden Experimenten eine exakte Reduzierung um 40% sowohl in der Zahl der Spinesynapsen als auch in der Abnahme der NR2B-Rezeptoren beobachtet werden konnte.

Auch diese Ergebnisse machen die essenzielle Bedeutung der Aromatase, insbesondere der hippocampalen Östrogene, in der Erhaltung von Langzeitpotenzialen im Hippocampus deutlich. Die Herunterregulierungen durch Letrozol führen zu Gedächtnisdefiziten und sind damit erklärbare Nebenwirkungen bei Patienten, die sich einer Letrozolbehandlung in Folge eines Brusttumorleidens aussetzen.

Die neuroprotektiven und neurotrophischen Effekte des Östradiols im ZNS wurden in der Vergangenheit hinreichend dargestellt (Garcia-Segura et al., 2001; Saunders-Pullman, 2003). Bei Krankheiten wie der Schizophrenie, dem M. Alzheimer oder der Regeneration nach cerebralen Traumata wie Schlaganfällen, wird die neuroprotektive Komponente des Östradiols durch eine Verbesserung der Prognose deutlich (Cho et al., 2003; Garcia-Segura et al., 2001).

Eine stärkere Fokussierung sollte jedoch auch die kürzlich bewiesene, hippocampale Östrogensynthese (Azcoitia et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003) und die damit verbundenen Effekte erhalten. Eine Inaktivierung der Aromatase im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen zeigt, dass eine entsprechende Enzyminduktion eine protektive Rolle spielt und unter Umständen neue, pharmakologische Behandlungskonzepte ermöglicht (Azcoitia et al., 2001).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sowie die von Fester und Mitarbeitern gefundenen proliferationsfördernden Effekte des endogenen Östradiols (Fester et al., 2006), stützen die These, dass endogene Östrogene eine umfassende Wirkung auf die Bildung von Neuronen, das Axonwachstum und auf die Bildung von Spinesynapsen haben (von Schassen et al., 2006).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist die Entstehung von Spinesynapsen in Slicekulturen hippocampaler Rattenneurone mittels Elektronenmikroskopie untersucht worden. Die Kulturen erhielten Zusätze von Östrogen, Östrogenvorstufen und Hemmern einzelner Östrogenvorstufen. In Rescue-Experimenten wurde die Spezifität dieser Substanzen getestet. Anschließend wurden die Effekte auf die Spinesynapsenzahl untersucht.

Es konnte dabei eine signifikante Zunahme der Spinesynapsen unter den jeweiligen Östrogenvorstufenbehandlungen beobachtet werden. Die Synthesehemmung der Östrogenvorstufen sowie im Speziellen die Hemmung der Aromatase, führten zu einer signifikanten Reduzierung der Spinesynapsenzahl. Die exogene Östrogenzufuhr führte zu keiner signifikanten Änderung der Spinesynapsenzahl.

Die Spinesynapsen-induzierende Wirkung der Östrogenvorstufen wurde durch die gleichzeitige Behandlung der Kulturen mit dem Aromatasehemmer Letrozol aufgehoben.

Anhand dieser Ergebnisse wird die Bedeutung der endogenen Östrogensynthese für die Bildung von Spinesynapsen im Hippocampus und insbesondere die Aktivität der Aromatase deutlich. Der Beleg, dass hippocampale Neurone Östradiol *de novo* synthetisieren, konnte bereits in vorangegangenen Studien geliefert werden.

Literaturverzeichnis

- Amateau SK, McCarthy MM (2002). A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. *J Neurosci* 22: 8586-8596.
- Anderson SA, Classey JD, Condi F, Lund JS, Lewis DA (1995). Synchronous development of pyramidal neuron dendritic spines and parvalbumin-immunoreactive chandelier neuron axon terminals in layer III of monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* 67: 7-22.
- Azcoitia I, DonCarlos LL, Garcia-Segura LM (2002). Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res* 4: 235-245.
- Badr M, Pelletier G (1987). Characterization and autoradiographic localization of Lhrh Receptors in the Rat-Brain. *Synapse* 1: 567-571.
- Balthazart J, Carnil CA, Tazinaux M, Charlier TD, Baillieu M, Ball GF (2006). Rapid changes in production and behavioural action of estrogens. *Neuroscience* 138: 783-791.
- Balthazart J, Ball GF (2006). Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci.* 29: 241-249.
- Barria A, Malinow R (2005). NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron.* 48: 289-301.
- Bartlett TE, Bannister NJ, Collett VJ, Dargan SL, Massey PV, Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Bashir ZI, Collingridge GL, Lodge D (2007). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-weeks old rat hippocampus. *Neuropharmacology* 52: 60-70.
- Baulieu EE (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52: 1-32.
- Behl C, Manthey D (2000). Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol* 29: 351-358.
- Berberich S, Jensen V, Hvalby O, Seeburg PH, Kohr G (2007). The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction. *Neuropharmacology* 52: 77-86.
- Beyer C (1999). Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol* 199: 379-390.

- Beyer C, Pawlak J, Karlczak M (2003). Membrane receptors for oestrogen in the brain. *J Neurochem* 87: 545-550.
- Braendgaard H, Gundersen HJ (1986). The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods*. 18: 39-78.
- Brito VI, Carrer HF, Cambiasso M (2004). Inhibition of tyrosine kinase receptor type B synthesis blocks axogenic effect of estradiol on rat hypothalamic neurones in vitro. *Eur J Neurosci* 20: 331-337.
- Cambiasso MJ, Colombo JA, Carrer HF (2000). Differential effect of estradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur J Neurosci* 12: 2291-2298.
- Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B, Tsien JZ (2007). Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci* 25: 1815-1822.
- Cho JJ, Iannucci FA, Fraile M, Franco J, Alesius TN, Stefano GB (2003). The role of the estrogen in neuroprotection: implications for neurodegenerative diseases. *Neuro Endocrinol Lett* 24: 141-147.
- Cordoba-Montoyer DA, Carrer HF (1997). Estrogen facilitates induction of long-term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res* 778: 430-438.
- Cyr M, Calon F, Morissette M, Di Parlo T (2002). Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Psychiatry Neurosci* 27: 12-27.
- Desmond NL, Levy WB (1990). Morphological correlates of long-term potentiation imply the modification of existing synapses, not synaptogenesis, in the hippocampal dentate gyrus. *Synapse* 5: 139-143.
- Dominguez R, Jalali C, de Lacalle S (2004). Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci* 24: 982-990.
- Dowsett M, Folkard E, Doody D, Haynes B (2005). The biology of steroid hormones and endocrine treatment of breast cancer. *Breast* 14: 452-457.
- Ethell IM, Pasquale EB (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75: 161-205.

- Farach-Carson MC, Davis PJ (2003). Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 839-845.
- Ferrini M, Bisagno V, Piroli G, Grillo C, Deniselle MC, de Nicola AF (2002). Effects of estrogens on choline-acetyltransferase immunoreactivity and GAP-43 mRNA in the forebrain of young and aging male rats. *Cell Mol Neurobiol* 22: 289-301.
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M, Rune GM (2006). Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* 97: 1136-1144.
- Fitzpatrick JL, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM (2002). Estrogen-mediated neuroprotection against β -amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor α or β and activation of MAPK pathway. *J Neurochem* 82: 674-682.
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 71: 2231-2238.
- Galofre E, Ferrer I (1987). Development of dendritic spines in the Vth's layer pyramidal neurons of the rat's somatosensory cortex. A qualitative and quantitative study with the Golgi method. *J Hirnforsch* 28: 653-659.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Don Carlos LL (2001). Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60.
- Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE (2002). Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol* 20: 751-757.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10: 1286-1291.
- Gray EG (1959). Axosomatic and axodendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. *J Anat* 83: 420-433.

- Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Lippa PB, Nykjaer A, Willnow TE (2005). Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Endocrinology* 144: 751-762.
- Harris KM, Stevens JK (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9: 2982-2997.
- Heimrich B, Frotscher M (1994). Slice cultures as a tool to study neuronal development and the formation of specific connections. *Neuroscience Protocols*, 94-030-05-01-09.
- Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H, Mukai H, Morrison JH, Janssen WGM, Kominami S, Hrada N, Kimoto T, Kawato S (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P450 17alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 865-870.
- Ikeda T, Matsuki N, Yamada MK (2006). Estrogen produced in cultured hippocampal neurons is a functional regulator of a GABAergic machinery. *J Neurosci Res* 84: 1771-1777.
- Ivonen S, Heikkinen T, Puoliväli J, Helisalmi S, Hiltunen M, Soinnen H, Tanila H (2006). Effects of estradiol on spatial learning, hippocampal cytochrome P450, and estradiol alpha and beta mRNA levels in ovariectomized female mice. *Neuroscience* 137: 1143-1152.
- Jacobs KM, Neve RL, Donoghue JP (1993). Neocortex and hippocampus contain distinct distributions of calcium-calmodulin protein kinase II and GAP43 mRNA. *J Comp Neurol* 336: 151-160.
- Janssens RMJ, Brus L, Cahill DJ, Huirne JAF, Schoemaker J, Lambalk CB (2000). Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum. Reprod. Update*. 6: 505-518.
- Jelks KB, Wylie R, Floyd CL, McAllister Ak, Wise P (2007). Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha. *J Neurosci* 27: 6903-6913.

- Jennes L, Dalati B, Conn PM (1988). Distribution of Gonadotropin Releasing Hormone Agonist Bindingsites in the Rat Central Nervous-System. *Brain Res*. 452: 156-164.
- Jennes L, Brame B, Centers A, Janovick JA, Conn PM (1995). Regulation of Hippocampal Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH) receptor mRNA and GnRH-Stimulated Inositol Phosphate Production by Gonadal Steroid Hormones. *Brain Res Mol Brain Res* 33: 104-110.
- Jones EG, Powell TP (1969). Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J Cell Sci* 5: 509-529.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004). Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24: 5913-5921.
- Lam TT, Leranth C (2003). Role of the medial septum diagonal band of Broca cholinergic neurons in oestrogen-induced spine synapse formation on hippocampal CA1 pyramidal cells of female rats. *Eur J Neurosci* 17: 1997-2005.
- Leblanc P, Crumeyrolle M, Latouche J, Jordan D, Fillion G, Lhetier A, Kordon C, Dussailant M, Rostene W, Hauour F (1988). Characterization and Distribution of Receptors for Gonadotropin-Releasing Hormone in the Rat Hippocampus. *Neuroendocrinology*. 48: 482-488.
- Lee SJ, McEwen BS (2001). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 569-591.
- Lin BC, Scalan TS (2005). Few things in life are Free: cellular uptake of steroid hormones by an active transport mechanism. *Cellular interventions*. 5: 338-340.
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304: 1021-1024.
- Lubke J, Albus K (1989). The postnatal development of layer VI pyramidal neurons in the cat's striate cortex, as visualized by intracellular Lucifer yellow injections in aldehyde-fixed tissue. *Brain Res Dev Brain Res* 45: 29-38.

- Lustig RH, Sudol M, Pfaff DW, Federoff HJ (1991). Estrogenic regulation and sex dimorphism of growth-associated protein 43 kDa (GAP-43) messenger RNA in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 125-132.
- McEwen B (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57: 357-384.
- McEwen BS, Alves SE (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20: 279-307.
- McQueen JK, Wilson H, Fink G (1997). Estradiol-17beta increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 45: 14-23.
- Mellon SH, Vaudry H (2001). Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *Int Rev Neurobiol* 46: 33-78.
- Morishita W, Lu W, Smith GB, Nicoll RA, Bear MF, Malenka RC (2007). Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Neuropharmacology* 52: 71-76.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Ishii HT, Kimoto T, Kawato S (2006). Local Neurosteroid Production in the Hippocampus Influence on Synaptic Plasticity of Memory. *Neuroendocrinology* 84: 255-263.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Oishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007). Rapid modulation of longterm depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100: 950-967.
- Muller D, Toni N, Buchs PA (2000). Spine changes associated with long-term potentiation. *Hippocampus* 10: 596-604.
- Munoz-Cueto JA, Garcia-Segura LM, Ruiz-Marcos A (1990). Developmental sex differences and effect of ovariectomy on the number of cortical pyramidal cell dendritic spines. *Brain Res* 515: 64-68.
- Murphy DD, Segal M (1996). Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16: 4059-4068.

- Murphy DD, Cole NB, Greenberer V, Segal M (1998). Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J. Neurosci* 18: 2550-2559.
- Nathan BP, Barsukova AG, Shen F, McAsey M, Struble RG (2004). Estrogen facilitates neurite extension via apolipoprotein E in cultured adult mouse cortical neurons. *Endocrinology*. 145: 3065-3073.
- Ostlund H, Keller E, Hurd YL (2003). Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 54-63.
- Parinaud J, Beaur A, Bourreau E, Vieitez G, Pontonnier G (1988). Effect of a Luteinizing- Hormone-Releasing Hormone Agonist (Buserelin) on Steroidogenesis of Cultured Human Preovulatory Granulosa-Cells. *Fertil Steril*. 50: 597-602.
- Parnass Z, Tashiro A, Yuste R (2000). Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* 10: 561-568.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127: 321-355.
- Petit TL, LeBoutillier JC, Gregorio A, Libstug H (1988). The pattern of dendritic development in the cerebral cortex of the rat. *Brain res* 459: 209-219.
- Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008). Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol*. 180: 417-426.
- Prange-Kiel J, Rune GM, Leranth C (2004). Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats. *Eur J Neurosci* 19: 309-317.
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13: 226-234.
- Puddefoot JR, Barker S, Glover HR, Malouitre SDM, Vinson GP (2002). Non-competitive steroid inhibition of estrogen receptor functions. *Int J Cancer* 101: 17-22.
- Ramon y Cajal S (1893). Neue Darstellung vom Histologischen Bau des Zentralnervensystems. *Archiv für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*.

- Anatomische Abteilung des Archives für Anatomie und Physiologie: 319-428.
- Reubi JC, Palacios JM, Maurer R (1987). Specific Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone Receptorbinding Sites in Hippocampus and Pituitary- an Autoradiographical Study. *Neuroscience* 21: 847-856.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signalling. *Science* 307: 1625-1630.
- Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002). Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*. 113: 167-175.
- Saunders-Pullman R (2003). Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both? *Endocrine*. 21: 81-87.
- Scheibel ME, Scheibel AB (1968). Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res*. 9: 32-58.
- Shilling V, Jenkins V, Morris R, Deutsch G, Bloomfield D (2005). The effects of adjuvant chemotherapy on cognition in women with breast cancer- preliminary results of an observational study. *The Breast* 14: 42-150.
- Shilling V, Jenkins V, Fallowfield L, Howell A (2001). The effects of estrogens and antiestrogens in cognition. *The Breast* 10: 484-491.
- Smith IE (1999). Aromatase inhibitors: a dose-response effect? *Endocr Relat Cancer* 6: 245-249.
- Smith CC, McMahon LL (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: 7780-7791.
- Smith CC, McMahon LL (2006). Estradiol induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci* 26: 8517-8522.
- Stoffel-Wagner B (2001). Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145: 669-679.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182.

- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1993). Lesion-induced neurite sprouting and synapse formation in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience*. 57: 985-994.
- Tanapat P, Hastings NB, Gould E (2005). Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol* 481: 252-265.
- Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM (2003). Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 63: 8037-8050.
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Conolly ES Jr, Nathans J, Tinnikov AA (2002). ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22: 8391-8401.
- von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006). Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18: 847-856.
- Walters MR, Nemere I (2004). Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci* 61: 2309-2321.
- Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT (1995). LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 703: 26-30.
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001). Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76: 1879-1886.
- Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10: 4035-4039.
- Woolley CS, McEwen BS (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol* 336: 293-306.

- Wong M, Eaton MJ, Moss RL (1990). Electrophysiological Actions of Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone-Intracellular Studies in the Rat Hippocampal Slice Preparation. *Synapse* 5: 65-70.
- Yang SN, Lu F, Wu JN, Liu DD, Hsieh WY (1999). Activation of gonadotropin-releasing hormone receptors induces long-term enhancement of excitatory postsynaptic currents mediated by ionotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Neurosci.Lett.* 260: 33-36.
- Yang SN, Tang YG, Zucker RS (1999). Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic (Ca^{2+}) elevation. *J Neurophysiol* 81: 781-787.
- Yokomaku D, Numakawa T, Numakawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Adachi N, Nishio C, Taguchi T, Hatanaka H (2003). Estrogen enhances depolarization-induced glutamate release through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in cultured hippocampal neurons. *Mol Endocrinol* 17: 831-844.
- Zafirov S, Heimrich B, Frotscher M (1994). Dendritic development of dentate granule cells in the absence of their specific extrinsic afferents. *J Comp Neurol.* 345: 472-480.
- Zhao L, Chen S, Ming Wang J, Brinton RD (2005). 17β -estradiol induces Ca^{2+} influx, dendritic and nuclear Ca^{2+} rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience* 132: 299-311.
- Zhou I, Lehan N, Wehrenberg U, Disteldorf E, von Lossow R, Mares U, Jarry H, Rune GM (2007). Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. *Exp Neurol* 203: 72-81.
- Zwain IH, Yen SS (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140: 3843-3852.

Danksagung

Mein Dank richtet sich an Frau Prof.Dr. Rune, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat. Darüber hinaus danke ich meinem Betreuer Dr. Zhou und Frau Kruck sowie allen anderen Institutsmitgliedern, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

Richard v. Lossow

zur Person 28.07.1978 geboren in Buchholz i. d. Nordheide,
ledig, deutsch

Hochschulausbildung

10/2007 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2004 Physikum
04/2001-10/2007 Studium der Humanmedizin an der Universität
Hamburg
10/1998 – 10/2000 Studium der Chemie an der Universität Hamburg

Schulbildung

07/1998 Allgem. Hochschulreife, Gymnasium am Kattenberge,
Buchholz i. d. Nordheide

Praktisches Jahr

04/2007 - 07/2007 Prof. Dr. Adam, Radiologie, UKE
12/2006 - 04/2007 Prof. Dr. Müller – Wieland, Innere Medizin, AK St.
Georg
08/2006 – 12/2006 Prof. Dr. Eggers, Chirurgische Abteilung, AK St.
Georg

Promotion „Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur
Dichte von Spinesynapsen in hippocampalen
Schnittkulturen nach Behandlung mit Substraten der
Östrogensynthese,
Doktormutter: Prof. Dr. Gabriele Rune, UKE

berufliche Erfahrungen

Seit 01/2008 Assistenzarzt in der Radiologie, AK Harburg

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Unterschrift:

(Richard v. Lossow)