

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

**Aus dem Institut für Neuroanatomie**

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

**Die Expression synaptischer Proteine im Hippocampus der Aromatase-  
Knock out-Maus**

**Dissertation**

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

vorgelegt von:

Theresa Bernard

aus Lübeck, Schleswig-Holstein

Hamburg 2013

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 23.01.2014**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Rune**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. E. Förster**

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. P. Arck**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
2.1	Einführung	6
2.2	Estrogensynthese im Hippocampus	8
2.2.1	Aufbau und Funktion des Hippocampus	8
2.2.2	Die Aromatase: Enzym der Estrogensynthese	10
2.2.2.1	Aromataseinhibitoren	12
2.2.3	Die ArKO-Maus	13
2.2.3.1	ZNS-Struktur und Verhaltensmuster der ArKO-Maus	14
2.2.4	Die Regulation der Aromatase	15
2.3	Synapsen	16
2.4	Synaptische Proteine	18
2.4.1	Synaptopodin und der Spineapparat	18
2.4.2	Synaptophysin, ein präsynaptischer Marker	19
2.4.3	Spinophilin, ein postsynaptischer Marker	19
2.5	Fragestellung	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>21</b>
3.1	Arbeitsmaterialien, Geräte und Software	21
3.2	Chemikalien	22
3.3	Lösungen	23
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>24</b>
4.1	Präparation der Gehirne aus der Maus	24
4.2	Zubereitung der Schnitte	24
4.3	Immunhistochemie der cerebralen Gefrierschnitte	25

4.3.1	Ablauf der immunhistochemischen Färbung	25
4.4	Bildanalyse	26
4.4.1	Analyse der Versuchsreihen	26
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
5.1	Immunhistochemische Untersuchungen	29
5.1.1	Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus	29
5.1.2	Synaptophysin-Expression bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus	33
5.1.3	Spinophilin-Expression bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus	35
5.1.4	Zusammenfassung der Synaptopodin-, Synaptophysin- und Spinophilin-Daten	39
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>40</b>
6.1	Vorüberlegungen	40
6.1.1	Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus	43
6.2	Die Expression von Synaptophysin und Spinophilin bei der ArKO-Maus	47
6.3	Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik	51
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>65</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>66</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>67</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionacid
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
ArKO	Aromataseknockout-Maus
ATP	Adenosintriphosphat
Aufl.	Auflage
BSA	bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CA	Cornu ammonis
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Indocarbocyanin 3
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPN	Diarylpropionitril
E2	17 $\beta$ -Estradiol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor - $\alpha$
ER $\beta$	Estrogenrezeptor- $\beta$

et al.	et alii (und andere)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	hour/ hours (Stunde/ Stunden)
HCl	Salzsäure
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphat
kDa	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
LSM	laser scanning microscope
LTP	long-term potentiation
M	Molar
mM	Millimolar
mol	Mol (1 mol = $6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle)
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	normal goat serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
pH	pH-Wert, Maß für die Aktivität von Protonen

PPT	Propylpyrazole Triol
PSD	Postsynaptische density
SERM	Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 2. Einleitung

### 2.1 Einführung

Das Gehirn ist die Steuerzentrale des Körpers, in der alle Informationen aus dem Körper und der Umwelt gesammelt und verarbeitet werden. Mit Hilfe von einem Netz aus Nervenzellen und ihrer Fortsätze, die den gesamten Körper durchziehen, werden diese Informationen gebündelt, weiter geleitet und in speziellen Gehirnabschnitten verwaltet. Die einzelnen Nervenzellen sind über spezielle Kontaktstellen, den Synapsen, miteinander verknüpft, von denen sich viele Billionen im menschlichen Gehirn befinden. Ständig können diese sich neu organisieren und je nach Bedarf ihre Funktion ruhen oder aufleben lassen. Dieser stetige Wandel wird als synaptische Plastizität bezeichnet, die für die Funktion des Gehirns essentiell ist, insbesondere für das Gedächtnis und die Fähigkeit zu Lernen. Dem Hippocampus, einer speziellen Hirnregion, wird vornehmlich die Bildung des Gedächtnisses zugesprochen und soll in dieser Arbeit im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen.

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass Estrogene im Hippocampus einen Einfluss auf die hippocampale Synapto- und Spinogenese, dem Korrelat der synaptischen Plastizität haben (Woolley *et al.*, 1990; Pozzo-Miller *et al.*, 1999; Mc Ewen 2001, 2002; Mukai *et al.*, 2007, Rune und Frotscher, 2005; Rune *et al.*, 2006). Ihre Wirkung wird als neuroprotektiv bezeichnet. Unter diesem Begriff werden Eigenschaften der Estrogene wie die Zellregeneration, das axonale Wachstum und die synaptische Übertragung positiv zu beeinflussen, zusammengefasst. (Azcoitia *et al.*, 2001; Garcia-Segura *et al.*, 2001). So scheinen Estrogene z.B. den Progress einer Alzheimer Demenz zu verzögern, da sie u.a. die Produktion von neurotoxischem  $\beta$ -Amyloid reduzieren (Tang *et al.*, 1996; Jaffe *et al.*; 1994) und vermutlich auch die zelluläre Regeneration nach einem Schlaganfall beschleunigen (Paganini-Hill *et al.*, 1995, Gail *et al.*, 1999). Die Aromatase, ein Enzym, das den letzten Schritt der Estrogensynthese katalysiert, scheint für diese neuroprotektive Wirkung der Estrogene entscheidend zu sein, indem sie durch verstärkte Enzymaktivität die Estrogen-Level in bestimmten Regionen zu bestimmten Zeitpunkten erhöhen kann (Holmes *et al.*, 2002; Wide *et al.*, 2004, Sinopoli *et al.*, 2006). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Aromatase-Expression und –Aktivität nach Gehirnverletzungen erhöht ist (Garcia-Segura *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2007) und dadurch eine erhöhte Estrogenkonzentration in den verletzten Bereichen gefunden werden kann (Saleh *et al.* 2005).



Estrogene sind jedoch ebenfalls an der Entstehung vieler Karzinome beteiligt wie z.B. an der des Mammakarzinoms. Dabei stellen Estrogene und ihre Metabolite als Tumorpromotoren und Tumorinitiatoren komplette Karzinogene dar (Fuhrmann *et al.*, 2012). Ungefähr 75-85% aller Mammakarzinome sind nicht nur hormonsensibel, sondern ihre Zellen überexprimieren die nukleären Estrogenrezeptoren. Deshalb wurden endokrine Therapien des Mammakarzinoms entwickelt, deren Ziel es ist, lokal am Brustgewebe die Estrogenrezeptoren und die von hier ausgehenden kaskadenartigen, mitogenen Signalwege über verschiedene Strategien zu hemmen (Hellriegel *et al.*, 2010). Als eine der ersten pharmakologischen Interventionen wurden Estrogenrezeptor-Blocker entwickelt, die verhindern, dass im Serum zirkulierende Estrogene an die Estrogenrezeptoren an der Tumorfläche andocken und ein Wachstum stimulieren können. Seit einigen Jahren sind jedoch auch Aromataseinhibitoren im Einsatz, die durch eine hemmende Domäne an das Enzym Aromatase anbinden und so schon die Katalysation von Testosteron zu Estrogen hemmen. Obwohl gerade die Therapie mit Aromataseinhibitoren durch das komplette Aufheben der Estrogensynthese und ihrer Metabolite große Erfolge in der Rezidivprävention zeigen, scheinen Nebenwirkungen der Aromataseinhibitoren unterschätzt zu werden. So kommt es neben den üblichen Symptomen der antiestrogenen Therapie wie Hitzewallungen, Schweißausbrüchen, Vaginitis sicca und Osteoporose speziell bei Aromataseinhibitoren zu Gedächtnisdefiziten (Jenkins *et al.*, 2002), die sich möglicherweise durch die Fähigkeit der Aromataseinhibitoren, die Gehirnschranke zu durchbrechen und dort die Aktivität der hippocampalen Aromatase zu hemmen, erklären lassen (Zhou *et al.*, 2010).

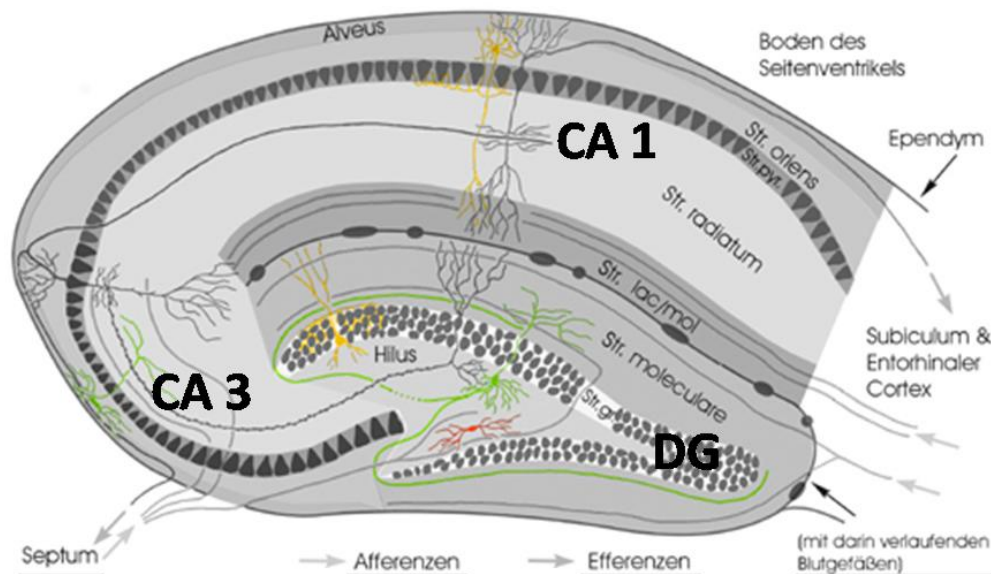
Um die Wirkung der durch die Aromatase katalysierten Estrogene auf die hippocampale synaptische Plastizität besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit estrogen-responsive synaptische Proteine bei Aromatase-Knock out-Mäusen (ArKO-Mäusen) untersucht. Hierbei handelt es sich um Mäuse, die durch Deletion des Aromatasegens nicht in der Lage sind Estrogene zu synthetisieren (Fisher *et al.*, 1998). Die Gewebeproben dieser ArKO-Mäuse wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. G. Vollmer, Leiter des Zoologischen Institutes der Technischen Universität Dresden, zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Estrogensynthese im Hippocampus

### 2.2.1 Aufbau und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus ist ein hauptsächlich in den Temporallappen gelegener Teil des Großhirns. Als Bestandteil des limbischen Systems ist er in einem komplexen System von Kern- und Rindengebieten eingeschlossen, das 1937 von Papez als „Papez-Neuronenkreislauf“ postuliert wurde. Es wird heute angenommen, dass das limbische System eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Verhaltens, der Emotionen und bei der Umwandlung von Kurzzeitgedächtnis in Langzeitgedächtnis spielt (Duus, 1995). Wie häufig in der Hirnforschung waren es Patienten mit einer Schädigung des limbischen Systems, die eine Korrelation zwischen der anatomischen Struktur und der Funktion möglich machten. So konnte gezeigt werden, dass Patienten, denen z.B. aufgrund einer Epilepsiebehandlung der Hippocampus entfernt worden war, nicht in der Lage sind neue Erinnerungen zu bilden. Sie leiden somit an einer anterograden Amnesie (Scoville u. Millner, 1957). Ebenso konnten bei Demenzerkrankungen frühe Veränderungen der Hippocampusformation mit einem reduzierten hippocampalen Volumen im MRT nachgewiesen werden (Hampel *et al.*, 1998). Dass der Hippocampus als Teil des limbischen Systems mit emotionalen Vorgängen in Zusammenhang gebracht werden kann (Morris *et al.*, 1982), unterstreichen Untersuchungen an Menschen mit unipolarer Depression und Menschen, die tiefgreifende, emotionalen Traumata wie z.B. Kriegserfahrungen oder sexuellen Missbrauch erlebt haben, da bei ihnen ebenfalls eine Volumenreduktion der hippocampalen Formation nachgewiesen werden konnte (Stein *et al.*, 1997). Auch im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass chronischer Stress zu einer Atrophie des Hippocampus führen kann (Bremner *et al.*, 1999). Eine Behandlung der Tiere mit Antidepressiva konnte das hippocampale Volumen wieder erhöhen (Warner-Schmidt *et al.*, 2006).

Der Hippocampus besteht aus sechs verschiedenen Regionen: Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Ammonshorn), Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum und entorhinaler Kortex (Amaral und Witter, 1989). Die beiden erstgenannten Regionen, Gyrus dentatus und Cornu ammonis, werden auch unter dem Begriff Hippocampusformation zusammengefasst. Sie entspricht phylogenetisch dem Allocortex, der nicht wie der Isocortex einem sechsschichtigen sondern einem dreischichtigen Aufbau axonaler Verbindungen unterliegt.



**Abb.1: Aufbau des Cornu ammonis und des Gyrus dentatus. CA1 = Cornu ammonis 1; CA3 = Cornu ammonis 3; DG = Gyrus dentatus**

Quelle: [http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/graphic\\_hippo\\_interneuron.html](http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/graphic_hippo_interneuron.html)

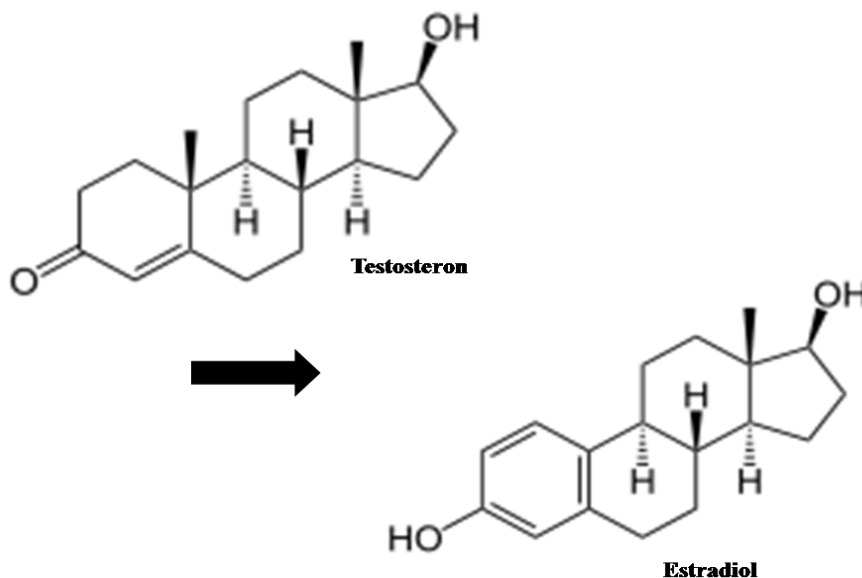
Die Neuronen des Gyrus dentatus und des Cornu ammonis sind in jeweils einem C-förmigen Band organisiert und umgreifen sich gegenseitig. Das Zellband des Gyrus dentatus wird hauptsächlich von den dicht gepackten Körnerzellen gebildet, deren Nervenzellkörper im Stratum granulosum liegen. An diesen Körnerzellen münden die exzitatorischen Hauptafferenzen des Hippocampus, die er über den Tractus perforans vom entorhinalen Cortex erhält. Die Körnerzellen projizieren wiederum die Erregung mit ihren Axonen, den sogenannten Moosfasern auf die CA3-Region des Cornu ammonis. Das Zellband des Cornu ammonis wird von dem Stratum pyramidale gebildet. Hierbei handelt es sich um eine Pyramidenzellschicht, deren Hauptzellen glutamaterge Zellen sind, die ihre Dendriten radial nach innen und außen schicken. Diese Zellschicht lässt sich makroskopisch in vier Regionen (CA1 bis CA4) unterteilen, von denen jedoch nur der CA1- und der CA3-Region eine bedeutende, vernetzende Funktion zugesprochen wird. Die kleinen Pyramidenzellen der CA1-Region nehmen zur CA2-Region hin sowohl an Größe als auch an Dichte der Struktur zu. In der CA3-Region befinden sich die größten, jedoch locker angeordneten Pyramidenzellen. Diese schicken mit ihren Axonen, den sogenannten Schaffer-Kollateralen, Informationen an die

Pyramidenzellen der CA1-Region, die dann von hier aus vor allem zu thalamischen und hypothalamischen Arealen gelangen (Ramon y Cajal, 1911). Das Stratum pyramidale wird in allen Regionen von der konvexen Seite aus durch das Stratum oriens und von der konkaven Seite aus durch das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare umschlossen (Koch und Berg, 1985).

### 2.2.2 Die Aromatase: Enzym der Estrogensynthese

Die Aromatase, auch Estrogensynthetase genannt, ist ein Cytochrom P450-Enzym, das den letzten Schritt der Estrogensynthese katalysiert. Es spaltet die C19-Methylgruppe von Testosteron ab und aromatisiert den Ring A, sodass 17 $\beta$ -Estradiol entsteht. Die Aromatase ist am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und ist auf dem Chromosom 15q21.1 genetisch determiniert. Sie wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. 1971 beschrieben Naftolin *et al.* erstmals eine Aromatase-Aktivität im Diencephalon und Hypothalamus männlicher Feten. Abdelgadir *et al.* (1994) und Wehrenberg *et al.* (2001) gelang der Nachweis der Aromatase auf mRNA-Ebene in hippocampalen Neuronen und Gliazellen. Die Aktivität der Aromatase im Hippocampus konnte von Prange-Kiel *et al.* (2003) nachgewiesen werden, indem sie zeigten, dass hippocampale Neurone *in vitro* eine erhebliche Menge an Estrogenen synthetisieren, was sich im Medium der Zellkultur nachweisen ließ. Es musste sich dabei um eine *de novo* Synthese handeln, da das Medium Serum- und Steroid frei war und die Kontamination der Kultur < 2 % lag. Es konnte so gezeigt werden, dass das zentrale Nervensystem nicht nur Zielorgan für gonadale Hormone sondern auch ihr Syntheseort ist. Hojo *et al.* (2004) zeigten sogar, dass die basale Konzentration an im Hippocampus synthetisiertem Estrogen etwa 6 mal so hoch ist wie die Estrogen-Konzentration im Serum. Um die Bedeutung der im Hippocampus synthetisierten Estrogene zu untersuchen, analysierten Rune *et al.* (2006) hippocampales Gewebe ovariectomierter Ratten und unbehandelter weiblicher Ratten, die mit Letrozol (Aromataseinhibitor) behandelt worden waren. Wie bei den Ergebnissen von Kretz *et al.* (2004) waren die Spindichte, die Synapsenanzahl und synaptische Proteine nach der Letrozol-Behandlung signifikant herunterreguliert. Die Behandlung der Gewebe mit Estrogenkonzentrationen, die dem physiologischen Serumlevel entsprechen und die Behandlung der Gewebe, die der 6 mal so hohen Konzentration der hippocampalen Estrogenkonzentration entsprechen, führte jedoch zu keiner Veränderung synaptischer Proteine. Erst die Gabe pharmakologischer, hoch dosierter

Estrogenkonzentrationen ( $10^{-7}$ M) führte zu einer Heraufregulation von Synaptophysin, einem präsynaptischen Marker, in hippocampalen Slice- und Dispersions-Kulturen. Diese Heraufregulation war jedoch nicht mit einer Zunahme von Boutons (präsynaptischen Endstücken) assoziiert. Rune *et al.* (2006) folgern aus ihren Ergebnissen, dass das lokal synthetisierte hippocampale Estrogen im Vergleich zum exogenen gonadalen Estrogen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der hippocampalen synaptischen Plastizität spielt, da die physiologischen Estrogenkonzentrationen keine Auswirkungen zeigten, aber die Hemmung der endogenen hippocampalen Estrogensynthese eine signifikante Beeinflussung der synaptischen Plastizität hervorrief.



**Abb. 2: Aromatase-Aktivität ist definiert als Menge gebildeten Estradiols nach Aromatisierung von Testosteron**

Estrogene und Aromatase scheinen für die Synaptogenese eine wichtige Rolle zu spielen, da ArKO-Mäuse und mit Aromataseinhibitoren behandelte Mäuse eine signifikant reduzierte Anzahl an Spines (siehe unten) und Spine-Synapsen aufweisen (Kretz *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2010, Rune *et al.*, bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Desweiteren reguliert die Aromatase das Reproduktionsverhalten (Ball *et al.*, 2004; Roselli *et al.*, 2007) und scheint ebenfalls Emotionen und Affektivität zu modulieren, da weibliche Aromatase-Knock out-Mäuse ein verstärkt depressives Verhalten zeigen (Dalla *et al.*, 2004). Frauen mit einem Polymorphismus im Aromatase-Gen erkranken häufig an Depressionen (Kravitz *et al.*, 2006). Frauen, die mit einem Aromataseinhibitor behandelt wurden, zeigten Gedächtnisdefizite (Jenkins *et al.*, 2002). Auch Bender *et al.* (2007) konnten erhöhte Gedächtnisdefizite bei

Frauen feststellen, die mit einem Aromatasehemmer behandelt wurden im Vergleich zu Frauen, die mit Tamoxifen, einem Östrogenrezeptorhemmer, der eine partiell mit Estrogen agonistische Funktion hat, behandelt wurden.

Bisher sind sechs Frauen und sieben Männer beschrieben worden, bei denen durch Genmutation im Cyp19-Gen eine Aromatase-Aktivität fehlte. Diesen Patienten fehlte die Fähigkeit endogene Estrogene zu bilden (Jones *et al.*, 2006). Weibliche Neugeborenen zeigen einen Pseudohermaphroditismus mit Klitorishypertrophie und während der Pubertät eine primäre Amenorrhoe, eine gestörte Brustentwicklung und zystische Ovarien. Bei den Männern waren die Testosteron- und Gonadotropinlevel normal bis erhöht. Alle waren sehr groß gewachsen und zeigten eine verspätete Knochenreife mit verspätetem Epiphysenverschluss (Oettel, 2002; Gennari *et al.*, 2004; Khosla *et al.*, 2002). Sie erkrankten frühzeitig an Osteoporose mit Knochenschmerzen und zunehmendem Genu valgum. Unter einer Estrogenherapie stieg das Knochenalter und Knochendichte. Alle Personen hatten einen erhöhten Body-Mass-Index mit abdominaler Fettanreicherung, also einer androiden Fettverteilung wie sie auch bei Männern und postmenopausalen Frauen typisch ist, während prämenopausale Frauen eher eine gynoide Fettverteilung aufweisen (Jones *et al.*, 2000). Der Lipidstoffwechsel war mit erhöhten Triglyceriden und erniedrigtem high-density Lipoprotein gestört (Jones *et al.*, 2006, Simpson *et al.*, 2004).

### **2.2.2.1 Aromataseinhibitoren**

Die derzeit für die endokrine Therapie von postmenopausalen, hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom-Patientinnen zugelassenen, oral applizierbaren Aromatasehemmer der 3. Generation werden in steroidale und nichtsteroidale Substanzen eingeteilt. Sie verhindern die Bildung von Estrogenen aus den androgenen Vorstufen Androstendion und Testosteron durch Hemmung der Aromatase. Bei prämenopausalen Frauen zeigt die Aromatase in den Ovarien die höchste Aktivität und kann durch die gängigen Aromatasehemmer nicht blockiert werden, da die Gabe in der Prämenopause zu einer Ausschüttung von GnRH führt. Sie stimuliert die Ovarien und bewirkt eine gesteigerte Estrogensynthese. Der in dieser Arbeit verwendete Aromatasehemmer Letrozol (Femara®) ist ein selektiver, nichtsteroidaler Aromatasehemmer, der kompetitiv an das Häm des Cytochrom-P450 der Aromatase bindet (Hellriegel *et al.*, 2010). Zhou *et al.* (2010) haben gezeigt, dass Letrozol in der Lage ist, die Hirnschranke zu durchbrechen. Eine Dosis von 100nM reduziert die Estrogensynthese von hippocampalen Neuronen bereits um 50% (Kretz *et al.*, 2004; Fester *et al.*, 2006).

Eine ebenfalls hohe klinische Relevanz wie Aromatasehemmer haben die selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERM). Sie hemmen kompetitiv die Bindung von Estrogenen an die zytoplasmatischen Hormonrezeptoren. Infolgedessen kommt es zu einer Abnahme der Zellteilung in den estrogenabhängigen Geweben bzw. zur Apoptose in entsprechenden Tumorzellen. In dieser Arbeit wurde der SERM ICI 182 780 (Fulvestrant, Faslodex®) verwendet. Er ist für die Behandlung von postmenopausalen, estrogenrezeptorpositiven Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinom nach Versagen einer vorausgegangenen endokrinen Therapie zugelassen. ICI 182 780 ist ein rein kompetitiver Estrogenrezeptorantagonist mit einer Estrogen vergleichbaren Affinität zum Rezeptor. Im Gegensatz zum Standardtherapeutikum des hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms Tamoxifen besitzt ICI 182 780 keine agonistische Rest-Aktivität, sondern ist ein reiner Estrogenrezeptor Antagonist und reduziert sogar die Estrogenrezeptor-Synthese (Hellriegel *et al.*, 2010).

### **2.2.3 Die ArKO-Maus**

Durch Deletion des Cyp 19-Gens gelang es Fisher *et al.* (1998) erstmals Aromatase-Knock out-Mäuse (ArKO-Mäuse) zu generieren. Es ist ihnen also erstmals gelungen Tiere zu züchten, die durch das Fehlen der Aromatase nicht in der Lage sind Testosteron zu Estradiol zu aromatisieren. Die weiblichen ArKO-Mäuse besitzen einen unterentwickelten Uterus und unterentwickelte äußere Geschlechtsmerkmale. Sie sind nicht fortpflanzungsfähig (Simpson *et al.*, 2004). Ihre Ovarien enthalten eine große Anzahl an Follikeln mit vielen Granulosazellen. Zudem zeigen die Ovarien eine Zellformation, die Anzeichen einer stagnierten Ovulation zeigt. Gelbkörper werden nicht ausgebildet. Das Brustdrüsengewebe ähnelt dem Gewebe eines präpubertären Weibchens (Fisher *et al.*, 1998). Die Serumlevel an Testosteron sind 10 Mal so hoch wie bei Wildtyp-Weibchen und auch die Gonadotropin-, LH- und FSH-Level (Estrogeninduktoren) sind erhöht (Simpson *et al.*, 2004).

Männliche ArKO-Mäuse werden phänotypisch normal geboren. Im Alter von fünf Monaten zeigen sie jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Femurlänge und nicht wie beim Menschen einen abnormen Riesenwuchs (Oz *et al.*, 2000). Sie haben eine geringere Knochendichte vor allem in der Lendenwirbelsäule, die durch Estrogenapplikation behandelt werden kann (Britt *et al.*, 2000). Ab einem Alter von ca. 10 Wochen reichern sie durch Größenzunahme und steigende Anzahl an Adipozyten subcutanes Fettgewebe an, sodass der

Fettgewebsanteil bei der männlichen ArKO-Maus mit 15% doppelt so hoch ist wie beim Wildtyp (Jones *et al.*, 2000). Dieser Fakt scheint nicht mit übermäßiger Nahrungsaufnahme zusammenzuhängen, sondern kann mit einer reduzierten körperlichen Spontanaktivität assoziiert werden (Jones *et al.*, 2000).

Bei allen ArKO-Mäusen ist der Fettstoffwechsel gestört. Die Serumlevel an Cholesterin, Leptin und Insulin sind erhöht, obwohl die Blutglukosespiegel unverändert sind. Dieses resultiert in einer Steatosis hepatis. Kimura *et al.* (2003) zeigten, dass die Aromatase auch eine regulatorische Funktion im Herzkreislaufsystem aufweist, da vasorelaxierende Prozesse verändert sind. Ebenso scheint die Aromatase einen Einfluss auf das Immunsystem auszuüben. Obwohl ihre mRNA nicht im Thymus exprimiert wird, scheint der Thymus Estrogen sensibel zu sein (Li *et al.*, 2002). So ist das Thymusvolumen bei den männlichen ArKO-Mäusen im Alter von 13-16 Wochen um 60% geringer als das der Wildtyp-Mäuse in der entsprechenden Altersklasse (Li *et al.*, 2002). Auch die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> positiven Lymphozyten ist bei den ArKO-Mäusen geringer. Eine Estrogensubstitution von Geburt an kann das normale Thymusvolumen und die normale Anzahl an Lymphozyten aufrecht erhalten (Jones *et al.*, 2006). Außerdem scheinen die ArKO-Mäuse mit zunehmendem Alter Zeichen einer lymphoproliferativen Autoimmunerkrankung zu entwickeln. Diese kommt auch beim Sjögren-Syndrom vor, einer Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, bei der Immunzellen die Speichel und Tränendrüsen angreifen (Shim *et al.*, 2004). Zusätzlich zeigen sie eine erhöhte B Lymphozytopoese im Knochenmark, die mit einer Vergrößerung der Milz und der mesenterialen Lymphknoten einhergeht (Oz *et al.*, 2001).

### **2.2.3.1. ZNS-Struktur und Verhaltensmuster der ArKO-Maus**

Wie bereits beschrieben wird die Aromatase in vielen Hirnregionen wie dem Hypothalamus, der Amygdala und im Hippocampus exprimiert (Simpson *et al.*, 2002). Untersuchungen und Vergleiche zwischen ArKO-Maus und Wildtyp-Maus haben deutliche morphologische Unterschiede in der Struktur und im Verhalten ergeben. Rune *et al.* zeigten (bisher unveröffentlicht), dass die ArKO-Mäuse im Hippocampus eine reduzierte Synapsenanzahl aufweisen. Im Alter von einem Jahr ist bei der ArKO-Maus eine Herunterregulation dopaminergener Neurone im präoptischen Areal zu verzeichnen. Daraus erklären Hull *et al.*



(1995) das reduzierte Kopulationsverhalten der männlichen ArKO-Mäuse, da demonstriert werden konnte, dass eine Dopaminausschüttung im präoptischen Areal das sexuelle Verhalten beeinflusst. Dalla *et al.* (2004) untersuchten, ob das veränderte sexuelle Verhalten der ArKO-Mäuse einer veränderten motorischen Aktivität und einem verändertem Angstgefühl zu Grunde liegt. Anders als bei den Untersuchungen von Jones *et al.* (2000), die gezeigt hatten, dass die ArKO-Mäuse eine geringere Spontanaktivität haben, zeigten Dalla *et al.* (2004), dass die motorische Aktivität und das Angstgefühl bei den ArKO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert war. Sie schließen aus ihrer Untersuchung, dass die sexuelle Beeinträchtigung nicht durch Veränderung anderer Verhaltensmuster verursacht wird. Auch die Untersuchung weiblicher ArKO-Mäuse belegte keinen Unterschied in der motorischen Spontanaktivität, im Explorations- und Angstverhalten. Im Wasser-Test zeigten sie jedoch ein passiveres Verhalten als die Wildtyp-Mäuse. Dieser Befund wurde als erhöhte Neigung zur Depressivität interpretiert (Dalla *et al.*, 2004). Ferner zeigten Martin *et al.* (2003) mit dem sogenannten „Y-maze Test“, dass sowohl weibliche als auch männliche ArKO-Mäuse ein schlechteres Orientierungsgedächtnis besitzen als Wildtyp-Mäuse.

#### **2.2.4 Die Regulation der Aromatase**

Die Enzymaktivität der Aromatase scheint auf zwei Arten reguliert zu werden: zum einen ein langandauernder Weg, der auf genetischer Ebene abläuft und mehrere Stunden bis Tage andauert und zum anderen ein kurzer Weg, der nur wenige Sekunden währt. Es wird angenommen, dass beim langandauernden Weg die Aromatase-Aktivität durch ihre Enzymkonzentration und die Konzentration ihrer Produkte gesteuert wird und diese Steuerung über eine Regulation der Enzymtranskription erfolgt (Balthazart *et al.*, 2001) Die Produkte, Estrogene, wirken über Estrogenrezeptoren, von denen zwei Isoformen beschrieben wurden: Estrogenrezeptor  $\alpha$  und Estrogenrezeptor  $\beta$ . Die Estrogene binden an die Rezeptoren und führen dazu, dass liganden aktivierte Rezeptordimere in den Zellkern gelangen und dort durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen zu einer Aktivierung der Transkription führen (Prange-Kiel, 2006). Der kurze, schnelle Weg wurde von Balthazart *et al.* (2003) beschrieben. Sie zeigten, dass die Aromatase-Aktivität durch synaptische Impulse wie z.B. Kalium induzierte Depolarisation, erhöhte intrazelluläre Calcium-Werte und Calcium-abhängige Phosphorylierung moduliert wird. Mehrere Proteinkinasen wie z.B. Proteinkinase C, Proteinkinase A und  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulin-abhängige Proteinkinase sind für die Phosphorylierung zuständig, die zu einer Aktivitätsverminderung der Aromatase führt. Diese Abnahme konnte jedoch mit Hilfe von Inhibitoren der Proteinkinase C und A rückgängig

gemacht werden. ATP,  $Mg^{2+}$  und besonders  $Ca^{2+}$  scheinen die Phosphorylierung zu erleichtern. Darüber hinaus zeigten Balthazart *et al.* (2003), dass exzitatorische Neurotransmitter wie NMDA, AMPA und Kainat über eine Phosphorylierung die Aromatase-Aktivität senken.

## 2.3 Synapsen

Synapsen sind spezielle Kontaktstellen, an denen Neurone Informationen von anderen Zellen empfangen oder an andere Zellen vermitteln. Die Erregungsübertragung erfolgt meistens von einem Axon auf einen Dendriten. Seltener erfolgt die Übertragung von einem Axon auf das Soma einer Nervenzelle, von einem Axon auf ein anderes Axon oder von einem Dendriten auf einen anderen Dendriten. Es gibt zwei Arten von Synapsen: elektrische und chemische. Bei den sogenannten elektrischen Synapsen handelt es sich um Gap junctions, an denen Ionenkanäle zweier Zellen Aktionspotentiale direkt und ohne Verzögerung weitergeben. Bei den im ZNS am häufigsten vorkommenden chemischen Synapsen sind die jeweiligen Zellen voneinander elektrisch isoliert. Sie bestehen aus der präsynaptischen Membran am Bouton (Ende des Axons), einem zwischen präsynaptischer und postsynaptischer Zelle liegendem schmalen synaptischen Spalt und der postsynaptischen Membran, dem Anfangsstück des Dendriten. Die Signalübertragung erfolgt, indem am synaptischen Bouton (Endstück des Axons) ankommende Erregungen zu einem Einstrom von Calciumionen an der präsynaptischen Zellmembran führen. Dieses löst eine Verschmelzung von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran aus, wodurch ein in ihnen gespeichertes Signalmolekül (Neurotransmitter) in den synaptischen Spalt entleert wird.

Die Neurotransmitter diffundieren innerhalb einer Millisekunde zur postsynaptischen Membran und binden dort an transmitterspezifische Rezeptormoleküle. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt dann zu einer elektrischen Veränderung der postsynaptischen Zelle.

An der zytoplasmatischen Seite der postsynaptischen Membran liegt die postsynaptische Density (PSD). Es wurden mehr als 30 verschiedene Proteine beschrieben, die in der PSD angereichert sind und von denen angenommen wird, dass sie die synaptische Funktion beeinflussen (Kennedy *et al.*, 1990). Die PSD ist eine etwa 50 nm große Struktur, die entweder scheibenförmig oder irregulär perforiert vorkommt (Harris und Kater 1994). Synapsen mit einer kräftigen postsynaptischen Verdichtung werden auch Synapsen vom Typ Gray I bezeichnet. Sie sind meist exzitatorische Synapsen. Synapsen mit einer gleich breiten

prä- und postsynaptischen Verdichtung werden Synapsen vom Typ Gray II genannt und haben meist eine inhibitorische Funktion (Gray 1959). Der postsynaptische Teil von 90% der exzitatorischen Synapsen wird im ZNS durch dendritische Spines gebildet. Dendritische Spines sind kleine membranöse Protrusionen („Dornen“), die besonders an Dendriten hippocampaler Neurone zu finden sind und dadurch die neuronale Kontaktfläche an den Synapsen erheblich vergrößern (Harris und Kater 1994). 1891 wurden sie erstmals von Ramon y Cajal beschrieben. In der CA1-Region des Hippocampus bilden die dendritischen Spines die Hauptlokalisation exzitatorischer Synapsen (Megias *et al.*, 2001). Ihre Länge beträgt 1-3µm. Spines bestehen aus einem Kopf, „spine-head“ (Volumen: 0,001-1µm<sup>3</sup>), der über einen dünnen Hals, „spine-neck“ (Durchmesser: <0,1µm), mit dem Neuron verbunden ist (Nimchinsky *et al.*, 2002). Anhand ihrer unterschiedlichen Morphologie werden Spines in verschiedene Gruppen unterteilt: man unterscheidet kurze und dicke („stubby“), dünne („thin“), verzweigte („branched“) und pilzförmigen („mushroom-shaped“) Spines.

Spines bestehen aus einem speziellen Zytoskelett, als dessen Hauptbestandteil große Mengen an Aktin nachgewiesen werden konnten (Fifková und Delay 1983; Fifková 1989). An lebenden Neuronen konnte gezeigt werden, dass Spines in der Lage sind ihre Morphologie innerhalb weniger Sekunden zu verändern (Fischer *et al.*, 1998). Diese Aktin-abhängige Beweglichkeit scheint vom intrazellulären Calciumspiegel reguliert zu werden (Fifková 1989; Holcman *et al.*, 2004; Oertner *et al.*, 2005; Segal *et al.* 2005). So bewirkt eine hohe Calciumkonzentration eine Spinelängenzunahme (Berridge, 1998). Matsuzaki *et al.* (2001, 2004) vermuten, dass diese Spine-Plastizität das anatomische Korrelat des Gedächtnisses darstellt. Sie konnten zeigen, dass eine repetitive Glutamat Stimulierung hippocampaler Neurone zu einer raschen Vergrößerung von Spines führt. Diese Spine-Vergrößerung war mit erhöhten elektrischen Strömen in den Synapsen assoziiert. Sie gehen daher davon aus, dass die synaptischen Spines den Hebb'schen Postulaten folgen, die besagen, dass Neurone schneller und bevorzugter aufeinander reagieren, je häufiger sie sich gegenseitig aktiviert haben (Hebb, 1949).

## 2.4 Synaptische Proteine

### 2.4.1 Synaptopodin und der Spineapparat

1997 wurde das Protein Synaptopodin erstmals von Mundel *et al.* beschrieben. Es gehört zu der Familie der Aktin-assoziierten Prolin-reichen Proteine. Es wurden zwei Splice-Varianten des Synaptopodin-Gens beschrieben: eine 100 kDa schwere Isoform, die ausschließlich im Gehirn exprimiert wird und eine 110 kDa schwere Isoform, die spezifisch für Podozyten der Niere ist (Mundel *et al.*, 1997; Asanuma *et al.*, 2005, Deller *et al.*, 2006). In den Podozyten der Niere stellt Synaptopodin einen Teil des aus Aktin bestehenden kontraktile Grundgerüsts dar (Mundel *et al.*, 1997) und scheint dessen Motilität zu regulieren (Asanuma *et al.*, 2005). Die Expression von Synaptopodin im Gehirn ist auf das Telencephalon (Bulbus olfactorius, cerebraler Kortex, Striatum und Hippocampus) beschränkt (Mundel *et al.*, 1997; Deller *et al.*, 2000a). Im Hippocampus befindet sich Synaptopodin hauptsächlich in der postsynaptischen Dichte (PSD) und in dendritischen Spines des Cornu ammonis und des Gyrus dentatus (Mundel *et al.*, 1997). Dort ist es mit dem Spineapparat, einer zytoplasmatischen Organelle assoziiert (Deller *et al.*, 2000a).

Der Spineapparat ist in 20% der dendritischen Spines zu finden und ist dort im „spine-neck“ lokalisiert. Er besteht aus glattem Endoplasmatischem Retikulum (SER) und elektronenmikroskopisch dichten Platten (Spacek und Harris 1997; Deller *et al.*, 2003), die Aktin und  $\alpha$ -Aktinin enthalten (Wyszynski *et al.*, 1998; Capani *et al.*, 2001) und deren Ausbildung von Synaptopodin abhängig ist, das in 95% der Spines mit Spineapparat enthalten ist (Bas Orth *et al.*, 2005). Hauptsächlich kommt der Spineapparat in den pilzförmigen, reifen Spines vor (Knott *et al.*, 2006; Spacek 1985). Seine Funktion konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, doch scheint er als intrazellulärer Calciumspeicher zu dienen (Fifkova *et al.*, 1983), der durch Calcium vermittelt Calcium freisetzt (Emptage *et al.*, 1999).

In der Synaptopodin-knock out Maus waren Spinelänge, -ausrichtung und -dichte unverändert, doch fehlte ihnen in den dendritischen Spines der Spineapparat (Deller *et al.*, 2003). Außerdem schienen sie ein schlechteres Ortsgedächtnis als die Kontrollgruppe aufzuweisen und besaßen eine reduzierte hippocampale Langzeit-Potenzierung (LTP), sodass angenommen werden kann, dass der Spineapparat eine Relevanz für die synaptische Plastizität besitzt (Deller *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde Synaptopodin als Marker für reife Spines, die einen Spineapparat besitzen, eingesetzt.

### **2.4.2 Synaptophysin, ein präsynaptischer Marker**

An Synapsen werden Informationen meist durch niedermolekulare chemische Verbindungen, den Neurotransmittern, übertragen. Dieses erfolgt durch Exocytose. Dazu werden die Neurotransmitter in den präsynaptischen Nervenendigungen mit Hilfe von Vesikeln an die präsynaptische Membran transportiert und in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort binden sie an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran, sodass Informationen von Nerv zu Nerv übertragen werden können. Synaptophysin ist ein Vesikelprotein. Sein Molekulargewicht beträgt 38 kDa und es besitzt vier Transmembrandomänen, die ihm eine antigene Eigenschaft verleihen.

Obwohl Eshkin und Leube (1995) nachweisen konnten, dass Synaptophysin für die Exocytose nicht essentiell ist, hatten Alder *et al* (1992) gezeigt, dass die Transmitterexocytose nach Hemmung von Synaptophysin erschwert ist. Synaptophysin scheint für die Fähigkeit Synapsen zu bilden wichtig zu sein, da die Synapsenausbildung bei gestörter Synaptophysinexpression verringert war (Tarsa und Goda 2002). Ferner sind Synaptophysinmultimere in der Lage Ionenkanäle zu bilden (Thomas *et al.*, 1988).

Synaptophysin scheint eine Rolle bei der Wiederverwertung der Vesikelmembranen zu spielen (Daly und Ziff, 2002) und für die hohe Membrankrümmung synaptischer Vesikel von Bedeutung zu sein (Thiele *et al.*, 2000). Calacos *et al* (1994) erwägten erstmals Synaptophysin als Marker für die Synaptogenese in Betracht zu ziehen und dabei besonders als präsynaptischen Marker einzusetzen.

### **2.4.3 Spinophilin, ein postsynaptischer Marker**

Spinophilin ist ein Protein, das besonders in den Spineköpfen von dendritischen Spines lokalisiert ist und für den Grundaufbau, die Motilität und die Funktion von Spines eine Rolle zu spielen scheint (Allen *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2003; Muly *et al.*, 2004, Schüler und Peti, 2007). Daher kann es als indirekter Marker für Spines benutzt werden (Alves *et al.*, 2002; Brake *et al.*, 2001). Veränderungen der Spinophilin-Expression sollen Veränderungen der Spinedichte wiedergeben (Amateau *et al.*, 2002).

Spinophilin bündelt Actinfilamente und koordiniert die Produktion von F-Actin, das das Grundgerüst der dendritischen Spines darstellt (Satoh *et al.*, 1998). Ferner bildet Spinophilin einen Komplex mit der katalytischen Untereinheit von Protein-Phosphatase 1, der Ionenkanäle und synaptische Plastizität reguliert (Allen *et al.*, 1997). Die bevorzugte

Lokalisation von Spinophilin in den dendritischen Spines führt dazu, dass es als postsynaptischer Marker eingesetzt werden kann.

## 2.5 Fragestellung

In zahlreichen vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Enzyms Aromatase, das den letzten Schritt der Estrogensynthese katalysiert, die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflusst (Kretz *et al.*, 2004 und Zhou *et al.*, 2010, Vierk *et al.*, 2012). Nach pharmakologischer Hemmung des Enzyms kam es zu einem Verlust von Spines, Spinesynapsen, einer Herunterregulation synaptischer Proteine und einer Verschlechterung der Langzeitpotenzierung (Vierk *et al.* 2012). In dieser Dissertation soll geklärt werden, ob die *in vitro* und *in vivo* Befunde, nach pharmakologischer Hemmung der Aromatase, durch vergleichbare Ergebnisse in der aromatasedefizienten Maus bestätigt werden können. Dazu wurden weibliche Wildtyp-Mäuse mit weiblichen ArKO-Mäusen verglichen. Zusätzlich wurde eine ArKO-Maus untersucht, die mit 17 $\beta$ -Estradiol, eine ArKO-Maus, die mit dem Estrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant (ICI 182 780) und eine ArKO-Maus, die sowohl mit 17 $\beta$ -Estradiol als auch mit ICI 182 780 (ICI) behandelt worden war.

Es wurden immunhistochemische Färbungen von hippocampalen Geweben dieser Mäuse mit Antikörpern gegen Synaptopodin, Synaptophysin und Spinophilin durchgeführt. Dabei wurde Synaptopodin als Korrelat des reifen Spineapparates, Synaptophysin als präsynaptischer Marker und Spinophilin als postsynaptischer Marker eingesetzt.

### 3. Material

#### 3.1. Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Aluminiumfolie	Lager UKE
Brutschrank WTC	Binder
Cutfix Surgical Disposable Scalpell, Skalpell	Braun
Cryo-Star HM 560 M	(MICROM International GmbH, Deutschland)
Deckgläser, 24x32mm	Marienfeld
Ep TIPS Standart, verschiedene Größen	Eppendorf AG
Excel 2003 (Software)	Microsoft
Falcon Cell Strainer, 40µm Nylon	Becton Dickinson Labware
GraphPad Prism 3.02 und 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Handschuhe	Kimberly-Clark
Heidemannspatel	Aesculap
Instrumentenkasten	Merck
Mikroskop: Axiovert 25	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Axiovert100, HBO100, MC80, EBQ100	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Axiovert100, HBO50, MC100, MBG52ac	Zeiss, Deutschland
Openlab 3.1.5 (Software)	Improvision, Coventry, UK
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25cm	Merck
Pinzette nach Dumount	Merck

Phasenkontrastmikroskop	Leitz
Pipetten, verschiedene Volumina	Gilson
Schere	Aesculap
SPSS für Windows (Software)	SPSS GmbH Software
Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Heraeus
Vortex-Genie 2	Scintific Industries
Waage	Sartorius
Windows 2000 (Software)	Microsoft
Windows XP (Software)	Microsoft
Word 2003 (Software)	Microsoft
Zellstofftücher	Wepa

### **3.2 Chemikalien**

17 $\beta$ -Estradiol	Sigma, St. Louis, MO
Aceton	Baker
Albumin, Bovine, BSA, A7906	Sigma, St. Louis, MO
Alexa Flour 488, polyclonal	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia, 1 Liter	Baxter Deutschland
Cy3, monoclonal, goat anti mouse	Jackson Immuno Research
Cy3, polyclonal, goat anti rabbit	Jackson Immuno Research
DAKO, fluorescence free mounting medium	DAKO
DAPI, 4',6-Diamidido-2-phenylindol	Sigma-Aldrich



ICI 182.780	Estrogenrezeptorantagonist, Tocris (bioscience)
PBS Tablets	Gibco
Spinophilin, polyclonal, Host: rabbit	Upstate (biotechnologie)
Synaptophysin, monoclonal, Host: mouse	Chemicon, Hofheim, Deutschland
Synaptopodin, monoclonal, Host: mouse	PROGEN Biotechnik

### **3.3 Lösungen**

#### **BSA**

- 3% BSA in PBS (pH 7,4)

#### **NGS (normal goat serum)**

- 2% NGS in PBS (pH 7,4)

#### **PBS**

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

alternativ:

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

## 4. Methoden

### 4.1 Präparation der Gehirne aus der Maus

Für dieses Experiment standen uns durch die freundliche Überlassung von Prof. Vollmer, Leiter des Zoologischen Institutes der Technischen Universität Dresden, sechs weibliche 12 Wochen alte ArKO-Mäuse (gezüchtet nach Fisher *et al.*, 1998) zur Verfügung, von denen eine mit 10µg/kg KG/Tag 17β-Estradiol (E2) behandelt worden war (Dosis entspricht der Estrogen-Plasmakonzentration weiblicher Mäuse, von Schassen *et al.*, 2006), eine mit 1mg/kg KG/Tag ICI 182.780 (ICI) behandelt worden war und eine, die sowohl mit ICI als auch E2 behandelt worden war. Als Kontrolle wurden vier genetisch unveränderte 12 Wochen alte weibliche Black6-Mäuse aus dem Tierstall der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf bereit gestellt. Wasser und Futter war *ad libitum* vorhanden. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen für den Tierschutz und im Einvernehmen mit der Ethikkommission durchgeführt. Die Präparation der Gehirne wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt.

Zuerst wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> begast. Nach Wirkungseintritt wurden sie mit einer Schere dekapitiert und die Kopfhaut entfernt, sodass das Schädeldach vorsichtig mit einer geraden Schere eröffnet werden konnte. Mit einer Pinzette wurden die Reste des Schädeldaches entfernt ohne dass cerebrale Strukturen verletzt wurden.

Die entnommenen Gehirne wurden auf einen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) getränkten Schwamm gelegt. Das Kleinhirn wurde entfernt und die beiden Großhirnhälften mit einem Skalpell entlang des Interhemisphärenspaltes durchtrennt. Die einzelnen Hirnhälften wurden in 2-Methyl-Butan schockgefroren und anschließend bei -25°C gelagert.

### 4.2 Zubereitung der Schnitte

Mit Hilfe des Kryostaten wurden von den Gehirnhälften entlang der Hippocampi sagittal 12µm-dicke Schnitte hergestellt. Jeder Schnitt wurde auf einen Objektträger gezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in kaltem Aceton bei -20°C im Kühlfach für 10 Minuten fixiert, dann der Acetonlösung entnommen und für weitere 10 Minuten an der Luft getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

### **4.3 Immunhistochemie der cerebralen Gefrierschnitte**

Insgesamt wurden drei verschiedene immunhistochemische Experimente durchgeführt. Im ersten Experiment wurde ein Synaptopodinantikörper, im zweiten ein Synaptophysinantikörper und im dritten ein Spinophilinantikörper als Primärantikörper verwendet.

#### **4.3.1 Ablauf der immunhistochemischen Färbung**

Für jeden Versuch wurden jeweils drei Schnitte von drei WT-Mäusen (für den Versuch standen vier WT-Mäuse zur Verfügung, von denen jeweils willkürlich drei Tiere ausgewählt wurden) und jeweils drei Schnitte von drei unbehandelten ArKO-Mäusen verwendet. Zusätzlich konnten durch die freundliche Überlassung von Prof. Vollmer bei jedem Versuch drei Objektträger mit Schnitten einer ArKO-Maus, die mit E2 behandelt worden war, einer ArKO-Maus, die mit ICI behandelt worden war und einer ArKO-Maus, die mit E2 und ICI behandelt worden war, angefärbt werden. Von den zuletzt genannten Mäusen stand jeweils Gewebe eines einzigen Tieres zur Verfügung. Es wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Schnitte aus dem Bereich des Hippocampus genommen wurden und dass sie entweder das obere oder das mittlere Drittel der CA1-Stratum radiatum-Region des Hippocampus enthielten.

Nach 20 Minuten langem Auftauen und Trocknen der Gefrierschnitte wurden diese für 10 Minuten in Aceton (Synaptopodin-Versuchsreihe) bzw. in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) (Synaptophysin- und Spinophilin-Versuchsreihe) fixiert und dann drei Mal 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Um unspezifische Immunreaktionen zu verhindern wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur für 60 Minuten in 2%igem NGS (Synaptopodin- und Synaptophysin-Versuchsreihe) bzw. 30 min. in 3%igem BSA (Spinophilin-Versuchsreihe) geblockt. Die nachfolgende Inkubation mit dem Primärantikörper Synaptopodin (Progen, unverdünnt) und dem verdünnten Primärantikörper Synaptophysin (Chemicon, Antikörper zu NGS/PBS-Serum 1:500) erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper Spinophilin (upstate, Antikörper zu BSA 1:500) wurde bei 37°C für zwei Stunden durchgeführt.

Nachdem die Schnitte dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, mit dessen Hilfe der Primärantikörper visualisiert werden kann. Für die Synaptopodin- und die Synaptophysin-Versuchsreihe wurde ein monoklonaler Cy3-Antikörper und für die Spinophilin-Versuchsreihe ein polyklonaler Cy3-Antikörper benutzt. Beide Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:350 in PBS verdünnt. Nach der Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Schnitte erneut dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne für 1 Minute mit einer DAPI-Kernfärbung (Verdünnung 1:1000 in PBS; Sigma) angefärbt. Letztendlich wurden die Schnitte zwei mal 5 Minuten in PBS gespült, kurz in Aquadest eingetaucht, mit einem Tropfen DABCO (fluoreszenzfreies Eindeckmedium) versehen und mit einem Deckglas eingedeckt. Bis zur Bildanalyse wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert. Pro Antikörper wurden drei Versuche durchgeführt.

## **4.4 Bildanalyse**

Es wurde immunhistochemisch die Expression von Synaptopodin, Synaptophysin und Spinophilin analysiert.

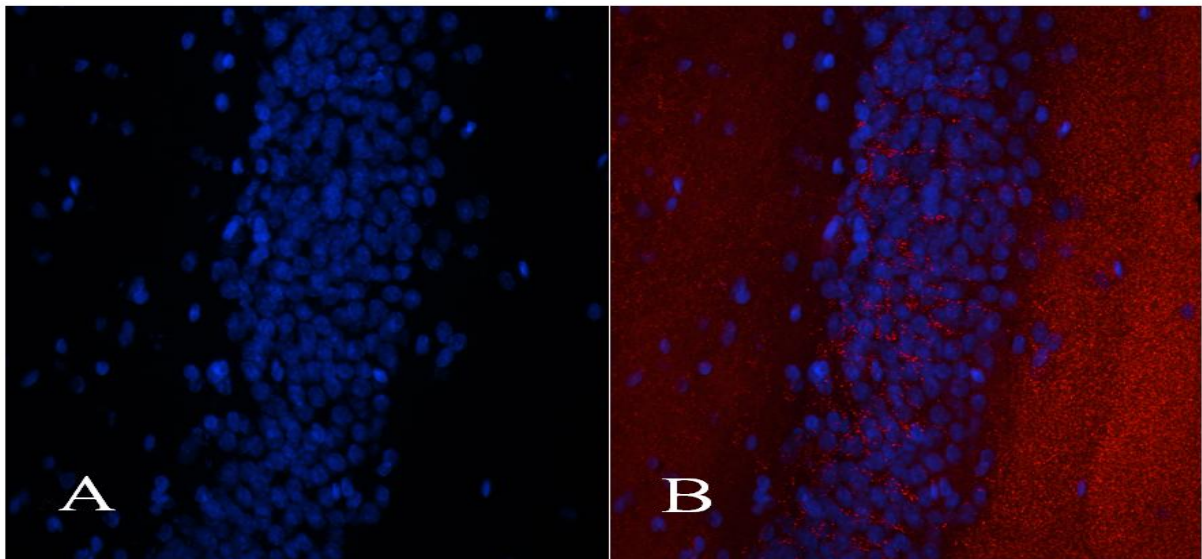
Synaptopodin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, das essentiell für die Ausbildung des Spineapparates zu sein scheint. Es kommt im Hippocampus in den dornfortsatzhaltigen Neuronen vor und wird dort an den Initialstücken der Axonsegmente exprimiert. Synaptophysin ist ein Membranbestandteil von Transmittervesikeln und wird als präsynaptischer Marker verwendet. Spinophilin ist ein Protein, das besonders in den Spines angereichert ist und als postsynaptischer Marker benutzt werden kann. Die Immunhistochemische Aktivität von Synaptophysin und Spinophilin ist punktförmig und besonders in den dendritischen Schichten des Hippocampus anzufinden.

### **4.4.1 Analyse der Versuchsreihen**

Zum Darstellen und Dokumentieren der angefertigten Immunhistochemien wurde ein Laser Scanning Mikroskop (LSM, Meta 5, Carl Zeiss, Inc.) verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig Zeit zwischen den letzten Schritten der

immunhistochemischen Färbung und der Intensitätsmessung lag. Bei jedem Versuch wurde ein Objektträger mit einem Immunhistochemieschnitt einer WT-Maus als Kontrolle definiert. Mit ihr wurden Schwellenwerte und optimalen Einstellungen für das Scannen ermittelt und bei der Auswertung beibehalten. So wurden die Fluoreszenz der fluorochrom-markierten Antikörper in jedem Versuch bei gleicher Intensität und Wellenlänge des Lasers gemessen.

Mit Hilfe der 4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Kernfärbung (DAPI) wurden die zu messenden Bereiche aufgesucht. Zunächst wurde in den Immunhistochemien der Hippocampus aufgesucht und mit dem Mikroskop eingestellt. Das Stratum pyramidale diente als Orientierung, sodass mit ihm die CA1-Region des Cornu ammonis detektiert und das auf seiner konkaven Seite liegende Stratum radiatum aufgesucht werden konnte. Das Stratum radiatum der CA1-Region war in dieser Arbeit als Messbereich festgelegt worden. In diesem verlaufen die Schaffer-Kollaterale, welche Informationen aus der CA3-Region an die Pyramidenzellen der CA1-Region schicken.



**Abb.3:Stratum-pyramidale**

**Aufsuchen und Scharfstellen des Stratum radiatum der CA 1-Region mit Hilfe der DAPI-Kernfärbung (A). B zeigt die mit DAPI-Kernfärbung überlagerte Antikörperfärbung.**

Mit dem Laser Scanning Mikroskop (Konfokales Mikroskop) wurden immer gleichgroße Ausschnitte des Stratum radiatum der CA1-Region photographiert. Pro Objektträger wurden zwölf nebeneinander liegende Ausschnitte aufgenommen und pro Versuch von jedem Tier (je Versuch wurden drei Objektträger mit Gewebe von einer Maus angefärbt) sechsunddreißig Fotos gemacht wurden.

Die Fotos wurden gespeichert und mit dem Software Programm Improvision Openlab 3.1.5 weiter analysiert. Dieses Programm ermittelt die gefärbten Bereiche und Intensität der Färbung und verrechnet dann die Fläche des Signals mit der jeweiligen Intensität, woraus sich der jeweilige Staining Index ergibt.

Auch in dieser Auswertung wurde in jedem Versuch ein Immunhistochemieschnitt einer WT-Maus als Kontrolle benutzt, mit deren Hilfe die Kameraeinstellungen durchgeführt und bei allen Fotos eines Versuchs beibehalten wurden.

Zum Analysieren wurde eine immer gleich große Fläche (40 $\mu$ m mal 40 $\mu$ m) ausgewählt und pro Foto acht willkürlich platzierte 40 $\mu$ m mal 40 $\mu$ m große Ausschnitte untersucht.

So wurde für jedes Bild ein Staining Index errechnet. Nachdem jeder Versuch dreimal durchgeführt worden war, wurden die Staining Indices nach der Tiergruppe sortiert und zusammengefasst. Folglich wurden pro Versuchsreihe 108 Messwerte aus der WT-Gruppe (n=4), 108 Messwerte aus der ArKO-Mausgruppe (n=3) gewonnen. Zusätzlich wurden 36 Messwerte aus der mit E2 behandelten ArKO-Maus (n=1), 36 Messwerte aus der mit ICI behandelten ArKO-Maus (n=1) und 36 Messwerte aus der ArKO-Maus, die sowohl mit E2 als auch mit ICI behandelt worden analysiert. Um eine symmetrische Verteilung der Werte zu erhalten, wurden die Werte mit dem Programm SPSS für Windows logarithmiert. Mit diesem Programm erfolgte auch die weitere statistische Berechnung. Die Gruppe der WT-Mäuse wurde der Gruppe der unbehandelten ArKO-Mäuse mit Hilfe eines unpaarigen einfachen T-Tests gegenübergestellt. Darüber hinaus wurde von allen Tiergruppen eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt. So konnte für jede Versuchsreihe das Signifikanzniveau ( $p \leq 0,05$ ) und die mittlere Differenz berechnet werden.

Die Werte wurden als ln-Werte mit Hilfe des Graphik Programmes GraphPad Prism 3.02 und 5 in Box Plot Diagrammen dargestellt.

## **5. Ergebnisse**

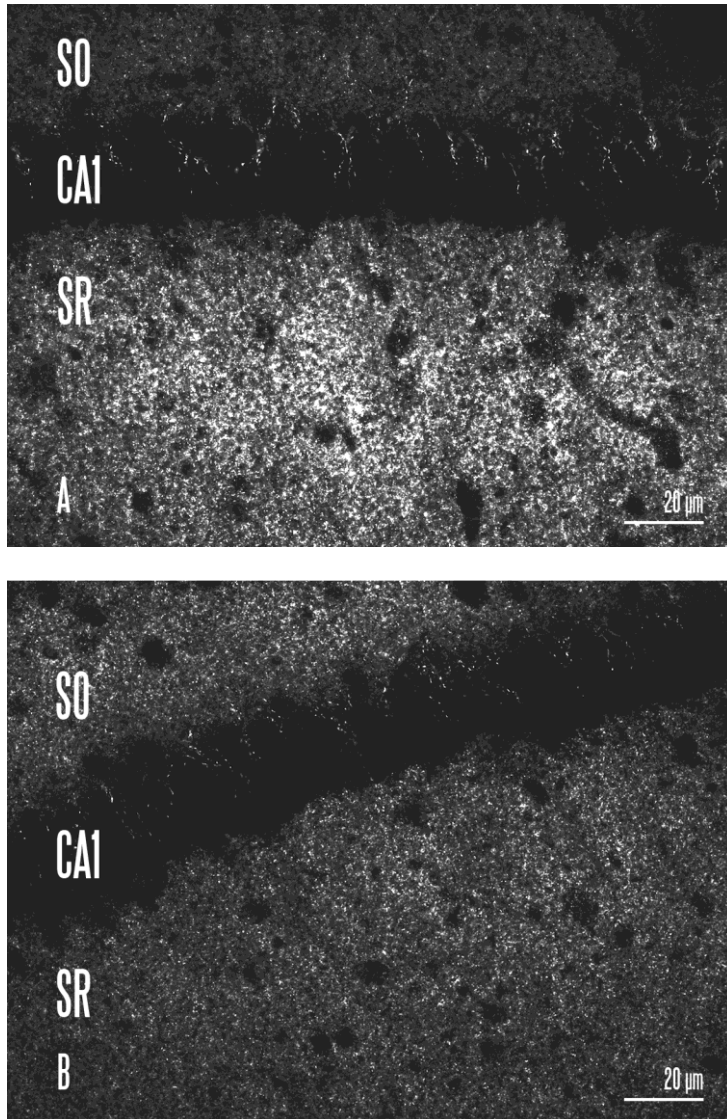
### **5.1 Immunhistochemische Untersuchungen**

Viele Studien beschreiben, dass Estrogene neuroprotektive Eigenschaften haben, da sie u.a. die Zellregeneration, das axonale Wachstum und die synaptische Übertragung positiv beeinflussen. In dieser Arbeit sollte die Auswirkung eines Knock-outs des Aromatasegens auf synaptische Proteine im Hippocampus untersucht werden. Die Hypothese, dass ein Mangel an Estrogenen wie nach pharmakologischer Inhibition der Aromatase zu einem verminderten Gehalt an synaptischen Proteinen führt, sollte verifiziert werden. Dafür wurden die synaptische Proteine Synaptopodin, Synaptophysin und Spinophilin in hippocampalen Gewebeschnitten von WT-Mäusen und ArKO-Mäusen verglichen.

#### **5.1.1 Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus**

In Abbildung 4 sind beispielhaft die mit Hilfe eines Laser Scanning Mikroskopes fotografierten immunhistochemisch angefärbten Gewebeschnitte einer WT-Maus (Abb. 4A) und einer ArKO-Maus (Abb. 4B) gezeigt. Im Mittelpunkt steht die Expression von Synaptopodin im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus. Erkennbar ist die nach immunhistochemischer Färbung zu detektierende punktförmige Anreicherung von Synaptopodin, die besonders im „Spineneck“ zu finden ist. Des Weiteren ist das Stratum pyramidale abgebildet, das zwischen Stratum oriens und Stratum radiatum liegt und mit dessen Hilfe die zu messende Region aufgesucht wurde.

Bereits bei der mikroskopischen Begutachtung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte durch das Laserscanningmikroskop war ein deutlich schwächeres Synaptopodinsignal im Gewebe der ArKO-Maus erkennbar (siehe Abbildung 4B) gegenüber der WT-Maus (siehe Abbildung 4 A) erkennbar.

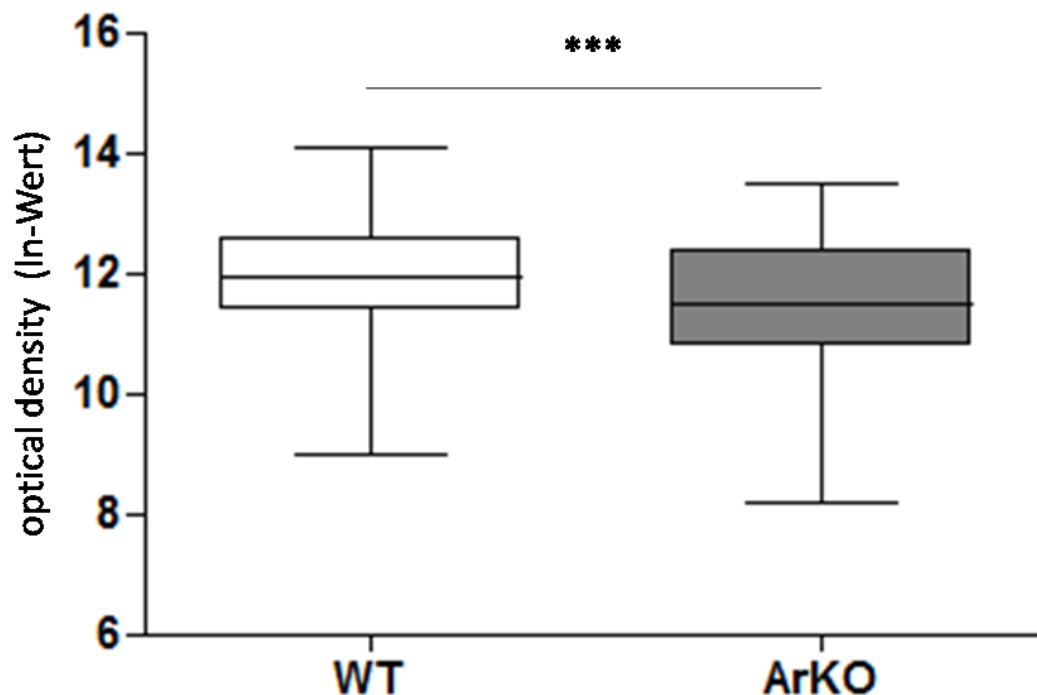


**Abb. 4:** Laserscanningmikroskopisches Bild von Synaptopodin-Signalen der CA1-Regionen einer WT-Maus (Bild A) und einer unbehandelten ArKO-Maus (Bild B). SO = Stratum oriens; CA1 = Cornu ammonis 1; SR = Stratum radiatum; Scalebar = 20μm

In Abbildung 5 sind die errechneten Daten aller Tiere einer Gruppe graphisch gegenübergestellt. Dargestellt ist die optical density der Synaptopodin Immunreaktivität der WT-Maus-Gruppe und der unbehandelten ArKO-Maus-Gruppe. Um eine symmetrische Verteilung der Messergebnisse zu erhalten, wurden die Werte der optical density logarithmiert.

Die Wildtyp-Maus-Gruppe diente als Kontrollgruppe. Ihre Synaptopodinwerte waren im Mittel 1,52-mal so hoch wie die Werte in der Gruppe der unbehandelten ArKO-Mäuse. Die Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus war damit im Mittel signifikant um 52% niedriger als bei der WT-Gruppe.





**Abb. 5:** Auswertung der Immunreaktivität mit Synaptopodin-Antikörpern in der CA1-Region von ArKO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. WT = Wildtyp (n=4), ArKO = Aromatase-Knockout-Maus (n=3). Dargestellt ist die logarithmierte optical density für die einzelnen Gruppen. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

Zusätzlich war eine ArKO-Maus, die mit E2 behandelt worden war, eine ArKO-Maus, die mit ICI 182 780 behandelt worden war und eine ArKO-Maus, die sowohl mit E2 als auch mit ICI 182 780 behandelt worden war, untersucht worden. Die Gewebeproben dieser 3 Mäuse sowie der 3 unbehandelten ArKO-Mäuse waren uns freundlicherweise von Prof. Dr. G. Vollmer, Leiter des Zoologischen Institutes der Technischen Universität Dresden, zur Verfügung gestellt worden. Diese Untersuchungen erfolgten auf der Basis folgender Überlegungen:

1. Eine E2 Substitution bei ArKO-Mäusen müsste zu einer Art „Rescue-Effekt“ führen, sodass die Synaptopodin-Expression bei ihnen auf die Expressionsstärke der WT-Maus ansteigen sollte.
2. Die Behandlung von ArKO-Mäusen mit ICI 182 780, einem Estrogenrezeptorantagonisten, sollte zu keiner Veränderung der Synaptopodin-Expression führen, da die ArKO-Maus keine Estrogene synthetisiert, die an Estrogenrezeptoren binden könnten.

3. Die gleichzeitige Behandlung mit ICI 182 780 und E2 sollte ebenfalls zu keiner Änderung der Synaptopodin-Expression führen, da angenommen wird, dass E2 über Estrogenrezeptoren wirkt bzw. bei Blockade der Rezeptoren durch ICI 182 780 nicht wirken kann. Die fehlende Änderung der Synaptopodin-Expression nach Blockade der Estrogenrezeptoren würde also gleichzeitig belegen, dass E2 die Synaptopodin-Expression über Estrogenrezeptoren beeinflusst und nicht über andere Signalkaskaden.

Leider lag jeweils nur Gewebe einer einzigen Maus vor, sodass keine Signifikanz berechnet werden konnte und die Ergebnisse damit lediglich Hinweise liefern können.

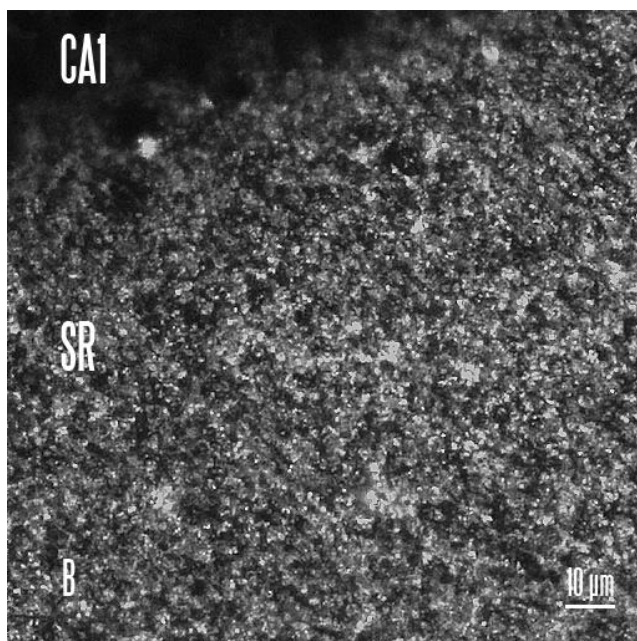
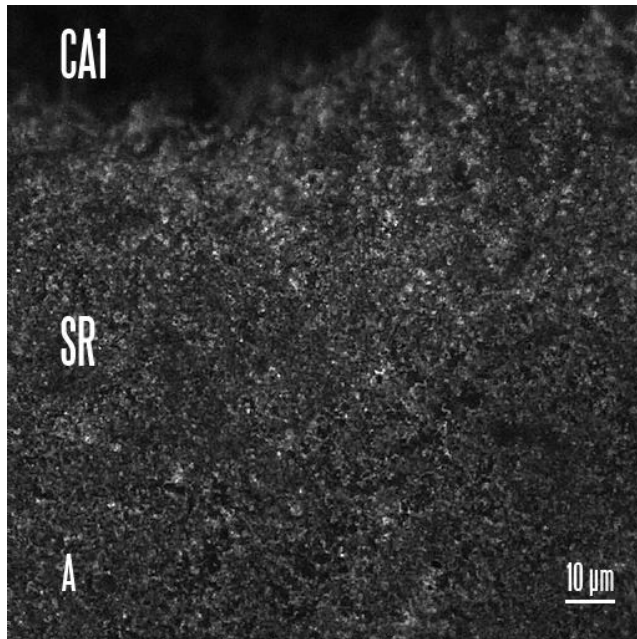
Zu 1: Wie in den Vorüberlegungen angenommen, führte die E2 Behandlung bei der ArKO-Maus zu einer starken Heraufregulation von Synaptopodin. Die Expression war nach der Behandlung im Mittel 2,3- mal so hoch wie bei der unbehandelten ArKO-Gruppe, jedoch auch deutlich höher als bei den Wildtyp-Mäusen. Im Vergleich zu den WT-Mäusen war die Synaptopodin-Expression 1,48-mal so hoch, also im Mittel um 48% höher.

Zu 2: Erstaunlicherweise führte die Behandlung der ArKO-Maus mit ICI 182 780 ebenfalls zu einer Erhöhung der Synaptopodin-Expression. Sie lag auf dem gleichen Niveau der Synaptopodin-Expression der WT-Mäuse und war um das 1,7 fache höher als bei den unbehandelten ArKO-Mäusen. Eine Erklärung für diese Erhöhung wäre, dass ICI eine agonistische Wirkung auf den membrangebundenen Estrogenrezeptor GPR30 ausübt (siehe auch Diskussionsteil) und dessen Aktivierung so wie die E2-Behandlung zu einer Heraufregulierung von Synaptopodin führt.

Zu 3: Die Messergebnisse der Untersuchung der ArKO-Maus, die sowohl mit E2 als auch mit ICI 182 780 behandelt worden war, entsprachen dagegen wieder den theoretischen Vorüberlegungen. Eine derart behandelte ArKO-Maus im Vergleich zur unbehandelten ArKO-Maus zeigte keine veränderte Synaptopodin-Expression und präsentierte so im Vergleich zur WT-Maus deutlich niedrigere Synaptopodin-Werte. Hier waren die Synaptopodinwerte der WT-Gruppe um den Faktor 1,51 höher.

### 5.1.2 Synaptophysin-Expression bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus

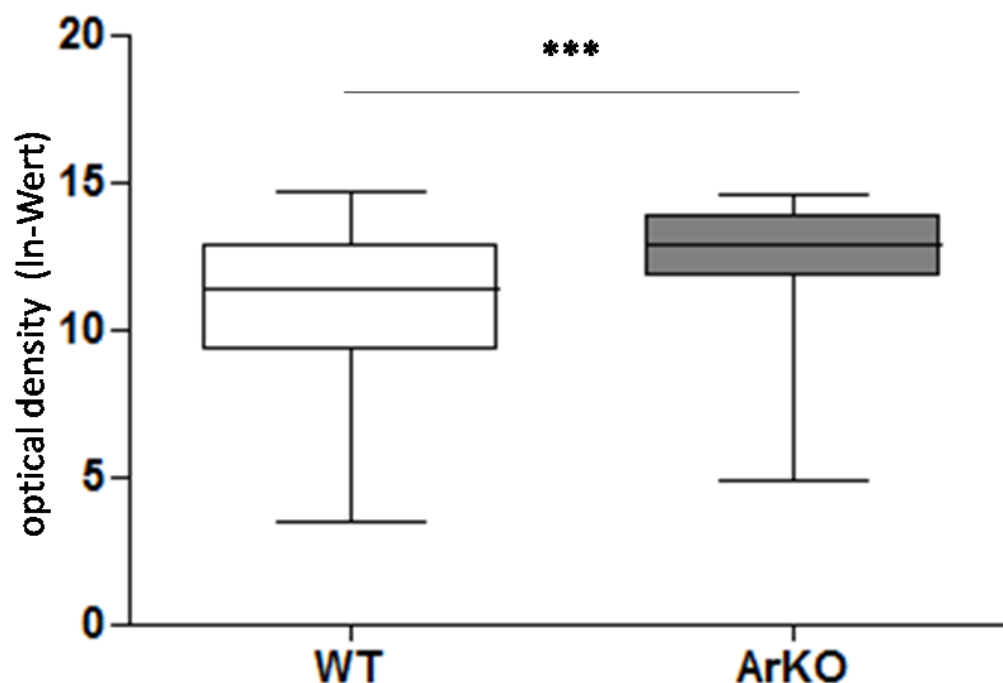
Abbildung 6 zeigt beispielhaft zwei mit dem Laserscanningmikroskop fotografierte, mit Synaptophysin als primärem Antikörper immunhistochemisch gefärbte Bereiche der CA 1 Region einer WT-Maus und einer ArKO-Maus. Dargestellt ist das Stratum radiatum, in dem die punktförmige Expression von Synaptophysin gemessen wurde, die vornehmlich in den dendritischen Schichten zu finden ist.



**Abb. 6: Synaptophysin-Signale der CA1-Regionen der Wildtyp-Maus (Bild A) und der ArKO-Maus (Bild B). SR = Stratum radiatum; CA1 = Cornu ammonis; Scalebar = 10μm.**

Bereits bei der reinen Inspektion der immunhistochemischen Färbungen durch das konfokale Mikroskop fiel ein deutlich stärkeres Synaptophysin-Signal bei den unbehandelten ArKO-Mausgeweben im Unterschied zu den WT-Mausgeweben auf (siehe Abbildung 6).

In Abbildung 7 ist die optical density der WT-Mausgruppe und der ArKO-Mausgruppe aufgeführt. Um eine symmetrische Verteilung der Messergebnisse zu erhalten, wurden diese logarithmiert. Die ArKO-Mausgruppe zeigte eine deutlich höhere Synaptophysin-Expression als die Wildtyp-Mäuse. Sie war im Mittel 4,6-mal so hoch, also im Mittel signifikant um 368 % höher als beim Wildtyp.



**Abb. 7: Auswertung der Synaptophysin-Expression in der CA1-Regionen von ArKO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. WT = Wildtyp (n=4), ArKO = Aromatase-Knockout-Maus (n=3). Dargestellt ist die logarithmierte optical density für die einzelnen Gruppen. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .**

Darüber hinaus waren auch in dieser Versuchsreihe eine ArKO-Maus, die mit E2, eine ArKO-Maus, die mit ICI 182 780 und eine ArKO-Maus, die mit E2 und mit ICI 182 780 behandelt worden war, untersucht worden. Es stand jeweils Gewebe nur eines Tieres zur Verfügung, sodass sich auch hier keine Signifikanz ermitteln ließ.

Entgegen unseren Erwartungen führte die E2-Behandlung bei der ArKO-Maus nicht zu einer Angleichung der Synaptophysin-Expression auf das Niveau der Synaptophysin-Expression der WT-Mäuse, sondern zu einer sogar noch höheren Synaptophysin-Expression als bei der unbehandelten ArKO-Maus. Sie war im Mittel 6,4-mal höher als die Expression beim Wildtyp.

Auch die Ergebnisse bei der ArKO-Maus, die sowohl mit E2 als auch mit ICI 182 780 behandelt worden war, entsprachen nicht den Erwartungen, da die Synaptophysin-Expression der so behandelten ArKO-Maus nicht der der unbehandelten ArKO-Mäuse entsprach, sondern sogar noch vermindert war. Sie lag sogar mit der Hälfte deutlich unter dem Niveau der Synaptophysin-Expression der WT-Mäuse.

Lediglich das Ergebnis der mit ICI 182 780 behandelten ArKO-Maus entsprach den Erwartungen. Es war nämlich angenommen worden, dass sich die Synaptophysinexpression nach Behandlung mit dem Estrogenrezeptorinhibitor ICI nicht ändern sollte, da ArKO-Mäuse keine Estrogene synthetisieren, die an Estrogenrezeptoren binden könnten. So zeigte die mit ICI 182 780 behandelte ArKO-Maus im Vergleich zur unbehandelten ArKO-Maus kaum eine Änderung der Synaptophysin-Expression und war 5-mal so hoch wie die der WT-Mäuse.

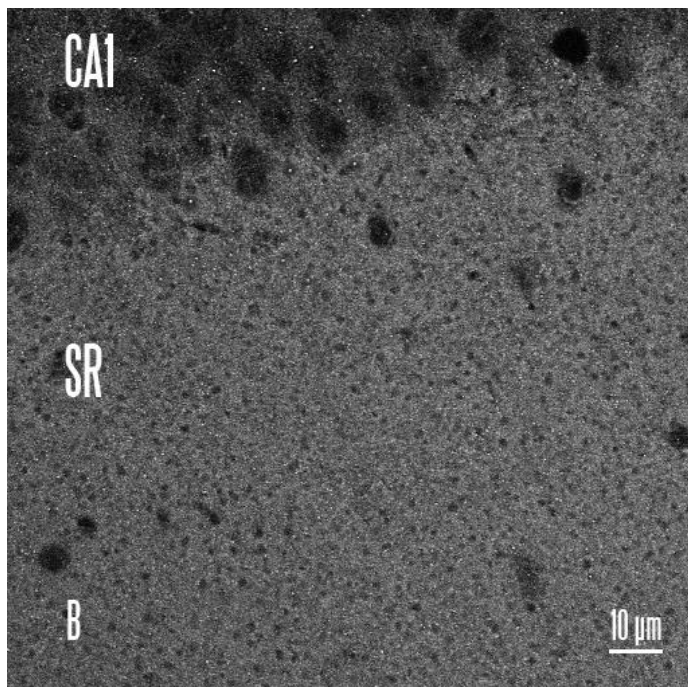
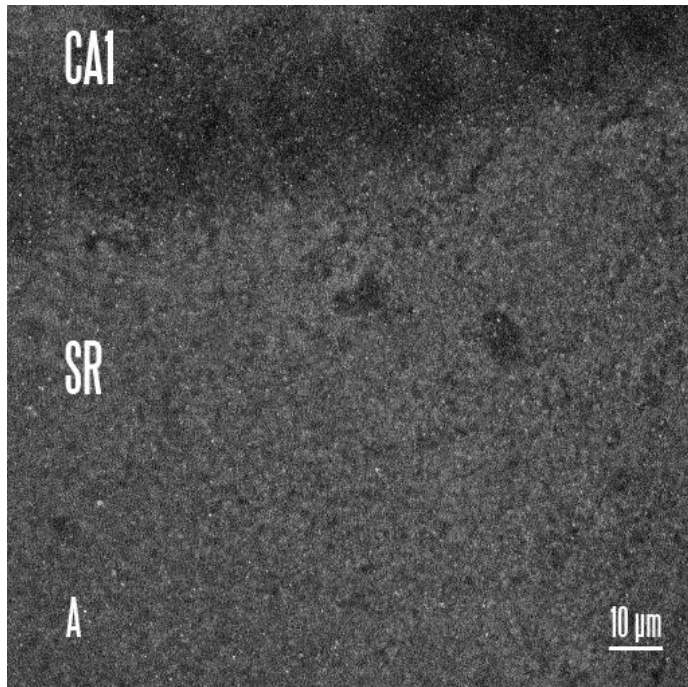
Die Unterschiede zwischen den mit E2- und mit ICI-behandelten ArKO-Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten ArKO-Mäusen waren jedoch nicht sehr groß, sodass ein Behandlungseffekt auf die Synaptophysin-Expression in Frage gestellt werden muss.

### **5.1.3 Spinophilin-Expression bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus**

In Abbildung 8 sind schließlich zwei Ausschnitte zu sehen, die mit dem Laserscanningmikroskop fotografiert wurden. Sie zeigen beispielhaft die mit Spinophilin als Primärantikörper durchgeführten immunhistochemischen Färbungen der CA1-Region einer WT-Maus und einer ArKO-Maus. In der Mitte ist das Stratum radiatum aufgenommen, in dem die Spinophilin-Expression gemessen wurde. Erkennbar ist das dichte, punktförmige Expressionsmuster von Spinophilin.

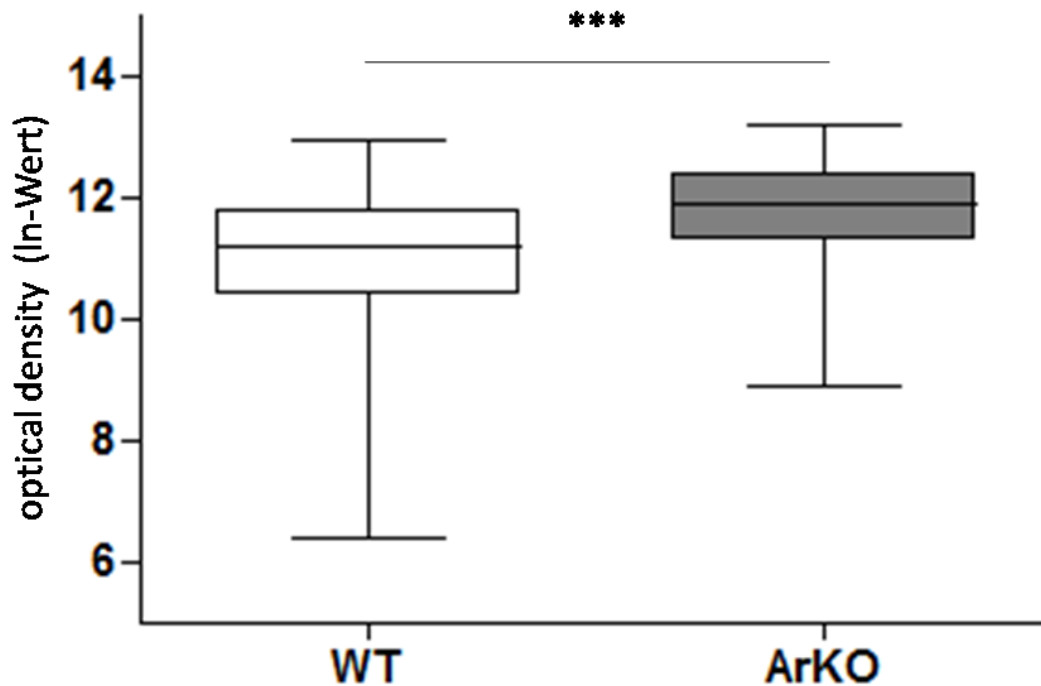
Wie bei der vorangegangenen Versuchsreihe fiel schon bei der Inspektion der immunhistochemisch gefärbten Gewebe durch das konfokale Mikroskop ein deutlich

stärkeres Spinophilin-Signal im Hippocampus der ArKO-Mäuse (siehe Abbildung 8B) im Vergleich zu den WT-Mäusen auf (siehe Abbildung 8A).



**Abb. 8: Spinophilin-Signale der CA1-Regionen der Wildtyp-Maus (Bild A) und der ArKO-Maus (Bild B). CA1 = Cornu ammonis; SR = Stratum radiatum; Scalebar = 10μm.**

In der Abbildung 9 sind die Ergebnisse der quantitativen Analyse der einzelnen Tiergruppen dargestellt. Die ArKO-Mäuse zeigten eine signifikant höhere Spinophilin-Expression als die WT-Mäuse. Sie hatten im Mittel eine 2,25-mal höhere Spinophilin-Expression als die WT-Mäuse.



**Abb. 9: Auswertung der Spinophilin-Expression in der CA1-Regionen von ArKO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. WT = Wildtyp (n=4), ArKO = Aromatase-Knockout-Maus (n=3). Dargestellt ist die logarithmierte optical density für die einzelnen Gruppen. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .**

Des Weiteren war auch in dieser Versuchsreihe eine ArKO-Maus, die mit E2 behandelt worden war, eine ArKO-Maus die mit ICI 182 780 behandelt worden war und eine ArKO-Maus, die gleichzeitig mit E2 und mit ICI 182 780 behandelt worden war, untersucht worden. Obwohl jeweils nur ein Tier jeder Behandlungsgruppe vorlag und sich also keine Signifikanz berechnen lässt, sollen sie hier aufgeführt werden, um die Tendenzen der Behandlung mit Estrogenen oder einem Estrogenrezeptorblocker zu zeigen. Die Berechnungen erfolgten ebenfalls auf Basis der Hypothese, dass eine Behandlung der ArKO-Maus mit E2 zu einer Angleichung der Spinophilin-Expression auf das Niveau der WT-Mäuse führt und dass eine Behandlung der ArKO-Maus mit ICI 182 780 oder mit ICI 182 780 und E2 die Expression

nicht verändern sollte. Die fehlende Änderung der Spinophilin-Expression bei der ArKO-Maus, die sowohl mit E2 als auch mit ICI 182 780 behandelt worden war, wäre gleichzeitig ein Beleg dafür, dass E2 Spinophilin über Estrogenrezeptoren beeinflusst, da es dieses bei Blockade durch ICI 182 780 nicht tun kann.

Wieder entsprachen die Ergebnisse der mit E2 behandelten ArKO-Maus nicht den Erwartungen. Ihre Spinophilin-Expression unterschied sich kaum von der der unbehandelten ArKO-Maus und war um das 2,1 fache höher als die der WT-Mäuse.

Die mit ICI 182 780 behandelte ArKO-Maus zeigte ebenfalls kaum eine Änderung der Spinophilin-Expression im Vergleich zu den unbehandelten ArKO-Mäusen, was mit vorangegangener Hypothese korrelierte. Es wurde angenommen, dass eine Behandlung der ArKO-Maus mit Estrogenrezeptorantagonisten zu keiner Veränderung der Spinophilin-Expression führen sollte, da die ArKO-Maus keine Estrogene synthetisiert, die an Estrogenrezeptoren binden könnten.

Erstaunlicher Weise war das Spinophilin-Signal bei der gleichzeitig mit E2 und ICI 182 780 behandelten ArKO-Maus im Vergleich zu allen anderen Mäusen am stärksten und nicht wie angenommen auf dem Niveau der unbehandelten ArKO-Maus. Sie zeigte im Mittel einen 3,5 fachen Anstieg, also im Vergleich zum Wildtyp eine um 250% höhere Spinophilin-Expression und im Vergleich zur unbehandelten ArKO-Maus eine 56% höhere Spinophilin-Expression.

Wie auf die Synaptophysin-Expression schien die Behandlung mit E2 und mit ICI 182 780 auf die Spinophilin-Expression keinen großen Effekt zu haben, da sich die Spinophilin-Expression der behandelten ArKO-Mäuse kaum von der der unbehandelten ArKO-Mäuse unterschied.



#### 5.1.4 Zusammenfassung der Synaptopodin-, Synaptophysin- und Spinophilin-Daten

In der Abbildung 10 sind die Ergebnisse aller drei Versuchsreihen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte der optical density der WT-Mäuse und der ArKO-Mäuse in Prozent. Die Ergebnisse der unbehandelten ArKO-Mäuse aller drei Versuchsreihen wurden denen der WT-Mäuse gegenübergestellt. Die Kontroll-Werte der WT-Mäuse wurden auf 100% (weiß) gesetzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass anders als in der Hypothese angenommen sowohl die Spinophilin- als auch die Synaptophysin-Expression bei den unbehandelten ArKO-Mäusen signifikant höher ist als bei den WT-Mäusen. Die Synaptopodin-Expression dagegen ist bei den unbehandelten ArKO-Mäusen signifikant niedriger als bei den WT-Mäusen.

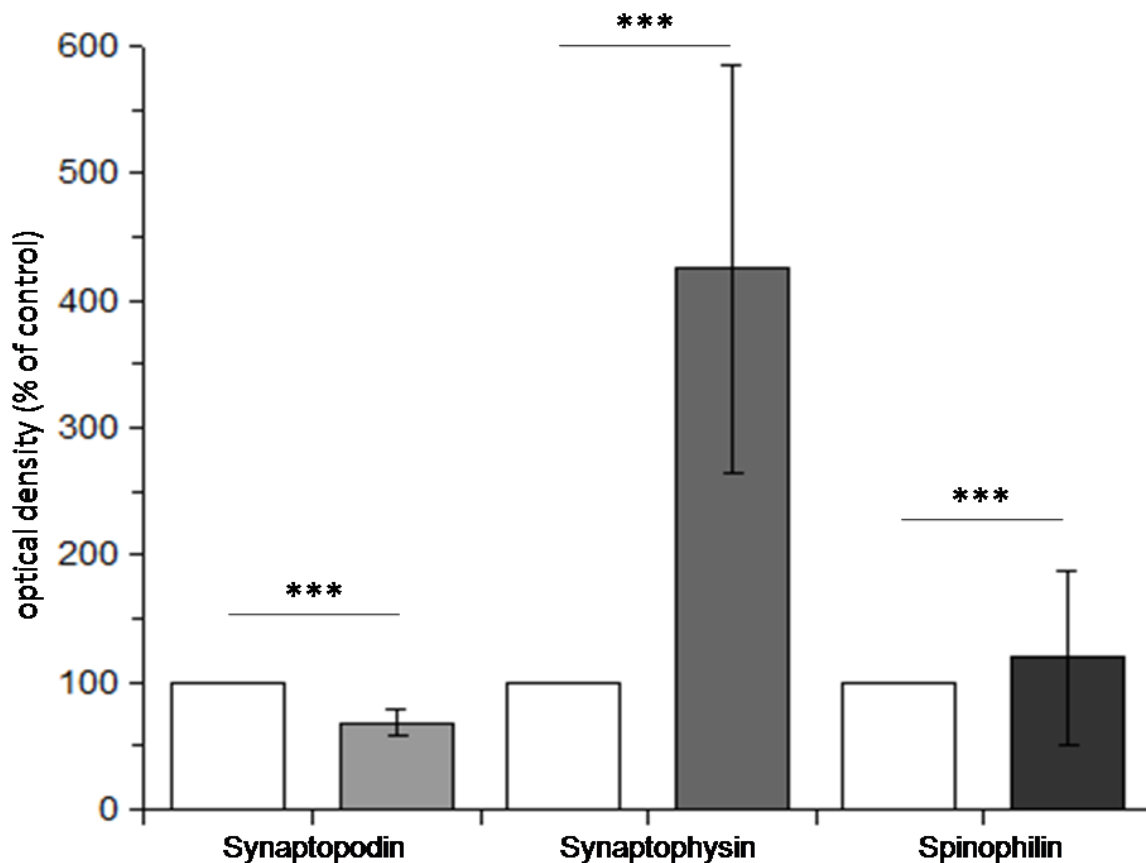


Abbildung 10: Quantitative Auswertung der Synaptopodin-, Synaptophysin- und Spinophilin-Immunhistochemien von hippocampalen Gewebeschnitten. Synaptophysin und Spinophilin sind bei der ArKO-Maus signifikant heraufreguliert. Synaptopodin ist signifikant herunterreguliert. Weiß = Wildtyp-Mäuse (n=4), grau = unbehandelte ArKO-Mäuse (n=3). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM („standard error of the mean“). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

## 6. Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein Aromatase-Knock out bei der Maus die Expression synaptischer Proteine im Hippocampus verändert. Immunhistochemische Messungen zeigten, dass die Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus signifikant niedriger ist als bei der WT-Maus. Dagegen ist die Expression von Spinophilin und Synaptophysin bei der ArKO-Maus signifikant höher als bei der WT-Maus. Die Befunde dieser Arbeit unterstützen die Vermutung, dass Estrogene die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflussen und dass die die Hirnschranke passierenden Aromataseinhibitoren, mit denen an Brustkrebs erkrankte Frauen systemisch behandelt werden, wahrscheinlich das Lernen und die Gedächtnisbildung beeinflussen.

### 6.1 Vorüberlegungen

Viele bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die pharmakologische Behandlung mit Aromataseinhibitoren das Gedächtnis negativ beeinflusst. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die Behandlung hippocampaler Slice-Kulturen und die systemische Therapie von weiblichen WT-Mäusen mit Letrozol zu einer Herunterregulation der Spinedichte, präsynaptischer Boutons und synaptischer Proteine im Hippocampus führt (Kretz *et al.*, 2004; Rune und Frotscher, 2005; Rune *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Es war gezeigt worden, dass Letrozol die synaptischen Proteine Spinophilin, Synaptophysin und Synaptopodin erniedrigt (Kretz *et al.*, 2004; Labitzke, 2009). Vierk *et al.* (2012) hatten zusätzlich bestätigt, dass eine Letrozol-Behandlung weiblicher WT-Mäuse zu einem erniedrigten LTP führt, welches ein elektrophysiologischer Marker für die Gedächtnisbildung ist (Bliss *et al.*, 1973). Dieses erniedrigte LTP ging gleichzeitig mit einer erniedrigten Spinedichte und Synapsenanzahl einher (Vierk *et al.*, 2012).

In dieser Dissertation sollte nun geklärt werden, ob diese bisher nur durch pharmakologische Hemmung der Aromatase gewonnenen *in vitro* und *in vivo* Befunde durch vergleichbare Ergebnisse in der aromatasedefizienten Maus bestätigt werden können.

Die ArKO-Maus wurde erstmals durch Fisher *et al.* (1998) durch Deletion des Cyp 19-Gens generiert. Diese Tiere sind dadurch nicht in der Lage Testosteron zu Estradiol zu aromatisieren, sodass ihnen in den kritischen Phasen der Entwicklung und als ausgewachsene Tiere Estrogene fehlen (Fisher *et al.*, 1998). ArKO-Mäuse zeigen nicht nur physische

Unterschiede gegenüber WT-Mäusen wie z.B. einen gestörten Fett- und Knochenstoffwechsel, eine mangelhafte Geschlechtsentwicklung und ein verändertes Immunsystem (Jones *et al.*, 2006) sondern auch Verhaltensauffälligkeiten. So beeinflusst die Deletion des Aromatasegens z.B. das Sexualverhalten, die Nahrungsaufnahme und das olfaktorische Erkundungsverhalten (Bakker *et al.*, 2004; Dalla *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2006). Die drei typischen Aktivitäten des männlichen Sexualverhaltens wie Besteigen, Penetration und Ejakulation waren bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus vermindert (Matsumoto *et al.*, 2003). Ferner zeigten männliche ArKO-Mäuse im Gegensatz zu WT-Mäusen ein hohes Aggressionspotenzial gegenüber weiblichen Mäusen. Die meisten männlichen ArKO-Mäuse versorgten ihre Jungen nicht und brachten diese in häufigen Fällen sogar um, was bei den männlichen WT-Mäusen nicht beobachtet wurde (Matsumoto *et al.*, 2003). Dalla *et al.* (2004) zeigten, dass weibliche ArKO-Mäuse gegenüber WT-Mäusen ein depressives Verhalten aufweisen, da sie sich im „forced swim test“ (FST) mehr treiben ließen und weniger strampelten. Dalla *et al.* (2004) vermuteten, dass dieses Verhalten mit einer erniedrigten Serotonin-Aktivität zusammenhängt, die sie im Hippocampus der Mutanten gemessen hatten. Eine Behandlung der erwachsenen ArKO-Mäuse mit Estradiol konnte die depressiven Symptome nicht bessern, sodass angenommen wird, dass die Verhaltensauffälligkeiten durch den Estrogenmangel in der Entwicklungszeit hervorgerufen werden (Dalla *et al.*, 2004). Martin *et al.*, (2003) zeigten, dass ArKO-Mäuse im Y-maze-Test deutlich schlechter abschnitten als WT-Mäuse, sodass ihnen wie den WT-Mäusen nach pharmakologischer Inhibition der Aromatase ein schlechteres räumliches Kurzzeitgedächtnis zugesprochen wird.

Wie bereits erwähnt, wurden die bisherigen Untersuchungen der Aromatase durch unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe der pharmakologischen Hemmung dieses Enzyms durchgeführt. Alle bisherigen Ergebnisse stammen von Experimenten, in denen die Aromatase kurzfristig und nur über einen bestimmten Zeitraum gehemmt wurde. Indem in dieser Arbeit Untersuchungen an ArKO-Mäusen durchgeführt wurden, können wir die Folgen einer bereits embryonal bestehenden Hemmung der Estrogene untersuchen und so erstmals zeigen, welche Auswirkung ein bereits genetisch veranlagter Estrogen-Mangel auf die synaptischen Proteine im Hippocampus ausübt. Durch den Knock-out ist es uns zusätzlich möglich Mäuse zu untersuchen, denen jegliche Estrogene fehlen (Simpson *et al.*, 2004). Es wurde darauf geachtet, dass die Tiere keine Phytoestrogene über die Nahrung aufnehmen konnten, obgleich Voruntersuchungen gezeigt hatten, dass diese über die Nahrung aufgenommenen Östrogene fast keine Auswirkungen auf das Verhalten der ArKO-Mäuse haben (Fisher *et al.*, 1998). Die

pharmakologische Hemmung der Aromatase dagegen führt nur zu einer Reduzierung des Estrogenspiegels. Eine Dosis von 100nM Letrozol verringert die Estrogensynthese von hippocampalen Neuronen um 50% (Kretz *et al.*, 2004; Fester *et al.*, 2006). Bei postmenopausalen Frauen mit Brustkrebs in fortgeschrittenem Stadium verringern Tagesdosen von 0,1-5,0 mg Letrozol die Plasmaspiegel von Estradiol, Estron und Estronsulfat aller behandelten Patientinnen um 75-95% gegenüber dem Ausgangswert (Hellriegel *et al.*, 2010).

Leider kann bei den Untersuchungen an der ArKO-Maus nicht zwischen einem gonadalen und einem peripheren Estrogenmangel unterschieden werden, da bei ihr durch den Knock-out der Aromatase sowohl die gonadale als auch die periphere Estrogensynthese gestört ist. Ferner muss bedacht werden, dass das genetisch bedingte Fehlen der Aromatase zu Anpassungsreaktionen führt und wahrscheinlich schon in der Embryonalperiode andere Hormone kompensatorisch erhöht sind und die Entwicklung beeinflussen. So findet man bei allen ArKO-Mäusen ein erhöhtes Serumlevel an LH, FSH und Testosteron (Fisher *et al.*, 1998). Es muss also bedacht werden, dass die Veränderungen, die wir bei der ArKO-Maus messen, nicht nur durch den Estrogen-Mangel hervorgerufen sein könnten. Es ist z.B. bekannt, dass alleine schon erhöhte Androgen-Werte bei Mäusen zu Verhaltensänderungen führen (Simon *et al.*, 1985). Aus diesem Grund entwickelten Harada *et al.* (2009) eine ArKO/hArom-Maus. Dieser ArKO-Maus ist ein Transgen menschlicher Aromatase eingepflanzt, das nur über eine Gehirn-spezifische Promotor-Region des ArKO-Maus-Gens kontrolliert wird. Diese ArKO/hArom-Mäuse besitzen also im Gehirn eine Aromataseaktivität. Harada *et al.* (2009) zeigten, dass diese ArKO/hArom-Mäuse sich von den Verhaltensauffälligkeiten der ArKO-Mäuse erholten und im Verhalten den WT-Mäusen ähneln. Die Verhaltensänderungen der ArKO-Mäuse scheinen also am ehesten durch den Verlust der gehirnspezifischen Aromatase verursacht zu sein und nicht durch den erhöhten Androgenspiegel. Martin *et al.* (2003) konnten ebenfalls ausschließen, dass nicht die erhöhten Testosteron-Werte Ursache des gestörten räumlichen Kurzzeitgedächtnisses der ArKO-Mäuse sind, sondern die gestörte Estrogenproduktion. Sie konnten an ArKO-Mäusen zeigen, dass eine Kastration oder Ovariectomie zu keiner Veränderung/ Verbesserung des Gedächtnisses führte. In Ihren Versuchen benutzten sie den Y-maze Test, mit dessen Hilfe das räumliche Kurzzeitgedächtnis getestet werden kann. ArKO-Mäuse zeigten dabei im Vergleich zu WT-Mäusen ein schlechteres räumliches Gedächtnis, das auch nach Ovariectomie oder Kastration also einer Reduzierung der LH-, FSH und Testosteronlevel nicht verbessert wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, beschränkten sich auf die CA1-Region des Hippocampus, da angenommen wird, dass estrogeninduzierte Veränderungen der synaptischen Plastizität besonders in dieser Region angesiedelt sind. So zeigten Woolley *et al.* (1990), dass eine Ovariectomie weiblicher Ratten in der CA1-Region dieser Tiere zu einer deutlichen Abnahme der Spine-Dichte führt. Eine Estrogen-Ersatztherapie konnte die Abnahme verhindern. Diese Veränderungen sowohl nach Ovariectomie als auch nach Estrogen-Ersatztherapie konnten weder in der CA3-Region noch im Gyrus dentatus gefunden werden (Gould *et al.*, 1990). Auch scheint nur die CA1-Region von zyklusabhängigen Estrogenschwankungen beeinflusst zu werden, da Gould *et al.* (1990) nur in dieser Region und nicht in der CA3-Region und im Gyrus dentatus während des Proestrus (Phase der höchsten Estrogenkonzentration) eine Zunahme der apikalen Spine-Dichte und während des Estrus (Phase der niedrigsten Estrogenkonzentration) eine Abnahme der apikalen Spine-Dichte messen konnten.

### **6.1.1 Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus**

In dieser Arbeit untersuchten wir das synaptische Protein Synaptopodin im Hippocampus von ArKO-Mäusen, da es ein Marker für den Spineapparat darstellt. Der Spineapparat ist eine Spine-spezifische Zellorganelle, die als Calciumspeicher dient und sich in 80% der pilzförmigen Spines befindet. Da diese Form von Spines in ihrer Struktur kräftiger sind und über mehrere Monate persistieren können, vermuten Spacek und Harris (1997), dass Synapsen, die einen Spineapparat enthalten, für die synaptische Plastizität und dadurch für die Ausbildung von Gedächtnis und Lernvorgängen besonders wichtig sind. Die Ausbildung eines Spineapparates scheint von Synaptopodin abhängig zu sein, da er in Synaptopodin-defizienten Mäusen fehlt (Deller *et al.*, 2003). Diese Mäuse zeigen ein reduziertes hippocampales „long-term potentiation“ (LTP), das als messbarer Parameter für Lernen und Gedächtnisbildung gilt (Deller *et al.*, 2003). Vasil`ev *et al.* (2010) demonstrierten, dass Ratten, die pränatal einer Hypoxie ausgesetzt worden waren, ein gestörtes Lernen und ein schlechteres Gedächtnis zeigten und dieses mit einer reduzierten Anzahl an Synaptopodin-positiven Spines in der CA1-Region des Hippocampus einherging. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die pharmakologische Inhibition der Aromatase mit Letrozol, die als Nebenwirkung zu Gedächtnisstörungen führen soll, in hippocampalen Slice-Kulturen von Mausgeweben zu einer Reduzierung von Spines, Spineapparaten und von Synaptopodin führt

(Kretz *et al.*, 2004; Labitzke, 2009; Rune und Frotscher, 2005; Rune *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). So untersuchte Labitzke (2009) in seiner medizinischen Dissertationsarbeit die Immunreaktivität von Synaptopodin nach Aromatasehemmung in Dispersionskulturen. Er zeigte, dass die Hemmung der Estrogensynthese zu einer deutlichen Herabregulierung des synaptischen Proteins führt. So war Synaptopodin bereits nach dreißig minütiger Letrozol-Stimulation (Aromatasehemmer) reduziert. Erstaunlicherweise war auch nach Estradiol-Gabe die Synaptopodin-Immunreaktivität vermindert. Fester *et al.* (2009) zeigten, dass die Behandlung hippocampaler Dispersionskulturen mit 100nM E2 zu einer signifikanten Herunterregulation von Synaptopodin führt. Diese Herunterregulation war jedoch erst nach 24 Stunden messbar und führte zusätzlich zu einer Abnahme von Spines, die einen Spineapparat enthalten (Fester *et al.*, 2009). Desweiteren konnte mit Hilfe einer real time RT-PCR gezeigt werden, dass nach E2-Behandlung die Expression von Synaptopodin mRNA in slice Kulturen herunterreguliert ist (Fester *et al.*, 2009). Rune *et al.* (unveröffentlicht) demonstrierten, dass die Herunterregulation der Synaptopodin-Expression hippocampaler Zellkulturen gehemmt werden konnte, wenn zusätzlich zu E2 der Estrogenrezeptorblocker ICI 182 780 gegeben wurde.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass die Synaptopodinexpression über einen klassischen, langandauernden genomischen Weg reguliert wird, indem Estrogen an Estrogenrezeptoren bindet und autokrin von Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), Estrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) und ihren Liganden beeinflusst wird, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Estrogenrezeptoren sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren (Klinge *et al.*, 2001), deren Isoformen ER $\alpha$  und ER $\beta$  in hippocampalen Neuronen in Abhängigkeit der Aromataseaktivität exprimiert werden (Prange-Kiel *et al.*, 2003; Wehrenberg *et al.*, 2001). Eine Aromataseinhibition durch Letrozol führte in hippocampalen Zellkulturen zu einer Herunterregulation von ER $\alpha$  und zu einer Heraufregulation von ER $\beta$ , während die Estradiol-Behandlung gegenteilige Effekte bewirkte, die jedoch nicht signifikant waren (Prange-Kiel *et al.*, 2003; Rune *et al.*, unveröffentlicht). Die gleichzeitige Gabe von Estradiol und Letrozol führte zu einer noch stärkeren Herunterregulation von Synaptopodin (Rune *et al.*, unveröffentlicht). Um zu untersuchen, welcher Estrogenrezeptor-Subtyp in die Regulation von Synaptopodin involviert ist, analysierte unsere Arbeitsgruppe hippocampale Zellkulturen, die mit dem spezifischen ER $\beta$ -Agonist Diarylpropionitril (DPN) behandelt worden waren. Diese Zellkulturen zeigten eine herunterregulierte Synaptopodin-Expression, während die

Behandlung von Zellkulturen mit dem spezifischer ER $\alpha$ -Agonist Propylpyrazole Triol (PPT) keinen Einfluss auf die Synaptopodin-Expression ausübte (Hinz, Med. Dissertation 2009). Die Behandlung mit dem ER $\beta$ -Antagonisten PHTTP führte zu einer Heraufregulation der Synaptopodinexpression (Rune *et al.*, unveröffentlicht). So scheint Synaptopodin von ER $\beta$  reguliert zu werden, der wiederum von der Aromatase-Aktivität abhängig ist. Die synergistische Funktion von exogen appliziertem Estrogen und Letrozol, die beide zu einer Herunterregulation von Synaptopodin führen, scheint daraus zu resultieren, dass Estrogen direkt an ER $\beta$  bindet. Dieser so entstandene Rezeptor/ Ligand-Komplex scheint dann im Nukleus die Transkription so zu beeinflussen, dass die Synaptopodin-Expression herunterreguliert wird. Die Herunterregulation der Synaptopodin-Expression durch Letrozol scheint daraus zu resultieren, dass durch die Letrozol induzierte, reduzierte intrazelluläre Estrogenkonzentration ER $\beta$  heraufreguliert wird. 100nM Letrozol reduzieren die Estrogen-Synthese um 50% (Kretz *et al.*, 2004). Die nach Letrozol-Applikation verbleibende, reduzierte Estrogenkonzentration scheint an die heraufregulierten ER $\beta$  zu binden und dadurch wie Estrogen zu einer Herunterregulation von Synaptopodin zu führen.

In dieser Arbeit war die Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus in der CA1-Region des Hippocampus im Vergleich zur Expression bei der WT-Maus signifikant erniedrigt. Die Differenz betrug mehr als 50%. Dieses Ergebnis stimmte mit den Ergebnissen nach pharmakologischer Hemmung der Aromatase überein, da Letrozol auch zu einer Herunterregulation der Synaptopodin-Expression führte (Labitzke, 2009). Möglicherweise hängt das erniedrigte Synaptopodin bei der ArKO-Maus ebenfalls mit einem erhöhten ER $\beta$ -Status zusammen, da unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass ER $\beta$  im Hippocampus der weiblichen ArKO-Maus deutlich heraufreguliert ist (Rune *et al.*, *in Review*). Zusätzlich war in dieser Arbeit die Synaptopodin-Expression im Hippocampus behandelter ArKO-Mäuse untersucht worden. Davon war eine ArKO-Maus mit E2, eine ArKO-Maus mit ICI 182 780 und eine ArKO-Maus war mit ICI 182 780 und E2 behandelt worden. Es war angenommen worden, dass E2 ebenfalls wie bei den *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu einer Herunterregulation von Synaptopodin führen würde. Erstaunlicherweise schien die Gabe von E2 auf die ArKO-Maus jedoch in dieser Arbeit einen „Substitutions-Effekt“ zu haben, da die Immunreaktivität von Synaptopodin nach E2-Gabe deutlich höher war als bei der unbehandelten Mutante. Entgegen unseren Erwartungen war sie auch deutlich höher als beim Wildtyp. Prange-Kiel *et al.*, (2003) und Rune *et al.* (unveröffentlicht) hatten gezeigt, dass Estrogene ER $\alpha$  herauf und ER $\beta$  herunterregulieren. Vermutlich ist dieser Effekt bei der mit E2 behandelten ArKO-Maus eingetreten, sodass ER $\beta$  herunter- und dadurch die

Synaptopodin-Expression heraufreguliert wurde. Von der Behandlung der ArKO-Maus mit dem Estrogenrezeptorblocker ICI 182 780 erwarteten wir keine Veränderung der Synaptopodin-Expression im Vergleich zur ArKO-Maus, da diese keine Estrogene synthetisiert und also eine Blockade der Estrogenrezeptoren keine Wirkung haben sollte. Die Behandlung der ArKO-Maus mit ICI 182 780 führte jedoch ebenfalls wie die E2-Behandlung zu einer deutlich höheren Synaptopodin-Expression als bei der unbehandelten ArKO-Maus. Eine Erklärung für diesen unerwarteten Effekt könnte in der agonistischen Wirkung von ICI 182 780 auf den „G-Protein-gekoppelten Estrogenrezeptor 1“ (GPR30) liegen. Dieser Rezeptor gilt als der membrangebundene Estrogenrezeptor, der schnelle, nichtgenomische Antworten vermittelt (Carmeci *et al.*, 1997). Er gehört zur Familie der G-Protein-gebundenen Rezeptoren (Maggiolini und Picard, 2010) und wird von vielen Karzinomzellen wie z.B. von Brustkrebszellen exprimiert. Es scheint, dass E2 über den Rezeptor das Karzinomwachstum stimuliert. Genaue Mechanismen sind jedoch nicht bekannt. Revankar *et al.* (2005) und Brailoiu *et al.* (2007) zeigten, dass die Aktivierung von GPR 30 durch E2 oder G-1, einem spezifischen Ligand von GPR30, zu einem Anstieg intrazellulären Calciums führt, das wahrscheinlich zu einer Ausschüttung von Neurotransmittern (Brailoiu *et al.*, 2003), einer Modulation des Neuritenwachstums (Jacques-Fricke *et al.*, 2006) und einer Hormonsekretion führt (Stojilkovic *et al.*, 2005). Die Early Breast Cancer Trialists`Collaborative Group (2005) konnte zeigen, dass zwei Drittel aller Brustkarzinome ER $\alpha$  exprimieren und trotzdem 25% aller Patienten nicht auf eine ICI 182 780- oder Tamoxifen-Therapie ansprechen oder im Verlauf eine Therapieresistenz entwickeln. Maggiolini und Picard (2010) nehmen an, dass die Ursache dafür darin liegt, dass Tamoxifen und ICI 182 780 auf GPR30 eine agonistische Wirkung haben und damit eine wachstumsstimulierende Wirkung haben können. Diese agonistische Wirkung könnte auch im Hippocampus vorkommen, da auch dort eine GPR30-Expression gefunden werden konnte (Brailoiu *et al.*, 2007). ICI 182 780 könnte also über GPR30 zu einer Zunahme der Synaptopodin-Expression führen.

Die gleichzeitige Behandlung der ArKO-Maus mit ICI 182 780 und E2 sollte zu keiner Änderung der Synaptopodin-Expression führen, da angenommen wird, dass E2 über Estrogenrezeptoren wirkt bzw. bei Blockade der Rezeptoren durch ICI 182 780 nicht wirken kann. Die fehlende Änderung der Synaptopodin-Expression nach Blockade der Estrogenrezeptoren würde also gleichzeitig belegen, dass E2 die Synaptopodin-Expression über Estrogenrezeptoren beeinflusst und nicht über andere Signalkaskaden. Wie erwartet war dieses in unserer Arbeit der Fall, da die Synaptopodin-Expression etwa auf dem gleichen



Level der Expression der unbehandelten ArKO-Maus lag und dadurch signifikant niedriger war als bei den WT-Mäusen.

Für die Untersuchungen mit behandelten ArKO-Mäusen stand jedoch jeweils nur eine einzige Mutante zur Verfügung, sodass keine Signifikanz ermittelt werden konnte und diese Ergebnisse mit Vorbehalt betrachtet werden müssen.

Die Daten dieser Arbeit stimmen also in sofern mit den *in vitro* und *in vivo* Daten nach pharmakologischer Hemmung der Aromatase überein, als das sowohl der Aromatase Knock-out als auch die Letrozol-Behandlung von WT-Mäusen zu einer Herunterregulation von Synaptopodin führt und unsere Arbeitsgruppe gezeigt hatte, dass auch die Spineapparate bei der ArKO-Maus wie nach der Letrozol-Behandlung bei der WT-Maus erniedrigt waren (Rune *et al.*, unveröffentlicht). Wahrscheinlich wird Synaptopodin bei der ArKO-Maus ebenfalls wie bei der WT-Maus über Estrogenrezeptoren reguliert. Die unterschiedliche Synaptopodin-Expression bei der ArKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus scheint an der veränderten Estrogenrezeptor-Expression zu liegen, da bei der ArKO-Maus die ER $\beta$ -Rezeptoren herauf und dadurch Synaptopodin herunterreguliert ist.

Die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Synaptopodinexpression in der ArKO-Maus bestätigt die Vermutungen, dass die Aromatase bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung hippocampaler Funktionen wie Lernen und Gedächtnisbildung eine bedeutende Rolle spielt. Dieses wird durch Untersuchungen von Bakker *et al.* 2004 unterstrichen, die gezeigt hatten, dass die Aromataseaktivität im zentralen Nervensystem in der Embryonalentwicklung erhöht ist.

## **6.2 Die Expression von Synaptophysin und Spinophilin bei der ArKO-Maus**

In dieser Arbeit benutzten wir Synaptophysin als einen präsynaptischen Marker. Es ist ein präsynaptisches Vesikelprotein, das die Fähigkeit von Neuronen Synapsen zu bilden, beeinflusst, da diese bei gestörter Synaptophysin-Expression verringert ist (Tarsa und Goda 2002). Es soll eine Rolle bei der Wiederverwertung der Vesikelmembranen spielen (Daly und Ziff 2002) und für die hohe Membrankrümmung synaptischer Proteine wichtig sein (Thiele *et al.*, 2000).

Spinophilin benutzen wir als einen postsynaptischen Marker, da es neben der postsynaptischen Membran in Spines angereichert ist. Es bündelt Actinfilamente und bildet einen Komplex mit der Protein-Phosphatase 1. Deshalb wird vermutet, dass es den Grundaufbau, die Motilität und die Funktion von Spines reguliert (Allen *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2003; Muly *et al.*, 2004, Schüler und Peti, 2008).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine Behandlung hippocampaler Zellkulturen mit dem Aromataseinhibitor Letrozol die Expression von Synaptophysin und Spinophilin verändert und dies zu einer Beeinflussung der Spinedichte und Synapsenanzahl führt (Kretz *et al.*, 2004, Prange-Kiel *et al.*, 2006, Rune und Frotscher, 2005). Nach kurzfristiger Behandlung hippocampaler Zellkulturen mit Letrozol (7 Tage) kam es zu einer signifikant erniedrigten Expression der synaptischen Proteine und korrelierte mit einem Abfall von Spines (Zhou *et al.*, 2010). Wurde die Letrozol-Behandlung über einen langen Zeitraum (vier Wochen) fortgesetzt, kam es zu einer Überexpression der synaptischen Proteine. Die nach der Letrozol-Behandlung erniedrigte Spineanzahl änderte sich jedoch nicht (Zhou *et al.*, 2010).

Um einen estrogen-agonistischen Effekt durch Letrozol auszuschließen, verwendeten Zhou *et al.* (2010) in ihren Untersuchungen ovariectomierte Tiere. In der Klinik werden Aromataseinhibitoren bekanntermaßen nur in der Postmenopause eingesetzt, da sie in der Prämenopause eine Aktivierung des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) bewirken und dadurch über eine Stimulation der Ovarien zu einer gesteigerten Estrogensekretion führen können (Hellriegel *et al.*, 2010). Durch die Ovariectomie der Tiere kann also ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Spinophilin- und Synaptophysin-Expression durch eine stimulierte Estrogensekretion hervorgerufen worden ist. Ferner zeigten Untersuchungen von Prange-Kiel *et al.*, 2008, dass die Applikation von GnRH zu hippocampalen Slice-Kulturen zwar die Estrogensynthese steigert, aber eine simultane Gabe von einem Aromataseinhibitor zu diesen Kulturen die Estrogensynthese hemmt. Die Expression von GnRH-Rezeptoren war nach Aromatasehemmung im Hippocampus erhöht. Prange-Kiel *et al.* (2008) beschreiben weiter eine menstruationsabhängige, also estrogenabhängige zyklische Veränderung der synaptischen Plastizität im Hippocampus und eine fünfmal so hohe GnRH-Rezeptor Expression im Hippocampus als in dem zyklusunabhängigen Neocortex. Daraus schließen sie, dass die pulsatile GnRH-Ausschüttung nicht nur die gonadale Estrogensynthese stimuliert, sondern auch die hippocampale. Ob gonadale Estrogene die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflussen können bleibt fraglich, da in Versuchen physiologische

Estrogenkonzentrationen, die dem normalen Serumlevel entsprechen, keine Veränderungen im Axonwachstum hippocampaler Neurone hervorrufen können (Kretz *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss ein Aromatase-Knockout auf die synaptischen Proteine ausübt. Dafür wurden Antikörper gegen Synaptophysin als präsynaptischer Marker und Antikörper gegen Spinophilin als postsynaptischer Marker verwendet und mit deren Hilfe die Expression von Synaptophysin und Spinophilin in der CA1-Region der Hippocampi gemessen.

Wie zu erwarten zeigten die hier untersuchten ArKO-Mäuse nicht den nach kurzfristiger Letrozolgabe beobachteten Abfall der Synaptophysin- und Spinophilin-Expression. Stattdessen konnte entsprechend den Daten nach Langzeitbehandlung mit Letrozol eine Überexpression von Synaptophysin und Spinophilin beobachtet werden.

Die Synaptophysin-Expression bei der Mutante war sogar 4,6 Mal so hoch wie bei der WT-Maus und die Spinophilin-Expression war im Mittel 2,25 Mal so hoch.

Es wäre denkbar, dass sich diese unterschiedlichen Expressionen der synaptischen Proteine zwischen WT-Mäusen und ArKO-Mäusen durch veränderte Estrogenrezeptor-Verhältnisse erklären lassen. Unsere Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass Synaptopodin nach E2 Behandlung hippocampaler Zellkulturen herunterreguliert wird. Diese Herunterregulierung scheint durch eine Aktivierung von ER $\beta$  hervorgerufen zu werden (Rune *et al.*, unveröffentlicht). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine E2-Behandlung der ArKO-Mäuse (siehe unten) möglicherweise über eine Aktivierung von ER $\beta$  nicht wie bei Synaptopodin zu einer Herunter- sondern zu einer Heraufregulation von Spinophilin und Synaptophysin führt.

Des Weiteren untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit jeweils eine ArKO-Maus, die mit E2, eine die mit ICI 182 780 und eine, die mit E2 und mit ICI 182 780 behandelt worden war.

In Vorüberlegungen erwarteten wir, dass die E2-Behandlung der ArKO-Maus im Sinne eines „Rescue-Effektes“ zu einer Angleichung an das Synaptophysin- und Spinophilin-Signal der WT-Mäuse führen würde. Dieses traf für die Spinophilin-Expression der ArKO-Mäuse auch zu, da sie sich tendenziell nach der E2-Behandlung an die Spinophilin-Expression der WT-Mäuse anglich und deshalb etwas unter dem Niveau der unbehandelten ArKO-Mäuse lag. Die Spinophilin-Expression war jedoch immer noch deutlich höher als die der WT-Mäuse. Die Synaptophysin-Expression dagegen war nach der E2-Behandlung bei der ArKO-Maus überexprimiert. Diese Überexpression bestätigt die Daten der bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. In diesen Untersuchungen hatte unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass die

Behandlung hippocampaler Zellkulturen mit 100nM 17 $\beta$ -Estradiol zu einer Heraufregulierung von Synaptophysin und Spinophilin führt (Fester *et al.* 2009, Rune *et al.* 2002). Da dieser Effekt erst nach 24 Stunden sichtbar war und mit einem Estrogenrezeptor-Blocker aufgehoben werden konnte, wird angenommen, dass es ein genomischer Effekt ist. Trotz Erhöhung der synaptischen Proteine änderte sich die Synapsenanzahl und Spinedichte jedoch nicht (Kretz *et al.*, 2004).

Von der Behandlung der ArKO-Maus mit dem Estrogenrezeptor ICI 182 780 hatten wir keine Veränderung der Synaptophysin und Spinophilin-Expression im Vergleich zur unbehandelten ArKO-Maus erwartet, da bei fehlender Estrogenproduktion eine Blockade der Estrogenrezeptoren keinen Effekt haben sollte. Diese Vermutung traf auch zu, weil die mit ICI 182 780-behandelte ArKO-Maus im Vergleich zur unbehandelten ArKO-Maus kaum eine veränderte Synaptophysin- und Spinophilin-Expression aufwies. Die Untersuchung der gleichzeitig mit E2 und mit ICI 182 780 behandelten ArKO-Maus erfolgte mit der Überlegung, dass E2 durch die Blockade der Estrogen-Rezeptoren mit ICI 182 780 nicht wirken kann. Die Behandlung der ArKO-Maus mit E2 und ICI 182 780 sollte also auch auf die Spinophilin- und Synaptophysin-Expression keine Auswirkung haben. Erstaunlicherweise führte die gleichzeitige Behandlung mit E2 und ICI 182 780 im Vergleich zu den unbehandelten ArKO-Mäusen zu einer deutlichen Herunterregulierung von Synaptophysin bis unter das Niveau der WT-Mäuse und nicht wie erwartet zu einer gegenseitigen „Neutralisierung“ und dadurch unveränderten Synaptophysin-Expression im Vergleich zur unbehandelten ArKO-Maus. Die Spinophilin-Expression dagegen war hier nicht wie bei der Synaptophysin-Expression herunter sondern deutlich heraufreguliert.

Dieser Unterschied zwischen Synaptophysin und Spinophilin könnte mit ihrer unterschiedlichen Lokalisation zusammen hängen, da Synaptophysin hauptsächlich in der Präsynapse und Spinophilin in der Postsynapse lokalisiert ist. Vermutlich können Estradiol und ICI 182 780 eine ständige Balance zwischen den synaptischen Proteinen herstellen. Auf der präsynaptischen Seite scheinen sie Synaptophysin herunterregulieren und auf der postsynaptischen Seite Spinophilin heraufregulieren zu können.

Insgesamt betrachtet muss eine Beeinflussung der Synaptophysin- und Spinophilin-Expression bei der ArKO-Maus durch E2- oder ICI 182 780-Behandlung jedoch in Frage gestellt werden, da die unbehandelten ArKO-Mäuse, die mit E2 behandelte ArKO-Maus und die mit ICI 182 780 behandelte ArKO-Maus untereinander nur minimale Unterschiede aufwiesen und jeweils nur Gewebe eines einzigen behandelten Tieres für die Untersuchungen vorlag.

ArKO-Mäuse haben eine verminderte Anzahl an Spines und an Spineapparaten (Rune *et al.*, unveröffentlicht) bei einer erhöhte Synaptophysin- und Spinophilin-Expression.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen also die These von Fester *et al.* (2009) zu den Ergebnissen von Zhou *et al.* (2010). Fester *et al.* (2009) stellt in ihr die Rolle von Spinophilin und Synaptophysin als synaptische Marker in Frage, da anscheinend die Expression von Spinophilin und Synaptophysin nicht mit der Spinedichte und Synapsenanzahl übereinstimmt. Er nimmt vielmehr an, dass die erhöhte Synaptophysin-Expression mit einer Zunahme von mit Transmittern gefüllten Vesikeln in den Boutons zusammenhängt und dass die Heraufregulation beider Proteine eher dazu dient, die synaptische Potenz aufrecht zu erhalten.

Vermutlich stellt die erhöhte Expression von Spinophilin und Synaptophysin bei der ArKO-Maus eine Art „Rescue“-Effekt dar. So kommt es möglicherweise als Folge der Erhöhung von Synaptophysin und Spinophilin zu einem späteren Zeitpunkt, der bisher in den Untersuchungen noch nicht detektiert werden konnte, zu einer Heraufregulierung der Spines. Auch könnte die erhöhte Synaptophysin- und Spinophilin-Expression im Sinne eines Kompensationsmechanismus auf eine verstärkte Produktion der noch vorhandenen Synapsen zurückzuführen sein.

Es wäre interessant, dafür die Versuche von Zhou *et al.* (2010) länger zu verfolgen, d.h. die Auswirkungen einer Aromataseinhibitor-Behandlung auf die Formation von Spine-Synapsen und synaptische Proteinen im Hippocampus noch über einen Zeitraum von über vier Wochen hinaus zu beobachten. Auch in der Klinik sollten die Gedächtnisdefizite der mit Aromatasehemmern behandelten Patientinnen länger verfolgt werden. Käme es zu einem „Rescue“-Effekt, sollten sich die Gedächtnisstörungen wieder bessern.

### **6.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik**

Viele wissenschaftliche Arbeiten belegten, dass Estrogene neuroprotektiv und sogar neurotrophisch wirken. Gerade das im Hippocampus endogen synthetisierte Estrogen scheint dabei besonders bedeutend zu sein. Fester *et al.* 2006 konnten demonstrieren, dass es wachstumsinduzierende und proliferationsfördernde Effekte aufweist. Die Expression der Aromatase als Schlüsselenzym der Estrogensynthese ist im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen herunterreguliert (Yue *et al.*, 2005; Ishunia *et al.*, 2007). Eine Aktivierung dieses Enzyms könnte folglich pharmakologisch eine Rolle bei der Therapie von demenziellen Erkrankungen spielen.

Die systemische Brustkrebstherapie mit Aromataseinhibitoren führt zu Gedächtnisdefiziten bei den betreffenden Patientinnen (Files *et al.*, 2010). Dass der Hippocampus in diesem Kontext eine besondere Rolle spielt, demonstrieren Studien und zeigen, dass die Größe des Hippocampus positiv mit einer Hormonersatztherapie korreliert und negativ mit dem Einsatz von Tamoxifen, einem Estrogenrezeptorblocker (Eberling *et al.*, 2003, 2004).

Die bisher durchgeführten Untersuchungen nach pharmakologischer Hemmung der Aromatase, die ja eigentlich vielmehr die klinische Situation widerspiegeln, konnten bereits präsentieren, dass Aromataseinhibitoren die synaptische Plastizität beeinflussen. Durch die vorliegende Arbeit kann besonders gezeigt werden, dass die Aromatase schon bei der embryonalen Entwicklung und bei der Aufrechterhaltung hippocampaler Funktionen wie Lernen und Gedächtnisbildung eine bedeutende Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass ein Aromatase-Knock out die Expression synaptischer Proteine beeinflusst.

Unsere Arbeitsgruppe konnte demonstrieren, dass Aromataseinhibitoren die Blut-Hirn-Schranke passieren, die Estrogenproduktion hemmen und damit die synaptische Plastizität beeinflussen können (Zhou *et al.*, 2010). Trotzdem werden Aromatasehemmer häufig zur Therapie des rezeptorpositiven Mammakarzinoms eingesetzt und stellen oftmals die einzige Hoffnung vieler Brustkrebspatientinnen dar, ihre Krebserkrankung zu unterdrücken. Die Gedächtnisdefizite als Nebenwirkung der Therapie werden zum größten Teil ignoriert, in Kauf genommen oder möglicherweise bei längerer Anwendung als „Rescue-Effect“ ausgeglichen. Diese Arbeit zeigt die Notwendigkeit für weitere Studien über die Anwendung von Aromataseinhibitoren im Bereich der Brustkrebstherapie. Möglicherweise könnte eine Entwicklung von Präparaten, die keine Auswirkung auf die endogene hippocampale Estrogensynthese zeigen, ein zukunftsfähiger Aspekt sein, um Nebenwirkungen, die das zentrale Nervensystem betreffen, zu verhindern.

Die vorliegende Arbeit ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Aromatase mit ihrer enzymatischen Aktivität einen Grundbaustein der synaptischen Plastizität darstellt. Ihr enzymatisches Produkt (Estrogene) interagiert dabei mit den synaptischen Proteinen Synaptopodin, Synaptophysin und Spinophilin und scheint letztere unabhängig von der Synapsenanzahl und Spinedichte zu regulieren. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch immer nicht verstanden und erfordern weitere wissenschaftliche Untersuchungen.

## 7. Zusammenfassung

Viele bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die pharmakologische Behandlung mit Aromataseinhibitoren das Gedächtnis negativ beeinflusst. So war gezeigt worden, dass die medikamentöse Hemmung des Enzyms zu einem Verlust von Spines, Spinesynapsen, einer Herunterregulation synaptischer Proteine und einer Verschlechterung der Langzeitpotenzierung führt. In dieser Dissertation sollte nun geklärt werden, ob diese bisher nur durch pharmakologische Hemmung der Aromatase gewonnenen *in vitro* und *in vivo* Befunde durch vergleichbare Ergebnisse in der aromatasedefizienten Maus bestätigt werden können. Dazu wurde die Expression synaptischer Proteine im Hippocampus der Aromatase-Knock out-Maus untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Synaptopodin, einem Marker für den Spineapparat, bei der Aromatase-Knock out Maus wie nach der pharmakologischen Hemmung deutlich niedriger ist als bei der Wildtyp-Maus.

Die Expression von Spinophilin, einem postsynaptischen Marker, und Synaptophysin, einem präsynaptischen Marker, hingegen war überraschenderweise im Hippocampus der Aromatase-Knockout Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus heraufreguliert, obwohl andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass bei der Aromatase-Knock out-Maus die Spineanzahl und -dichte reduziert ist. Daraus folgernd muss die Rolle von Spinophilin und Synaptophysin als synaptische Marker in Frage gestellt werden, da ihre Expression anscheinend nicht mit der Spinedichte und Synapsenanzahl übereinstimmt.

Eine Behandlung der Aromatase-Knock out-Maus mit  $17\beta$ -Estradiol und mit dem Estrogenrezeptorblocker ICI 182 780 führte nur zu einer geringen Veränderung der Synaptophysin- und Spinophilinexpression. Auf die Synaptopodinexpression schien  $17\beta$ -Estradiol und ICI 182 780 zu einem „Substitutions-Effekt“ zu führen, da die bei der unbehandelten Mutante reduzierte Synaptopodin-Expression in ihrem Fall sogar über dem Niveau der Wildtyp-Maus lag.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass die Aromatase mit ihrer enzymatischen Aktivität einen Grundbaustein der synaptischen Plastizität darstellt, da ihr enzymatisches Produkt (Estrogene) mit den synaptischen Proteinen Synaptopodin, Synaptophysin und Spinophilin interagiert und diese unabhängig von der Synapsenanzahl und Spinedichte zu regulieren scheint.

## 8. Literaturverzeichnis

Abdelgadir SE, Resko JA, Ojeda SR, Lephart ED, McPhaul MJ, Roselli CE (1994) Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 135: 395-401.

Alder J; Xie ZP; Valtorta F; Greengard P, Poo M (1992) Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 9: 759-768.

Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (1997) Spinophilin a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9956-9961.

Alves SE, Hoskin E, Lee SJ, Brake WG, Ferguson D, Luine V, Allen PB, Greengard P, McEwen BS (2002) Serotonin mediates CA1 spine density but is not crucial for ovarian steroid regulation of synaptic plasticity in the adult rat dorsal hippocampus. *Synapse* 45: 143-151.

Amaral DG, Wittner MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.

Amateau SK, McCarthy MM (2002) A Novel Mechanism of Dendritic Spine Plasticity Involving Estradiol Induction of Prostaglandin-E2. *J Neurosci* 22: 8586-8596.

Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, Reiser J, Mundel P (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 115: 1188-1198.

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47: 318-329.

Bakker J, Baillien M, Honda S, Harada N, Balthazart J (2004) Relationship between aromatase activity in the brain and gonads and behavioural deficits in homozygous and heterozygous aromatase knockout mice. *J Neurosci* 16: 483-490.

Ball GF, Balthazart J (2004) Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds. *Physiol Behav* 15: 329-346.

Balthazart J, Baillien M, Ball GF (2001) Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79: 261-277.

Balthazart J, Baillien M, Charlier TD, Ball GF (2003) Calcium dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. *J Neurosci* 17: 1591-1606.

Bas Orth C, Deller T (2005) Lamina-specific distribution of Synaptopodin, an actin-associated molecule essential for the spine apparatus, in identified principal cell dendrites of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 487: 227-239.



Bender CM, Sereika SM, Brufsky AM, Ryan m, Vogel VG, Rastogi P, Cohen SM, Casillo FE, Berga SL (2007) Memory impairments with adjuvant anastrozole versus tamoxifen in women with early-stage breast cancer. *Menopause* 14: 995-998.

Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13-26.

Bliss TVP, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331–356.

Brailoiu E, Patel S, Dun NJ (2003) Modulation of spontaneous transmitter release from the frog neuromuscular junction by interacting intracellular Ca(2+) stores: critical role for nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP). *Biochem J.* 373: 313-318.

Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ (2007) Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol* 193: 311-321.

Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, Greengard P, McEwen BS (2001) Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology* 142: 1284-1289.

Bremner JD (1999) Does stress damage the brain? *Biol. Psychiatry* 45: 797–805.

Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones ME, Simpson ER, Findlay JK.(2000) An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 141: 2614-2623.

Calakos N, Scheller RH (1994) Vesicle-associated membrane protein and synapto-physin are associated on the synaptic vesicle. *J Biol Chem* 269: 24534-24537.

Capani F, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH (2001) Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study. *J Comp Neurol* 435: 156-170.

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ (1997) Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45: 607-617.

Dalla C, Antonius K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J (2004) Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKo) mice exhibit depressive-like symptomatology. *Eur J Neurosci* 20: 217-228.

Daly C, Ziff EB (1997) Post- Transcriptional Regulation of Synaptic Vesicle protein Expression and the Developmental Control of Synaptic Vesicle Formation. *J Neurosci* 17: 2365-2375.

Deller T, Merten T, Roth SU, Mundel P, Frotscher M (2000) Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J Comp Neurol* 418: 164-181.

Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P (2003) Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10494-10499.

Deller T, Bas Orth C, Vlachos A, Merten T, Del Turco D, Dehn D, Mundel P, Frotscher M (2006) Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion. *J Comp Neurol* 499: 471-484.

Duus P (1995) *Neurologisch – topische Diagnostik*. Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 365: 1687-1717.

Eberling JR, Wu C, Haan MN, Mungas D, Buonocore M, Jagust WJ (2003) Preliminary evidence that estrogen protects against age-related hippocampal atrophy. *Neurobiol Aging* 24: 725-732.

Eberling JR, WU C, Tong-Turnbeaugh R, Jagust WJ (2004) Estrogen and tamoxifen-associated effects on brain structure and function. *Neuroimage* 21: 364-371.

Emptage N, Bliss TV, Fine A (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22: 115-124.

Eshkind LG, Leube RE (1995) Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res* 282: 423-433.

Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9287-9292.

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 estrogen synthesis. *J Neurochem* 97: 1136-1144.

Fester L, Zhou L, Voets C, Ossig C, Disteldorf E, Peters C, Bläute F, Prange-Kiel J, Dudzinski D, Jarry H, Rune GM (2009) The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology* 34: 123-129.

Fifková E, Markham JA, Delay RJ (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res* 266: 163-168.

- Fifkova E, Morales M (1989) Calcium-regulated contractile and cytoskeletal proteins in dendritic spines may control synaptic plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 568: 131-137.
- Files JA, Ko MG, Pruthi S. (2010) Managing aromatase inhibitors in breast cancer survivors: not just for oncologists. *Mayo Clin Proc.* 85: 560-566.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-845.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95: 6950-6970.
- Fitzpatrick JL, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM (2002) Estrogen-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor alpha or beta and activation of the MAPK pathway. *J Neurochem.* 82: 674-682.
- Fuhrman BJ, Schairer C, Gail MH, Boyd-Morin J, Xu X, Sue LY, Buys SS, Isaacs C, Keefer LK, Veenstra TD, Berg CD, Hoover RN, Ziegler RG (2012) Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 104: 326-339.
- Gail MH, Costantino JP, Bryant J, Croyle R, Freedman L, Helzlsouer K, Vogel V (1999) Weighing the risks and benefits of tamoxifen treatment for preventing breast cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 91: 1829-1846.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchinson RE, Hutchison JB (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience.* 89: 567-578.
- Gennari L, Nuti R, Bilezikian JP (2004) Aromatase activity and bone homeostasis in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 5898-5907.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, Mc Ewen BS (1990) Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10:1286-1291.
- Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. *J Anat* 83: 420-433.
- Hampel H, Teipel SJ, Alexander GE, Horwitz B, Teichberg D, Schapiro MB, Rapoport SI (1998) Corpus callosum atrophy is a possible indicator of region- and cell typespecific neuronal degeneration in Alzheimer disease: a magnetic resonance imaging analysis. *Arch Neurol* 55: 193-198.

- Hao J, Janssen WG, Tang Y, Roberts JA, McKay H, Lasley B, Allen PB, Greengard P, Rapp PR, Kordower JH, Hof PR, Morrison JH (2003) Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 465: 540-550.
- Harada N., Wakatsuki T., Aste N., Yoshimura N., Honda S.-I. (2009) Functional analysis of neurosteroidal oestrogen using gene-disrupted and transgenic mice. *J. o Neuroendocrinol* 21: 365-369.
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17: 341-371.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York: Wiley.
- Hellriegel M, Hawighorst T, Emons G (2010) *Endokrine Therapie des Mammakarzinoms*. Thieme Verlag  
up2date 6: 367-380.
- Hinz R (2009) *Die Rolle der Estrogenrezeptoren bei estrogeninduzierter Regulation von Synaptopodin*. Med. Dissertation, Universität Hamburg.
- Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morison JH, Janssen WGM, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes Estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 865-870.
- Holcman D, Schuss Z, Korkotian E (2004) Calcium dynamics in dendritic spines and spine motility. *J Biophys* 87: 81-91.
- Holmes MM, Wide JK, Galea LA (2002) Low levels of estradiol facilitate, whereas high levels of estradiol impair, working memory performance on the radial-arm maze. *Behav Neurosci*. 116: 928-934.
- Hull EM, Du J, Lorrain DS, Matuszewich L (1995) Extracellular dopamine in the medial preoptic area: implications for sexual motivation and hormonal control of copulation. *J Neurosci* 15: 7465-7471.
- Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF (2007) Estrogen receptor  $\alpha$  and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer`s disease. *Neurobiol Aging* 28: 1670-1681.
- Jaffe AB, Toran-Allerand CD, Greengard P, Gandy SE (1994) Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein. *J Biol Chem*. 269: 13065-13068.
- Jacques-Fricke BT, Seow Y, Gottlieb PA, Sachs F, Gomez TM (2006)  $CA^{2+}$  influx through mechanosensitive channels inhibits neurite outgrowth in opposition to other influx pathways and release from intracellular stores. *J Neurosci* 26: 5656-5664.

Jenkins VA, Fallowfield LJ, Schilling V, Howell A (2002) Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? *Breast Cancer Res Treat* 76: 137.

Jones MEE, Thoburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23: 12735-12740.

Jones MEE, Boon WC, Proietto J, Simpson ER (2006) Of mice and men: the evolving phenotype of Aromatase deficiency. *Trends Endocrinol Metab*. 2:55-64.

Kennedy MB, Bennett MK, Bulliet RF et al. (1990) Structure and regulation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in central nervous system neurons. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bioi*. 55: 101.

Khosla S, Melton LJ 3<sup>rd</sup>, Riggs BL (2002) Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 87: 1443-1450.

Kimura M, Sudhir K, Jones M, Simpson E, Jefferis AM, Chin-Dusting JP (2003) Impaired acetylcholine-induced release of nitric oxide in the aorta of male aromatase-knockout mice: regulation of nitric oxide production by endogenous sex hormones in males. *Circ Res* 93: 1267-1271.

Klinge CM, Jernigan SC, Smith SL, Tyulmenkov VV, Kulakosky PC (2001) Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol* 174: 151-166.

Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9: 1117-1124.

Koch T und Berg R (1985) *Lehrbuch der Veterinär-Anatomie*. Fischer-Verlag Jena 4. Auflage, Band 3: 422.

Kravitz HM, Janssen I, Lotrich FE, Kado DM, Bromberger JT (2006) Sex steroids hormone gene polymorphisms and depressiv symptoms in women at midlife. *Am J Med* 119: 87-93.

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.

Labitzke J (2009) Einfluss neuronaler Aktivität auf die Expression von Synaptopodin in hippocampalen dendritischen Spines. *Med. Dissertation, Universität Hamburg*.

Li CL, Toda K, Saibara T, Zhang T, Ono M, Iwasaki S, Maeda T, Okada T, Hayashi Y, Enzan H, Shizuta Y, Onishi S (2002) Estrogen deficiency results in enhanced expression of Smoothed of the Hedgehog signaling in the Thymus and affects thymocyte development. *Int. Immunopharmacol*. 2: 823-833.

- Maggiolini M, Picard D (2010) The unfolding stories of GPR 30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol.* 204: 105-114.
- Martin S, Jones M, Simpson E, van den Buuse M (2003) Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice. *Neuroreport* 14: 1979-1982.
- Matsumoto T, Honda S, Harada N (2003) Neurological effects of aromatase deficiency in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86: 357-365.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4: 1086-1092.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429: 761-766.
- McEwen B (2001) Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91: 2785-2801.
- McEwen B (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57: 357-384.
- Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102: 527-540.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature* 297: 681-683.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison J, Janssen W, Rose J, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007) Rapid modulation of long term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100: 950-967.
- Muly EC, Smith Y, Allen P, Greengard P (2004) Subcellular distribution of spinophilin immunolabeling in primate prefrontal cortex: localization to and within dendritic spines. *J Comp Neurol* 469: 185-197.
- Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W (1997) Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139: 193-204.
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z (1971) Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 368-370.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64: 313-353.

Oertner TG, Matus A (2005) Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37: 477-482.

Oettel M (2002) Is there a role for estrogens in the maintenance of men`s health? *Aging Male* 5: 248-257.

Okubo-Suzuki R, Okada D, Sekiguchi M, Inokuchi K (2008) Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 28: 266-276.

Oz OK, Zerwekh JE, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R, Simpson ER (2000) Bone has a sexually dimorphic response to Aromatase deficiency. *J. Bone Miner. Res. Commun.* 280: 1062-1068.

Oz OK, Hirasawa G, Lawson J, Nanu L, Constantinescu A, Antich PP, Mason RP, Tsyganov E, Parkey RW, Zerwekh JE, Simpson ER (2001) Bone phenotype of the aromatase deficient mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 79: 49-59.

Paganini-Hill A (1995) Estrogen replacement therapy and stroke. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 38: 223-242.

Paganini-Hill A, Henderson VW (1996) Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* 156: 2213-2217.

Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion. *Arch. Neurol. Psychiat* 28: 725-743.

Peterson RS, Fernando G, Day L, Allen TA, Chapleau JD, Menjivar J, Schlinger BA, Lee DW (2007) Aromatase expression and cell proliferation following injury of the adult zebra finch hippocampus. *Dev Neurobiol* 67: 1867-1878.

Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD (1999) Estradiol increases spine density and NMDA-dependent  $Ca^{2+}$  transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* 81: 1404-1411.

Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carretero J, Rune GM (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16: 464-471.

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, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptor in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13: 184-192.

Ramon y Cajal S (1891) Sur la structure de l`ecorce cerebrale de quelques mamiferes. *La Cellule* 7: 125-176.

Ramon y Cajal S (1911) Histologie du Systeme Nerveux de l`Homme et des Vertebretes. Vols. 1 and 2. A. Maloine. Paris. 1911.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307: 1625-1630.

Roselli CF (2007) Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol* 106: 143-150.

Rune GM, Frotscher M (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 136: 833-842.

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: 167-75.

Rune GM, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M (2006) Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Rev* 31: 145-155.

Saleh TM, Connell BJ, Legge C, Cribb AE (2005) Estrogen synthesis in the central nucleus of the amygdala following middle cerebral artery occlusion: role in modulating neurotransmission. *Neurosci* 135: 1141-1153.

Satoh A, Nakanishi H, Obaishi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, Hirao K, Nishioka H, Hata Y, Mizoguchi A (1998) Neurabin-II/ spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Biol Chem* 273: 3470-3475.

Schüler H, Peti W (2008) Structure-function analysis of the filamentous actin binding domain of the neuronal scaffolding protein spinophilin. *FEBS J* 275: 59-68.

Scoville WB and Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12: 103-113.

Segal M (2005) Dendritic spines and long term-plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6: 277-284.

Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J, Imamov O, Jones ME, Gustafsson JA (2004) Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 101: 12628-12633.

Simon NG, Whalen RE, Tate MP (1985) Induction of male-typical aggression by androgens but not by estrogens in adult female mice. *Horm Behav.* 19: 204-212.

Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M (2002) Aromatase-a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64: 93-127.

Simpson ER (2004) Models of Aromatase Insufficiency. *Semin Reprod Med.* 1: 25-30.

Sinopoli KJ, Floresco SB, Galea LA (2006) Systemic and local administration of Estradiol into the prefrontal cortex or hippocampus differentially alters working memory. *Neurobiol Learn Mem.* 86: 293-304.



Spacek J (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat Embryol* 171: 235-243.

Spacek J, Harris KM (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17: 190-203.

Spencer JL, Waters EM, Milner TA, Mc Ewen BS (2008) Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt LIM kinase and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. *Neuroscience* 155: 1106-1119.

Stein MB, Koverola C, Hanna C, Torchia MG, McClarty B (1997) Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol Med* 27: 951-959.

Stojilkovic SS, Zemkova H, Van Goor F (2005) Biophysical basis of pituitary cell type specific Ca<sup>2+</sup> signaling-secretion coupling. *Trends Endocrinol Metab* 16: 152-159.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348: 429-432.

Tarsa L, Goda Y (2002) Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *PNAS* 99: 1012-1016.

Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2: 42-49.

Thomas L, Hartung K., Langosch D, Rehm H; Bamberg E, Franke WW, Betz H (1988): Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242: 1050-1053.

Vasilèv DS, Tumanova NL, Zhuravin IA (2010) Study of distribution of protein of the spine apparatus Synaptopodin in cortical brain parts of rats submitted to hypoxia at different periods of embryogenesis. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 46: 435-439.

Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM (2012) Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci* 32: 8116-8126

Von Schassen C, Fester L, Pranke-Kiel J, Lohse C, Böttner M, Rune GM (2006) Oestrogen Synthesis in the Hippocampus: Role in Axon Outgrowth. *J Neuroendocrinology* 18: 847-856.

Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16: 239-249.

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.

Wide LK, Hanratty K, Ting J, Galea LA (2004) High level Estradiol impairs and low level Estradiol facilitates non-spatial working memory. *Behav Brain Res.* 155: 45-53.

Woolley CS, Gould E, Frankfurt M., Mc Ewen BS (1990) Naturally Occuring Fluctuation in Dendritic Spine Density on Adult Hippocampal Pyramidal Neurons. *J. Neurosci* 10: 4035-4039.

Wyszynski M, Kharazia V, Shangvi R, Rao A, Beggs AH, Craig AM, Weinberg R, Sheng M (1998) Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* 18: 1383-1392.

Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y, Li R (2005) Brain estrogen deficiency accelerates Ab plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19198-19203.

Zhou L, 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.

Zhou L, Fester L, von Blittersdorf B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM, (2010) Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinol* 17: 831-844.

## 9. Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune für die Überlassung dieses spannenden Themas sowie für die unkomplizierte, ausgezeichnet fachliche Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. rer. nat. Lars Fester bedanken, der mich in die praktische Arbeit einwies und bei Problemen immer mit Rat und Tat an meiner Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt Frau Bettina Kruck, die mir durch ihre langjährige Erfahrung stets bei der praktischen Arbeit im Labor zur Seite stand.

Allen Mitdoktoranden besonders Dr. med. Christiana Ossig, Dr. med. Jan Labitzke und Dr. med. Thomas Kornek danke ich für die schöne Zeit auch außerhalb des Labors.

Meiner Schwester, Dr. rer. nat. Veronika Bernard, danke ich für die vielen Tipps und das Korrekturlesen der Arbeit.

Meinem Freund, Dr. med. Jakob Olfe, danke ich für die Geduld und fortwährende emotionale und fachliche Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern ohne deren Vertrauen ich nicht so weit gekommen wäre und denen ich diese Arbeit widme.

## **10. Lebenslauf**

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

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

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

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

Unterschrift: .....