

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Neuroanatomie

Direktorin Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune

**Estradiol erhöht die Synapsendichte in der männlichen,  
hippocampalen Schnittkultur**

**Dissertation**

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

vorgelegt von:

Simon Georg Gloger  
aus Bochum

Hamburg 2017

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am:**

**25.01.2018**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**

**Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune**

**Prüfungsausschuss, zweite(r) Gutachter(in):**

**Herr Prof. Dr. med. Markus Glatzel**

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Inhaltsverzeichnis .....                                              | 1  |
| Abkürzungsverzeichnis .....                                           | 4  |
| 1. Einleitung .....                                                   | 8  |
| 1.1. Einführung .....                                                 | 8  |
| 1.2. Der Hippocampus .....                                            | 11 |
| 1.3. Spine-Synapsen .....                                             | 14 |
| 1.4. Hippocampale Testosteron-/Estradiolsynthese .....                | 15 |
| 1.4.1. Aromatase .....                                                | 16 |
| 1.5. Genomische und nicht-genomische Estradiol-/Androgeneffekte ..... | 17 |
| 1.6. Rezeptor- und Enzyminhibitoren .....                             | 20 |
| 1.6.1. Nicht-Steroidale Aromatasehemmer .....                         | 20 |
| 1.6.3. Androgenrezeptor-Antagonisten .....                            | 21 |
| 2. Fragestellung .....                                                | 22 |
| 3. Methoden .....                                                     | 23 |
| 3.1. Untersuchte Tiere .....                                          | 23 |
| 3.2. Hippocampale Slicekulturen .....                                 | 23 |
| 3.2.1. Präparation des Rattenhippocampus .....                        | 23 |
| 3.2.2. Stimulation der Slicekulturen .....                            | 24 |

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3. <i>In vivo</i> -Versuche .....                                                                 | 25 |
| 3.3.1. Beschreibung der Versuche .....                                                              | 25 |
| 3.3.2. Präparation .....                                                                            | 26 |
| 3.4. Nachfixierung, Entwässerung und Einbettung .....                                               | 26 |
| 3.5. Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten.....                                              | 27 |
| 3.6. Herstellung der EM-Bilder und Evaluation .....                                                 | 27 |
| 3.7. Materialien .....                                                                              | 28 |
| 3.7.1. Material und Geräte .....                                                                    | 28 |
| 3.7.2. Chemikalien .....                                                                            | 30 |
| 3.7.3 Lösungen.....                                                                                 | 32 |
| 4. Ergebnisse .....                                                                                 | 34 |
| 4.1. Inhibierung der Aromatase im männlichen Hippocampus .....                                      | 36 |
| 4.1.1. <i>in vivo</i> -Letrozolbehandlung über 24 und 48 Stunden .....                              | 36 |
| 4.1.2. Letrozolbehandlung der männlichen, hippocampalen Slicekultur.....                            | 38 |
| 4.1.2. Spine-Synapsendichte in der männlichen ArKO-Maus.....                                        | 39 |
| 4.2. Estradiolbehandlung der männlichen Slicekultur .....                                           | 41 |
| 4.2.1. Dosisabhängige Spine-Synapsendichte bei Estradiolbehandlung 100 bis 1 nM .....               | 41 |
| 4.2.2. Konsolidierung der Ergebnisse für die Estradiolbehandlung im männlichen<br>Hippocampus ..... | 43 |
| 4.3. Aufhebung des Estradioleffekts durch Androgenrezeptorblockade .....                            | 45 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1. Hemmung des Androgenrezeptors unter Estradiolbehandlung .....      | 45 |
| 5. Diskussion.....                                                        | 47 |
| 5.1. Letrozol erhöht im männlichen Hippocampus die Synapsendichte.....    | 47 |
| 5.2. Synapsenbildung durch Estradiol in der männlichen Schnittkultur..... | 50 |
| 5.3. Gleichzeitige Flutamidgabe hebt den Estradioleffekt wieder auf.....  | 53 |
| 6. Zusammenfassung.....                                                   | 55 |
| 6.1. Deutsch .....                                                        | 55 |
| 6.2. English .....                                                        | 56 |
| 7. Literaturverzeichnis .....                                             | 57 |
| 8. Danksagung.....                                                        | 71 |
| 9. Tabellarischer Lebenslauf.....                                         | 72 |
| 10. Eidesstattliche Erklärung .....                                       | 73 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |                                                            |
|------------------|------------------------------------------------------------|
| %                | Prozent                                                    |
| ®                | registered trade mark                                      |
| 3 beta HSD       | 3 beta Hydroxysteroid-Dehydrogenase                        |
| 17 beta HSD      | 17 beta Hydroxysteroid-Oxidoreduktase                      |
| Abb.             | Abbildung                                                  |
| AMPA             | $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure |
| ArKO             | Aromatase-Knockout                                         |
| ATP              | Adenosintriphosphat                                        |
| bp               | Basenpaare                                                 |
| BPH              | Benigne Prostatahyperplasie                                |
| bzw.             | beziehungsweise                                            |
| c                | Zenti                                                      |
| CA               | Cornu ammonis (Ammonshorn)                                 |
| Ca <sup>2+</sup> | Calcium                                                    |
| ca.              | circa                                                      |
| cAMP             | cyclisches Adenosinmonophosphat                            |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlendioxid                                               |
| CYP              | Cytochrom P450                                             |
| °C               | Grad Celsius                                               |

|                  |                                        |
|------------------|----------------------------------------|
| dest.            | destilliert                            |
| DHEA             | Dihydroepiandrosteron                  |
| DHT              | Dihydrotestosteron                     |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                       |
| DNA              | Desoxyribonucleinsäure                 |
| EPON 820         | Epoxyresin                             |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum            |
| ER $\alpha$      | Estrogenrezeptor Alpha                 |
| ER $\beta$       | Estrogenrezeptor Beta                  |
| et al.           | et alii (und andere)                   |
| F-Aktin          | filamentäres Aktin                     |
| FSH              | Follikel-Stimulierendes-Hormon         |
| g                | Gramm                                  |
| GA               | Glutaraldehydlösung                    |
| GABA             | Gamma-Amino-Buttersäure                |
| GnRH             | Gonadotropin-Releasing Hormon          |
| GP <sub>ER</sub> | G-Protein gekoppelter Estrogenrezeptor |
| h                | Stunde                                 |
| HCl              | Salzsäure                              |
| IP <sub>3</sub>  | Inositoltrisphosphat                   |

|                  |                               |
|------------------|-------------------------------|
| IX               | neun                          |
| KG               | Körpergewicht                 |
| l                | Liter                         |
| LH               | Luteinisierendes Hormon       |
| LTP              | Long term potentiation        |
| m                | Milli                         |
| m                | Meter                         |
| m <sup>3</sup>   | Kubikmeter                    |
| M                | Molar                         |
| MAP              | Mitogen-activated Protein     |
| MEM              | Minimal Essential Medium      |
| Mg <sup>2+</sup> | Magnesium                     |
| mRNA             | messenger- Ribonucleinsäure   |
| μ                | Mikro                         |
| n                | Anzahl                        |
| n                | nano                          |
| NaCl             | Natriumchlorid/Kochsalz       |
| NMDA             | N-Methyl-D-Aspartat           |
| NaOH             | Natronlauge                   |
| P5               | 5 Tage alte postnatale Ratten |

|        |                                        |
|--------|----------------------------------------|
| PB     | Phosphatpuffer                         |
| PBS    | Phosphatgepufferte Salzlösung          |
| PCR    | Polymerase-Ketten-Reaktion             |
| PFA    | Paraformaldehyd                        |
| PSD    | postsynaptic density                   |
| PSD-95 | postsynaptic density Protein 95        |
| scc    | side chain cleavage enzyme             |
| SEM    | Standardfehler                         |
| StAR   | steroidogenic acute regulatory protein |
| Tab.   | Tabelle                                |
| Vgl.   | Vergleiche                             |
| WT     | Wildtyp                                |
| z. B.  | zum Beispiel                           |
| z. T.  | zum Teil                               |

# 1. Einleitung

## 1.1. Einführung

Der Cortex cerebri gilt als Zentrum für höhere kognitive Fähigkeiten. Er hat eine sehr große Vielfalt an Funktionen wie den Sitz des Bewusstseins, die Kommunikation, spielt eine Rolle bei der Planung und Durchführung von Bewegungen und ist Sitz der Erinnerung. Jede dieser Funktionen wird mit bestimmten Kortexregionen in Verbindung gebracht. So ist zum Beispiel der Hippocampus als Teil des Archikortex bei der Gedächtnisbildung sowie bei Lernprozessen beteiligt. Durch die enge Vernetzung des Hippocampus mit anderen Teilen des limbischen Systems können sich besonders gut Sachverhalte gemerkt werden, die eng mit Emotionen korrelieren. Man nimmt an, dass im Hippocampus lediglich ein Engramm, eine Gedächtnisspur gebildet wird, der Inhalt der Erinnerung jedoch in anderen Hirnregionen gespeichert wird.

Estrogene haben im Gehirn eine stimulierende Funktion für die Synapsenbildung (Woolley et al. 1990; Pozzo-Miller et al. 1999; Lee und McEwen 2001). Die Synapsendichte sowie die LTP (*long term potentiation*) selbst gelten als die strukturellen bzw. physiologischen Korrelate der Merkfähigkeit. Die klinische Relevanz dieses Forschungsbereichs wird in der Therapie des Mammakarzinoms deutlich. Frauen, die aufgrund eines hormonabhängigen Brustkrebses mit Aromatasehemmern wie Letrozol behandelt werden, die wiederum die Umwandlung von Testosteron zu Estradiol inhibieren, zeigen Defizite in ihrer Gedächtnisleistung (Jenkins et al. 2006; Bayer et al. 2015). Dazu kommen Effekte, die sich auf das Hippocampus-abhängige Verhalten auswirkten und Depression-ähnliche Symptome in Tiermodellen auslösten (Dalla et al. 2004; Barha und Galea 2010; Cornil und Charlier 2010; Fernandez und Russo 2010).

In der Wirkung von Sexualhormonen im Hippocampus besteht ein sexueller Dimorphismus. In Tierversuchen an weiblichen Ratten zeigte sich, dass für den Hippocampus in Bezug auf seine synaptische Plastizität Estrogene wichtig sind, während bei männlichen Ratten Androgene einen positiven Effekt auf die Synapsendichte im Hippocampus haben. Andere Hirnregionen wie Kortex oder Cerebellum zeigten diese Abhängigkeit nicht, weder bei männlichen noch bei weiblichen Tieren (Woolley et al. 1990; Walf et al. 2009; Zhou et al. 2010, 2014; Brandt et al. 2013).

Beim Weibchen korrelieren hohe Estradiolkonzentrationen, wie während des Proestrus der Ratte,

mit hoher Spine-Synapsendichte und hoher hippocampaler Estradiolproduktion, niedrige Estradiolkonzentrationen, wie sie zum Beispiel postmenopausal oder die Postmenopause-simulierend in Tierversuchen nach Ovariectomie gemessen werden, korrelieren mit niedrigen Spine-Synapsendichten und niedriger hippocampaler Estradiolproduktion (Brandt et al. 2013).

Die Synapsendichte bei Weibchen scheint zudem direkt von der Aktivität der Aromatase und der damit einhergehenden veränderten Estradiolproduktion abhängig zu sein, da eine Hemmung der Aromatase durch den nicht-steroidalen Inhibitor Letrozol zu einem Spine-Synapsenverlust führt (Kretz et al. 2004). Estradiol selbst kann ebenfalls die Aromatase durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und folgender Phosphorylierung über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen hemmen (Balthazart et al. 2001; Balthazart et al. 2003; Fester et al. 2016).

Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass die Korrelation von Synapsendichte und dem weiblichen Zyklus kein Effekt des peripheren Estradiols ist, sondern ein direkter Einfluss über die Hypothalamus-Hypophysen-Zielorgan-Achse besteht. Das hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) bewirkt einerseits die Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-Stimulierendem-Hormon (FSH) aus der Hypophyse, hat aber auch direkte Effekte auf die Ovarien und den Hippocampus (Janssens et al. 2000; Prange-Kiel et al. 2008). Im Hippocampus stimuliert GnRH die Estradiolproduktion. Der Weg, den das GnRH nimmt, um diesen Effekt auszulösen, ist jedoch noch nicht in seiner Gänze erforscht (Lehman et al. 1986; Skinner und Caraty 2002).

Die Zyklusabhängigkeit sowie die gesteigerte Reduktion der Spine-Synapsendichte nach Ovariectomie und Letrozol im Vergleich zu alleiniger Ovariectomie sprechen für eine vorwiegende GnRH-vermittelte Regulation und die Wichtigkeit von lokal produziertem Estradiol in Bezug auf die Spine-Synapsendichte im weiblichen Hippocampus (Zhou et al. 2010; Prange-Kiel et al. 2013).

Es gibt neben zytosolischen/nukleären auch membrangebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die die Wirkungen von Estrogenen in der Zelle vermitteln. In der weiblichen Ratte scheint  $\text{ER}\alpha$  für die Spine-Synapsenbildung und -aufrechterhaltung wichtig zu sein, während  $\text{ER}\beta$  im Sexualzyklus wichtig für die Regression der Spine-Synapsen nach Ovulation sein könnte (Zhou et al. 2014). In der Zelle werden die Effekte dann über Phosphorylierung von Cofilin und Stabilisierung der Synapse durch Polymerisierung von Aktin, welches die Synapse an der

Zellmembran befestigt, vermittelt (Honkura et al. 2008; Kramár et al. 2009; Vierk et al. 2014). Weitere Effekte werden für die Wirkung auf den synaptischen Apparat, vorwiegend auf das präsynaptische Synaptophysin und das postsynaptische Spinophilin, beschrieben (Murphy und Segal 1996; Brake et al. 2001; Rune et al. 2002; Kretz et al. 2004).

Während die Estradioleffekte auf den weiblichen Hippocampus also intensiver Untersuchungen unterliegen, sind die Wirkungen der Sexualhormone auf den männlichen Hippocampus weniger erforscht. Die Hormonproduktion unterliegt keinem Zyklus, die GnRH-Produktion ist tonisch und pulsatil, was zu einem Gleichgewicht der Androgenspiegel führt und der negative Feedbackmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Endorgan-Achse bleibt negativ-rückgekoppelt unabhängig der Spiegel der anderen Sexualhormone (Gillies und McArthur 2010). Zudem zeigt sich der sexuelle Dimorphismus vorwiegend *in vivo*, während *in vitro*-Untersuchungen bei beiden Geschlechtern ähnliche bzw. gleiche Ergebnisse liefern. Die Enzyme für die Sexualhormonproduktion können in männlichem wie weiblichem Gewebe nachgewiesen werden. Dispersionskulturen produzieren unabhängig des Geschlechts Estradiol, die Produktion kann bei beiden Geschlechtern durch Zugabe von Testosteron oder Pregnenolon gesteigert werden und die Expression des Estradiolrezeptors und dessen mRNA ist ebenfalls bei beiden Geschlechtern unterschiedslos (Rune et al. 2002; Fester et al. 2009).

*In vivo* zeigten sich hingegen Unterschiede. Angefangen von unterschiedlichen Plasmaspiegeln von Estradiol bei männlicher oder weiblicher Ratte über unterschiedliche Estradiolkonzentrationen im hippocampalen Gewebe bis hin zu unterschiedlicher Spine-Synapsendichte bei männlicher und weiblicher Maus stellt sich die Frage, ob Sexualhormon-Effekte in Versuchsreihen am männlichen Gewebe wie bei der Frau durch Estradiol vermittelt werden oder aber Testosteron bzw. Dihydrotestosteron (DHT) eine größere Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Synapsendichte haben (Leranth et al. 2003, 2004; Fester et al. 2012; Brandt et al. 2014).

In der vorliegenden Dissertation sollen weitere Untersuchungen an männlichen Hippocampi unternommen werden, um mögliche Effekte der Aromatase-Inaktivierung auf die synaptische Plastizität des männlichen Hippocampus im Sinne des sexuellen Dimorphismus diskutieren zu können. Hierzu wurden Versuche *in vitro* sowie *in vivo* durchgeführt und die jeweiligen Hippocampi anschließend elektronenmikroskopisch untersucht. Bewertet wurde dabei die synaptische Dichte im Hippocampus. Die Bedeutung der Forschung am männlichen Hippocampus

scheint nicht minder relevant zu sein, insofern als verbales Gedächtnis bei älteren Männern, aber auch die kognitive Leistungsfähigkeit bei präpubertären Jungen mit Wachstumsdefiziten von der Aromatasefunktion abhängen könnten (Cherrier et al. 2005; Hero et al. 2010). Die Therapie mit Antiandrogenen beim Prostatakarzinom oder mit 5 $\alpha$ -Reduktasehemmer bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) könnten ebenfalls Wirkungen auf synaptische Plastizität und Kognition bei Betroffenen haben (Brandt et al. 2014).

## **1.2. Der Hippocampus**

Der Hippocampus gehört als Teil des Archicortex zu den ältesten Strukturen des Gehirns. Er ist beim Menschen im Temporallappen an der Medialseite des Gyrus hippocampalis lokalisiert und wird als funktionelle Gruppe unterschiedlicher Zellverbände nach kranial durch den Seitenventrikel, nach rostral durch das Corpus amygdaloideum und nach kaudal durch das Ende des Balkens (Corpus callosum) und den Fornix cerebri begrenzt. Makroskopisch liegt er bei Maus und Ratte weiter kranial unmittelbar unterhalb des Kortex, lateral des Balkens. Als Teil des limbischen Systems und des Papez-Neuronenkreises gilt der Hippocampus als die wichtigste Struktur für Lern- und Gedächtnisprozesse, spielt aber auch eine Rolle bei Verhalten und Emotionen. Er ähnelt im Verbund mit dem Fornix makroskopisch dem Seepferdchen, was dem Hippocampus seinen Namen gab.

Unter dem Lichtmikroskop fallen insbesondere zwei Strukturen auf, die sich wie zwei ineinandergreifende C's darstellen: der kaudal liegende Gyrus dentatus und das unter dem Seitenventrikel liegende Ammonshorn (Cornu ammonis=CA). Des Weiteren werden Subiculum, Präsubiculum sowie Parasubiculum zum Hippocampus gezählt. Das Ammonshorn kann in weitere drei Untereinheiten aufgeteilt werden: CA1 mit vorwiegend kleinen Pyramidenzellen, CA2 mit besonders großen Pyramidenzellen und CA3 mit großen Pyramidenzellen in lockerem Zellverbund. Teilweise wird eine weitere Region als CA4 beschrieben, die sich CA3 anschließt, ähnlich wie CA2 aber in ihrer Funktion eher CA3 zugerechnet wird.

Während das Ammonshorn als Hauptzellen Pyramidenzellen aufweisen, liegen im Gyrus dentatus größtenteils Körnerzellen vor. Diese sind hier im sog. Stratum granulare organisiert. Das Ammonshorn weist hingegen ein Stratum pyramidale auf, das von Stratum oriens und Stratum

moleculare gesäumt wird, welches in ein Stratum radiatum und ein Stratum lacunosum-moleculare gegliedert werden kann. Der Hippocampus hat somit als phylogenetisch alte Struktur einen dreischichtigen Aufbau und differiert somit zu großen Teilen des Telencephalons mit dessen sechsschichtiger Zusammensetzung. Das Subiculum bildet den Übergang von Drei- zu Sechsschichtigkeit.

Neben exzitatorischen glutamatergen Pyramidenzellen und inhibitorischen GABA-ergen Körnerzellen besteht der Hippocampus, wie andere Teile des Gehirns auch, aus Gliazellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Diese sind wichtig für die Stützfunktion in neuronalem Gewebe. Sie isolieren und umhüllen Synapsen, bilden die Blut-Hirn-Schranke und sind wichtig für die Immunabwehr. Astrozyten sind hier besonders wichtig, da sie die hippocampalen Neurone mit Nährstoffen wie Glucose, aber auch mit Cholesterol versorgen und den Neuronen nach Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt diese Überträgerstoffe wieder zuführen.

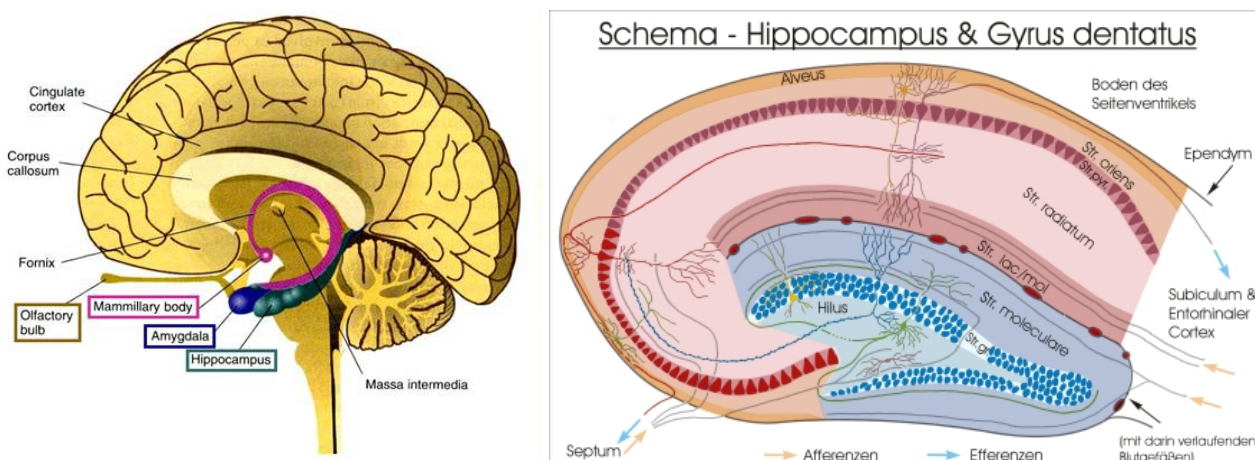
Neuronale Verbindungen des Hippocampus bestehen zu einer Vielzahl anderer neuronaler Kerngebiete und Strukturen. Während Afferenzen als Tractus perforans aus Corpus amygdaloideum und Neokortex über den entorhinalen Kortex den Gyrus dentatus des Hippocampus erreichen, erhält der Hippocampus auch Informationen aus dem Thalamus und über den Gyrus cinguli. Somit können Qualitäten verschiedenster Genese verarbeitet werden. Geruchssempfindungen stellen dabei eine Besonderheit dar, da sie z.T. unter Umgehung der Verarbeitungsprozesse des Thalamus in den Hippocampus gelangen und so ungefilterter aufgenommen werden können. Efferenzen gibt der Hippocampus über den Fornix an die Corpora mammillaria ab, welche dort weiterverarbeitet werden und zum Teil über Nucleus anterior des Thalamus und Gyrus cinguli in den Hippocampus zurückgelangen. Dieser Schaltkreis wird als Papez-Neuronenkreis bezeichnet. Er soll wichtig sein, um Informationen vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis zu überführen.

Innerhalb des Hippocampus werden Informationen trisynaptisch verarbeitet. Die erste Synapse wird an den Körnerzellen des Gyrus dentatus durch Afferenzen des Tractus perforans gebildet. Von hier aus wird die elektrische Erregung an die CA3-Pyramidenzellen des Ammonshorns weitergegeben und weiterverarbeitet, um über die sog. Schaffer-Kollateralen in die CA1-Region zu gelangen und hier auf Pyramidenzellen dieses Gebietes umgeschaltet zu werden. Modulierende

Einflüsse sind an den Dendriten von Körner- und Pyramidenzellen möglich.

In Bezug auf diese Arbeit ist der Hippocampus zudem mit allen Enzymen zur Sexualhormonsynthese ausgestattet und könnte demnach beginnend mit Cholesterol die gesamte Synthese bis hin zum Testosteron und mit Hilfe der Aromatase zum Estradiol selbst durchführen. (Shibuya et al. 2003; Do Rego et al. 2009; Pelletier 2010). Die Präsenz der Aromatase im Zwischenhirn war bereits Anfang der 1970er bekannt (Naftolin et al. 1971), im Hippocampus gelang der erste immunhistochemische Nachweis der Aromatase im Jahre 1991 (Sanghera et al. 1991). Die Funktionalität dieses Steroidhormon-bildenden Systems konnte mittels Nachweis von Estradiol unter zu Beginn Steroid- und Serum-freien Dispersionskulturbedingungen bewiesen werden (Prange-Kiel et al. 2003). Der Hippocampus ist in der Lage, Estradiol *de novo* zu produzieren und könnte sich parakrin oder autokrin stimulieren. Die Produktion von DHT ist ebenfalls durch Expression der 5 $\alpha$ -Reduktase in beiden Geschlechtern möglich (Hojo et al. 2011; Castelli et al. 2013).

Durch Nachweis der Funktionalität der Produktion der Sexualhormone ist der Hippocampus folglich nicht auf die Supplementierung von Vorläufermolekülen wie Pregnenolon oder Dihydroepiandrosteron (DHEA) angewiesen (Jakab et al. 1993; Baulieu 1997; Baulieu und Robel 1998). Die Sexualhormonproduktion ist im männlichen wie im weiblichen Gewebe möglich (Rune et al. 2002; Fester et al. 2009).



**Abb. 1.1.:** Links: Schematische Darstellung des limbischen Systems und Lage des Hippocampus *in situ*.

Rechts: Schema des Hippocampus und Gyrus dentatus. Afferenzen und Efferenzen des Hippocampus werden dargestellt.

(Quellen: <https://projects.exeter.ac.uk/time/images/content/findings/hippocampus.jpg>, Stand 26.02.2017  
<http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus-farbig.jpg>, Stand 26.02.2017)

### 1.3. Spine-Synapsen

Spine-Synapsen sind kleine Ausstülpungen der Dendriten, die der Vergrößerung der Dendritenoberfläche und somit der Interaktionsfläche mit anderen Zellen dienen. Sie kommen unter anderem im Hippocampus vor und gleichen äußerlich kleinen Dornfortsätzen (*spine* = Dorn). Sie bilden den postsynaptischen Anteil der Synapse und können in kurze (*stubby*), dünne (*thin*) und pilzförmige (*mushroom-shaped*) Synapsen unterteilt werden. Sie wirken meist exzitatorisch. Die pilzförmigen Synapsen werden aufgrund ihrer Funktion auch als Memory- oder Gedächtnis-Synapsen bezeichnet.

Ihr Aufbau ist in aller Regel gleich oder sehr ähnlich. Dem ovalen Bulbus mit der postsynaptischen Verdichtung folgt ein schmalerer Halsteil, der unmittelbar dem Dendritenschaft entspringt (Nimchinsky et al. 2002). In den Präsynapsen sind in ca. 20% der Fälle Spine-Apparate zu erkennen. Diese interagieren unter anderem mit Synaptopodin und Aktin und sind wichtig bei Prozessen der synaptischen Plastizität. Spine-Synapsen sind nicht, wie früher gedacht, stabile Strukturen, sondern befinden sich in stetigem Umbau (Segal 2005). Sie können *de novo* oder aus einer vorbestehenden Schaftsynapse entstehen. Im ersteren Fall bilden sich sogenannte Filopodien, welche aus den Dendriten aussprossen und nach Interaktionsorten wie Axone benachbarter Zellen suchen. Nach Bindung bilden sich die Filopodien zurück und werden zu 1-2 µm langen Spine-Synapsen (Harris und Kater 1994; Dailey und Smith 1996). Filopodien selbst sind bis zu 10 µm lang und 1 µm dick (Segal 2005).

Die Mechanismen zur Entstehung der Spine-Synapsen scheinen sich in beiden Fällen auch auf molekularer Ebene zu unterscheiden, wie zum Beispiel bei der Einbindung postsynaptischer Adhäsionsmoleküle und dem PSD-95 (postsynaptic density Protein 95) (El-Husseini et al. 2000; Abe et al. 2004). Für das Zytoskelett der Spine-Synapse ist besonders das Aktin unabdingbar (Fifková und Delay 1982; Morales und Fifková 1989). Es hat darüber hinaus eine Bedeutung für die Funktion der Synapse (Honkura et al. 2008; Hotulainen und Hoogenraad 2010; Dent et al. 2011). Die Veränderungen der Synapsen scheinen zudem Calcium-abhängig zu sein. So konnte die Aktin-abhängige Motilität, die Länge und Größe der synaptischen Anteile sowie die Stabilität der Synapse durch unterschiedlich hohe Calciumkonzentrationen verändert werden. Dabei sprachen hohe Calciumkonzentrationen für eine Vergrößerung und Verbreiterung der Synapse (Berridge

1998; Holcman et al. 2004; Oertner und Matus 2005; Segal 2005).

Auch hippocampales Estradiol hat eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Spine-Synapsen (Zhou et al. 2010; Prange-Kiel et al. 2013). Es bewirkt über Aktivierung der LIM-1-Kinase eine Phosphorylierung des Proteins Cofilins, das Aktin-assoziert in Neuronen vorkommt. Cofilin verhindert in nicht phosphoryliertem Zustand die Polymerisierung von Aktin, so dass die LIM-1-Kinase-assoziierte Phosphorylierung zu einer Inaktivierung der Cofilin-Funktion führt. Hierdurch kann sich filamentäres Aktin (F-Aktin) bilden, welches zur Stabilisierung der Spine-Synapsen beiträgt (Vierk et al. 2014).

#### 1.4. Hippocampale Testosteron-/Estradiolsynthese

Die Enzyme, die an der Synthese des Estradiols beteiligt sind, gehören zur Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme. Ihr Name beruht auf der Tatsache, dass sie bei photometrischen Untersuchungen das Licht bei 450 nm absorbieren. Ihr Gewicht liegt bei ca. 50 kDa.

Ausgangsstoff für die Estradiolsynthese ist wie bei allen Steroidhormonen das Cholesterol. Dieses wird bei allen Steroidhormon-produzierenden Prozessen mit Hilfe des *side chain cleavage enzyme* (Cytochrom P450 scc) an der inneren Membran des Mitochondriums zu Pregnenolon umgesetzt. Zuvor ist für den Transport durch die äußere Mitochondrienmembran in den intermembranären Spalt das Enzym StAR (steroidogenic acute regulatory protein) verantwortlich. Seine Aktivität ist letztlich verantwortlich für die Menge der Steroidhormonsynthese und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (*rate limiting step*).

Das entstehende Pregnenolon wird in einem weiteren Schritt durch das Enzym 17 alpha Hydroxylase/17,20 Lyase (Cytochrom P450 c17) im glatten endoplasmatischen Retikulum über 17 alpha Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) umgesetzt. Dieser Schritt ist irreversibel und kann dementsprechend nicht umgekehrt werden. Das DHEA gehört bereits zu den Androgenen und kann reversibel durch die nicht zu den P450-Enzymen gehörenden 17 beta Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (17 beta HSD) und 3 beta Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 beta HSD) zum Androstendiol und weiter irreversibel zu Testosteron umgewandelt werden.

Testosteron kann als Vorläufermolekül für das Estradiol bezeichnet werden. Es wird durch das

Enzym Aromatase (Cytochrom P450 aro) durch Aromatisierung des Ringes A und Abspaltung der C19-Methylgruppe in Estradiol umgewandelt. Andererseits gelingt jedoch auch die Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) durch die 5 $\alpha$ -Reduktase. DHT gilt im Vergleich zu Testosteron als das potentere Androgen.

Cholesterol ist neben den Estrogenen und Androgenen ebenfalls Ausgangsstoff für die Gluco- und Mineralocorticoidsynthese. Die Ausstattung und Aktivität an den unterschiedlichen P450-Enzymen bestimmt die Umsetzung des Pregnenolons in die eine bzw. andere Richtung. Im Falle der Gonaden sowie in der Zona reticularis der Nebennierenrinde erfolgt die Umsetzung zu Androgenen und Estrogenen. Neben diesen primären Organen der Sexualhormon-Synthese sind viele weitere Zelltypen wie z.B. Fettzellen, aber auch Neurone in der Lage, diese Botenstoffe herzustellen. Auch der Hippocampus ist *de-novo*-Syntheseort für Estradiol (Prange-Kiel et al. 2003; Hojo et al. 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass der Hippocampus alle Enzyme der Estrogensynthese exprimiert und damit auf die gleiche Art und Weise Estradiol produziert, wie es auch die Gonaden tun (Furukawa et al. 1998; Stoffel-Wagner 2001). Die alternative Synthese zu DHT konnte im Hippocampus ebenfalls beschrieben werden (Okamoto et al. 2012; Melcangi et al. 2016).

### 1.4.1. Aromatase

Die Aromatase ist auf dem Chromosom 15 kodiert und ist 1511 bp (Basenpaare) lang. Sie katalysiert die irreversible Umwandlung von Testosteron zu Estradiol. Sie hat ihren Sitz im endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird neben vielen anderen Regionen im Körper und im Besonderen auch anderer Regionen des Gehirns wie der Amygdala und dem Hypothalamus, auch im Hippocampus exprimiert. In der Zelle ist die Aromatase vorwiegend entlang der postsynaptischen Verdichtung (*post-synaptic density*, PSD) zu finden, konnte aber auch schon in den prä- und postsynaptischen Regionen in Körner- und Pyramidenzellen gefunden werden (Hojo et al. 2004; Mukai et al. 2006). Sie wird bei männlichen und weiblichen Ratten gleichermaßen exprimiert und auch die produzierte Menge an Estradiol aus dem Überstand von kultivierten männlichen und weiblichen Neuronen ist gleich groß. Im Gegensatz hierzu konnten große Unterschiede der gemessenen Estradiolmengen mit Hilfe der Massenspektrometrie bei *in vivo*-Versuchen mit männlichem und weiblichem hippocampalen Gewebe festgestellt werden. Hier

waren die Estradiolmengen bei männlichen und ovariectomierten Tieren nicht messbar gering, während sie bei weiblichen Tieren leicht zu bestimmen waren (Fester et al. 2012).

Die Aromatase wird mit Hilfe Calcium-abhängiger Kinasen wie der Calmodulin-Kinase reguliert. Daher ist auch sie indirekt abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration. Bei Calciumeintrom nach Aktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Calmodulin-Kinase und der Phosphorylierung der Aromatase. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Abnahme der Aktivität und damit einen geringeren Umsatz von Testosteron zu Estradiol (Balthazart und Ball 2006; Fester und Rune 2015). Es kommt folglich zu einer Anreicherung von Testosteron in der Zelle (Harden und MacLusky 2005).

### **1.5. Genomische und nicht-genomische Estradiol-/Androgeneffekte**

Sexualhormone wie Estradiol und Testosteron können auf genomischer und nicht-genomischer Ebene Signale auf die Zielzelle übertragen. Während der genomische Weg mittels zytosolischer/nukleärer Steroidrezeptoren vermittelt wird, wirken sie nicht-genomisch über membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Genomisch bzw. nicht-genomisch zeigt in diesem Zusammenhang an, ob Einfluss auf die Transkription und Proteinbiosynthese der Zelle genommen wird. Im Hippocampus sind beide Wege bekannt, es gibt aber auch Quervernetzungen, so dass zytosolische Rezeptoren schnelle, nicht-genomische und membrangebundene Rezeptoren genomische Effekte auslösen können.

Der genomische Signaltransduktionsweg ist die klassische Art und Weise für Sexualhormone, Effekte in der Zielzelle auszulösen. Er beginnt mit der Diffusion über die Zellmembran der Zelle, wo sie entweder an die zytosolischen Estradiol- oder Androgenrezeptoren binden. Estradiol und Testosteron gehören zu den Steroidhormonen und sind daher lipophil, was die Diffusion über die Zellmembran ermöglicht. Nach Bindung an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung und mit dem Rezeptor assoziierte Proteine dissoziieren ab. Der an das Hormon gebundene Steroidrezeptor dimerisiert mit einem weiteren ligandengebundenen Rezeptor und es kommt zur Phosphorylierung. Das Dimer transloziert in den Zellkern, wo es mit seinen Zielstrukturen, den Promotern auf der DNA, interagiert. So kann direkter Einfluss auf die Genexpression genommen werden (Klinge 2001). Diese und auch die folgende Proteinbiosynthese kann wenige Stunden bis

mehrere Tage in Anspruch nehmen. Der genomische Weg gehört zu den langsamen Übertragungswegen (Beyer 1999; Behl und Manthey 2000; Lee und McEwen 2001).

Es sind zurzeit zwei unterschiedliche Subtypen des genomischen Estradiolrezeptors bekannt, die sich auch auf molekularer Ebene sehr ähnlich sind. Die als ER $\alpha$  und ER $\beta$  bezeichneten Rezeptoren weisen jedoch große Unterschiede in den Transaktionsdomänen auf und es sind drei ER $\alpha$ - und fünf ER $\beta$ -Isoformen bekannt. Im Hippocampus werden beide Rezeptorsubtypen exprimiert (Shughrue et al. 1997; Wehrenberg et al. 2001; Rune et al. 2002; Foster 2012). Beim Androgenrezeptor sind hingegen keine Subtypen bekannt, zwei Isoformen konnten jedoch isoliert werden. Der Androgenrezeptor ähnelt in seiner Struktur am ehesten dem Progesteronrezeptor. Wichtig zu wissen in diesem Zusammenhang ist, dass Estradiol selektiv auf den Estrogenrezeptor wirkt, während die Androgene spezifisch auf den Androgenrezeptor wirken. Dihydrotestosteron hat dabei eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor als Testosteron.

Die spezifische Rolle der jeweiligen Rezeptoren im Hippocampus wird kontrovers diskutiert. Einige Studien weisen darauf hin, dass es bei der Frau unter Stimulation von ER $\beta$ -Agonisten zur Bildung von dendritischen Synapsen kommt (Liu et al. 2008; Srivastava et al. 2010), andere Studien widerlegen dies jedoch und beschreiben eine Abnahme an dendritischen Synapsen (Tan et al. 2012). Zudem wird der ER $\alpha$ -Rezeptor von einigen Autoren als der Rezeptor-Subtyp beschrieben, der die Synapsenbildung induziert (Zhou et al. 2014). Nach Ovariectomie konnte der Synapsenverlust durch ER $\alpha$ -Agonisten wieder ausgeglichen werden (Qu et al. 2013).

Die Komplexität der Wirkung der Rezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  hängt mit vielen Faktoren zusammen, die jeweils Einfluss auf den synaptischen Apparat und dessen Plastizität nehmen. In Mäusen wird vorwiegend ER $\beta$  exprimiert, in der Ratte ist ER $\alpha$  vorherrschend (Shughrue et al. 1997). Beide Rezeptortypen können über den genomischen Weg und über einen schnellen nicht-genomischen Weg über Membran-initiierte Effekte funktionieren. Sie bilden Homo- und Heterodimere, ihre Expression beeinflusst sich gegenseitig und Faktoren wie Geschlecht und Alter haben zusätzliche Einflüsse auf die Wirkung des Estradiols (Pettersson et al. 1997; Adams et al. 2001; Nomura et al. 2003; Heldring et al. 2007; Bailey et al. 2011).

Neben dem herkömmlichen klassischen Weg der Signaltransduktion existiert ein nicht-genomischer Signalweg, der über membrangebundene Rezeptoren vermittelt wird. Er ist im

Gegensatz zum genomischen Weg sehr schnell (sog. „rapid effects“), da seine Effekte innerhalb von wenigen Sekunden ausgelöst werden. Beispiel für einen Estradiol-Rezeptor dieser Art ist der GPER (früher bekannt als GPR 30), der G-Protein-gekoppelt arbeitet. Allgemein können mithilfe dieses Weges *second messenger*-Moleküle umgesetzt werden wie z.B. IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-trisphosphat) oder cAMP (cyclisches Adenosin-Monophosphat). Es kommt außerdem zur Aktivierung des MAP-Kinase-Transduktionsweges und durch Bindung des IP<sub>3</sub> an seinen IP<sub>3</sub>-Rezeptor zum Einstrom von Calcium aus dem glatten Endoplasmatischen Retikulum (Toran-Allerand et al. 2002; Beyer et al. 2003).

Estradiol und Testosteron/DHT können von vielen unterschiedlichen Zellen des menschlichen Organismus produziert werden. Neben den wohl bekanntesten Orten ihrer Synthese, den Eierstöcken und den Hoden, produzieren auch Fettzellen, Neurone und Zellen der Zona reticularis der Nebennierenrinde Sexualhormone. Der Mann produziert im geringen Maße Estradiol, die Frau auch geringe Mengen Androgene. Vor allem beim Mann und bei der postmenopausalen Frau hat die extraovarielle Produktion an Estrogenen eine besondere Bedeutung (Simpson et al. 1999). Die Sexualhormonproduktion unterliegt der Hypothalamus-Hypophysen-Endorgan-Achse.

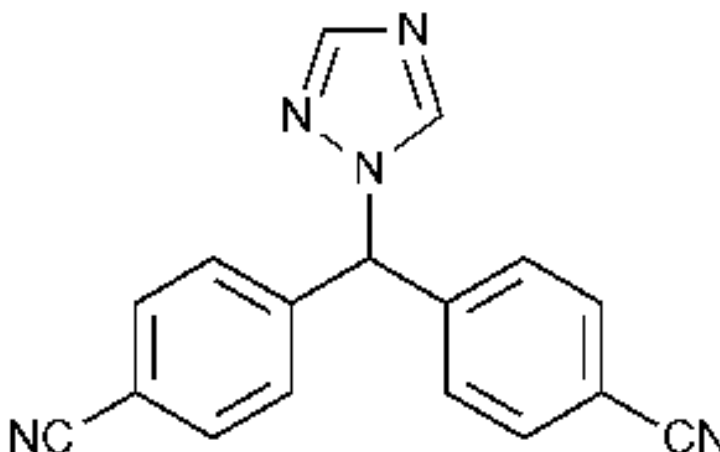
Estrogene sind besonders für den weiblichen Organismus wichtig. In Bezug auf die Ausbildung sexueller Geschlechtsmerkmale und auf eine regelgerechte Sexualfunktion sind sie unabdingbar. Während des Menstruationszyklus ist der Serumspiegel an den Tagen vor der Ovulation und in der Lutealphase besonders hoch. Die Lutealphase wird jedoch durch das Hormon Progesteron bestimmt. Beim Mann sind die Androgene die wichtigen Vertreter, die Reproduktion und Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale sichern.

Allgemein haben Sexualhormone vielfältige, anabole Funktionen. Bei einem Absinken des Estrogenspiegels nach dem Klimakterium steigt das Risiko für Erkrankungen wie Osteoporose und Morbus Alzheimer, es sinkt aber auch das Risiko für Mammakarzinome. Auch der Hippocampus gehört zu den Organen, die GnRH-abhängig Estradiol produzieren. Diese Regulation scheint mittels Aktivierung der Aromatase zu funktionieren und ist abhängig vom Status der Reproduktivität (Prange-Kiel et al. 2008, 2013). Dabei korreliert die Estradiol-Serumkonzentration mit der Konzentration im Hippocampus (Kato et al. 2013). Über die oben genannten Rezeptoren wie ER $\alpha$ , ER $\beta$ , dem Androgenrezeptor und den nicht-genomischen Signaltransduktionswegen wird Einfluss auf die Synapsendichte genommen.

## 1.6. Rezeptor- und Enzyminhibitoren

### 1.6.1. Nicht-Steroidale Aromatasehemmer

Nicht-Steroidale Aromatasehemmstoffe werden zur Therapie des hormonabhängigen Mammakarzinoms eingesetzt. Zu ihren Vertretern gehören Anastrozol, Aminoglutethimid sowie das in dieser Dissertation verwendete Letrozol, die sich in ihrer Potenz, die Aromatase zu hemmen, unterscheiden. Durch Inhibition der Aromatase wird die Umwandlung von Testosteron zu Estradiol reduziert. Letrozol als der potenteste Vertreter der nicht-steroidalen Aromatasehemmer kann die Funktion der Aromatase auf bis zu 10 Prozent der ursprünglichen Aktivität verringern und ist somit um das 10.000-fache leistungstärker als Aminoglutethimid und zehnfach stärker als Anastrozol. Als kompetitiver, reversibler Inhibitor konkurriert Letrozol dabei mit Testosteron um die Bindungsstelle an der Aromatase. Wird Letrozol abgesetzt, kann die Aromatase ihre vollständige Funktion wiederaufnehmen und die gleichen Mengen Estradiol produzieren. Klinisch macht sich die Verabreichung, ähnlich wie bei postmenopausalen Beschwerden oder verallgemeinernd bei Estrogen-Defizienz, durch Hitzewallungen, Kopfschmerzen, verringerter Libido sowie einem erhöhten Osteoporoserisiko bemerkbar.



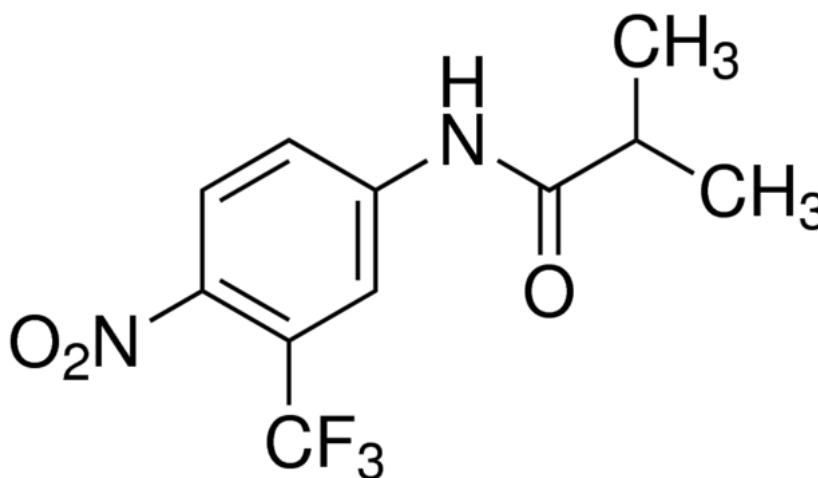
**Abb. 1.2.:** Dargestellt wird die chemische Strukturformel von Letrozol. Letrozol weist nicht die für Steroidhormone typische Ringstruktur auf.

(Quelle: <http://www.newdruginfo.com/pharmacopeia/usp28/v28230/uspnf/pub/images/v28230/g-1606.gif>, Stand 26.02.2017)

### 1.6.3. Androgenrezeptor-Antagonisten

Androgenrezeptor-Antagonisten wie Flutamid oder Bicalutamid heben die Wirkung männlicher Geschlechtshormone auf und können zur Therapie des fortgeschrittenen, metastasierten Prostatakarzinoms eingesetzt werden. Weitere Indikationen antiandrogener Medikamente sind Hirsutismus und Akne bei der Frau, aber auch Triebdämpfung beim Mann. Im Nebenwirkungsprofil von Flutamid und Bicalutamid sind primär Wirkungen auf Brust und Brustdrüse zu nennen. Gynäkomastie, Brustschmerzen, Berührungsempfindlichkeit der Brust und kleinknotige Veränderungen können beobachtet werden.

In der hiesigen Dissertation wurde Flutamid benutzt, um in hippocampalem Gewebe die Wirkung eines Androgenrezeptor-Blocks im Hinblick auf die synaptische Plastizität zu testen. Die Wirkungen von Flutamid werden vorwiegend nach Umwandlung zu 2-Hydroxyflutamid als aktivem Metaboliten beschrieben.



**Abb. 1.3.:** Auf der Abbildung wird die chemische Strukturformel von Flutamid gezeigt. Flutamid ist ein nicht-steroidales Anti-Androgen

(Quelle: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f9397?lang=it&region=IT>, Stand: 05.03.2017)

## **2. Fragestellung**

Sexualsteroiden wie Estradiol und Dihydrotestosteron (DHT) haben eine stimulierende Funktion für die Synapsenbildung im Hippocampus. Dabei stellt Estradiol bei der Frau und DHT beim Mann das entscheidende Hormon dar (Leranth et al. 2003; Kretz et al. 2004). Das Substrat für beide Hormone ist Testosteron. Der Hemmstoff Letrozol führt zur Inhibition der Aromatase, dem letzten Schritt in der Estradiolsynthese und damit erwartungsgemäß zu einer Abnahme der Synapsen bei weiblichen, aber nicht bei männlichen Tieren. Bei männlichen Tieren konnte eine tendenzielle Zunahme der Synapsen festgestellt werden, die wahrscheinlich durch die nach Letrozolgabe erhöhte Testosteronkonzentration bedingt ist. Erhöhte Konzentrationen von Testosteron führen zu einer vermehrten Bildung von DHT.

Die Behandlung von weiblichen hippocampalen Schnittkulturen mit Estradiol hat keinen Effekt, vermutlich, weil Estradiol über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen die Phosphorylierung der Aromatase, und damit ihre Inaktivierung und Abnahme der Produktion von Estradiol aus Testosteron bedingt (Kretz et al. 2004; Fester et al. 2016). In männlichen Schnittkulturen könnte die Erhöhung der Testosteron- bzw. DHT-Konzentrationen nach Estradiolgabe zu einer Zunahme der Synapsendichte führen, da bei männlichen Tieren gezeigt worden ist, dass DHT essentiell für die Synapsenbildung im Hippocampus ist (Leranth et al. 2003).

Um die Frage zu adressieren, ob Estradiol in männlichen hippocampalen Schnittkulturen, im Gegensatz zu weiblichen Schnittkulturen, aufgrund des oben geschilderten Mechanismus die Synapsenbildung stimuliert, haben wir die Synapsendichte in männlichen Schnittkulturen nach Estradiolgabe dosisabhängig untersucht. Die Synapsendichte wurde stereologisch in der CA1-Region des Hippocampus bestimmt. Wir konnten verifizieren, dass die Behandlung von männlichen Tieren mit Letrozol die Synapsendichte erhöht. Erstaunlicherweise zeigt die männliche Aromatase-KO-Maus eine unveränderte Synapsendichte. Estradiolbehandlung von männlichen Schnittkulturen führt zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl von Synapsen in der CA1 Region des Hippocampus. Dieser Estradioleffekt wird durch gleichzeitige Gabe eines Androgenrezeptorblockers aufgehoben.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Estradiol-induzierte Erhöhung der Synapsendichte in männlichen hippocampalen Schnittkulturen über Androgene vermittelt wird.

### **3. Methoden**

#### **3.1. Untersuchte Tiere**

Für diese Dissertation wurden *in vitro*- sowie *in vivo*-Experimente durchgeführt. Wir verwendeten die Methode der stereologischen Elektronenmikroskopie, um unsere These zu untersuchen. Für die *in vitro*-Versuche wurden hippocampale Slicekulturen von 5 Tage alten, postnatalen Ratten (P5) verwendet. Die *in vivo*-Untersuchungen sollten die synaptische Dichte an 10 bis 12 Wochen alten Mäusen beobachten. Außerdem wurden *in vivo*-Versuche mit ArKO-Mäusen im Alter von 9 Wochen und 12 Monaten durchgeführt. Die Tierversuche wurden im Vorfeld durch eine Ethikkommission überprüft und bewilligt. Die Haltungsbedingungen wurden gemäß den gesetzlichen Bestimmungen eingehalten. Um Rankämpfe zu vermeiden, wurden maximal drei Tiere in einer Box gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und es wurde ein Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden gewährleistet.

#### **3.2. Hippocampale Slicekulturen**

##### **3.2.1. Präparation des Rattenhippocampus**

Unter semisterilen Bedingungen wurden 5 Tage alte Ratten dekapitiert und die Kopfhaut im Anschluss von dorsal her durchtrennt. Der Schädel wurde mit Hilfe einer Schere geöffnet und das Gehirn unter Verwendung eines Heidemannspatels aus dem Kopfsitus herauspräpariert. Das Gehirn wurde auf ein Schwämmchen gelegt, welches zuvor mit der Pufferlösung PBS getränkt wurde, und das Kleinhirn mittels Skalpells entfernt. Im Anschluss wurden linke und rechte Hemisphäre voneinander getrennt und jeweils unter einer Stereolupe vergrößert dargestellt, um eine exakte Präparation der jeweiligen Hippocampi zu gewährleisten. Diese Präparation erfolgte wiederum mit Hilfe eines Heidemannspatels.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Hippocampus senkrecht zur longitudinalen Achse in ca. 400µm dicke Schnitte aufgetrennt. Hierzu wurde ein Tissue Chopper verwendet. Die Schnitte des Hippocampus wurden insgesamt für 30- 60 Minuten in einem auf 4°C gekühltem

Präparationsmedium (Minimal Essential Medium, MEM und 2mM Glutamine) aufbewahrt. Anschließend konnte die Struktur der ineinandergreifenden C's des Hippocampus durch das Schneiden der Frontalschnitte unter der Stereolupe begutachtet werden.

3 bis 4 nebeneinanderliegende Slices wurden nach Trennung voneinander ausgewählt und auf ein Kultursieb gegeben. Jeder dieser Slices zeigte das Ammonshorn mit seinen Region CA1 bis CA3 sowie den Gyrus dentatus. Nach Aufteilen der Slices auf 6-Well-Platten wurden 1,0-1,2 ml Kulturmedium in jedes Well gegeben, um eine Nährstoffversorgung des hippocampalen Gewebes gewährleisten zu können.

Die Lagerung der 6-Well-Platten erfolgte daraufhin im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 Prozent. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt und zudem darauf geachtet, dass der pH-Wert des Inkubationsmediums jedes Mal neu gemessen und auf 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt wurde. Zur Titration wurde 1M NaOH bzw. 1M HCl verwendet. Bei allen Arbeitsschritten und besonders während des Mediumwechsels wurde auf Sterilität geachtet, um eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden. Das Vorgehen der Präparation und Kultivierung orientierte sich an der Methodik von Stoppini (Stoppini et al. 1991).

### **3.2.2. Stimulation der Slicekulturen**

Für die Dissertation wurden unterschiedliche Versuchsreihen und Stimulationen verwendet. Am fünften Tag der Kultivierung wurde mit der eigentlichen Behandlung begonnen. Während die Untersuchungsgruppen mit den unterschiedlichen Stimulanzen behandelt wurden, wurde auf die Kontrollgruppe Wasser appliziert. Die folgende Übersicht gibt einen Überblick über die Versuche, die mit hippocampalen Slicekulturen durchgeführt wurden.

1. 3 männliche Ratten: Letrozol 100 nM sowie Kontrollgruppe
2. 4 männliche Ratten: Estradiol 100 nM, 10 nM und 1 nM sowie Kontrollgruppe
3. 5 männliche Ratten: Estradiol 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM sowie Kontrollgruppe
4. 5 männliche Ratten: Estradiol 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM, Flutamid 100 nM, Flutamid 100 nM + Estradiol 100 nM, Kontrollgruppe im Kulturmedium und Kontrollgruppe mit DMSO-Zusatz (1µl/1ml MEM)

Bei insgesamt je vier Stimulationen wurden die Kulturmedien alle zwei Tage ausgetauscht, sodass die Stimulationen immer am gleichen Tag wie die Medienwechsel stattfanden. Es wurden jeweils pharmakologische und nicht-toxische Konzentrationen zur Behandlung der Slicekulturen verwendet. Nach sieben Tagen, also insgesamt am elften Tag der Kultivierung, wurden die Kulturen fixiert. Das Medium wurde abgesaugt und zweimal mit PB (Phosphatpuffer:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5 M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M) und einmal mit PBS gespült. Daraufhin wurde mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Es erfolgte eine erneute Spülung mit PB in 0,1 molarer Lösung.

### **3.3. *In vivo*-Versuche**

#### **3.3.1. Beschreibung der Versuche**

Für die *in vivo*-Versuchsreihen wurden jeweils die Spine-Synapsendichten der Kontrollgruppen gegen die der behandelten Untersuchungsgruppen gemessen. Die folgende Übersicht zeigt, welche Behandlungen vorgenommen wurden.

1. 9 männliche Mäuse des Zuchtstamms C57/BL7 im Alter zwischen 10 und 12 Wochen: Kontrollgruppe (3 Tiere), Letrozolbehandlung intraperitoneal 24 h ( $4 \mu\text{g}/10 \text{ g KG}$ ) (3 Tiere), Letrozolbehandlung intraperitoneal 48 h ( $4 \mu\text{g}/10 \text{ g KG}$ ) (3 Tiere)
2. 6 männliche Mäuse: Kontrollgruppe mit 2 männlichen Mäuse des Zuchtstamms C57/BL6 im Alter von 9 Wochen, 2 männliche Mäuse mit Aromatase-Knockout im Alter von 9 Wochen, 2 männliche Mäuse mit Aromatase-Knockout im Alter von 12 Monaten

Für die intraperitoneale Gabe von Letrozol wurden Tiere im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Neben einer Kontrollgruppe, die lediglich Spritzen mit einem Gemisch aus DMSO und NaCl 0,9% erhielt, wurde die Stimulation mit Letrozol durch Injektion in das Peritoneum erreicht. Hierzu wurden die Mäuse im Nacken fixiert und die Spritze in das Abdomen appliziert. Die Gabe erfolgte gewichtsadaptiert. Um Verwechslungen nach Gabe zu vermeiden, wurden die Tiere in eine andere Box gegeben, bis allen Tieren die Injektionen verabreicht wurden. Mäuse mit 24-stündiger Stimulation erhielten eine Spritze mit Letrozol, Mäuse mit 48-stündiger Stimulation erhielten zwei Spritzen und die Tötung erfolgte immer 24 Stunden nach der letzten Stimulation.

Wie oben beschrieben, wurden für einen der beiden Versuche Mäuse mit Aromatase-Knockout (ArKO) verwendet. Die Genausschaltung der Aromatase wurde durch Unterbrechung des CYP19-Gens gewährleistet. Durch Transfektion wurde ein Vektor eingebracht, der das für die Funktion der Aromatase wichtige Exon IX durch ein funktionsloses Exon ersetzte (Fisher et al. 1998). Zuchtstämme für die ArKO-Mäuse dieser Dissertation wurden am Prince Henry's Institute of Medical Research gehalten und am Institut der Zoologie an der Technischen Universität in Dresden zurückgekreuzt (Zhou et al. 2014). Die Genotypisierung wurde mittels PCR sichergestellt.

### **3.3.2. Präparation**

Die Narkotisierung wurde durch ein Sauerstoff-CO<sub>2</sub>-Gemisch durchgeführt und durch pures CO<sub>2</sub> sichergestellt. Daraufhin wurden die Mäuse zur Vorbereitung auf die transkardiale Perfusion auf einem Tisch fixiert. Mittels Medianschnitt wurde das Abdomen sowie der Thorax eröffnet. Daraufhin wurde der rechte Ventrikel eröffnet und die Perfusion gestartet. Für die Elektronenmikroskopie wurde eine Fixierung mittels 2,5 % Glutaraldehyd-Lösung (GA) verwendet. Zunächst wurde jedoch das Blut mittels Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) ausgewaschen. Daraufhin gelang die Fixierung durch GA.

Die anschließende Präparation der Hippocampi glich der der hippocampalen Slicekulturen. Nach Präparation wurden die Hippocampi in 10 ml 2,5 % GA gegeben und zwei Tage lang bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Nach weiteren 15 Stunden in 0,1 M PB wurden die Hippocampi so geschnitten, dass das Stratum radiatum in der CA1 Region dargestellt werden konnte. Aus dieser Region stammten nun die Gewebeschnitte, die annähernd würfelförmig in der Größe von 1 mm<sup>3</sup> zurechtgeschnitten wurden.

### **3.4. Nachfixierung, Entwässerung und Einbettung**

Die Nachfixierung wurde mit einprozentiger Osmiumtetroxid-Lösung, gelöst in 0,1 molarer PB-Lösung mit Saccharose, durchgeführt. Daraufhin wurde mittels Ethanol in aufsteigender Konzentration (30%,50%,70%,96% und zweimal mit 100% Ethanol, jeweils für 10 min) Wasser entzogen. Die Entwässerung wurde daraufhin mit Propylenoxid weitergeführt, jeweils für 15 min.

Für die Einbettung erfolgte zunächst die Applikation einer Propylenoxid/ Glycidether-Mischung.

Diese wurde zunächst für 60 min im Verhältnis 1:1 verwendet. Daraufhin wurde über Nacht der Glycidether-Anteil auf 3:1 erhöht. Die Einbettung erfolgte wieder über Nacht in einer Glycidether-Mischung. Für diese Mischung wurden 4 Teile der Stammlösung A sowie 6 Teile der Stammlösung B verwendet (siehe unten). Die Zugabe der zweiprozentigen Lösung 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol wirkte als Beschleuniger.

### 3.5. Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Um aus den eingebetteten Gewebeschnitten ca. 1  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte zu erhalten, wurde ein Semidünnschnittgerät verwendet. Das Präparat wurde mit Toluidinblaulösung in einprozentiger Konzentration angefärbt und es wurden geringe Mengen an Pyronin hinzugefügt. Ziel war es, das Gewebe zur Kontrastierung mit zwei unterschiedlichen Farben anzufärben. Es wurden das Stratum pyramidale und Stratum radiatum der CA1 Region dargestellt und die Gewebeblöcke daraufhin so geschnitten, dass lediglich diese beiden Regionen übrigblieben. Aus den Gewebeblöcken wurden infolgedessen nochmals 1/10 dünnere Schnitte angefertigt, die Ultradünnschnitte. Diese haben eine Dicke zwischen 80 und 110 nm und wurden mit 0,1 % Uranylacetat für 30 Minuten und mit Bleicitrat für 5 Minuten kontrastiert.

### 3.6. Herstellung der EM-Bilder und Evaluation

Es wurden solche Schnitte ausgewählt und unter dem Elektronenmikroskop dargestellt, die zu dem oberen und mittleren Drittel des Stratum radiatum gehörten. Zur Untersuchung der Gewebe wurde eine 6600-fache Vergrößerung gewählt und Ausschnitte verwendet, die nicht durch Blutgefäße oder Dendriten zur Verfälschung der Ergebnisse beitragen konnten. Es wurden jeweils zwei Ultradünnschnitte verwendet, die *in situ* nebeneinanderlagen. Somit wurden korrespondierende Ausschnitte gewählt, die in der Maus/der Ratte oder in der späteren Slicekultur 0,1  $\mu\text{m}$  voneinander entfernt waren. Die jeweiligen Ausschnitte wurden dargestellt und abfotografiert. Die Entwicklung der Fotos erfolgte daraufhin im Fotolabor, durch Modernisierung der Kamera konnte dieser Schritt umgangen werden und es konnten nun direkt digitale Fotos produziert werden, die am Computer und in gedruckter Form ausgewertet wurden.

Eine Synapse besteht laut Kahle aus unterschiedlichen Elementen, die notwendig sind, um eine Synapse als solche bezeichnen zu können (Kahle und Frotscher 2001). Hierzu gehören die präsynaptischen Vesikel, die präsynaptische Membran, die postsynaptische Membran und postsynaptische Verdichtung sowie der synaptische Spalt, der zwischen Prä- und Postsynapse lokalisiert ist. Es wurden nur solche Synapsen markiert, die diese Anforderungen erfüllten.

Zur Auswertung wurden die untersuchten Bilder für den Betrachter verblindet und die korrespondierenden Ausschnitte aus dem Hippocampus verglichen. Auf Bild 1 wurden Synapsen markiert und auf Bild 2 erneut bewertet. Diejenigen Synapsen, die auf Bild 1 sichtbar als Synapse zu werten waren, auf Bild 2 aber nicht mehr die Anforderungskriterien einer zu markierenden Synapse erfüllten, wurden in die Wertung aufgenommen. Eine erneute Auswertung folgte von Bild 2, um diejenigen Synapsen zu erfassen, die nur auf diesem Bild zu erkennen waren, nicht aber auf Bild 1. Mit Hilfe einer Klarsichtfolie, auf die ein Quadrat mit einem Bereich von 16x16 cm eingezeichnet war, wurde der Bereich mit den meisten zu zählenden Synapsen ausgewählt. Da das Quadrat in der Vergrößerung einer Fläche von  $64 \mu\text{m}^2$  entsprach und die korrespondierenden Bilder einen Abstand von  $0,1 \mu\text{m}$  aufwiesen, konnte das zweidimensionale Quadrat als dreidimensionaler Quader gesehen werden. Der Inhalt betrug also  $6,4 \mu\text{m}^3$ .

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms SPSS und die Berechnung der Signifikanzen mittels ANOVA. Mittelwerte, Standardabweichung sowie Standardfehler wurden bestimmt und ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  verwendet.

### 3.7. Materialien

#### 3.7.1. Material und Geräte

|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| Aluminiumfolie                     | LAGER UKE     |
| Brutschrank, WTC                   | BINDER        |
| Cryogenic Vials                    | NALGENE BRAND |
| Cutfix Surgical Disposable Scalpel | BRAUN         |

|                                 |              |
|---------------------------------|--------------|
| Deckgläser 21x26mm              | MARIENFELD   |
| Durst Laborator 1200            | DURST        |
| Einmalspritzen 1ml              | BRAUN        |
| Einmalkanülen                   | BRAUN        |
| Elektronenmikroskop MC 100      | PHILIPS      |
| EPON 820                        | SERVA        |
| Eukobrom SW Papierentwickler    | TETENAL      |
| Fixierbad Superfix              | TETENAL      |
| Fixierbad-Prüfer                | MERCK        |
| Foliodrape                      | HARTMANN     |
| Handschuhe, Größe L             | HARTMANN     |
| Heidemannspatel                 | AESCU LAP    |
| Kosmetiktücher Samtess          | WEPA         |
| Kühlschrank, 4°C Laborabzug     | BOSCH        |
| Lampe                           | HANAULUX     |
| Lichtmikroskop Axiovert 25      | ZEISS        |
| Negativentwickler KODAK D19     | KODAK        |
| Perfusionspumpe Masterflex®     | COLE PARMER  |
| Photopapier Nr.3, 24x30cm       | TETENAL      |
| Pipetten 2, 20,100, und 1000 µl | EPPENDORF AG |

|                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| Pipettenspitzen                      | EPPENDORF AG  |
| Reaktionsgefäße, verschiedene Größen | EPPENDORF AG  |
| Schüttler-Wasserbad                  | MEMMERT       |
| Semidünnschnittgerät                 | LEICA         |
| Sicherheitswerkbank Klasse 2         | HERAEUS       |
| Stereolupe                           | ZEISS         |
| Tissue Chopper                       | H. SAUER      |
| Ultramikrotom                        | REICHERT JUNG |
| 24 Wellplatte                        | NUNC BRAND    |
| Zellstofftücher                      | WEPA          |

### **3.7.2. Chemikalien**

|                                       |             |
|---------------------------------------|-------------|
| Aqua dest.                            | BAXTER      |
| Bleicitrat nach Reynolds, 1963        | MERCK       |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat | MERCK       |
| DMSO                                  | SIGMA       |
| Estradiol                             | SIGMA       |
| Ethanol 35 %, 50%, 70%, 96%, 100 %    | UKE HAMBURG |
| Flutamid                              | TOCRIS      |
| Glutaraldehyd 2,5%ig                  | MERCK       |
| Glycidether 100                       | SERVA       |

|                                        |          |
|----------------------------------------|----------|
| G15                                    | TOCRIS   |
| HCl 1M                                 | MERCK    |
| Kaliumchlorid                          | MERCK    |
| Kaliumhydrogenphosphat                 | MERCK    |
| Letrozol                               | NOVARTIS |
| NaOH 1M                                | MERCK    |
| Nadic Methylanhydrid (NMA)             | SERVA    |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat   | MERCK    |
| Osmiumtetroxid                         | ROTH     |
| Paraformaldehyd (PFA)                  | MERCK    |
| Propylenoxid                           | SERVA    |
| Pyronin                                | MERCK    |
| Saccharose                             | MERCK    |
| Toluidinblau                           | MERCK    |
| 2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol | SERVA    |
| Uranylacetat 0,1 %                     | MERCK    |
| Xylazin                                | BAYER    |

### 3.7.3 Lösungen

#### **PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):**

- 1 Liter destilliertes Wasser
- 8g Natriumchlorid
- 0,2g Kaliumchlorid
- 1,44g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2g Kaliumhydrogenphosphat
- pH 7,4 unter Raumtemperatur

#### **0,1 molarer Phosphatpuffer (PB):**

Ansatz für ca. 100 ml:

- 10 ml 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat
- 10 ml 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat
- gelöst in bis zu 100 ml dest. Wasser, titriert mit NaOH (1mol/L) und HCl (1mol/L)
- pH 7,4 unter Raumtemperatur

#### **Glutaraldehyd-Lösung (GA) in 0,1 M PB:**

Ansatz für 300 ml:

- 30 ml Natriumdihydrogenphosphat
- 30 ml Dinatriumhydrogenphosphat
- 30 ml Glutaraldehyd 25 %
- zu destilliertem Wasser bis 300ml
- pH 7,4 unter Raumtemperatur

#### **Präparationsmedium für Slicekulturen:**

Ansatz für 100ml:

- 50 ml Minimum Essential Medium(MEM), steril, 2fach konzentriert
- 1ml Glutamin (200mM)
- 49 ml destilliertes Wasser

### **Inkubationsmedium für Slicekulturen:**

Ansatz für 100 ml:

- 25 ml steriles Minimum Essential Medium (MEM), 2-fach konzentriert
- 1 ml Glutamin 200mM
- 580 µl 7,5% Natriumbikarbonat-Lösung
- 19 ml destilliertes Wasser
- 25ml Hanks Balanced Salts (HBSS)
- 25ml steriles, hitzeinaktiviertes Pferdeserum
- 1ml Penicillin-Streptomycin Lösung
- 1250 µl 50 % Glucose

In jedes Well werden 1,0 ml Inkubationsmedium pipettiert. Der pH-Wert des Inkubationsmediums wird vor jedem Mediumwechsel neu eingestellt. Wie für das Präparationsmedium geltend wird sterile 1M NaOH bzw. 1M HCl verwendet. Der pH-Wert unter Raumtemperatur sollte pH=7,25 betragen.

### **Glycidether-Mischung:**

Stammlösung A:

- 77 ml Glycidether 100
- 125 ml 2-Dodecanylsuccinylsäureanhydrid

Stammlösung B:

- 100 ml Glycidether 100
- 89 ml Methyladicanhydrid

Gebrauchslösung:

- 4 Teile Lösung A
- + 6 Teile Lösung B
- + 2 % 2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol

## **4. Ergebnisse**

Die Hypothese des sexuellen Dimorphismus im Hippocampus beschreibt, dass die Synapsenbildung bei der Frau durch Estradiol und beim Mann durch die Androgene Testosteron und DHT induziert wird (Leranth et al. 2003, 2004; Fester et al. 2012; Brandt et al. 2014). Die Hemmung der Aromatase, die den entscheidenden Schritt der Umwandlung von Testosteron zu Estradiol katalysiert, führt bei der Frau durch Abnahme der Estradiolkonzentration zur Abnahme der Synapsendichte (Kretz et al. 2004). Beim Mann ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Hier kommt es zu einer tendenziellen Zunahme der Synapsendichte (Vierk et al. 2012; Brandt et al. 2013), vermutlich über die Anreicherung von Testosteron, welches nicht mehr zu Estradiol umgesetzt werden kann und folglich zu DHT umgewandelt werden könnte (Hayes et al. 2001; Harden und MacLusky 2005).

Die Versuche in dieser Dissertation versuchten einerseits die Ergebnisse der Letrozolbehandlung im männlichen Hippocampus zu verifizieren und untersuchten andererseits die dosisabhängige Wirkung von Estradiol im männlichen Hippocampus. Da Estradiol selbst durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen die Inhibition der Aromatase bewirkt (Fester et al. 2016), könnten Estradioleffekte beim Mann durch die folgende Anreicherung von Androgenen also auch Androgeneffekte beinhalten.

Wir verwendeten zur Untersuchung unserer Hypothese die stereologische Methode der Elektronenmikroskopie. Die Auswertung der Bilder wurde wie oben beschrieben durchgeführt (vgl. 3.6). Exemplarisch dargestellt sind elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Synapsen (siehe Abb. 4.1). In jeder Untersuchungsgruppe konnten intakte Synapsen festgestellt werden. Zur übersichtlichen Auflistung der ausgewerteten Bilder wurden Excel-Tabellen erstellt, die anschließend mit Hilfe des Softwareprogramms SPSS statistisch ausgewertet wurden. Hierzu wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  verwendet, womit jeder p-Wert unter 0,05 einen statistisch signifikanten Unterschied bedeutet. Zur graphischen Darstellung wurden des Weiteren Mittelwerte, Standardabweichung sowie die jeweiligen Standardfehler ermittelt.

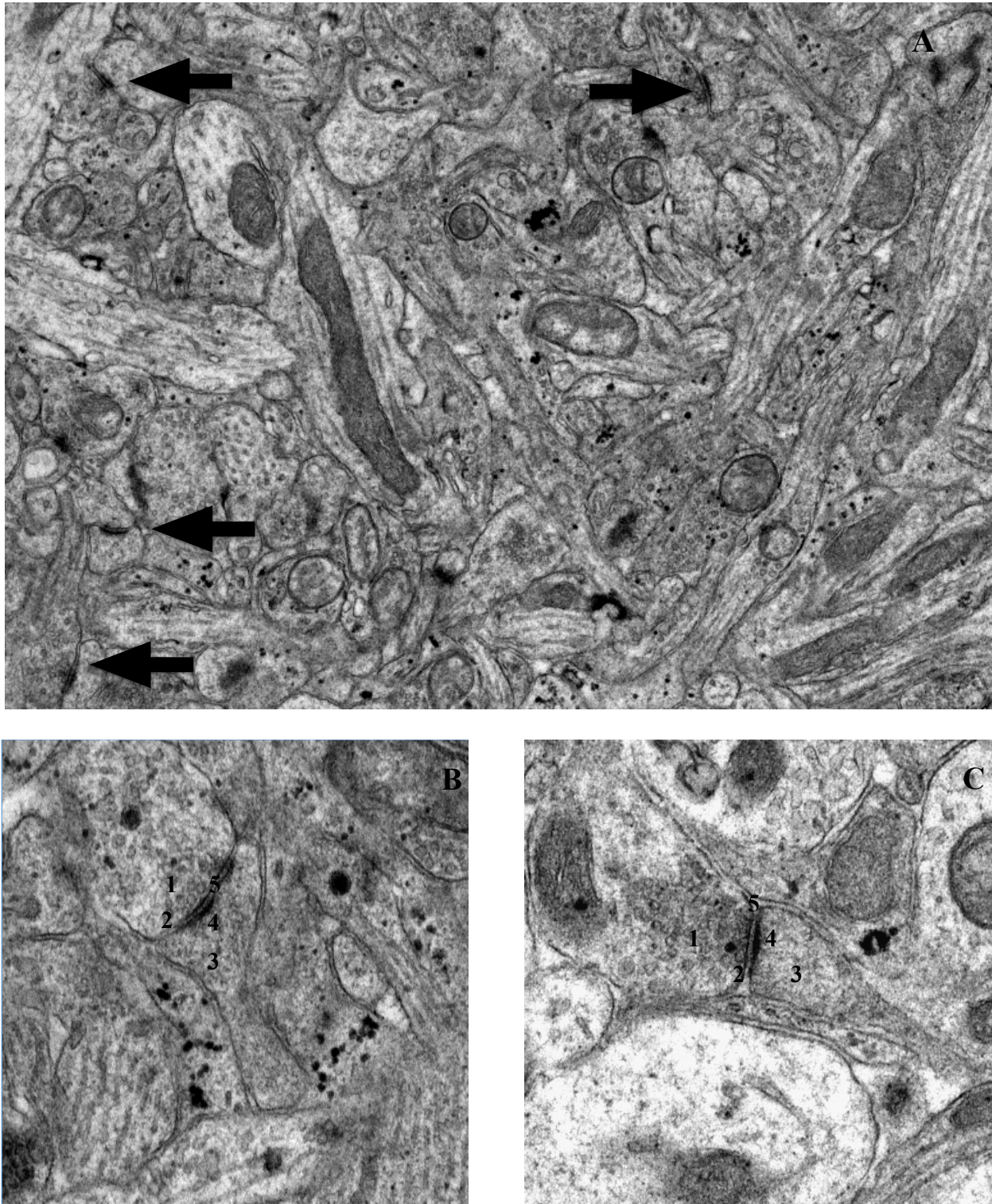


Abb. 4.1.: A) Elektronenmikroskopische Darstellung von hippocampalem Gewebe in der CA1-Region des Hippocampus. Die Pfeile markieren beispielhaft Spine-Synapsen, die in die Zählung aufgenommen wurden. B/C) Vergrößerte Darstellung von Spine-Synapsen im Neuropil: Zu erkennen sind die Präsynapse mit reichlich präsynaptischen Vesikeln (1) sowie die präsynaptische Membran (2), die Postsynapse (3) samt postsynaptischer Membran und Verdichtung (4) sowie der synaptische Spalt (5). Die Synapsen zeigen somit alle Kriterien einer Synapse nach Kahle und Frotscher, 2001.

## 4.1. Inhibierung der Aromatase im männlichen Hippocampus

Die Hemmung der Aromatase an männlichen Versuchstieren führte bei Versuchsreihen in Publikationen aus unserem Institut zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Synapsendichte (Vierk et al. 2012; Brandt et al. 2013). Wir versuchten in unseren ersten Untersuchungen, diesen Effekt als Grundlage für die weitergehenden Versuche ebenfalls darstellen und verifizieren zu können.

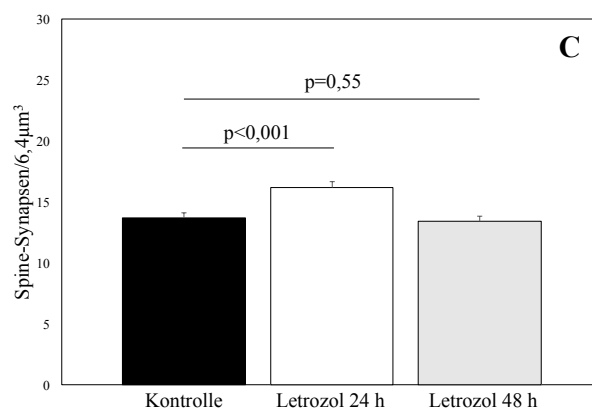
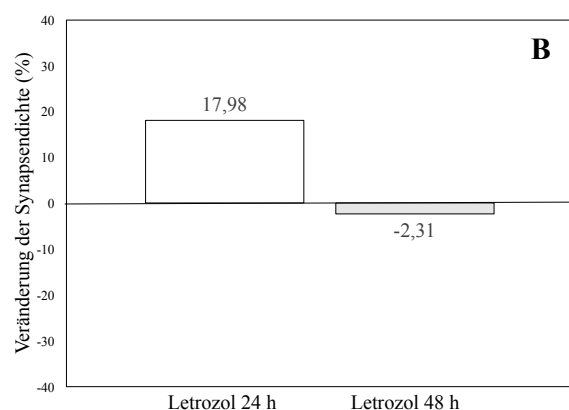
Wir verwendeten hierfür unterschiedliche Methodiken. Die Inhibition der Aromatase wurde pharmakologisch sowie mittels gentechnologisch veränderten Mäusen durchgeführt. Wir verwendeten für die pharmakologische Untersuchung Letrozol, das männlichen Mäusen *in vivo* appliziert wurde und behandelten zudem männliche, hippocampale Slicekulturen mit diesem Inhibitor. Die Genmodifikation wurde durch chromosomale Ausschaltung der Aromatase durchgeführt (siehe 3.3.1) und die sogenannten ArKO-Mäuse wurden auf ihre synaptische Dichte untersucht.

### 4.1.1. *in vivo*-Letrozolbehandlung über 24 und 48 Stunden

Wir begannen unsere Experimente mit dem nicht-steroidalen Inhibitor Letrozol, das männlichen Mäusen gewichtsadaptiert intraperitoneal verabreicht wurde. Während wir die tendenzielle Zunahme der Synapsendichte in anderen Publikationen nach einem Behandlungszeitraum von sieben Tagen bzw. vier Wochen beobachteten (Vierk et al. 2012; Brandt et al. 2013), untersuchten wir in dieser Dissertation die Mäuse über einen kürzeren Zeitraum von 24 bzw. 48 Stunden.

Abbildung 4.2 stellt die Ergebnisse unserer Untersuchung dar. Während in der Tabelle A die absoluten Daten dargestellt werden, zeigt die Graphik B die prozentuale Veränderung der verschiedenen Behandlungsgruppen. Darüber hinaus gibt das Säulendiagramm C die Mittelwerte der Versuchsgruppen wieder und zeigt die statistisch berechneten Unterschiede. In dem hier durchgeführten Experiment ergab sich eine signifikante Erhöhung der Spine-Synapsen nach 24 Stunden ( $p < 0,001$ ). Nach zweitägiger Behandlung konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden ( $p = 0,55$ ).

| <b>A</b>      | Summe aller Synapsen | Mittelwert der Synapsen/ $6,4\mu\text{m}^3$ | Standardabweichung | Standardfehler |
|---------------|----------------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------|
| Kontrolle     | 823                  | 13,72                                       | 3,03               | 0,39           |
| Letrozol 24 h | 971                  | 16,18                                       | 3,45               | 0,44           |
| Letrozol 48 h | 804                  | 13,4                                        | 3,16               | 0,41           |

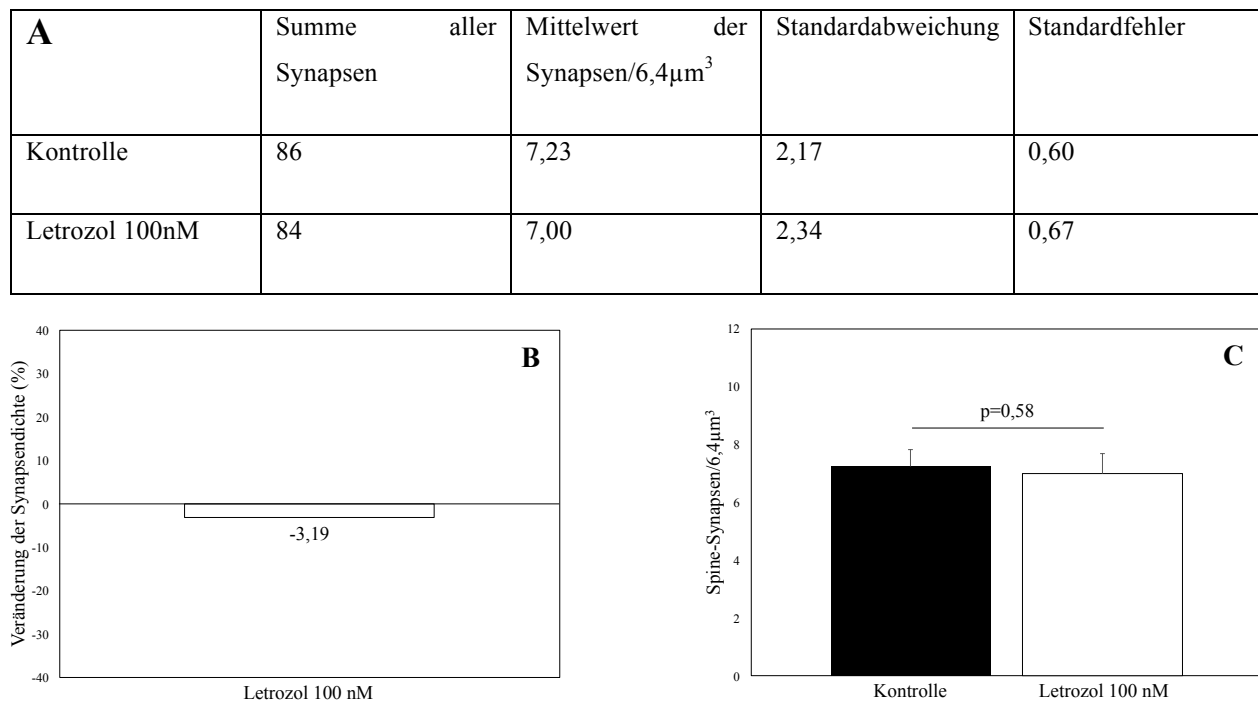


**Abb. 4.2.:** A) Tabellarische Übersicht der berechneten Werte für die intraperitoneale Letrozolbehandlung nach 24 und 48 Stunden. Für den Versuch wurden Hippocampi von 10-12 Wochen alten Mäusen untersucht (n=6; Bilderpaare/Hippocampus: 10). Die berechneten Werte beziehen sich auf jeweils ein Bildpaar, die Summe auf alle gezählten Synapsen in der jeweiligen Versuchsgruppe. B) Graphische Übersicht: Gezeigt ist die prozentuale Veränderung der Spine-Synapsendichte/ $6,4\mu\text{m}^3$  der Letrozol-behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe; die Kontrollgruppe entspricht der Nulllinie. Die Synapsendichte nach 24 h war um ~18% erhöht, nach 48 h zeigte sich eine Reduktion um 2,31%. C) Dargestellt sind die Mittelwerte der gezählten Spine-Synapsendichten/ $6,4\mu\text{m}^3$  (Mittelwerte $\pm$ SEM). Von einem signifikanten Unterschied wird bei  $p \leq 0,05$  ausgegangen. Auf der Graphik ist eine signifikante Erhöhung der Synapsendichte nach 24-stündiger Letrozolbehandlung zu erkennen ( $p < 0,001$ ), jedoch nicht nach 48 Stunden ( $p = 0,55$ ).

#### 4.1.2. Letrozolbehandlung der männlichen, hippocampalen Slicekultur

Wir führten im Anschluss die Letrozolbehandlung in der männlichen Schnittkultur durch. Da wir im *in vivo*-Versuch also nach eintägiger Gabe eine Erhöhung der Spine-Synapsendichte durch Letrozolbehandlung feststellen konnten, versuchten wir diesen Effekt nun in der Zellkultur nachweisen zu können. Untersucht wurden hierfür hippocampale Slicekulturen von männlichen, fünf Tage alten, postnatalen Ratten, die über vier Tage vorkultiviert und daraufhin über sieben Tage mit Letrozol in der Dosis von 100 nM behandelt wurden.

Die Graphik 4.3 stellt die Ergebnisse der Zählung der Spine-Synapsen dieser beiden Gruppen dar: Nach einwöchiger Letrozolbehandlung zeigte sich eine kaum veränderte Synapsendichte (-3,19 Prozent). Die statistische Analyse mittels T-Test ergab einen p-Wert von  $p=0,58$  und stellt somit einen nicht signifikanten Unterschied dar.



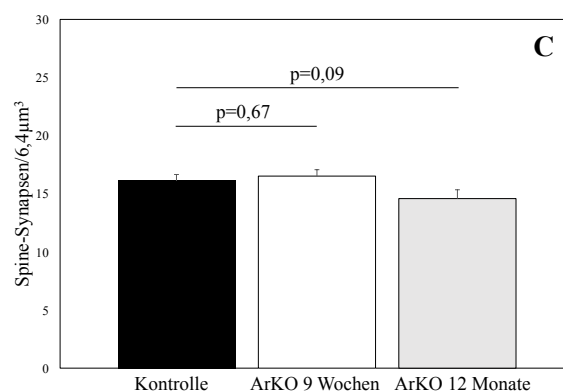
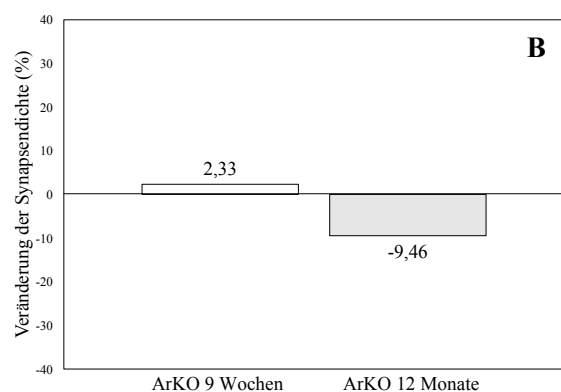
**Abb. 4.3.: A) Tabellarische Übersicht der Werte für die Letrozolbehandlung in der hippocampalen Slicekultur. Gezählt wurden alle Synapsen im Referenzbereich von  $6,4\mu\text{m}^3$ . Aus den gezählten Synapsen wurden Mittelwerte, Standardabweichung sowie Standardfehler berechnet ( $n=3$ , Bilderpaare/Slice: 4). B) Prozentuale Darstellung der Veränderung der Synapsendichte. Die Nulllinie entspricht dem Wert für die Kontrollgruppe. Erkennbar ist eine geringfügige Abnahme der Synapsendichte um 3,19%. C) Graphische Ansicht der Mittelwerte/ $6,4\mu\text{m}^3$  ( $n=3$ ; Mittelwerte  $\pm$ SEM). Bei einem Signifikanzniveau von  $p\leq 0,05$  und einem berechneten p-Wert von  $p=0,58$  ist von keinem signifikanten Unterschied auszugehen.**

#### **4.1.2. Spine-Synapsendichte in der männlichen ArKO-Maus**

Zur weiteren Untersuchung und Verifizierung unserer These untersuchten wir daraufhin Aromatase-Knockout-Mäuse, also Mäuse, bei denen die Funktion der Aromatase gentechnologisch ausgeschaltet wurde (Aromatase-Knockout=ArKO). Während die Letrozolgabe eine vorübergehende Inhibition der Aromatase nach sich zieht, führt die genetische Ausschaltung der Aromatase durchgängig zu keiner Produktion von Estradiol. Bei Letrozol bleibt zudem als kompetitiver Hemmstoff eine Restaktivität der Aromatase bestehen. Die ArKO-Maus produziert hingegen kein funktionierendes Enzym, sodass hier kein Testosteron zu Estradiol umgesetzt werden kann. Wir überlegten, dass es durch diesen Mechanismus dauerhaft zur Akkumulation von Testosteron kommen könnte (Fisher et al. 1998).

Für unsere Versuchsreihe verwendeten wir die Hippocampi von 9 Wochen und 12 Monate alten ArKO-Mäusen und verglichen die Spine-Synapsendichten mit der von 9 Wochen alten Wildtyp-Mäusen (WT, Kontrolle). Erstaunlicherweise konnten wir in diesem Modell keine Erhöhung der Synapsendichte feststellen. Im Vergleich der Behandlungsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, weder in der Gegenüberstellung mit den 9 Wochen alten ArKO-Mäusen ( $p=0,67$ ) noch mit den 12 Monate alten Mäusen ( $p=0,09$ ) (vgl. Abb. 4.4 C).

|                | Summe aller Synapsen | Mittelwert der Synapsen/ $6,4\mu\text{m}^3$ | Standardabweichung | Standardfehler |
|----------------|----------------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------|
| Kontrolle      | 645                  | 16,13                                       | 3,48               | 0,55           |
| ArKO 9 Wochen  | 660                  | 16,5                                        | 3,63               | 0,57           |
| ArKO 12 Monate | 584                  | 14,6                                        | 4,67               | 0,74           |



**Abb. 4.4.: A) Tabellarische Darstellung der Spine-Synapsendichte in der männlichen ArKO-Maus (9 Wochen und 12 Monate). Pro Hippocampus wurden 10 Bilderpaare untersucht (n=4). B) Gezeigt ist die prozentuale Angabe der Spine-Synapsendichte/ $6,4\mu\text{m}^3$  der ArKO-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe; die Kontrollgruppe entspricht der Nulllinie. Es zeigt sich eine geringfügige Zunahme der Synapsendichte um 2,33% bei den 9 Wochen alten ArKO-Mäusen und eine tendenzielle Abnahme der Synapsendichte um 9,46% bei den 12 Monate alten ArKO-Mäusen. C) Graphische Darstellung der absoluten Synapsendichte/ $6,4\mu\text{m}^3$  (Mittelwerte  $\pm$ SEM). Auf der Abbildung ist zu erkennen, dass die genetische Ausschaltung der Aromatase zu keinem signifikanten Unterschied der Spine-Synapsendichten führt (9 Wochen: p=0,67; 12 Monate: p=0,09).**

## **4.2. Estradiolbehandlung der männlichen Slicekultur**

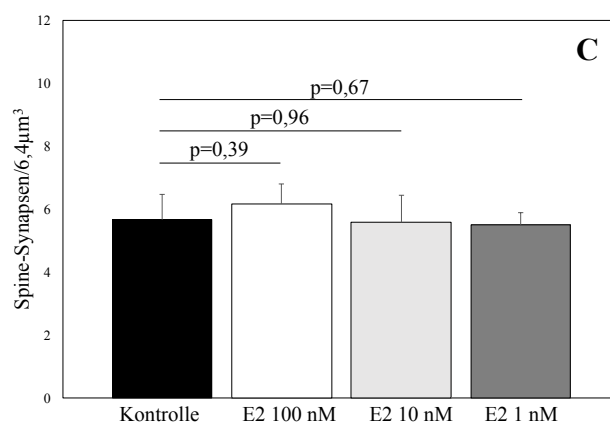
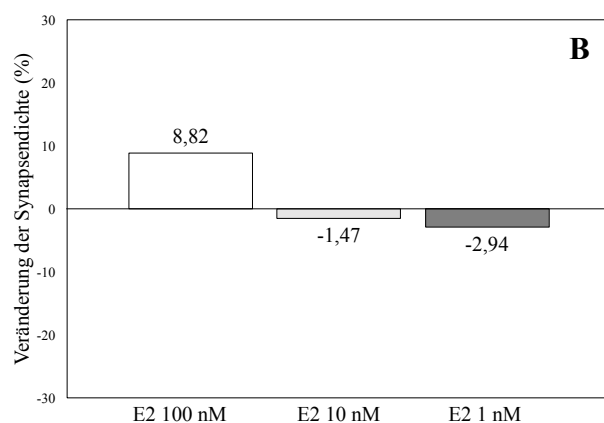
### **4.2.1. Dosisabhängige Spine-Synapsendichte bei Estradiolbehandlung 100 bis 1 nM**

Wir führten daraufhin die Experimente zur Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung von Estradiol durch. Estradiol wurde in den Konzentrationen von 100 bis 1 nM an männlichen, hippocampalen Schnittkulturen untersucht. Die hippocampale Synapsendichte im männlichen Hippocampus wird wahrscheinlich über Androgene reguliert (Leranth et al. 2003) und Estradiol selbst führt zu einer Hemmung der Aromatase (Kretz et al. 2004; Fester et al. 2016). Wir konnten weitergehend verifizieren, dass die Hemmung der Aromatase beim männlichen Tier zur Erhöhung der Synapsendichte führt, sodass wir die Hypothese aufstellten, dass Estradiol einen ähnlichen Effekt wie die Aromataseinhibition durch Letrozol zeigen könnte.

Wir verwendeten zur Untersuchung unserer These hippocampale Slicekulturen und verglichen hierbei, entsprechend den ersten Versuchen, elektronenmikroskopische Schnitte der CA1-Region des Hippocampus. Wie bei der Behandlung mit Letrozol, das hippocampalen Schnittkulturen appliziert wurde, wurden die hier benutzten Slicekulturen von postnatalen Ratten verwendet. Diese wurden, wie beschrieben, nach einer Vorkultur über 4 Tage für insgesamt 7 Tage mit Estradiol in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt.

In der statistischen Auswertung zeigten sich zunächst keine signifikanten Unterschiede durch die Estradiolbehandlung, jedoch eine tendenzielle Erhöhung durch Estradiol 100 nM. In dieser Konzentration ergab der t-Test einen p-Wert von  $p=0,39$ , in der Konzentration von 10 nM einen p-Wert von  $p=0,96$  und bei 1 nM einen p-Wert von  $p=0,67$  (vgl Abb. 4.5 C).

| <b>A</b>         | Summe aller Synapsen | Mittelwert der Synapsen/ $6,4\mu\text{m}^3$ | Standardabweichung | Standardfehler |
|------------------|----------------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------|
| Kontrolle        | 68                   | 5,66                                        | 2,74               | 0,79           |
| Estradiol 100 nM | 74                   | 6,17                                        | 2,21               | 0,63           |
| Estradiol 10 nM  | 67                   | 5,58                                        | 2,94               | 0,84           |
| Estradiol 1 nM   | 66                   | 5,50                                        | 1,38               | 0,39           |



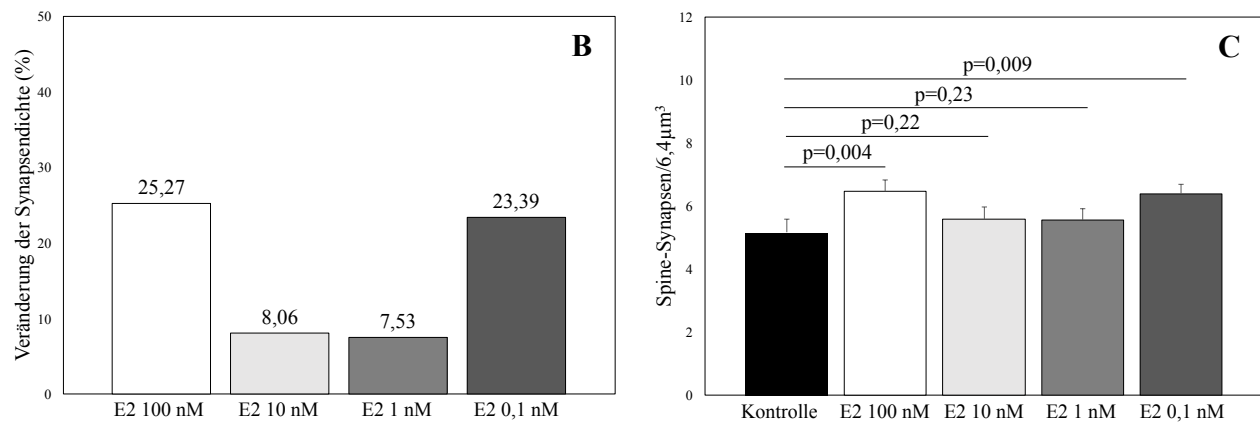
**Abb. 4.5.:** A) Tabellarische Übersicht der berechneten Werte für die dosisabhängige Estradiolbehandlung in der männlichen Slicekultur (n=3; Bildpaare: 4). B) Darstellung der prozentualen Veränderung der Spine-Synapsendichte/ $6,4\mu\text{m}^3$  (E2=Estradiol). Es zeigt sich eine Erhöhung der Synapsendichte bei Applikation von Estradiol in der Dosis von 100 nM um 8,82 %, die synaptische Dichte bei 10 nM und 1 nM blieb auf ungefähr gleichem Niveau (10 nM: -1,47%; 1nM: -2,94%). C) Graphik der absoluten, berechneten Mittelwerte ( $\pm$ SEM). Die Veränderung der Synapsendichte bei Estradiolbehandlung ist nicht signifikant, in der Tendenz kommt es jedoch zur Zunahme bei Applikation von Estradiol in der Dosis von 100 nM.

#### **4.2.2. Konsolidierung der Ergebnisse für die Estradiolbehandlung im männlichen Hippocampus**

Um sicherzustellen, dass Estradiol keinen signifikant positiven Effekt auf die Synapsendichte im männlichen Hippocampus hat, wiederholten wir die zuvor durchgeführte Versuchsreihe. Diese erweiterten wir außerdem um eine weitere Untersuchungsgruppe, bei der die Estradiolwirkung in der Konzentration von 0,1 nM untersucht wurde. Wie beschrieben, haben wir bei der Estradiolbehandlung 100 nM in der ersten Versuchsreihe eine tendenzielle Zunahme der Synapsendichte beobachten können. Um diese näher zu untersuchen, erhöhten wir hierfür also die Anzahl der Schnittkulturen. Wir führten die Untersuchung des Estradioleffekts insgesamt zwei weitere Male durch (jeweils  $n=3$ ).

Die zusammenfassenden Ergebnisse aller drei Versuchsreihen stellt die Abb. 4.6 dar. Erstaunlicherweise zeigten sich nun im Gegensatz zu unseren ersten Resultaten erhöhte Synapsendichten in allen verwendeten Konzentrationen. Die tendenzielle Zunahme aus dem ersten Versuch bei 100 nM zeigte sich sogar als signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ( $p=0,004$ ). Auch bei der zusätzlich erhobenen Gruppe, die mit Estradiol in der Dosis von 0,1 nM behandelt wurde, nahm die Synapsenzahl signifikant um 23,39% zu ( $p=0,009$ ). In den Konzentrationen 10 und 1 nM konnten wir ebenfalls eine Erhöhung der Synapsendichte feststellen, diese Effekte verfehlten jedoch das Signifikanzniveau (10 nM:  $p=0,22$ ; 1nM:  $p=0,23$ ).

| <b>A</b>               | Summe aller Synapsen | Mittelwert der Synapsen/ $6,4\mu\text{m}^3$ | Standardabweichung | Standardfehler |
|------------------------|----------------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------|
| Kontrolle (n=9)        | 186                  | 5,16                                        | 2,37               | 0,42           |
| Estradiol 100 nM (n=9) | 233                  | 6,47                                        | 1,99               | 0,35           |
| Estradiol 10 nM (n=9)  | 201                  | 5,58                                        | 2,18               | 0,39           |
| Estradiol 1 nM (n=9)   | 200                  | 5,55                                        | 2,06               | 0,36           |
| Estradiol 0,1 nM (n=6) | 153                  | 6,38                                        | 1,79               | 0,32           |



**Abb. 4.6.:** A) Tabellarische Übersicht der Zusammenfassung der Estradiolbehandlung der männlichen, hippocampalen Slicekultur. Da die Untersuchung der Dosis 0,1 nM erst in der zweiten Versuchsreihe untersucht wurde, ergibt sich hier absolut gesehen eine geringere Synapsenanzahl. Pro Slice wurden 4 Bildpaare untersucht. B) Gezeigt ist die prozentuale Veränderung der Spine-Synapsendichte/ $6,4\mu\text{m}^3$  der Estradiol-behandelten Schnittkulturen; die Kontrollgruppe entspricht der Nulllinie. Alle untersuchten Gruppen führten zur Zunahme der Synapsendichte. C) Die dargestellte Graphik zeigt die berechneten p-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Säulen des Diagramms geben die jeweiligen Mittelwerte ( $\pm$ SEM) der Untersuchungsgruppen an. Der Unterschied der Behandlungsgruppen Estradiol 100 nM sowie 0,1 nM zur unbehandelten Kontrollgruppe war signifikant erhöht (100 nM: p=0,004; 0,1 nM: p=0,009), bei den untersuchten Versuchsreihen 10 nM und 1 nM stellten wir keine Signifikanzen fest (10 nM: p=0,22; 1 nM: p=0,23).

### **4.3. Aufhebung des Estradioleffekts durch Androgenrezeptorblockade**

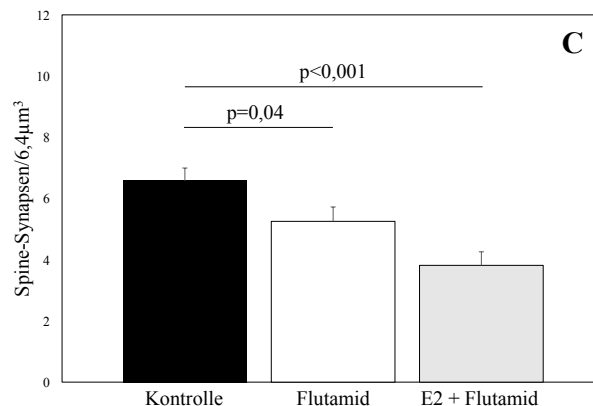
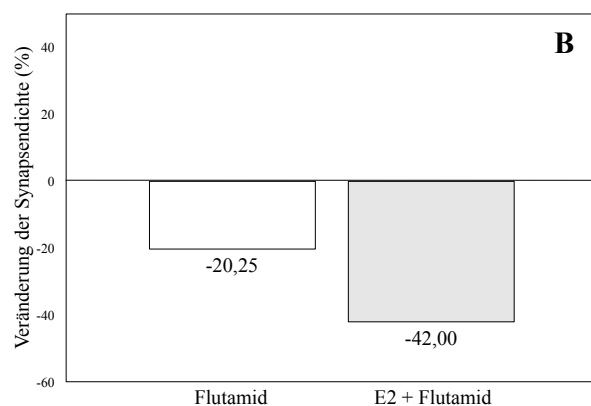
Da wir zeigen konnten, dass Estradiol die Synapsendichte im männlichen Hippocampus erhöht, untersuchten wir daraufhin, ob der Estradioleffekt auch nach Inhibition des Androgenrezeptors zu beobachten ist, oder durch diese Hemmung aufgehoben wird. Als Kontrolle untersuchten wir den Effekt der reinen Androgenrezeptorblockade.

#### **4.3.1. Hemmung des Androgenrezeptors unter Estradiolbehandlung**

Um den Androgenrezeptor zu inhibieren, nutzten wir den Androgenrezeptorblocker Flutamid. Flutamid ist ein Zytostatikum in der Therapie des Prostatakarzinoms und wird in fortgeschrittenen, palliativen Stadien eingesetzt. Durch die Bindung an den Androgenrezeptor können DHT und Testosteron nicht ihre androgene Wirkung entfalten. Zur Untersuchung unserer These führten wir einerseits eine Behandlung mit Flutamid sowie andererseits eine Behandlung mit der Kombination aus Flutamid und Estradiol durch.

Passend zur These, dass Androgene für den männlichen Hippocampus essentiell sind (Leranth et al. 2003; Brandt et al. 2013), konnten wir nach reiner Flutamidbehandlung eine signifikante Reduktion der Synapsendichte beobachten (vgl. Abb 4.7 C). Die gleichzeitige Behandlung mit Estradiol und Flutamid führte ebenfalls zur Abnahme der Synapsendichte. Dieser Synapsenverlust war sogar stärker ausgeprägt als die alleinige Kultivierung mit Flutamid und reduzierte die durchschnittliche Synapsenzahl um mehr als 40 Prozent (vgl. Abb 4.7 B). Der Estradioleffekt, der, wie in den vorherigen Versuchsreihen gezeigt, zu einer Erhöhung der Synapsendichte führte, wurde durch die gleichzeitige Gabe eines Androgenrezeptorblockers aufgehoben.

| <b>A</b>             | Summe aller Synapsen | Mittelwert der Synapsen/ $6,4\mu\text{m}^3$ | Standardabweichung | Standardfehler |
|----------------------|----------------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------|
| Kontrolle            | 79                   | 6,58                                        | 1,38               | 0,40           |
| Flutamid             | 63                   | 5,25                                        | 1,60               | 0,46           |
| Estradiol + Flutamid | 42                   | 3,82                                        | 1,54               | 0,44           |



**Abb. 4.7.:** A) Tabellarische Übersicht der Werte für die Behandlung mit dem Androgenrezeptor-Inhibitor Flutamid sowie Flutamid und Estradiol in der hippocampalen, männlichen Schnittkultur (n=3). Die Behandlung wurde jeweils in der Dosis von 100 nM durchgeführt. Pro Slice wurden 4 Bildpaare untersucht. B) Gezeigt ist die prozentuale Veränderung der Spine-Synapsendichte/ $6,4\mu\text{m}^3$ ; die Kontrollgruppe entspricht der Nulllinie. Die beiden untersuchten Gruppen führten zur signifikanten Reduktion der Synapsendichte (Flutamid: -20,25%; Estradiol + Flutamid: -42 %). C) Die dargestellte Graphik zeigt die berechneten p-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Säulen des Diagramms geben die jeweiligen Mittelwerte ( $\pm$ SEM) der Untersuchungsgruppen an. Der Unterschied der Spine-Synapsendichte der Flutamid-behandelten Hippocampi war signifikant reduziert (p=0,004), ebenfalls signifikant reduziert war die kombinierte Behandlung mit Estradiol und Flutamid (p<0,001).

## **5. Diskussion**

Synapsen im Allgemeinen gelten als Korrelate für die Kommunikation zwischen den Neuronen und nehmen im Hippocampus an stetigen Umbauprozessen teil (Segal 2005). Die CA1-Region des Hippocampus, die in dieser Dissertation untersucht wurde, ist diesen Vorgängen besonders ausgesetzt. Die Wirkungen von Sexualsteroiden wie Estradiol und Dihydrotestosteron (DHT) sind dabei essentiell für die synaptische Stabilität und Plastizität im Hippocampus (Gould et al. 1990; Woolley und McEwen 1992; MacLusky et al. 2006).

Wie bereits beschrieben, besteht im Hippocampus bezüglich dieser synaptischen Umbauprozesse ein sexueller Dimorphismus. Estradiol ist für den weiblichen, Androgene wie Testosteron und DHT sind für den männlichen Hippocampus und dessen synaptische Integrität wichtig (Leranth et al. 2003, 2004; Kretz et al. 2004; Brandt et al. 2013). Im Steroidhormonstoffwechsel ist Testosteron dabei das Substrat für die Biosynthese von Estradiol und DHT. Über die Aromatase gelingt die Umwandlung zu Estradiol, die 5 $\alpha$ -Reduktase setzt Testosteron zu DHT um (Azcoitia et al. 2001).

Als im Gehirn vorkommendes Enzym kann die Aromatase auch im Hippocampus nachgewiesen werden, wo sie wichtig für lokal produziertes Estradiol ist (Garcia-Segura et al. 1999, 2001; Prange-Kiel et al. 2003; Shibuya et al. 2003; Hojo et al. 2004). Auch die Produktion von DHT ist im Hippocampus möglich und kann in suffizienten Konzentrationen zur Modulierung der synaptischen Plastizität nachgewiesen werden (Pelletier et al. 1994; Kimoto et al. 2001; Hojo et al. 2004, 2011).

Wir untersuchten in dieser Dissertation neben der Aromataseinhibition durch Letrozol die dosisabhängige Wirkung von Estradiol in der männlichen, hippocampalen Schnittkultur.

### **5.1. Letrozol erhöht im männlichen Hippocampus die Synapsendichte**

Letrozol als nicht-steroidaler Hemmstoff der Aromatase führt zu einer geringeren Produktion von Estradiol, was die entscheidende Wirkung in der Anwendung als Zytostatikum bei der Therapie des hormonabhängigen Mammakarzinoms darstellt. Ein Nebeneffekt hierbei ist jedoch auch die Akkumulation mit dem Androgen Testosteron. Die Anreicherung mit Androgenen durch die Hemmung der Estradiolproduktion ist vielfach beschrieben worden. Zum Beispiel stellten Fisher

*et al.* fest, dass der Knockout der Aromatase zu erhöhten Testosteronspiegeln im Serum der Maus führte (Fisher *et al.* 1998). Hayes *et al.* konnten den gleichen Effekt an gesunden Männern beobachten, die mit den Letrozol-verwandten Aromatasehemmern Ketoconazol und Anastrozol behandelt wurden (Hayes *et al.* 2001). Weitere Publikationen wie Leder *et al.* beschreiben, dass bei älteren Männern mit mildem Hypogonadismus ebenfalls eine Erhöhung der Testosteronwerte nach Aromataseinhibition durch Anastrozol festzustellen war (Leder *et al.* 2004). Auch das in dieser Dissertation verwendete Letrozol führt zu einer Testosteronakkumulation, was durch die Forschungsgruppe um Harden und MacLusky gezeigt werden konnte. Diese Forschungsgruppe zeigte einerseits, dass die Letrozolbehandlung zu signifikant erhöhten Testosteronwerten bei männlichen Epilepsiepatienten führte und dadurch andererseits auch eine verlängerte anfallsfreie Zeit beobachtet werden konnte (Harden und MacLusky 2005).

Mit unseren in dieser Dissertation gezeigten Ergebnissen der Letrozolbehandlung über 24 bzw. 48 Stunden sowie durch die Untersuchung der Letrozolapplikation der hippocampalen Schnittkultur, können wir bereits publizierte Letrozoleffekte im männlichen Hippocampus verifizieren. In diesen Publikationen war darauf hingewiesen worden, dass die Testosteronanreicherung für die erhöhten Synapsendichten wichtig sein könnte. Vierk *et al.* beschreiben zum Beispiel den Effekt der gesteigerten Synapsendichte im Hippocampus der männlichen Maus nach siebentägiger Letrozolbehandlung. In der weiblichen Maus zeigte sich hier dagegen eine signifikante Reduktion (Vierk *et al.* 2012). Fester *et al.* stellten nach vierwöchiger, intraperitonealer Letrozolbehandlung ebenfalls eine erhöhte Synapsendichte fest. Hier zeigten sich neben den Geschlechtsunterschieden im Sinne des sexuellen Dimorphismus auch divergierende Ergebnisse in Bezug auf *in vivo* und *in vitro* Beobachtungen (Fester *et al.* 2012). Brandt *et al.* konnten im männlichen Hippocampus ebenfalls Ergebnisse veröffentlichen, die eine erhöhte Synapsendichte durch Letrozol darstellen (Brandt *et al.* 2013, 2014). In all diesen beschriebenen Publikationen war der Anstieg der Synapsendichte jedoch statistisch nicht signifikant und nur tendenziell zu beobachten. In einer Dissertation unseres Institutes konnten wir diesen Effekt dagegen als signifikanten Anstieg beschreiben. Hier war Letrozol männlichen Mäusen über 21 Tage intraperitoneal verabreicht worden. Die gleiche Behandlung von weiblichen Mäusen führte dagegen zu einem signifikanten Abfall der Synapsendichte (von Blittersdorff 2011).

In dieser Dissertation zeigen wir nun, dass die Letrozolbehandlung über 24 Stunden ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Synapsendichte führt. Nach 48-stündiger Behandlung der männlichen Maus und auch in der hippocampalen Slicekultur war dieser Effekt jedoch nicht zu sehen und die Synapsendichte blieb auf ungefähr gleichem Niveau (vgl. Abb. 4.2, Abb. 4.3). Auch bei unseren für diese Dissertation untersuchten männlichen ArKO-Mäusen konnten wir erstaunlicherweise beobachten, dass sich die Synapsendichte kaum veränderte (vgl. Abb. 4.4). Hierfür könnten gegenregulatorische Mechanismen oder eine unzureichende Aktivität der 5 $\alpha$ -Reduktase ursächlich sein, da in diesem Fall nicht genügend Testosteron zu dem potenteren DHT umgewandelt werden würde.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen im weiblichen Hippocampus, an dem eine Aromataseinhibition oder der Aromatase-Knockout zu einer signifikanten Abnahme der Synapsendichte führte (Kretz et al. 2004; Fester et al. 2012), stellten wir jedoch in keinem hier durchgeführten Versuch eine signifikante Reduktion fest. Passend zu der Hypothese des sexuellen Dimorphismus im Hippocampus (Brandt et al. 2013), unterstützen unsere Ergebnisse daher auch die Aussage, dass die synaptische Stabilität und Plastizität bei beiden Geschlechtern unterschiedlich vermittelt werden.

Im Hippocampus von weiblichen Ratten führt die Aromataseinhibition ebenfalls zu einer gesteigerten Konzentration von Testosteron (Morishima et al. 1995; Fisher et al. 1998). Da das Estradiol jedoch entscheidend die Synapsenbildung und die synaptische Stabilität beeinflusst, ist die geringere Estradiolproduktion ausschlaggebend für die Reduktion der Synapsendichte (Fester et al. 2006, 2012; Zhou et al. 2010). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Hemmung der Aromatase nicht nur zu einer reduzierten Synapsendichte führte, sondern von diesem Effekt auch Spines, synaptische Proteine wie Spinophilin oder Synaptopodin und die LTP als elektrophysiologisches Korrelat für die Synapsenbildung signifikant betroffen waren (Prange-Kiel et al. 2006; Vierk et al. 2012; Fester et al. 2013). Bei der ArKO-Maus zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Synapsendichte. Dieser Effekt war spezifisch für den Hippocampus und konnte in anderen Hirnarealen wie dem Kortex und dem Zerebellum nicht beobachtet werden (Zhou et al. 2014). Wir und andere Forschungsgruppen konnten kürzlich in klinischen Studien zeigen, dass Frauen, die gesund oder an Brustkrebs erkrankt eine Hormontherapie mit Aromataseinhibitoren erhielten, eine reduzierte kognitive Performance in Bezug auf das Hippocampus-abhängige

Gedächtnis aufwiesen (Jenkins et al. 2006; Collins et al. 2009; Hedayati et al. 2012; Bayer et al. 2015).

Untersuchungen am männlichen Hippocampus weisen dagegen darauf hin, dass Testosteron und das stärker wirksame DHT für die synaptische Plastizität im Hippocampus wichtig sind. So zeigten sich zwar bei männlichen und weiblichen Ratten eine reduzierte Synapsendichte nach Gonadektomie, der Effekt wird aber bei männlichen Ratten durch DHT, und nicht durch Estradiol, wieder aufgehoben (Leranth et al. 2003, 2004). Li *et al.* beobachteten nach Orchidektomie zudem eine Reduktion von postsynaptischen Proteinen wie dem PSD-95. Dieses Resultat wird ebenfalls durch Testosterongabe wieder rückgängig gemacht (Li et al. 2012). Hohe Androgenspiegel erhöhen außerdem innerhalb von kurzer Zeit die Spine-Dichten im Hippocampus. Durch Blockade des Androgenrezeptors ist dieser Effekt nicht mehr zu sehen (Hatanaka et al. 2009, 2015; Jacome et al. 2016). Unpublizierte Daten aus unserem Institut bestätigen diese Beobachtungen und zeigen nach DHT-Applikation eine erhöhte Synapsendichte und eine Reduktion nach Gabe des 5 $\alpha$ -Reduktase-Hemmers Finasterid (Fester und Rune 2015). All diese unterschiedlichen, beschriebenen Effekte weisen auf eine verschiedene Hormon- und Rezeptorvermittlung im Hippocampus von Mann und Frau hin.

In dieser Dissertation demonstrieren und verifizieren wir nun, dass die Aromataseinhibition beim Mann nicht zu einer reduzierten Synapsendichte wie im weiblichen Hippocampus führt, sondern eine Erhöhung der Synapsendichten zu beobachten ist. Dieser Effekt könnte in der Akkumulation von Testosteron und in der Konversion zu DHT begründet liegen.

Wir führten im Anschluss die Estradiolbehandlung der männlichen, hippocampalen Schnitkultur durch, da auch für Estradiol gezeigt werden konnte, dass Estradiol die Aromatase durch Phosphorylierungsprozesse hemmt.

## **5.2. Synapsenbildung durch Estradiol in der männlichen Schnitkultur**

Die Estradiolproduktion im Hippocampus wird über vielfältige Mechanismen reguliert. Die Aromatase stellt hierbei den wichtigsten Angriffspunkt in der Regulation der Estradiolsynthese dar. So führt eine erhöhte Substratverfügbarkeit, zum Beispiel durch Cholesterol als Ausgangsstoff der Sexualsteroidsynthese und/oder durch Testosteron als unmittelbares Substrat der Aromatase,

zu einer höheren Produktion von Estradiol. Letrozol als Inhibitor der Aromatase hebt die genannten Effekte wieder auf (Fester et al. 2009; Fester et al. 2011). Ein anderes Stimulanz für die Estradiolsynthese ist GnRH, das ebenfalls über die Aromatase zu einer verstärkten Estradiolsynthese führt (Prange-Kiel et al. 2008, 2013).

In der Regulation der Aromatase können hierbei unterschiedliche Mechanismen zu einer Aktivitätsänderung führen. Während die Aromatase einerseits über langsame, genomische Effekte in ihrer Transkription und Proteinbiosynthese, also in ihrer Expression beeinflusst werden kann, können andererseits Phosphorylierungsprozesse schnell die Aktivität der Aromatase verändern (Roselli et al. 1987; Harada et al. 1993; Bourguiba et al. 2003; Zhao et al. 2008; Charlier et al. 2013). Die Forschungsergebnisse von Balthazart *et al.* nehmen im Zusammenhang mit den schnellen Regulationsvorgängen der Aromatase einen wichtigen Stellenwert zur Diskussion der Ergebnisse dieser Dissertation ein.

Diese Forschungsgruppe stellte heraus, dass  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  sowie ATP zu einer Aktivitätsabnahme der Aromatase im medialen präoptischen Nucleus des Hypothalamus führten. Durch  $\text{K}^{+}$ -induzierte Depolarisierung der Zellmembran und durch Stimulation von Glutamatrezeptoren konnte ebenfalls eine Reduktion der Aromataseaktivität beobachtet werden. Kinaseinhibitoren sowie die Entleerung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern mittels Thapsigargin konnten diese Effekte wieder aufheben und umkehren (Balthazart et al. 2001). Zwei Jahre später zeigte die gleiche Forschungsgruppe, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen wie die Proteinkinase C, die Calmodulinkinase und auch die Proteinkinase A zu einer Phosphorylierung der Aromatase führten. Die Phosphorylierung fand an bestimmten Aminosäuren der Aromatase, am Threonin 455 und 486 sowie am Serin 118, statt und ging mit einer Aktivitätsabnahme der Aromatase einher (Balthazart et al. 2003).

Balthazart *et al.* schlussfolgerten daraus, dass es über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Release zu einer Aktivierung von Proteinkinasen kommt, die dann durch Phosphorylierung zu einer Aktivitätsabnahme der Aromatase führen. Durch weitere Experimente konnten sie zeigen, dass auch Calmodulin in der Regulierung der Aromatase eine wichtige Rolle spielt, indem es aktiv an die Aromatase binden kann und hierdurch eine verminderte Aromataseaktivität bewirkt (Balthazart et al. 2005). Im Geschlechtervergleich konnten die gleichen Effekte im männlichen wie auch im weiblichen Hypothalamus beobachtet werden (Konkle und Balthazart 2011). Sie stellten zudem die Hypothese auf, dass es sich bei diesem Mechanismus zur Regulation der Aromatase um einen

generellen Mechanismus handeln könnte. Wie sie weiterhin beschreiben, könnte auch in anderem Gewebe, in dem die Aromatase stark exprimiert wird, und in anderen Spezies diese Aromataseregulation Gültigkeit haben (Balthazart et al. 2006; Charlier et al. 2011, 2013).

Im Hippocampus könnten daher ähnliche Phosphorylierungsprozesse die Aromatase regulieren. Diese Annahme konnten wir in kürzlich publizierten Versuchsreihen zeigen. Ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen Ergebnissen von Balthazart *et al.* führte die Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher mittels Thapsigargin zu einer verminderten Phosphorylierung der Aromatase und einer erhöhten Produktion von Estradiol. Im Gegensatz hierzu führte Letrozol zu einer verstärkten Phosphorylierung und einer geringeren Estradiolproduktion (Fester et al. 2016).

Von besonderer Bedeutung in Bezug auf die Ergebnisse, die wir in dieser Dissertation zeigen, ist, dass Estradiol in der genannten Publikation selbst eine Phosphorylierung und Aktivitätsabnahme der Aromatase induzierte. In verschiedenen Veröffentlichungen konnte zudem gezeigt werden, dass Estradiol über L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt und hierdurch die Öffnung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher über SERCA-Kanäle bewirkt wird (Wu et al. 2005; Zhao et al. 2005; Zhao und Brinton 2007; Sarkar et al. 2008). Diese Ergebnisse weisen zusammenfassend darauf hin, dass Estradiol im Hippocampus im Sinne eines autokrinen Mechanismus die eigene Produktion regulieren kann. Hierbei sind vermutlich Phosphorylierungsprozesse wichtig, die über  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Release initiiert werden (Meethal et al. 2009; Fester et al. 2016). Wie wir bereits 2004 feststellen konnten, führt Estradiol zu keiner erhöhten Synapsendichte in der weiblichen Schnitkultur (Kretz et al. 2004). Fester *et al.* stellen hierzu die Hypothese auf, dass die beschriebene Autoregulation der Estradiolproduktion über die Phosphorylierungsprozesse der Aromatase hierfür ursächlich sein könnte.

Da wir in dieser Dissertation hippocampale Schnitkulturen nicht von weiblichen, sondern von männlichen Ratten verwendeten, wirkt die Abnahme der Aromataseaktivität durch Estradiol dagegen nicht im Sinne einer Autoregulation. Es kommt wiederum zu erhöhten Androgenkonzentrationen, ähnlich wie nach Letrozolbehandlung. Diese führen im männlichen Hippocampus zu einer erhöhten Synapsendichte, da Androgene, wie beschrieben, für den männlichen Hippocampus wichtig sind.

In dieser Dissertation zeigen wir, dass Estradiol in allen applizierten Konzentrationen zu einem

Anstieg der Synapsendichte führte (vgl. Abb. 4.6). In den Konzentrationen 100 nM und 0,1 nM war dieser Anstieg signifikant, bei Applikation von Estradiol 10 nM und 1 nM zeigte sich eine tendenzielle Steigerung der Synapsendichte.

Hierdurch stellt sich nun die Frage, ob diese Zunahme der Synapsendichte ein Estradioleffekt ist, also ein Effekt, der über Estradiolrezeptoren vermittelt wird, oder indirekt über die Akkumulation von Testosteron ausgelöst wird.

### **5.3. Gleichzeitige Flutamidgabe hebt den Estradioleffekt wieder auf**

In diesem Zusammenhang führten wir im Anschluss einen Versuch mit dem Androgenrezeptorhemmer Flutamid durch und testeten diesen einerseits in alleiniger Anwendung und andererseits in Kombination mit Estradiol. In Bezug auf den Estradioleffekt, der in der männlichen Schnittkultur einen signifikanten Anstieg der Synapsendichte zeigte, ist die kombinierte Gabe von Flutamid und Estradiol die wichtigere Anwendung.

Erwartungsgemäß zeigte sich nach alleiniger Flutamidapplikation eine signifikante Reduktion der Synapsendichte. Dies unterstreicht zunächst noch einmal die Wichtigkeit von Androgenen für den männlichen Hippocampus (vgl. Abb. 4.7).

Die gemeinsame Applikation von Flutamid und Estradiol zeigte wie die reine Flutamidanwendung ebenfalls eine Synapsenabnahme, die aber sogar stärker war als die alleinige Flutamidapplikation. Die signifikante Zunahme der Synapsendichte durch Estradiol wurde also durch eine Androgenrezeptorblockade aufgehoben. Dieser Sachverhalt weist somit darauf hin, dass der Estradioleffekt, den wir in der hippocampalen Schnittkultur beobachteten, über Androgenrezeptoren vermittelt wird.

In diesem Kontext können nun weitere Publikationen diskutiert werden, die Estradioleffekte im Hippocampus von männlichen Tieren beschreiben. So führte Estradiol zu einer gesteigerten Spine-Dichte (Murakami et al. 2006, 2015), ein Effekt, den Mukai und Hasegawa *et al.* bestätigen konnten. Sie zeigten, dass Estradiol im Hippocampus der männlichen Ratte auch zu einer gesteigerten LTP führte. Im Gegensatz zu unserer hier aufgestellten Hypothese gehen sie jedoch davon aus, dass der Effekt über den ER $\alpha$  vermittelt sein könnte und dabei die intrazelluläre

Signalkaskade über die MAP-Kinase für die ausgelösten Effekte wichtig ist (Mukai et al. 2007; Hasegawa et al. 2015). Kramár *et al.* beobachteten im Hippocampus von männlichen Ratten ebenfalls eine Erhöhung der Spinedichte nach Estradiolbehandlung. Nach Applikation von Latrunculin, einem Toxin, das Prozesse im aktinischen Zytoskelett hemmt, war dieser Effekt jedoch nicht mehr zu sehen. Durch Gabe von ER $\beta$ -Agonisten wurde zudem eine leicht gesteigerte LTP beobachtet (Kramár et al. 2009). Eine kürzlich veröffentlichte Publikation zeigte nach zweistündiger Estradiolapplikation ebenfalls eine Zunahme der Spinedichte im Hippocampus von männlichen Ratten. Dieser Effekt wurde ebenfalls nach Testosteronbehandlung gesehen und war von besseren Resultaten in einem Gedächtnistest nach Testosteron- und Estradiolanwendung begleitet (Jacome et al. 2016).

Durch die hier präsentierten Ergebnisse können wir zeigen, dass bei der Vermittlung von Estradioleffekten in männlichen Neuronen auch indirekt Androgene eine wichtige Rolle spielen könnten, welche über den Androgenrezeptor auf die synaptische Plastizität Einfluss nehmen. Wie Fester *et al.* beschreiben, werden Estradioleffekte an Hippocampi von männlichen Versuchstieren häufig untersucht und/oder keine Angaben zum Geschlecht der Versuchstiere gemacht. Fester *et al.* stellen daher fest, dass Estradioleffekte einerseits unter Berücksichtigung des Geschlechts, aber auch unter Berücksichtigung des autokrinen Regulationsmechanismus der Aromatase diskutiert werden sollten, den sie in der genannten Publikation beschreiben (Fester et al. 2016).

Durch Bezug auf die Autoregulation der Aromatase könnte der Estradioleffekt in den männlichen, hippocampalen Schnittkulturen zu erklären sein und anders als vermutet, durch Androgene ausgelöst werden. Durch die gezeigten Ergebnisse in dieser Dissertation unterstreichen wir außerdem die Geschlechtsabhängigkeit der Untersuchungen, also den sexuellen Dimorphismus im Hippocampus.

## **6. Zusammenfassung**

### **6.1. Deutsch**

Nach 24-stündiger Letrozolbehandlung von männlichen Mäusen konnten wir einen signifikanten Anstieg der Synapsendichte im Hippocampus beobachten, nicht jedoch nach 48 Stunden und auch nicht in der hippocampalen Schnittkultur. Hier blieb die Synapsendichte auf ungefähr gleichem Niveau. Der gentechnologische Knockout der Aromatase führte ebenfalls zu einer kaum veränderten Synapsendichte. Im wissenschaftlichen Kontext verifizieren diese Ergebnisse ähnliche Untersuchungen, die tendenziell erhöhte Synapsendichten im männlichen Hippocampus zeigen. Die Erhöhung könnte durch die Akkumulation von Androgenen durch die Aromatasehemmung hervorgerufen worden sein.

Im Anschluss wurde die Estradiolwirkung auf den männlichen Hippocampus dosisabhängig untersucht. In allen untersuchten Konzentrationen zeigte sich eine Zunahme der Synapsendichte, Estradiol 100 nM und 0,1 nM stellten dabei signifikante Anstiege dar. Da gezeigt werden konnte, dass Estradiol die Aromataseaktivität durch Phosphorylierungsprozesse reduziert, könnte dieser Effekt ebenfalls durch Androgene vermittelt worden sein.

Untersuchungen mit dem Androgenrezeptorinhibitor Flutamid unterstützen diese These. Die alleinige Flutamidanwendung führte zu einer reduzierten Synapsendichte und durch die kombinierte Gabe von Flutamid und Estradiol konnten wir feststellen, dass der Estradioleffekt durch Androgenrezeptorblockade aufgehoben wird und sich ebenfalls eine Abnahme der Synapsendichte zeigte.

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Estradiol-induzierte Erhöhung der Synapsendichte im männlichen Hippocampus über Androgene vermittelt wird.

## **6.2. English**

After 24 hours of treatment with letrozole we found a significant increase of spine synapse density in the hippocampus of the male mouse, but did not see it neither after 48 hours nor in the hippocampal slice culture. In these groups, the spine synapse density did not differ from the control group. However, the knockout of aromatase did not show a difference in synapse density as well. These data are consistent with publications, that show an increased synapse density in the male hippocampus in tendency. The increase could have been caused by accumulation of androgens, because the concentrations of androgens are elevated by inhibition of aromatase.

In another experiment the effect of estradiol on the male hippocampus was tested dose-dependently. In all tested concentrations, we found an increase of spine synapse density, Estradiol 100 nM and 0,1 nM even showed a significant difference to the control group. Because it was demonstrated, that Estradiol reduces aromatase activity by phosphorylation, the increase of synapse density could also be an effect, that is mediated by accumulation of androgens.

To test this thesis, we tested the effects of the anti-androgen flutamide in male hippocampal slice cultures. We found a reduced spine synapse density after sole treatment with flutamide and could find an even more reduced density after combined application of estradiol and flutamide. The effect of estradiol, that showed an increase of synapse density, was completely abolished by inhibition of the androgen receptor.

In conclusion, these data point to an estradiol-induced increase of spine synapse density in the male hippocampus, that is mediated by androgens and the androgen receptor.

## **7. Literaturverzeichnis**

Abe K, Chisaka O, van Roy F, Takeichi M (2004): Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by [alpha]N-catenin. *Nat Neurosci* 7, 357–363

Adams MM, Shah RA, Janssen WGM, Morrison JH (2001): Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8071–8076

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

Bailey M, Wang AC, Hao J, Janssen WG, Hara Y, Dumitriu D, Hof PR, Morrison JH (2011): Interactive Effects of Age and Estrogen on Cortical Neurons: Implications for Cognitive Aging. *Neuroscience* 191, 148–158

Balthazart J, Ball GF (2006): Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 29, 241–249

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

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

Balthazart J, Baillien M, Charlier TD, Ball GF (2005): Effects of calmodulin on aromatase activity in the preoptic area. *J Neuroendocrinol* 17, 664–671

Balthazart J, Baillien M, Ball GF (2006): Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology* 147, 359–366

Barha CK, Galea LAM (2010): Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. *Estrogen Actions Brain* 1800, 1056–1067

Baulieu EE (1997): Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52, 1–32

- Baulieu EE, Robel P (1998): Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4089–4091
- Bayer J, Rune G, Schultz H, Tobia MJ, Mebes I, Katzler O, Sommer T (2015): The effect of estrogen synthesis inhibition on hippocampal memory. *Psychoneuroendocrinology* 56, 213–225
- Behl C, Manthey D (2000): Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol* 29, 351–358
- Berridge MJ (1998): Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13–26
- Beyer C (1999): Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol (Berl)* 199, 379–390
- Beyer C, Pawlak J, Karolczak M (2003): Membrane receptors for oestrogen in the brain. *J Neurochem* 87, 545–550
- von Blittersdorff B: Östrogenabhängige Spinesynapsendichte: ein sexueller Dimorphismus. 2011
- Bourguiba S, Lambard S, Carreau S (2003): Steroids control the aromatase gene expression in purified germ cells from the adult male rat. *J Mol Endocrinol* 31, 83–94
- Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, Greengard P, McEwen BS (2001): Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology* 142, 1284–1289
- Brandt N, Vierk R, Rune GM (2013): Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus. *Int J Dev Biol* 57, 351–356
- Brandt N, Vierk R, Fester L, Zhou L, Imholz P, Rune GM (2014): Geschlecht und Effekte von Steroidhormonen im Zentralnervensystem (ZNS). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 57, 1054–1060
- Castelli MP, Casti A, Casu A, Frau R, Bortolato M, Spiga S, Ennas MG (2013): Regional distribution of 5 $\alpha$ -reductase type 2 in the adult rat brain: an immunohistochemical analysis. *Psychoneuroendocrinology* 38, 281–293

Charlier TD, Harada N, Balthazart J, Cornil CA (2011): Human and quail aromatase activity is rapidly and reversibly inhibited by phosphorylating conditions. *Endocrinology* 152, 4199–4210

Charlier TD, Cornil CA, Balthazart J (2013): Rapid modulation of aromatase activity in the vertebrate brain. *J Exp Neurosci* 7, 31–37

Cherrier MM, Matsumoto AM, Amory JK, Ahmed S, Bremner W, Peskind ER, Raskind MA, Johnson M, Craft S (2005): The role of aromatization in testosterone supplementation: effects on cognition in older men. *Neurology* 64, 290–296

Collins B, Mackenzie J, Stewart A, Bielajew C, Verma S (2009): Cognitive effects of hormonal therapy in early stage breast cancer patients: a prospective study. *Psychooncology* 18, 811–821

Cornil CA, Charlier TD (2010): Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *J Neuroendocrinol* 22, 664–673

Dailey ME, Smith SJ (1996): The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 16, 2983–2994

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

Dent EW, Merriam EB, Hu X (2011): The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21, 175–181

Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon M-C, Pelletier G, Vaudry H (2009): Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol* 30, 259–301

El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS (2000): PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364–1368

Fernandez SV, Russo J (2010): Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicol Pathol* 38, 110–122

- Fester L, Rune GM (2015): Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Res* 1621, 162–169
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M, Jarry H, Rune GM (2006): Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* 97, 1136–1144
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009): Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19, 692–705
- Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2011): Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell Tissue Res* 345, 285–294
- Fester L, Prange-Kiel J, Zhou L, Blittersdorf BV, Böhm J, Jarry H, Schumacher M, Rune GM (2012): Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 131, 24–29
- 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  $\beta$ . *J Steroid Biochem Mol Biol* 138, 455–461
- Fester L, Brandt N, Windhorst S, Pröls F, Bläute C, Rune GM (2016): Control of aromatase in hippocampal neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol* 160, 9–14
- Fifková E, Delay RJ (1982): Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95, 345–350
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998): Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6965–6970
- Foster TC (2012): Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus* 22, 656–669
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998): Steroidogenic acute regulatory protein

(StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 71, 2231–2238

Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB (1999): Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89, 567–578

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001): Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63, 29–60

Gillies GE, McArthur S (2010): Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev* 62, 155–198

Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS (1990): Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 10, 1286–1291

Harada N, Abe-Dohmae S, Loeffen R, Foidart A, Balthazart J (1993): Synergism between androgens and estrogens in the induction of aromatase and its messenger RNA in the brain. *Brain Res* 622, 243–256

Harden C, MacLusky NJ (2005): Aromatase inhibitors as add-on treatment for men with epilepsy. *Expert Rev Neurother* 5, 123–127

Harris KM, Kater SB (1994): Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17, 341–371

Hasegawa Y, Hojo Y, Kojima H, Ikeda M, Hotta K, Sato R, Ooishi Y, Yoshiya M, Chung B-C, Yamazaki T, Kawato S (2015): Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks. *Brain Res* 1621, 147–161

Hatanaka Y, Mukai H, Mitsuhashi K, Hojo Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Sato R, Kawato S (2009): Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 728–732

Hatanaka Y, Hojo Y, Mukai H, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kim J, Ikeda M, Hiragushi A, Kimoto T, Kawato S (2015): Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res* 1621, 121–132

Hayes FJ, DeCruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF (2001): Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 53–58

Hedayati E, Alinaghizadeh H, Schedin A, Nyman H, Albertsson M (2012): Effects of adjuvant treatment on cognitive function in women with early breast cancer. *Eur J Oncol Nurs Off J Eur Oncol Nurs Soc* 16, 315–322

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson J-A (2007): Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87, 905–931

Hero M, Maury S, Luotoniemi E, Service E, Dunkel L (2010): Cognitive effects of aromatase inhibitor therapy in peripubertal boys. *Eur J Endocrinol* 163, 149–155

Hojo Y, Hattori T-A, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H-T, Mukai H, Morrison JH, Janssen WGM, Kominami S, et al. (2004): Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 865–870

Hojo Y, Higo S, Kawato S, Hatanaka Y, Ooishi Y, Murakami G, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Kimoto T (2011): Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity. *Front Endocrinol* 2, 43

Holcman D, Schuss Z, Korkotian E (2004): Calcium dynamics in dendritic spines and spine motility. *Biophys J* 87, 81–91

Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2008): The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719–729

- Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010): Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189, 619–629
- Jacome LF, Barateli K, Buitrago D, Lema F, Frankfurt M, Luine VN (2016): Gonadal Hormones Rapidly Enhance Spatial Memory and Increase Hippocampal Spine Density in Male Rats. *Endocrinology* 157, 1357–1362
- Jakab RL, Horvath TL, Leranth C, Harada N, Naftolin F (1993): Aromatase immunoreactivity in the rat brain: gonadectomy-sensitive hypothalamic neurons and an unresponsive „limbic ring“ of the lateral septum-bed nucleus-amygdala complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44, 481–498
- Janssens RM, Brus L, Cahill DJ, Huirne JA, Schoemaker J, Lambalk CB (2000): Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum Reprod Update* 6, 505–518
- Jenkins V, Shilling V, Deutsch G, Bloomfield D, Morris R, Allan S, Bishop H, Hodson N, Mitra S, Sadler G, et al. (2006): A 3-year prospective study of the effects of adjuvant treatments on cognition in women with early stage breast cancer. *Br J Cancer* 94, 828–834
- Kahle W, Frotscher M: Taschenatlas der Anatomie. Bd. 3 Nervensystem und Sinnesorgane. 7. Aufl. Thieme, Stuttgart New York 2001
- Kato A, Hojo Y, Higo S, Komatsuzaki Y, Murakami G, Yoshino H, Uebayashi M, Kawato S (2013): Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front Neural Circuits* 7, 149
- Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura H, Hojo Y, Takata N, Kawato S (2001): Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology* 142, 3578–3589
- Klinge CM (2001): Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905–2919
- Konkle ATM, Balthazart J (2011): Sex differences in the rapid control of aromatase activity in the quail preoptic area. *J Neuroendocrinol* 23, 424–434

- Kramár EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G (2009): Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29, 12982–12993
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004): Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24, 5913–5921
- Leder BZ, Rohrer JL, Rubin SD, Gallo J, Longcope C (2004): Effects of aromatase inhibition in elderly men with low or borderline-low serum testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1174–1180
- Lee SJ, McEwen BS (2001): Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 569–591
- Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ, Silverman AJ (1986): Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol* 244, 19–35
- Leranth C, Petnehazy O, MacLusky NJ (2003): Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23, 1588–1592
- Leranth C, Hajszan T, MacLusky NJ (2004): Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24, 495–499
- Li M, Masugi-Tokita M, Takanami K, Yamada S, Kawata M (2012): Testosterone has sublayer-specific effects on dendritic spine maturation mediated by BDNF and PSD-95 in pyramidal neurons in the hippocampus CA1 area. *Brain Res* 1484, 76–84
- Liu F, Day M, Muñoz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, et al. (2008): Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci* 11, 334–343
- MacLusky NJ, Hajszan T, Prange-Kiel J, Leranth C (2006): Androgen modulation of

hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* 138, 957–965

Meethal SV, Liu T, Chan HW, Ginsburg E, Wilson AC, Gray DN, Bowen RL, Vonderhaar BK, Atwood CS (2009): Identification of a regulatory loop for the synthesis of neurosteroids: a steroidogenic acute regulatory protein-dependent mechanism involving hypothalamic-pituitary-gonadal axis receptors. *J Neurochem* 110, 1014–1027

Melcangi RC, Giatti S, Garcia-Segura LM (2016): Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions: Sex-specific features. *Neurosci Biobehav Rev* 67, 25–40

Morales M, Fifková E (1989): In situ localization of myosin and actin in dendritic spines with the immunogold technique. *J Comp Neurol* 279, 666–674

Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K (1995): Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3689–3698

Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Ishii H, Kimoto T, Kawato S (2006): Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology* 84, 255–263

Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, et al. (2007): Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100, 950–967

Murakami G, Tsurugizawa T, Hatanaka Y, Komatsuzaki Y, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Kominami S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2006): Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 553–558

Murakami G, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Chambon P, Nakajima K, Ooishi Y, Kimoto T, Kawato S (2015): Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res* 1621, 133–146

Murphy DD, Segal M (1996): Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 16, 4059–4068

Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z (1971): Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab* 33, 368–370

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002): Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64, 313–353

Nomura M, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S (2003): Estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ERalpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. *Brain Res Mol Brain Res* 110, 7–14

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

Okamoto M, Hojo Y, Inoue K, Matsui T, Kawato S, McEwen BS, Soya H (2012): Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13100–13105

Pelletier G (2010): Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. *Prog Brain Res* 181, 193–207

Pelletier G, Luu-The V, Labrie F (1994): Immunocytochemical localization of 5 alpha-reductase in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 5, 394–399

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA (1997): Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol Baltim Md* 11, 1486–1496

Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD (1999): Estradiol Increases Spine Density and NMDA-Dependent  $\text{Ca}^{2+}$  Transients in Spines of CA1 Pyramidal Neurons From Hippocampal Slices. *J Neurophysiol* 81, 1404

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003): Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13, 226–234

- 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, 464–471
- Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008): Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180, 417–426
- Prange-Kiel J, Schmutterer T, Fester L, Zhou L, Imholz P, Brandt N, Vierk R, Jarry H, Rune GM (2013): Endocrine regulation of estrogen synthesis in the hippocampus? *Prog Histochem Cytochem* 48, 49–64
- Qu N, Wang L, Liu Z-C, Tian Q, Zhang Q (2013): Oestrogen receptor  $\alpha$  agonist improved long-term ovariectomy-induced spatial cognition deficit in young rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1071–1082
- Roselli CE, Salisbury RL, Resko JA (1987): Genetic evidence for androgen-dependent and independent control of aromatase activity in the rat brain. *Endocrinology* 121, 2205–2210
- Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelmann G, Frotscher M (2002): Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113, 167–175
- 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
- Sarkar SN, Huang R-Q, Logan SM, Yi KD, Dillon GH, Simpkins JW (2008): Estrogens directly potentiate neuronal L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15148–15153
- Segal M (2005): Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6, 277–284
- Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe N, Ishii H, et al. (2003): Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochim Biophys Acta*

1619, 301–316

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997): Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388, 507–525

Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M (1999): Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer* 6, 131–137

Skinner DC, Caraty A (2002): Measurement and possible function of GnRH in cerebrospinal fluid in ewes. *Reprod Camb Engl Suppl* 59, 25–39

Srivastava DP, Woolfrey KM, Liu F, Brandon NJ, Penzes P (2010): Estrogen receptor  $\beta$  activity modulates synaptic signaling and structure. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30, 13454–13460

Stoffel-Wagner B (2001): Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145, 669–679

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991): A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173–182

Tan X, Dai Y, Wu W, Kim H, Barros RPA, Richardson TI, Yaden BC, Warner M, McKinzie DL, Krishnan V, Gustafsson J-Å (2012): Reduction of dendritic spines and elevation of GABAergic signaling in the brains of mice treated with an estrogen receptor  $\beta$  ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1708–1712

Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002): ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22, 8391–8401

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

Vierk R, Brandt N, Rune GM (2014): Hippocampal estradiol synthesis and its significance for hippocampal synaptic stability in male and female animals. *Neuroscience* 274, 24–32

- Walf AA, Koonce CJ, Frye CA (2009): Adult female wildtype, but not oestrogen receptor beta knockout, mice have decreased depression-like behaviour during pro-oestrus and following administration of oestradiol or diarylpropionitrile. *J Psychopharmacol Oxf Engl* 23, 442–450
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001): Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76, 1879–1886
- Woolley C, Gould E, Frankfurt M, McEwen B (1990): Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10, 4035
- Woolley CS, McEwen BS (1992): Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12, 2549–2554
- Wu T-W, Wang JM, Chen S, Brinton RD (2005): 17Beta-estradiol induced Ca<sup>2+</sup> influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* 135, 59–72
- Zhao C, Fujinaga R, Yanai A, Kokubu K, Takeshita Y, Watanabe Y, Shinoda K (2008): Sex-steroidal regulation of aromatase mRNA expression in adult male rat brain: a quantitative non-radioactive in situ hybridization study. *Cell Tissue Res* 332, 381–391
- Zhao L, Brinton RD (2007): Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res* 1172, 48–59
- Zhao L, Chen S, Ming Wang J, Brinton RD (2005): 17beta-estradiol induces Ca<sup>2+</sup> influx, dendritic and nuclear Ca<sup>2+</sup> rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience* 132, 299–311
- Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM (2010): Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology* 151, 1153–1160

Zhou L, Fester L, Haghshenas S, de Vrese X, von Hacht R, Gloger S, Brandt N, Bader M, Vollmer G, Rune GM (2014): Oestradiol-induced synapse formation in the female hippocampus: roles of oestrogen receptor subtypes. *J Neuroendocrinol* 26, 439–447

## **8. Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Neuroanatomie Hamburg und insbesondere Dr. Nicola Brandt für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken, für ihr offenes Ohr bei allen Fragen, der Einarbeitung und der Hilfe bei der Zusammenstellung der Dissertation. Außerdem danke ich Frau Prof. Rune für die Möglichkeit, an ihrem Institut eine Dissertation in einem spannenden Forschungsbereich schreiben zu können, die Dissertation zu solch einem frühen Zeitpunkt in meinem Studium beginnen zu können und diese als externer Student der Universität Göttingen weiterführen zu können. Ich möchte mich weiterhin bei Dr. Lepu Zhou bedanken, der meine Doktorarbeit zunächst betreute und sich auch darüber hinaus für alle Fragen und Probleme Zeit und Geduld genommen hat. Brigitte Asmus und Barbara Holstermann möchte ich für ihre vorzügliche Arbeit im Labor und ihre herzliche Art und Weise, mir die Laborarbeit etwas näher zu bringen, danken. Danke an alle anderen Doktoranden, mit denen ich nicht immer rein fachliche Gespräche geführt habe.

Ein besonderer Dank geht an meine lieben Eltern, die mich nicht nur in Fragen und Problemen der Doktorarbeit, sondern auch in allen anderen Bereichen unterstützen. Ich danke allen meinen Freunden und insbesondere Sebastian Knaps für seine Hilfe bei der Entwicklung der Bilder im Fotolabor.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei allen Korrekturlesern, die meinen manchmal komplizierten Ausdruck zu gut verständlichem Deutsch gemacht haben.

Danke!

## **9. Tabellarischer Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

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

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

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

Unterschrift: .....