



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

**Experimentelle Regulationsmöglichkeiten
der 17 β -Estradiolsynthese
und deren Wirkung auf synaptische Plastizität**

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaft
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

vorgelegt von

Philipp Justus Imholz

aus Hamburg

Hamburg, Juni 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2009 bis März 2014 im Institut für Neuroanatomie am Zentrum für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Rune angefertigt.

Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Rune

Gutachter: PD Dr. Hartwig Lüthen

Tag der Disputation: 30. Mai 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. G. RUNE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv. Doz. Dr. H. LÜTHEN
Tag der Disputation: 30. Mai 2014



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kinde vor der Märchenwelt.“

Marie Curie (1867-1934)

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1. EINLEITUNG	5
1.1. Der Hippocampus	5
1.2. Die Synapse.....	7
1.3. Dendritische Spines	8
1.3.1. Spines und chronische Veränderungen von Estrogen.....	9
1.4. Synaptische Proteine	10
1.4.1. Synaptopodin	10
1.4.2. Synaptophysin.....	12
1.5. Aromatase-vermittelter Einfluss von 17 β -Estradiol auf Neurone und synaptische Plastizität.....	14
1.5.1. Die Aromatase	14
1.5.2. Aromatase-vermittelter Einfluss von Estradiol auf synaptische Plastizität.....	16
1.6. Aromataseinhibitoren	18
1.7. Zielsetzung dieser Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1. Material	22
2.1.1. Arbeitsmaterialien	22
2.1.2. Chemikalien und Enzyme	22
2.1.3. Kits zur Isolierung und Reinigung von RNA und DNA	22
2.1.4. Größen-Standards	23
2.1.5. Geräte	23
2.1.6. Software	25
2.1.7. Versuchstiere	25
2.1.8. Zelllinien	25
2.1.9. Bakterienstämme	25
2.1.10. Medien, Puffer und Lösungen	26
2.1.11. Antikörper.....	29
2.1.12. Vektoren.....	30
2.1.13. Oligonukleotide	31

2.2. Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1. Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.2.2. Plasmid-DNA Isolation	33
2.2.3. Anlegen von Glycerolkulturen	33
2.2.4. DNA Konzentrationsbestimmung	34
2.2.5. DNA Fällung	34
2.2.6. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	34
2.2.7. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	34
2.2.8. Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	35
2.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.11. RNA-Isolierung	37
2.2.12. RNA Qualitäts- und Quantitätsbestimmung	38
2.2.13. cDNA-Synthese (reverse Transkription)	38
2.2.14. quantitative Real-Time-PCR (q-PCR)	39
2.2.15. Analyse der Real-Time PCR	40
2.2.16. Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.17. Klonierung von DNA-Fragmenten	40
2.2.18. shRNA Herstellung	41
2.2.19. Aromatase-Expressionsvektor	42
2.2.20. siRNA Experimente	43
2.2.21. DNA- Sequenzierung	43
2.3. Proteinbiochemie	44
2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Estradiol mittels ELISA	44
2.3.2. Herstellung von Zelllysaten	44
2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
2.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	45
2.3.5. Immunoblot (Western Blot)	45
2.3.6. Immundetektion	45
2.4. Zellbiologie und Immunocytochemie	46
2.4.1. Kultivierung von Neuro-2a Zellen	46
2.4.2. Kultivierung von HT22 Zellen	47
2.4.3. Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen aus	
<i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)	47
2.4.4. Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen aus	
<i>Mus musculus</i> (Linnaeus, 1758)	48
2.4.5. Fixierung der Dispersionskulturen	48

2.4.6. Präparation und Kultivierung hippocampaler Schnittkulturen	49
2.4.7. Elektronenmikroskopie	49
2.4.8. Auswertung der EM-Bilder	50
2.4.9. Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA und siRNA	51
2.4.10. Pharmakologische Behandlung kultivierter primärer hippocampaler Neurone und Schnitte	54
2.4.11. Herstellung von Kryostatschnitten.....	54
2.4.12. Immunzytochemie/ Immunhistochemie.....	55
2.4.13. Intensitätsanalyse der IHC bzw. ICC	56
2.5. Quantitative Analyse und Statistik	57
2.5.1. Statistik.....	57
3. ERGEBNISSE	59
3.1. Aromatase- <i>Knockout</i> -Maus	59
3.2. Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die 17 β -Estradiolsynthese in hippocampalen Dispersionskulturen	62
3.3. Synaptische Proteine in hippocampalen Dispersionskulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren	64
3.3.1. Synaptophysinexpression nach Inhibition der Aromatase in Dispersionskulturen	65
3.3.2. Synaptopodinexpression nach Inhibition der Aromatase in Dispersionskulturen.....	69
3.4. Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synapsendichte in hippocampalen Schnittkulturen.....	74
3.5. Synaptische Proteine in hippocampalen Schnittkulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren	76
3.5.1. Synaptophysinexpression nach Inhibition der 17 β -Estradiolsynthese durch verschiedene Aromataseinhibitoren in hippocampalen Schnittkulturen.....	77
3.5.2. Synaptopodinexpression nach Inhibition der Aromatase in hippocampalen Schnittkulturen	82
3.6. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse.....	87
3.7. „ <i>Gen-Silencing</i> “ der Aromatase	89
3.7.1. shRNA-vermittelter <i>Knockdown</i> der Aromatase-mRNA.....	90
3.7.2. Aromatase- <i>Knockdown</i> mittels siRNA	95
3.8. Untersuchung zum Einfluss des Aromatase- <i>Knockdowns</i> auf synaptische Proteine ...	101
4. DISKUSSION	108
4.1. Vergleich der 17 β -Estradiol-reduzierenden Wirkung verschiedener	
Aromataseinhibitoren im neuronalen Modellsystem	108

4.2. Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Spinesynapsen-Anzahl hippocampaler Schnittkulturen	112
4.3. Veränderte Expression synaptischer Proteine nach Applikation verschiedener Aromataseinhibitoren	114
4.3.1. Einfluss der Aromataseinhibitoren auf Synaptopodin	114
4.3.2. Einfluss der Aromataseinhibitoren auf Synaptophysin	119
4.4. <i>Knockdown</i> -vermittelte Reduktion der Aromatase und deren Wirkung auf synaptische Proteine	122
4.5. Vergleich der verschiedenen Methoden zur Untersuchung des Estradiol-vermittelten Einflusses auf Neuronen	126
 5. LITERATURVERZEICHNIS	 128
 APPENDIX	 I
A. Abkürzungsverzeichnis	I
B. Einheiten	III
C. Präfixe	III
D. Abbildungsverzeichnis	III
E. Tabellenverzeichnis	VI
F. Publikationsverzeichnis	VII
G. Wissenschaftlicher Werdegang	VIII
H. Stipendien	VIII
I. Danksagung	IX
J. Eidesstattliche Versicherung	X

ZUSAMMENFASSUNG

Durch eine Vielzahl von Untersuchungen hat sich in den letzten Jahrzehnten das Wissen etabliert, dass Estrogene eine wichtige Rolle für die Funktion und Struktur des Gehirns spielen.

Die Steroidbiosynthese der Estrogene wird durch das Enzym Aromatase katalysiert, welche im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Seit den 1970er Jahren ist durch Arbeiten von Naftolin bekannt, dass Estrogene neben den Ovarien und anderen Körpergeweben auch im Gehirn und hier im Speziellen im cerebralen Cortex, dem limbischen System mit dem Hippocampus, dem Hypothalamus und der Amygdala synthetisiert werden. Seit bekannt ist, dass Estradiol lokal im Hippocampus *de novo* synthetisiert wird, sind in *in vivo* und *in vitro* Systemen vermehrt Hinweise entdeckt worden, die dieses hippocampale Estradiol mit synaptischer Plastizität und Neuroprotektion in Verbindung bringen und so die hippocampalen Funktionen sowie strukturelle synaptische Plastizität unterstützen. Estradiol unterstützt die Bildung von dendritischen Spines und verstärkt Langzeitpotenzierung (LTP) von hippocampalen Neuronen, dem elektrophysiologischen Korrelat von Gedächtnis. Auch der positive Einfluss von Estradiol in Hippocampus-abhängigen Lernparadigmen ist beschrieben. Im Zusammenhang mit der Estradiol-vermittelten synaptischen Plastizität wurde eine Hochregulation von synaptischen Proteinen in der Hippocampusregion CA1 gefunden. Umgekehrt führt eine Reduzierung des Estradiols durch Inhibition der Aromataseaktivität zur einer Reduzierung der synaptischen Proteine, die einhergeht mit einem Synapsenverlust und einer verringerten LTP. Aromataseinhibitoren werden bei der Behandlung von Estrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen eingesetzt, um die intra- und extratumorale Estradiolsynthese, die das Tumorwachstum fördert, zu unterdrücken. Da die hierbei verwendeten Aromataseinhibitoren die Blut-Hirn-Schranke passieren können, reduzieren sie auch die lokale Estrogensynthese im Gehirn. Möglicherweise sind Berichte von Patientinnen, die verschlechterte Gedächtnisleistungen in Folge ihrer Therapie schildern, durch diese reduzierte Estradiolsynthese im Gehirn begründet.

Da die in der Brustkrebstherapie eingesetzten Aromataseinhibitoren auch bei der Aufklärung estrogenvermittelter Prozesse im Gehirn zum Einsatz kommen, ist ein direkter Vergleich ihrer Wirkung auf Neurone wichtig. Dieser Vergleich lässt möglicherweise auch Rückschlüsse für die Verwendung der Aromataseinhibitoren in der Brustkrebstherapie zu.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aromataseinhibitoren Letrozol, Anastrozol und Fadrozol hinsichtlich ihres Einflusses auf die 17 β -Estradiolsynthese, die Synapsenanzahl sowie auf die prä- und postsynaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptopodin in hippocampalen Dispersions- und Schnittkulturen untersucht und verglichen. Neben den Aromataseinhibitoren wurde ebenfalls untersucht wie sich ein *Knockdown* der Aromatase-mRNA auf diese Parameter auswirkt und möglicherweise von ihnen unterscheidet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die verschiedenen Aromataseinhibitoren in der Stärke ihres Einflusses auf die synaptischen Proteine, die Synapsenanzahl und die reduzierende Wirkung der 17 β -Estradiolsynthese voneinander unterscheiden, jedoch in der Tendenz die gleichen Effekte hervorrufen. Alle Aromataseinhibitoren führen zu einer reduzierten 17 β -Estradiolsynthese und einer Reduktion der Spinesynapsen-Anzahl. Der Grad der Spinesynapsenreduktion ist dabei unabhängig vom 17 β -Estradiol-reduzierendem Effekt der Aromataseinhibitoren. Einhergehend damit führen die Aromataseinhibitoren zu einer Zunahme der prä- und postsynaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptopodin. Die Reduktion der Aromatase-mRNA mittels ihres *Knockdowns* führt hingegen zu einer verringerten Menge der betrachteten synaptischen Proteine.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sowohl der Differenzierungsgrad der Neurone als auch die Dauer der 17 β -Estradiol-Deprivation einen Einfluss auf die Expression der synaptischen Proteine hat. Unterschiedlich starke Einflüsse der Aromataseinhibitoren sind möglicherweise durch unbekanntes Nebenreaktionen dieser begründet und erklären darüber hinaus auch die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu der spezifischeren Reduktion der 17 β -Estradiolsynthese durch einen *Knockdown* der Aromatase-mRNA.

Für eine möglichst starke Reduktion der 17 β -Estradiolsynthese in Neuronen empfiehlt sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit Anastrozol dicht gefolgt von Letrozol. Da Anastrozol gleichzeitig zur geringsten Reduktion der Spinesynapsen-Anzahl führt, ist sein Einsatz in der Brustkrebstherapie möglicherweise dem von Letrozol vorzuziehen. Um möglichst spezifisch Einfluss auf die Estradiolsynthese zu nehmen empfiehlt sich der *Knockdown* der Aromatase mittels siRNA.

SUMMARY

During the last decades, a variety of studies have been published supporting the hypothesis that estrogens play an important role in brain function and structure.

The steroidogenesis of estrogens is catalyzed by the enzyme aromatase, which is localized in the endoplasmic reticulum.

Since the 1970s, the work of Naftolin has shown that other tissues, apart from the ovaries, are capable of synthesizing estrogens. These body tissues include the brain, in particular the cerebral cortex, and the limbic system, which includes the hippocampus and the amygdala.

Since the discovery of the local *de novo* synthesis of estrogen in the hippocampus, more and more evidence from *in vivo* and *in vitro* experiments links this local estrogen to synaptic plasticity and neuroprotection, thus suggesting that estradiol supports the function of and structural plasticity in the hippocampus. Estradiol supports the generation of dendritic spines and also enhances long-term potentiation (LTP) of hippocampal neurons, which is an electrophysiological correlate of memory. Moreover, the positive impact of estradiol in hippocampus-dependent learning paradigms has been described. In the context of estradiol-mediated synaptic plasticity, an upregulation of synaptic proteins has been described in the CA1 region of the hippocampus. Vice versa, a reduction of estradiol by aromatase inhibition results in decreased expression of synaptic proteins that is accompanied by a reduction of spine synapses and decreased LTP.

Aromatase inhibitors are used in the treatment of estrogen receptor-positive mammary carcinoma to reduce intra- and extratumoral estrogen synthesis, which promotes tumor growth. As these aromatase inhibitors are able to pass the blood-brain barrier, they also decrease local estrogen synthesis in the brain. It is possible that this local estrogen reduction is the cause of cognitive deficits reported by breast cancer patients.

Since aromatase inhibitors are also used to explore the estrogen-related processes in the brain, a direct comparison of their effects on neurons is important. This comparison may also lead to conclusions on the use of aromatase inhibitors in breast cancer therapy.

In the present study, the aromatase inhibitors letrozole, anastrozole and fadrozole are compared and examined in terms of their influence on 17β -estradiol synthesis, on spine synapse number, as well as on the pre- and post-synaptic proteins synaptophysin and synaptopodin in hippocampal dispersed and slice cultures. In

addition, the influence of a knockdown of the aromatase mRNA was studied and compared to the effects of aromatase inhibitors.

The results of this study show that the various aromatase inhibitors differ in the degree to which they reduce the levels of 17β -estradiol, and spine synapse numbers. At the same time, aromatase inhibitors lead to an increase in the levels of pre- and post-synaptic proteins synaptophysin and synaptopodin. The reduction of aromatase-mRNA by their knockdown, however, leads to reduced levels of synaptic proteins.

The results of this study suggest that both the duration of 17β -estradiol deprivation, as well as the degree of differentiation of the neurons treated with aromatase inhibitors, has an effect on the expression of synaptic proteins. The unknown side effects of aromatase inhibitors may account for the different degrees of reduction in 17β -estradiol and spine synapses. Moreover, they may explain the variation in the results compared to the more specific knockdown of aromatase-mRNA by siRNAs.

The results of this study indicate that the use of anastrozole results in the strongest reduction of 17β -estradiol synthesis. As anastrozole gives rise to the smallest reduction in spine synapse number, its use in breast cancer therapy may be preferable to that of letrozole. In order to influence the synthesis of estradiol as specifically as possible, the knockdown of aromatase by siRNA is recommended.

1. EINLEITUNG

1.1. Der Hippocampus

Der Hippocampus ist größter Bestandteil des Archicortex und ist somit ein entwicklungsgeschichtlich alter Teil des Gehirns. Weiter ist er Teil des limbischen Systems. Die Anatomie und die Verschaltung seiner verschiedenen Regionen sind unter den Säugetieren stark konserviert (Manns und Eichenbaum, 2007).

Die Hippocampusformation wird während der Embryonalentwicklung in den Temporallappen verlagert (Benninghoff und Drenckhahn, 2004). Zu ihr wird der *Gyrus dentatus*, das *Cornu ammonis* (Ammonshorn), bestehend aus den Regionen CA1 bis CA4, und das *Subiculum* gezählt. Beim Menschen liegt der Hippocampus am medialen Rand des linken und rechten Temporallappens. In der Ratte bildet er eine C-förmige Struktur, die von rostral nach kaudal beide Hemisphären durchzieht (Amaral und Witter, 1989).

Anders als die Großhirnrinde weist der Hippocampus eine Dreischichtigkeit in der axonalen Verschaltung auf. Diese Dreischichtigkeit findet man sowohl im Cornum ammonis als auch im *Gyrus dentatus*. Außerhalb liegt der Alveus, in dem die Efferenzen des Hippocampus verlaufen, dem Cornum ammonis auf. Darunter befinden sich dann von innen nach außen folgende drei Schichten: Das *Stratum oriens* (Korbzellschicht) beherbergt die Zellkörper der hemmenden Korbzellen, gefolgt vom *Stratum pyramidale* (Pyramidenzellschicht) in dem die Zellkörper der Neurone liegen. Im anschließendem *Stratum moleculare* (Molekularschicht), welches sich in das *Stratum radiatum* und das *Stratum lacunosum moleculare* unterteilen lässt, finden sich hauptsächlich die apikalen Dendriten der Neurone aus der Pyramidenzellschicht und einige Interneurone. Der Hippocampus proprius ist beim Menschen in die Regionen CA1 bis CA4 (von **Cornu Ammonis**) unterteilt. (Bei Nagern CA1 bis CA3.) Der Übergang zwischen den Regionen CA1 und CA3 lässt sich im *Stratum pyramidale* gut an den im CA1 zunehmenden dichter und kleiner werdenden Zellkörpern erkennen. Der *Gyrus dentatus* weist eine vergleichbare Schichtung auf.

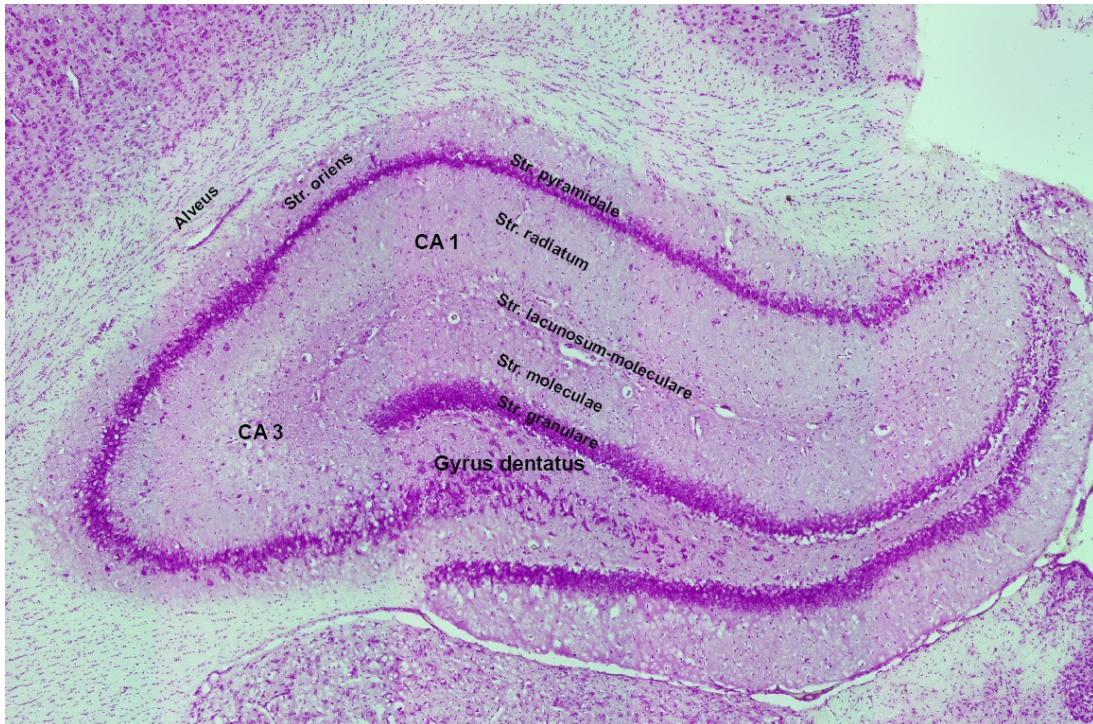


Abbildung 1: Übersichtsaufnahme der Hippocampusformation. Zu sehen ist die Übersichtsaufnahme eines mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbten Hippocampus einer adulten Ratte zusammen mit dem *Gyrus dentatus*. Zu sehen ist das *Cornu ammonis* mit seinen Regionen (CA1, CA3). In ihm sind von Innen nach Außen folgende Schichten zu sehen: *Alveus*, *Str. oriens*, *Str. pyramidale*, *Str. radiatum*, *Str. lacunosum-moleculare*. Diese werden gefolgt von den Schichten des *Gyrus dentatus*: *Str. moleculare*, *Str. granulare* und *Hilus*. Str. = Stratum

Im Hippocampus fließen verschiedene sensorische Informationen zusammen, die hier integriert und in den Cortex zurückgesandt werden. Der Hippocampus stellt daher ein wichtiges Zentrum für die Gedächtniskonsolidierung dar. So zeigen Menschen, denen auf Grund von Unfällen oder Erkrankungen beide Hippocampi fehlen, anterograde Amnesien. Sie sind nicht in der Lage neue Gedächtnisinhalte zu speichern, können jedoch alte Erinnerungen abrufen. Da es mittlerweile als anerkannt gilt, dass Neurone des Hippocampus synaptische Plastizität zeigen, also eine Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung in Abhängigkeit ihrer neuronalen Aktivität, und die Schaffer-Kollateralen durch ihre Ausstattung mit Glutamat-Rezeptoren/NMDA-Rezeptoren an Langzeitpotenzierung beteiligt sind, eignet sich der Hippocampus besonders gut, um molekulare Grundlagen von Lernen und Gedächtnis sowie den Einfluss von Substanzen auf diese zu untersuchen.

1.2. Die Synapse

Das Nervensystem besteht aus ca. 10^{11} Neuronen, welche seine funktionelle Basis bilden. Die Nervenzellen sind untereinander durch eine Vielzahl an Synapsen – ca. 100 Billionen - verbunden und bilden so ein weit verzweigtes Netzwerk aus. Dieses Netzwerk erlaubt es den Organismen auf innere und äußere Reize bewusst und unbewusst zu reagieren (Squire, 1992).

Die Haupteigenschaft der Neurone besteht in ihrer elektrischen Erregbarkeit und der Fähigkeit elektrische Signale gerichtet und über weite Strecken hinweg zu leiten (Siegel und Sapru, 2006). Dies wird erst durch das Vorhandensein eines Membranpotentials möglich, welches durch unterschiedliche intra- und extrazelluläre Konzentrationen von verschiedenen Ionen, die durch die semipermeable Plasmamembran getrennt werden, zustande kommt (Kandel et al., 2000). Dieser Ionengradient wird aktiv durch Ionenpumpen in der Plasmamembran aufrechterhalten. Durch chemische und elektrische Signale können ligandengesteuerte bzw. spannungsgesteuerte Ionenkanäle in der Plasmamembran die Leitfähigkeit für Ionen selektiv erhöhen oder verringern. Wird hierdurch eine Depolarisierung ausgelöst, kommt es nach dem „Alles oder Nichts“ Prinzip zur Weiterleitung des Signals in Form eines Aktionspotentials. Dieses Aktionspotential läuft im Axon bis zum nächsten Neuron. Die Stelle, an der die Signalübertragung von einem Neuron an ein anderes stattfindet, wird als Synapse bezeichnet (Purves, 2012). Man unterscheidet hierbei zwischen einer chemischen und einer elektrischen Synapse (Kandel et al., 2000). Elektrische Synapsen (*gap junctions*) bilden eine direkte Verbindung des Zytoplasmas zweier Neurone über so genannte Connexine. Durch diese Poren können Metabolite und elektrische Signale von einem auf das andere Neuron sehr schnell ($<0,1$ ms) uni- und bidirektional übertragen werden.

Im Gegensatz zur elektrischen Synapse besteht bei der chemischen Synapse kein direkter Kontakt zwischen den Neuronen. Sie werden durch den synaptischen Spalt voneinander getrennt (Purves, 2012). Auf der Seite der präsynaptischen Endigung (*bouton terminal*) findet man tausende mit für den Synapsentyp spezifischen Neurotransmittern gefüllte Vesikel, die sich in der Aktiven Zone konzentrieren. Dieser Zone gegenüber liegend befinden sich auf der postsynaptischen Seite die Neurotransmitterrezeptoren.

Erreicht ein Aktionspotential die Präsynapse, kommt es zu einer Depolarisation der Plasmamembran und in dessen Folge zu einer Ausschüttung von Neurotransmittern. Durch Diffusion gelangen die Neurotransmitter an die Rezeptoren der Postsynapse und führen selektiv zum Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen. Hierdurch kommt

es entweder zu einer Depolarisierung oder einer Hypopolarisierung der postsynaptischen Membran. Dies bedeutet, dass das Neuron erregt (exzitatorische Synapse) oder gehemmt (inhibitorische Synapse) wird. Durch die Verschaltung von verschiedenen Synapsentypen kommt es letztendlich zur Modulation und Integration der Signale.

1.3. Dendritische Spines

Die Dendriten der meisten Neurone sind von vielen Spines besetzt, welche dazu dienen die Oberfläche für Neurotransmissionen zu vergrößern (Nimchinsky et al., 2002). Spines sind der Gegenpart des axonalen Buttons und bilden mit ihm zusammen eine Synapse. Ramón y Cajal beschrieb Spines erstmals 1888 und stellte fest, dass die Dichte der Spines positiv mit einer vermehrten Innervation korreliert (García-López et al., 2007). Die Pyramidenzellen aus dem Hippocampus und dem Cortex sind besonders stark mit Spines besetzt (Nimchinsky et al., 2002). Eine Reihe von Spine-Untergruppen wird in der Literatur beschrieben. So genannte „*Mushroom Spines*“ (pilzförmige Dornen) bestehen aus einer Vorstülpung mit einem dicken Kopf. Diese werden von Spines mit einem kleineren Kopf und solchen, die gar keine Verdickung an ihrem Ende aufweisen (stubby Spines), unterschieden. Weiter sind noch die filopodienartigen, sehr dünnen Spines beschrieben (Bourne und Harris, 2008; Urbanska et al., 2012; Halbach, 2009). Die *Mushroom Spines* bestehen gegenüber dünnen Spines länger und sind funktionell stärker (Holtmaat et al., 2005; Zuo et al., 2005; Tada und Sheng, 2006; Kasai et al., 2010). Daher werden sie auch als „Gedächtnis“-Spines bezeichnet. Cajals frühe Hypothese, Spines dienten der Vergrößerung der Oberfläche für die Kommunikation zwischen Neuronen wurde Jahrzehnte später durch Untersuchungen mithilfe der Elektronenmikroskopie bestätigt.

Die Anzahl an Spines nimmt bis zu einem bestimmten Alter zu. So sind die Dendriten Neugeborener Ratten nahezu frei von Spines, wohingegen die von adulten Ratten eine hohe Dichte dieser aufweisen. Die Spinedichte und Morphologie adulter Tiere ist jedoch variabel und es ist mittlerweile anerkannt, dass Veränderungen in der Spinedichte und Morphologie ein wichtiger Mediator für neuronale Plastizität darstellen (Urbanska et al., 2012). Veränderungen der Spinemorphologie können innerhalb weniger Sekunden auftreten (Fischer et al., 1998; Engert und Bonhoeffer, 1999). Diese schnellen Veränderungen sind

vermutlich Aktin-vermittelt, da Aktin den Hauptbestandteil des Spine-Cytoskeletts bildet (Matus, 2007; Fifkova und Delay, 1982)

Die dendritische Spinedichte ist für eine Vielzahl an Stimuli sensitiv. Stress führt beispielsweise geschlechtsabhängig zu veränderten Synapsendichten im Hippocampus (Conrad et al., 2012; Shors et al., 2004). Auch gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die einen altersabhängigen Rückgang der Spinedichte in Pyramidenzellen sowohl in Ratten (Bloss et al., 2011; Geinisman et al., 2004; Luine et al., 2011; Markham und Juraska, 2002; Halbach et al., 2006; Wallace et al., 2007) als auch in Affen (Uemura, 1980; Dumitriu et al., 2010) beschreiben. Diese Veränderungen gehen einher mit verschlechterten Gedächtnisleistungen und einer verminderten Konzentration von 17β -Estradiol im Serum.

Heute wird angenommen, dass dendritische Veränderungen der Spinedichte zu den grundlegenden Mechanismen gehören, die für Lernen und Gedächtnis wichtig sind. Das Ablegen neuer Erinnerungen in Konditionierungsparadigmen geht einher mit einer Zunahme der Spinesynapsen-Dichte in der CA1 Region des Hippocampus (Leuner et al., 2003; Jedlicka et al., 2008; Beltrán-Campos et al., 2011). Weiter wurde gezeigt, dass Spines ihre Morphologie in Folge von LTP (Langzeitpotenzierung) verändern. Kongruent dazu geht eine Abnahme der Synapsenzahl und –größe mit Langzeitdepression (LTD) einher (Bastrikova et al., 2008). Gedächtnisbildung scheint somit Veränderungen der dendritischen Spines zu brauchen, welchen den Veränderungen der Langzeitpotenzierung (LTP) nachfolgen.

1.3.1. Spines und chronische Veränderungen von Estrogen

In den Neuronen der CA1 Region von Ratten kommt es während des vier bis fünf Tage andauernden ovariellen Zyklus zu Schwankungen in der dendritischen Spinedichte von ca. 30 % (Woolley und McEwen, 1992). Die höchste Spinedichte tritt hierbei zusammen mit den höchsten 17β -Estradiolspiegeln im Serum während des Proöstrus auf. In ovariectomierten Tieren ist eine reduzierte Spinedichte in der CA1 Region zu beobachten (Gould et al., 1990; Wallace et al., 2006). Dieser Rückgang in der Spinedichte kann durch die Gabe von Estradiol aufgehoben werden. In Experimenten mit Affen konnte selbiges für die CA1 Region gezeigt werden (Packard, 1998; Hajszan und Leranth, 2010). Auch in Aromatase-Knockout Mäusen, in denen also das Gen des estrogensynthetisierenden Enzyms fehlt, wurde eine verminderte Spinedichte gefunden (Zhou et al., 2014, under revision). Daher wird allgemein davon ausgegangen, dass Estrogen einen physiologischen sowie

morphologischen Einfluss auf Neurone und ihre Verbindungen, speziell im Hippocampus, hat. Genauer wird der Einfluss von 17 β -Estradiol auf Neurone im Abschnitt 1.5 erläutert.

1.4. Synaptische Proteine

1.4.1. Synaptopodin

Das Protein Synaptopodin wurde 1997 erstmals in den Podozyten der Niere und in dendritischen Spines beschrieben, wo es eng an den Spine-Apparat assoziiert ist (Mundel et al., 1997). *In-situ*-Hybridisierungen zeigten, dass die Synaptopodin mRNA nur in Neuronen des Telencephalons und hier nur im Perikaryon der Neurone vorkommt, das Protein jedoch nur in den Dendriten und hier speziell in den Spines (Czarnecki et al., 2005; Deller et al., 2000b; Roth et al., 2001). Fester et al. beschreiben allerdings auch ein Vorkommen des Proteins im Soma und im Axon-Initialesegment von Neuronen des Hippocampus (Fester et al., 2013).

Es sind heute drei Isoformen des Proteins bekannt (Synpo-short, Synpo-long und Synpo-T), welche durch alternatives Splicen und unterschiedliche Polyadenylierungen zustande kommen. Die Funktion und das Vorkommen der drei Varianten werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Mundel vermutet, dass die lange Synaptopodinvariante ausschließlich in der Niere und die kurze Variante nur im Telencephalon vorkommen (Mundel et al., 1997). Diese Annahme wird durch Asanuma gestützt (Asanuma et al., 2005). Andere Veröffentlichungen berichten, dass gerade Bestandteile der langen Variante wichtig für die Synaptopodinfunktion in den Spines sind und dass es sich bei der kurzen Form des Proteins lediglich um eine unvollständige Sequenz in der Datenbank handelt (Kremerskothen et al., 2005). Sowohl die lange als auch die kurze Proteinvariante weisen mit ca. 20 % einen hohen Prolinanteil auf, auf Grund dessen für Synaptopodin eine gestreckte Struktur ohne globuläre Domänen angenommen wird. Über zwei PPxY-Motive kann Synaptopodin mit den WW-Domänen und SH3 Domänen anderer Proteine interagieren (Einbond und Sudol, 1996; Chen und Sudol, 1995). Diese Proteine sind unter anderen Dystrophin und Utrophin, welches Proteine des postsynaptischen Zytoskeletts sind (Bork und Sudol, 1994). Weiter konnte eine Assoziation von Synaptopodin mit Aktin und α -Aktinin über eine jeweilige Bindungsstelle gezeigt

werden und dass durch diese Bindung die beiden Aktin-Proteine stabilisiert werden (Mundel et al., 1997; Asanuma et al., 2005; Kremerskothen et al., 2005).

In den Spines von Neuronen ist Synaptopodin als Teil des Aktin-Zytoskeletts in der postsynaptischen Dichte (PSD) (Mundel et al., 1997) und hier hauptsächlich im Spinehals, wo der Spine-Apparat lokalisiert ist, zu finden (Deller et al., 2000b). *In situ* Hybridisierungen zeigten jedoch, dass die mRNA nur im Perikaryon zu detektieren ist, was darauf hindeutet, dass das Synaptopodin-Protein vom Zellkörper zu den Spines transportiert wird.

Sowohl im Gehirn, als auch in der Niere ist die Synaptopodin Genexpression *in vivo* und *in vitro* entwicklungsbedingt reguliert (Mundel et al., 1997). Während der postnatalen Entwicklung der dendritischen Spines im Gehirn und in den Podozyten während der Nephrogenese wird Synaptopodin erst in späteren und maturen Stadien, nachdem die typische subzelluläre Architektur bereits ausgeprägt ist, exprimiert (Czarnecki et al., 2005). In dissoziierten Neuronen scheint Synaptopodin erst in späteren Entwicklungsstadien exprimiert zu werden, in denen auch die Differenzierung der dendritischen Spines zeitgleich abläuft (Deller et al., 2006). So steigt in primären hippocampalen Neuronen die Menge an Synaptopodin parallel zur Reifung der Spines an.

Synaptopodin interagiert in spezieller Weise mit α -Aktinin, welches für die Bündelung und Verlängerung von Aktinfilamenten wichtig ist. Durch diese Eigenschaft nimmt Synaptopodin eine wichtige Rolle in der Strukturierung des Aktin-Zytoskeletts in maturen Spines und Podozyten ein und ist möglicherweise wichtig für die Stabilität des Spine-Apparats (Asanuma et al., 2005). Über dies hinaus wird Synaptopodin mit dem Auftreten von Langzeitpotenzierung (LTP = long-term potentiation) in Verbindung gebracht. So wurde gezeigt, dass Synaptopodin defiziente Mäuse ein abgeschwächtes LTP sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigen (Deller et al., 2003; Jedlicka et al., 2008). In wildtypischen Mäusen hingegen ist nach der Induzierung eines LTP ein Anstieg der Synaptopodin mRNA zu messen (Yamazaki et al., 2001; Matsuo et al., 1998; 2000). Weiter konnten Untersuchungen an den Synaptopodin-KO-Mäusen zeigen, dass Synaptopodin essentiell für die Bildung eines Spine-Apparats ist, da in den synaptopodindefizienten Mäusen bei gleichzeitiger sonstiger morphologischer Unauffälligkeit keine Spine-Apparate gefunden werden konnten (Deller et al., 2003). Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von Synaptopodin und dem Vorhandensein eines Spine-Apparats. So spiegelt das Verteilungsmuster des Spine-Apparats das Expressionsmuster von Synaptopodin wieder (Mundel et al., 1997; Deller et al., 2000a). Sowohl durch die Korrelation von LTP und Synaptopodin als auch durch die

Interaktionen mit dem Zytoskelett, stellt Synaptopodin eine wichtige Komponente bei Prozessen der synaptischen Plastizität dar. Dies wird auch durch die Ergebnisse von Korkotian und Segal unterstützt, nach denen Synaptopodin wichtig für den Calcium induzierten Calciumrelease in Spines sein soll (Korkotian und Segal, 2011). Aufgrund seines spezifischen Vorkommens in maturen, dendritischen Spines wird Synaptopodin als postsynaptisches Marker-Protein von maturen, so genannten „Gedächtnis“-Spines verwendet.

1.4.2. *Synaptophysin*

Synaptophysin ist das in synaptischen Vesikeln am häufigsten vorkommende Protein (Bertram und Wiedemann, 1985; Jahn et al., 1985; Jahn und Südhof, 1999; Takamori et al., 2006; Leube et al., 1989). Es ist sowohl an der Neurotransmitterfreisetzung, wie auch der Transmitter-Wiederaufnahme durch die Regulation von Exo- und Endozytose beteiligt (Hübner et al., 2002). Darüber hinaus spielt es eine Rolle beim Vesikel-*Recycling* (Daly, 2002). Synaptophysin ist evolutionär stark konserviert und kommt in neuroendokrinen Zellen sowie in allen Neuronen, die an synaptischen Übertragungen im Gehirn und Rückenmark beteiligt sind vor. Sein ubiquitäres Vorkommen im präsynaptischen Teil von Synapsen hat zu der Verwendung von Synaptophysin-Immunfärbungen als Mittel zur Quantifizierung von Synapsen geführt (Calhoun et al., 1996).

Strukturell verfügt Synaptophysin über vier Transmembrandomänen. Seine Termini sind auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert, wobei der C-Terminus lang ist und aus Pentapeptidwiederholungen besteht, der N-Terminus hingegen kurz ist. Durch diese Anordnung entstehen zwei Schleifen des Proteins, die zur luminalen Seite der Vesikel zeigen. Jeder dieser Schleifen wird durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten stabilisiert. Die Größe und ungewöhnliche Struktur des C-Terminus spricht dafür, dass es sich hierbei um eine Bindungsstelle für zelluläre Faktoren handelt. Des Weiteren wird vermutet, dass sich mehrere Synaptophysinuntereinheiten über Disulfidbrücken und oder nicht kovalente Kräfte verbinden und auf diese Weise Multimere formen. Deren Transmembranregionen formen dann wahrscheinlich einen Membrankanal (Südhof et al., 1987). Die Ladungsverteilungen innerhalb dieses Kanals verringern die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um einen Ionenkanal handelt. Vielmehr gleicht diese Struktur der einer *gap-junction* (Paul, 1986; Unwin, 1986). Hierfür sprechen auch die

Ergebnisse einer Elektronenmikroskopie-Studie, die für Synaptophysin eine hexamere Struktur ähnlich der der Connexone fand (Arthur und Stowell, 2007).

Synaptophysin bindet Cholesterol in der Membran synaptischer Vesikel, in welcher ein überdurchschnittlich hoher Anteil von Cholesterol zu finden ist. Cholesterol ist hier in Form von Clustern in der Membran angereichert (Westhead, 1987). Diese Protein-Lipid-Cluster sind vermutlich für die Funktion des SNARE-Komplexes notwendig (Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001; Salaün et al., 2004; Salaun, 2005). Cholesterol ist des Weiteren für die Biogenese und die starke Membrankrümmung synaptischer Vesikel erforderlich (Hannah et al., 1999).

Synaptophysin wird bereits während der frühen Neurogenese exprimiert und ist während der Synaptogenese stark hochreguliert (Devoto und Barnstable, 1989; Leclerc et al., 1989; Marazzi und Buckley, 1993). Auch in neuronalen Zellkulturen ist es eines der ersten vorkommenden Proteine (Fletcher et al., 1991; Tarsa, 2002).

Über die weitere Funktion von Synaptophysin ist seit seiner Entdeckung 1985 (Bertram und Wiedemann, 1985; Jahn et al., 1985) relativ wenig bekannt geworden. Man weiß, dass es mit dem essentiellen synaptischen Protein Synaptobrevin einen Komplex bildet, der nur in Vesikelmembranen adulter Neurone vorkommt. Über diesen Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex reguliert Synaptophysin wahrscheinlich die Verfügbarkeit von Synaptobrevin zur Bildung des SNARE-Komplexes, da sich beide Komplexe gegenseitig ausschließen (Chapman et al., 1995; Mitter et al., 2003; Bonanomi et al., 2007; Siddiqui et al., 2007). Weiter ist es ein typischer Bestandteil der Vesikelmembran und spielt eine Rolle beim Anheften der Vesikel an die Plasmamembran (Brake et al., 2001; Tarsa und Goda, 2002). Darüber hinaus zeigten Studien mit Synaptophysin-KO-Mäusen normale Entwicklung und Funktionen (McMahon et al., 1996). Lediglich Verhaltensänderungen konnten festgestellt werden. So zeigten die Synaptophysin defizienten Mäuse ein erhöhtes exploratives Verhalten sowie geringere Objekterkennung und geringeres Orientierungslernen (*spatial learning*) (Schmitt et al., 2009b; Schmitt et al., 2009b). Weiter zeigten genetische Screenings bei Menschen und weitere Verhaltensexperimente mit Mäusen, dass der Verlust von Synaptophysin oder dessen Trunkierung mit mentaler Retardierung und oder Lerndefiziten in Verbindung steht (Schmitt et al., 2009a; Tarpey et al., 2009). Aufgrund seines spezifischen Vorkommens in der Präsynapse wird Synaptophysin als Marker-Protein für diese verwendet.

1.5. Aromatase-vermittelter Einfluss von 17 β -Estradiol auf Neurone und synaptische Plastizität

1.5.1. Die Aromatase

Die Aromatase (CYP19A1) ist das Schlüsselenzym in der Synthese von Estrogen und ist ein Mitglied der Cytochrome P450 Superfamilie. Aromatase katalysiert die Umwandlung des ungesättigten A-Ringes des androgenen C19-Sexualsteroidhormons in einen gesättigten aromatischen Ring. In drei Schritten katalysiert es die irreversible Umwandlung von Androgenen (C19), nämlich Androstendion und Testosteron zu Estrogenen (C18) - Estron, oder 17 β -Estradiol (siehe Abbildung 2) (Conley und Hinshelwood, 2001; Payne und Hales, 2004; Simpson et al., 2013).

Die Synthese verschiedener Estrogene scheint hierbei gewebespezifisch und von der Verfügbarkeit des jeweiligen Substrats abhängig zu sein. So wird zum Beispiel im Ovar Testosteron zu Estradiol und im Fettgewebe Androstenedion zu Estron aromatisiert (Osawa et al., 1987). Unter allen Vertebraten ist das Enzym hoch konserviert und ist hauptsächlich in der Membran des endoplasmatischen Reticulums lokalisiert, konnte jedoch auch in den prä- und postsynaptischen Endigungen nachgewiesen werden (Sanghera et al., 1991; Abdelgadir, 1994; Garcia-Segura et al., 1999; Wehrenberg et al., 2001; Naftolin und MacLusky, 1982). Aromatase wird, wie bereits erwähnt, in verschiedenen Geweben und Zellen exprimiert. Besonders in den Gonaden und hier in den Granulosazellen der Follikel kommt die Aromatase vor (McNatty et al., 1976). Jedoch ist sie auch im Fettgewebe (Mahendroo et al., 1993) Knochen (Nawata et al., 1995), Brustgewebe, Haut (Harada, 1992) und der Plazenta zu finden.

Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte haben dazu geführt, dass es mittlerweile allgemein anerkannt ist, dass Aromatase auch im Gehirn exprimiert wird und dass das Enzym hier funktional und aktiv ist (Naftolin und MacLusky, 1982; Naftolin et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2003).

Das Aromatase-codierende Gen CYP19 besteht aus 9 codierenden Exonen und einer Reihe verschiedener nicht-codierender erster Exone. Vom ersten Exon sind gewebespezifische Transkripte bekannt. Gewebeabhängige Transkriptionsfaktoren initiieren die Transkription von CYP19A1 an unterschiedlichen Promotoren und führen so zu der den jeweiligen Geweben spezifischen Expression. Die Verwendung

unterschiedlicher Promotoren beeinflusst nicht die Enzymstruktur, jedoch wird das Expressionslevel hierdurch gewebespezifisch reguliert (Simpson, 2004). So ist im Vergleich zur Plazenta die Aromataseaktivität im Gehirn relativ gering (Steckelbroeck et al., 1999). Der Promotor II steuert beispielsweise die Aromataseexpression im Ovar (Michael et al., 1995; Adams et al., 2001) wohingegen der Promotor 1f überwiegend die Expression im Gehirn steuert (Honda et al., 1994). Darüber hinaus regulieren Zytokine (z.B. IL-6 und IL-11), Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1) und Hormone (z.B. Androgene, Estrogene und FSH) die periphere Aromataseexpression auf genomischer Ebene (Simpson, 2004), was in Verbindung mit den verschiedenen Promotoren zu einer komplexen Regulation der Aromatase führt.

Die Aktivität der Aromatase wird über ihre Phosphorylierung gesteuert. Im phosphorylierten Zustand ist sie inaktiv, dephosphoryliert aktiv. Ihre Inaktivierung wird durch ATP, Calcium und Magnesium positiv unterstützt, wobei Calcium sowie die Proteinkinase A (PKA) und C (PKC) hierbei maßgeblich sind (Balthazart et al., 2001; Balthazart, 2005). Auf diesem Wege können auch Neurotransmitter durch die Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels, über den NMDA-Rezeptor zur Phosphorylierung und somit zur Inaktivierung beitragen.

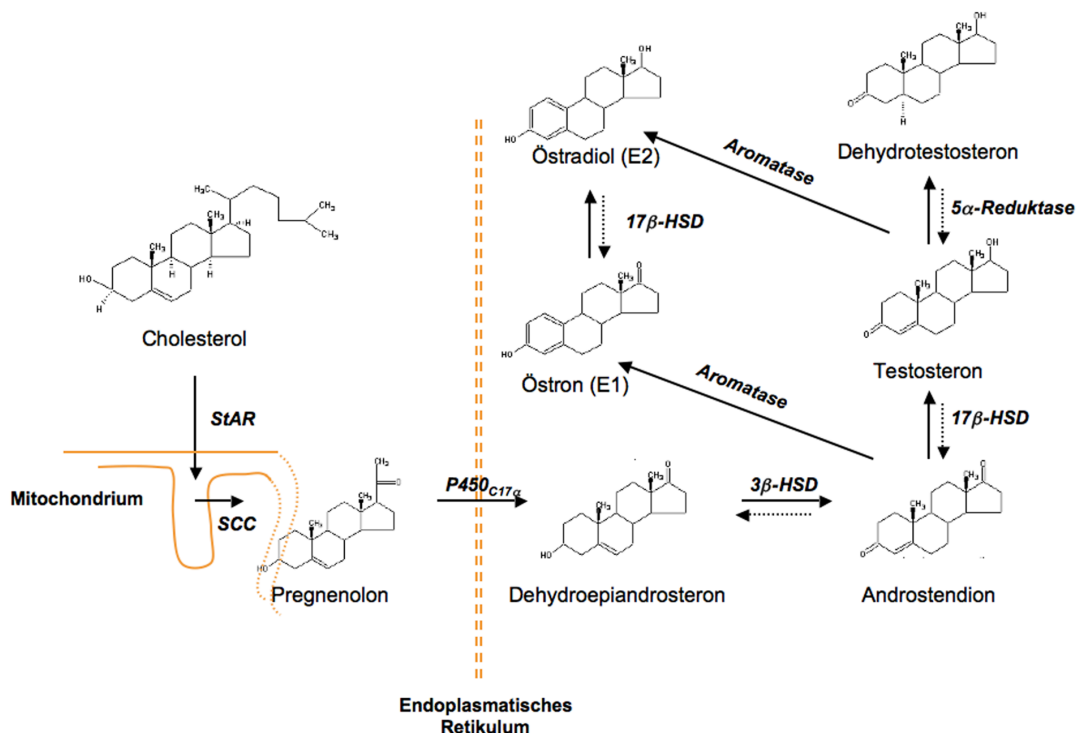


Abbildung 2: Biosyntheseweg der Estrogene. Die Abbildung zeigt den Biosyntheseweg der Estrogene ausgehend von Cholesterin. Der erste Schritt in der Umwandlung findet im Mitochondrium statt und wird durch StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) katalysiert. Anschließend finden die weiteren Schritte im Endoplasmatischen Retikulum statt. (Fester et al., 2007, Neuroforum 04/07)

1.5.2. Aromatase-vermittelter Einfluss von Estradiol auf synaptische Plastizität

Wie bereits erwähnt, ist die Aromatase auch im Gehirn zu finden. Naftolin war der erste, der eine Aromataseaktivität im Hypothalamus und auch im limbischen System beschrieb (Naftolin et al., 1971b; 1971a). Weiter wurde gezeigt, dass durch Aromatase lokal gebildetes 17β -Estradiol auf parakrine und autokrine Weise neuroendokrine Prozesse beeinflusst (Prange-Kiel et al., 2003). Differenzierungsprozesse verschiedener Hirnregionen während der Embryogenese werden geschlechtsspezifisch über die lokale Estrogenkonzentration, welche durch die Aromatase reguliert ist, vermittelt (Lephart, 1996). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Architektur einiger limbischer und hypothalamischer Hirnregionen sind wohlmöglich an der geschlechtsspezifischen Ausprägung des Sexualverhaltens beteiligt (Roselli, 2007). Auch während des adulten Lebensabschnitts kontrolliert die Aromataseaktivität die lokalen Estrogenlevel in Gehirnregionen, die mit der Reproduktion in Verbindung stehen (Naftolin, 1994; Lephart, 1996) Hutchinson, 1991; MacLusky und Naftolin 1981). Darüber hinaus brachte Fink et al. (1999) die Aromataseaktivität mit Veränderungen der Stimmung und Empfindlichkeit in Verbindung.

Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 17β -Estradiol einen modulierenden Effekt auf Spinesynapsen im Hippocampus hat. So führt eine Reduktion des 17β -Estradiolspiegels, sei es durch Schwankungen während des Zyklus, Ovariectomie oder Administration von potenten Aromataseinhibitoren zu einer Reduktion der Spinesynapsen-Anzahl sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Woolley und McEwen, 1993; Woolley et al., 1990; Zhou et al., 2010b; Fester et al., 2012b; Prange-Kiel et al., 2008; Fester et al., 2006). Diese Effekte ließen sich durch die Administration von 17β -Estradiol aufheben. Unterstützt wird dies durch das Ergebnis, dass die lokale Aromatisierung von Testosteron zu Estradiol im Gehirn von Singvögeln zu verbesserten Funktion des Hippocampus einhergehend mit Verbesserungen des räumlichen Gedächtnis (*spatial memory*) führt (Oberlander et al., 2004).

Ein Vorkommen der Aromatase im Hippocampus konnte schon früher sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene gezeigt werden (Wehrenberg und Prange-Kiel, 2001). Weiter wurde nachgewiesen, dass hippocampale Schnitt- und Dispersionskulturen 17β -Estradiol *de novo* synthetisieren (Hojo, 2004; Fester et al., 2009a; Prange-Kiel et al., 2003). Neben einem Einfluss auf dendritische Spines konnte auch ein Einfluss von 17β -Estradiol auf das Wachstum von Axonen

nachgewiesen werden (Schassen et al., 2006). Kretz und Kollegen zeigten, dass endogenes, im Hippocampus synthetisiertes und parakrin wirkendes 17β -Estradiol und nicht das Serum- 17β -Estradiol für das Aufrechterhalten der Spinesynapsen wichtig ist. Weiter zeigte er, dass die Inhibition der Aromataseaktivität in hippocampalen Schnittkulturen durch potente Aromataseinhibitoren neben einem Rückgang der Synapsenanzahl auch zu einem Rückgang in der Expression der prä- und postsynaptischen Proteine Synaptophysin und Spinophilin führte (Kretz et al., 2004).

Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die lokale Estrogensynthese ein endogener Regulator für synaptische Plastizität ist.

Estrogene zeigen auch einen Einfluss auf Messungen der Langzeitpotenzierung (LTP) (Warren et al., 1995), welche auf eine Interaktion von 17β -Estradiol mit dem NMDA-Rezeptor zurückgeführt wird, die eine Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat (Smith et al., 2009). Estrogene bewirken weiter eine durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A erhöhte Phosphorylierung von CREB (*cAMP response element binding protein*), welche in der Folge zu einer Erhöhung der Spinesynapsen Dichte führt (Murphy und Segal, 1997). Wahrscheinlich führt die Aktivierung von CREB zur transkriptionellen Regulation der an der Bildung von dendritischen Spines beteiligten Proteine. Auch ein Einfluss von 17β -Estradiol auf BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) wird bei der Bildung von dendritischen Spines erwähnt (Murphy et al., 1998).

Ein weiterer Ansatz, der die Veränderungen der Synapsenanzahl durch Estrogene zu erklären versucht, berichtet von einer Estrogen vermittelten Disinhibition der Neurone über eine Inhibition der GABA Synthese bzw. durch eine verminderte Ausschüttung von GABA an individuellen Synapsen. Dazu passt, dass 17β -Estradiol zu einer Verminderung von bereitstehenden synaptischen Vesikeln an inhibierenden Synapsen führt (Ledoux et al., 2009).

Im Gegensatz zu den an weiblichen Schnittkulturen gemachten Beobachtungen führt die Applikation von 17β -Estradiol in Schnittkulturen von Männchen zu einer raschen Verstärkung des LTD (*long time depression*) im Hippocampus (Administrator et al., 2007). Daher könnte 17β -Estradiol in den Hippocampi von männlichen Ratten zu einer anderen Regulation der synaptischen Plastizität beitragen als hormonelles Estradiol in Weibchen.

17β -Estradiol vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über die Aktivierung der nukleären Steroid-Rezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ (Estrogen Rezeptor α , β). Diese

Rezeptoren bilden nach ihrer Aktivierung Dimere, welche dann über Estrogen-Rezeptor responsive Elemente (EREs = Estrogen Receptor Response Element) an die DNA binden und hier als Transkriptionsfaktor wirken (Klinge, 2001.). Darüber hinaus kann 17 β -Estradiol seine Wirkung auf Spines und Gedächtnisprozesse auch schnell über nicht-genomische, membranassoziierte Mechanismen ausüben (Luine und Frankfurt, 2012). Die Aktivität der Gehirnaromatase kann zudem schnell – innerhalb von Minuten- über afferent synaptische Eingänge verändert werden (Cornil et al., 2006b; 2006a; Naftolin et al., 1996; Cornil et al., 2006a). Die Rolle (Heldring et al., 2007) der Aromatase als ein Modulator der Neuralen Informationsverarbeitung hat auch Auswirkungen auf das Verhalten. So kommt es binnen Minuten nach Veränderung des Estrogen-Levels im Gehirn zu Veränderungen des Sexualverhaltens (Cornil et al., 2006; Balthazart, 2006). Folgender Ablauf ist daher denkbar: Synaptische Aktivität reguliert schnell die Aromataseaktivität (z.B. calciumvermittelt) und damit die lokale 17 β -Estradiolsynthese, welche sich ihrerseits auf die synaptischen Funktionen und das Verhalten auswirkt.

Auch die in den präsynaptischen Endigungen lokalisierte Aromatase vermag durch die 17 β -Estradiolsynthese auf synaptische Vesikel, die Estrogen Rezeptoren exprimieren, Einfluss zu nehmen. Darüber könnte die Freisetzung der Neurotransmitter reguliert und Einfluss auf die synaptische Plastizität genommen werden (Woolley, 2007; Heldring et al., 2007).

Aus den vorstehenden Ausführungen wird deutlich, dass die lokale Estrogensynthese durch die Aromatase an verschiedensten Stellen Einfluss auf die physiologischen und morphologischen Eigenschaften der Neurone und ihrer Synapsen nehmen kann. Die Rolle des 17 β -Estradiol hierbei genauer zu untersuchen, kann daher neue Erkenntnisse hervorbringen, die uns helfen die komplexen grundlegenden Abläufe für Lernen und Gedächtnis besser zu verstehen.

1.6. Aromataseinhibitoren

Estrogene stellen für gut 75 % aller Mammakarzinome (MC) einen wichtigen Wachstumsfaktor dar (Miller et al., 1982). Diese Tumore werden auch als Estrogen-Rezeptor- (ER) positiv bezeichnet. In prämenopausalen Frauen sind die Ovarien und in postmenopausalen Frauen das Fettgewebe die größte Estrogen-Quelle. Forschungen zeigten jedoch, dass auch die Tumorzellen selber zur Estrogensynthese (intratumorale Estrogensynthese) fähig sind.

In der Behandlung von Mammakarzinomen stellt die Hemmung des Estrogeneinflusses auf die Karzinomzellen die Grundlage der begleitenden Hormontherapie dar. Zur diesem Zweck finden seit Jahrzehnten Aromataseinhibitoren (auch Aromatasehemmer genannt) ihren Einsatz in der adjuvanten Therapie von Mammakarzinomen und wurden mit der Zeit fortwährend weiterentwickelt. Momentan kommen überwiegend Aromataseinhibitoren der dritten Generation zum Einsatz.

Generell unterscheidet man Aromataseinhibitoren in zwei Klassen. Zum einen gibt es die steroidal Inhibitoren (Typ I), die als Substratanaloga in Konkurrenz mit Androstendion um die Bindungsstelle im Aromataseenzym stehen. Zu ihnen gehört beispielsweise Formestan. Zum anderen gibt es die nicht-steroidalen Aromataseinhibitoren (Typ II), welche kompetitiv an die Häm-Gruppe der Cytochrom-P₄₅₀- Untereinheit des Aromataseenzym binden. Weiter unterscheidet man die Aromataseinhibitoren hinsichtlich ihrer Selektivität. Selektiv bedeutet in diesem Zusammenhang, dass durch den Inhibitor kein anderes Enzym der Steroidbiosynthese beeinflusst wird. So ist Aminoglutethimid beispielsweise ein nichtselektiver Aromataseinhibitor vom Typ II und Fadrozol ein nicht vollständig selektiver Inhibitor (Typ II) hinsichtlich der Mineralokortikoidsynthese. Letrozol (Femara®) und Anastrozol (Arimidex®) sind hochselektiver Aromataseinhibitoren der dritten Generation vom Typ II und kommen in der Therapie überwiegend zum Einsatz.

Wichtig für die Therapie des Mammakarzinoms ist weiter, dass die Aromataseinhibitoren nicht nur die sog. periphere Estrogensynthese im Fettgewebe von postmenopausalen Frauen, sondern auch die intratumorale Estrogensynthese hemmen können. Für die Behandlung von prämenopausalen Frauen sind die Aromataseinhibitoren ohne den Einsatz weiterer Therapeutika nicht anwendbar. Zum einen konkurrieren die hohen Androstendion-Spiegel als Substrat um den Enzymkomplex und führen so nur zu einer schwächeren Hemmung. Zum anderen führt die Estrogenunterdrückung zu einem reflexartigen Anstieg des Gonadotrophins, was in der Folge zu einem starken Anstieg der Aromatase im Ovar führt und so die initiale Hemmung mindestens aufhebt. Daher wird in der begleitenden Hormontherapie bei prämenopausalen Frauen der selektive Estrogen-Rezeptor Modulator (SERM) Tamoxifen eingesetzt, der im Brustgewebe als Antagonist wirkt, an anderen Stellen jedoch auch als Agonist wirken kann.

Die Aromataseinhibitoren der dritten Generation (Letrozol und Anastrozol) wurden in einer Reihe von Studien (ATAC: Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination; BIG 1-98: Breast International Group) hinsichtlich ihrer Wirkung und Nebenwirkungen

untersucht und hierbei meist mit dem weit verbreitet genutztem Tamoxifen (zur Klasse der SERM gehörend) verglichen. Ein direkter Vergleich von Letrozol und Anastrozol innerhalb einer Studie blieb hierbei jedoch weitgehend aus und auch ein Vergleich der Einzelstudien ist nur schwer möglich, da sich die Studien meist in ihrem Design zu sehr unterschieden. Es ist daher sowohl für die Anwendung in der Klinik als Medikament als auch in der Estrogen bezogenen Hirnforschung von Interesse zu wissen, ob und wenn ja welche Unterschiede zwischen den Verschiedenen Inhibitoren im Bezug auf ihren Einfluss auf Neurone bestehen.

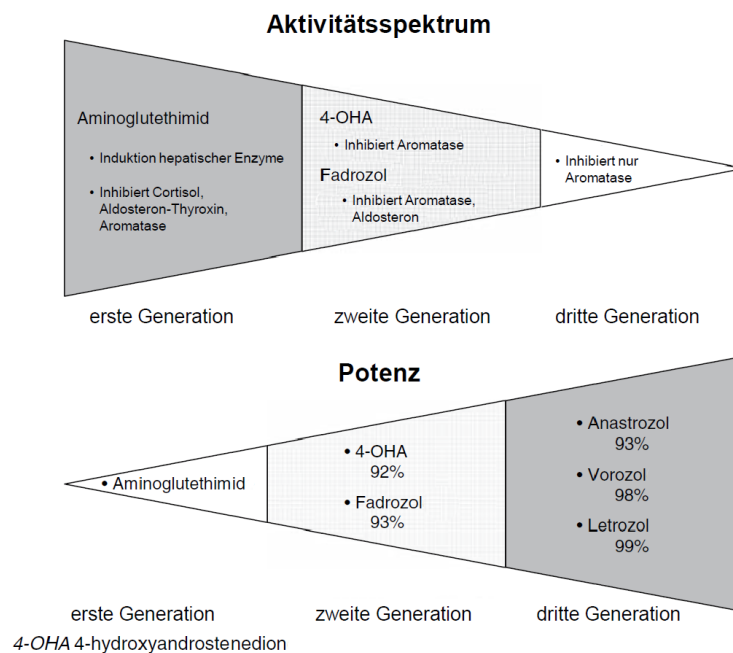


Abbildung 3. Die Entwicklung der Aromataseinhibitoren hat Reagenzien mit hoher Spezifität und Potenz hervorgebracht. Gezeigt ist das Wirkspektrum von Aromataseinhibitoren der ersten bis dritten Generation. Inhibitoren der dritten Generation wirken ausschließlich auf das Aromataseenzym. Die Potenz der Aromataseinhibitoren bezieht sich auf die Inhibition der Aromatase im gesamten Körper. 4-OHA: 4-hydroxyandrostenoion. Abbildung verändert nach (Santen und Harvey, 1999).

1.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Estrogene werden nicht nur in den Gonaden, sondern auch lokal im Gehirn synthetisiert und spielen bei verschiedenen neuronalen Prozessen eine wichtige Rolle. Ihr Einfluss auf Strukturen und physiologische Prozesse, die als Grundlage für Lernen und Gedächtnis angesehen werden, ist in der Literatur beschrieben. Eine differenzierte Betrachtung des Einflusses von gonadaler und hippocampaler Estrogensynthese auf die Bewältigung von Lernparadigmen *in vivo* stellt daher einen weiteren Schritt zur Aufklärung wichtiger Faktoren bei kognitiven Prozessen dar. Zu diesem Zweck sollten konditionale-Aromatase-*Knockout*-Mäuse, Aromatase-komplett-*Knockout*-Mäuse und wildtypische Mäuse im Hinblick auf Lernen und Gedächtnis charakterisiert und verglichen werden. Die Ursachen für eventuell auftretende Unterschiede zwischen den verschiedenen Maustypen sollten auf Ebene des Gehirns (speziell des Hippocampus) morphologisch und molekular untersucht und mit Ergebnissen aus *in vitro* Untersuchungen verglichen werden. Hierzu sollen verschiedene Methoden der RNA-Interferenz in Zellkulturmodellen herangezogen werden.

Da die Estrogensynthese im Gehirn an wichtigen grundlegenden Prozessen beteiligt ist, ist es von Interesse zu erfahren, welche Effekte verschiedene, in der Behandlung von Brustkrebs eingesetzte, Aromataseinhibitoren auf Neurone haben. Da bisher ein direkter Vergleich dieser verschiedenen Aromataseinhibitoren in neuronalen Modellsystemen ausgeblieben ist, sollen hier ihr Estrogen-reduzierender Wirkungsgrad und ihr Einfluss auf synaptische Strukturen verglichen werden. Dissoziierte hippocampale Neurone und hippocampale Schnittkulturen sollen hierzu mit den Aromataseinhibitoren Letrozol, Anastrozol und Fadrozol behandelt werden und anschließend hinsichtlich ihrer Wirkung auf die 17β -Estradiolsynthese, die Synapsendichte, sowie prä- und postsynaptische Proteine untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erlauben eine verbesserte Evaluation der Aromataseinhibitoren beim Einsatz zur Aufklärung estradiolbeeinflusster Mechanismen im Gehirn. Darüber hinaus lassen sich möglicherweise Empfehlungen für den Einsatz der Aromataseinhibitoren in der Brustkrebstherapie ableiten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Arbeitsmaterialien

Materialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Millipore (Schwalbach), Nunc (Wiesbaden), Sarstedt (Nürnbrecht), BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA) und Greiner (Solingen) bezogen. Für die Zellkultur kamen Glasdeckplättchen von den Firmen Assistent (Sondheim) und Marienfeld (Lauda-Königshofen) zur Verwendung.

Plastikwaren, für molekularbiologische und biochemische Arbeiten, wurden zusätzlich zu den bereits genannten Firmen von Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.1.2. Chemikalien und Enzyme

Genutzte Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern mit einem Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder in höchstmöglicher Reinheit bezogen: Sigma Aldrich (Taufkirchen), AppliChem (Darmstadt), Roche (Mannheim), VWR (Darmstadt), Fermentas (St. Leon-Roth), Thermo Scientific (Waltham, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), Merk (Darmstadt), J.T. Baker Chemicals (PA, USA) und Tocris bioscience (Bristol, UK). Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen. T4-DNA-Ligase und Turbo-DNase stammen von Ambion (Carlsbad, USA).

2.1.3. Kits zur Isolierung und Reinigung von RNA und DNA

RNA-Extraktion:	RNeasy Mini Kit, Qiagen (Venlo, Niederlande)
DNA-Aufreinigung:	QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen (Venlo, Niederlande) QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen (Venlo, Niederlande)
Plasmid- Präparation:	GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) QIAGEN HiSpeed Plasmid Midi Kit, Qiagen (Venlo, NL) QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit, Qiagen (Venlo, NL) Nucleo Bond®PC100, Macherey&Nagel (Düren)

2.1.4. Größen-Standards

DNA Standard:	1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen (Carlsbad, USA) 12.000, 11.000, 10.000, 9.000, 8.000, 7.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.650, 1.000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp
Protein Standard:	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa

2.1.5. Geräte

Agarose-Gelelektrophoresesystem:	Sub-Cell GT, BioRad (München)
Binokular:	Stemi SV11, Zeiss, Jena)
Chemilumineszenzkamera:	Fusion SL2, Vilber Lourmat (Eberhardzell)
CO ₂ -Inkubatoren:	Heraeus Function Line Heraeus (Hanau) CB Binder (Tuttlingen)
Digitale Kamera:	AxioCam HRc, Zeiss (Jena)
Elektronenmikroskop:	CM 100, Philips, PW 602
Elektrophoresesystem:	Mini-Protean II BioRad, München
Gelkammer für Elektrophorese:	SubCell GT , Bio-RAD (München)
Geldokumentationsanlage:	Bioprint M1, Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Inkubatoren:	Memmert (Schwabach) Melag Brutschrank Typ A (Melag, Berlin)
Kryostat:	Microm HM560, Microm (Walldorf)
Mikroskope:	Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2, Zeiss (Jena) Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, LSM Axiovert 100 Microsystem, Zeiss (Jena) Lichtmikroskop Axiovert 25 Zeiss (Jena) Fluoreszenzmikroskop BZ-9000, Keyence (Mechelen, BE)

PCR-Zyler:	7900 HT, Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems Darmstadt, Mastercycler gradient, Eppendorf (Hamburg) T personal, Biometra (Göttingen)
Photometer:	Bio Photometer, Eppendorf (Hamburg) Ultrospec 3000 UV/Vis Photometer, Pharmacia Biotech (Cambridge, UK)
Netzteil:	Electrophoresis Power Supply EPS 3501XL, Amersham (Uppsala, S) Electrophoresis constant Power Supply ECPS 3000/150, Pharmacia Biotech (Cambridge, UK)
Rotatoren:	MacsMix Tube Rotator, Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach) Stuart Rotator SB3, Bibby Scientific (Staffordshire, UK)
Schüttelinkubator:	TH 30, Edmund Bühler (Tübingen)
Sterile Werkbank:	Hera Safe, Heraeus (Hanau)
Thermocycler:	Mastercycler gradient, Eppendorf (Hamburg) T personal, Biometra (Göttingen)
Thermomixer:	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot SD:	SemiDry Transfer Cell, BioRad (München)
Vortex:	Vortex Genie2; Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waagen:	Mettler PN 1210, Mettler-Toledo (Gießen) Analysenwaage Sartorius AG (Göttingen)
Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5417Rm Eppendorf (Hamburg) Heraeus Minifuge GL, Heraeus (Hanau) Universal 32R Hettich Zentrifuge, Hettich, (Tuttlingen)

2.1.6. Software

AxioVision 3.1	Zeiss (Jena)
Bio CAPT	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Excel 2003/2007	Microsoft (Redmond, USA)
IBM SPSS Statistics 20.0	IBM (Ehningen)
Fusion CAPT	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
	ImageJ Version 1.460 Wayne Rasband, National Institutes of Health (USA)
Papers 1.5	Scimatic Software for Mekentosj (Dordrecht, NL)
Photoshop CS3 Extended	Adobe Systems GmbH (München)
SDS 2.4.1	Applied Biosystems -2009 (Waltham, US)
Serial Cloner 2.6.1	serialbasics
Word 2003/2007	Microsoft (Redmond, USA)
ZEN 2011	Zeiss (Jena)

2.1.7. Versuchstiere

Es wurden Wildtyp-Ratten vom Stamm Wistar sowie Mäuse vom Stamm C57Bl/6J und Aromatase-Knockout-Mäuse aus der Zentralen Versuchstierhaltung des Universitäts-Klinikums Eppendorf bezogen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung und wurden in einem konstanten Tag-Nacht-Zyklus gehalten.

2.1.8. Zelllinien

Neuro-2A (N-2a)	murine NeuroblastomZelllinie
HT22	immortalisierte murine hippocampale neuronale Zelllinie

2.1.9. Bakterienstämme

XL 1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac^fZΔM15TN10(Tet^r)]</i>
Top10	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ-</i>

2.1.10. Medien, Puffer und Lösungen

0,07 % Ethidiumbromidlösung [0,7 mg/ml] –Genaxxon bioscience –Ulm

Aufschlusspuffer:

TBS

TX 100: 1,2 %

Proteaseinhibitor (800 µl einer 25x Roche Tablette)

EDTA: 5 mM

H₂O ad 20 ml

Blockierungslösung (Immunzytochemie)

FCS: 5 % (v/v)

Thimerosal: 0,02 % (v/v)

In 1x PBS oder 1x TBS

Blockierungslösung (Immundetektion)

5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS oder 1x TBS

D-MEM/F-12 complete (Zellkultur)

D-MEM/F-12 (1:1, w/o L-Glu): 500 ml

FCS: 10 % (v/v)

L-Glutamin: 2 mM

Pyruvat: 25 µg/ml

Penizillin/Streptomycin (PS): 50000 Units

6x DNA-Ladepuffer

Ficoll: 7,5 g

Bromophenolblau: 0,125 g

ad 50 ml H₂O (Aliquots wurden bei –20 °C gelagert)

Elektrophoresepuffer:

Tris-Base: 25 mM

Glycin: 192 mM

SDS: 0,1 %

pH: 7,4

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar (autoklaviert) Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50 °C wurde zur Selektion resistenter Bakterien Antibiotika supplementiert: Ampizillin (100 µg/ml), Kanamyzin (50 µg/ml)

LB-Medium

Trypton: 10 g

Hefeextrakt: 5 g

NaCl: 5 g

ad 1000 ml H₂O,

pH: 7,5

autoklaviert

5x Laemmli Probenpuffer: (Endvolumen 20ml)

DTT: 0.5M

SDS: 10 %

1M Tris-HCl, pH 6,8: 0.4M

30 min. lösen und anschließend mit Glycerin auf 20 ml auffüllen.

10x Laemmli-Laufpuffer:

Tris-Base: 0,4 M

Glycin: 2 M

SDS: 1 %

Ad 1000 ml mit H₂O

Neurobasalmedium (NBA)

500 ml Neurobasalmedium (Invitrogen, Carlsbad, USA);

L-Glutamin: 2 mM

Pyruvat: 25 µg/ml

Penizillin/Streptomyzin (P/S): 50000 Units

B27: 1 % (v/v)

4 % Paraformaldehydlösung

40 g Paraformaldehyd

Ad 1000 ml PBS

pH: 7,2

PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl: 140 mM

Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Dihydrat: 10 mM

KCl: 2,7 mM

Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat: 1,8 mM

pH: 7,4

RIPA-Puffer:

NaCl: 150 mM

Tris-HCl (pH 7,5): 50 mM

NP 40 Alternative: 1 %

SDS: 0,1 %

NaDeoxycholat: 0,5 %

EDTA: 5 mM

Complete Protease-Inhibitoren-Mix

SDS-Laufpuffer (10x)

Tris-HCl: 250 mM

Glyzin: 2,5 M

SDS: 1 % (w/v)

ad 1000 ml H₂O

pH: 8,3

Semi-Dry Blotpuffer

Tris: 25 mM

Glycin: 150 mM

Methanol. 10 % (v/v)

TE-Puffer

Tris-HCl: 10 mM

EDTA: 1 mM

ph: 8,0

TBS (Tris-Buffered Saline)

Tris-Cl: 50 mM

NaCl: 150 mM

pH: 7,4

2.1.11. Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Art, Organismus	Verdünnung	Inkubationszeit und Temperatur	Referenz
anti-Synaptophysin SY38	Monoklonal, Maus	1:1000	4°C ÜN	Millipore (Darmstadt)
anti-Synaptopodin	Polyklonal, Kaninchen	1:400	4°C ÜN	Synaptic Systems (Göttingen)
anti-MAP2 HM-2	Monoklonal, Maus	1:1000	4°C ÜN	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
anti-MAP2	Polyklonal, Kaninchen	1:1000	4°C UN	Millipore/ Chemicon (Darmstadt)
anti-Aromatase (Madr.)	Polyklonal, Kaninchen	1:400	4°C ÜN	Acris (Herford)
anti-GFP	Monoklonal, Maus	1:500	1,5 h RT	Millipore (Darmstadt)
anti- α -Tubulin	Monoklonal, Maus	1:10 000	1,5 h RT	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
anti-GFP	Polyklonal, Kaninchen	1:500	1,5 h RT	Abcam (Cambridge, UK)

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Art, Organismus	Verdünnung	Inkubationszeit und Temperatur	Referenz
α-Maus-Alexa 488	Huhn	1:500	2 h RT	Molecular Probes (Darmstadt)
α-Kaninchen-Alexa 488	Huhn	1:500	2 h RT	Molecular Probes (Darmstadt)
α-Kaninchen-Cy3	Ziege	1:350	2 h RT	Jackson Immuno Research (Suffolk, UK)
α-Maus-Cy3	Ziege	1:350	2 h RT	Jackson Immuno Research (Suffolk, UK)
α-Maus-HRP	Esel	1:2500	2 h RT	Jackson Immuno Research (Suffolk, UK)
α-Kaninchen-HRP	Meerschwein	1:2500	2 h RT	Jackson Immuno Research (Suffolk, UK)

2.1.12. Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammenfassung aller verwendeter Vektoren

Name	Herstellung/Herkunft	Verwendung
pCGLH	Chen, Yale University	shRNA
pcDNA 3.1(-)	Invitrogen	Aromatase-Expressionsvektor
pcDNA3.1(+)	Invitrogen	Aromatase-Expressionsvektor
pJET 1.2	Thermoscientific	Klonierungen

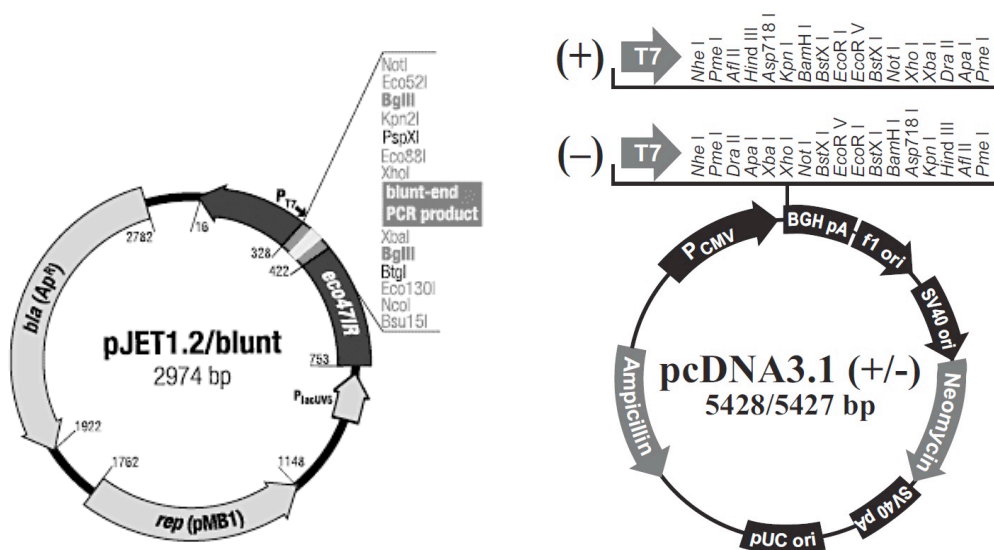


Abbildung 4: Vektorkarten; pCGLH-Vektor (Chen et al., 2005) , pJET1.2-Vektor (Thermo Scientific, Waltham, USA), pcDNA3.1 (+/-)-Vektor (Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.1.13. Oligonukleotide

Folgende unmodifizierte Oligonukleotide wurden für PCR und Sequenzierung bei der Firma eurofins MWG (Ebersberg) in HPSF-Qualität (high purity salt free) bezogen:

Tabelle 4: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Name	5'-3'-Sequenz	Verwendung
1-AroKO-f	CTTAGAACATGGCTGACACATTCATCC	Genotypisierung
2-AroKO-r1	GCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAATG	Genotypisierung
3-AroKO-r2	CATTCAATGCTTGAGGCTATTTGATAG	Genotypisierung
CamKII – Cre fwd.	ATGCGCTGGGCTCTATGGCTTCTG	Genotypisierung
CamKII – Cre rev.	TGCACACCTCCCTCTGCATGCACG	Genotypisierung
Aro_Ex2-3_f	CCTCAAGCATGTTCCATGTC	Aro-Ex-Herstellung
Aro_Ex2-3_rev	AAAGGCTCGGGTTGTTGTTA	Aro-Ex-Herstellung
AroEx3-4 f	CCGAGCCTTTGGAGAACAATTCGC	Aro-Ex-Herstellung
AroEx3-4 rev	AGCCGGTCCAAATGCTGCTTG	Aro-Ex-Herstellung
Aro711-f	CACCTCTAACATGCTCTTCCT	Aro-Ex-Herstellung
Aro950-rev	TCCATACAGTCTTCCAGTTTCTC	Aro-Ex-Herstellung
HPRT mouse S	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG	Expressionskontrolle
HPRT mouse AS	CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT	Expressionskontrolle
GAPDH mouse f	TGACGTGCCGCCTGGAGAAA	Expressionskontrolle
GAPDH mouse rev	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG	Expressionskontrolle
GAPDH rat f	TGCCACTCAGAAGACTGTGG	Expressionskontrolle
GAPDH rat rev	TTCAGCTCTGGGATGACCTT	Expressionskontrolle

Tabelle 5: Liste der verwendeten TaqMan-Sonden von life technologies (Darmstadt)

Gen	Spezies	AsseyID	Katalog #
Aromatase (Cyp19a1)	Ratte	Rn01422546_m1	4331182
Hprt1	Ratte	Rn01527840_m1	4331182
Cyclophilin B/ peptidylprolyl isomerase B (CyPB)	Ratte	Rn03302274_m1	4331182
Aromatase (Cyp19a1)	Maus	Mm00484049_m1	4331182
Hprt1	Maus	Mn00446968_m1	4453320

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Transformation von *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA werden die *E. coli* –Stämme XL1-Blue und Top10 transformiert. Die Transformation wird nach der Hitzeschockmethode (Hofgen und Willmitzer, 1988) mit 100 µl chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen durchgeführt. Hierzu werden 50 ng Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgt ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min. Die Zellen werden dann mit 900 µl LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt und hinterher bei 15000 x g für 30 sec zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend werden 70 µl und 30 µl der Suspension auf entsprechende Antibiotikum-enhaltende LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten werden dann über Nacht bei 37 °C oder für 42 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2. Plasmid-DNA Isolation

Für die Transfektion von eukaryotische Zellen wird Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad eingesetzt. Hierzu wird die Plasmid DNA mit Hilfe eines Kits von Macherey-Nagel aufgereinigt. Der Aufschluss erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie. Die Anzucht und Lyse der Bakterien sowie die Präparation der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers ("Nucleo Bond[®]PC100", Macherey-Nagel, Düren).

Für endotoxinfreie DNA für die transiente Transfektionen von Säugerzellen, im Besonderen primäre hippocampale Neurone, wird Plasmid-DNA mit Hilfe des „EndoFree-Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Venlo) aufgereinigt.

2.2.3. Anlegen von Glycerolkulturen

Um Dauerkulturen anzulegen werden 100 µl einer Bakterienübernachtskultur bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ 0,5–1,0 angezogen. 600 µl dieser Bakteriensuspension werden mit 600 µl 100 %igem Glycerol versetzt und bei –80 °C über längere Zeit gelagert.

2.2.4. DNA Konzentrationsbestimmung

Die quantitative und qualitative Überprüfung von DNA in wässriger Lösung erfolgte einerseits photometrisch mittels eines Ultrospec 3000 Photometers (Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) basierend auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und andererseits durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese und einem Intensitätsvergleich der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente mit dem Größenmarker 1Kb+ (Fermentas). Durch Berechnung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} wurde die Qualität bestimmt. Reine DNA-Lösung weist einen Quotienten von 1,8 auf.

2.2.5. DNA Fällung

Will man die DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung erhöhen, muss der DNA ihre Hydrathülle entzogen werden, damit die DNA ausfällt. Hierzu wird die Lösung mit dem 2,5-fachem Volumen Ethanol und 10 % (v/v) 3 M NaAc (ph: 5,5) versetzt. Anschließend wird das DNA-Präzipitat für 20 min bei 20000 x g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das DNA-Pellet wird dann mit dem einfachen Volumen 70 % Ethanol gewaschen und nach zweiminütiger Zentrifugation getrocknet. Abschließend wird die DNA in einer passenden Menge TE-Puffer aufgenommen

2.2.6. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für den Verdau von DNA wurden FastDigest[®] Restriktionsendonukleasen von Fermentas (Waltham, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.2.7. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation der mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektoren zu verhindern, wird die 5'-Phosphatgruppen der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt. Hierzu wird FastAP[®] von Fermentas (Waltham, USA) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.8. *Agarose-Gelelektrophorese*

PCR-Produkte sowie DNA-Fragmente werden in Ethidiumbromid enthaltendem, 1 bis 3 % igen (w/v) Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wird die Agarose in 0,5 x TAE aufgekocht und ein Tropfen Ethidiumbromidlösung (0,7 mg/ml) pro 50 ml Gel zugegeben. Als Laufpuffer wird ebenfalls 0,5 x TAE verwendet. Die DNA wird, sofern nicht im Reaktions-fertig-Mix enthalten, in DNA-Ladepuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 120 -140 V und wird unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größen und Mengenstandart wird 1Kb plus[®] und 100 bp[®] von Invitrogen (Darmstadt) verwendet.

2.2.9. *Aufreinigung von DNA-Fragmenten*

Um DNA-Fragmente, die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, aus dem Gel zu extrahieren, wird die entsprechenden Banden auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion wird dann mit dem QUIAEX II Gelextraction Kit von Qiagen den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Anschließend wird die DNA-Fragmente mit Anionenaustauschsäulen aufgereinigt.

2.2.10. *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Für die PCR wird der Genaxxon 2x RedTagMastermix und die jeweiligen Oligonukleotiden (MWG Eurofins) verwendet. Die eingesetzten DNA- und Oligonukleotid-Konzentrationen sowie die verschiedenen Programme der Temperaturzyklen waren folgende:

Tabelle 6: PCR-Programme

Programmname	Temperatur	Dauer	
Aro	Aktivierung	95°C	5 min
	Denaturierung	94°C	20 sec
	Primeranlagerung	58°C	45 sec
	Primerelongation	72°C	90 sec
	Finale Elongation	72°C	5 min
			35 Zyklen
CamKII-Cre	Aktivierung	96°C	2 min
	Denaturierung	95°C	15 sec
	Primeranlagerung	65°C	15 sec
	Primerelongation	72°C	30 sec
	Finale Elongation	72°C	10 min
			30 Zyklen
Aro-Ex	Aktivierung	95°C	5 min
	Denaturierung	94°C	20 sec
	Primeranlagerung	65°C	45 sec
	Primerelongation	72°C	45 sec
	Finale Elongation	72°C	10 min
			35 Zyklen

Tabelle 7: PCR-Ansätze**Ansatzname**

CamKII-Cre:	DNA	1 μ l
	H ₂ O	39,8 μ l
	Puffer (incl.MgCl) 10x	5 μ l
	10mM dNTPs	1 μ l
	Primer fw (10pmol)	2 μ l
	Primer rew (10pmol)	2 μ l
	Taq-Polymerase (5 Units/ μ l)	0,2 μ l
	Gesamtvolumen	50 μ l
Allgem. Genaxxon 2x	Template	10 pg-1 μ g
	Primer Mix1:10	2 μ l
	Genaxxon Master Mix 2x	10 μ l
	H ₂ O	5 μ l
	Gesamtvolumen	20 μ l

2.2.11. RNA-Isolierung

Zur RNA- Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, NL) verwendet und das Herstellerprotokoll wie im Folgenden beschrieben angepasst.

Zur Isolierung der RNA werden in der Regel Zellen aus zwei bis vier Wells einer 24 Well-Platte vereinigt. Hierzu werden insgesamt 600 μ l RLT-Puffer (Qiagen, Venlo, NL) mit 1 % β -Mercaptoethanol (v/v) in die Wells gegeben und durch wiederholtes Pipettieren die Zellen abgelöst. Anschließend wird die Suspension auf eine Qiasredder (Qiagen, Venlo, NL) Säule gegeben und für zwei Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Danach wird das gleiche Volumen 70 % EtOH zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Diese Lösung wird auf eine RNeasy-Säule (Qiagen, Venlo, NL) gegeben und für 15 sec bei 18000 x g zentrifugiert. Danach wird zweimal mit je 500 μ l RLT-Puffer gewaschen und im Anschluss die Säule durch einminütiges Zentrifugieren getrocknet. Anschließend wird zweimal mit je 40 μ l H₂O eluiert, wobei die Säulen vor dem Zentrifugieren für eine Minute bei RT inkubiert werden.

Um mögliche Verunreinigungen der isolierten RNA mit genomischer DNA zu beseitigen wird ein DNase-Verdau durchgeführt. Die RNA befindet sich in 90 µl Wasser zu dem 10 µl 10 x Turbo-DNase-Puffer und 3 Units Turbo DNase zugegeben werden. Nach vorsichtigem Mischen wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wird die RNA nochmals aufgereinigt. Hierzu werden 350 µl RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol (v/v) und 250 µl 100 % EtOH hinzugegeben und durch Pipettieren gemischt. Dieses Gemisch wird auf eine RNeasy-Säule gegeben und für 15 sec. Bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Die Säule wird dann in ein frisches Auffanggefäß gesteckt und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Vor dem abschließenden Eluieren mit zweimal 40 µl Wasser, wird die Säule zum Trocknen für zwei Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert. Zur Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der isolierten RNA wird diese mittels Photometer gemessen und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.2.12).

2.2.12. RNA Qualitäts- und Quantitätsbestimmung

Die quantitative und qualitative Überprüfung von RNA in wässriger Lösung erfolgte einerseits photometrisch mittels eines Ultrospec 3000 Photometers (Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) und zum anderen durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese. Intakte RNA weist hierbei zwei scharf abgegrenzte Banden, nämlich die 28s und 18s rRNA, auf. Die Bande der 28s rRNA sollte ungefähr doppelt so intensiv sein, wie die der 18s, da diese in einem Verhältnis von 2:1 vorkommen. Eine photometrisch bestimmte OD_{260} von 1 entspricht hierbei 40 µg/ml RNA. Durch die Berechnung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} wird die Qualität der RNA bestimmt.

2.2.13. cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Zur Synthese der komplementären DNA wird das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (Waltham, USA) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Zur Synthese wurden 2 µl RNA (siehe 2.2.11) eingesetzt und mit 4 µl *Reaktion-Mix* und 2 µl *Enzym-Mix* in 20 µl Gesamtvolumen gemischt und im Thermocycler dem vorgegebenen Inkubationsprogramm unterzogen. Jede RNA Probe wurde im

Doppelansatz in cDNA umgeschrieben. Parallel wird ein Ansatz ohne *Enzym-Mix* als Negativkontrolle hergestellt.

2.2.14. quantitative Real-Time-PCR (q-PCR)

Aufgrund der sehr geringen Expression des Aromatasegens in hippocampalen Neuronen wird die sehr sensitive Methode der TaqMan® Real-Time-PCR verwendet. TaqMan-Sonden bestehen aus einem kovalent an das 5'-Ende des Oligonukleotids gebundenem Fluorophor (z.B. FAM) und einem Quensher (Löscher; z.B. TAMRA) am 3'-Ende. Solange Fluorophor und Quensher zusammen vorliegen unterdrückt der Quensher das via FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) angeregte Signal des Fluorophors.

Die TaqMan-Sonden sind so gewählt, dass sie in einer Region der DNA binden, die durch die benutzten Primer amplifiziert wird. Sobald die Taq-Polymerase die Primer verlängert und somit den komplementären DNA-Strang synthetisiert, degradiert die 5'-3' Exonuclease-Aktivität der Polymerase die Sonde und trennt so Fluorophor und Quensher voneinander. Hierdurch kommt es zu einem detektierbaren Signal des Fluorophors. Die detektierbare Fluoreszenz ist hierbei direkt proportional zu freiem Fluorophor und der Menge an Template-DNA in der PCR. Jede cDNA-Probe wurde hierbei in Triplikaten mit einem ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (jetzt life Technologies) gemessen. Als interner Standard wurde das Gen *HPRT1* ausgewählt und die relative Expression des Zielgens mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt (siehe 2.2.15).

Die Messungen wurden in 20 μ l Gesamtvolumen durchgeführt, die aus 2 μ l cDNA, 1 μ l der 20 x konzentrierten genspezifischen TaqMan-Sonde sowie 10 μ l 10x TaqMan Universal Master mix II with UNG und 7 μ l Wasser bestanden. Das folgende Temperaturprofil wurde verwendet und der Schritte „Stage 3“ mit 45 Zyklen wiederholt.

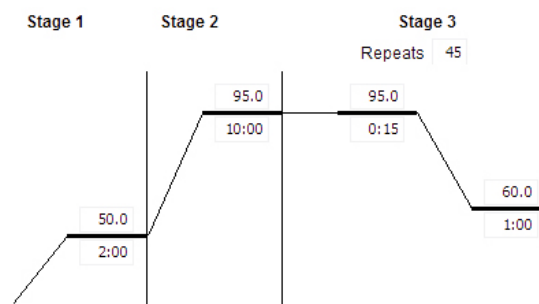


Abbildung 5: Temperaturprofil der Taq-Man real-time PCR

2.2.15. Analyse der Real-Time PCR

Zur Analyse der real-time PCR Ergebnisse wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode herangezogen. Hierzu wurde in der real-time PCR neben dem Zielgen auch ein Referenzgen (*HPRT1*) gemessen, dessen Expression unabhängig von den Experimentbedingungen konstant bleibt (Tan et al., 2012), um einen relativen Mengen-Vergleich zu ermöglichen. Folgende Formeln kommen hierbei zum Einsatz:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct}$$

Kontrolle

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Ct: Cycle threshold

2.2.16. Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe von Ligasen können DNA-Fragmente verbunden werden, da sie die Bildung von kovalenten Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Fragmenten katalysieren. Die Ligation von Restriktionsfragmenten erfolgte unter Verwendung von DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (Fermentas). Die T4-Ligase benutzt als Cofaktor ATP, das bereits im Reaktionspuffer enthalten ist. Die Ligationen werden in einem Volumen von 20 μl angesetzt, Vektor und Insert liegen dabei in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:3 vor (Crouse et al., 1983). Es werden 2 μl des Ligationspuffers (10x Stock) und 0,2 μl T4-Ligase (5 Units/ μl) eingesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 16 °C oder für ca. 4 h bei RT. Für eine Transformation in Bakterien (siehe Abschnitt 2.2.1) wird dieser Ansatz ohne weitere Behandlung eingesetzt.

2.2.17. Klonierung von DNA-Fragmenten

Als Erstes werden der Zielvektor und das Plasmid mit der gewünschten DNA-Sequenz verdaut (2.2.6) und im Anschluss die 5'-Enden des geschnittenen Vektors dephosphoryliert (2.2.7). Zielvektor und DNA-Fragment werden anschließend mittels Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel extrahiert (2.2.8 bzw. 2.2.9). Die beiden Fragmente werden dann ligiert (2.2.16) und der Ligationsansatz in *E.coli*

transformiert (2.2.1). Positive Klone werden gepickt, ihre Plasmid-DNA isoliert (2.2.2) und durch spezifischen Restriktions-Verdau analysiert (2.2.6). Plasmid DNA der als positiv identifizierten Klone werden zur weiteren Verifizierung zur Sequenzierung gegeben (2.2.21).

2.2.18. *shRNA Herstellung*

Die Methode der small hairpin RNA (shRNA – Haarnadelstruktur bildendes RNA Molekül) nutzt die RNA-Interferenz (RNAi) um die Genexpression herunterzuregulieren (*Knockdown*). Bei der shRNA-Methode wird ein Plasmid mit der gegen die mRNA des Zielgens gerichteten shRNA- (siRNA-) Sequenz in die Zellen transfiziert. Durch die Verwendung von geeigneten Promotoren wird in der transfizierten Zelle somit kontinuierlich neue shRNA gebildet. Dies stellt gegenüber der siRNA-Methodik vor allem bei Experimenten über längere Zeiträume einen Vorteil dar.

Als Grundlage für einen shRNA-Vektor dient der pCGLH Vektor (siehe Tabelle 3 und Abbildung 4). Dieser kodiert zusätzlich zu der shRNA das grün fluoreszierende Protein (EGFP), welches eine Identifizierung der transfizierten Neuronen ermöglicht. Die Sequenzen der shRNA gegen das Aromatasegen von Mäusen (*CYP19A1*) wurde mit dem Programm BLOCK-iT® RNAi-Designer von Invitrogen ermittelt. Entsprechend dieser Sequenzen werden passende Oligonukleotide für die shRNA bei MWG bestellt. Diese werden in der Folge zuerst phosphoryliert und anschließend die jeweils komplementären Sequenzen annealt. Unterdessen werden der pCGLH-Vektor mit *Bgl*II und *Sa*II geschnitten und anschließend dephosphoryliert (2.2.7). Der geschnittene Vektor wird dann über ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel geschnitten und mittels QIAEXII-Kit aufgereinigt (2.2.9). Der geschnittene Vektor und die annealten Oligonukleotide werden zusammen ligiert (2.2.16) und in kompetente XL-1 blue *E.coli* transformiert (2.2.1). Aus gewachsenen Klonen wird die Plasmid-DNA gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.2) und zur Sequenzierung gegeben.

Tabelle 8: Mit BLOCK-iT® RNAi-Designer ermittelte Sequenzen für shRNA Konstrukte

shRNA Name	Start	Sequence DNA	Region	GC %
shRNA Aro-1	247	GGATTGGAAGTGCCTGCAACT	ORF	52.39
shRNA Aro-2	418	GCATGCATGAGAACGGCATCA	ORF	52.39
shRNA Aro-3	536	GGAGTCCATCAAGCAGCATTT	ORF	47.62

Tabelle 9: Sequenzen der shRNA-Konstrukte

shRNA Name	Oligonukleotid	5'-3' Sequenz
shRNA Aro-1	shRNA Aro-1s	GATCTCGGGATTGGAAGTGCCTGCAACTTTCAAGAGAG TTGCAGGCACTTCCAATCCTTTTTTGGAA
	shRNA Aro-1as	TCGAGTTCCAAAAAAGGATTGGAAGTGCCTGCAACTTC TCTTGAAAGTTGCAGGCACTTCCAATCCCGA
shRNA Aro-2	shRNA Aro-2s	GATCTCGGCATGCATGAGAACGGCATCATTCAAGAGAT GATGCCGTTCTCATGCATGCTTTTTTGGAA
	shRNA Aro-2as	TCGAGTTCCAAAAAAGCATGCATGAGAACGGCATCATC TCTTGAATGATGCCGTTCTCATGCATGCCGA
shRNA Aro-3	shRNA Aro-3s	GATCTCGGGAGTCCATCAAGCAGCATTTTTCAAGAGAA ATGCTGCTTGATGGACTCCTTTTTTGGAA
	shRNA Aro-3as	TCGAGTTCCAAAAAAGGAGTCCATCAAGCAGCATTTTC TCTTGAAAATGCTGCTTGATGGACTCCCGA
Kontrolle	shRNA 3b s	GATCTCGATGTGCAATCGAGATGCTTGCGTTCAAGAGA CGCAAGCTCTCGATTGCACATTTTTTGGAA
	shRNA 3b as	TCGAGTTCCAAAAAATGTGCAATCGAGAGCTTGCGTC TCTTGAACGCAAGCTCTCGATTGCACATCGA

2.2.19. Aromatase-Expressionsvektor

Um eine Überexpression von Aromatase zu erreichen, wird ein Aromatase-Expressionsvektor (Aro-Ex) hergestellt. Dieser soll dazu dienen, die Wirksamkeit der gegen Aromatase mRNA gerichteten shRNAs zu testen.

Als Grundlage für den Aro-Ex dient der Vektor pcDNA3.1(-) (siehe Tabelle 3), in den die Sequenz des Aromatasegens (*CYP19A1*) aus *mus musculus* kloniert und unter die Kontrolle eines CMV-Promoters gestellt wird. Zur positiven Selektion in eukaryotischen Zellen trägt der Vektor eine Geneticin-Kassette.

2.2.20. siRNA Experimente

Neben der shRNA-Methode können auch direkt siRNAs (small interfering RNAs) für einen Gen-*Knockdown* eines Zielgens genutzt werden. Der Wirkmechanismus macht sich ebenfalls die RNA-Interferenz (RNAi) zu nutze. Im Unterschied zur shRNA-Methode wird bei der siRNA-Methode von der transfizierten Zelle keine neue siRNA gebildet, so dass für den Gen-*Knockdown* nur die durch die Transfektion in die Zelle aufgenommenen Menge an siRNA zu Verfügung steht. Da die siRNA-Moleküle jedoch viel kleiner sind als die shRNA-Vektoren, ist mit ihnen eine viel höhere Transfektionsrate erreichbar. Für die Experimente wurden die Accell siRNAs von Thermo Scientific verwendet. Hierbei handelt es sich um siRNAs, die sich ohne zusätzliche Reagenzien selbstständig in die Neurone transfizieren. Die Neurone werden wie beschrieben für sieben Tage kultiviert (siehe Abschnitt 2.4.4). Am siebten Tag wird das Medium bis auf 200 µl abgenommen und die Accell siRNA hinzugegeben, so dass die finale Konzentration der siRNA 1 µM beträgt. Nach 48 Stunden wird aus den Neuronen die RNA isoliert und die Knockdown-Rate mittels q-PCR analysiert. Parallel hierzu werden nach weiteren 48 Stunden Neurone mit PFA fixiert und mittels ICC analysiert (siehe Abschnitt 2.4.12).

Tabelle 10: verwendete Accell siRNAs (Ratte)

	Katalognummer	Ziel-Sequenz
Cyp19a1 SMART pool siRNA	E-097560-00-0020	UGGUCUUAUUCGAAUGGUA; GACGAAAGUUCUAUUGUGA; GCAUCAUAUUUACAACAA; CCAUCAAGCAGCAUUUGGA
Control siRNA Red Non-targeting	D-001960-01-50	Keine Sequenzinformation des Herstellers vorhanden
Non-targeting siRNA #3	D-001910-03-20	Keine Sequenzinformation des Herstellers vorhanden
Cyclophilin B siRNA	D-001920-03-20	Keine Sequenzinformation des Herstellers vorhanden

2.2.21. DNA- Sequenzierung

Die zu sequenzierenden Proben werde gemäß der Angaben von GATC Biotech (Konstanz) vorbereitet und an deren Sequenzierungsservice geschickt. Die zur Sequenzierung benötigten Primer werden entweder aus den von GATC vorgehaltenen Standart-Primern ausgewählt, oder die speziellen Primer werden

anhand einer eingesendeten Sequenz synthetisiert und bei GATC bis zur dortigen Verwendung gelagert.

2.3. Proteinbiochemie

2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Estradiol mittels ELISA

Zur Bestimmung der 17 β -Estradiol-Konzentration im Medium von Zellkulturen wird das Medium an den für das Experiment relevanten Zeitpunkten abgenommen (jeweils 8 Wells vereinigt) und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Zur Messung der 17 β -Estradiol-Konzentration werden die Proben zusammen mit nicht-konditioniertem Medium als Referenz an den Kooperationspartner Prof. Jarry nach Göttingen geschickt. Dort werden jeweils 5 ml Zellkulturübersand über Lepak-Säulen extrahiert und in 250 μ l Assay-Puffer aufgenommen. Hiervon werden jeweils 25 μ l für die 17 β -Estradiolbestimmung mittels ELISA eingesetzt. Die gemessenen Konzentrationen entsprechen daher pg/25 μ l und werden auf pg/ μ l umgerechnet.

2.3.2. Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen werden mit 4 ml 1x PBS pro Well gewaschen und anschließend in 200 μ l Aufschlusspuffer aufgenommen. Die Zellsuspensionen eines Doppelsatzes werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer 23 G-Kanüle (Syringe 5 ml; Braun, Melsungen) durch siebenmaliges Auf- und Abziehen und unter Vermeidung von Schaumbildung auf Eis. Zellkerne und Debris werden bei 18 000 x g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Sie basiert auf der Interaktion von Bestandteilen der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie®. Bei Bindung der Proteine an Coomassie in saurem Medium verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm, was im Photometer gemessen werden kann. Hierbei verhält sich der entstehende

Farbumschlag über einen breiten Konzentrationsbereich linear zu der eingesetzten Proteinmenge. Anhand einer zur Kontrolle mit BSA angefertigten Eichreihe kann somit die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben bestimmt werden. Für die Proteinbestimmung wurden 980 µl 1x Bradford-Reagenz mit 19 µl H₂O und 1 µl Probe gemischt und in Dreifachbestimmungen die Konzentrationen ermittelt.

2.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gelelektrophorese wird mit Hilfe des Mini-Protean III Systems (Biorad, München) durchgeführt. Hierzu werden 10 %ige Trenngele und 4 %ige Sammelgele hergestellt (Sambrook und Russell, 2006). Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel entsprechend mit 5x Lämmli-Laufpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C hitze-denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 80 V während der Fokussierung im Sammelgel und 150 V während der Auftrennung im Trenngel in 1x Lämmli-Laufpuffer. Anschließend werden die Proteine durch Western Blot (siehe 2.3.5) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Als Größenmarker wird der Precision Plus Protein Standards Dual Color (Biorad, München) verwendet.

2.3.5. Immunoblot (Western Blot)

Zum Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper (Immundetektion) werden die Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (2.3.4) auf eine Nitrocellulose-Membran Whatman Protran BA85 der Porengröße 0,45 µm (GE Healthcare Lifesciences, Freiburg) transferiert. Der Transfer erfolgt mit Hilfe von einem Semi Dry Transfer Cell Trans-Blot SD Apparat (Biorad, München) bei einer konstanten Spannung von 35 V für 60 min. Der Blot wird ausgehend von der Anodenseite wie folgt aufgebaut: Ein dickes Filterpapier, zwei Lagen Whatman-Papier, Nitrocellulose-Membran, SDS-Gel, zwei Lagen Whatman-Papier und ein dickes Filterpapier, alles getränkt in Semy Dry Blotpuffer.

2.3.6. Immundetektion

Zum Nachweis der immobilisierten Proteine auf der Nitrocellulose-Membran (2.3.5) durch spezifische Antikörper wird die Membran zunächst für 60 min bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss daran wird mit den Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung in 5 % (w/v) Magermilchpulver in x TBST unter leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht oder alternativ für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Membran wird anschließend dreimal für je 10 min in 1x TBST gewaschen und anschließend mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach der zweiten Inkubation wird erneut dreimal für jeweils 10 min mit 1x TBST gewaschen, bevor die Detektion mit der auf Chemilumineszenz basierenden Reaktionskomplettausstattung ImmobilonWestern (Millipore, Billerica, USA) bzw. Millipore high sens (Millipore, Billerica, USA) nach Angaben des Herstellers erfolgt. Zur Dokumentation wird ein Fusion SL (Vilber Lourmat, Eberhardzell) verwendet, der digitale Bilder der Chemilumineszenz aufnimmt.

2.4. Zellbiologie und Immunocytochemie

2.4.1. Kultivierung von Neuro-2a Zellen

Neuro-2a (N-2a) Zellen werden in DMEM F12 1/1 Medium mit 5 % (v/v) (alternativ 10 %) FCS und 1 % (v/v) Penizillin/Streptomycin (PS) in Zellkulturflaschen, Petrischalen oder 6 Well-Platten in einem Brutschrank mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80- 90 % erreichen, werden sie passagiert. Hierzu wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen ein Mal mit warmen PBS gespült. Anschließend werden sie für 10 min bei 37 °C im Brutschrank mit Trypsin inkubiert. Durch die Zugabe von Medium mit FCS wird die Lyse gestoppt und die N-2a Zellen in gewünschter Dichte in den jeweiligen Kulturgefäßen ausgesät.

N-2a Zellen, die stabil mit einem Aromatase-Expressionsvektor transfiziert waren, werden zuerst in DMEM-Kulturmedium mit 500 µg G418 selektioniert und anschließend darin kultiviert.

2.4.2. Kultivierung von HT22 Zellen

Die HT 22 Zellen werden in DMEM Medium mit 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) PS und 0,01 M HEPES in Zellkulturflaschen, Petrischalen oder 6 Well-Platten in einem Brutschrank mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Sobald die Zelleneine Konfluenz von 80- 90 % erreichen, werden sie passagiert. Hierzu wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen ein Mal mit warmen PBS gespült. Anschließend werden sie für 10 min bei 37 °C im Brutschrank mit Trypsin inkubiert. Durch die Zugabe von Medium mit FCS wird die Lyse gestoppt und die HT 22 Zellen anschließend in gewünschter Dichte in den jeweiligen Kulturgefäßen ausgesät.

2.4.3. Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen aus *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)

Zur Kultivierung hippocampaler Neurone werden wildtypische Rattenembryonen des Stammes Wilstar im Entwicklungsstadium E 18 verwendet. Hierzu wird das trächtige Weibchen mittels CO₂ betäubt und durch Dekapitation getötet. Anschließend werden alle Embryonen entnommen und in kaltes Präparationsmedium (HBSS) gegeben. Die Embryonen werden dann ebenfalls dekapitiert und die Gehirne entnommen. Diese werden von den Meningen gesäubert, die Hippocampi heraus präpariert und in kaltem Präparationsmedium gesammelt. Die Hippocampi werden hinterher zwei Mal mit Präparationsmedium gespült und anschließend zur Vereinzelung der Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA und 8 ml HBSS für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit HBSS wird das Präparationsmedium abgesaugt und durch 2 ml Neurobasal Kulturmedium ersetzt. Darauf werden die Zellen mit Hilfe feuerpolierter Pasteurpipetten unterschiedlicher Durchmesser vorsichtig trituriert. Die Zellsuspension wird dann durch ein 40 µm Zellsieb gegeben und mit 3 ml Neurobasal Kulturmedium nachgespült. Die Zellzahl wird mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von 125 000 pro Glasplättchen (Durchmesser 12 mm) in 1 ml Neurobasalmedium ausgesät. Die Glasplättchen wurden vorher über Nacht in den Wells einer 24-Well-Platte mit 1,5 µg/ml Poly-L-Lysin in Boratpuffer bei Raumtemperatur beschichtet und anschließend zwei Mal mit Wasser gewaschen.

Die Dispersionskulturen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach ein bis drei Stunden wurde

das Kulturmedium gewechselt und die Neuronenkulturen bis zum Experiment weiter inkubiert.

2.4.4. *Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen aus *Mus musculus* (Linnaeus, 1758)*

Primäre hippocampale Neurone werden mit leichten Abwandlungen nach dem Protokoll von Kretz (Kretz, 2004) präpariert. Zur Kultivierung der hippocampalen Neuronen werden neugeborene Mäuse (postnatal Tag 0, P0) des Stammes C57bl/6 durch Dekapitation getötet. Die Hippokampi wurden in eiskaltem 1x PBS, versetzt mit 10 mM Glukose, präpariert. Zur Vereinzelung der Zellen wurden die Gewebe mit 10 µg/ml DNase I und 0,5 mg/ml Papain (alle SIGMA, Taufkirchen) in 10 mM Glukose in 1x PBS für 25 min bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit 20 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM/F12-complete* (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden die Zellen zum Vereinzeln vorsichtig in 2 ml des selben Mediums mit abgerundeten Pasteurpipetten trituriert. Die Zellen wurden dann in *DMEM/F12-complete* auf 12 mm Glasplättchen in einer Dichte von 140 000 Zellen pro Glasplättchen ausgesät. Die Glasplättchen wurden zuvor mit 1,5 µg/ml Poly-L-Lysin in Boratpuffer und mit 20 µg/ml Laminin in H₂O (beide SIGMA, Taufkirchen) jeweils über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach jedem Beschichtungsschritt erfolgten zwei Waschschriffe mit H₂O. Die Kulturen werden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 4 bis 5 Stunden wird das Medium durch Neurobasalmedium ersetzt. Nach 3 Tagen in Kultur (DIV 3) wird 3 µM 1- β -D-Arabinofuranosyl]-Cytosin (SIGMA, Taufkirchen) zu den Kulturen gegeben, um die Proliferation von Astrozyten zu stoppen. Alle 7 Tage wird ein Drittel des Kulturmediums durch frisches Neurobasalmedium ersetzt.

2.4.5. *Fixierung der Dispersionskulturen*

Die Fixierung von Zellkulturen erfolgt mit 5 % Paraformaldehyd (PFA). Jedes Well wird nach Absaugen des Kulturmediums mit 1 ml PFA für zehn Minuten inkubiert und anschließend drei Mal mit PBS für fünf Minuten gewaschen. Die so fixierten Zellen werden mit Parafilm umschlossen und bei 4°C bis zur Immuncytochemie gelagert.

2.4.6. *Präparation und Kultivierung hippocampaler Schnittkulturen*

Die Präparation hippocampaler Schnittkulturen erfolgt nach Frotscher (Frotscher et al., 1995). Hierzu werden weibliche Ratten im Alter von fünf Tagen (P5 = postnatal Tag 5) des Stamms Wistar aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) bezogen. Die Tiere wurden dort zuvor unter kontrollierten Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Tiere werden dekapitiert und der Hippocampus mithilfe eines feinen Heidemannspatels heraus präpariert und in Präparationsmedium überführt. Anschließend wird der Hippocampus mithilfe eines Tissue Chopper (McIlwain, H. Saur, Reutlingen) senkrecht zur longitudinalen Achse in 400 µm dicke Schnitte geteilt. Die Schnitte werden dann in Präparationsmedium vereinzelt und in 6-Well-Platten überführt, in denen sie auf einer Biomembran (BD Falcon, Heidelberg), an der Grenzfläche zwischen Luft und Inkubationsmedium, in 1 ml Inkubationsmedium kultiviert werden. Auf jeder Membran werden 5 bis 8 Schnitte kultiviert.

Die hippocampalen Schnittkulturen blieben insgesamt für 11 Tage in Kultur, welche sich in vier Tage Vorkultur und 7 Tage Behandlung untergliederten (siehe 2.4.10). Die hippocampalen Schnitte werden in *in vitro* in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Das Inkubationsmedium wird erstmalig am Tag nach der Präparation und anschließend alle zwei Tage gewechselt.

2.4.7. *Elektronenmikroskopie*

Um hippocampale Schnittkulturen elektronenmikroskopisch untersuchen zu können wurden sie wie folgt nach der von Reynolds beschriebenen Methodik (Reynolds, 1963) fixiert und vorbereitet.

Zuerst werden die Schnitte zweimal mit 37 °C warmen und einmal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden sie in 4 °C kaltem 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Daraufhin wird mit einer 2,5 %igen (v/v) Glutaraldehydlösung in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert und abschließend nochmals mit 4 °C kaltem 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die halbstündige Inkubation in 1 %igem Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer versetzt mit Saccharose dient der Nachfixierung. Um spätere Gewebeschäden zu minimieren, werden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Hierfür wurde jeweils für zehn Minuten in unvergällten Ethanol, verdünnt mit Aqua dest. in aufsteigenden Konzentrationen von 35 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 % inkubiert.

70 %, 96 %, inkubiert und zum Abschluss zwei Mal in 100 %igem Ethanol inkubiert. Restfeuchtigkeit wird den Schnitten anschließend durch zweimalige Inkubation in Propylenoxid entzogen. Anschließend werden die Schnitte für drei Stunden in einem Intermedium aus Propylenoxid und Glycidether (Verhältnis 1:3), sowie einem als Accelerator fungierenden Zusatz von 2 % 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol inkubiert. Die hippocampalen Schnitte werden nachfolgend in einen Tropfen Glycidether auf Silikonplatten überführt und mit Dokumentenfolie abgedeckt. Nach dem Aushärten der Schnitte bei 65 °C über Nacht in einen Wärmeschrank werden sie in eine Glycidether ernthaltende Gelatine kapsel gegeben. Nach erneutem Aushärten über Nacht entstehen auf diese Weise Schnittblöcke, die am Microtom durch ein Diamantmesser zugeschnitten werden. Die entstandenen 1 µm dicken Schnitte werden anschließend frei schwimmend in Toluidinblau angefärbt. Zuvor wurden die Schnittblöcke so zu Recht geschnitten, dass nur das *Stratum pyramidale* und das *Stratum radiatum* der CA1 Region erhalten blieb. Aus diesen Semidünnschnitten werden mit einem Ultramicrotom Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von ca. 90 nm hergestellt. Diese Schnitte werden anschließend auf einen Kupferschlitzträger übertragen und für die Elektronenmikroskopie angefärbt. Hierzu werden die Schnitte für 30 min in Uranylacetat inkubiert und anschließend gewaschen. Das Uranylacetat wird nachfolgend durch Bleicitrat ersetzt und die Schnitte abschließend noch einmal gewaschen.

2.4.8. Auswertung der EM-Bilder

Bilder der Schnitte werden am CM 100, PW 6021 Elektronenmikroskop mit einer Vergrößerung von 6600-fach aufgenommen. Regionen mit größeren Dendriten oder Blutgefäßen werden ausgespart, um so eine mögliche Fehlerquelle beim späteren Auszählen zu minimieren. Die EM-Bilder werden später entwickelt und nach folgendem Muster ausgewertet.

Bei der Bestimmung der Synapsendichte wurden nur Strukturen als Spine-Synapsen gezählt, wenn sie:

- eine präsynaptische Membran (1)
- präsynaptische Vesikel (2)
- einen synaptischen Spalt (3)
- eine postsynaptische elektronische Dichte (4)

aufwiesen (siehe Abbildung 6)

Es werden hierbei jeweils die Spinesnapsen auf dem Bild der Schnittober- und Unterseite markiert und nur diejenigen gezählt, die nur in einem Bild zu finden waren. Auf einer quadratischen, $6,4 \mu\text{m}^3$ messenden Fläche ($16,8 \times 16,8 \text{ cm}$) erfolgt die quantitative Auswertung. Als Zählausschnitt wird der Bereich mit der größten Synapsendichte gewählt.

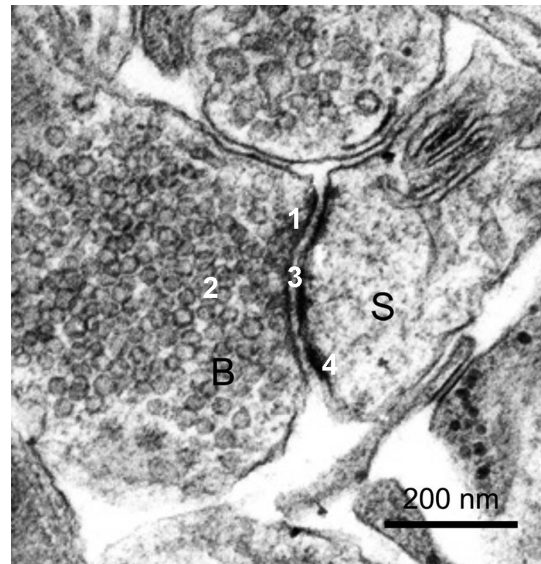


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Ausschnitt) einer Spine-Synapse.
S: Spine, **B:** Bouton, **1:** präsynaptische Membran, **2:** präsynaptische Vesikel, **3:** synaptischer Spalt, **4:** postsynaptische elektronische Dichte.

2.4.9. Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA und siRNA

Die Transfektion dient dem Einbringen von DNA und RNA in eukaryote Zellen. Um dieses zu erreichen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die sowohl chemische (Calciumphosphat-Präzipitation), physikalische (Elektroporation, Mikroinjektion) und biologische (Lipofektion, Virensysteme) Methoden beinhalten. Für die durchgeführten Transfektionen wurden als Methoden die Lipofektion mit kationischen Liposomen, sowie die nicht-liposomale Transfektion mittels Effectenen angewandt. Die Lipofektion wurde erstmals 1987 von Felgner und Mitarbeitern beschrieben (Felgner et al., 1987). Diese Methode basiert auf der endozytotischen Aufnahme von mit einem Lipidgemisch komplexierter DNA durch die Zielzellen. Dieses Lipidgemisch besteht aus kationischen Lipiden und ungeladenen Helferlipiden, die durch Ultraschallbehandlung sogenannte Liposomen bilden. Das Gemisch wurde für die Versuche als fertige Transfektionslösung (Metafectene® PRO, Biontex; FuGENE®, Roche Applied Sciences) bezogen.

Effectene ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, dessen Vorteile in der hohen Transfektionseffizienz für Zelllinien und Primärzellen sowie in der geringen

Zytotoxizität liegen. Die DNA wird zunächst mit Hilfe eines Enhancers kondensiert, nach Zugabe von Effectene formt sich ein kationischer Effectene-DNA-Komplex, der von den Zellen aufgenommen wird.

Für den Erfolg der Transfektion und eine hohe Ausbeute an transfizierten Zellen ist es notwendig, die auf die jeweilige Zellart zugeschnittenen optimalen Transfektionsbedingungen zu ermitteln. Einflussgrößen sind hier vor allem das Verhältnis von DNA zu Transfektionslösung und deren absolut eingesetzte Mengen je Transfektionsansatz. Bei primären Zellen ist außerdem das Alter, die Inkubationszeit und Zelldichte, sowie die Verwendung serumhaltigen- oder freien Mediums zu beachten. Um die Transfektionseffizienz zu beurteilen wurde ein EGFP-Vektor oder eine mit einem Fluorophor gekoppelte siRNA verwendet.

Transfektion mit Metafectene® Pro

Die N-2a Zellen werden bis zur gewünschten Dichte kultiviert und vor der Transfektion mit frischem serumfreiem Medium versorgt. Das für die Transfektion optimale Verhältnis von Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz beträgt 1:10 (1,5 µg zu 16 µl). Zur Transfektion wird sowohl die DNA als auch das Transfektionsreagenz in 50 µl serumfreies Medium gegeben. Anschließend wird der DNA-Ansatz zum Transfektionsansatz gegeben, einmal durch Pipettieren gemischt und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bilden sich die DNA-Lipidkomplexe.

Nach dieser Inkubation wird der Ansatz auf die Zellen getropft und vorsichtig mit dem Medium vermischt. Die Zellen werden für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert, anschließend wieder auf normales Kulturmedium umgestellt und bis zum gewünschten Zeitpunkt weiterkultiviert.

Transfektion mit FuGene9 (XtremeGENE9) (Roche Applied Sciences)

Die optimalen Transfektionsbedingungen wurden durch Variationen in eingesetzter Plasmidmenge und verwendetem Volumen des Transfektionsreagenz in Vorversuchen ermittelt. Die Transfektion wird mit einem Verhältnis XtremeGENE zu DNA von 3:1 (3 µl Transfektionsreagenz : 1 µg DNA) durchgeführt.

N-2a Zellen werden bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert und ca. eine Stunde vor der Transfektion mit frischem Medium versorgt. Die entsprechenden Mengen an OptiMEM I, XtremeGENE und Plasmid-DNA werden in einem Reaktionsgefäß zusammengefügt und vorsichtig gemischt. Das Gesamtvolumen beträgt hierbei meist 200 µl. Der Transfektionsansatz wird für 20 -30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann jeweils 100 µl Tropfenweise auf die Zellen gegeben, die sich in

2 ml befinden. Durch Schwenken wird das Transfektionsreagenz gleichmäßig im Medium verteilt. Die Zellen werden dann für zwei bis drei Stunden bis zum Mediumwechsel im Brutschrank inkubiert.

Transfektion mit Effectene Transfektionsreagenz (QIAGEN)

Effectene ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, dessen Vorteile in der hohen Transfektionseffizienz für Zelllinien und Primärzellen sowie in der geringen Zytotoxizität liegen. Die DNA wird zunächst mit Hilfe eines Enhancers kondensiert. Nach Zugabe von Effectene formt sich ein kationischer Effectene-DNA-Komplex, der von den Zellen aufgenommen wird. Die hippocampalen Primärzellen wurden nach der Präparation mit 120.000 Zellen pro Well einer 24-Well Platte ausgesät und entsprechend der Experimente nach 8, 10 bzw. 12 Tagen *in vitro* (DIV8 bzw. 10, 12) transfiziert. Für einen Doppelansatz wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß je 150 µl EC-Puffer vorgelegt, 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben sowie 10 µl Enhancer. Nach sorgfältigem Mischen erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurden 8 bis 16 µl Effectene dazugegeben und nach erneutem Mischen für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Kulturmedium wurde der Reaktionsansatz gleichmäßig auf die Zellen gegeben, die sich in 1 ml frischem Kulturmedium befanden. Nach 1–2 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend bis zum Experiment in Kulturmedium inkubiert.

Transfektion von Accell siRNA (Thermo Scientific)

Accell siRNA ist eine von Thermo Scientific entwickelte siRNA, die sich selber ohne Zusatz von Transfektionsreagentien ins Zytoplasma von schwer zu transfizierenden Zelltypen schleust und dabei keine toxischen Effekte hervorruft.

Die Accell siRNA wird gemäß der Herstellerangaben in DNase/RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration mittels Photometer überprüft.

Die Transfektion wird in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die größte Abweichung zum Herstellerprotokoll besteht darin, dass die Transfektion nicht in dem speziellen Accell Delivery Medium, sondern in Kulturmedium durchgeführt wird. Für die Transfektion wird das Kulturmedium der Neurone bis auf das für die Transfektion benötigte Volumen abgenommen und das für eine finale siRNA-Konzentration von 1 µM nötige Volumen siRNA direkt auf die Neuronen gegeben. Anschließend wird die siRNA durch sorgfältiges Schwenken mit dem Medium vermischt. Die Neurone werden dann bis zum gewünschten Zeitpunkt weiter im Brutschrank kultiviert.

Um die Transfektionseffizienz sichtbar zu machen wird eine mit einem rot bzw. grün fluoreszierenden Farbstoff gekoppelte siRNA (Accell siNTC red/green) benutzt und die Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Da die gegen das Zielgen gerichtete siRNA nicht mit einem Fluorophor gekoppelt erhältlich ist, wird sie zusammen mit einer minimalen Menge an siNTC red/green cotransfiziert, um so die transfizierte Zellen anhand der Fluoreszenz der siNTC identifizieren können.

2.4.10. Pharmakologische Behandlung kultivierter primärer hippocampaler Neurone und Schnitte

Sowohl die hippocampalen Schnittkulturen als auch die primären hippocampalen Dispersionskulturen werden mit den verschiedenen nichtsteroidalen Aromataseinhibitoren (auch Aromatasehemmer genannt) behandelt. Zum Einsatz kommen Letrozol, Anastrozol und Fadrozol, welche in DMSO gelöst werden und in einer finalen Konzentration von 100 nM im Inkubationsmedium verwendet werden. Kontrollen bestehen aus einer Behandlung mit gleichen Mengen DMSO alleine. Bei den Slicekulturen wird das vorher beschriebene Behandlungsintervall eingehalten (siehe 2.4.4.). Dispersionskulturen werden für 21 Tage vorkultiviert ohne dass in dieser Zeit das Medium ausgetauscht wurde. Während der Behandlung wird das Medium alle zwei Tage zu 50 % ersetzt.

2.4.11. Herstellung von Kryostatschnitten

Zuerst werden die Hippocampalen Schnitte fixiert und entwässert. Dazu werden die Schnitte einmal in warmem (Ausspülen der Salze) und zwei Mal in kaltem (Stoppen der Zellvorgänge) PBS gewaschen. Anschließend folgt die Fixierung in kaltem 4 % igen (v/v) PFA (Paraformaldehyd) über Nacht im Kühlschrank bei ca. 4 °C. Nach zwei weiteren Waschgängen mit PBS wird zwei Mal über Nacht in 25 % D-(+)-Saccharose entwässert. Anschließend werden die Schnitte von der Biomembran in einen Tropfen 25 % Saccharose auf einem Deckglas überführt, die Flüssigkeit mit einem Papiertuch abgesaugt und ein Tropfen TissueTek (Sakura Finetek, Nussloch) auf das Gewebe gegeben. Anschließend werden die Schnitte bei -80 °C gelagert.

Die hippocampalen Schnitte werden mit einem Kryostaten (Microm HM560, Microm International GmbH, Walldorf) bei -20 °C zu 12 µm dicken Schnitten geschnitten und auf Objektträgern aufgenommen. Nach dem Schneiden werden die Schnitte bei

Raumtemperatur getrocknet, 10 Minuten in Aceton (Busing & Fasch GmbH & Co. KG, Oldenburg) bei -20 °C dehydriert, entfettet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.12. Immunzytochemie/ Immunhistochemie

Schnittkulturen:

Für die spätere Analyse ist es wichtig, dass alle Schnitte eines Experimentdurchlaufs gemeinsam unter den gleichen Bedingungen gefärbt werden. Die Schnitte werden aufgetaut und kurz an der Luft getrocknet. Der Immunhistochemie mit dem Synaptopodin Antikörper geht eine 10 min Fixierung in kaltem Methanol voraus. Im Anschluss daran erfolgt das Blocken unspezifischer Epitope für 30 min mit 5 % FCS (Fetales Calf Serum) in TBS versetzt mit 0,1 % TX-100 und 0,02 % Thimerosal. Mit TBS versetzt mit 0,2 % TX-100 werden die Schnitte für 40 bis 60 min permeabilisiert. Danach erfolgt die Inkubation mit den primären Antikörpern, welche in der Blocklösung angesetzt waren, in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht.

Am nächsten Tag werden die Schnitte drei Mal für jeweils 10 min in TBS versetzt mit 0,1 % TX-100 gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit den sekundär Antikörpern für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Diese wird gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation mit DAPI um die Zellkerne anzufärben. Abschließend werden die Schnitte drei Mal für jeweils 10 min in TBS versetzt mit 0,1 % T-100 gewaschen und vor dem Eindeckeln einmal in *Aqua dest.* getaucht um die Entstehung von Salzkristallen zu verhindern. Bis zur Aufnahme der Schnitte mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops werden sie lichtdicht bei 4 °C gelagert.

Dispersionskulturen:

Die Neurone werden auf 12 mm Glasplättchen kultiviert und wie oben beschrieben mit 5 % (w/v) PFA fixiert. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen werden die Neurone mit 5 % FCS-Blocklösung für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellmembranen mit TBS versetzt mit TX100 (0,2 %) für 20-30 min permeabilisiert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit den jeweiligen Primärantikörpern, die in Blocklösung verdünnt wurden. Vor der Inkubation mit den Sekundärantikörpern im Dunkeln werden die Neuronen dreimal für je 10 min mit TBS versetzt mit TX100 (0,1 %) gewaschen. Um die Zellkerne anzufärben wird anschließend für 3 min mit DAPI inkubiert und die Neurone

daraufhin erneut dreimal für je 10 min mit TBS+ TX100 (0,1 %) gewaschen. Vor dem Eindeckeln mit Fluorescence Mounting Medium (Dako, Hamburg) werden die Glasplättchen in *Aqua dest* getaucht um die Bildung von Salzkristalle zu vermeiden. Bis zur Analyse der Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie werden die Präparate bei 4 °C und in Dunkelheit gelagert.

2.4.13. Intensitätsanalyse der IHC bzw. ICC

Die immunhistochemischen bzw. immunzytochemischen Präparate werden mit einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Dabei sind die verschiedenen Behandlungsgruppen verschlüsselt. Vergrößerung, Belichtung, Bildausschnitt, Schichtdicke sowie Intesnsitätseinstellungen werden innerhalb einer Experimentgruppe nicht variiert.

Um die Synaptopodin- bzw. Synaptophysin-Intensität in Dispersionskulturen nach der Behandlung mit verschiedenen Aromataseinhibitoren zu bestimmen, wurden morphologisch intakte Neurone anhand der Detektion von MAP2 identifiziert und die Synaptopodin- bzw. Synaptophysin-Fluoreszenz im Perikaryon aufgenommen. Der Fokus wird hierbei immer so gewählt, dass der Hauptdendrit gerade noch fokussiert ist. Hierdurch soll eine bessere Vergleichbarkeit der Bilder gewährleistet werden.

Die Intensitätsanalyse der Synaptopodin-und Synaptophysin-Fluoreszenz erfolgt mit Hilfe des Programms ImageJ (Version 1.46o; Wayne Rasband; National Institutes of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>). Hierbei wird die MAP2-Färbung zur Hilfe der genauen Abgrenzung des Perikaryons genutzt. Für die Intensitätsmessung von Synaptophysin werden im Perikaryon jedes Neurons drei Quadrate mit einer Kantenlänge von 80x80 Pixel zufällig so positioniert, dass sie es größtmöglich ausfüllen und die Intensität innerhalb dieser Quadrate gemessen. Bei der Intensitätsmessung von Synaptopodin wird das Perikaryon umrandet und die Intensität innerhalb der Umrandung gemessen. Bei den Intensitätsmessungen wird jeweils ein Schwellenwert, der die Hintergrundfärbung abdeckte, eingestellt, unterhalb dessen die Intensität nicht gemessen wird. Dieser Schwellenwert wird anhand von Färbungs-Negativkontrollen (in Abwesenheit der primären Antikörper inkubiert) und dem Vergleich mehrerer Bilder ermittelt und lag um 80.

Die Intensität der Aromatrasefärbung wird ähnlich wie bei Synapropodin und Synaptophysin gemessen. Neuronen, die den shRNA-Vektor aufgenommen haben, werden anhand ihrer GFP-Färbung identifiziert und nach vorherig festgelegten Standards aufgenommen. Hierbei wird wieder das Perikaryon umrandet und die Intensität oberhalb eines ermittelten Schwellenwertes gemessen.

Bei der Auswertung der Synaptopodin- und Aromataseintensität wird die gemessene Intensität ins Verhältnis zur gemessenen Fläche gesetzt. Dies ist bei der Analyse der Synaptophysin Intensitäten nicht nötig, da die berücksichtigte Messfläche durch die konstante Anzahl an gleich großen Quadraten bei allen Messungen gleich ist.

Für die Intensitätsanalyse der Synaptopodin- und Synaptophysin-Fluoreszenz in den mit Aromataseinhibitoren behandelten hippocampalen Schnittkulturen werden Schichtaufnahmen (jeweils 7 Bilder/Schichten) in der CA1 Region im *Stratum radiatum* unterhalb des *Stratum pyramidale* beginnend aufgenommen. Je nach Beschaffenheit der Schnitte können in der CA1 Region zwischen drei und acht Schichtbilder aufgenommen werden. Der Abstand der einzelnen Schichten einer Aufnahme wurde mit 1 μm so gewählt, dass er größer als der Durchmesser einer Synapse lag, so dass jede Synapse nur einmal detektiert wird.

Die Intensitätsanalyse erfolgt ebenfalls mit ImageJ. Hierbei wird die Intensität über den gesamten Bildausschnitt und alle sieben Schichten oberhalb eines zuvor an Färbungs-Negativkontrollen ermittelten Schwellenwertes gemessen.

2.5. Quantitative Analyse und Statistik

2.5.1. Statistik

Für die statistische Analyse aller in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden zunächst die Mittelwerte aus den Daten gebildet und ihr Standardfehler (SEM) ausgerechnet. Dieser ergibt sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte dividiert durch die Quadratwurzel der Fallzahl (n) der Einzelereignisse. Die Mittelwerte wurden jeweils an der angegebenen Kontrollbedingung innerhalb eines Experiments normiert. Anschließend wurden die normierten Werte mehrerer Wiederholungen des Experiments zusammengeführt und verglichen. Für den Vergleich der Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc-Test durchgeführt.

Für den Vergleich der Immunreaktivitäten wurde die ANOVA (log Expression) angewendet. Für die statistische Evaluation aller Interaktionen wurde ein Modellsuche (model search) für jedes Experiment durchgeführt. Die Ergebnisse werden mit einer prozentualen Skalierung dargestellt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq .05$ festgesetzt, was der Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner gleich 5 % entspricht. Ist die berechnete

Signifikanz $\leq .05$, so besteht demnach ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der verglichenen Stichproben der Versuchsgruppen.

Zur Durchführung der statistischen Analyse wurde die Software SPSS verwendet.

3. ERGEBNISSE

Aromatase ist das Schlüsselenzym in der Steroid-Biosynthese. Sie ist in den Ovarien, dem Fettgewebe und im Besonderen im Gehirn, speziell im Hippocampus lokalisiert und aktiv (MacLusky et al., 1994; Wehrenberg et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2003; Shibuya et al., 2003; Rego et al., 2009; Pelletier, 2010). Lokal im Hippocampus gebildetes 17β -Estradiol beeinflusst auf parakrine und autokrine Weise neuroendokrine Prozesse (Prange-Kiel et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 17β -Estradiol einen modulierenden Effekt auf Spinesynapsen im Hippocampus hat. So führt eine Reduktion des 17β -Estradiolspiegels, sei es durch Schwankungen während des Zyklus, Ovariectomie oder Administration von potenten Aromataseinhibitoren zu einer Reduktion der Spinesynapsen-Anzahl sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Woolley und McEwen, 1993; Woolley et al., 1990; Zhou et al., 2010b; Fester et al., 2012b; Prange-Kiel et al., 2008; Fester et al., 2006).

3.1. Aromatase-Knockout-Maus

Zu Beginn dieser Arbeit sollte die Rolle der Estrogene *in vivo* anhand von Aromatase-Knockout-Maus-Modellen untersucht werden. Mit Hilfe der Aromatase-Knockout-Maus-Modelle sollte der Einfluss gonadaler und hippocampaler Estrogensynthese bzw. endogenen und exogenen hippocampalen 17β -Estradiols auf die Synapsenbildung und die Expression von synaptischen Proteinen untersucht werden. Weiter sollte der Einfluss der verschiedenen Estrogenquellen auf Lernparadigmen analysiert und die Ursache für hierbei eventuell auftretende Unterschiede zwischen KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen auf morphologischer und molekularer Ebene untersucht werden.

Um den Einfluss von gonadaler und hippocampaler Estrogensynthese differenzieren zu können, sollten komplette Aromatase-Knockout-Tiere und solche mit einem hippocampusspezifischen, konditionalen Aromatase-Knockout verglichen werden. Von Dr. Peters in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Rune generierte Knockout-Mauslinien sollten zuerst abschließend genotypisiert und anschließend charakterisiert werden.

Bei den Aromatase-*Knockout*-Tieren wurde das Exon 9 des Aromatasegens, welches für dessen enzymatische Aktivität kodiert, durch LoxP-Erkennungssequenzen flankiert. Durch die Verpaarung mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase entweder ubiquitär oder hippocampuspezifisch exprimieren, kommt es zu einem kompletten bzw. konditionalen *Knockout* des Aromatasegens. Bei dem komplett-*Knockout* wird die Aromatase in allen Geweben der Tiere ausgeschaltet, wohingegen bei konditionellen-*Knockout*-Tieren der Aromatase -*Knockout* auf hippocampale Neurone begrenzt wird.

Die Genotypisierung der Mäuse durch PCR-Analysen erwies sich jedoch als sehr problematisch. So war es nicht möglich, auf diese Weise zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren zu unterscheiden. Die Genotypisierungen zeigten, obwohl mehrere hundert Nachkommen analysiert wurden, dass alle gezeugten Nachkommen entweder heterozygot oder wildtypisch, jedoch nicht homozygot für den *Knockout* waren. Auch durch den Einsatz verschiedener Varianten der Genotypisierungs-PCR konnten keine homozygoten Nachkommen ermittelt werden. Einige Rückkreuzungen von Aromatase *Knockout*-Tieren mit wildtypischen Tieren ergaben bei den Nachkommen bisweilen den erwarteten Genotyp der F1-Tiere (100 % heterozygote Aro⁺Aro⁻-Tiere, siehe Abb. 7 a). Dies erlaubte den Rückschluss, dass ein Elterntier homozygot für den *Knockout* gewesen sein musste. Bei Verpaarung von Aro⁺Aro⁺-Tieren mit heterozygoten *Knockout*-Tieren hingegen wären 50 % wildtypische und 50 % heterozygote Aro⁺Aro⁻ Nachkommen zu erwarten (vergleiche Abbildung 7 a und 7 b). Die Genotypisierung dieser Aro⁻Aro⁻ bzw. Aro⁺Aro⁻-Elterntiere ergaben jedoch in beiden Fällen das für heterozygote Tiere zu erwartende Bandenmuster (Abbildung 8). Sequenzierungen der beiden auftretenden DNA-Fragmente bestätigten den Befund: Das größere Fragment repräsentierte die Sequenz des mutierten Allels, während das kleinere Fragment der Wildtyp-Sequenz entsprach. Damit war eine PCR-basierte Genotypisierung nicht möglich.

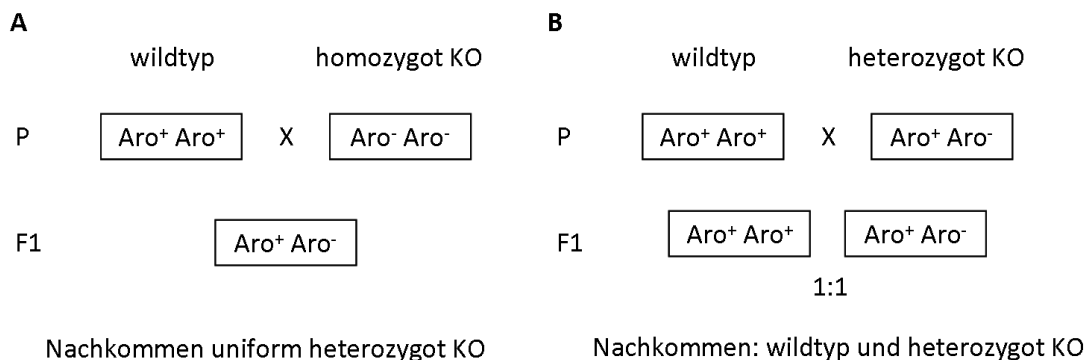


Abbildung 7: Schematische Darstellung von Verpaarungen mit *Knockout*-Tieren. (A) zeigt das Verpaarungsschema einer Rückkreuzung von einem potenziell für den *Knockout*

homozygoten Tier mit einem wildtypischen Tier. Die Nachkommen dieser Verpaarung sind alle einheitlich heterozygot für den *Knockout*. **(B)** zeigt das Verpaarungsschema zwischen einem für den *Knockout* heterozygoten Tier und einem wildtypischen Tier. Die Nachkommen dieser Verpaarung sind zu einem Teil wildtypisch und zum andern heterozygot für den *Knockout*. Aro⁺ = wildtypisch, Aro⁻ = Knockout, P = parental Generation, F1 = erste Folgegeneration.

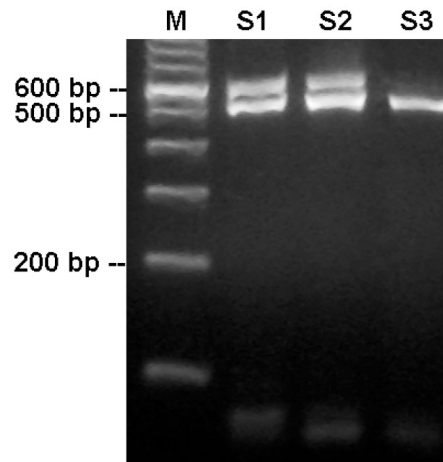


Abbildung 8: Beispielhafte Ergebnisse der Genotypisierungsanalysen von Aromatase-Knockout- und Wildtyp-Tieren. Zu sehen sind die repräsentativen PCR-Fragmente einer Genotypisierung. Von links nach rechts sind die Proben von einem heterozygoten (S 1), einem potenziell homozygoten (S 2) und einem wildtypischen Tier (S 3) zu sehen. Beim wildtypischen Tier ist nur eine Bande auf der erwarteten Höhe von 531 bp zu sehen. Das heterozygote Tier weist zusätzlich eine 611 bp große Mutanten-Bande auf. Das anhand von Ergebnissen der Kreuzungen als potentiell homozygot für den *Knockout* eingestufte Tier (S 2) zeigt neben der Mutanten-Bande ebenfalls die Wildtypbande. Für die Genotypisierung wurden die Primer 1-AroKO-f und 3-AroKO-r2 verwendet. Die Position von DNA-Fragmenten bekannter Größe (in Basenpaaren, bp) ist in der Spur M zu sehen.

Daher wurde anschließend versucht, den Genotyp der *Knockout*-Mäuse mittels umfangreicher Southern-Blot-Analysen eindeutig zu bestimmen. Auch hier gelang es nicht, zwischen homo- und heterozygoten Tieren zu unterscheiden, obwohl aufgrund der durchgeführten Verpaarungen homozygote Aro⁻/Aro⁻-Tiere zu erwarten gewesen wären. Zudem wiesen die mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdauten genomischen DNAs nicht immer die theoretisch erwarteten Größen der DNA-Fragmente auf.

Die DNA-Sequenzierung des ursprünglich zur Generierung der *Knockout*-Mäuse verwendeten Plasmids wies die erwartete Sequenz auf und erbrachte daher keinen Hinweis auf die Ursache der Genotypisierungsprobleme. Diese Diskrepanzen traten auch bei den konditionellen Aromatase KO-Mauslinien auf, bei denen das durch LoxP-Erkennungssequenzen flankierte Exon noch nicht durch die Cre-Rekombinase aus der DNA entfernt wurde. Das konditionelle Allel entspricht in seiner Funktion somit dem Wildtyp-Allel. Die homozygote Form des konditionellen Aromatase KO-

Allels sollte daher keinen Einfluss auf die Überlebensrate des resultierenden Nachwuchses haben. Damit ist auszuschließen, dass es bereits im Mutterleib zu einer *knockoutbedingten* Letalität der homozygoten KO-Tiere kommt. Weitere modifizierte Southern-Blot-Analysen mit veränderten Sonden und Restriktionsverdauen konnten die Ursache der Probleme bei der Genotypisierung ebenfalls nicht aufklären. Sie lieferten jedoch Hinweise dafür, dass es bei der homologen Rekombination des Vektors ins Genom möglicherweise zu einer fehlerhaften Integration gekommen sein könnte (Ergebnisse in Kooperation mit Frau Dr. Mohr, Daten nicht gezeigt). Daher konnte das oben beschriebene Maus-Modell nicht in dieser Arbeit verwendet werden. Damit war die Grundvoraussetzung zur Klärung der anstehenden Fragen nicht mehr gewährleistet. Aufgrund dessen verschob sich der Fokus dieser Arbeit. Verschiedene experimentelle Methoden die 17 β -Estradiolsynthese in Neuronen zu vermindern sollten getestet und verglichen werden. Mit diesen Methoden sollte dann untersucht werden, wie sich die verringerte 17 β -Estradiolkonzentration auf die Synthese verschiedener prä- und postsynaptischer Proteine und die Synapsenanzahl auswirkt. Hierzu wurde zum einen die pharmakologische Hemmung der Aromatase mittels verschiedener Präparate aus der Brustkrebstherapie, so genannte Aromataseinhibitoren, angewendet. Zum anderen wurde die Synthese des Steroidhormons durch genomische Manipulation der Aromatase verringert. Hierzu wurden verschiedene Methoden der RNA-Interferenz angewendet.

3.2. Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die 17 β -Estradiolsynthese in hippocampalen Dispersionskulturen

Vorhergehende Studien (Prange-Kiel et al., 2003; Fester et al., 2011; Fester et al., 2012a) haben gezeigt, dass hippocampale Neurone 17 β -Estradiol *de novo* synthetisieren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der potente, nicht steroidale Aromataseinhibitor Letrozol zu einer Reduktion des im Mediumüberstand gemessenen 17 β -Estradiols in hippocampalen Dispersionskulturen (Fester et al., 2006; Prange-Kiel et al., 2003), sowie Schnittkulturen führt (Kretz, 2004). Die gemessenen 17 β -Estradiol-Konzentrationen in Mediumüberständen aus Dispersionskulturen variieren nach Literaturlage stark. Kontrollwerte liegen in der Publikation von Fester und Kollegen (Fester et al., 2006) bei 87,6 pg/ml und für

Letrozol [100 nM] signifikant verschieden bei 56,1 pg/ml. Bei Kretz (Kretz et al., 2004) liegen die Kontrollwerte bei 95 pg/5 ml und die nach Letrozol [100 nM] signifikant niedriger bei 90 pg/5 ml. Somit schwankt der Synthesereduzierende-Effekt von Letrozol in Dispersionskulturen laut der Literatur von 36 % bis 7 %.

Obwohl die Aromataseinhibitoren der dritten Generation seit gut 20 Jahren in der Behandlung von Mammakarzinom (MC) zum Einsatz kommen, ist ein direkter Vergleich ihrer estrogenspiegelreduzierenden Wirkung *in vitro* bis jetzt weitgehend ausgeblieben. Wenige *in vivo* Studien vergleichen die Potenz verschiedener Inhibitoren und ein indirekter Vergleich ist aufgrund unterschiedlicher Studiendesings und Stichproben nur bedingt möglich.

Aufgrund des bereits beschriebenen Einflusses von 17 β -Estradiol auf Neuronen, kommen Aromataseinhibitoren, neben ihrem Einsatz in der Brustkrebstherapie, vor allem bei experimentellen Untersuchungen zum Einfluss von 17 β -Estradiol auf Neuronen zum Einsatz. Besonders in diesem Zusammenhag ist ein direkter Vergleich der verschiedenen Atomataseinhibitoren bis jetzt ausgeblieben.

Um die Auswirkungen der verschiedenen Aromataseinhibitoren auf die 17 β -Estradiolsekretion ins Kulturmedium zu vergleichen wurden hippocampale Dispersionskulturen hergestellt und für drei Wochen ohne jegliche Behandlung kultiviert. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt gelten die Neuronenkulturen bereits als matur (Dotti et al., 1988). Hervorzuheben ist, dass das Kulturmedium hierbei wie bei allen Experimenten frei von Estrogen ist. Nach dieser Vorkultur von drei Wochen wurden die Neuronen für eine Woche alle zwei Tage mit Aromataseinhibitoren gleicher Konzentration behandelt und hierbei das Medium im Austausch gegen frisches gesammelt. Das Medium aus acht Kulturnapfen einer Behandlung (jeweils vier aus zwei Dispersionskulturen) wurde dabei gepoolt um genug Medium für die 17 β -Estradiolmessung mittels ELISA zu erhalten.

Wie in Abbildung 9 zu sehen, zeigen die Messungen, dass die hippocampalen Neurone 17 β -Estradiol synthetisieren und ins Kulturmedium sezernieren. Im Medium der Kontrollgruppe befanden sich $78,96 \pm 3,74$ pg/5 ml 17 β -Estradiol. Die Behandlung mit Letrozol und Anastrozol führt zu einer signifikanten Reduktion des 17 β -Estradiolspiegels im Medium auf 51,28 pg/5 ml bzw. 45,7 pg/5 ml (Abbildung 9). Dies entspricht einer Verringerung gegenüber der Kontrolle um ca. 35 % bzw. 42 %. Auch Fadrozol führt zu einer Verminderung des 17 β -Estradiolspiegels, welche mit $-14,55 \pm 0,03$ % jedoch nicht signifikant ist.

Letrozol und Anastrozol erweisen sich somit in ihrer Potenz die 17 β -Estradiolsezernierung ins Medium zu reduzieren als gleichwertig und gegenüber Fadrozol als potenter.

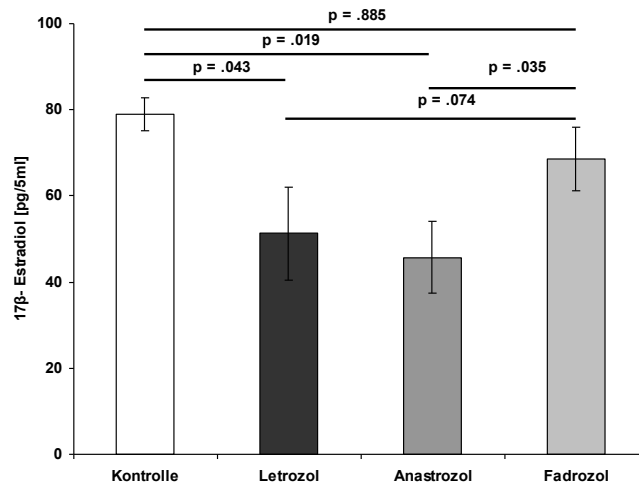


Abbildung 9: Verringerte 17β-Estradiolsynthese in Dispersionskulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren. Dispersionskulturen (E18 + 21 Tage *in vitro*) wurden für die Dauer einer Woche mit Aromataseinhibitoren behandelt. Das Medium von insgesamt acht Kulturnapfen je Inhibitor wurde hierbei gepoolt. Der 17β-Estradiolspiegel der Kontrolle beträgt 78,9 pg/5ml ± 3,7 pg. Die Gabe von Anastrozol verringert die 17β-Estradiolkonzentration signifikant um 42,13 % [45,69 pg/5ml]. Letrozol führt ebenfalls zu einer signifikanteren Reduktion um 35,06 % [51,28 pg/5ml], lediglich Fadrozol weist mit 13,17 % eine nicht signifikante Abnahme der 17β-Estradiolkonzentration auf. Letrozol und Anastrozol sind im direkten Vergleich untereinander mit einem p-Wert von 0,65 nicht verschieden. Alle Daten sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA + LSD; Konfidenzintervall ≤ 0,5

3.3. Synaptische Proteine in hippocampalen Dispersionskulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren

Nachdem der 17β-Estradiol-reduzierende Effekt der verschiedenen Aromataseinhibitoren untersucht wurde, sollte als nächstes der Einfluss der durch die verschiedenen Inhibitoren reduzierten 17-β Estradiolsynthese auf Neurone, im Speziellen auf ihre Synapsen, analysiert werden. Um den Einfluss der Aromataseinhibitoren auf ausdifferenzierte, mature hippocampale Neurone zu untersuchen und zu vergleichen, wurden 21 Tage alte dissoziierte Neurone über den Zeitraum von einer Woche mit den verschiedenen Aromataseinhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Markerproteine für die Prä- und Postsynapse (Synaptophysin und Synaptopodin) analysiert.

Vorhergegangene Experimente in der Arbeitsgruppe zeigten einen direkten Zusammenhang in der Anzahl der synaptophysin- und synaptopodinpositiven, punktuellen Färbungen entlang des Dendritenbaumes eines Neurons und der Intensität der Immunreaktivität im Soma des entsprechenden Neurons. Nahm in

einem Experiment die Anzahl der Synaptopodinpunkte entlang der Dendriten ab, so nahm die gemessene Immunreaktivität vom Synaptopodin bzw Synaptophysin in gleichem Maße auch im Perikaryon ab (Fester, persönliche Kommunikation). Daher wurde in den folgenden Experimenten jeweils die Immunreaktivität der synaptischen Markerproteine im Perikaryon gemessen und durch die gemessene Fläche dividiert.

3.3.1. *Synaptophysinexpression nach Inhibition der Aromatase in Dispersionskulturen*

Bei der visuellen, morphologischen Begutachtung der Neurone anhand der verschiedenen Färbungen im Bezug auf die Ausbildung der Dendritenbäume und die Verteilung der Färbungen innerhalb der Neurone waren keine Veränderungen in Abhängigkeit zu den verschiedenen Versuchsgruppen auffällig (Abbildung 10 und Abbildung 13).

Abbildung 10 zeigt Übersichtsaufnahmen einzelner hippocampaler Neurone der Dispersionskulturen. Neurone wurden anhand ihrer positiven MAP2-Immunfärbung (zweite Zeile in Abbildung 10) identifiziert. Darüber hinaus diente die MAP2-Immunfärbung weiter der visuellen Beurteilung der Neurone. Hierbei wurde das Augenmerk vor allem auf die Struktur des Dendritenbaumes gelegt. Die Synaptophysin-Immunfärbung ist in der ersten Spalte der Abbildung 10 zu sehen. Man kann eine Färbung im Soma und den Dendriten der Neurone erkennen. Dies wird nochmals in der Überlagerung der Synaptophysin- und MAP2-Färbung (Bilder D,H,L und P) als gelblich rote Färbung deutlich.

Die konfokalen Detailaufnahmen der Neurone (Abbildung 11 A bis H) zeigen ein genaueres Bild. Die beispielhaften Bilder der ersten Zeile (Bilder A bis D) zeigen die MAP2-Immunfärbung, die keine erkennbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen zeigt. In der darunter liegenden Zeile (Bilder E bis H) ist die Synaptophysin-Immunfärbung nach den verschiedenen Behandlungen gezeigt. Hier ist mit bloßem Auge eine Zunahme der Immunintensität nach Aromataseinhibitoren (Bilder F bis H) gegenüber unbehandelten Neuronen (E) zu erkennen. Weiter scheint die Synaptophysinfärbung nach Applikation der Aromataseinhibitoren verstärkt in den Randbereichen des Soma aufzutreten.

Die Bilder I bis L zeigen die in den darüber liegenden Zeilen abgebildeten Neurone in geringerer Vergrößerung. In der Überlagerung von Synaptophysin und MAP2 sind auf diesen Bildern die synaptophysinpositiven Punkte entlang der Dendriten

erkennbar, welche nach der Inhibition der Aromatase (Bilder J bis L) gegenüber der Kontrolle (Bild I) zunehmen.

Die in Abbildung 11 M dargestellte quantitative Auswertung von insgesamt 844 Neurone aus vier unabhängigen Experimenten ergibt für die mit Letrozol behandelten Neurone einen höchst signifikanten Anstieg der Synaptophysin-Immunreaktivität um 30 %. Die Behandlung mit Fadrozol und Anastrozol führte jeweils zu einem höchst signifikanten Anstieg um ca. 19 %.

Die zur Validierung der Immunfluoreszenz-Ergebnisse durchgeführten Immunoblots und ihre Analyse (Abbildung 12) bestätigen den Anstieg von Synaptophysin auch auf der Ebene der Proteinexpression. Anastrozol zeigt mit 17 % die stärkste, obgleich nicht signifikante Zunahme, gefolgt von Letrozol und schließlich Fadrozol (10 % und 7 %).

Es zeigt sich, dass sowohl die Analyse der Synaptophysin-Immunreaktivität als auch die der Immunoblots zumindest tendenziell, aber nicht signifikant auf ein vermehrtes Vorhandensein von Synaptophysin nach Inhibition der Aromatase hinweisen. Allerdings ist das Bild für die verschiedenen Aromataseinhibitoren im Hinblick auf ihre Effektstärke nicht eindeutig.

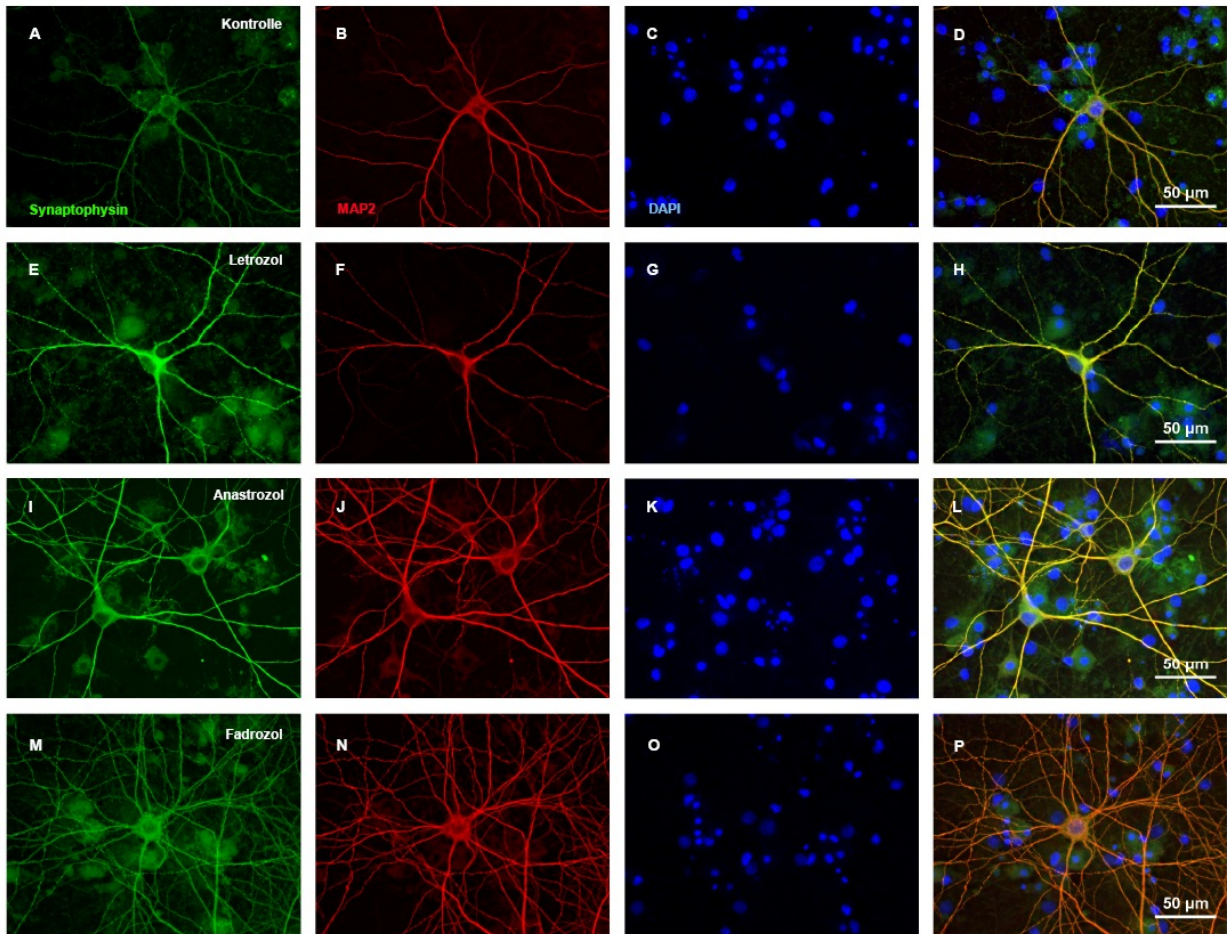


Abbildung 10: Immunreaktivität von Synaptophysin in Dispersionskulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren (Übersicht). Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen repräsentative Neurone (E18 + 21 Tage *in vitro*) nach einwöchiger Applikation von Aromataseinhibitoren. Es wurden keine Unterschiede in der Vitalität der Neurone nach Applikation der verschiedenen Aromataseinhibitoren festgestellt. Die Bilder **A-D** zeigen die Kontrolle, **E-H** Letrozol, **I-L** Anastrozol, **M-P** Fadrozol. Neurone wurden anhand ihrer positiven MAP2-Immunreaktivität (rot) identifiziert. Eine Zunahme der Synaptophysin-Immunreaktivität gegenüber der Kontrolle ist für alle drei Bahnadlungen mit Aromataseinhibitoren zu erkennen, wobei diese nach Letrozol-Applikation am stärksten ist. Die Bilder **C, G, K, O** zeigen Kernfärbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Bilder **D, H, L, P** zeigen eine Überlagerung aller vorherigen Bilder einer Reihe

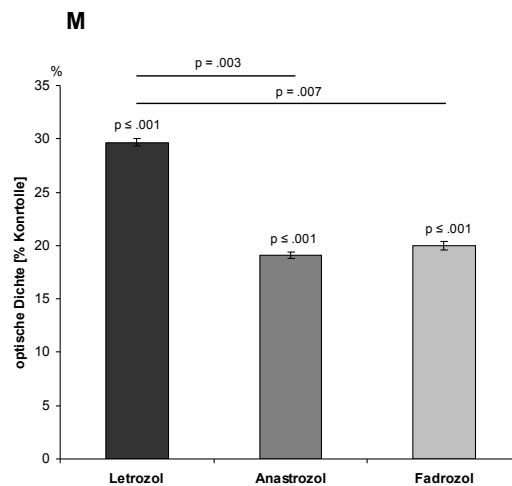
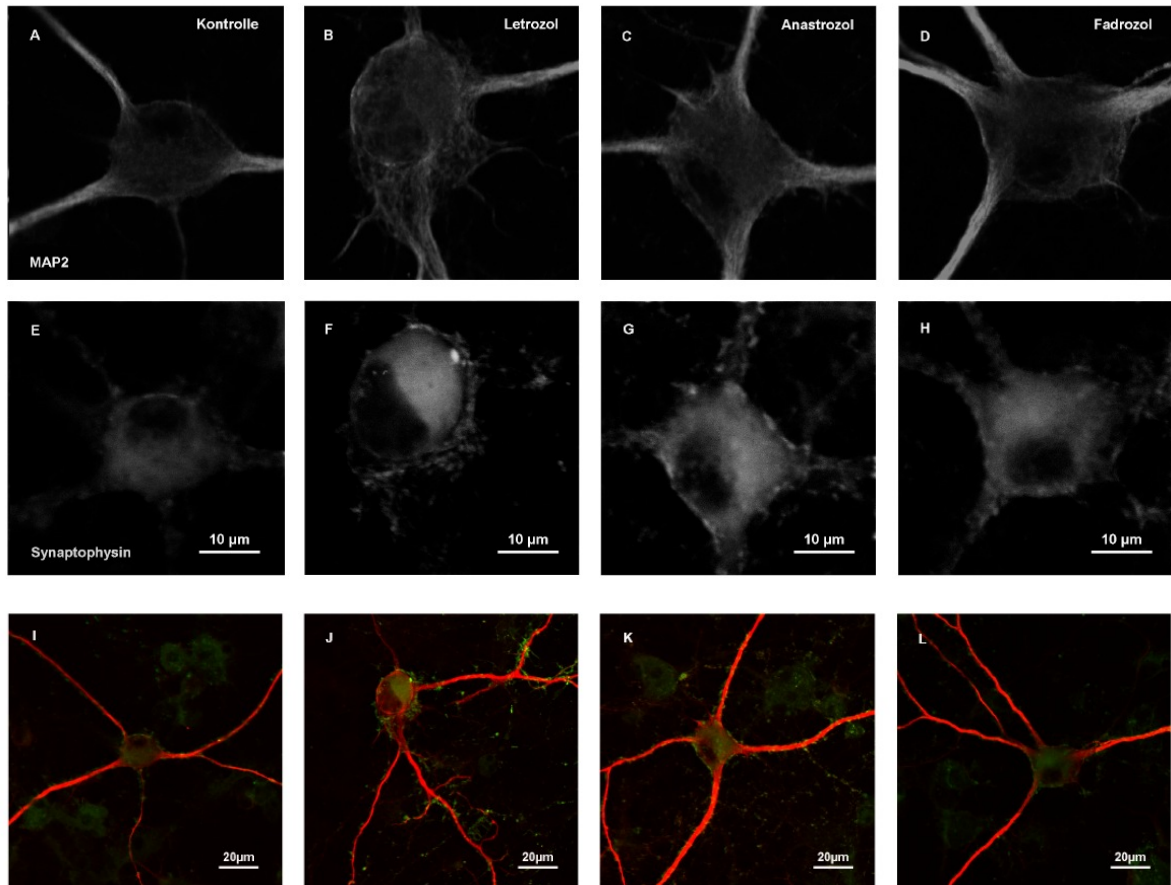


Abbildung 11: Quantifizierung der Synaptophysin-Immunreaktivität in hippocampalen Neuronen nach Inkubation mit Aromataseinhibitoren. Hippocampale Dispersionskulturen (präpariert an E18 + 21 Tage *in vitro* Vorkultur) wurden für eine Woche alle zwei Tage mit Aromataseinhibitoren behandelt und anschließend die Fluoreszenzintensität mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen. Die Bilder **E-H** zeigen exemplarisch die Synaptophysin-Immunreaktivität nach der Behandlung mit den Aromataseinhibitoren und die Bilder **A-D** die MAP2-Immunreaktivität. Die Bilder **A+E** zeigen die Kontrolle, **B+F** Letrozol, **C+G** Anastrozol, **D+H** Fadrozol. Neurone wurden anhand ihrer MAP2-positiven Immunreaktivität identifiziert. In allen Versuchsgruppen ist eine deutliche Synaptophysinfärbung zu erkennen. Die Bilder **I-L** zeigen Überlagerungen der Z-Projektionen der Synaptophysin- und MAP2-Färbungen der verschiedenen Versuchsgruppen in der Übersicht. Bei genauer Betrachtung kann man die veränderte Anzahl der synaptophysinpositiven Punkte entlang der Dendriten in Abhängigkeit zur Behandlung erkennen. Abbildung (**M**) zeigt die quantitative Auswertung der Färbungsintensitäten. Letrozol führt zu einer hoch signifikante Zunahme der

Immunreaktivität um nahezu 30 %. Anastrozol und Fadrozol führten ebenfalls zu einer hoch signifikanten Zunahme der Immunreaktivität um ca. 18 %. Insgesamt wurden 844 Neurone aus vier unabhängigen Kulturen analysiert. Angegeben sind jeweils die mittleren prozentualen Unterschiede der Behandlungen gegenüber dem 0-Wert (Kontrolle). Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA + LSD; Konfidenzintervall $\leq 0,5$.

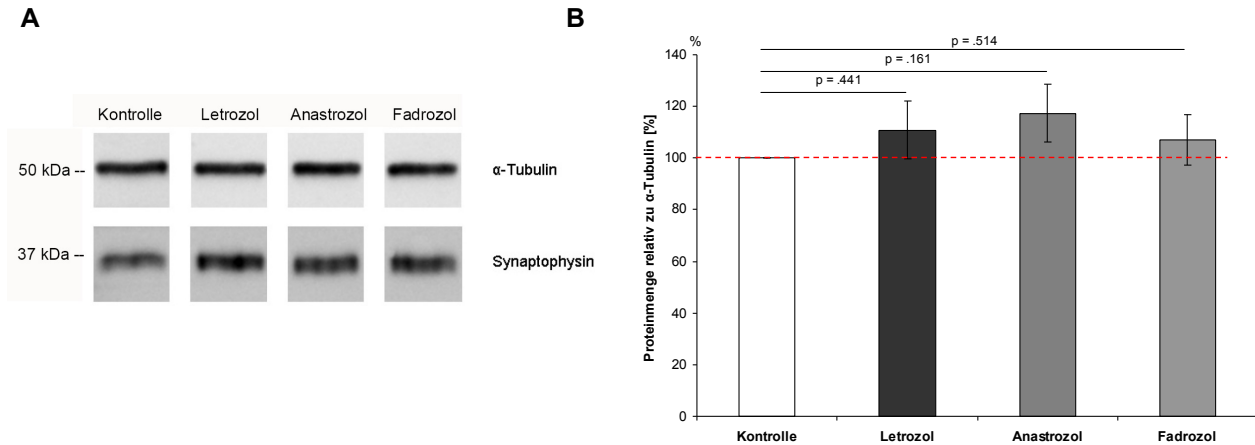


Abbildung 12: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptophysin-Proteinmenge. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus hippocampalen Dispersionskulturen (präpariert an E18 + 21 Tage *in vitro* Vorkultur) nach sieben Tagen Behandlung. Der Immunoblot zeigt Synaptophysin und α -Tubulin für die unterschiedlichen Versuchsgruppen. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Größenstandarts angegeben. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. (B) Die quantitative Analyse der Immunoblots (n=13) zeigt eine nicht signifikante Zunahme der Synaptophysin-Menge nach der Applikation der Aromataseinhibitoren im Vergleich zur Kontrolle (100 %). Alle Daten zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen dem SEM: ANOVA+ Bonferroni; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

3.3.2. Synaptopodinexpression nach Inhibition der Aromatase in Dispersionskulturen

Um den Einfluss der Aromataseinhibitoren auch auf den postsynaptischen Teil der Synapsen zu untersuchen, wurde die Immunreaktivität des postsynaptischen Markerproteins Synaptopodin (wie Synaptophysin in Abschnitt 3.3.1) untersucht. Synaptopodin ist ein postsynaptisches, Aktin-assoziiertes Protein, welches hauptsächlich in *Mushroom*-Spines vorkommt. Dort ist es an interne Calciumspeicher wie den Spinapparat assoziiert. Damit markiert Synaptopodin überwiegend mature, auch als „Gedächtnis-“ Spines bezeichnete Strukturen (Fester et al., 2012b). (Für eine detaillierte Beschreibung von Synaptopodin siehe Abschnitt 1.4) Unter der Annahme, dass die Immunreaktivität von Synaptophysin und Synaptopodin ein Korrelat für die Anzahl bestehender Synapsen darstellt, wäre in

Anlehnung an die Hebb'sche Regel¹ zu erwarten, dass die postsynaptische Zelle die Synaptopodinexpression in ähnlicher Weise nach Aromataseinhibitorapplikation verändert, wie die präsynaptische Zelle Synaptophysin.

Abbildung 13 zeigt exemplarische Übersichtsaufnahmen einzelner hippocampaler Neurone der Dispersionskulturen. Neurone wurden anhand ihrer positiven MAP2-Immunfärbung (Abbildung 13 B, F, J, N) identifiziert. Darüber hinaus diente die MAP2-Immunfärbung weiter der bereits zuvor beschriebenen visuellen Beurteilung der Neurone. Die Synaptopodin-Immunfärbung ist in der ersten Spalte der Abbildung 13 zu sehen (Bilder A, E, I, M). Eine Färbung ist in weiten Teilen der Neurone zu erkennen, wobei die Synaptopodinfärbung im Soma am intensivsten ist. Dies wird auch nochmals in der Überlagerung der Synaptopodin- und MAP2-Färbung (Bilder D, H, L, P) als gelblich rote Färbung deutlich.

Die Übersichtsbilder der Synaptopodin-Färbung (Abbildung 13, erste Spalte) zeigen des Weiteren keine Veränderungen im Verteilungsmuster der Synaptopodin-Immunreaktivität innerhalb der Neurone in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe. Eine Veränderung in der Intensität der Synaptopodin Immunreaktivität erscheint erkennbar, wird aber erst quantifizierbar anhand der konfokal aufgenommenen Vergrößerungen (Abbildung 14).

Die Bilder der ersten Spalte (Abbildung 14 A bis D) zeigen die MAP2-Immunfärbung, die erneut keine erkennbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen zeigt. In der darunter liegenden Zeile (Bilder E bis H) ist die Synaptopodin-Immunfärbung nach den verschiedenen Behandlungen in Soma zu sehen. Sie entspricht der von Fester et al. beschriebenen Immunreaktivität (Fester et al., 2013). Hier ist mit bloßem Auge eine Veränderung der Immunintensität nach Applikation der Aromataseinhibitoren (F bis H) gegenüber unbehandelten Neuronen (E) zu erkennen. Die Synaptopodin-Färbungen zeigt eine Intensitätszunahme vor allem für Fadrozol (D) und Letrozol (B). Dies wird durch die quantitative Analyse (I) bestätigt. Diese ergibt einen höchst signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle um ca. 21 % für Fadrozol und ca. 18 % für Letrozol. Für Anastrozol ergibt sich jedoch eine Verringerung der Immunreaktivität um ca. 10 %, welche jedoch nicht signifikant ist. Eine Veränderung der Synaptopodinverteilung innerhalb des Soma in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe ist nicht erkennbar. Die punktuelle Synaptopodinfärbung ist jeweils relativ gleichmäßig über das Soma verteilt

¹ Hebb'sche Regel: Wenn ein Axon der Zelle A Zelle B erregt und wiederholt und dauerhaft zur Erzeugung von Aktionspotentialen in Zelle B beiträgt so resultiert dies in Wachstumsprozessen oder metabolischen Veränderungen in einer oder in beiden Zellen, die bewirken dass die Effizienz von Zelle A in Bezug auf die Erzeugung eines Aktionspotentials in B größer wird

.Die Quantifizierung der Ergebnisse, der zur Validierung der Immunintensitäts-Ergebnisse durchgeführten Immunoblots (Abbildung 15) ergab für Fadrozol eine erhöhte Synaptopodin-Proteinexpression von ca. 41 %, welche jedoch knapp oberhalb des Signifikanzniveaus liegt. Letrozol führt ebenfalls zu einer Zunahme (+ 28 %). Der schwächste Anstieg ist mit 13 % nach Inkubation mit Anastrozol zu sehen.

Zusammengenommen deuten die immunzytochemischen Intensitätsanalysen und die Immunoblots übereinstimmend darauf hin, dass sowohl Letrozol als auch Fadrozol zu einer erhöhten Menge an Synaptopodin Dispersionskulturen in Folge der Inhibition der 17- β Estradiolsynthese führen. Anastrozol zeigt den geringsten Effekt auf die detektierbare Menge an Synaptopodin mit einer tendenziellen aber nicht signifikanten Abnahme.

Der Vergleich der Effekte der Aromataseinhibitoren auf präsynaptischer und postsynaptischer Seite zeigt kein einheitliches Bild. Letrozol und Fadrozol führen sowohl für Synaptophysin als auch für Synaptopodin stets zu einer Zunahme. Diese ist für die Auswertung der Immunreaktivität auch immer höchst signifikant. Anastrozol hingegen führt zu einer Zunahme von Synaptophysin, in der Immunreaktivitätsanalyse von Synaptopodin jedoch tendenziell zu einer Abnahme.

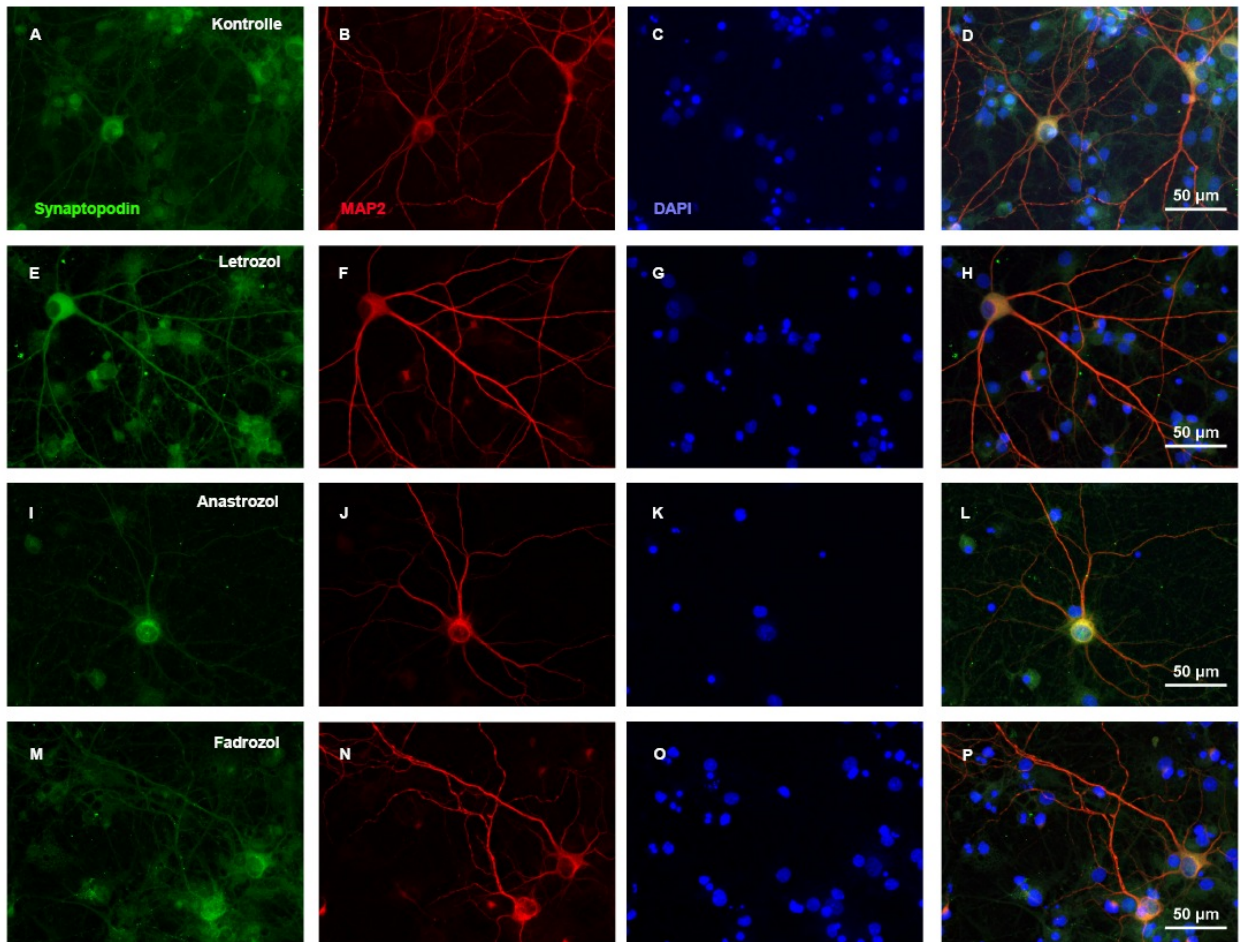


Abbildung 13: Immunreaktivität von Synaptopodin in Dispersionskulturen nach Applikation verschiedener Aromataseinhibitoren (Übersicht). Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen repräsentative Neurone (E18 + 21 Tage *in vitro*) nach einwöchiger Applikation von Aromataseinhibitoren. Es wurden keine Unterschiede in der Vitalität der Neurone nach Applikation der verschiedenen Aromataseinhibitoren festgestellt. **(A-D)** Kontrolle **(E-H)** Letrozol **(I-L)** Anastrozol **(M-P)** Fadrozol. Neurone wurden anhand ihrer positiven MAP2-Immunreaktivität (rot) identifiziert. Eine Zunahme der Synaptopodin-Immunreaktivität gegenüber der Kontrolle ist bei Behandlungen mit Letrozol und Fadrozol zu erkennen. Die Bilder C, G, K, O zeigen Kernfärbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Bilder D, H, L, P zeigen eine Überlagerung aller vorherigen Bilder einer Reihe

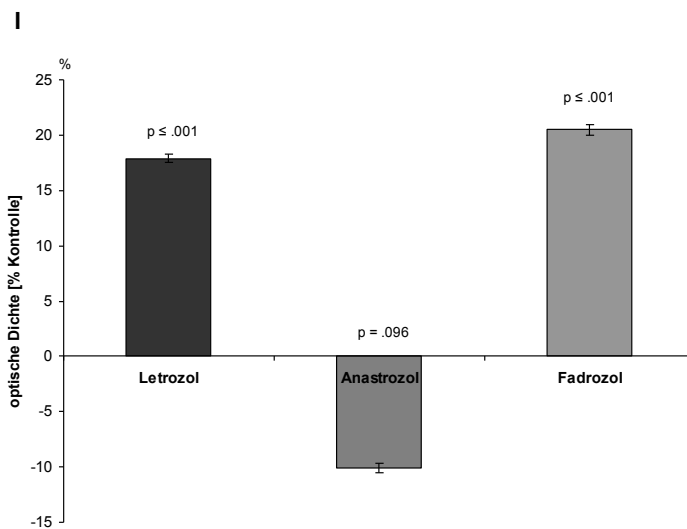
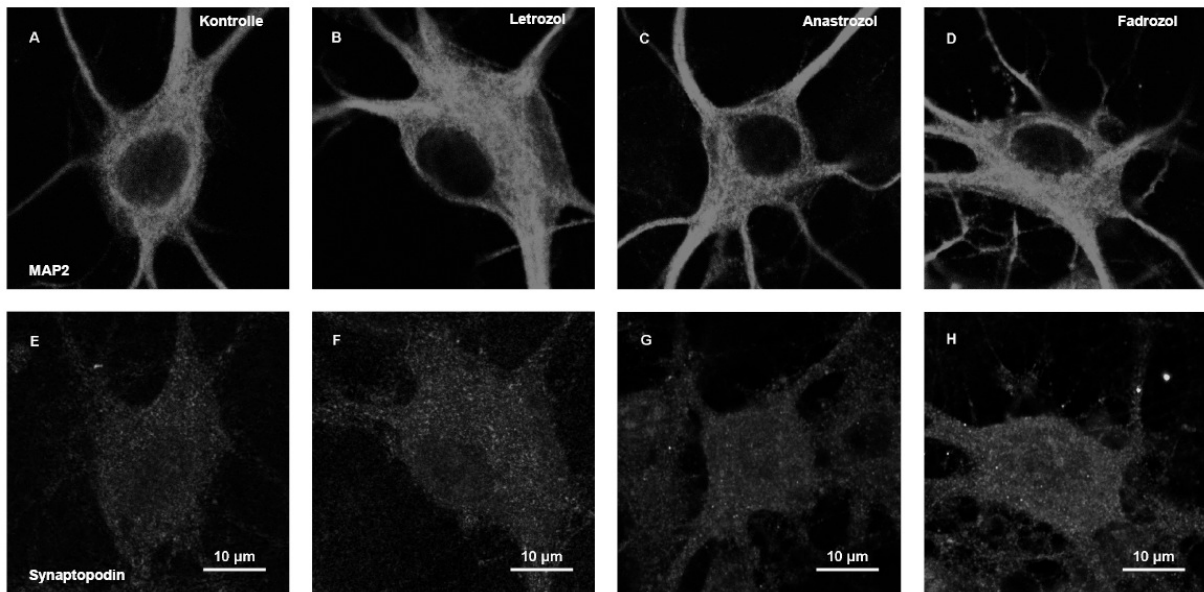


Abbildung 14: Quantifizierung der Synaptopodin-Immunreaktivität in hippocampalen Neuronen nach Inkubation mit Aromataseinhibitoren. Dispersionskulturen (präpariert an E18 + 21 Tage *in vitro* Vorkultur) wurden für eine Woche alle zwei Tage mit Aromataseinhibitoren behandelt und anschließend die Fluoreszenzintensität von Synaptophysin mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen. Die Bilder zeigen repräsentativ die Synaptopodin-Immunreaktivität unterschiedlich behandelter Neurone (**E-H**) und die MAP2-Immunreaktivität (**A-D**). Die Bilder **A+E** zeigen die Kontrolle, **B+F** Letrozol, **C+G** Anastrozol, **D+H** Fadrozol. Neurone wurden anhand ihrer MAP2-positiven Immunreaktivität identifiziert. In allen Versuchsgruppen ist eine punktuelle Synaptopodinfärbung zu erkennen. Gegenüber der Kontrolle ist eine Zunahme der Immunreaktivität nach Letrozol (F) und Fadrozol (H) erkennbar. Anastrozol (G) zeigt einen leichten Rückgang der Synaptopodin-Immunreaktivität. (I) Die quantitative Auswertung ergab eine hoch signifikante Zunahme der Synaptopodin-Immunreaktivität nach Letrozol und Fadrozol von 17 % bzw. 21 % gegenüber der Kontrolle. Anastrozol führte zu einer nicht signifikanten Reduktion um 10 %. Insgesamt wurden 796 Neurone aus vier unabhängigen Kulturen analysiert. Angegeben sind jeweils die mittleren prozentualen Unterschiede der Behandlungen gegenüber der Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA + LSD; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

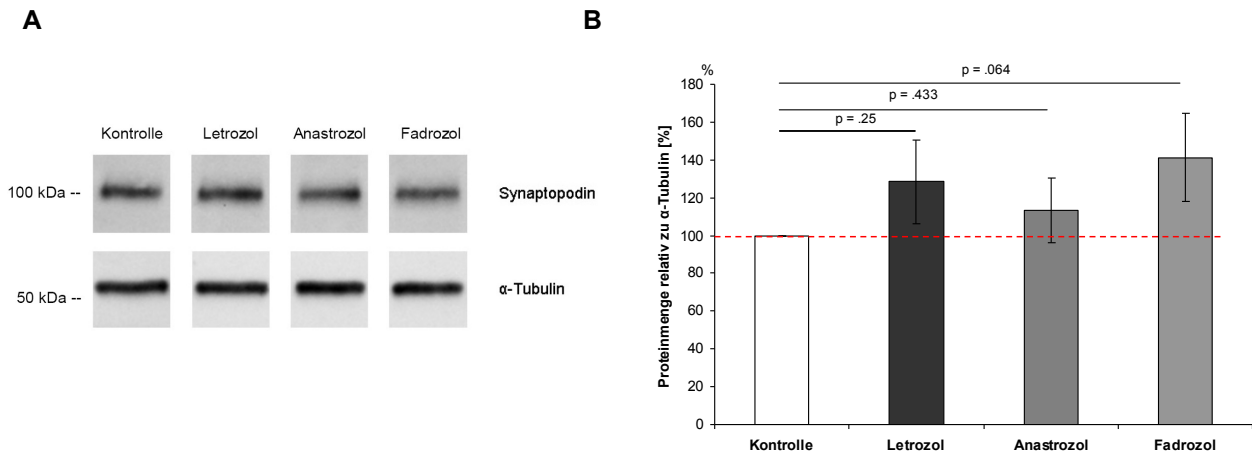


Abbildung 15: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptopodin-Proteinmenge in Dispersionskulturen. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus hippocampalen Dispersionskulturen (E18 + 21 Tage *in vitro*) nach sieben Tagen Behandlung. Der Immunoblot zeigt die Proteinmenge von Synaptopodin-short und α -Tubulin für die jeweilige Versuchsgruppe. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Größenstandarts angegeben. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. **(B)** Die quantitative Analyse der Immunoblots (n= 9) zeigt einen Anstieg der Synaptopodin-Menge bei allen Aromataseinhibitoren, der jedoch nicht signifikant ist. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen dem SEM, ANOVA+ Bonferroni; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

3.4. Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synapsendichte in hippocampalen Schnittkulturen.

Nachdem die verschiedenen Aromataseinhibitoren im Bezug auf ihre 17- β Estradiol-reduzierende Potenz und dessen Einfluss auf die prä- und postsynaptischen Markerproteine in Dispersionskulturen verglichen wurden, wurde im Folgenden untersucht wie diese in hippocampalen Schnittkulturen wirken. Schnittkulturen spiegeln im Vergleich zu Dispersionskulturen eine *in vivo* Situation besser wieder, da sie über funktionelle synaptische Verbindungen verfügen und sich in einem intakten Gewebeverband befinden. Einzig die Afferenzen und Efferenzen wurden in den Schnittkulturen unterbrochen. Damit stellen Sie ein erweitertes Modellsystem dar und ermöglichen es, den Einfluss der verschiedenen Aromataseinhibitoren auf Neurone in Abhängigkeit ihrer Verbindungen zu untersuchen.

Vorherige Studien zeigten, dass eine Reduktion des 17 β -Estradiolspiegels, sei es durch Schwankungen während des Zyklus, Ovariectomie oder Administration von potenten Aromataseinhibitoren zu einer Reduktion der Spinesynapsen-Anzahl sowohl *in vivo* als auch *in vitro* führte (Woolley und McEwen, 1993; Woolley et al., 1990; Zhou et al., 2010b; Fester et al., 2012b; Prange-Kiel et al., 2008; Fester et al., 2006). Zudem zeigen unterschiedliche Publikationen, dass Frauen die im Zuge ihrer

Brustkrebstherapie mit estrogenspiegelsenkenden Aromataseinhibitoren behandelt wurden über verschiedene Beeinträchtigungen ihrer Gedächtnisleistung berichten (Phillips und Bernhard, 2003; Jenkins et al., 2004; Bender et al., 2007).

Einhergehend mit diesen Beobachtungen zeigt eine Vielzahl von Publikationen ebenfalls einen positiven Einfluss von Estradiol auf die Generierung von LTP (*long term potentiation*), was ein elektrophysiologischer Parameter für Gedächtnis ist und zur Zunahme von Spinesynapsen führt (Smith, 2005; Tarpey et al., 2009; Mendez et al., 2011). Die Gabe von Letrozol hingegen führt in Experimenten mit Mäusen zu einem Rückgang des LTP (Vierk et al., 2012) und zu einer Verringerung der Spinesynapsen Anzahl (Kretz, 2004; Zhou et al., 2010b).

Da es bisher keinen direkten Vergleich verschiedener Aromataseinhibitoren in Bezug auf deren Einfluss auf die Spinesynapsen Anzahl im Hippocampus gab, wurden organotypische, hippocampale Schnittkulturen angefertigt und nach einer Kulturzeit von vier Tagen alle zwei Tage für die Dauer einer Woche mit den Aromataseinhibitoren Letrozol, Anastrozol und Fadrozol (jeweilige Konzentration 100 nM) behandelt. Nach der Behandlung wurde die Spinesynapsen Dichte anhand von EM-Aufnahmen stereologisch ermittelt. Dazu kam ein in der AG Rune gängiges Verfahren zur Anwendung (Prange-Kiel et al., 2004; Braendgaard und Gundersen, 1986; Sterio, 1984)

Für die Kontrollgruppe wurde eine Synapsendichte von $12,3 \pm 0,49$ Synapsen per $6,4 \mu\text{m}^3$ ermittelt und gleich 100 % gesetzt. Verglichen mit der Kontrolle führten alle Aromatasehemmer zu einer Reduktion der Synapsendichte, jedoch nur Letrozol ($-22,53 \pm 0,05$ %) und Fadrozol ($-23,48 \pm 0,06$ %) sind signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. Anastrozol führte lediglich zu einer Reduktion um $-9,3 \pm 0,04$ %.

Bei der genaueren Untersuchung der EM-Bilder (Abbildung 16 A) sind keine morphologischen Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen zu erkennen. Intakte Spinesynapsen sind bei allen Versuchsgruppen erkennbar (Pfeile) und auch die anderen Zellorganellen sind in ihrer Morphologie unverändert.

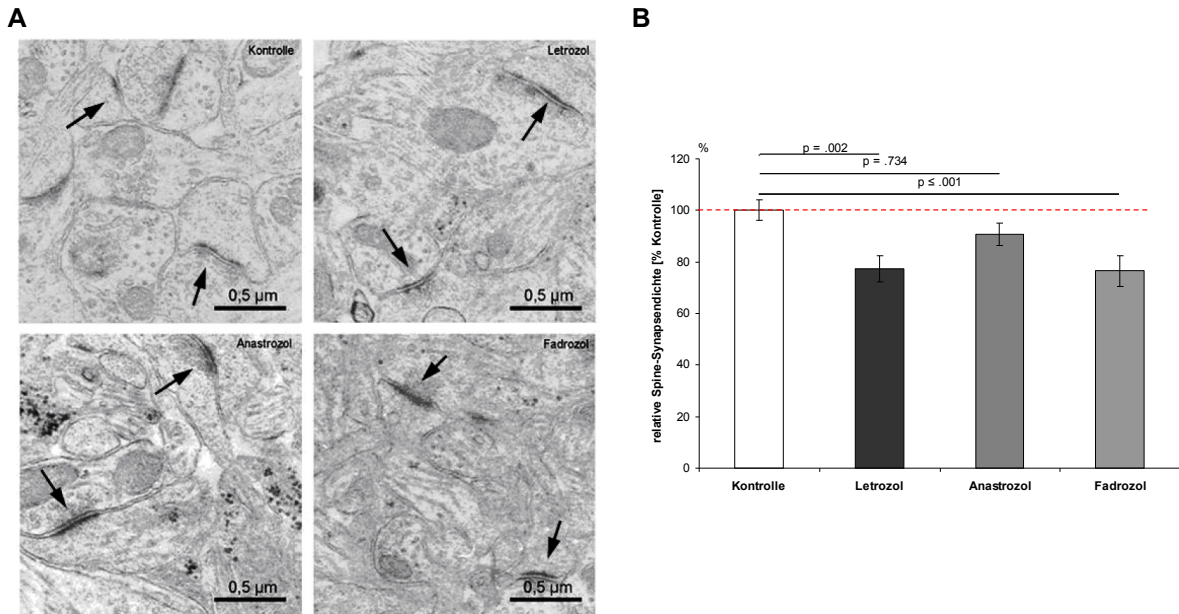


Abbildung 16: Morphologie und Spinesynapsen-Dichte hippocampaler Schnittkulturen nach Behandlung mit verschiedenen Aromataseinhibitoren. Die Hippocampalen Schnitte (präpariert an P0 + vier Tage *in vitro* Vorkultur) wurden für eine Woche alle zwei Tage mit den Aromataseinhibitoren Letrozol, Anastrozol und Fadrozol behandelt. (A) Exemplarische EM-Aufnahmen des *Stratum radiatum* in der CA1 Region des Hippocampus. Morphologisch intakte Spine-Synapsen (vergleiche Abbildung 6) wurden bei allen Versuchsgruppe gefunden und sind durch Pfeile gekennzeichnet. Diese unterscheiden sich nach der Behandlung morphologisch nicht von den Kontrollen. (B) Stereologische Analyse der Spinesynapsen-Dichte im *Stratum radiatum* der CA1 Region des Hippocampus. Eine einwöchige Behandlung mit Letrozol und Fadrozol führt zu einer signifikanten Reduktion der Spinesynapsen-Dichte wohingegen Anastrozol nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ist. Angaben in Prozent in Bezug zur Kontrolle. Insgesamt wurden 139 Ausschnitte aus drei unabhängigen Kulturen analysiert. Alle Daten sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA +Bonferroni; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

3.5. Synaptische Proteine in hippocampalen Schnittkulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren

Neben der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Spinesynapsen-Dichte, wurden zusätzlich, wie zuvor in den Dispersionskulturen geschehen, die Markerproteine der Prä- und Postsynapse immunhistochemisch untersucht. Dadurch ist ein differenzierter Vergleich zwischen dem Effekten der Aromataseinhibitoren auf die Gesamtanzahl an Spinesynapsen und auf die Prä- und Postsynapse möglich.

Hierzu wurden hippocampale Schnittkulturen (präpariert an P5 + 4 Tage *in vitro* Vorkultur) für eine Woche mit den verschiedenen Aromataseinhibitoren inkubiert und anschließend fixiert. Die Immunreaktivität von Synaptophysin als präsynaptisches Markerprotein und Synaptopodin als postsynaptisches

Markerprotein im *Stratum. radiatum* der CA1 Region wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen und analysiert. Estrogeninduzierte Veränderungen der Spine-Dichte sind für das *Str. radiatum* der CA1-Region nicht aber der CA3 Region beschrieben (Woolley et al., 1990). Weiter sind regionsspezifische Unterschiede in der 17 β -Estradiolsynthese bekannt, die eine Analyse der Synapsenproteine in der CA1 Region nahe legen. Sowohl in situ Hybridisierungen als auch immunhistochemische Analysen zeigen eine vermehrte Expression von Aromatase in den Pyramidenzellen der CA3 Region des Hippocampus. (Prange-Kiel et al., 2006; Wehrenberg et al., 2001). Um den Einfluss einer durch Aromataseinhibitoren induzierten 17 β -Estradiolreduktion auf Synapsen in diesen Pyramidenzellen zu untersuchen, muss man sich die CA1 Region anschauen. Die Pyramidenzellen der CA3 Region projizieren über ihre Schaffer Kollateralen in das *Str. radiatum* der CA1 Region. Hier bilden sie Synapsen mit den apikalen Dendriten der CA1 Pyramidenzellen. Die Messung von Synaptophysin in der CA1 Region spiegelt somit dessen Expression in Buttons von CA3-Pyramidenzellen wieder. Die hier gemessenen Veränderungen haben ihren Ursprung also in den CA3-Pyramidenzellen, deren Responsivität auf Estradiol bereits gezeigt wurde.

3.5.1. *Synaptophysinexpression nach Inhibition der 17 β -Estradiolsynthese durch verschiedene Aromataseinhibitoren in hippocampalen Schnittkulturen*

Um die Synaptophysin-Immunreaktivität in der CA1 Region in hippocampalen Schnitten mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops zu analysieren, wurden in den Schnitten neben Synaptophysin auch die Zellkerne (DAPI) und das Microtubuli-assoziierte-Protein (MAP2) angefärbt. Sowohl die MAP2 als auch die DAPI-Färbung dienen der morphologischen Kontrolle der Schnitte sowie zur Orientierung. In der ersten Spalte der Abbildung 17 ist die DAPI-Färbung zu sehen. In der Übersichtsaufnahme (Abbildung 17 A), die aus mehreren Einzelaufnahmen zusammengesetzt wurde, ist das Körnerzellenband des *Gyrus Dentatus* gut zu erkennen (vergleiche Abbildung 1 in der Einleitung). Ausgehend vom *Gyrus Dentatus* kann man die sich um ihn herum krümmende Pyramidenzellschicht (*Str. pyramidale*) erkennen. Verfolgt man diese, so fällt auf, dass die Zellkerne ab einer bestimmten Stelle (zwischen 2 und 3 Uhr) kleiner und dichter angeordnet sind.

Diese Stelle stellt den Übergang zwischen den Regionen CA3 und CA1 dar. Abbildung 17B zeigt einen Ausschnitt aus der CA1-Region (Markierung in Abbildung 17 A). Im *Str. pyramidale* erkennt man die Anhäufung der Zellkerne, wohingegen im darunter liegenden *Str. radiatum* weniger und nicht so dicht beieinander liegende Zellkerne zu sehen sind. Dies ist der Bereich, der bei den Aufnahmen von Interesse ist, da sich hier die dendritischen Felder der Pyramidenzellen befinden. Abbildung 17C zeigt diesen nochmals in der Vergrößerung.

Die MAP2-Färbung zeigt die Dendriten der Neurone und diente der Orientierung, viel mehr aber der morphologischen Bewertung jedes Schnittes und somit der Kontrolle, ob die Dendriten nach der Behandlung keine morphologischen Veränderungen aufweisen und der Kontrolle entsprechen. In Ausschnitt H sieht man beispielhaft die durch MAP-2 angefärbten apikalen Dendriten, welche vom *Str. pyramidale* ausgehend in das *Str. radiatum* ziehen und zueinander parallel verlaufen. Ausschnitt I zeigt dies nochmals in der Vergrößerung. Die Bilder D bis F in Abbildung 17 zeigen die Synaptophysin-Färbung.

Synaptophysin ist ein Glycoprotein der synaptischen Vesikel in Neuronen, welches auf Grund seines steten Vorhandenseins in der Präsynapse zu dessen Verwendung als präsynaptisches Markerprotein geführt hat.

In Abbildung 17 D sieht man die Synaptophysinverteilung über den gesamten Hippocampuschnitt. Eine stärkere und breitere Synaptophysinfärbung der CA3 Region gegenüber der CA1 Region ist erkennbar. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen (Rune et al., 2002). Beim Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen fielen keine Unterschiede in diesem Verteilungsmuster auf. Ebenfalls konnten anhand der DAPI und MAP-2-Färbungen keine augenscheinlichen Unterschiede in der Morphologie der hippocampalen Schnitte in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe beobachtet werden.

Die Vergrößerungen der Synaptophysinfärbung (Abbildung 17 E und F) zeigen eine punktuierete Färbung. Die zur quantitativen Analyse benutzten konfokal aufgenommenen Bilder sind exemplarisch in Abbildung 18 zu sehen. In Ausschnitt E ist zu sehen, dass die Intensität mit zunehmender Entfernung vom *Str. pyramidale* abnimmt.

Die Überlagerungen der aller Färbungen sind in den Bildern J bis L gezeigt. Besonders in der hohen Vergrößerung (Abbildung 17 L) erkennt man, dass die Synaptophysin-Färbung besonders entlang der apikalen Dendriten auftritt. Dies spricht dafür, dass es sich hierbei um Synapsen handelt.

In Abbildung 18 sieht man beispielhaft die mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops aufgenommenen und für die Analyse der Synaptophysin-

Immunreaktivität verwendeten Bilder der verschiedenen Versuchsgruppen. Bei der Betrachtung der Synaptophysin-Immunreaktivität im *Str. radiatum* der CA1 Region (Abbildung 18) sieht man die zuvor in Abbildung 17 E und F erwähnte punktuierete Synaptophysinfärbung. Man erkennt, dass die Immunreaktivität der Synaptophysinfärbung nach der Inkubation mit den verschiedenen Aromataseinhibitoren mit bloßem Auge sichtbar gegenüber der Kontrolle zunimmt. Weiter sieht man, dass die Synaptophysin-Färbung, die in Abbildung 17 I zu sehen ist, die apikalen Dendriten und deren Verlauf nachzeichnet.

Die quantitative Auswertung der konfokalen Bilder (Abbildung 18 E) zeigt eine tendenzielle Zunahme der Synaptophysin-Immunreaktivität nach Aromataseinhibition, die sich zwischen 13,5 % für Letrozol, 21 % für Anastrozol und 23,8 % für Fadrozol befindet. Alle Veränderungen sind jedoch gegenüber der Kontrolle statistisch nicht signifikant verschieden.

Neben den Immunreaktivitäten in der CA1 Region wurden zusätzlich Immunoblots der hippocampalen Schnittkulturen angefertigt und die relative Konzentration von Synaptophysin nach der Applikation der Aromataseinhibitoren untersucht. Der Immunoblot (Abbildung 19 A) zeigt deutliche Banden auf der für Synaptophysin üblichen Höhe von 38 kDa. Die quantitative Auswertung (Abbildung 19 B) ergibt eine nach Hemmung der Aromatase durch Anastrozol um 34 % erhöhte, signifikante Expression von Synaptophysin. Auch für Fadrozol zeigt sich eine zwölfprozentige Erhöhung, die jedoch nicht signifikant ist. Nach Letrozol bleibt die Synaptophysinexpression gegenüber der Kontrolle unverändert.

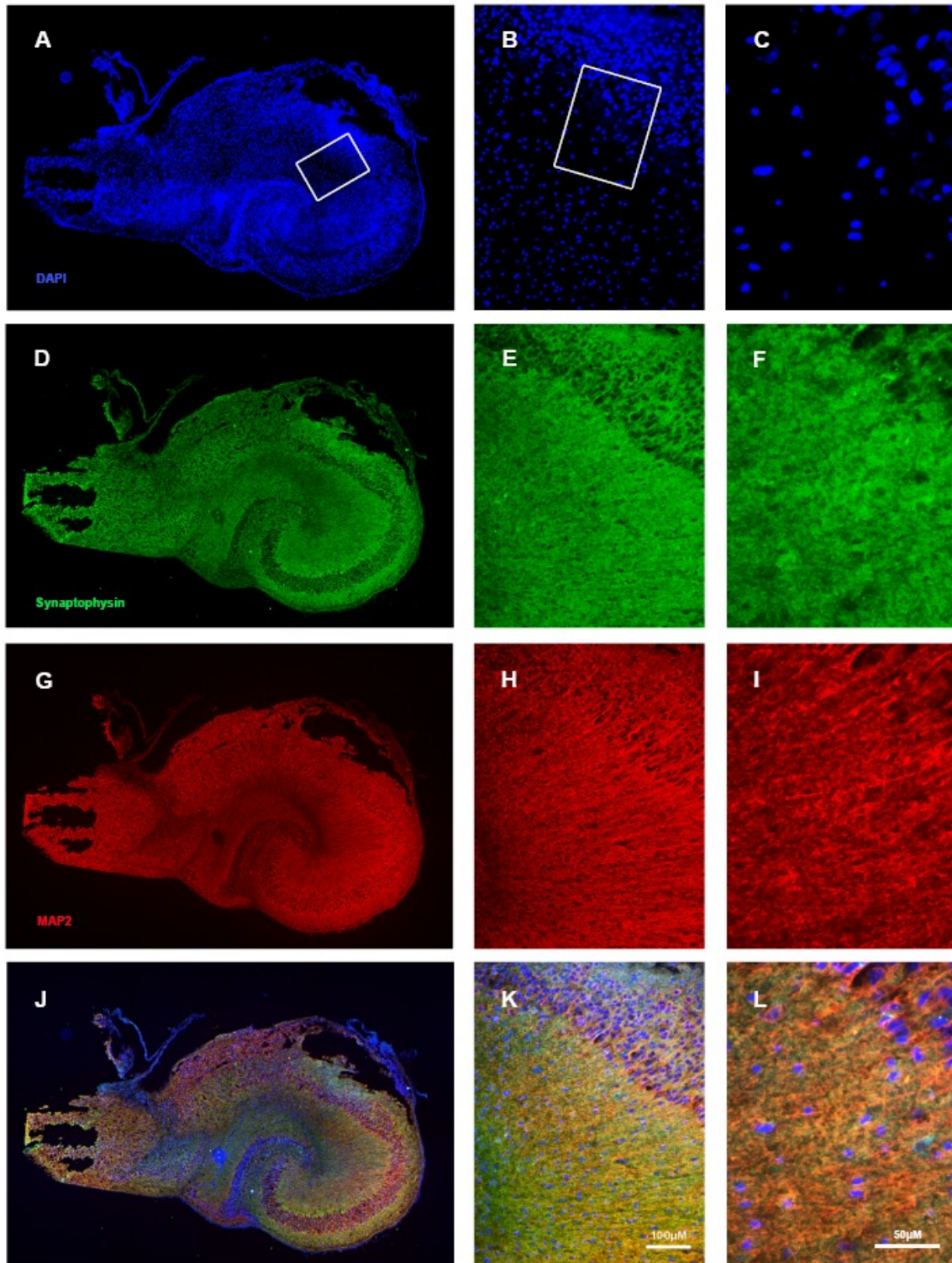


Abbildung 17: Synaptophysin-Immunreaktivität in Schnittkultur des Hippocampus (Übersicht). Lichtmikroskopische Aufnahmen eines hippocampalen Schnittes der Kontrollgruppe. Bilder (A-C) zeigen Kernfärbungen (blau) mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), (D-F) die Synaptophysin-Immunreaktivität (grün), (G-I) die MAP2-Immunreaktivität (rot) und (J-L) Überlagerungen der Bilder der jeweiligen Spalte. Die zweite Spalte zeigt den in A gekennzeichneten Ausschnitt des Übergangs zwischen CA3 und CA1 Region. Die dritte Spalte zeigt mit dem in B gekennzeichneten Ausschnitt eine Vergrößerung des *Str. radiatum* direkt unterhalb des *Str. pyramidale*.

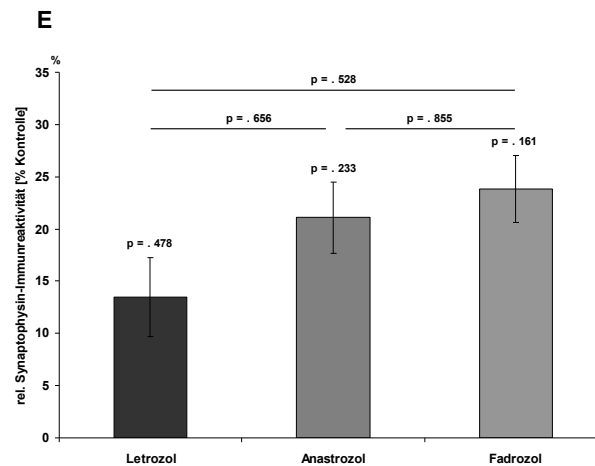
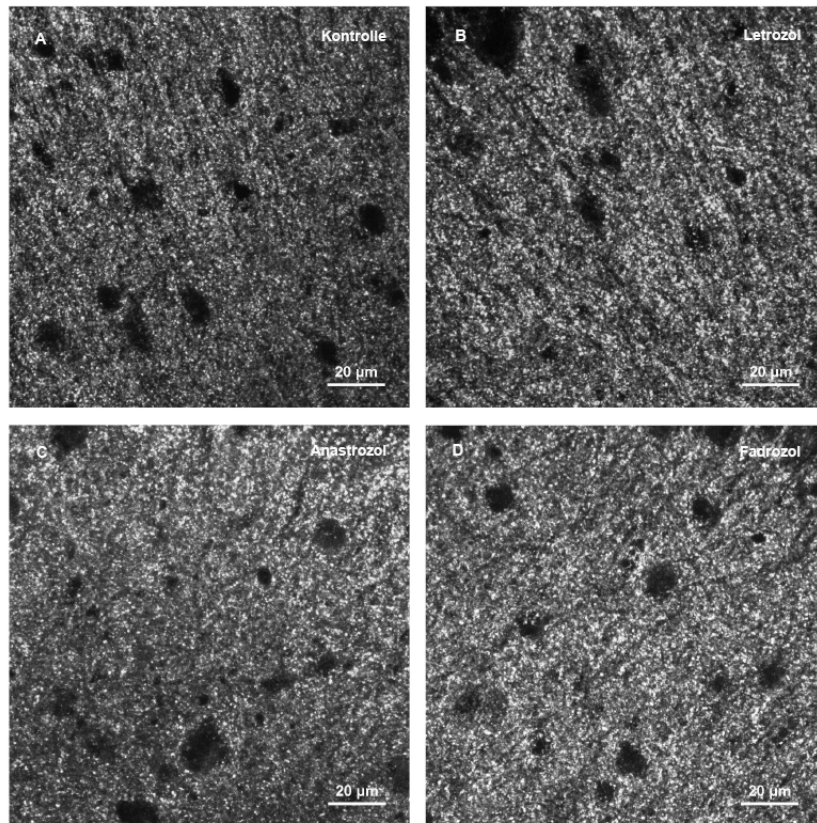


Abbildung 18: Quantifizierung der Synaptophysin-Immunreaktivität im *Str. radiatum* der CA1-Region von hippocampalen Schnittkulturen nach Applikation verschiedener Aromataseinhibitoren. Die Schnittkulturen (präpariert an P5 + vier Tage *in vitro* Vorkultur) wurden für eine Woche alle zwei Tage mit Aromatase-Inhibitoren behandelt. Kryoschnitte dieser hippocampalen Schnittkulturen wurden hinsichtlich ihrer Synaptophysin-Färbungsintensität im *Str. radiatum* der CA1 Region mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen. Die Bilder A bis D zeigen repräsentativ die Z-Projektion der Synaptophysin-Immunreaktivität im *Str. radiatum* für die verschiedenen Behandlungen mit Aromataseinhibitoren. In allen Versuchsgruppen ist eine deutliche, punktuelle Synaptophysinfärbung zu erkennen. Nach der Applikation der Aromataseinhibitoren entsteht der subjektive Eindruck einer leichten Zunahme der Immunreaktivität bei allen Versuchsgruppen (B-D) im Vergleich zur Kontrolle (A). Die quantitative Auswertung (E) ergab einen Anstieg der Immunreaktivität in allen Versuchsgruppen, der jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus lag. Insgesamt wurden 179 Schnitte (mit jeweils ca. fünf Bildausschnitten) aus drei Unabhängigen Kulturen analysiert. Angegeben sind jeweils die prozentualen Unterschiede der Behandlungen gegenüber der Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

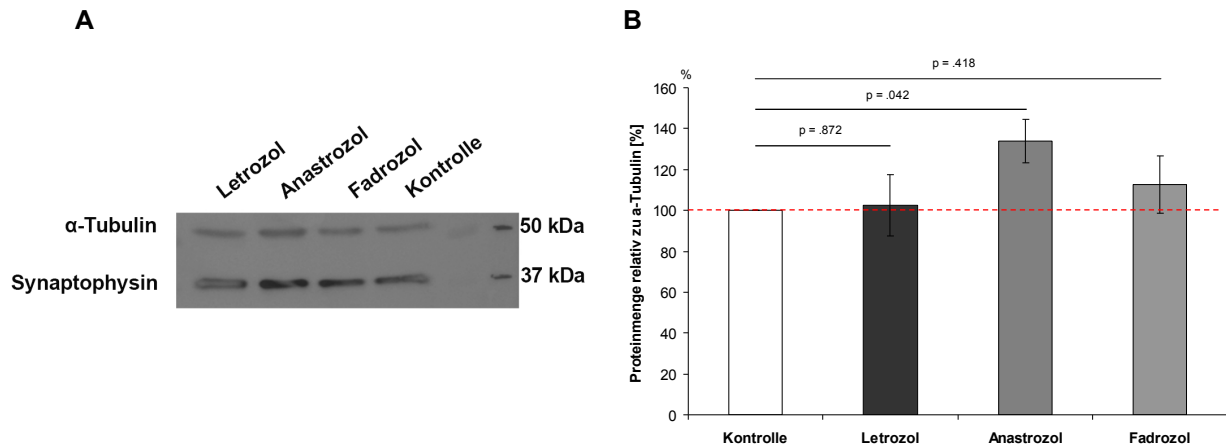


Abbildung 19: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptophysin-Proteinmenge in hippocampalen Schnittkulturen. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus hippocampalen Schnittkulturen (präpariert an P5 + vier Tage *in vitro* Vorkultur) nach sieben Tagen Behandlung mit Aromataseinhibitoren. Der Immunoblot (A) zeigt die Proteinmenge von Synaptophysin und α -Tubulin für die unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Synaptophysin Banden liegen bei erwarteten 37 kDa und die α -Tubulinbanden bei ca. 50 kDa. Das Molekulargewicht der Größenstandarts ist auf der rechten Seite zu sehen. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. (B) Die quantitative Analyse der Synaptophysin-Immunoblots (n=9) zeigt eine signifikante Erhöhung der Synaptophysin-Menge nach Anastrozol. Letrozol und Fadrozol zeigen nur geringe Zunahmen unterhalb des Signifikanzniveaus. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen dem SEM: ANOVA+ LSD; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

3.5.2. Synaptopodinexpression nach Inhibition der Aromatase in hippocampalen Schnittkulturen

Wie bereits für die Dispersionskulturen beschrieben, wurde in den Schnittkulturen neben dem präsynaptischen Marker Synaptophysin auch der postsynaptische Marker Synaptopodin untersucht. Damit sollte überprüft werden, ob die verschiedenen Aromataseinhibitoren auch in Schnittkulturen gleichförmig auf die Proteine der Prä- und Postsynapse einwirken.

In der Literatur ist eine starke Synaptopodin-Immunfärbung besonders in dendritischen Schichten des Hippocampus beschrieben. Das Verteilungsmuster in der CA3 und der CA1 Region gleicht sich. Am stärksten ist das Signal jeweils im *Str. oriens*. Im *Str. pyramidale* ist lediglich eine schwache kettenartige, punktuelle Immunfärbung zu sehen. Im *Str. radiatum* und im *Str. lacunosum moleculare* ist wieder eine starke Synaptopodin-Immunfärbung beschrieben (Mundel et al., 1997; Deller et al., 2000b; 2003). Eine stärkere Immunreaktivität der CA3-Region gegenüber der CA1-Region wird bei Roth (Roth et al., 2001) beschrieben.

Um die Synaptopodin-Immunreaktivität in der CA1 Region in hippocampalen Schnitten mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops aufzunehmen, wurden in den Schnitten neben *short*-Synaptopodin auch die Zellkerne (DAPI) und das Microtubuli-assoziierte-Protein (MAP-2) angefärbt. Sowohl die MAP-2 als auch die DAPI-Färbung dienten hier wie auch schon bei den Synaptophysin-Färbungen der visuellen Kontrolle der Schnittmorphologie sowie zur Orientierung.

Abbildung 20 zeigt eine repräsentative, aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzte Lichtmikroskopische Aufnahme eines hippocampalen Schnittes. In den Bildern A bis C ist die DAPI-Kernfärbung zu sehen, anhand der man das Körnerzellband des *Gyrus dentatus* gut erkennen kann (vergleiche Abbildung 1). Weiter sieht man das Str. pyramidale. Der in Bild A gekennzeichnete Ausschnitt liegt im Bereich der CA1-Region und ist in Bild B vergrößert zu sehen. In der oberen linken Ecke erkennt man das Str. pyramidale und ihm gegenüberliegend das Körnerzellband des *Gyrus dentatus*. Im dazwischen liegenden Bereich sind die Zellkerne locker verteilt. Ihre Verteilung verdichtet sich je näher man dem Str. *granulosum* kommt. Diese Schichtung ist auch in den MAP2-Färbungen der Bilder H und I zu sehen. Die MAP2-Färbung diente neben weiteren Kriterien der visuellen Beurteilung der Schnitte. Ausgehend vom Str. *pyramidale* erkennt man anhand der MAP2-Färbung die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen die in Richtung rechts unten ziehen. Anhand der schwächeren Färbung erkennt man in Bild H den Übergang zum Str. *lacunosum moleculare*. Im darauf folgenden Str. *moleculare* wieder zunimmt. In Bild I ist die parallele Ausrichtung der apikalen Dendriten noch detaillierter zu sehen.

Bei der Betrachtung der Synaptopodin Färbung in Bild E sieht man, dass die Färbung im Str. *radiatum* direkt unterhalb des Str. *pyramidale* am stärksten ist. Eine weitere starke Synaptopodin Färbung erkennt man im Bereich des Str. *lacunosum moleculare*. Eine stärkere Vergrößerung der Synaptopodin Färbung ist in Abbildung 20 F zu sehen. Hier kann man die punktuelle Färbung sehen. In der untersten Reihe der Abbildung sieht man eine Überlagerung der jeweils darüber gezeigten Bilder. In Ausschnitt K erkennt man an der rötlich gelben Farbe eine Kolokalisation von Synaptopodin und MAP-2. Diese ist besonders im Str. *radiatum* zu erkennen und in Ausschnitt L nochmals vergrößert dargestellt.

Die optischen Schnitte der konfokalen Aufnahmen der Synaptopodin-Immunreaktion (Abbildung 21) geben die punktförmige Färbung noch besser wieder. Es ist durch bloße Betrachtung der Bilder eine Zunahme der Immunreaktivität sowohl nach Anastrozol (C) als auch nach Fadrozol (D) gegenüber der Kontrolle (A) zu erkennen. Bei der visuellen, morphologischen Begutachtung der Schnitte anhand der

verschiedenen Färbungen im Bezug auf die Ausbildung der verschiedenen Schichten, Verteilung der Zellkern, Ausrichtung der Dendriten und Verteilung der Färbungen waren keine Veränderungen in den verschiedenen Versuchsgruppen auffällig.

Die Analyse der Synaptopodin-Immunreaktivität (Abbildung 21 E) ergab eine signifikante Zunahme von ca. 35 % für Anastrozol gegenüber der Kontrolle. Auch nach Fadrozol kommt es zu einer ca. 28 % -igen Zunahme, welche mit $p = 0,08$ jedoch knapp oberhalb der Signifikanzgrenze liegt. Die Behandlung mit Letrozol führte zu keiner signifikanten Zunahme im Vergleich zur Kontrolle (Anstieg von ca. 3 %)

Um die Ergebnisse zu verifizieren wurden, wie auch für Synaptophysin, Immunoblots für Synaptopodin aus kompletten hippocampalen Schnitten angefertigt. Diese Blots (Abbildung 22) und ihre quantitative Analyse unterstützen die Ergebnisse der Analyse der Synaptopodin-Immunreaktivität.

Anastrozol führt gegenüber der Kontrolle zu einer signifikant um 50 % gesteigerten Synaptopodin Proteinexpression. Fadrozol und Letrozol führten nur zu einer geringeren, unsignifikanten Erhöhung (25 % und 7 %).

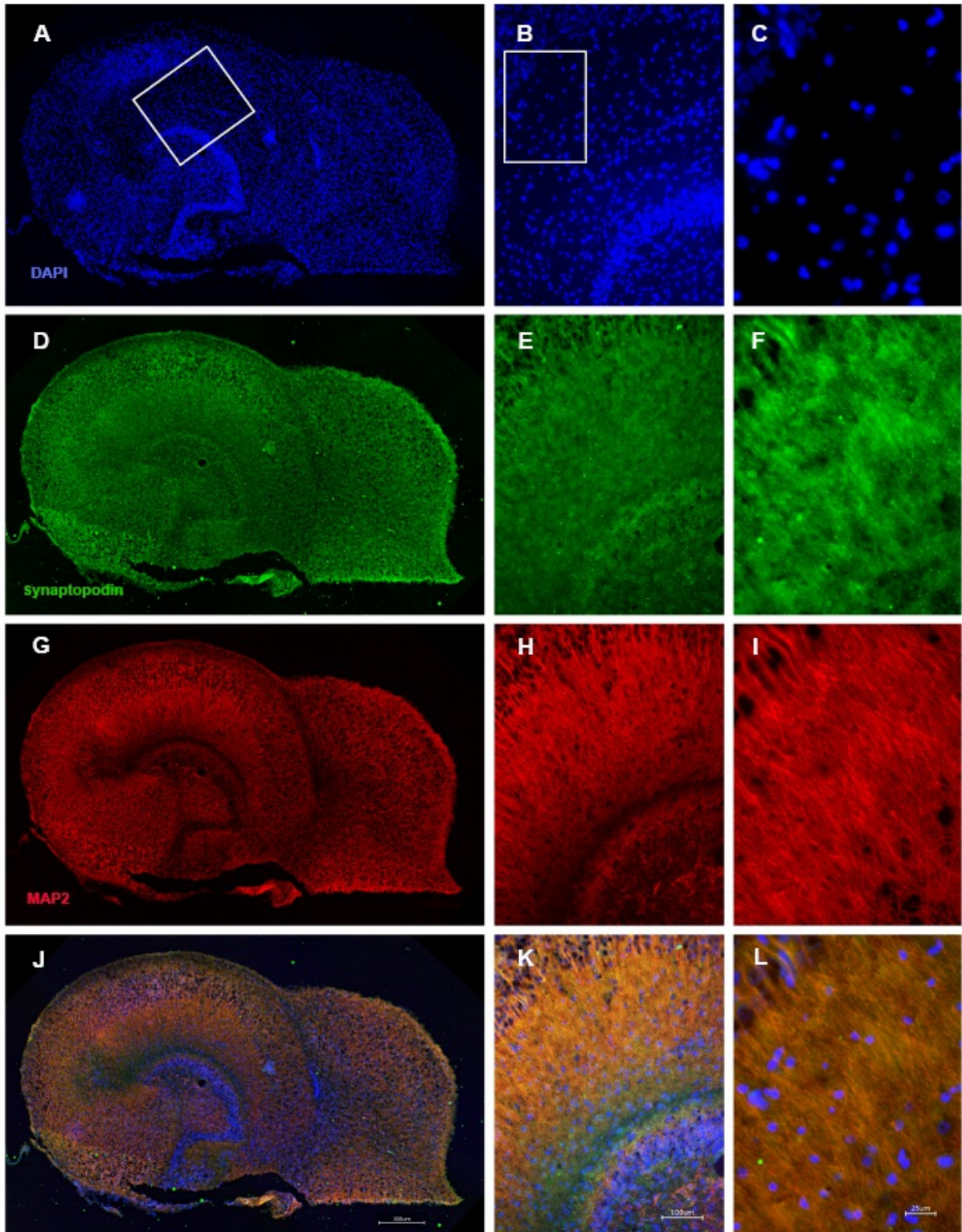


Abbildung 20: Synaptopodin-Immunreaktivität in Schnittkultur des Hippocampus (Übersicht). Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen eines hippocampalen Schnittes der Kontrollgruppe. Die Bilder **A-C** zeigen DAPI- Kernfärbungen (blau), **D-F** die Synaptopodin-Immunreaktivität (grün), **G-I** die MAP2-Immunreaktivität (rot), und die Bilder **J-L** zeigen Überlagerungen der Bilder der jeweiligen Spalte. Die zweite Spalte zeigt den in A gekennzeichneten Ausschnitt der CA1 Region. Die dritte Spalte zeigt mit dem in B gekennzeichneten Ausschnitt eine Vergrößerung des *Str. radiatum* direkt unterhalb des *Str. pyramidale*.

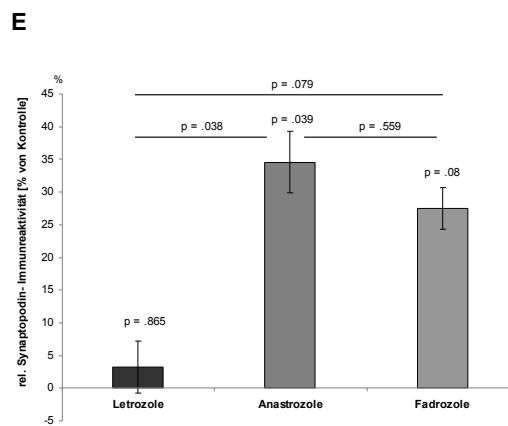
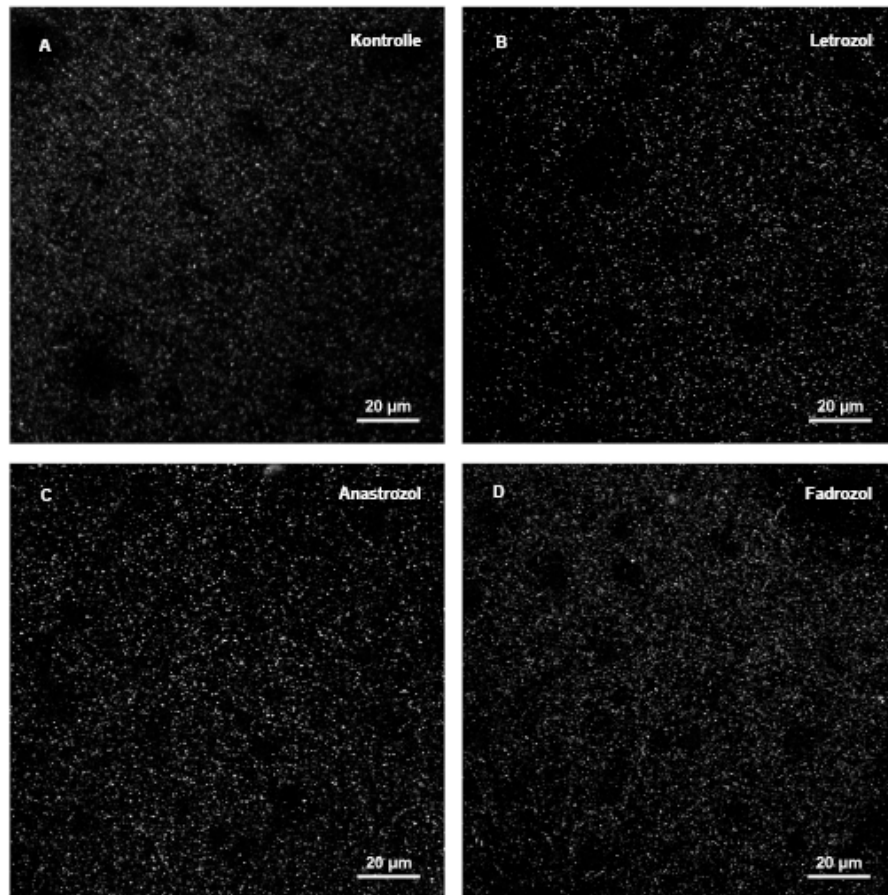


Abbildung 21: Quantifizierung der Synaptopodin-Immunreaktivität im *Str. radiatum* der CA1-Region von hippocampalen Schnittkulturen nach Inkubation mit Aromataseinhibitoren. Die Schnittkulturen (präpariert an P5 + vier Tage *in vitro* Vorkultur) wurden für eine Woche alle zwei Tage mit Aromatase-Inhibitoren behandelt. Kryoschnitte dieser Hippocampalen Schnittkulturen wurden hinsichtlich ihrer Synaptopodin-Färbungsintensität im *Str. radiatum* der CA1 Region mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen und mit ImageJ ausgewertet. Die Bilder **A** bis **D** zeigen repräsentativ die Z-Projektion der Synaptopodin-Immunreaktivität im *Str. radiatum* für die verschiedenen Behandlungen mit Aromataseinhibitoren. In allen Versuchsgruppen ist eine deutliche punktuelle Synaptopodinfärbung zu erkennen. Bei rein visueller Betrachtung ist eine Zunahme der Immunreaktivität vor allem nach Anastrozol-Applikation (**C**) erkennbar. Die quantitative Auswertung (**E**) ergab für Anastrozol eine signifikante Zunahme der Synaptopodin-Immunreaktivität von nahezu 35 % gegenüber der Kontrolle. Fadrozol führt ebenso wie Letrozol zu einer Zunahme der Immunreaktivität, welche jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus bleibt. Insgesamt wurden 112 Schnitte aus drei unabhängigen Kulturen analysiert. Angegeben sind jeweils die mittleren prozentualen Unterschiede der

Behandlungen gegenüber der Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA+LSD; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

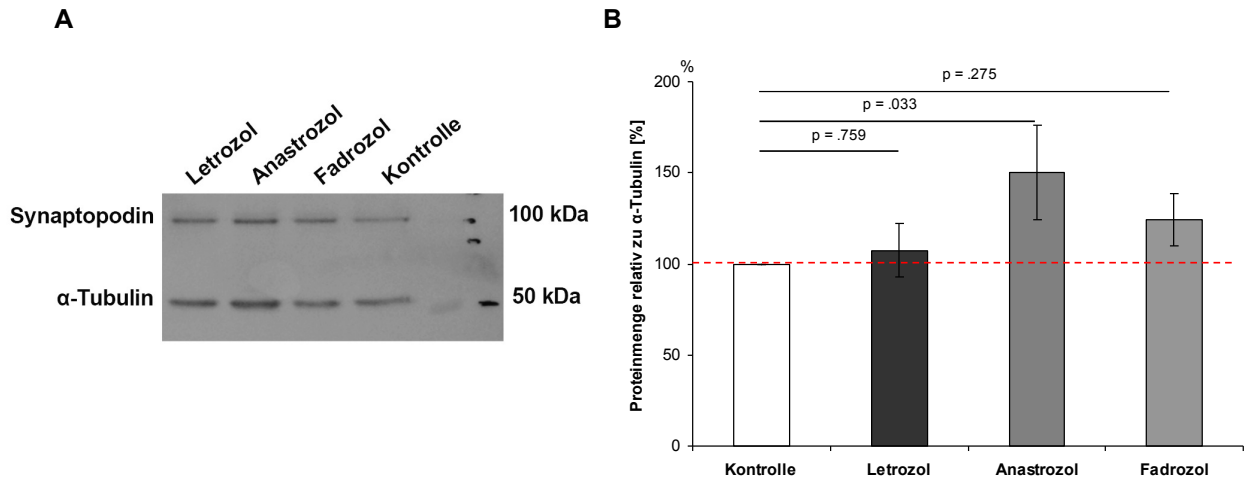


Abbildung 22: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptopodin-Proteinmenge in hippocampalen Schnittkulturen. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus hippocampalen Schnittkulturen (präpariert an P5 + vier Tage *in vitro* Vorkultur) nach sieben Tagen Behandlung. Der Immunoblot zeigt die Expression von short-Synaptopodin und α -Tubulin für die jeweilige Versuchsgruppe. Die Synaptopodin Banden liegen entsprechend ihrer molrcularen Größe (96,5 kDa) auf Höhe der 100 kDa Markerbande und das zur Standartisierung eingesetzte α -Tubulin entsprechend seiner molekularen Größe (ca. 50 kDa) bei etwa 50 kDa. Das Molekulargewicht der Größenstandarts ist auf der rechten Seite zu sehen. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton (B) Die quantitative Analyse der Synaptopodin-Immunoblots (n= 9) zeigt einen signifikanten Anstieg der Synaptopodin-Menge nach Anastrozol-Applikation. Der Anstieg der Expression nach Letrozol und Fadrozol ist nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen dem SEM, ANOVA+LSD; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

3.6. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Zum besseren Vergleich der Ergebnisse aus den Experimenten mit den Aromataseinhibitoren sind diese in Abbildung 23 graphisch zusammengefasst.

- Die Anzahl der Spinesynapsen in den Schnittkulturen nimmt nach der Applikation aller Aromataseinhibitoren ab.
- In den Dispersionskulturen führen alle Aromataseinhibitoren zudem zu einer Annahme der 17β -Estradiolkonzentration im Medium.
- Alle Analysen der synaptischen Proteine sowohl in Schnittkulturen als auch in Dispersionskulturen zeigen mit einer Ausnahme das Gleiche. Beide Messmethoden - Messung der Immunfluoreszenz und Immunoblots- ergeben einen Anstieg beider synaptischer Proteine nach der Applikation von Aromataseinhibitoren. Die Ausnahme stellt die Messung der

Immunreaktivität von Synaptopodin in Dispersionskulturen nach Anastrozol dar. Sie nimmt lediglich tendenziell ab ist aber statistisch nicht signifikant.

Dispersionskulturen

	Synaptophysin			Synaptopodin		E2-Konzentration
	ICC	Western Blot		ICC	Western Blot	
Letrozol	↑	↗	Letrozol	↑	↗	↓
Anastrozol	↑	↗	Anastrozol	↘	↗	↓
Fadrozol	↑	↗	Fadrozol	↑	↗	↘

Schnittkulturen

	Synaptophysin			Synaptopodin		Spine-Synapsen
	IHC	Western Blot		IHC	Western Blot	
Letrozol	↗	→	Letrozol	↗	↗	↓
Anastrozol	↗	↑	Anastrozol	↑	↑	↘
Fadrozol	↗	↗	Fadrozol	↗	↗	↓

Legende: ↑ ↓ signifikante Zu-/ Abnahme
 ↗ ↘ nicht signifikante Zu-/ Abnahme

Die Vektorlänge der Pfeile repräsentiert qualitativ die Größe der prozentualen Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Abbildung 23: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse nach Applikation der verschiedenen Aromataseinhibitoren.

3.7. „Gen-Silencing“ der Aromatase

Nachdem die Probleme bei der Genotypisierung der Aromatase-*Knockout*-Maus auftraten (siehe Abschnitt 3.1), wurde nach einer alternativen genetischen Methode gesucht, mit der sich die Auswirkungen einer Stilllegung des Aromatasegens *in vitro* untersuchen lassen. Diese Methode sollte, anders als die Aromataseinhibitoren, frei vom unbekanntem möglichen pharmakologischen Nebenreaktionen sein. Dabei fiel die Wahl zuerst auf die shRNA-Technik, da diese eine Genstilllegung (*gene silencing*) des Zielgens über längere Zeiträume ermöglicht. Später wurde auch die siRNA-Technik angewendet.

Neben der pharmakologischen Beeinflussung der in einer Zelle vorhandenen Aromatase durch Aromataseinhibitoren stellt die Manipulation der Aromatase mRNA eine weitere potente Möglichkeit der intrinsischen Regulation der 17 β -Estradiolsynthese dar. Anders als durch die pharmakologische Inhibition der enzymatischen Aktivität wird hierbei die Synthese des Proteins durch eine (teilweise) Genstilllegung (*gene silencing*) beeinflusst. Zudem schließt diese Methode das Auftreten von unbekanntem pharmakologischen Nebenreaktionen aus, die bei der Verwendung der Aromataseinhibitoren vorkommen könnten.

Es kamen im Folgenden verschiedene, auf den Mechanismen der RNA-Interferenz beruhende Methoden zum Einsatz. Hierbei handelt es sich zum einen um die shRNA-Technik, bei der ein Vektor in die Neurone transfiziert wird. Das Ablesen dieses Vektors führt zu einer ständigen und konstanten Expression von shRNA, welche anschließend zu siRNA prozessiert wird (Wadhwa et al., 2004). Durch die von der siRNA vermittelten Mechanismen der RNA-Interferenz kommt es zum Abbau der Ziel-mRNA, und somit zur Reduktion der Proteinbiosynthese. Als weitere Methode wurden Neurone direkt mit gegen die Aromatase-mRNA gerichteter siRNA transfiziert. Obwohl beide Methoden am Ende auf denselben Mechanismen beruhen, unterscheiden sie sich doch in grundlegenden Eigenschaften. Die Unterschiede der beiden *Knockdown*-Methoden und ihre Resultate in Neuronen sollten daher evaluiert werden. Die shRNA-Methode führt nach der Transfektion des Plasmids zu einer konstanten und anhaltenden Expression der shRNA und somit zu einer stabilen RNA-Interferenz. Daher können hiermit besonders gut Langzeitauswirkungen eines mRNA-*Knockdowns* beobachtet werden. Der Nachteil dieser Methode besteht vor allem darin, dass ein verhältnismäßig großes DNA-Konstrukt in die Neurone transfiziert werden muss, was sich negativ auf die Transfektionsrate auswirkt und zu einer verringerten Vitalität führen kann (Chen und

Okayama, 1987; Karra und Dahm, 2010). Da bei der siRNA Methode nur kurze Nukleinsäuren in der Größenordnung von ca. 20 Basen in die Neurone aufgenommen werden müssen, ist hiermit eine gute Transfektionsrate zu erzielen. Der Nachteil dieser Methode besteht vor allem darin, dass nur eine begrenzte Menge an siRNA-Molekülen in die Neurone aufgenommen werden und diese mit der Zeit abgebaut werden. (Unmodifizierte siRNAs sind bereits nach ca. 24 h abgebaut. Modifizierte siRNAs sind je nach Hersteller bis zu 6 Tagen stabil) Es handelt sich hierbei also um eine transiente RNA-Interferenz. Ein längerfristiger *Knockdown* der Proteinexpression ist hier nur durch wiederholte Transfektionen möglich, welche sich jedoch wiederum negativ auf das Überleben der Zellen oder deren Vitalität auswirken können (Karra und Dahm, 2010). Aus diesen Gründen bietet sich diese Methode für Kurzzeitexperimente an.

Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass durch beide Techniken nur ein Teil der mRNA abgebaut wird und es daher, anders als beim *Knockout* eines Gens, nur zu einer Verminderung der Proteinbiosynthese kommt.

3.7.1. *shRNA-vermittelter Knockdown der Aromatase-mRNA*

Auf Grundlage des pcGLH-Vektors (siehe Abschnitt 2.1.12) wurden shRNA-exprimierende Vektoren generiert. Die shRNA steht hierbei unter der Kontrolle des H1-Promotors. Weiter beinhaltet der Vektor hinter einer IRES- („internal ribosomal entry site“) Stelle die EGFP kodierende Sequenz (Chen et al., 2005). Dadurch wird in den transfizierten Zellen zusätzlich GFP (*green fluorescent protein*) synthetisiert und ermöglicht dadurch die Identifizierung transfizierter Zellen.

Bei der Validierung der Funktion der generierten shRNA-Vektoren erwies es sich als schwierig, eine verminderte Aromatase-mRNA-Menge in den mit den shRNA-Vektoren (pCGLH/shAro2, pCGLH/shAro3) transfizierten Mausneuronen nachzuweisen. Für diese Schwierigkeiten gibt es zwei Gründe. Zum einen ist die in den Neuronen vorhandene Menge an Aromatase-mRNA so gering, dass sie sich an der Nachweisgrenze der hoch sensitiven TaqMan qPCR befindet (Kornek, 2012). Dies konnte durch weitere eigene Messungen bestätigt werden (die Aromatase-mRNA-Menge ist 1000-fach geringer als die mRNA-Menge von HPRT1). Zudem konnte auch unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien keine für diese Zwecke ausreichende Transfektionsrate erzielt werden. Aufgrund der niedrigen Transfektionsrate hat die Quantifizierung der Aromatase-mRNA keine Aussagefähigkeit über die *Knockdown*-Rate der shRNA.

Daher wurden alternative Validierungsansätze verfolgt. Zunächst wurde die Aromatase-Immunreaktivität mittels konfokaler Mikroskopie analysiert, da hier eine Identifizierung der mit der shRNA transfizierten Neurone anhand der GFP-Expression möglich ist. Primäre Neurone aus Mäusen wurden präpariert und nach vierzehn Tagen in Kultur mit den shRNA-Konstrukten transfizierten. Vier Tage nach der Transfektion wurden die Neurone fixiert. Die Aromatase wurde immunocytochemisch angefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Dies ermöglichte die anschließende Quantifizierung der Aromatasekonzentration in solchen Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, und die Aromatase-Immunreaktivität quantifiziert.

Zum anderen wurde ein Aromatase-Expressionsvektor generiert, der in einer neuronalen Zelllinie der Maus (Neuro-2a) zu einer Expression der Aromatase führen sollte. Mit Hilfe dieser Zelllinie, die viel höhere Transfektionsraten für den shRNA Vektor aufweist, wurde die *Knockdown*-Rate der Aromatase-mRNA ermittelt. Die Wirkung der shRNAs auf die Aromatase-mRNA-Menge wurde durch qPCR mit TaqMan-Sonden analysiert. Der Aromatase-Expressionsvektor (siehe Abschnitt 2.2.19) wurde hierzu stabil in die Neuro-2a (N2a) Zellen (Klebe und Ruddle, 1969) transfiziert. Anschließend wurden diese Zellen wiederum mit den shRNA-Vektoren (pCGLH/shAro2, pCGLH/shAro3) transfiziert und für 48 h inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung der relativen Aromatase-mRNA-Menge mittels der Taq-Man qPCR.

Abbildung 25 zeigt eine Immunopräzipitation aus dem Lysat von stabil mit dem Aromatase-Expressionsvektor transfizierten N-2a Zellen. Zum Vergleich wurde homogenisiertes Gewebe aus dem Ovar, das eine hohe Aromatasekonzentration aufweist, aufgetragen. Die Immunpräzipitation zeigt, dass die Zelllinie nach der Transfektion das Aromataseprotein exprimiert.

In Abbildung 26 ist zu sehen, dass es durch den Expressionsvektor zur Expression der Aromatase mRNA in den N-2a Zellen kommt. In den untransfizierten Zellen ist diese nicht nachweisbar. Weiterhin ist zu sehen, dass der Vektor pCGLH/shAro2 zu einer signifikanten Verringerung der Aromatase-mRNA Konzentration um ca. 22 % führt. Der Vektor pCGLH/shAro3 führt ebenfalls zu einer Verringerung von ca. 10 %, welche jedoch statistisch nicht signifikant ist. Auch der Vergleich der Immunoblots (Abbildung 27) zeigt, dass der Vektor pCGLH/shAro2 zu einer nicht signifikanten Reduktion der Aromatase-Proteinexpression führt. Der Vektor pCGLH/shAro3 führt zu keiner Veränderung.

Murine, hippocampale Neurone nach Transfektion mit den gegen die Aromatase-mRNA gerichteten Vektoren sind in Abbildung 24 zu sehen. In der ersten Spalte der

Abbildung (Bilder A, D, G) ist die Aromatase-Immunfluoreszenz zu sehen. Eine klare, netzartige Aromatasefärbung, die sich sowohl im Perikaryon als auch in den Neuriten erstreckt, ist in den Immunzytochemischen Färbungen erkennbar. Die Immunintensität zwischen Neuronen eines Bildes variiert leicht. In der zweiten Spalte der Abbildung ist die GFP-Färbung zu sehen, anhand derer Neurone, die den shRNA-Vektor aufgenommen haben, identifiziert wurden. Die GFP-Färbung wurde darüber hinaus zur visuellen Begutachtung der Neurone genutzt, da sich anhand dieser Färbung die Morphologie gut darstellen lässt. Bei allen Neuronen in Abbildung 24 sind Spines entlang der Dendriten zu sehen. Eine für das Auge sichtbare Veränderung in der Aromatase-Immunreaktivität ist nur für den Vektor pCGLH/shAro3 (Abbildung 24 G) erkennbar und wird auch durch die quantitative Analyse der Immunreaktivität bestätigt (Abbildung 24 J). Durch den Vektor pCGLH/shAro3 kommt es zu einer Reduktion der Immunreaktivität der Aromatase um ca. 48 %, welche jedoch knapp ($p = .064$) über dem Signifikanzniveau liegen. Der Vektor pCGLH/shAro2 führt nahezu zu keiner Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Ich konnte zeigen, dass der Aromatase-Expressionsvektor in N-2a Zellen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene zu einer Expression von Aromatase führt. Damit bietet sich diese stabil transfizierte Zelllinie als gutes Testsystem für mögliche weitere Voruntersuchungen bei Experimenten bezüglich der Aromatase an. Weiter konnte ich zeigen, dass die getesteten shRNA-Vektoren in den verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Resultaten führen. In primären Neuronen kommt es durch pCGLH/shAro3 zu einer Reduzierung der Aromatase-Immunintensität, während es in N-2a Zellen durch pCGLH/shAro2 zu einer verminderten Aromataseexpression auf mRNA- und Protein-Ebene.

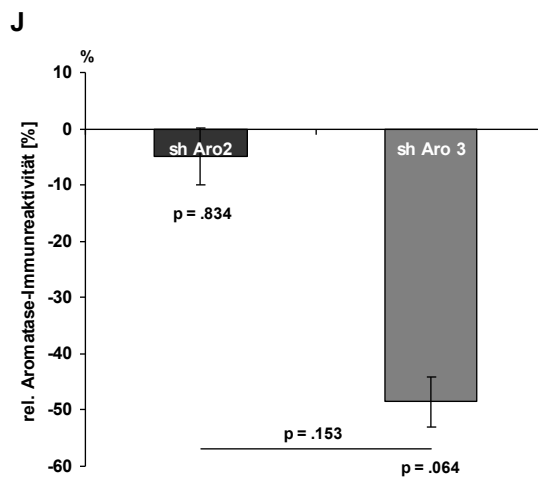
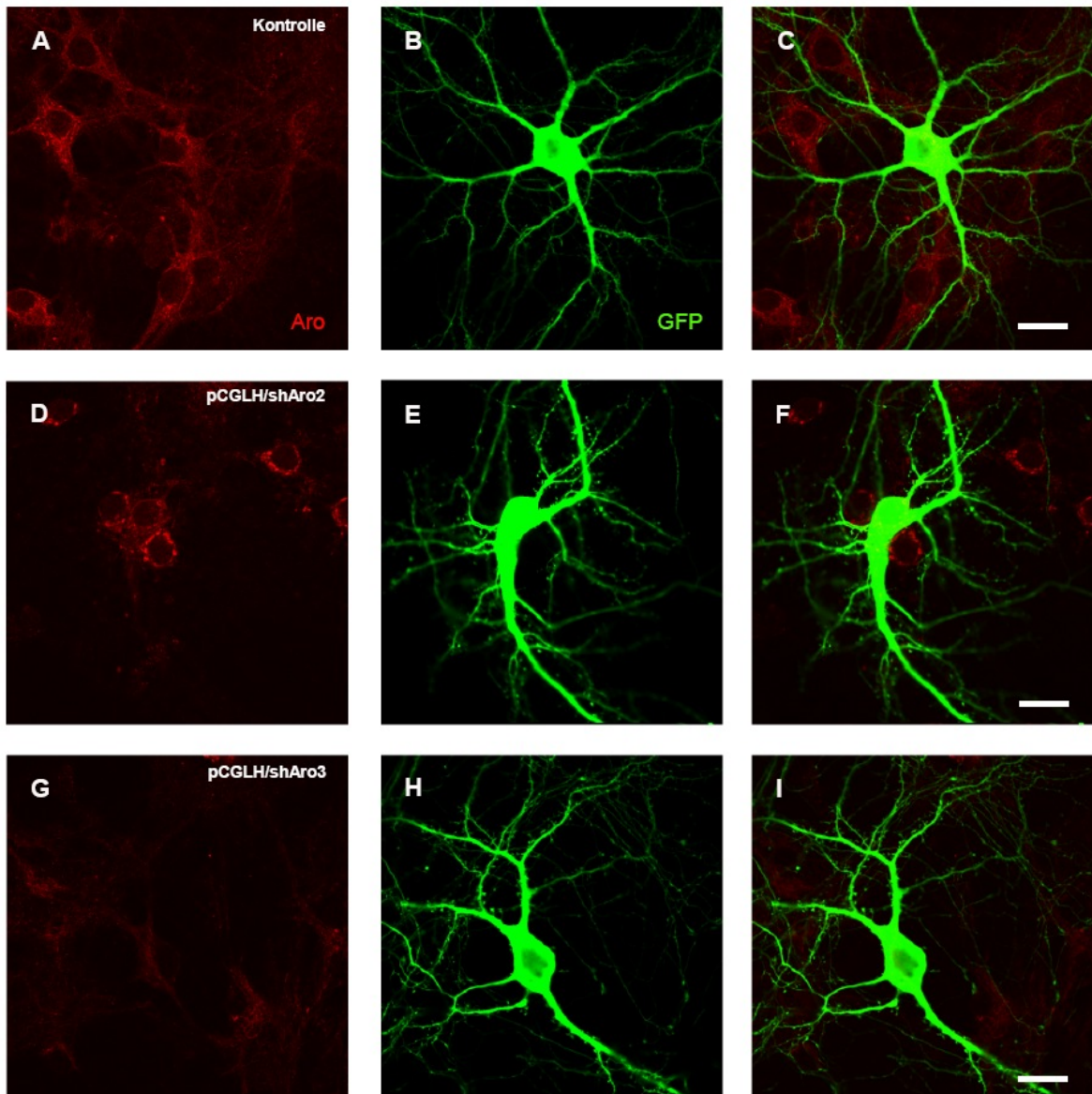


Abbildung 24: Aromatase-Immunreaktivität nach Transfektion mit Aromatase-shRNA-Vektoren. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen und zeigen für repräsentative Neurone (präpariert an P0 + 14 Tage *in vitro* Vorkultur) die Aromatase-Immunreaktivität (rot) für die Versuchsgruppen (A) Kontrolle (D) pCGLH/shAro2 und (G) pCGLH/shAro3 vier Tage nach der Transfektion. Die Bilder B, E und H zeigen GFP.

Transfizierte Neurone wurden anhand der GFP-Färbung identifiziert. Bei allen Neuronen sind Spines zu sehen. Vergleiche der Aromatase-Immunreaktivität (**A**, **D** und **G**) lassen keine Unterscheidung zwischen der Kontrolle (**A**) und dem Vektor pCGLH/shAro2 (**D**) zu. Eine Verringerung der Immunreaktivität nach pCGLH/shAro3 ist in (**G**) zu erkennen. Bilder (**C**, **F** und **I**) zeigen eine Überlagerung aller vorherigen Bilder einer Reihe. Größenbalken entspricht 20 μm . (**J**) Die quantitative Analyse der Immunreaktivitäten zeigt einen nicht signifikanten Abnahme der Aromatase-Immunreaktivität vier Tage nach der Transfektion mit dem Vektor pCGLH/shAro3. pCGLH/shAro2 zeigt keinen Unterschied in der Immunreaktivität gegenüber der Kontrolle. Insgesamt wurden 81 GFP positive Neurone aus vier unabhängigen Kulturen analysiert und verglichen. Angegeben sind jeweils die prozentualen Mittelwerte normiert an der Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

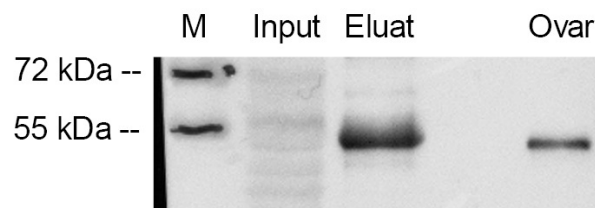


Abbildung 25: Immunpräzipitation von Aromatase aus dem Lysat von N-2a Zellen nach stabiler Transfektion mit pcDNA3.1/AroEx. Immunoblot der Aromatase-Immunpräzipitation aus N-2a Zellen, welche stabil mit dem Aromatase-Expressionsvektor pcDNA3.1/AroEx transfiziert wurden. Aromatase wurde durch einen monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Der Blot zeigt sowohl für das Eluat als auch die Positivkontrolle (Ovar) Banden auf der für Aromatase erwarteten Höhe von ca. 55 kDa. Als Expressionskontrolle wurden die Proteinextrakte (Input) aufgetragen. M= Molekulargewichtsmarker-Protein (in kDa).

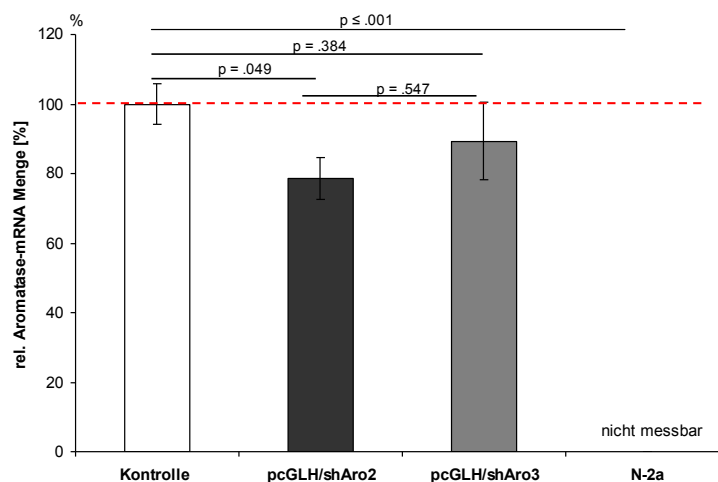


Abbildung 26: Aromatase-Knockdown in N-2a Zellen. Relative Aromatase-mRNA-Menge in stabil transfizierten N-2a-Zellen nach Transfektion mit shRNA-Vektoren (pcGLH/shAro2 und pcGLH/shAro3) gerichtet gegen Aromatase-mRNA 48 Stunden nach der Inkubation. Im Vergleich zu N-2a-Zellen ohne den Vektor pcDNA3.1/AroEx zeigen alle mit dem Aromatase-Expressionsvektor stabil transfizierten Zellen eine deutliche mRNA-Expression von Aromatase. Nach der Transfektion mit dem Vektor pCGLH/shAro2 verringert sich die relative Aromatase-mRNA-Menge signifikant um ca. 20 %. Der Vektor pCGLH/shAro3 führt ebenfalls zu einer Verringerung, welche jedoch nicht signifikant ist. n= 4 unabhängige Experimente. Alle Daten zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen SEM. T-Test; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

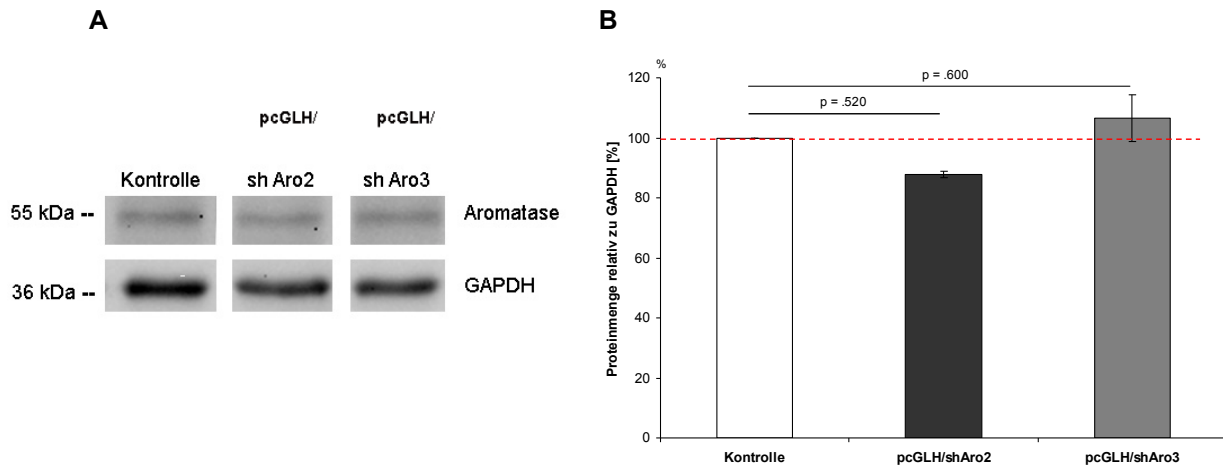


Abbildung 27: Aromatase nach mRNA-Knockdown. Mit einem Aromatase-Expressionsvektor (pcDNA3.1/Aro) stabil transfizierte N2a-Zellen wurden mit shRNA-Vektoren (pcGLH/shAro2 und pcGLH/shAro3) gerichtet gegen Aromatase-mRNA transfiziert und das Aromatase-Proteinmenge nach 72 h mittels Immunoblot ermittelt. (A) Der exemplarische Immunoblot zeigt Aromatase und GAPDH für die jeweiligen Versuchsgruppen. (B) Die quantitative Analyse der Immunoblots (n=4) zeigt für den Vektor pcGLH/shAro2 eine nicht signifikante Abnahme der Aromatase und für pcGLH/shAro3 eine leichte, nicht signifikante Zunahme in der Aromatase. Alle Daten zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen SEM. ANOVA; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

3.7.2. Aromatase-Knockdown mittels siRNA

Nachdem die Wirkung der shRNA-Vektoren nicht eindeutig validiert werden konnte und besonders aufgrund der sehr geringen Transfektionsraten, wurde neben der shRNA-Methode auch die siRNA-Methode hinsichtlich ihrer Effizienz zur experimentellen Manipulation der Aromatase untersucht.

Im Vorfeld wurde die Aromatase-mRNA Konzentration zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten nach der Präparation der Dispersionskulturen aus Ratte mittels qPCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden quantifiziert. Es zeigte sich, dass die mRNA Expression bis zum neunten Kulturtag um das Zehnfache im Vergleich zum dritten Kulturtag ansteigt und dann bis zum 28. Tag auf das 2,5 fache zurückgeht (Abbildung 28). Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der Aromatase-mRNA-Menge ist *in vivo* von Kornek (Kornek, 2012) beschrieben. Hier nimmt die relative Konzentration im juvenilen Tier gegenüber dem Embryonalstadium Tag 18 um das ca. Dreifache zu. Im adulten Tier gehen die Werte wieder zurück und liegen leicht über denen im Embryonalstadium Tag 18. Für die Detektion eines möglichst großen Effekts der siRNA auf die Aromatase-mRNA Menge sind daher in Dispersionskulturen um den neunten Kulturtag am besten geeignet.

Die Dispersionskulturen wurden daraufhin am Tag sieben mit kommerziell erhältlichen siRNAs (on-Target *plus* siRNA, Thermo Scientific) gegen Aromatase in

Verbindung mit verschiedenen Transfektionsreagenzien transfiziert und nach zwei Tagen die *Knockdown*-Rate untersucht. Transfektionen mit fluoreszenzgekoppelten siRNAs zeigten, dass diese siRNAs nur ungenügend von den Neuronen aufgenommen wurden. Daraufhin wurden Accell® siRNAs verwendet, welche durch eine spezielle Modifikation ohne Verwendung von Transfektionsreagenzien eine hohe Transfektionsrate erreichen sollen. Der Erfolg dieser Transfektion wurde ebenfalls durch eine mit einem Fluorophor markierte Kontroll-siRNA sichtbar gemacht (Abbildung 29). Die Bilder A und G zeigen die Fluoreszenzsignale der markierten siRNA. Bild D zeigt nicht transfizierte Neurone. Die Bilder B, E und H zeigen die mittels DAPI durchgeführte Kernfärbung und die Bilder C, F und I der Abbildung 29 zeigen jeweils die Überlagerung der beiden vorhergehenden Bilder. Durch die Überlagerung (Bild C) erkennt man ein Fluoreszenz-Signal der markierten siRNA in der Mehrheit der Neurone. In der Vergrößerung (Abbildung 29 G bis I) ist eine stärkere Fluoreszenz in kernnahen Bereichen zu erkennen. Somit ist hier von einer Anreicherung der siRNA auszugehen. Anschließend wurde die Aromatase-mRNA *Knockdown*-Rate zwei Tage nach Inkubation mit der Accell siRNA (an DIV 9) mittels TaqMan qPCR ermittelt (Abbildung 30 A). Es zeigt sich, dass die gegen die Aromatase-mRNA gerichtete siRNA (siAro) zu einem höchst signifikanten Rückgang der relativen Aromatase-mRNA Konzentration um ca. 63 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle führt. Überraschenderweise führte die Negativkontrolle (siNTC red) ebenfalls zu einem 55 % igem, höchst signifikantem Rückgang. Auch die Wiederholung mit einer anderen Negativkontrolle (siNTC#3; Daten nicht gezeigt) führte zu einer ähnlich starken Reduktion der Aromatase-mRNA Konzentration. Die durchgeführten Positivkontrollen (Abbildung 30 B) zeigen jedoch, dass die Kontroll-siRNA (siNTC red) keinen Einfluss auf die Menge der mRNA für Cyclophilin B (CyPB) hat. Die gegen CyPB gerichtete Positivkontrolle (siCyPB) führt hier zu einer Reduktion der CyPB-mRNA um ca. 44 %.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Notwendigkeit einer Negativkontrolle bei der Transfektion wurde der Einfluss der gegen CyPB-mRNA gerichteten siRNA (siCyPB) auf die Aromatase-mRNA Konzentration untersucht (Abbildung 31). Es zeigte sich, dass siAro wieder zu einer hoch signifikanten Reduktion der Aromatase-mRNA führte. Die siRNA siCyPB führte zwar auch zu einer signifikanten Reduktion der Aromatase-mRNA, lag mit ca. 20 % jedoch deutlich unter dem Effekt der Negativkontrollen siNTCred und siNTC#3.

Um die Auswirkungen des *Knockdowns* der Aromatase-mRNA auch auf Proteinebene zu untersuchen und sicherzustellen, dass die Kontroll-siRNA (siCyPB) hierbei zu keinen unerwarteten Effekten führt wurde die Aromatase-Immunreaktivität

in den transfizierten Neuronen gemessen und mit unbehandelten Neuronen verglichen.

Die immunzytochemischen Färbungen gegen Aromatase (Abbildung 32 Bilder A, D, G) zeigen ein distinktes, netzartiges Signal im Cytoplasma unbehandelter Neurone, welches sich auch in den Neuriten fortsetzt. Die Transfektion mit der gegen Aromatase-mRNA gerichteten siRNA (Abbildung 32 D) führt zu einer deutlich erkennbaren Abschwächung dieser Immunreaktivität. Weiter zeigt Abbildung 32 in der mittleren Spalte (Bilder B, E, H) die MAP2-Färbung der Neurone und in der rechten Spalte die Überlagerung der MAP2- und Aromatase-Färbung. Die Analyse zeigt (Abbildung 32 J) eine höchst signifikante Abnahme des Aromatase-Signals nach siAro gegenüber der unbehandelten Gruppe von 122 %. Die siRNA siCyPB führt zu einem leichten, aber nicht signifikanten Rückgang der Aromatase-Immunreaktivität (Abbildung 32 G, J). Dieser Effekt von siCyPB entspricht in etwa dem Effekt, der für siCyPB auf mRNA Ebenen für Aromatase ermittelt wurde. Die verwendeten siRNAs führen somit sowohl auf mRNA wie auf Proteinebene zu ähnlichen Effekten auf die Aromatase. Daher wurde die siRNA siCyPB in weiteren Experimenten als Kontroll-siRNA eingesetzt.

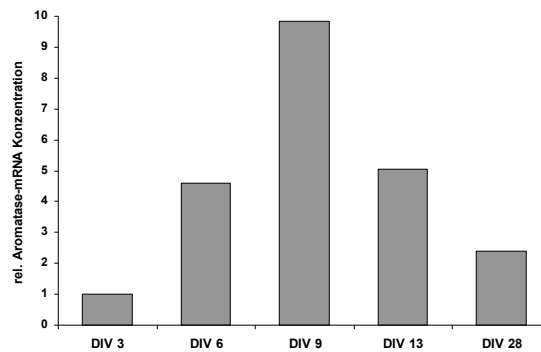


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Aromatase-mRNA-Menge in hippocampalen Dispersionskulturen. Hippocampale Dispersionskulturen (präpariert an E 18) wurden für drei bis 28 Tage kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA aus den Kulturen isoliert und anschließend für alle Proben gemeinsam die Aromatase-mRNA-Menge mittels q-PCR gemessen. Die mRNA-Mengen wurden an der an Tag drei (DIV 3) gemessenen Menge normiert. (Tag drei =1). Es ist ein Anstieg der Aromatase-mRNA-Menge um das Zehnfache bis zu Tag 9 (DIV 9) zu erkennen. Zwischen dem neunten und 28. Tag in Kultur (DIV 28) nimmt die Aromatase-mRNA-Menge wieder ab und beträgt am 28. Kulturtag das 2,5-fache der Menge von Tag drei. n=2

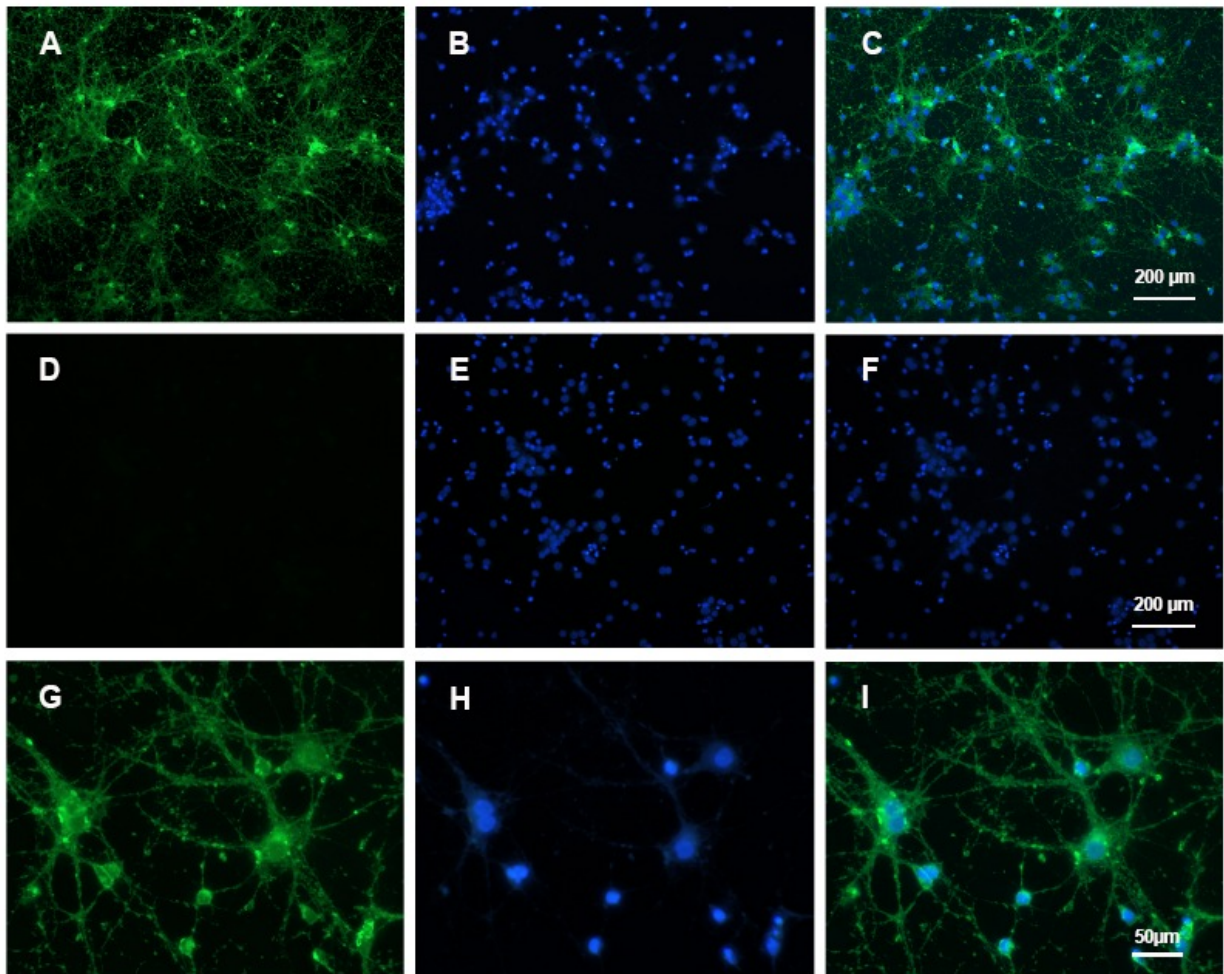


Abbildung 29: Accell siRNA Transfektionsrate in hippocampalen Dispersionskulturen. Hippocampale Dispersionskulturen (E 18 + 7 Tage *in vitro*) wurden mit Accell-Green siRNA transfiziert. Nach einem Tag wurden die Neurone fixiert und die Transfektionsrate mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. **(A-C)**: Übersichtsaufnahme von mit Accell-Green transfizierten Neuronen. **(D-F)**: Übersichtsaufnahme von Neuronen ohne Accell-Green. **(G-I)**: Vergrößerung von mit Accell-Green transfizierten Neuronen. Die Bilder **B, E, H** zeigen DAPI-Färbung. Die Bilder **A, D, G** zeigen in Grün die Fluoreszenz der markierten siRNA. Die Bilder **C, F, I** zeigen die Überlagerung der beiden vorherigen Bilder. Im Vergleich zur Kontrolle zeigen nahezu alle mit Accell-Green transfizierten Neurone ein deutliches Fluoreszenzsignal, was für eine hohe Transfektionsrate spricht. Die Vergrößerung zeigt eine Verteilung der siRNA im gesamten Neuron mit einer Anreicherung in kernnahen Cytoplasmaregionen.

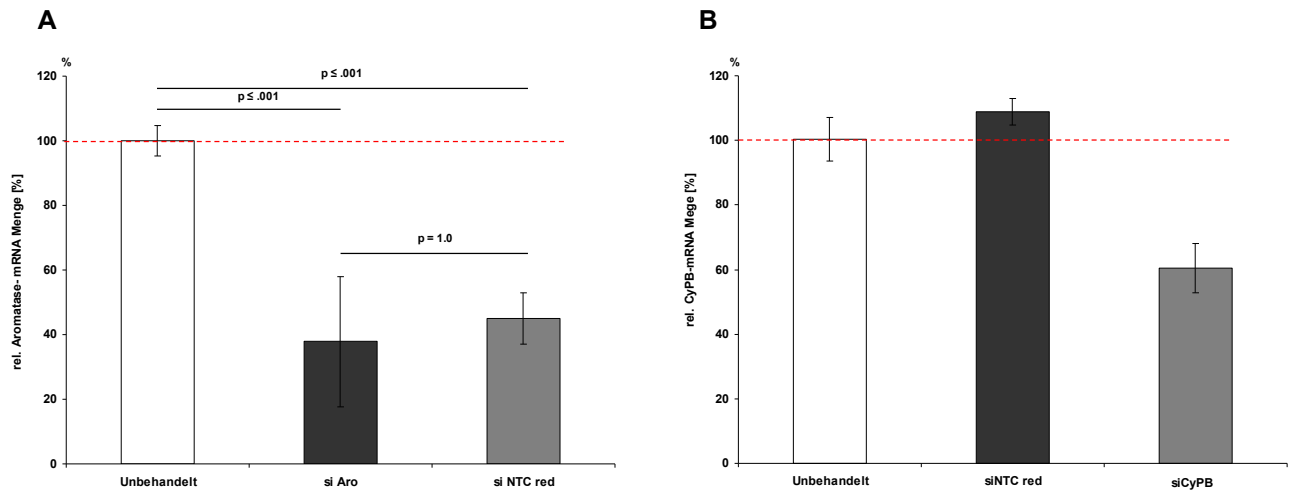


Abbildung 30: mRNA-Knockdown nach Accell siRNA Transfektion. (A): Hippocampale Dispersionskulturen wurden an Kulturtag sieben mit Accell siRNA gerichtet gegen die Aromatase-mRNA und der Kontroll siRNA Accell-red transfiziert. Die Aromatase-mRNA-Menge wurde nach weiteren zwei Kulturtagen mittels quantitativer Real-Time-PCR gemessen und zeigt, dass sowohl die siRNA gegen die Zielsequenz, als auch die Kontroll-siRNA (siNTC red) zu einer hoch signifikanten Reduzierung der Aromatase-mRNA-Menge führen. ANOVA + Bonferroni; Konfidenzintervall $\leq 0,5$, $n= 6$. **(B)** Positivkontrolle: Hippocampale Dispersionskulturen wurden an Kulturtag sieben mit Accell siRNA gerichtet gegen die Cyclophilin B-mRNA und der Kontroll siRNA Accell-red transfiziert. Die Cyclophilin B-mRNA-Menge wurde nach weiteren zwei Kulturtagen mittels quantitativer Real-Time-PCR ermittelt. Die CyPB-siRNA führt zu einer Verminderung der CyPB-mRNA-Menge um ca. 45 %. Die Kontroll-siRNA hat keinen Einfluss auf die Menge an CyPB-mRNA. $n= 2$. Daten zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen den SEM.

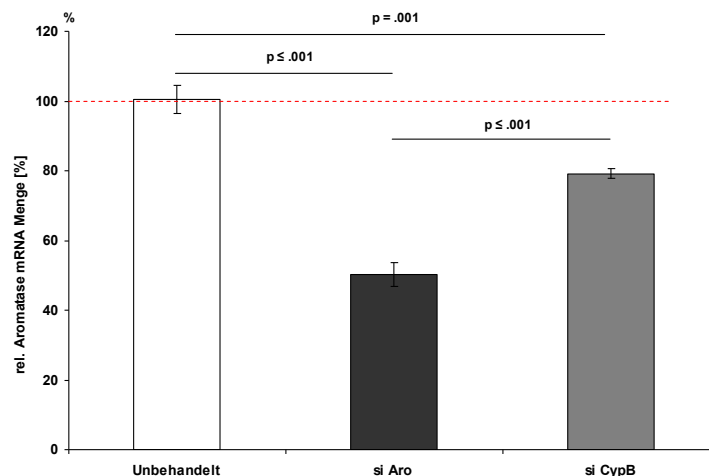


Abbildung 31: Aromatase-mRNA-Menge nach Knockdown mit Accell siRNA. Hippocampale Dispersionskulturen (präpariert an E 8 + 7 Tage *in vitro* Vorkultur) wurden mit Accell siRNA gerichtet gegen die Aromatase-mRNA und der als Kontrolle dienenden siRNA gegen Cyclophilin B transfiziert. Die Aromatase-mRNA-Menge wurde nach weiteren zwei Kulturtagen mittels quantitativer Real-Time-PCR gemessen. Die siRNA gegen Aromatase führt zu einer hoch signifikanten Reduktion der Aromatase-mRNA um 50 %. Die als Kontrolle dienende siRNA (siCypB) führt zu einer signifikanten Abnahme um 20 %. ; $n= 6$ unabhängige Experimente Daten zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA + Bonferroni; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

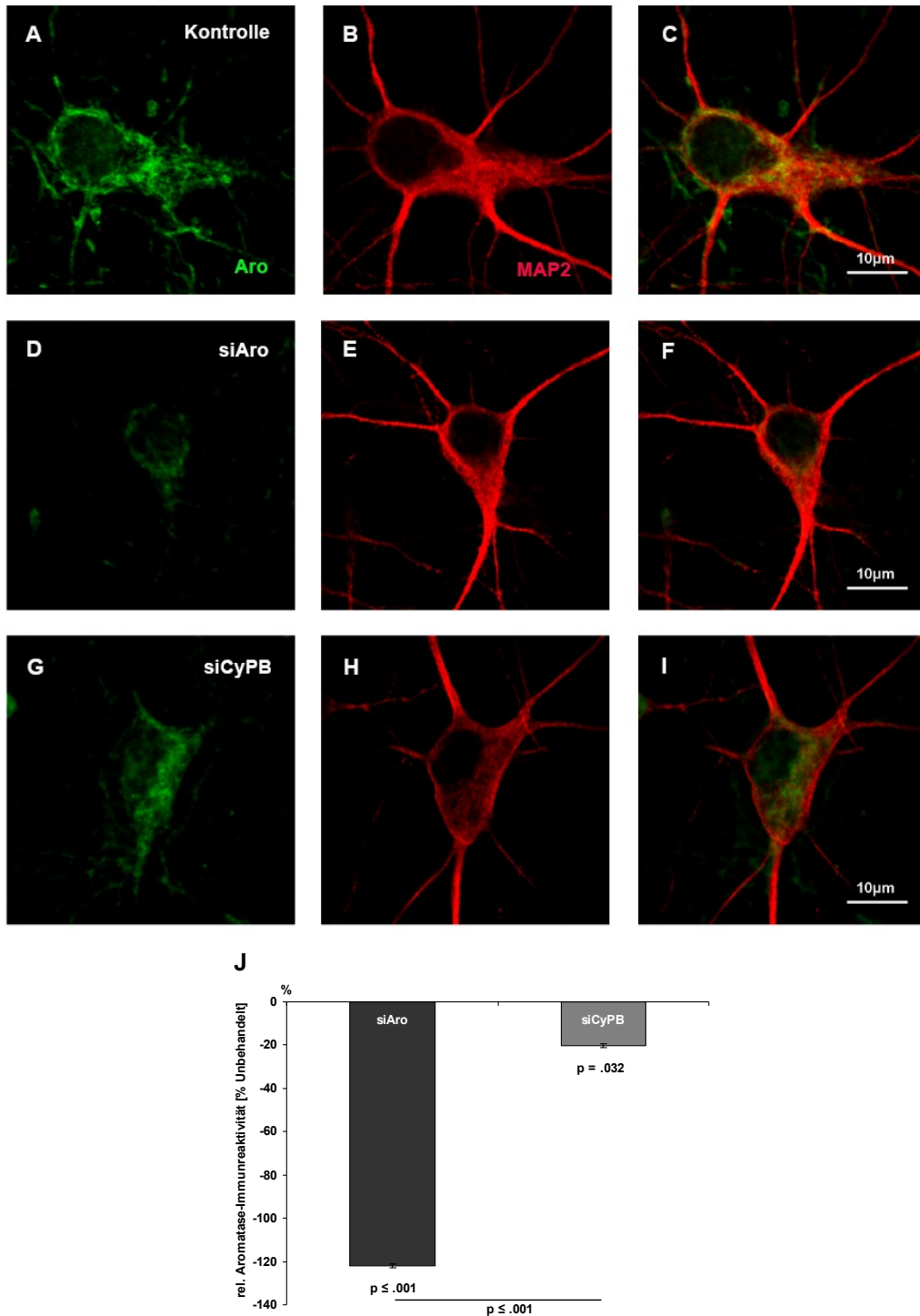


Abbildung 32: Aromatase-Immunreaktivität nach Aromatase-Knockdown mit Accell siRNA. Hippocampale Dispersionskulturen (präpariert an E18 + 7 Tage *in vitro* Vorkultur) wurden mit Accell siRNA gerichtet gegen die Aromatase-mRNA und der als Kontrolle dienenden siRNA gegen Cyclophilin B transfiziert. Die Neurone wurden für weitere drei Tage kultiviert und anschließend die Immunreaktivität ermittelt. Die Bilder zeigen repräsentative konfokale Aufnahmen der Aromatase-Immunreaktivität (**A, D, G**) für unbehandelte (**A-C**), siAro transfizierte (**D-F**) und siCyPB transfizierte (**G-I**) Neurone. Die Neurone wurden anhand ihrer MAP-2 Färbung (**B, E** und **H**) identifiziert. Die Bilder der letzten Spalte zeigen einer Überlagerung der beiden Immunfärbungen. Die quantitative Analyse der Aromatase-Immunreaktivität (**J**) zeigt eine höchst signifikante Reduktion nach siAro und einen signifikanten Rückgang nach siCyPB im Vergleich mit Unbehandelten hippocampalen Neuronen. Insgesamt wurden 162 Neurone aus zwei unabhängigen Kulturen analysiert.

Angegeben sind jeweils die prozentualen Unterschiede zur Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. ANOVA +LSD; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

3.8. Untersuchung zum Einfluss des Aromatase-*Knockdowns* auf synaptische Proteine

Nachdem die Wirksamkeit der siRNA gegen die mRNA der Aromatase gezeigt werden konnte (Abbildung 31), wurde anschließend der Einfluss des *Knockdowns* auf die Expression synaptischer Proteine untersucht. Dazu wurden die Neurone sieben Tage *in vitro* kultiviert und mit den siRNAs gegen Aromatase transfiziert. Nach weiteren vier Tagen in Kultur und anschließender immunocytochemischer Färbung wurde die Immunreaktivität von Synaptophysin und Synaptopodin mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht.

Abbildung 33 zeigt Neurone und deren Synaptophysin-Immunreaktivität ohne Transfektion (Kontrolle) und nach der Transfektion mit den siRNAs gegen Aromatase und Cycliphilin B (weitere Transfektions-Kontrolle). Die erste Spalte zeigt die Synaptophysin-Färbung in den Neuronen. Hierbei ist eine Verteilung der Signale innerhalb der einzelnen Neurone im Cytoplasma und den Dendriten zu sehen. In der zweiten Spalte ist die MAP2-Färbung, welche zur Identifizierung der Neurone und ihrer visuellen Begutachtung diente, zu sehen. Die beiden letzten Spalten der Abbildung 33 zeigen die DAPI-Kernfärbung, sowie das zusammengesetzte Bild aus Überlagerungen aller Färbungen.

Durch die Transfektion mit der siRNA gegen Aromatase (siAro) wurde die Morphologie und das Überleben der Neurone gegenüber der unbehandelten und mit der Kontroll-siRNA (siCyPB) transfizierten Neuronen augenscheinlich nicht negativ beeinflusst (Abbildung 33 und Abbildung 35). Eine Verringerung der Synaptophysin-Immunreaktivität sowohl nach siAro als auch nach siCyPB ist bei der Betrachtung mit bloßem Auge sichtbar.

Durch hoch auflösende konfokale Aufnahmen kann diese Veränderung in der Synaptophysin-Immunreaktivität (Abbildung 34) in den mit siRNA transfizierten Neuronen gegenüber der unbehandelten Kontrolle verdeutlicht werden. In der oberen Bilderreihe ist die als Neuronenmarker genutzte MAP2-Färbung zu sehen. Unterschiede in dieser Färbung sind für die verschiedenen Versuchsgruppen nicht erkennbar. Die darunter liegende Bilderreihe zeigt die dazu gehörige Synaptophysin-Immunreaktivität der verschieden behandelten Neurone. Man

erkennt hier eine punktierte Synaptophysin-Färbung die gleichmäßig im Soma der Neurone verteilt ist. Bei der Betrachtung der Bilder fällt bereits ein Unterschied der Immunreaktivität von Synaptophysin nach der Transfektion mit siRNAs (Bilder E und F) gegenüber untransfizierten Neuronen (Bild D) auf. Die quantitative Analyse der Bilder (Abbildung 37 A) ergibt eine höchst signifikante Verringerung der Synaptophysin-Immunreaktivität um ca. 41 % gegenüber dem Kontrollniveau für Accell siAro. Auch die als Negativkontrolle dienende siRNA siCyPB führt zu einer Reduktion der Synaptophysin-Immunreaktivität um ca. 58 %.

Abbildung 35 zeigt Neurone nach der Transfektion mit den Kontroll-siRNAs oder gegen Aromatase und deren Synaptopodin-Immunreaktivität in den Neuronen in Abhängigkeit zur Behandlung. Die Verteilung der Signale innerhalb und zwischen den Neuronen ist für die Synaptopodin-Färbung heterogener im Vergleich zur Synaptophysin-Färbung. Auch die Färbungsintensität zwischen den Neuronen eines Bildes scheint stärker zu schwanken. In der zweiten Spalte ist erneut die MAP2-Färbung zu sehen und die vorletzte und letzte Spalten der Abbildung 35 zeigen wieder die DAPI Kernfärbung, sowie die Überlagerung aller Färbungen. Eine Verringerung der der Synaptopodin-Immunreaktivität ist nur nach siAro bei der Betrachtung mit bloßem Auge bemerkbar.

Die Betrachtung der hochauflösenden konfokalen Synaptopodin Bilder (Abbildung 36 D, E, F) unterstützt den gewonnenen Eindruck. Sie zeigen die Synaptopodin-Färbung im Soma im Detail. Die Bilder Abbildung 36 A bis C zeigen wie zuvor die neuronentypische MAP2-Färbung. Die quantitative Auswertung der Bilder (Abbildung 37 B) ergibt eine höchst signifikante Verringerung der Synaptopodin-Immunreaktivität nach siAro von ca. 40 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Anders als bei Synaptophysin hat die Negativkontroll- siRNA siCyPB keinen nennenswerten Einfluss auf die Synaptopodin-Immunreaktivität.

Auffällig ist, dass sowohl das präsynaptische Markerprotein Synaptophysin als auch das postsynaptische Markerprotein Synaptopodin im Betrag gleich stark gegenüber der Kontrolle durch die gegen die mRNA der Aromatase gerichtete siRNA (siAro) reduziert werden.

Um auszuschließen, dass der starke Effekt der Kontroll-siRNA siCyPB auf die Synaptophysin-Immunreaktivität nicht durch eine starke Reduktion der Aromatase-Proteinexpression zustande kommt, wurde die Aromatase-Immunreaktivität in den transfizierten Neuronen gemessen und mit unbehandelten Neuronen verglichen.

Die immunzytochemischen Färbungen gegen Aromatase (Abbildung 32 Bilder A, D, G) zeigen ein distinktes, netzartiges Signal im Cytoplasma unbehandelter Neurone,

welches sich auch in den Neuriten fortsetzt. Die Transfektion mit der gegen Aromatase-mRNA gerichteten siRNA (Abbildung 32 D) führt zu einer deutlich erkennbaren Abschwächung dieser Immunreaktivität. Weiter zeigt Abbildung 32 in der mittleren Spalte (Bilder B, E, H) die MAP2-Färbung der Neurone und in der rechten Spalte die Überlagerung der MAP2- und Aromatase-Färbung. Die Analyse zeigt (Abbildung 32 J) eine höchst signifikante Abnahme des Aromatasesignals nach siAro gegenüber der unbehandelten Gruppe von 122 %. Die siRNA siCyPB führt zu einem leichten, aber nicht signifikanten Rückgang der Aromatase-Immunreaktivität (Abbildung 32 G, J). Dieser Effekt von siCyPB entspricht in etwa dem Effekt, der für siCyPB auf mRNA Ebenen für Aromatase ermittelt wurde. Die verwendeten siRNAs führen somit zu ähnlichen Effekten für die Aromatase, sowohl auf mRNA wie auf Proteinebene. Der stärkere Effekt der siCyPB auf die Synaptophysin-Immunreaktivität im Vergleich zu der siAro ist somit nur zum Teil durch den Transfektionseffekt auf die Aromataseexpression zu erklären. Für den anderen, größeren Teil des Effektes müssen daher bisher unbekannte regulatorische Verbindungen zwischen CyPB und Synaptophysin bestehen.

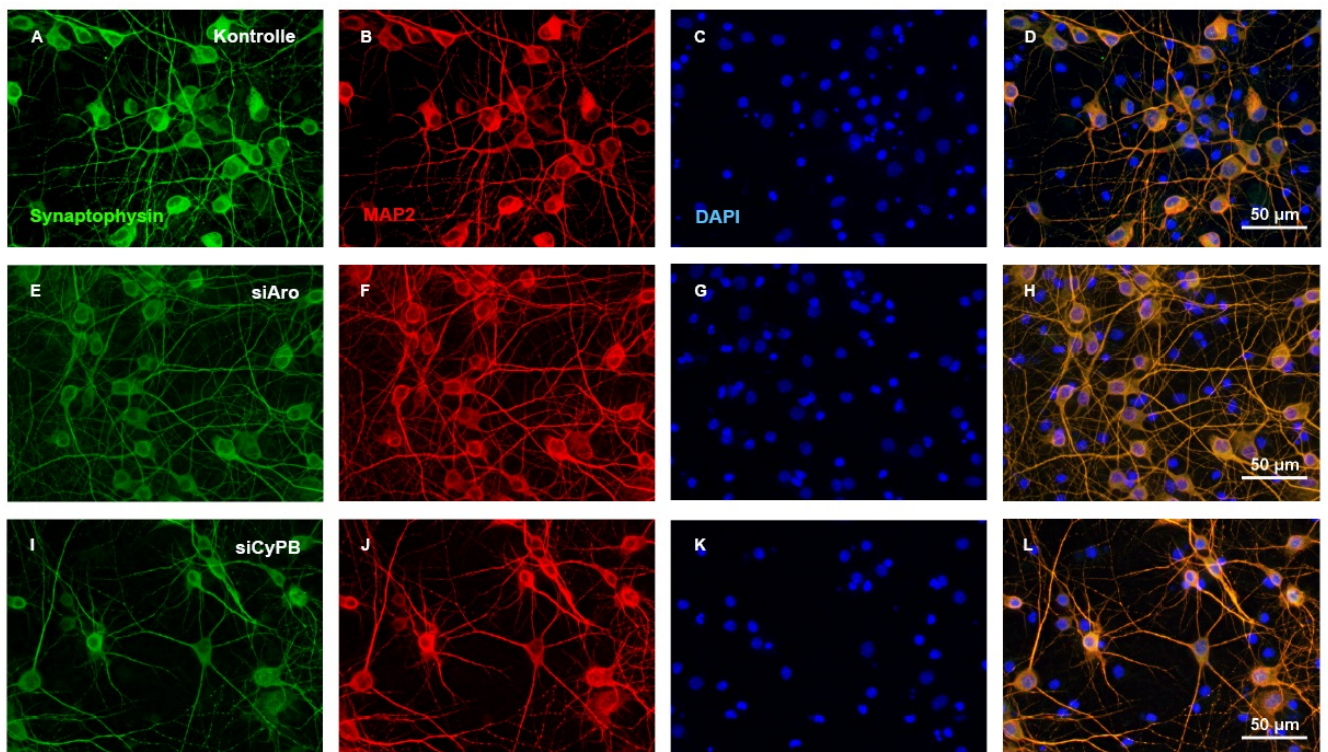


Abbildung 33: Synaptophysin-Immunreaktivität nach Aromatase-Knockdown mittels Accell siRNA. Hippocampale Dispersionskulturen (präpariert an E18 + 7 Tage *in vitro* Vorkultur) wurden mit Accell siRNA gerichtet gegen die Aromatase-RNA und der als Kontrolle dienenden siRNA gegen Cyclophilin B transfiziert. Die Neurone wurden nach vier Tagen fixiert und die Synaptophysin- (A, E, I) und die MAP2- Immunreaktivität (B, F, J) mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Bilder A-D zeigen unbehandelte, E-H mit

siAro transfizierte und I-L mit siCyPB transfizierte Neurone. Neurone wurden anhand ihrer positiven MAP2-Immunreaktivität (rot) identifiziert. Die Neurone zeigen keine morphologischen Unterschiede nach der Transfektion mit Accell-siRNA. Eine Abnahme der Synaptophysin-Immunreaktivität (grün) ist nach Applikation beider siRNAs zu erkennen.

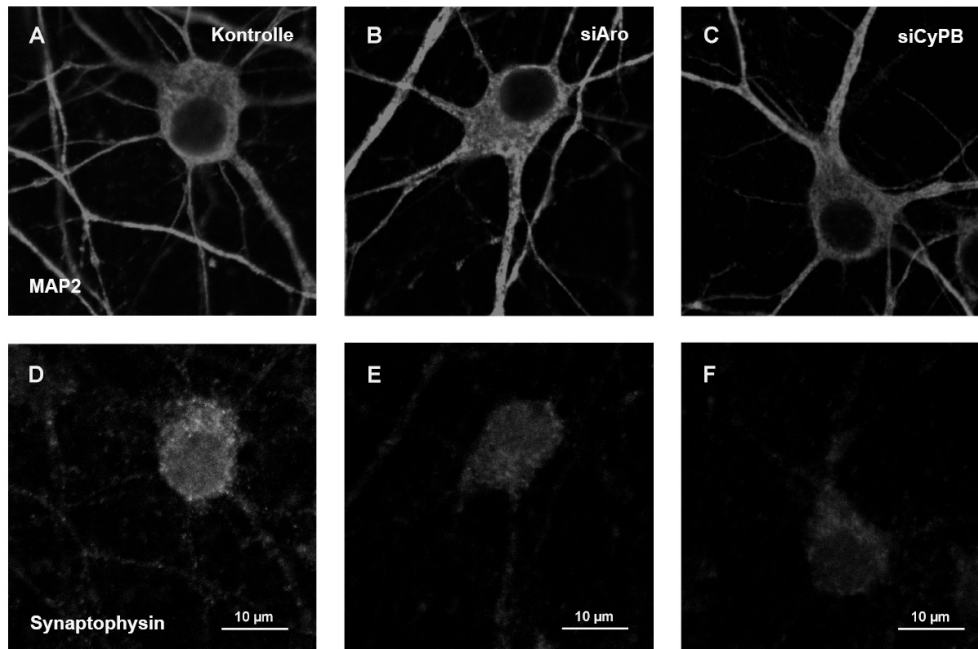


Abbildung 34: Quantitative Analyse der Synaptophysin-Immunreaktivität nach Aromatase-Knockdown mittels Accell siRNA. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen und zeigen repräsentativ die Synaptophysin-Immunreaktivität in (A+D) unbehandelten, (B+E) mit siAro transfizierten und (C+F) mit siCyPB transfizierten Neuronen. Die Bilder A-C zeigen die MAP2-Immunreaktivität und die Bilder D-F die Synaptophysin-Immunreaktivität. Die Bilder D bis F zeigen eine klare und punktierte Synaptophysin-Immunreaktivität, welche nach Applikation von siAro und siCyPB deutlich reduziert ist.

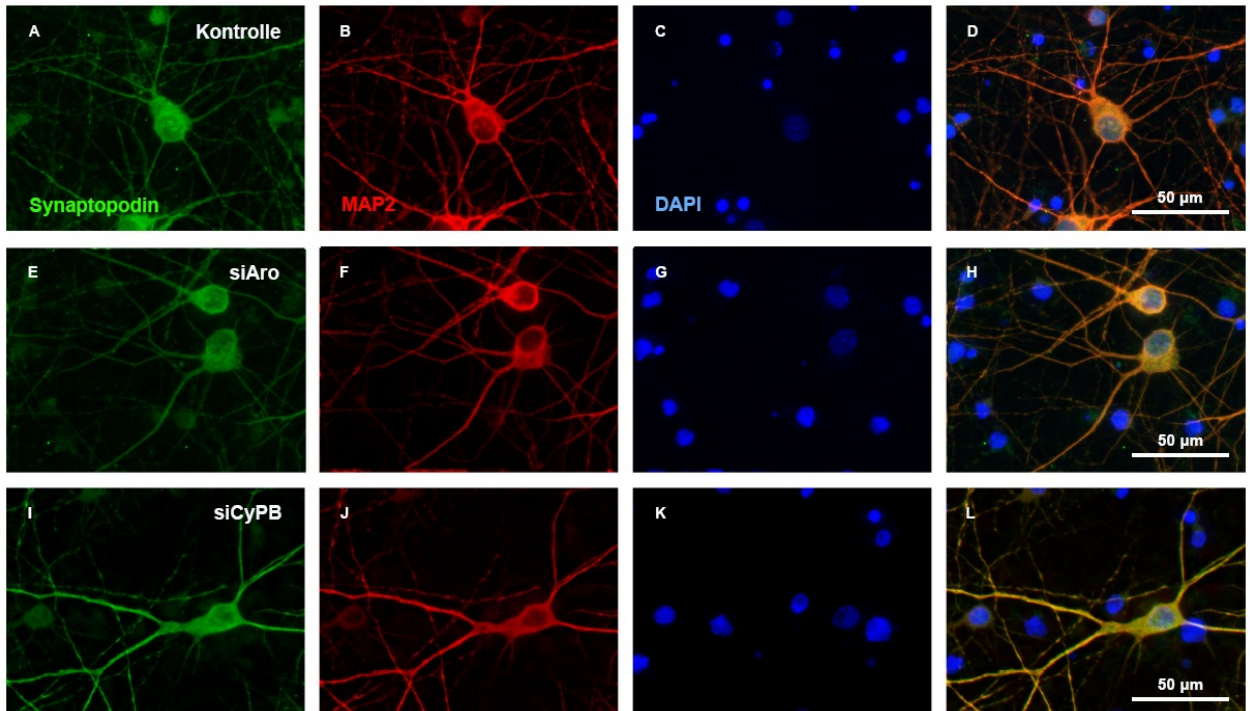


Abbildung 35: Synaptopodin-Immunreaktivität nach Aromatase-Knockdown mittels Accell siRNA. Hippocampale Dispersionskulturen (präpariert an E18 + 7 Tage *in vitro* Vorkultur) wurden mit Accell siRNA gerichtet gegen die Aromatase-mRNA und der als Kontrolle dienenden siRNA gegen Cyclophilin B transfiziert. Die Neurone wurden nach vier Tagen fixiert und die Synaptopodin- (A, E, I) und die MAP2- (B, F, J) Immunreaktivität mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Bilder A-D zeigen unbehandelte, E-H mit siAro transfizierte und I-L mit siCyPB transfizierte Neurone. Neurone wurden anhand ihrer positiven MAP2-Immunreaktivität (rot) identifiziert. Die Neurone zeigen keine morphologischen Unterschiede nach der Transfektion mit Accell-siRNA. Eine Abnahme der Synaptopodin-Immunreaktivität (grün) ist nach siRNA gerichtet gegen Aromatase-mRAN (F) zu erkennen. Die siCyPB führt im Vergleich zu unbehandelten Neuronen nicht zu einer Abnahme der Synaptopodin-Immunreaktivität.

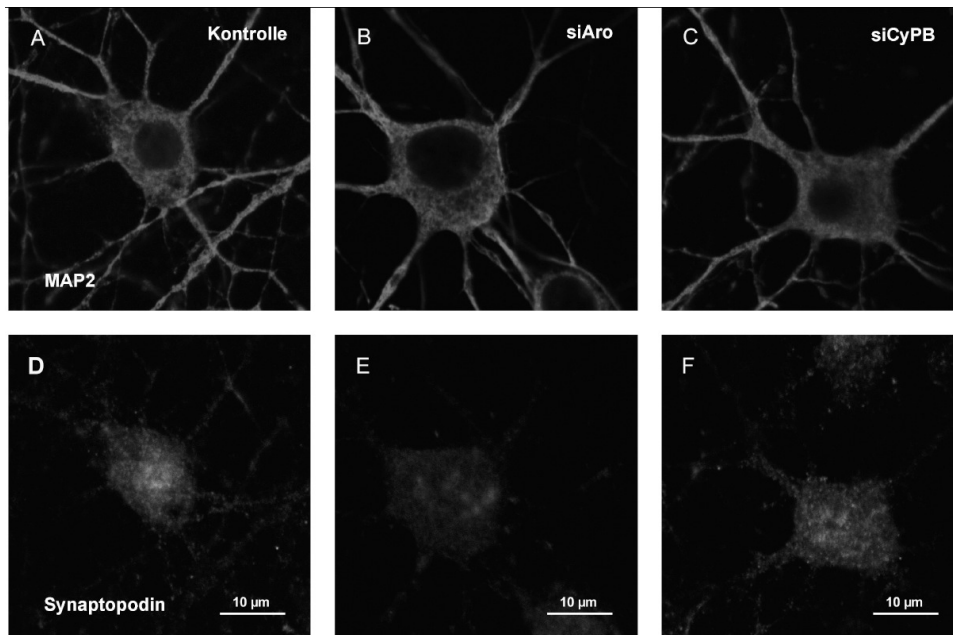


Abbildung 36: Quantitative Analyse Synaptopodin-Immunreaktivität nach Aromatase-Knockdown mittels Accell siRNA. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen und zeigen repräsentativ die Synaptopodin-Immunreaktivität in (A+D) unbehandelten, (B+E) mit siAro transfizierten und (C+F) mit siCyPB transfizierten Neuronen. Die Bilder A-C zeigen die MAP2-Immunreaktivität und die Bilder D-F die Synaptopodin-Immunreaktivität. Die Bilder D bis F zeigen eine klare und punktierte Synaptopodin-Immunreaktivität, welche nach Applikation von siAro deutlich reduziert ist.

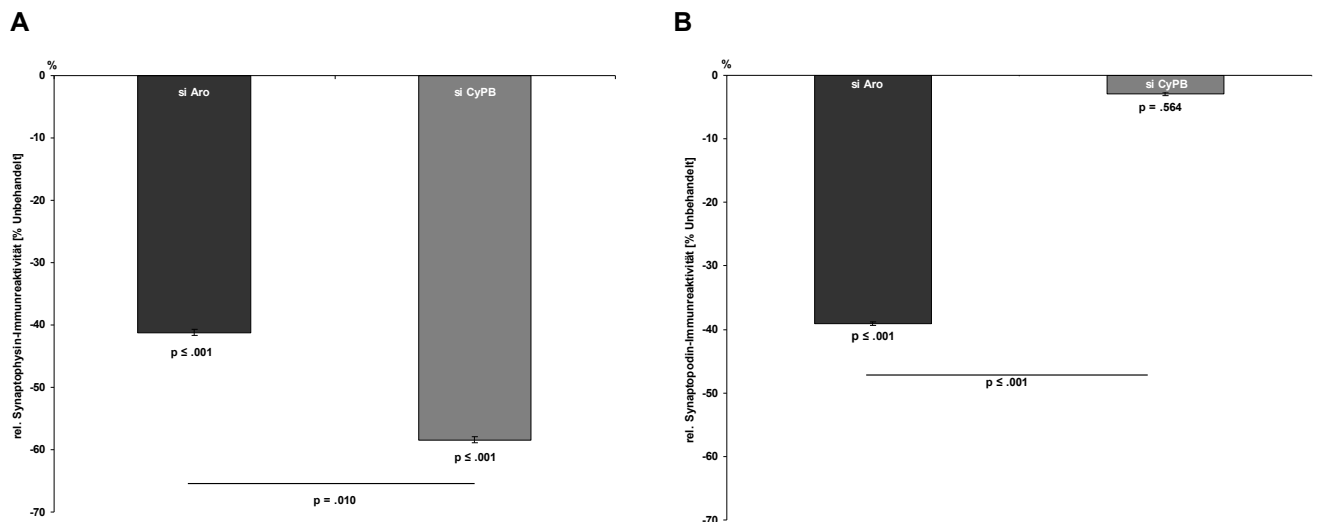


Abbildung 37: Quantitative Analyse des Aromatase-Knockdowns auf die Immunreaktivität von Synaptopodin und Synaptophysin in hippocampalen Dispersionskulturen. Hippocampale Dispersionskulturen (präpariert E18 + 7 Tage *in vitro* Vorkultur) wurden mit Accell siRNA gerichtet gegen die Aromatase-RNA und der als Kontrolle dienenden siRNA gegen Cyclophilin B transfiziert. Die Neurone wurden für weitere vier Tage kultiviert und anschließend die Immunreaktivität ermittelt. (A): Quantitative Analyse der Synaptophysin-Immunreaktivität (Abbildung 34) nach Aromatase-Knockdown. Sowohl der *Knockdown* der Aromatase als auch der von Cyclophilin B (Kontrolle) führen zu einer

hoch signifikanten Abnahme der Synaptophysin-Immunreaktivität. n= je Bedingung 100 bis 110 Neurone aus drei unterschiedlichen Kulturen. ANOVA + LSD, Konfidenzintervall $\leq 0,5$

(B): Quantitative Analyse der Synaptopodin-Immunreaktivität (Abbildung 36) nach Aromatase-*Knockdown*. Dieser führt zu einer hoch signifikanten Abnahme der Synaptopodin-Immunreaktivität um 40 % im Vergleich zu unbehandelten Neuronen. Die Kontroll-siRNA hat keinen signifikanten Einfluss auf die Synaptopodin-Immunreaktivität. n= je Bedingung 259 bis 265 Neurone aus drei unterschiedlichen Kulturen. ANOVA +LSD; Konfidenzintervall $\leq 0,5$

4. DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die verschiedenen Aromataseinhibitoren in der Stärke ihres Einflusses auf die synaptischen Proteine, die Synapsenanzahl sowie die reduzierende Wirkung auf die 17β -Estradiolsynthese voneinander unterscheiden, jedoch in der Tendenz die gleichen Effekte hervorrufen. Alle Aromataseinhibitoren führen zu einer reduzierten 17β -Estradiolsynthese und einer Reduktion der Spinesynapsen-Anzahl. Der Grad der 17β -Estradiol-Reduzierung korreliert dabei nicht mit der Stärke der Reduktion der Spinesynapsen-Anzahl. Einhergehend damit führen die Aromataseinhibitoren zu einer Zunahme der prä- und postsynaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptopodin.

Die Reduktion der Aromatase-mRNA mittels *Knockdown* durch siRNAs führt hingegen zu einer verringerten Menge der untersuchten synaptischen Proteine.

4.1. Vergleich der 17β -Estradiol-reduzierenden Wirkung verschiedener Aromataseinhibitoren im neuronalen Modellsystem

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Estrogene auch im Gehirn lokal synthetisiert werden und einen Einfluss auf neuronale Prozesse haben (siehe Einleitung 1.5). In der Literatur werden die Effekte von Aromataseinhibitoren in Bezug auf Einschränkungen der Lern- und Gedächtnisleistungen bei Brustkrebspatientinnen kontrovers diskutiert.

Eine Reihe von klinischen Studien beschreibt kognitive Beeinträchtigungen vor allem für verbales und visuelles Lernen und Erinnern kurz nach und während der Therapie mit Aromataseinhibitoren (Shilling et al., 2001; Castellon et al., 2004; Jenkins et al., 2006; Phillips et al., 2010; Bender et al., 2007; Jenkins et al., 2004; Phillips und Bernhard, 2003). Diese Beeinträchtigungen sind 12 Monate nach der Therapie deutlich verringert und sind später meist nicht mehr messbar (BIG 1-98 Studie).

Aktuelle Veröffentlichungen deuten jedoch darauf hin, dass die Therapie mit Aromataseinhibitoren allgemein keine negativen Effekte auf Kognition haben (Jenkins et al., 2006; 2008; Phillips et al., 2011). Bei einzelnen Patientinnen sind

jedoch messbare Unterschiede der Gedächtnisleistung während der Therapie dokumentiert. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Behandlung und kognitiven Einschränkungen besteht damit jedoch noch nicht. Eine mögliche Ursache für die kognitiven Beeinträchtigungen wird von Chang (Chang et al., 2013) beschrieben. Er fand heraus, dass Letrozol neben der Reduktion der dendritischen Spine-Dichte und der synaptischen Proteine auch zu einer Abnahme des Mitochondrien-Volumens führt. Wurden die hippocampalen Neurone und Schnitte zusätzlich noch mit A β ₁₋₄₂ (Beta amyloid) behandelt, welches als ein Faktor für Alzheimer (AD) angesehen wird, verstärkt sich der nach Letrozol beschriebene Effekt. Es ist daher anzunehmen, dass Letrozol und andere Aromataseinhibitoren Neurone für pathologische Erkrankungen wie Alzheimer anfälliger machen, sie aber nicht auslösen (Chang et al., 2013). Hierdurch könnten die klinischen Befunde der kognitiven Defizite bei Brustkrebspatientinnen unter Therapie mit Aromataseinhibitoren erklärt werden.

Neben negativen Auswirkungen von Aromataseinhibitoren auf Kognition sind auch positive Effekte beschrieben. Letrozol führt beispielsweise bei älteren Männern zu verbesserten räumlichen Lernen (*spatial learning*) (Cherrier et al., 2005). Auch in verschiedenen Untersuchungen an Tieren führen Aromataseinhibitoren in beiden Geschlechtern sowohl zum verbesserten (González et al., 2007; Aydin et al., 2008; Moradpour et al., 2006) als auch zum schlechteren Abschneiden in verschiedenen Lern- und Gedächtnisparadigmen.

Vergleiche der pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen aus der Brustkrebstherapie stammenden Aromataseinhibitoren wurden zuvor nur im Bezug auf ihre Estrogenspiegel senkende Wirkung im Plasma und in Brustkrebsgewebe sowie auf die Gesamtkörper-Aromataseaktivität durchgeführt (Geisler et al., 2002; 2008). Eine weitere Studie verglich Aromataseinhibitoren *in vitro* mit Blick auf ihre relative Potenz in verschiedenen humanen und Hamster Geweben (Bhatnagar et al., 2001).

Untersuchungen mit verschiedenen Aromataseinhibitoren zeigten zum Teil unerwartete Effekte. So berichtet Harada (Harada et al., 1999) von einer Zunahme der Aromatase-Immunreaktivität in JEG 3 Zellen nach der Applikation verschiedener nichtsteroidaler Aromataseinhibitoren darunter auch Fadrozol. Laut dieser Untersuchungen wird für eine verstärkt gefundene Immunreaktivität/Proteinexpression nach Applikation der Aromataseinhibitoren eine Stabilisierung des Aromataseenzym durch die Komplexbildung mit dem Aromataseinhibitor und/oder eine durch die Aromataseinhibitoren verringerte *Turnover*-Rate angenommen (Harada et al., 1999). Auch Choate (Choate und Resko, 1996) berichtet, dass Letrozol im Gehirn von männlichen Meerschweinchen zu einer

Erhöhung der Aromataseaktivität führt, die jedoch nicht von Änderungen der Steroidlevel im Serum begleitet werden. Ein autoregulatorischer Mechanismus zur Kompensierung der Enzyminhibition könnten ursächlich hierfür sein.

Da der Einfluss von Aromataseinhibitoren auf Neuronen bisher nur indirekt verglichen wurde, sind in dieser Arbeit erstmalig verschiedene Inhibitoren direkt in neuronalen Modellsystemen verglichen worden. Um die Potenz der Aromataseinhibitoren im Bezug auf die 17β -Estradiolsynthese in neuronalen Zellen vergleichen zu können, wurden hippocampalen Dispersionskulturen nach einer Vorkulturzeit von 21 Tagen für eine weitere Wochen mit den Aromataseinhibitoren Letrozol, Anastrozol und Fadrozol behandelt. Ungleich als in anderen Veröffentlichungen beschrieben wurde eine lange Vorkulturzeit der Neurone gewählt (die Behandlungsdauer ist vergleichbar), damit diese Kulturen mature Synapsen ausgebildet können. Somit war die Voraussetzung geschaffen, den Einfluss von Aromataseinhibitoren auf Synapsen in einem Modellsystem zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei gleicher eingesetzter Konzentration der Aromataseinhibitoren von 100 nM Anastrozol gefolgt von Letrozol zu einer signifikanten Reduzierung des sezernierten 17β -Estradiols um 42 % bzw. 35 % führt. Fadrozol senkt die gemessene 17β -Estradiolkonzentration nur geringfügig (14 %). Betrachtet man die in klinischen Untersuchungen ermittelte Potenz dieser Inhibitoren auf Aromatase im gesamten Körper (siehe Abbildung 3), so wurde gezeigt, dass Fadrozol mit einer Potenz von 93 % gleiche Werte wie Anastrozol aufweist. Letrozol ist mit einer Potenz von 99 % auf den gesamten Körper am wirksamsten in der Inhibierung der Aromatase (Santen und Harvey, 1999). Bei einem direkten Vergleich von Letrozol und Anastrozol in Brustkrebspatientinnen zeigte sich ein vergleichbares, wenn auch differenzierteres Bild. Letrozol reduziert hier die gemessenen Estrogekonzentrationen im Plasma um 87,8 % und die Aromataseaktivität im gesamten Körper um mehr als 99 %. Anastrozol reduziert die 17β -Estradiolkonzentration nur um 84 % und die Aromataseaktivität um 97 % (Geisler et al., 2002). Bei den klinischen Vergleichen der Aromataseinhibitoren ist zu berücksichtigen, dass die Inhibitoren hierbei in unterschiedlichen Tagesdosen verabreicht werden (Letrozol: 2,5 mg; Anastrozol: 1,0 mg; Fadrozol: 4,0 mg). Fadrozol wurde in klinischen Studien soweit bekannt nicht direkt mit einem der anderen Aromataseinhibitoren verglichen. Lediglich ein direkter *in vitro* Vergleich ist bekannt. Hierbei wurden Gewebe aus Hamstern und Brustkrebspatientinnen sowie Zelllinien mit den drei Aromataseinhibitoren behandelt und ihre relative Potenz ermittelt. Dabei zeigte sich, dass sowohl Letrozol als auch Fadrozol in ihrer Aromatase inhibierenden Wirkung potenter waren als Anastrozol. Je nach

Gewebeart und Ursprungsspezies war zum einen Teil Letrozol und zum anderen Teil Fadrozol potenter gegenüber dem jeweils anderen (Bhatnagar et al., 2001). Das Fehlen weiterer Vergleiche mit Fadrozol, liegt wahrscheinlich daran, dass Fadrozol in mehreren Ländern keine therapeutische Zulassung hat und zudem zur zweiten Generation der Aromataseinhibitoren gezählt wird.

Fester (Fester et al., 2006) beschreibt in seinen Experimenten nach siebentägiger Applikation von Letrozol einen zu meinen Ergebnissen vergleichbar starken Rückgang der 17β -Estradiolkonzentration (-36 %) in hippocampalen Dispersionskulturen. Die verwendeten Kulturen waren im Vergleich zu in dieser Arbeit verwendeten mit einer Vorkulturzeit von vier Tagen jedoch jünger. In Schnittkulturen ist nach vier tägiger Applikation von Letrozol ein Rückgang der 17β -Estradiolkonzentration um ca. 65 % beschrieben (Kretz et al., 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse und ihr Vergleich mit der Literatur zeigen, dass die Potenz der untersuchten Inhibitoren *in vitro* in neuronalen Kulturen leicht von der Gesamtpotenz *in vivo* abweicht. So zeigt Anastrozol in Neuronenkulturen eine stärkere Reduktion des ins Medium sezernierten 17β -Estradiols als Letrozol und ist somit in diesem System potenter. Ursächlich für die stärkere Potenz im Vergleich zu den klinischen Studien könnte sein, dass bei den hier durchgeführten Experimenten die Aromataseinhibitoren alle in gleicher Konzentration verwendet wurden, wohingegen die Dosis von Letrozol in der Klinik ca. doppelt so hoch ist wie die von Anastrozol. Die Studie von Bhatnagar et al. (2001) hat gezeigt, dass die Potenz der Inhibitoren sowohl gewebe- als auch speziesabhängig ist. Dies wird auch von Choate (Choate und Resko, 1996) unterstützt, der artspezifisch unterschiedliche Effekte von Letrozol auf die Aromataseaktivität im Gehirn erwähnt.

Der Vergleich mit Fester (Fester et al., 2006) legt ferner nahe, dass die Potenz der Aromataseinhibition nicht vom Entwicklungsstand bzw. Differenzierungsgrad der Neuronenkultur abhängt, da hier Letrozol in jungen Neuronenkulturen zu vergleichbaren Werten, wie sie in dieser Arbeit in murenen Neuronen gefunden wurden, führte.

Möchte man die 17β -Estradiolsynthese *in vitro* in hippocampalen Neuronen aus Ratte möglichst stark inhibieren, bietet sich den Ergebnissen dieser Arbeit nach der Einsatz von Anastrozol gefolgt von Letrozol an.

4.2. Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Spinesynapsen-Anzahl hippocampaler Schnittkulturen

Nachdem die 17β -Estradiol reduzierende Wirkung der verschiedenen Aromataseinhibitoren in Neuronen-Kulturen analysiert und verglichen wurde, folgten Untersuchungen zur Auswirkung der verschiedenen Inhibitoren auf die Synapsen in Dispersionskulturen und organotypischen Schnittkulturen. Ferner sollte untersucht werden, ob sich die zuvor festgestellten unterschiedlichen Wirkungsgrade der Aromataseinhibitoren in ihrem Einfluss auf synaptischer Ebene widerspiegeln. Aus einer Reihe vorhergehender Studien ist bekannt, dass die Reduzierung von 17β -Estradiol sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Reduktion der Spinesynapsen Anzahl führt (Kretz, 2004; Wallace et al., 2006; Fester et al., 2009a; Hajszan und Leranth, 2010; Zhou et al., 2010b). Letrozol kann die Blut-Hirn-Schranke aufgrund seiner hohen lipophilen Eigenschaft leicht überqueren (Zhou et al., 2010a; Chang et al., 2013). Dies wird auch für die anderen Aromataseinhibitoren angenommen und unterstützt die Hypothese, dass die Reduktion des lokal gebildeten 17β -Estradiols zu einem Synapsenrückgang führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der zuvor festgestellte Wirkungsgrad der Aromataseinhibitoren (siehe Abbildung 9) keinen Rückschluss auf die Synapsen reduzierende Wirkung der Inhibitoren (Abbildung 16) zulässt. So weist Anastrozol, das zur hoch signifikanten Reduzierung der 17β -Estradiolkonzentration führte (- 43 %), die mit 9 % geringste Abnahme in der Synapsendichte auf, wohingegen Fadrozol, trotz seiner geringen Wirkung auf die 17β -Estradiolkonzentration (- 13 %), den signifikantesten Rückgang in der Synapsendichte hervorruft (- 24 %). Letrozol führt mit -23 % zu einem mit Fadrozol vergleichbaren Rückgang der Synapsendichte und reduzierte die 17β -Estradiolkonzentration signifikant um 35 %. Vergleichswerte lassen sich in der Literatur nur für Letrozol finden und unterstützen die gefundenen Ergebnisse. So führt Letrozol in vergleichbaren Schnittkulturen bei gleicher Vorkultur- und Behandlungsdauer zu einem mit ca. 32 % vergleichbaren Rückgang der Synapsendichte (Fester et al., 2009a). Andere Veröffentlichungen zeigen in Tieren nach einer einwöchigen Applikation von Letrozol im *Gyrus dentatus* einen Rückgang der Synapsendichte um 37 % (Bender et al., 2010) und in der CA1-Region des Hippocampus um 28 % sowie nach vierwöchiger Applikation um 36 % (Zhou et al., 2010b).

Wie auch in anderen Veröffentlichungen für Letrozol beschrieben wurde (Fester et al., 2009a; Kretz et al., 2004), zeigen die vorliegenden Untersuchungen mit den

verschiedenen Aromataseinhibitoren keine morphologischen Veränderungen der Synapsen bei der Auswertung mittels Elektronenmikroskopie. Dies spricht für einen physiologischen und nicht für einen toxischen Effekt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Aromataseinhibitoren in Bezug auf ihre reduzierende Wirkung der 17β -Estradiolkonzentration in Neuronenkulturen und ihren Einfluss auf die Synapsendichte lassen sich nicht direkt erklären.

Kretz und Kollegen konnten für Letrozol eine dosisabhängige Reduktion des freigesetzten 17β -Estradiols in hippocampalen Schnittkulturen zeigen. Dabei hatte Letrozol bei einer Konzentration von 10 pM noch keinen signifikanten Effekt, jedoch Konzentrationen von 1nM und 100 nM (Kretz, 2004). Diese Studie zeigte zudem eine ähnlich starke Reduktion von Boutons wie von Spinesynapsen in der CA1-Region nach Letrozolapplikation (Kretz et al., 2004). Dies verdeutlicht, dass es einen Zusammenhang zwischen Aromataseinhibitor-Dosis, 17β -Estradiolkonzentration und Spinesynapsen gibt. Je höher die Dosis des Aromataseinhibitors ist desto weniger Estrogen wird sezerniert und umso geringer ist die Anzahl der Spinesynapsen. Auch eine dosisabhängige Reduktion der Synaptophysin-Immunreaktivität ist in der Form beschrieben, dass je höher die applizierte Letrozol Konzentration in Dispersionskulturen ist, desto geringer ist seine Immunreaktivität (Prange-Kiel et al., 2006).

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge lässt sich der Zusammenhang zwischen Estradiol-reduzierender Wirkung und Reduktion der Spinesynapsen jedoch nicht auf den Vergleich der verschiedenen Aromataseinhibitoren übertragen. Da Fadrozol bei Brustkrebspatientinnen neben dem Einfluss auf die Aromatase auch einen auf die Synthese von Aldosteron haben kann, ist seine geringe Wirkung auf den 17β -Estradiolspiegel bei gleichzeitiger stärkster Synapsenreduktion möglicherweise durch diesen Nebeneffekt zu erklären. Doch dies scheint unwahrscheinlich, da es keine Veröffentlichungen gibt, die dies unterstützen. Es sind lediglich wenige Neuronenpopulationen im CNS bekannt, die für Aldosterone sensitiv sind und im Zusammenhang mit der Regulation der Flüssigkeitsaufnahme stehen (Geerling and Loewy, 2009).

Die zuvor beschriebenen Berichte über Beeinträchtigungen der kognitiven Leistungen, die mit der Aromataseinhibitor begleiteten Brustkrebstherapie einhergehen, lassen in Verbindung mit den vorliegenden *in vitro* Untersuchungen in neuronalen Modellsystemen folgende Schlüsse für deren klinischen Gebrauch zu. Anastrozol unterscheidet sich in seinem 17β -Estradiol-reduzierenden Wirkungsgrad kaum von Letrozol, besonders dann nicht, wenn man die von Geisler (Geisler et al., 2002) gefundene Werte für die Aromataseaktivität im gesamten Körper heranzieht,

welche für die Wirkung auf den Brustkrebs ausschlaggebend sind. Da Anastrozol jedoch gleichzeitig zu deutlich geringeren Verlusten von Spinesynapsen führt, ist eine geringere negative Beeinflussung der Lern- und Gedächtnisleistung während der Brustkrebstherapie möglich. Daher wäre Anastrozol aufgrund seiner vergleichbaren therapeutischen Wirkung bei gleichzeitig schwächeren Nebenwirkungen auf Strukturen, die grundlegend für Lern- und Gedächtnisleistungen sind, gegenüber Letrozol im klinischen Einsatz zu präferieren, sofern sich die Ergebnisse aus dem Modellsystem auf den menschlichen Organismus übertragen lassen.

4.3. Veränderte Expression synaptischer Proteine nach Applikation verschiedener Aromataseinhibitoren

Nachdem der Wirkungsgrad und der Einfluss der verschiedenen Aromataseinhibitoren auf die Spinesynapsen-Dichte untersucht wurde, galt es den Einfluss auf die Prä- und Postsynapse differenzierter zu betrachten. Dazu wurde die Expression, der allgemein als Markerproteine geltenden Proteine Synaptopodin und Synaptophysin, sowohl in hippocampalen Dispersions- als auch in Schnittkulturen analysiert.

4.3.1. Einfluss der Aromataseinhibitoren auf Synaptopodin

Synaptopodin ist ein postsynaptisches, Aktin-assoziiertes Protein, das hauptsächlich in großen pilzförmigen (*Mushroom*-) Spines vorkommt, da es eng an interne Calciumspeicher, wie den Spine-Apparat assoziiert ist (Deller et al., 2003; Vlachos et al., 2009; Segal et al., 2010). Der Spine-Apparat kommt in 80 % aller *Mushroom* Spines vor (Gray, 1959; Harris et al., 1992; Spacek und Harris, 1997; Orth et al., 2005), welche gegenüber dünnen Spines länger bestehen und funktionell stärker sind (Holtmaat et al., 2005; Zuo et al., 2005; Tada und Sheng, 2006; Bourne und Harris, 2007; Kasai et al., 2010). Daher werden sie auch als „Gedächtnis“-Spines bezeichnet. Durch seine Aktin-bindenden Eigenschaften ist Synaptopodin wahrscheinlich an der Ausformung und Plastizität von Spines durch Kontrolle über ihr Aktin-Cytoskelett beteiligt.

Vorhergehende Studien zeigten, dass Synaptopodin anders als andere synaptische Proteine nach der Behandlung von hippocampalen Kulturen mit Estradiol eine reduzierte Expression aufweist (Fester et al., 2009b). Eine weitere Untersuchung hingegen kam zu dem Resultat, dass es in Folge der Letrozolapplikation zu einem Verlust in der Anzahl von murenen *Mushroom*-Spines kam (Vierk et al., 2012). Letrozol führt in Dispersionskulturen zu einem Rückgang der Synaptopodin-Immunreaktivität um ca. 20 % und auch in *Aromatase-Knockout*-Mäusen konnte eine Reduktion von Synaptopodin um 40 % in der CA1-Region beobachtet werden (Fester et al., 2013). Um den Widerspruch aufzuklären, dass sowohl die Applikation von Estradiol als auch die Aromataseinhibitor-induzierte Reduktion von Estradiol zu einer verminderten Synaptopodinexpression in Neuronen führt, untersuchten Fester und Kollegen über welchen Weg Synaptopodin in Neuronen reguliert wird. Sie konnten zeigen, dass die Synaptopodinexpression über genomische Signalwege in Abhängigkeit zur Expression der Estrogen Rezeptoren (ER) α und β reguliert wird. Durch Applikation von spezifischen ER α und β Agonisten und Antagonisten kamen sie zu dem Resultat, dass der ER β für die Estrogen vermittelte genomische Regulation der Zu- bzw. Abnahme von Synaptopodin verantwortlich ist (Fester et al., 2013). Letrozol reduziert die intrazelluläre Menge an Estradiol (ca. - 50 %, Fester et al., 2013) und führt gleichzeitig zur Heraufregulation von ER β . Die Applikation von 17 β -Estradiol hat den gegenteiligen Effekt, da sie zu einer Reduzierung des ER β führt (Fester et al., 2013). Dass mehr Estradiol (Applikation) als auch weniger Estradiol (Aromataseinhibition) zu einer Verringerung der Synaptopodinexpression führt, kommt nach Interpretation der Autoren dadurch zustande, dass das nach Letrozol verringert in der Zelle vorkommende Estrogen an die nun vermehrt exprimierten ER β bindet und so die Expression von Synaptopodin reduziert.

Eine Studie von Chamniansawat (Chamniansawat und Chongthammakun, 2012) zeigt im Gegenteil, dass Anastrozol zur reduzierten Expression des ER β in H19-7 Zellen führt. Nach seinen Erkenntnissen führt lokales 17 β -Estradiol im Hippocampus über den basalen nicht genomischen Mechanismus von ER α -PI3-Kinase (Phosphoinositid-3-Kinasen) zur erhöhten Expression von ER β . Diese Heraufregulation ist seinen Ausführungen nach nötig, damit exogenes 17 β -Estradiol verstärkend auf synaptische Plastizität wirken kann (Chamniansawat und Chongthammakun, 2012).

Eine weitere Publikation berichtet, dass Letrozol in Männchen *in vivo* zur Reduktion von ER α und ER β einhergehend mit und wahrscheinlich vermittelt durch eine regionspezifische Reduktion des SRC-1 (*nuclear receptor coactivator 1*) führt (Bian et al., 2014). Weiter sind die Level der synaptischen Proteine Synaptophysin, PSD-

95 und GluR1 während der postnatalen Entwicklung mit der Expression von SRC-1 korreliert (Bian et al., 2012).

Weitere Experimente, bei denen die Estrogen Rezeptoren durch ICI 182 780 geblockt wurden zeigten bei gleichzeitiger Applikation von 17 β -Estradiol keinen Einfluss mehr von 17 β -Estradiol auf die Synaptopodinexpression (Fester et al., 2009b). Dieses Ergebnis festigt die Interpretation der genomischen Regulierung von Synaptopodin über die Estrogen Rezeptoren. Experimente von Beyer (Beyer und Raab, 1998) beschreiben eine von 17 β -Estradiol dosisabhängige, schnelle, über membranassoziierte Rezeptoren (nicht genomisch) vermittelte Calciumfreisetzung aus internen Speichern. Estradiol stimuliert die Phospholipase C und induziert dadurch die Formation von Inositoltrisphosphat (IP₃), welches seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums aktiviert und zur Freisetzung des internen Calciums führt (Beyer et al., 2002). Weitere Experimente aus der Arbeitsgruppe Rune stellten eine Verbindung zwischen einer durch 17 β -Estradiol ausgelösten Calcium-Induzierten-Calciumfreisetzung (CICR) und der damit einhergehenden Synaptopodin-Reduktion her (Voets, 2008).

Disteldorf beschreibt einen Synaptopodin-Rückgang, der mit einer Reduktion der Spine-Apparate einhergeht. Anders als Letrozol, das ebenfalls zu einem vergleichbaren Rückgang Spine-Apparat-tragender Spines führt, wird die absolute Anzahl an Spinesynapsen durch Estradiol-Applikation jedoch nicht vermindert (Disteldorf, 2010). 17 β -Estradiol scheint damit vor allem mature *Mushroom* Spines, die reich an Synaptopodin sind, zu reduzieren, also selektiv Einfluss auf die verschiedenen Spinetypen zu nehmen. Synaptopodin scheint daher geeignet zu sein quantitative Aussagen über funktionelle Synapsen zu machen.

Die Arbeiten von Valchos et al. (2009) beschreiben ein von der Spineform unabhängiges Vorkommen von Synaptopodin in dissoziierten Neuronen, als auch ein vermehrtes Vorkommen von Synaptopodin in Spines mit einem großen Kopf, der von Synaptophysin positiven Terminalen innerviert wird (Vlachos et al., 2009). Es liegt daher nahe zu vermuten, dass Synaptopodin auch in dissoziierten Neuronen vornehmlich in reiferen Spines vorkommt.

Die 17 β -Estradiol vermittelte Reduktion von Synaptopodin entsteht der Arbeitsgruppe Rune nach durch eine Calciumzunahme im Spine, hervorgerufen durch einen NMDA- und AMPA- Rezeptor vermittelten Calciumeinstrom oder eine estrogeninduzierte Ca²⁺-Freisetzung führt zu einem CICR aus dem Spine-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum. Dieses Calcium bewirkt wiederum durch Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen-Kinasen eine Phosphorylierung und somit eine

Inaktivierung der Aromatase. Hierdurch könnte es zu einer vermehrten Expression des ER β und der damit verbundenen reduzierten Synaptopodinexpression kommen (Voets, 2008).

Entgegen der in der Literatur beschriebenen Lokalisierung von Synaptopodin in Spines und Dendriten in Assoziierung an deren Spine-Apparat und der somatischen Lokalisierung der Synaptopodin mRNA (Deller et al., 2000b; Mundel et al., 1997), konnte in dieser Arbeit auch eine somatische Lokalisation des Synaptopodin-Proteins mittels Immuncytochemie gezeigt werden (siehe Abbildung 14). Dies entspricht der Beschreibung von Fester (Fester et al., 2013). Anders als bei Fester et al, der eine Reduzierung der Synaptopodin-Immunreaktivität nach Letrozol in hippocampalen Dispersionskulturen beschreibt, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Zunahme der Synaptopodin-Immunreaktivität sowohl nach der Applikation von Letrozol als auch von Fadrozol. Lediglich nach Applikation von Anastrozol ist eine geringe, unsignifikante Reduzierung zu sehen. Allerdings unterscheiden sich die Experimente von Fester et al. zu den vorliegenden deutlich im Alter der verwendeten Dispersionskulturen. Hier wurden die Kulturen nur nach einer kurzen *in vitro*-Kulturzeit von vier Tagen für die Dauer einer Woche mit Letrozol behandelt und nicht wie in dieser Arbeit nach einer Vorkultur von 21 Tagen. Nach dieser langen Kulturzeit gelten die Synapsen als matur (Dotti et al., 1988) und die Anzahl an Synaptopodin beinhaltenden *Mushroom*-Spines sollte daher höher sein, da sowohl im Gehirn, als auch in der Niere die Synaptopodin Genexpression *in vivo* und *in vitro* entwicklungsbedingt reguliert wird (Mundel et al., 1997). So wird während der postnatalen Entwicklung der dendritischen Spines im Gehirn und in den Podozyten während der Nephrogenese Synaptopodin erst in späteren und maturaen Stadien, nachdem also die typische subzelluläre Architektur bereits ausgeprägt ist, exprimiert (Czarnecki et al., 2005). In Neuronen wird Synaptopodin somit erst in späteren Entwicklungsstadien exprimiert, in denen auch die Differenzierung der dendritischen Spines zeitgleich abläuft (Deller et al., 2006). So steigt in primären hippocampalen Neuronen die Menge an Synaptopodin parallel zur Reifung der Spines an.

Die Auswertungen der Immunoblots gleicher Kulturen unterstützen die für Letrozol und Fadrozol zuvor gefundenen Ergebnisse (siehe Abbildung 15). Auch hier kommt es zu einer Zunahme von Synaptopodin durch die Applikation der Aromataseinhibitoren. Fadrozol zeigt hierbei wie zuvor einen stärkeren Effekt auf die Synaptopodinexpression (+40 %) als Letrozol (+35 %). Anastrozol führt hingegen, anders als in der immuncytochemischen Auswertung, auch zu einer leichten Zunahme (+10 %). Die Auswertung der Blots ist jedoch nicht signifikant. Die Abnahme der Synaptopodin-Immunreaktivität in Dispersionskulturen nach

Anastrozol passt auch nicht ins Bild, wenn man die Ergebnisse aus den Schnittkulturen hinzuzieht. Hier führen alle Aromataseinhibitoren, bei gleicher Tendenz und Reihenfolge bei der Auswertung der Immunoblots und der Immunhistochemie, zu einer Zunahme der Synaptopodinexpression. Hierbei zeigt sich nach Anastrozol sogar die stärkste Zunahme, gefolgt von Fadrozol. Letrozol zeigt schließlich kaum eine Zunahme. Aufgrund aller Ergebnisse für Synaptopodin nach Applikation der Aromataseinhibitoren ist es wahrscheinlich, dass das Ergebnis für Anastrozol in Dispersionskulturen mit einem Fehler behaftet ist. Dafür spricht auch, dass es das einzige Resultat bei der Auswertung der Immunreaktivität in Dispersionskulturen ist, welches nicht signifikant ist. Alle anderen Messungen, auch die von Synaptophysin, resultieren in höchst signifikanten Ergebnissen. Dies zeigt, dass die Messung der Immunreaktivität in einzelnen Neuronen sehr valide ist.

Vergleichswerte für die Messung der Synaptopodin-Immunreaktivität in Schnittkulturen nach der Applikation von Aromataseinhibitoren sind nicht bekannt. Lediglich Spinophilin, ein an das Zytoskelett assoziiertes Protein der Postsynapse, das als postsynaptischer Marker dient, wurde in vergleichbaren Schnittkulturen nach Letrozol-Applikation analysiert. Hierbei kam es zu einer Reduktion der Spinophilin-Immunreaktivität um ca. 40 % (Prange-Kiel und Rune, 2006). Zhou und Kollegen (Zhou et al., 2010b) untersuchten ebenfalls Spinophilin nach Letrozol-Applikation, jedoch *in vivo*. Sie verglichen weibliche intakte Mäuse nach einwöchiger und vierwöchiger Letrozolbehandlung mit ovariectomierten Tieren unter dem gleichen Behandlungsplan. Hierbei fanden sie in den ovariectomierten Tieren nach einwöchiger Behandlung eine Abnahme an Spinophilin, nach vier Wochen jedoch eine Zunahme um ca. 20 %. Zu beiden Zeitpunkten fanden sie zudem eine Abnahme der Spinesynapsen im Hippocampus (Zhou et al., 2010b). Auch in der Aromatase-*Knockout*-Maus ist eine Reduktion der Immunreaktivität von Synaptopodin beschrieben, gleichzeitig jedoch auch ein starker Anstieg von Synaptophysin und Spinophilin (Bernard, 2013).

Der Einfluss von 17β -Estradiol auf die Expression von Synaptopodin wird durch eine Vielzahl von Faktoren - Aromataseaktivität, 17β -Estradiolkonzentration (Fester et al., 2009b), Estrogen Rezeptoren und deren Genaktivierung (Fester et al., 2013) - beeinflusst. Der diesen Expressionsveränderungen zu Grunde liegende Mechanismus (oder die Mechanismen) ist komplex und im Detail noch ungeklärt.

4.3.2. Einfluss der Aromataseinhibitoren auf Synaptophysin

Parallel zur Untersuchung der Auswirkungen der verschiedenen Aromataseinhibitoren auf die Synaptopodinexpression wurde auch die Expression von Synaptophysin untersucht. Synaptophysin ist ein Vesikelprotein der Präsynapse, das auch als ihr Marker verwendet wird (Fester et al., 2009b; Zhou et al., 2010b; Evans und Cousin, 2012). Synaptophysin wird durch Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen phosphoryliert (Barnekow et al., 1990; Linstedt, 1992; Rubenstein et al., 1993) und ist eines der Hauptproteine, das in maturen Neuronenendigungen Phosphotyrosin enthält (Pang et al., 1988). Daher ist es möglich, dass Synaptophysin Ziel von stromabwärts *second messenger* Systemen ist, die, wenn sie phosphoryliert sind auf Proteine, welche für die Aufrechterhaltung der synaptischen Architektur wichtig sind, einwirken. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Yokomaku (Yokomaku, 2003). In seinen Experimenten führt eine 24 stündige Applikation von 17 β -Estradiol in Dispersionskulturen zu einer Zunahme der Synaptophysinexpression. Diese Zunahme konnte durch die Gabe von ICI 182 780 unterbunden werden und spricht für eine Beteiligung der Estrogen-Rezeptoren bei der Regulation von Synaptophysin. Die Inhibierung der MAP-Kinase (MAP-K) und der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) bei gleichzeitiger Stimulation mit Estrogen führt zum Ausbleiben der Synaptophysinerhöhung. Dies zeigt eine Beteiligung der MAP-K und teilweise die der PI3-Kinasen an der Erhöhung der Synaptophysinexpression nach der Behandlung mit 17 β -Estradiol (Yokomaku, 2003). Eine um ca. 75 % gestiegene Synaptophysin-Immunreaktivität ist nach Applikation von 17 β -Estradiol beschrieben (Fester et al., 2009a). Unterstützt werden diese Ergebnisse von Kretz (Kretz et al., 2004), der zuvor gleiches sowohl in Dispersionskulturen als auch in Schnittkulturen zeigte. Einhergehend mit der 17 β -Estradiolapplikation wurde bei Kretz jedoch keine Veränderungen in der Anzahl von präsynaptischen Boutons beschrieben. Dies deutet auch darauf hin, dass Estradiol einen direkten Effekt auf Synaptophysin hat, so wie es bereits Yokomaku (Yokomaku, 2003) vermutete. Kretz konnte in der gleichen Veröffentlichung (Kretz et al., 2004) ebenfalls keinen Anstieg von Spines finden, obwohl auch das postsynaptische Markerprotein Spinophilin vermehrt exprimiert wurde. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Fester und Kollegen (Fester et al., 2009b), die bei dem oben erwähnten Anstieg von Synaptophysin und Spinophilin ebenfalls keine Veränderungen der Spinedichte finden konnten. Die veränderte Expression der synaptischen (Marker)-Proteine scheint somit nicht mit Veränderungen in der Anzahl der synaptischen Strukturen (Boutons und Spines) einherzugehen. Ähnliche

Beobachtungen beschreibt Zhou (Zhou et al., 2010a) *in vivo*. Er applizierte weiblichen, intakten und ovariectomierten Mäusen Letrozol und betrachtete sowohl die Expression der Synaptischen Proteine als auch die Anzahl an Spinesynapsen. Nach einwöchiger Behandlung stellte Zhou eine reduzierte Expression von Synaptophysin und Spinophilin fest, die mit einer reduzierten Spinesynapsen Anzahl einherging. Nach vierwöchiger Letrozolgabe zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Die Spinesynapsen ovariectomierter Tiere waren gegenüber der einwöchigen Behandlung weiter reduziert, jedoch nahm die Expression der synaptischen Proteine gegenüber der Kontrolle zu. Besonders Synaptophysin verzeichnete eine starke Zunahme von ca. 150 %. Unterstützt werden diese Beobachtungen von Untersuchungen an Aromatase-*Knockout*-Mäusen. Hier wurde in der CA1-Region ebenfalls ein Anstieg der Synaptophysin- und Spinophilinexpression gefunden. Auch hier war die Zunahme für Synaptophysin besonders stark (Bernard, 2013). Gleichzeitig wurde jedoch bei weiblichen Aromatase-*Knockout*-Mäusen ein Rückgang der Spinesynapsen festgestellt (Zhou et al., 2014 under Revision). Eine differenzierte Analyse der verschiedenen Spineformen blieb in diesem Zusammenhang jedoch aus. Es wäre interessant zu erfahren, ob sich die Anzahl von Spine-Apparat-positiven Spines (maturen, *Mushroom*-Spines) und das Verhältnis gegenüber den immaturren Spines verändert.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Verwendung der verschiedenen Aromataseinhibitoren sowohl in 28 Tage lang kultivierten Dispersionskulturen als auch in 11 Tage lang kultivierten Schnittkulturen zu einem Anstieg der Synaptophysinexpression führten. Diese Zunahme an Synaptophysin war besonders deutlich in den Dispersionskulturen zu sehen. In den Schnittkulturen wurde der leichte / tendenzielle Anstieg der Expression von einer deutlichen Reduktion an Spinesynapsen begleitet.

Es stellt sich die Frage welcher Faktor während der Entwicklung für die umgekehrten Effekte der Expression der synaptischen Proteine ausschlaggebend ist.

Bei Zhou führt eine längere Behandlungsdauer der Mäuse (12 Wochen alt) mit Letrozol zu der Umkehrung der Synaptophysinexpression. Allerdings bleibt der Vergleich der Kontrollgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten aus. Es ist daher vorstellbar, dass der beobachtete Effekt allein durch das fortgeschrittene Alter der Tiere und durch während dieser Zeit ablaufender ontogenetischer Entwicklungen begründet ist. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit ist wahrscheinlich die längere Vorkulturzeit der Dispersionskulturen (drei Wochen) ursächlich für die im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen (Fester et al., 2009a;

Prange-Kiel et al., 2006) gefundenen unterschiedliche Synaptophysinexpression nach Applikation von Aromataseinhibitoren. Unterschiede in den Ergebnissen, die aus Schnittkulturen gewonnen wurden sind schwieriger zu erklären, da die Kulturen sehr ähnlich waren. Auf eine Vorkulturzeit von vier Tagen folgte eine viertägige Behandlung mit Letrozol (Kretz, 2004; Prange-Kiel et al., 2006). Möglicherweise stellt die Kultivierungsdauer von elf Tagen bei einwöchiger Behandlungsdauer der Schnittkulturen der vorliegenden Untersuchungen gerade den Zeitpunkt der Umkehr der synaptischen Proteinexpression dar. Auch die längere Behandlungsdauer (vier Tage gegenüber sieben Tage) könnte ausschlaggebend sein.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sowohl für Synaptopodin als auch Synaptophysin zeigen ein einheitliches Bild. Die Applikation der Aromataseinhibitoren führt fortwährend zu einer Zunahme ihrer Expression. Dies widerspricht zum Teil den in anderen Studien gefundenen Ergebnissen, in denen eine Reduktion der 17 β -Estradiolsynthese zu einer Reduktion der synaptischen Markerproteine führt (s.o.). All diesen Publikationen ist gemein, dass sie die Auswirkungen einer reduzierten 17 β -Estradiolsynthese in jungen, nicht voll entwickelten Dispersionskulturen fanden. Sobald die synaptischen Proteine in adulten Tieren untersucht werden, verändert sich das Bild. In der adulten Aromatase-*Knockout*-Maus ist eine Zunahme von Synaptophysin und Spinophilin beschrieben, jedoch auch eine Abnahme von Synaptopodin (Bernard, 2013). Ferner beschreibt Zhou (Zhou et al., 2010b) eine Umkehrung der Expression synaptischer Proteine nach vierwöchiger Letrozolapplikation gegenüber einer einwöchigen Applikation. Des weiteren ist interessant, dass sowohl die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit als auch die der anderen Autoren meist einen Rückgang in der Anzahl der Spinesynapsen in Folge der 17 β -Estradiolreduktion beobachten, der im Widerspruch zur Expression der als Marker für Synapsen angesehenen Proteine steht. Die Zunahme der synaptischen Proteine nach länger anhaltender 17 β -Estradioldeprivation *in vivo* bzw. die mittellange Deprivation in murenen Modellsystemen, wie den von mir verwendeten, in Verbindung mit dem beobachteten Rückgang der Spinesynapsen, spricht dafür, dass möglicherweise ein kompensatorischer Mechanismus in Folge der anhaltenden 17 β -Estradioldeprivation oder der verringerten Synapsendichte auftritt. Dieser Mechanismus könnte noch verbliebene synaptische Verbindungen stärken und so ihrem Verlust entgegenwirken. Möglich ist auch, dass die Deprivation zur Bildung von prä- und postsynaptischen Strukturen führt, die jedoch keine gegenseitigen Verbindungen

eingehen und so bei der Auswertung nicht als Spinesynapsen gewertet werden. Eine differenziertere elektronenmikroskopische Untersuchung der Spinesynapsen könnte Aufschluss darüber geben, ob sich die Gesamtzahl der Spinesynapsen nach Aromataseinhibition verändert oder ob es nur in der Subpopulation der Spine-Apparat-positive Synapsen zu einer Veränderung kommt. Diese Untersuchungen sollten zudem an verschiedenen Entwicklungszeitpunkten sowie nach kurzer (einwöchiger) und langer (dreiwöchiger) Behandlung mit den Aromataseinhibitoren durchgeführt werden.

4.4. Knockdown-vermittelte Reduktion der Aromatase und deren Wirkung auf synaptische Proteine

Eine weitere Methode die Menge an synthetisiertem Estrogen in Neuronen *in vitro* zu reduzieren wurde auf den Mechanismus der RNA-Interferenz zurückgegriffen. Hierzu wurde zuerst die shRNA Methode angewendet. Bei der Validierung der generierten shRNA-Vektoren erwies es sich aufgrund der geringen Expression von Aromatase in den hippocampalen Neuronen und der niedrigen Transfektionsrate zunächst als schwierig die Effektivität des Aromatase-Knockdowns mittels realtime PCR nachzuweisen. Der aus diesem Grund generierte und in eine hippocampale Zelllinie stabil transfizierte Aromatase-Expressionsvektor erwies sich hingegen als geeignetes Testsystem. Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene konnte mit seiner Hilfe die Funktionalität des shRNA-Vektors pCGLH/shAro2 gezeigt werden. Er führt in den N-2a Zellen zu einer Reduktion der Aromataseexpression um ca. 20 % (Abbildung 26). Auch der andere Vektor (pCGLH/shAro3) führte zu einer Reduktion der mRNA, welche jedoch nicht signifikant ist. Dass die Reduktion sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (Abbildung 27) gleichermaßen abnimmt, spricht dafür, dass die *Turnover*-Rate des Proteins innerhalb des gewählten Zeitfensters, zwischen Auswertung der mRNA Level und der Proteinexpression, von 24 Stunden liegt. Um die Funktionalität der Konstrukte auch in den primären Neuronen zu zeigen, wurde hier, parallel zu den Arbeiten in den N-2a Zellen, die Aromatase-Immunreaktivität nach der Transfektion analysiert. Hier zeigte sich ein zu den Untersuchungen in der Zelllinie entgegengesetztes Bild. Der zuvor als funktionell eingestufte Vektor zeigte nahezu keinen reduzierenden Effekt auf die Aromatase-Immunreaktivität in dissoziierten Neuronen, wohingegen der Vektor pCGLH/shAro3 eine Reduktion von ca. 45 % (Abbildung 24) herbeiführte.

Trotz der starken Abnahme der Immunreaktivität war das Ergebnis nicht signifikant. Einer Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Zelltypen besteht möglicherweise darin, dass die Aromataseexpression in den primären Neuronen zu gering und von Neuron zu Neuron zu schwankend ist, als dass hier mittels Analyse der Immunreaktivität die Resultate aus der Zelllinie reproduziert werden können. In den N-2a Zellen wird die Aromatase aufgrund des Expressionsvektors ständig und konstant exprimiert. Dadurch kommt es bei der Bewertung der *Knockdown*-Rate der shRNA-Vektoren zu geringeren systemischen Schwankungen, die die Ergebnisse beeinflussen.

Da sich die shRNA Methode mit einer *Knockdown*-Rate von nur ca. 20 % als nicht ausreichend wirkungsvoll erwies und zusätzlich nur geringe Transfektionsraten erzielt werden konnten, wurde auf weitere Untersuchungen an mit den Konstrukten transfizierten Neuronen verzichtet.

Um die Auswirkungen einer reduzierten Estrogensynthese durch eine verringerte Aromatase mRNA Expression weiter zu untersuchen wurde der Einsatz von siRNAs evaluiert.

Verschiedene kommerziell erhältliche siRNAs (ON-TARGETplus siRNA, Thermo Scientific; Silencer[®], life technologies) wurden in Verbindung mit unterschiedlichen Transfektionsreagentien in primären hippocampalen Neuronen aus Ratten getestet. Hierbei wurden nur niedrige Transfektionsraten erreicht. Daher wurden Accell[®] siRNAs verwendet, die sich aufgrund von speziellen Modifikationen selber in die Neurone transfiziert. Es zeigte sich, dass die Transfektionsraten mit dieser siRNA sehr hoch waren (siehe Abbildung 29). Daraufhin wurde die *Knockdown*-Rate der Aromatase zu einem Zeitpunkt (DIV 9) hoher Aromataseexpression mittels *realtime* PCR ermittelt. Es zeigte sich, dass die Aromatase-mRNA-Menge durch die siRNA um 50 % gegenüber unbehandelten Neuronen reduziert wurde. Jedoch zeigte sich ein ähnlich starker Effekt auch bei den vom Hersteller empfohlenen Negativkontrollen. Die Positivkontrollen (Abbildung 30 B) zeigten, dass dieser Effekt nur für die Aromatase-mRNA beobachtet werden konnte. Die zuerst verwendete Negativkontrolle war mit einem Fluorophor gekoppelt, um transfizierte Neurone identifizieren zu können. Laut Hersteller (Thermo Scientific) ist es auch bei anderen Kunden vorgekommen, dass diese Kontroll-siRNAs einen Effekt auf die Ziel-mRNA hatte. Daher wurden die Versuche mit einer Kontrolle ohne Fluorophor wiederholt. Da auch hier ein ähnlicher Einfluss auf die Aromatase-mRNA zu sehen war, muss der Effekt entweder durch die Sequenz der Kontroll-siRNA oder durch die Transfektion selber begründet sein. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde

daher die eigentlich als Positivkontrolle gedachte siRNA gegen CyPB als Transfektionskontrolle verwendet. Auch sie zeigte einen signifikanten Effekt auf die Menge der Aromatase-mRNA von ca. 20 % gegenüber unbehandelten Neuronen. Dieser war jedoch deutlich geringer als der der ursprünglichen Negativkontrollen. Diese Reduktion der Aromatase-mRNA um ca. 20 % stellt wahrscheinlich den Einfluss der Transfektion auf die mRNA-Menge der Aromatase dar. Damit lässt sich vermuten, dass der Effekt der ursprünglichen Negativkontrollen eine Kombination aus Transfektionseffekt und *Off-target*-Effekten ist. Hierfür sprechen auch die Auswertungen der Aromatase-Immunreaktivität (siehe unten).

Nach Abzug des Transfektionseffekts führt die gegen die Aromatase-mRNA gerichtete siRNA (im Vergleich zur Transfektionskontrolle mit siCyPB) zu einer Reduzierung der Aromatase-mRNA um ca. 40 %. Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurde die Aromatase-Immunreaktivität der transfizierten Neurone mittels konfokaler Laser-Scanning-Aufnahmen analysiert und verglichen. Der Effekt, der als Kontrolle verwendeten siRNA gegen CypB, betrug auch hier ca. 20 % (Abbildung 32). Die siRNA gegen Aromatase führte zu einer höchst signifikanten Reduktion der Aromatase-Immunreaktivität um 120 % und bestätigt die hohe Wirksamkeit auch auf Proteinebene.

Nachdem die Wirksamkeit der siRNA gezeigt werden konnte, wurde analysiert, welchen Effekt die reduzierte Menge an Aromatase-mRNA und damit reduzierte 17 β -Estradiolsynthese auf die synaptischen Proteine Synaptopodin und Synaptophysin hat.

Die mit siAro transfizierten Neurone zeigten vier Tage nach der Transfektion eine höchst signifikante Reduzierung der Synaptophysin-Immunreaktivität um ca. 42 % gegenüber unbehandelten Neuronen (Abbildung 37 A). Dieser Wert ist vergleichbar zu den von Fester (Fester et al., 2009a) gemessenen Werten nach dem *Knockdown* von StAR (steroidogenic acute regulatory protein). StAR katalysiert den ersten Schritt der Steroid-Biosynthese und sein *Knockdown* hat somit ebenfalls eine reduzierte Estrogensynthese zur Folge. Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *Knockdown* der Aromatase-mRNA ist jedoch spezifischer, da alle anderen Produkte der Steroid-Biosynthese nicht durch ihn beeinträchtigt werden. Fester und Kollegen fanden in zu meinen vergleichbaren Dispersionskulturen eine Reduktion der Synaptophysin-Immunreaktivität nach StAR *Knockdown* von ca. 40 % (Fester et al., 2009a). Gleichzeitig führte der StAR-*Knockdown* zu einer Reduktion der 17 β -Estradiol-Konzentration im Medium um ca. 25 % (Fester et al., 2006).

Unerwarteterweise führte die Transfektion mit der Kontroll-siRNA (siCyPB) ebenfalls zu einer starken Reduktion der Synaptophysin-Immunreaktivität von ca. 55 %, die

nicht mit dem zuvor beschriebenen Transfektionseffekt zu erklären ist. Über die Funktion von CyPB ist nicht sehr viel bekannt. Für das Zellüberleben ist es nicht essentiell. Weiter ist es zusammen mit anderen Mitgliedern seiner Proteinfamilie an der Immunantwort durch Bindung an T-Lymphozyten beteiligt (Carpentier et al., 1999). Darüber hinaus ist sein Vorkommen in intrazellulären calciumgefüllten Vesikeln und in diesem Zusammenhang seine Beteiligung an Signalweiterleitungs-Mechanismen beschrieben (Bram et al., 1993). Zudem kommt CyPB im endoplasmatischen Retikulum vor und ist am sekretorischen *Pathway* beteiligt (Jin et al., 1994). Daher ist es möglich, dass der *Knockdown* von CyPB über bis jetzt unbekannte Mechanismen die Expression des präsynaptischen Vesikelproteins Synaptophysin reduziert.

Dafür, dass es sich bei dem Effekt der siCyPB nicht um einen estrogenvermittelten Effekt handelt, spricht auch, dass die siCyPB nahezu keinen Effekt auf die Immunreaktivität von Synaptopodin zeigte (siehe Abbildung 36). Der *Knockdown* der Aromatase mittels siAro führte hingegen zu einer deutlichen, höchst signifikanten Reduktion der Synaptopodinexpression um ca. 40 % (Abbildung 37 B). Fester und Kollegen (Fester et al., 2009a) untersuchten in ihren Experimenten nach dem *Knockdown* von StAR zwar nicht Synaptopodin, jedoch mit Spinophilin ein anderes postsynaptisches Markerprotein und fanden hier einen Rückgang um ca. 50 %. Andere Studien bei denen die Estrogensynthese durch den *Knockdown* eines an der Steroid-Biosynthese beteiligten Enzyms in Neuronen verringert wurde sind aus der Literatur nicht bekannt. In den Experimenten dieser Arbeit konnte durch den spezifischen *Knockdown* der Aromatase eine zum StAR-*Knockdown* (Fester et al., 2009) vergleichbar starke Reduktion sowohl der prä- als auch postsynaptischen Markerproteine zeigen werden.

Der Vergleich der Ergebnisse aus den Experimenten mit den Aromataseinhibitoren und denen mit den siRNAs zeigt im Bezug auf die synaptischen Proteine ein entgegengesetztes Bild. Die Applikation der Aromataseinhibitoren führte auf prä- und postsynaptischer Seite in vergleichbarem Maße zu einem vermehrten Vorkommen von Synaptophysin und Synaptopodin. Die verringerte Aromatasesynthese durch die Transfektion mit siRNAs führte hingegen zu einem Rückgang der synaptischen Proteine. Auch hier war der Rückgang des präsynaptischen Proteins mit einem ähnlich starken Rückgang des postsynaptischen Proteins verbunden. Beide Methoden wirken somit jeweils gleich stark auf die prä- und postsynaptischen Proteine. Dass sie jedoch entgegengesetzt wirken, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte die Transfektion mit der

siRNA zu einer geringeren Reduktion der 17 β -Estradiolsynthese führen und daher nicht die vermuteten Kompensationsmechanismen der Zelle für ein Übermaß an reduzierten Synapsen aktivieren. Zum anderen war die Inkubationszeit mit den Aromataseinhibitoren (sieben Tage) länger als die der siRNAs (vier Tage). Weiter unterschieden sich die verwendeten Dispersionskulturen in der Kultivierungsdauer bis zur Behandlung (21 Tage gegenüber sieben Tagen).

Es ist ferner möglich, dass die Aromataseinhibitoren zu unbekannt Nebenreaktionen führen, die ihrerseits Einfluss auf die Expression der synaptischen Proteine nehmen. Die Verminderung der 17 β -Estradiolsynthese durch den *Knockdown* der Aromatase-mRNA ist dem gegenüber spezifischer und schließt Nebenreaktionen nahezu aus.

In zukünftigen Experimenten sollten die Effekte eines länger andauernden Aromatase-*Knockdowns* auf synaptische Proteine untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss des *Knockdowns* auch in weiter entwickelten (maturen) Neuronen analysiert werden. Im Vergleich zu den mit den Aromataseinhibitoren erzielten Ergebnissen würde dies möglicherweise klären, ob die Zunahme der synaptischen Proteine nach der Applikation der Aromataseinhibitoren auf Nebenreaktionen der Inhibitoren beruhen, oder ob es sich dabei um einen Effekt langer Estradioldeprivation handelt.

4.5. Vergleich der verschiedenen Methoden zur Untersuchung des Estradiol-vermittelten Einflusses auf Neuronen

Der Vergleich der in dieser Arbeit angewendeten Techniken zur Reduzierung der 17 β -Estradiolsynthese – durch pharmakologische Inhibition der Aromataseaktivität oder Verringerung der Aromatase-Proteinmenge durch *Knockdown* der Aromatase-mRNA – zeigt die Vor- und Nachteile der jeweiligen Techniken. Die Verwendung der Aromataseinhibitoren ist einfach und kostengünstig. Durch die Applikation der Aromataseinhibitoren ins Kulturmedium werden alle Zellen im gleichen Maß erreicht und die 17 β -Estradiol-reduzierende Wirkung von Anastrozol und Letrozol ist mit ca. 45 % deutlich messbar. Bei dem Einsatz der Aromataseinhibitoren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es zu unbekannt Nebenreaktionen kommt, die den eigentlichen Effekt einer reduzierten Estradiolsynthese verändern oder verschleiern.

Der Einsatz von Accell siRNAs ist demgegenüber spezifischer, da er nur die Menge des Aromataseproteins beeinflusst. Mit den siRNAs ist es trotz hoher Transfektionsraten jedoch nicht möglich alle Zellen eines Kulturapfes zu erreichen. Darüber hinaus ist die siRNA Technik weitgehend auf den Einsatz in Dispersionskulturen beschränkt, da eine ausreichende Transfektionsrate und Transfektionen tiefer liegender Zellen in einem Schnitt kaum möglich ist. Lentivirale Injektionen von organotypischen Schnittkulturen sind in diesem Zusammenhang als mögliche Transfektionsmethode in der Literatur beschrieben (Kasri et al., 2008), diese sind jedoch mit höheren Sicherheitsauflagen verbunden. Gegenüber dem Einsatz der Aromataseinhibitoren ist die Verwendung der Accell siRNAs deutlich kostenintensiver. Je nach Fragestellung stellen beide Methoden jedoch geeignete Möglichkeiten zur Untersuchung Estradiol-vermittelter Prozesse in Neuronen dar. Eine erst kürzlich beschriebene Technik scheint noch weitere Vorteile zu besitzen. Fan und Kollegen (Fan et al., 2014) beschreiben einen durch ein so genanntes *targeting peptide* schnellen und reversiblen *Knockdown* von endogenen Proteinen, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einsetzbar ist. Laut ihrer Ausführungen besitzt ihre Methode einige Vorteile gegenüber den anderen genannten. Durch das *targeting peptide* kann es schon nach zwei Stunden zu einem *Knockdown* des Zielproteins kommen und daher ist es weniger anfällig für mögliche Kompensationen, wie sie bei Manipulationen auf Gen- oder mRNA-Ebene auftreten können. Weiter ist der Effekt auf das Zielprotein dosisabhängig und reversibel sowie komplett oder nur konditional induzierbar. Die von Fan erreichten *Knockdown*-Raten von ca. 80 % für verschiedene Proteine (PSD-95, α -Synuclein) in Neuronen sprechen zudem für die hohe Effektivität ihrer Methode. Da die Herstellung eines solchen *targeting-peptides* keine besonderen technischen Mittel voraussetzt, handelt es sich hierbei um eine viel versprechende neue Technik, die bei der weiteren Aufklärung Estradiol-vermittelter Prozesse in Neuronen behilflich sein könnte.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdelgadir SE (1994) Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 135:395-401.
- Adams M, Oung T, Morrison J, Gore A (2001) Length of Postovariectomy Interval and Age, but Not Estrogen Replacement, Regulate N-Methyl-d-Aspartate Receptor mRNA Levels in the Hippocampus of *Experimental Neurology*.
- Administrator, Ish H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Asashima M, Mukai H, Murakami G, Hojo Y, Kimoto T, Kawato S (2007) Local Production of Sex Hormones and Their Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity. *The Neuroscientist* 13:323-334.
- Amaral D, Witter M (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:1-21.
- Arthur CP, Stowell MHB (2007) Structure of Synaptophysin: A Hexameric MARVEL-Domain Channel Protein. *Structure* 15:707-714.
- Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, Reiser J, Mundel P (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. *Journal of Clinical Investigation* 115:1188-1198.
- Aydin M, Yilmaz B, Alcin E, Nedzvetsky VS, Sahin Z, Tuzcu M (2008) Effects of letrozole on hippocampal and cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats. *Neuroscience* 151:186-194.
- Balthazart J (2005) Rapid Control of Brain Aromatase Activity by Glutamatergic Inputs. *Endocrinology* 147:359-366.
- Balthazart J, Baillien M, Ball G (2001) Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *The Journal of steroid biochemistry and*.
- Barnekow, Jahn, Scharfl (1990) Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60c-src in intact synaptic vesicles. *Oncogene* 5:1019-1024.
- Bastrikova N, Gardner GA, Reece JM, Jeromin A, Dudek SM (2008) Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:3123-7.
- Beltrán-Campos V, Prado-Alcalá RA, León-Jacinto U, Aguilar-Vázquez A, Quirarte GL, Ramírez-Amaya V, Díaz-Cintra S (2011) Increase of mushroom spine density in CA1 apical dendrites produced by water maze training is prevented by ovariectomy. *Brain Research* 1369:119-30.
- Bender CM, Sereika SM, Brufsky AM, Ryan CM, 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.
- Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski J-, Paysen D, Konig A, Rune GM (2010) Roles of 17 β -Estradiol Involve Regulation of Reelin Expression and Synaptogenesis in the Dentate Gyrus. *Cerebral Cortex* 20:2985-2995.
- Benninghoff A, Drenckhahn D (2004) *Anatomie 2*. Urban & Schwarzenberg:1-1.
- Bernard Theresa (2013) Die Expression synaptischer Proteine im Hippocampus der Aromatase-Knock out-Maus. *Med. Dissertation*

- Bertram, Wiedemann FWW (1985) Identification and Localization of Synaptophysin, an Integral Membrane Glycoprotein... *Cell* 41:1017-1028.
- Beyer C, Raab H. (1998) Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *European Journal of Neuroscience*.
- Beyer C, Ivanova T, Karolczak M, Küppers E. (2002) Cell type-specificity of nonclassical estrogen signaling in the developing midbrain. *The Journal of steroid*.
- Bhatnagar AS, Brodie AMH, Long BJ, Evans DB, Miller WR (2001) Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatase inhibitors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 76:199-202.
- Bian C, Zhao Y, Guo Q, Xiong Y, Cai W, Zhang J (2014) Aromatase inhibitor letrozole downregulates steroid receptor coactivator-1 in specific brain regions that primarily related to memory, neuroendocrine and integration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 141:37-43.
- Bian C, Zhu K, Yang L, Lin S, Li S, Su B, Zhang J (2012) Gonadectomy differentially regulates steroid receptor coactivator-1 and synaptic proteins in the hippocampus of adult female and male C57BL/6 mice. *Synapse*.
- Bloss EB, Janssen WG, Ohm DT, Yuk FJ, Wadsworth S, Saardi KM, McEwen BS, Morrison JH (2011) Evidence for Reduced Experience-Dependent Dendritic Spine Plasticity in the Aging Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience* 31:7831-7839.
- Bonanomi D, Rusconi L, Colombo C, Benfenati F, Valtorta F (2007) Synaptophysin I selectively specifies the exocytic pathway of synaptobrevin 2/VAMP2. *Biochemical Journal* 404:525.
- Bork P, Sudol M (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends in Biochemical Sciences* 19:531-533.
- Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology* 17:381-386.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual review of neuroscience* 31:47-67.
- Brake W, Alves S, Dunlop J, Lee S, Bulloch K (2001) Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology*:1-6.
- Brændgaard H, Gundersen HJG (1986) The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *Journal of neuroscience methods* 18:39-78.
- Bram RJ, Hung DT, Martin PK, Schreiber SL, Crabtree GR (1993) Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Molecular and cellular biology* 13:4760-9.
- Calhoun M, Jucker M, Martin L, Thinakaran G (1996) Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of*:1-8.
- Carpentier M, Allain F, Haendler B, Denys A, Mariller C, Benaïssa M, Spik G (1999) Two distinct regions of cyclophilin B are involved in the recognition of a functional receptor and of glycosaminoglycans on T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 274:10990-8.
- Castellon SA, Ganz PA, Bower JE, Petersen L, Abraham L, Greendale GA (2004) Neurocognitive Performance in Breast Cancer Survivors Exposed to Adjuvant Chemotherapy and Tamoxifen. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 26:955-969.

- Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spatial control of exocytosis. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, pp 5619-5624.
- Chamniansawat S, Chongthammakun S (2012) A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Experimental & molecular*.
- Chang, Boridy, McKinney, Maysinger (2013) Letrozole Potentiates Mitochondrial and Dendritic Spine Impairments Induced by β Amyloid. *Journal of aging* 2013.
- Chapman RJER, Edelman L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *The EMBO Journal* 14:224.
- Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology*.
- Chen HI, Sudol M (1995) The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, pp 7819-7823. National Acad Sciences.
- Chen, Rasin, Kwan, Sestan (2005) Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. In: Proceedings of the National Academy of Sciences.
- Cherrier M, Matsumoto A, Amory J, Ahmed S (2005) The role of aromatization in testosterone supplementation effects on cognition in older men. *Neurology* 64:290-296.
- Choate J, Resko J (1996) Paradoxical effect of an aromatase inhibitor, CGS 20267, on aromatase activity in guinea pig brain. *The Journal of steroid biochemistry and molecular*.
- Conley A, Hinshelwood M (2001) Mammalian aromatases. *Reproduction*.
- Conrad C, McLaughlin K, Huynh T (2012) Chronic stress and a cyclic regimen of estradiol administration separately facilitate spatial memory: Relationship with hippocampal CA1 spine density and dendritic *Behavioral*.
- Cornil C; Ball G, Balthazart J (2006a) Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: Where do the estrogens come from? *Brain Research* 1126:2-26.
- Cornil CA, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z, Baillien M, Balthazart J (2006b) Estradiol rapidly activates male sexual behavior and affects brain monoamine levels in the quail brain. *Behavioural Brain Research* 166:110-123.
- Crouse GF, Frischauf A, Lehrach H (1983) An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages. *Methods in enzymology* 101:78-89.
- Czarnecki K, Haas CA, Orth CB, Deller T, Frotscher M (2005) Postnatal development of synaptopodin expression in the rodent hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 490:133-144.
- Daly C (2002) Ca²⁺-dependent Formation of a Dynamin-Synaptophysin Complex. POTENTIAL ROLE IN SYNAPTIC VESICLE ENDOCYTOSIS. *Journal of Biological Chemistry* 277:9010-9015.
- Deller T, Freiburg GI, Mundel P, Bronx NY, Frotscher M (2000a) Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus* 10:569-581.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:10494-10499.
- Deller T, Orth CB, 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. *The Journal of Comparative Neurology* 499:471-484.
- Deller, Merten, Roth, Mundel, Frotscher (2000b) Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal *Journal of*:1-18.
- Devoto SH, Barnstable CJ (1989) Expression of the growth cone specific epitope CDA 1 and the Synaptic vesicle protein SVP38 in the developing mammalian cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 290:154-168.
- Disteldorf Erik (2010) Untersuchung des Spine Apparates in hippocampalen Spines unter dem Einfluss von Estradiol. *Med. Dissertation*
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8:1454-68.
- Dumitriu D, Ji, Hao J, Hao O, Hara Y, Kaufmann J, Janssen WGM, Lou W, Rapp PR, Morrison JH (2010) Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:7507-15.
- Einbond A, Sudol M (1996) Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Letters* 384:1-8.
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*.
- Evans GJ, Cousin MA (2012) Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochemical Society Transactions* 33:1350.
- Felgner P, Gadek T, Holm M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. In: *Proceedings of the*.
- Fester L, Labitzke J, Hinz R, Behem C, Horling K, Bernhard T, Bader MI, Vollmer G, Rune GM (2013) Estradiol responsiveness of synaptopodin in hippocampal neurons is mediated by estrogen receptor β . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 138:455-461.
- Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2011) Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research* 345:285-94.
- Fester L, Prange-Kiel J, Zhou L, Blittersdorf BV, Böhm J, Jarry H, Schumacher M, Rune GM (2012a) Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 131:24-9.
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, Schassen von C, Bottner M, Jarry H, Rune GM (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *Journal of Neurochemistry* 97:1136-1144.
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, Lossow von R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009a) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19:692-705.
- Fester L, Zhou L, Voets C, Ossig C, Disteldorf E, Peters C, Bläute F, Prange-Kiel J, Dudzinski D, Jarry H, Rune GM (2009b) The opposing roles of estradiol on synaptic

- protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology* 34:S123-S129.
- Fester, Prange-Kiel, Zhou, Schumacher, Rune (2012b) Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: Sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 131:24-29.
- Fifkova E, Delay RJ. (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *The Journal of Cell Biology.*;95(1):345-350. doi:10.1083/jcb.95.1.345
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20.
- Fletcher T, Cameron P, de Camilli P, Banker G (1991) The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J. Neurosci.* 11:1617-1626.
- Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B (1995) Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Progress in neurobiology* 45:vii-xxviii.
- Garcia-Segura L, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez J (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*.
- García-López P, García-Marín V, Freire M (2007) The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Progress in neurobiology* 83:110-30.
- Geinisman Y, Ganeshina O, Yoshida R, Berry RW, Disterhoft JF, Gallagher M (2004) Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum. *Neurobiology of Aging* 25:407-16.
- Geisler J, Geisler J, Haynes B, Anker G (2002) Influence of Letrozole and Anastrozole on Total Body Aromatization and Plasma Estrogen Levels in Postmenopausal Breast Cancer Patients Evaluated in a Randomized, Cross-Over Study. *Journal of clinical oncology* 20:751-757.
- Geisler J, Helle H, Eske D, et al. (2008) Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:6330-5.
- González M, Cabrera-Socorro A, Pérez-García CG, Fraser JD, López FJ, Alonso R, Meyer G (2007) Distribution patterns of estrogen receptor α and β in the human cortex and hippocampus during development and adulthood. *The Journal of Comparative Neurology* 503:790-802.
- Gould E, Woolley C, Frankfurt M, McEwen B (1990) Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.* 10:1286-1291.
- Gray EG (1959) Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex. , Published online: 06 June 1959; | doi:10.1038/1831592a0 183:1592-1593.
- Hajszan T, Leranth C (2010) Bisphenol A interferes with synaptic remodeling. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31:519-30.
- Halbach von OBU (2009) Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 191:518-31.

- Halbach von OBU, Zacher C, Gass P, Unsicker K (2006) Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience Research* 83:525-31.
- Hannah MJ, Schmidt AA, Wiel, Huttner WB, Huttner B (1999) Synaptic Vesicle Biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15:733-798.
- Harada N (1992) A unique aromatase (P-450AROM) mRNA formed by alternative use of tissue-specific exons 1 in human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Harada N, Honda SI, Hatano O (1999) Aromatase inhibitors and enzyme stability. *Endocrine-related cancer* 6:211-8.
- Harris K, Jensen F, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of *J Neurosci*:1-21.
- Heldring N et al. (2007) Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev* 87:905-931.
- Hofgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*.
- Hojo Y (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:865-870.
- Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K (2005) Transient and Persistent Dendritic Spines in the Neocortex In Vivo. *Neuron* 45:279-291.
- Honda S, Harada N, Takagi Y (1994) Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochemical and biophysical research*.
- Hübner K, Windoffer R, Hutter H, Leube R (2002) Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *International review of*.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp 4137-4141. *National Acad Sciences*.
- Jahn R, Südhof TC (1999) MEMBRANE FUSION AND EXOCYTOSIS. *Annual Review of Biochemistry* 68:863-911.
- Jedlicka P, Vlachos A, Schwarzacher SW, Deller T (2008) A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behavioural Brain Research* 192:12-19.
- Jenkins V, Shilling V, Deutsch G, Bloomfield D, Morris R, Allan S, Bishop H, Hodson N, Mitra S, Sadler G, Shah E, Stein R, Whitehead S, Winstanley J (2006) A 3-year prospective study of the effects of adjuvant treatments on cognition in women with early stage breast cancer. *British Journal of Cancer* 94:828-834.
- Jenkins V, Shilling V, Fallowfield L, Howell A, Hutton S (2004) Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? A pilot study. *Psycho-Oncology* 13:61-66.
- Jenkins V, Ambroisine L, Atkins L, Cuzick J, Howell L, Fallowfield L (2008) Effects of anastrozole on cognitive performance in postmenopausal women: a randomised, double-blind chemoprevention trial (IBIS II). *The Lancet Oncology* 9:953-961.
- Jin M, Lim D, Pati S, Walsh C (1994) Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. In: *Proceedings of the*.

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of neural science, 4 ed. New York: McGraw-Hill.
- Karra D, Dahm R (2010) Transfection Techniques for Neuronal Cells. *Journal of Neuroscience* 30:6171-6177.
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J (2010) Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in neurosciences* 33:121-129.
- Klinge CM (n.d.) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research* 29:2905-2919.
- Kornek Thomas (2012) Die Aromatase mRNA Expression im Hippocampus der Ratte im Verlauf der Ontogenese. Med. Dissertation
- Korkotian E, Segal M (2011) Synaptopodin regulates release of calcium from stores in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *The Journal of Physiology* 589:5987-5995.
- Kremerskothen J, Plaas C, Kindler S, Frotscher M, Barnekow A (2005) Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin/alpha-actinin binding protein. *Journal of Neurochemistry* 92:597-606.
- Kretz O, Fester, Wehrenberg, Zhou, Prange-Kiel, Jarry, Frotscher, Rune (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:5913-21.
- Labitzke Jan Gerhard (2009) Einfluss neuronaler Aktivität auf die Expression von Synaptopodin in hippocampalen dendritischen Spines. Med. Dissertatin
- Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *The EMBO*.
- Leclerc N, Beesley PW, Brown I, Colonnier M, Gurd JW, Paladino T, Hawkes R (1989) Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 280:197-212.
- Ledoux AV, Smejkalova T, May RM, Cooke BM, Woolley CS (2009) Estradiol Facilitates the Release of Neuropeptide Y to Suppress Hippocampus-Dependent Seizures. *Journal of Neuroscience* 29:1457-1468.
- Lephart E (1996) A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Research Reviews* 22:1-26.
- Leube RE, Wiedenmann B, Franke WW (1989) Topogenesis and sorting of synaptophysin: Synthesis of a synaptic vesicle protein from a gene transfected into nonneuroendocrine cells. *Cell* 59:433-446.
- Leuner B, Falduto J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:659-65.
- Linstedt AD (1992) Specific association of the proto-oncogene product pp60c-src with an intracellular organelle, the PC12 synaptic vesicle. *The Journal of Cell Biology* 117:1077-1084.
- Luine V, Wallace M, Frankfurt M (2011) Age-related deficits in spatial memory and hippocampal spines in virgin, female Fischer 344 rats. *Current gerontology and*.
- Luine VN, Frankfurt M (2012) Estrogens facilitate memory processing through membrane mediated mechanisms and alterations in spine density. *Frontiers in Neuroendocrinology* 33:388-402.

- MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD (1994) Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Molecular and cellular neurosciences* 5:691-8.
- Mahendroo M, Mendelson C, Simpson E (1993) Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *Journal of Biological.*
- Marazzi G, Buckley K (1993) Accumulation of mRNAs encoding synaptic vesicle-specific proteins precedes neurite extension during early neuronal development. *Developmental Dynamics*:1-10.
- Markham JA, Juraska JM (2002) Aging and sex influence the anatomy of the rat anterior cingulate cortex. *Neurobiology of Aging* 23:579-88.
- Matsuo R, Kato A, Sakaki Y, Inokuchi K (1998) Cataloging altered gene expression during rat hippocampal long-term potentiation by means of differential display. *Neuroscience Letters* 244:173-176.
- Matsuo R, Murayama A, Saitoh Y (2000) Identification and Cataloging of Genes Induced by Long-Lasting Long-Term Potentiation in Awake Rats. *Journal of.*
- Matus A (2007) Actin-Based Plasticity in Dendritic Spines. *Science* 290:754-758.
- McMahon H, Bolshakov V, Janz R (1996) Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. In: *Proceedings of the.*
- McNatty KP, Baird DT, Bolton A, Chambers P, Corker CS (1976) Concentration of Oestrogens and Androgens in Human Ovarian Venous Plasma and Follicular Fluid Throughout the Menstrual Cycle. *Journal of Endocrinology* 71:77-85.
- Mendez P, Garcia-Segura LM, Muller D (2011) Estradiol promotes spine growth and synapse formation without affecting pre-established networks. *Hippocampus* 21:1263-1267.
- Michael M, Kilgore M, Morohashi K (1995) Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (P11) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. *Journal of Biological.*
- Miller WR, Hawkins RA, Forrest AP (1982) Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer research* 42:3365s-3368s.
- Mitter D, Reisinger C, Hinz B, Hollmann S (2003) The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *Journal of:*1-8.
- Mundel P, Heid H, Mundel T, Krüger M, Reiser J, Kriz W (1997) Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *The Journal of Cell Biology* 139:193-204.
- Murphy D, Segal M (1997) Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:1482-1487.
- Murphy DD, Cole NB, Segal M (1998) Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp 11412-11417.
- Naftolin F (1994) Brain aromatization of androgens. *The Journal of reproductive medicine* 39:257-61.
- Naftolin F, Horvath TL, Balthazart J (2001) Estrogen synthetase (aromatase) immunohistochemistry reveals concordance between avian and rodent limbic systems and hypothalami. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 226:717-25.

- Naftolin F, Horvath TL, Jakab RL, Leranath C, Harada N, Balthazart J (1996) Aromatase Immunoreactivity in Axon Terminals of the Vertebrate Brain. *Neuroendocrinology* 63:149-155.
- Naftolin F, MacLusky N (1982) Aromatase in the central nervous system. *Cancer research*.
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z (1971a) Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 33:2, 368-370
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z (1971b) Aromatization of Androstenedione by Limbic System Tissue from Human Foetuses. *Journal of Endocrinology* 51:795-796.
- Nawata H, Tanaka S, Takayanagi R (1995) Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. *The Journal of steroid* 53.
- Moradpour F, Naghdi N, Fathollahi Y. (2006) Anastrozole improved testosterone-induced impairment acquisition of spatial learning and memory in the hippocampal CA1 region in adult male rats. *Behavioural Brain Research.*;175(2):223-232. doi:10.1016/j.bbr.2006.08.037.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annual review of physiology* 64:313-53.
- Oberlander JG, er, Schlinger BA, Clayton NS, Saldanha CJ (2004) Neural aromatization accelerates the acquisition of spatial memory via an influence on the songbird hippocampus. *Hormones and Behavior* 45:250-258.
- Orth CB, Vlachos A, del Turco D, Burbach GJ, Haas CA, Mundel P, Feng G, Frotscher M, 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. *The Journal of Comparative Neurology* 487:227-239.
- Osawa Y, Higashiyama T, Fronckowiak M, Yoshida N, Yarborough C (1987) Aromatase. *Journal of Steroid Biochemistry* 27:781-9.
- Packard MG (1998) Posttraining estrogen and memory modulation. *Hormones and Behavior* 34:126-39.
- Pang DT, Wang JK, Valtorta F, Benfenati F, Greengard P (1988) Protein tyrosine phosphorylation in synaptic vesicles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp 762-766. National Acad Sciences.
- Paul DL (1986) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *The Journal of Cell Biology* 103:123-34.
- Payne A, Hales D (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*.
- Pelletier G (2010) Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. *Progress in brain research* 181:193-207.
- Phillips K, Bernhard J (2003) Adjuvant breast cancer treatment and cognitive function: current knowledge and research directions. *Journal of the National Cancer*.
- Phillips K, Ribic K, Fisher R (2011) Do aromatase inhibitors have adverse effects on cognitive function. *Breast Cancer Res*:1-7.
- Phillips K, Ribic K, Sun Z, Stephens A, Thompson A, Harvey V, Thürlimann B, Cardoso F, Pagani O, Coates AS, Goldhirsch A, Price KN, Gelber RD, Bernhard J (2010) Cognitive function in postmenopausal women receiving adjuvant letrozole or tamoxifen for breast cancer in the BIG 1-98 randomized trial. *The Breast* 19:388-395.
- Prange-Kiel , Fester, Zhou, Lauke, Rune, Zhou (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16:464-471.

- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune GM (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16:464-71.
- 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. *The Journal of Cell Biology* 180:417-426.
- Prange-Kiel J, Rune GM (2006) Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138:765-772.
- Prange-Kiel, Wehrenberg, Jarry, Rune (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*.
- Rego J, Seong J, Burel D, Leprince J, Luu-The, Tsutsui K, Tonon M, Pelletier G, Vaudry H (2009) Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30:259-301.
- Roselli CF (2007) Brain aromatase: Roles in reproduction and neuroprotection. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 106:143-150.
- Roth S, Sommer C, Mundel P, Kiessling M (2001) Expression of Synaptopodin, an Actin-associated Protein, in the Rat Hippocampus after Limbic Epilepsy. *Brain Pathology*.
- Rubenstein JL, Greengard P, Czernik AJ (1993) Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse* 13:161-172.
- 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.
- Salaun C (2005) Lipid Raft Association of SNARE Proteins Regulates Exocytosis in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280:19449-19453.
- Salaun C, James D, Chamberlain L (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*:1-10.
- Sambrook J, Russell DW (2006) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006:pdb.prot4540-pdb.prot4540.
- Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED (1991) Immunocytochemical Distribution of Aromatase Cytochrome P450 in the Rat Brain Using Peptide-Generated Polyclonal Antibodies. *Endocrinology* 129:2834-2844.
- Santen R, Harvey H (1999) Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocrine-related cancer*:1-18.
- Schassen von C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *Journal of Neuroendocrinology* 18:847-56.
- Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE (2009a) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162:234-243.
- Schmitt, Tanimoto N, Tanimoto, Seeliger M, M S, Schaeffel F, Schaeffele, Leube R, Leube (2009b) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*:1-10.
- Segal M, Vlachos A, Korkotian E (2010) The Spine Apparatus, Synaptopodin, and Dendritic Spine Plasticity. *The Neuroscientist* 16:125-131.
- Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe N, Ishii H, Mukai H, Takahashi T, Hattori T, Kawato S (2003) Hippocampal

- cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochimica et biophysica acta* 1619:301-16.
- Shilling, Shilling V, et V, Jenkins V, Fallowfield L, Howell A (2001) The effects of oestrogens and anti-oestrogens on cognition. *The Breast* 10:484-491.
- Shors TJ, Falduto J, Leuner B (2004) The opposite effects of stress on dendritic spines in male vs. female rats are NMDA receptor-dependent. *The European journal of neuroscience* 19:145-50.
- Siddiqui TJ, Vites O, Stein A, Heintzmann R, Jahn R, Fasshauer D (2007) Determinants of Synaptobrevin Regulation in Membranes. *Molecular Biology of the Cell* 18:2037-2046.
- Simpson E (2004) Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. *Seminars in reproductive medicine*.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M (2013) AROMATASE—A BRIEF OVERVIEW. :1-38.
- Smith CC (2005) Estrogen-Induced Increase in the Magnitude of Long-Term Potentiation Occurs Only When the Ratio of NMDA Transmission to AMPA Transmission Is Increased. *Journal of Neuroscience* 25:7780-7791.
- Smith CC, Vedder LC, McMahon LL (2009) Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3–CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology* 34:S130-S142.
- 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.
- Steckelbroeck S, Heidrich DD, Stoffel-Wagner B, Hans VHJ, Schramm J, Bidlingmaier F, Klingmüller D (1999) Characterization of Aromatase Cytochrome P450 Activity in the Human Temporal Lobe1. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.84.8.5876>:1-7.
- Sterio D (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of microscopy*.
- Südhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn R (1987) A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science (New York, N.Y.)* 238:1142-4.
- Squire LR. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review.*;99(2):195-231.
- Tada T, Sheng M (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 16:95-101.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P (2006) Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* 127:831-846.
- Tan S, Carr C, Yeoh K, Schofield C (2012) Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase *Molecular biology*.
- Tarpey PS et al. (2009) A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nature Genetics* 41:535-543.
- Tarsa L (2002) Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:1012-1016.

- Tarsa L, Goda Y (2002) Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, pp 1012-1016.
- Uemura E (1980) Age-related changes in prefrontal cortex of *Macaca mulatta*: synaptic density. *Experimental Neurology* 69:164-72.
- Unwin N (1986) Is there a common design for cell membrane channels? *Nature* 323:12-3.
- Urbanska M, Swiech L, Jaworski J (2012) Developmental plasticity of the dendritic compartment: focus on the cytoskeleton. *Advances in experimental medicine and biology* 970:265-84.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:8116-26.
- Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, Copanaki E, Deller T, Segal M (2009) Synaptopodin Regulates Plasticity of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience* 29:1017-1033.
- Voets Corinna (2008) Zur Rolle des Calciums bei Estrogen-vermittelter synaptischer Plastizität. *Med. Dissertation*
- Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, Taira K (2004) Vectors for RNA interference. *Current opinion in molecular therapeutics* 6:367-72.
- Wallace M, Frankfurt M, Wallace M, Frankfurt M, Arellanos A, Inagaki T, Luine V (2007) Impaired Recognition Memory and Decreased Prefrontal Cortex Spine Density in Aged Female Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1097:54-57.
- Wallace M, Luine V, Arellanos A, Frankfurt M (2006) Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Research* 1126:176-82.
- Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT (1995) LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Research* 703:26-30.
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of Neurochemistry* 76:1879-86.
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of*
- Westhead E (1987) Lipid Composition and Orientation in Secretory Vesicles. *Annals of the New York Academy of Sciences*:1-9.
- Woolley CS (2007) Acute Effects of Estrogen on Neuronal Physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47:657-680.
- Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:4035-9.
- Woolley CS, McEwen BS (1992) Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:2549-54.
- Woolley CS, McEwen BS (1993) Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 336:293-306.

- Yamazaki M, Chiba K, Mohri T (2001) Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade through nitric oxide synthesis as a mechanism of neuritogenic effect of genipin in PC12h cells. *Journal of*:1-10.
- Yokomaku D (2003) Estrogen Enhances Depolarization-Induced Glutamate Release through Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase in Cultured Hippocampal Neurons. *Molecular Endocrinology* 17:831-844.
- Zhou L, Fester L, Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune G (2010a) Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology* 151:1153-60.
- Zhou L, Fester L, Blittersdorff von B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM (2010b) Aromatase Inhibitors Induce Spine Synapse Loss in the Hippocampus of Ovariectomized Mice. *Endocrinology* 151:1153-1160.
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan W (2005) Development of Long-Term Dendritic Spine Stability in Diverse Regions of Cerebral Cortex. *Neuron* 46:181-189.

APPENDIX

A. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Aro	Aromatase
AI	Aromatase Inhibitor
AH	Aromatase Hemmer
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cds	<i>Coding sequence</i>
CNBD	<i>Cyclic nucleotide binding domain</i>
Cyp 19A1	Genbezeichnung der Aromatase
CyPB	Cyclophilin B
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DG	Gyrus dentatus
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E	Eluat
E2	Estradiol
E 18	Embryonal-Entwicklungstag 18
E64-d	Inhibitor lysosomaler Proteasen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Entorhinaler Cortex
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced GFP</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERC	Endosomales Recycling-Kompartiment
et al.	<i>et altera</i> (und andere)
FCS	fetales Kälberserum
xg	Erdbeschleunigung
g, kg, mg, μ g	Gramm, Kilogramm, Milligramm, Mikrogramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gcl	Körnerzellschicht
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i> (gepufferte Salzlösung)
HC	Hippocampus
hil	Hilus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
i. p.	Intraperitoneal
ICC	Immuncytochemie
IF	Immunfluoreszenz

IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
iml	Innere Molekularschicht
IP	Immunpräzipitation
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasenpaar
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani-Medium
M	Mol
mA	Milli-Ampere
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
min	Minuten
mml	Mittlere Molekularschicht
mV	Milli-Volt
n	Anzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	Optische Dichte
oml	Außere Molekularschicht
P	Postnatal
p	p-Wert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI3-Kinasen	Phosphoinositid-3-Kinasen
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PLA	<i>Proximity ligation assay</i>
PM	Plasmamembran
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>Rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	Sekunden
SEM	<i>Standard error of the mea</i> (Standardfehler)
slm	Stratum lacunosum moleculare
SNX	Sorting Nexin
sog.	sogenannt
sp	Stratum pyramidale
sr	Stratum radiatum
Sub	Subiculum
Str.	Stratum
Tau	Mikrotubuli-assoziiertes Protein (axonaler Marker)
TBE	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) mit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TX-100	Triton X-100
u	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
Ubi	Ubiquitin

UV	Ultraviolett
V, mV	Volt, Millivolt
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WB	Westernblot
Well	Vertiefung/ Näpfchen
X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-galactopyranosid

B. Einheiten

bp	Basenpaare
Da	Dalton
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
s	Sekunde

C. Präfixe

Symbol	Präfix	Zehnerpotenz
f	Femto	10^{-15}
p	Pico	10^{-12}
n	Nano	10^{-9}
μ	Mikro	10^{-6}
m	Milli	10^{-3}
c	Zenti	10^{-2}
h	Hekto	10^2
k	Kilo	10^3
M	Mega	10^6
G	Giga	10^9

D. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersichtsaufnahme der Hippocampusformation.	6
Abbildung 2: Biosyntheseweg der Estrogene.	15
Abbildung 3. Die Entwicklung der Aromataseinhibitoren	20

Abbildung 4: Vektorkarten.	31
Abbildung 5: Temperaturprofil der Taq-Man real-time PCR	39
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Ausschnitt) einer Spine-Synapse.	51
Abbildung 7: Schematische Darstellung von Verpaarungen mit <i>Knockout</i> -Tieren.	60
Abbildung 8: Beispielhafte Ergebnisse der Genotypisierungsanalysen von Aromatase- <i>Knockout</i> - und Wildtyp-Tieren.	61
Abbildung 9: Verringerte 17 β -Estradiolsynthese in Dispersionskulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren.	64
Abbildung 10: Immunreaktivität von Synaptophysin in Dispersionskulturen nach Applikation von Aromataseinhibitoren (Übersicht).	67
Abbildung 11: Quantifizierung der Synaptophysin-Immunreaktivität in hippocampalen Neuronen nach Inkubation mit Aromataseinhibitoren.	68
Abbildung 12: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptophysin-Proteinmenge.	69
Abbildung 13: Immunreaktivität von Synaptopodin in Dispersionskulturen nach Applikation verschiedener Aromataseinhibitoren (Übersicht).	72
Abbildung 14: Quantifizierung der Synaptopodin-Immunreaktivität in hippocampalen Neuronen nach Inkubation mit Aromataseinhibitoren.	73
Abbildung 15: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptopodin-Proteinmenge in Dispersionskulturen.	74
Abbildung 16: Morphologie und Spinesynapsen-Dichte hippocampaler Schnittkulturen nach Behandlung mit verschiedenen Aromataseinhibitoren. Die Hippocampalen Schnitte	76
Abbildung 17: Synaptophysin-Immunreaktivität in Schnittkultur des Hippocampus (Übersicht).	80
Abbildung 18: Quantifizierung der Synaptophysin-Immunreaktivität im <i>Str. radiatum</i> der CA1-Region von hippocampalen Schnittkulturen nach Applikation verschiedener Aromataseinhibitoren.	81
Abbildung 19: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptophysin-Proteinmenge in hippocampalen Schnittkulturen.	82
Abbildung 20: Synaptopodin-Immunreaktivität in Schnittkultur des Hippocampus (Übersicht).	85
Abbildung 21: Quantifizierung der Synaptopodin-Immunreaktivität im <i>Str. radiatum</i> der CA1-Region von hippocampalen Schnittkulturen nach Inkubation mit Aromataseinhibitoren.	86

Abbildung 22: Einfluss verschiedener Aromataseinhibitoren auf die Synaptopodin-Proteinmenge in hippocampalen Schnittkulturen.	87
Abbildung 23: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse nach Applikation der verschiedenen Aromataseinhibitoren.	88
Abbildung 24: Aromatase-Immunreaktivität nach Transfektion mit Aromatase-shRNA-Vektoren.	93
Abbildung 25: Immunpräzipitation von Aromatase aus dem Lysat von N-2a	94
Abbildung 26: Aromatase- <i>Knockdown</i> in N-2a Zellen.	94
Abbildung 27: Aromatase-Menge nach mRNA- <i>Knockdown</i> .	95
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Aromatase-mRNA-Menge in hippocampalen Dispersionskulturen.	97
Abbildung 29: Accell siRNA Transfektionsrate in hippocampalen Dispersionskulturen.	98
Abbildung 30: mRNA- <i>Knockdown</i> nach Accell siRNA Transfektion.	99
Abbildung 31: Aromatase-mRNA-Menge nach <i>Knockdown</i> mit Accell siRNA.	99
Abbildung 32: Aromatase-Immunreaktivität nach Aromatase- <i>Knockdown</i> mit Accell siRNA.	100
Abbildung 33: Synaptophysin-Immunreaktivität nach Aromatase- <i>Knockdown</i> mittels Accell siRNA.	103
Abbildung 34: Quantitative Analyse der Synaptophysin-Immunreaktivität nach Aromatase- <i>Knockdown</i> mittels Accell siRNA.	104
Abbildung 35: Synaptopodin-Immunreaktivität nach Aromatase- <i>Knockdown</i> mittels Accell siRNA. zu einer Abnahme der Synaptopodin-Immunreaktivität.	105
Abbildung 36: Quantitative Analyse Synaptopodin-Immunreaktivität nach Aromatase- <i>Knockdown</i> mittels Accell siRNA.	106
Abbildung 37: Quantitative Analyse des Aromatase- <i>Knockdowns</i> auf die Immunreaktivität von Synaptopodin und Synaptophysin in hippocampalen Dispersionskulturen.	106

E. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper	29
Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper	30
Tabelle 3: Zusammenfassung aller verwendeter Vektoren	30
Tabelle 4: Liste der verwendeten Oligonukleotide	32
Tabelle 5: Liste der verwendeten TaqMan-Sonden von life technologies	32
Tabelle 6: PCR-Programme	36
Tabelle 7: PCR-Ansätze	37
Tabelle 8: Mit BLOCK-iT® RNAi-Desigener ermittelte Sequenzen für shRNA Konstrukte	42
Tabelle 9: Sequenzen der shRNA-Konstrukte	42
Tabelle 10: verwendete Accell siRNAs (Ratte)	43

F. Publikationsverzeichnis

Originalveröffentlichungen

Brand N, Vierk R, Fester L, Zhou L, **Imholz P**, Rune G.M (2014) Geschlecht und degenerative Erkrankungen im ZNS. Bundesgesundheitsblatt (in press)

Prange-Kiel J, Schmutterer T, Fester L, Zhou L, **Imholz P**, Brandt N, Vierk R, Jarry H, Rune G.M (2013) Endocrine regulation of estrogen synthesis in the hippocampus? Progress in Histo- and Cytochemistry 2013 Aug;48(2):49-64

van Neerven S, Nemes A, **Imholz P**, Denecke B, Johann S, Beyer C, Hanisch U, Mey J (2010) Inflammatory cytokine release of astrocytes in vitro is reduced by all trans retinoic acid. Journal of Neuroimmunology Volume 229, Issues 1–2, 15 December 2010, Pages 169–179

Veröffentlichungen in Vorbereitung

Imholz, P and Rune G.M (2014) Effects of various aromatase inhibitors on hippocampal synapses. Neuropharmacology

Fester L, Zhou L, **Imholz P**, Disterldorf E, Ossig C, Labitzke J, Bläute C, Brandtner M, Vollmer G, Jarry H, Rune G.M (2014) Estrogen responsiveness of synaptodin. The Journal of Neuroscience

Kongressbeiträge

Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft 2009:

Imholz P, van Neerven S, Hanisch U, Mey J. (2009) "Retinoic acid affects the expression of IL-1 β in astrocytes."

G. Wissenschaftlicher Werdegang

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

H. Stipendien

Promotions-Abschlussstipendium der Universität Hamburg

I. Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gabriele Rune für die Betreuung meiner Arbeit und die Aufnahme in Ihr Institut bedanken.

Auch für die spannenden und lehrreichen Eindrücke als Dozent im Präparierkurs danke ich ihr.

Mein Dank gilt ebenso Herrn PD. Dr. Hartwig Lüthen für die Betreuung am Fachbereich Biologie sowie für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Allen Mitgliedern des Instituts für Neuroanatomie danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei allen kleinen und großen Problemen während und außerhalb des Laboralltags. Das überaus gute und freundschaftliche Arbeitsklima hat sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Maurice für seine Hilfe. Auch Nicola, Evita, Lars und Ricardo gilt mein Dank.

Torben, auch Dir danke ich.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer vorbehaltlos unterstützen, mir Mut zusprachen und mir mit ihrer Lebenserfahrung zur Seite standen. Für das was Ihr mir ermöglicht habt bin ich Euch sehr dankbar. Auch meiner Schwester danke ich für ihre Unterstützung in allen Bereichen.

Nora, ich danke Dir. Dafür dass Du immer für mich da bist, mir den Rücken stärkst und mich zum Lachen bringst. Mit Dir ist Vieles leichter.

J. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Philipp Justus Imholz, geboren am 4. Juli 1981, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den.....2014

Philipp Justus Imholz