

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Neuroanatomie

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

Die Expression synaptischer Proteine im Hippocampus nach systemischer Behandlung von Mäusen mit Aromatasehemmern

Dissertation

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

vorgelegt von:

Basel Hassu
aus El-Hassake

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.05.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Gabriele Rune

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter : Prof. Dr. Christian Hagel

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	3
2. Einleitung	7
2.1 Einführung	7
2.2 Anatomie und Funktion des Hippocampus	9
2.3 Synapsen und dendritische Spines	12
2.4 Synaptische Plastizität, LTP	15
2.5 Synaptische Proteine	16
2.5.1 Synaptophysin, ein präsynaptisches Markerprotein	16
2.5.2 Spinophilin, ein postsynaptisches Markerprotein	17
2.5.3 Synaptopodin, ein postsynaptisches Protein und Marker für Spinereife	18
2.6 Estrogensynthese	18
2.7 Estrogen im Hippocampus und seine Wirkung	20
2.8 Aromatase, das Schlüsselenzym der Estrogensynthese	22
2.9 Aromatasehemmer in der Therapie des Mammakarzinoms	23
2.10 Fragestellung	26
3. Material, Geräte, Chemikalien und Lösungen	27
3.1 Material und Geräte	27
3.2 Chemikalien	28
3.3 Lösungen	29
4. Methoden	30
4.1 Verwendete Versuchstiere	30
4.2 Behandlung der Versuchstiere mit Letrozol	31
4.3 Präparation der Hippocampi von Mäusen	31
4.4 Vorbereitung der Schnitte für die Immunhistochemie	32
4.5 Immunhistochemie	32
4.6 Bildanalyse und Statistik	33

5. Ergebnisse	35
5.1 Expression von Synaptophysin	35
5.2 Expression von Spinophilin	37
5.3 Expression von Synaptopodin	40
5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	42
6. Diskussion	45
6.1 Expression synaptischer Proteine in weiblichen und männlichen Mäusen nach systemischer Behandlung mit Letrozol	46
6.2 Expression synaptischer Proteine in ovariectomierten Mäusen nach systemischer Behandlung mit Letrozol	50
6.3 Estrogen und Kognition	53
7. Zusammenfassung, Summary	54
8. Literaturverzeichnis	56
9. Danksagung	66
10. Lebenslauf	67
11. Eidesstattliche Versicherung	68

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AI	Aromataseinhibitoren = Aromatasehemmer
AK	Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ArKo	Aromatase Knockout
ATP	Adenosintriphosphat
Aufl.	Auflage
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CA1-3	Cornu ammonis 1-3
cm	Zentimeter
Cy3	Indocarbocyanin 3
d	Tage
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DABCO	1,4-Diazabicyclooctane
dest.	destilliert
DG	Gyrus dentatus
d.h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	deoxyribonucleic acid

E1	Estron
E2	Estradiol
E3	Estriol
ER+	Estrogenrezeptor positiv
ER- α	Estrogenrezeptor Alpha
ER- β	Estrogenrezeptor Beta
et al.	Et alii (und andere)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	hour (Stunde)
HCl	Salzsäure
HeNe	Helium-Neon
HHG-Achse	Hypothalamisch-Hypophysären-Gonadalen- Achse
HRT	Hormonersatztherapie
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Ko	Knockout
l	Liter
le	Letrozol
LH	Luteinisierendes Hormon
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung

LSM	laser scanning microscope
m	männlich
M	Mol
mg	Milligramm
Min.	Minute
mind.	mindestens
ms	Millisekunde
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-ribonucleic acid
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NGS	normal goat serum
n	Anzahl
nM	Nanomol
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	Maß für die Aktivität von Protonen
PK-A/C	Proteinkinasen-A/C
PP1	Proteinphosphatase1
PSD	postsynaptische Dichte
o.g.	oben genannt

Ovx	Ovarektomie
RKI	Robert Koch Institut
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
<i>scc</i>	<i>side chain cleavage enzyme</i>
SEM	<i>standard error in mean</i>
SER	smooth sarcoplasmic reticulum
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
s.o.	siehe oben
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
s.u.	siehe unten
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Vgl.	Vergleich
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.Z.	zurzeit

2. Einleitung

2.1 Einführung

Das komplexeste Organ des Menschen, das Gehirn, besteht aus ca. 100 Milliarden Nervenzellen (Neuronen), die wiederum über mehr als 100 Billionen hochspezialisierte Kontaktstellen (Synapsen) miteinander kommunizieren und so die Basis für seine neuronalen Netzwerke darstellen. Die Fähigkeit des Gehirns, Informationen aufzunehmen, in seinen neuronalen Netzwerken zu verarbeiten, zu speichern und entsprechende Reaktionen zu generieren, stellt die Grundlage für seine höheren kognitiven Funktionen wie Lernen und Gedächtnisbildung dar. Dies legt nahe, dass dieses Organ in ständiger Dynamik ist. In diesem Zusammenhang wird auf zellulärer Ebene der Synapse eine herausragende Rolle zugeschrieben. Synapsen können im zentralen Nervensystem (ZNS) neu gebildet werden. Die bestehenden Synapsen können in ihrer Aktivität verstärkt, supprimiert oder gänzlich eliminiert werden. Dies wird auch als synaptische Plastizität bezeichnet und als Grundlage für Lernvorgänge und Bildung von Gedächtnisinhalten betrachtet.

Unter den Sexualhormonen üben Estrogene vielfältige Funktionen im Körper aus. Neben ihrer prominenten Rolle in der weiblichen Reproduktionsbiologie konnte in zahlreichen Arbeiten ihr Einfluss auch auf die synaptische Plastizität im ZNS gezeigt werden (Gould et al., 1990; Woolley et al., 1990; Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2006; Prange-Kiel et al., 2006, 2009; Vierk et al., 2012). Darüber hinaus werden den Estrogenen neuroprotektive Eigenschaften im Gehirn zugesprochen, speziell im Hippocampus, einer Hirnregion, die mit Lernen und Gedächtnisbildung assoziiert ist (McEwen und Alves, 1999; Behl, 2002; Garcia-Segura et al., 2003; Garcia-Segura, 2008). So haben Estrogene beispielhaft protektive Eigenschaften gegen das β -Amyloid, das in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz eine Schlüsselrolle spielt (Green et al., 1996). Ferner konnte gezeigt werden, dass Estrogene den β -Amyloid-induzierten programmierten Zelltod (Apoptose) der Neurone verhindern können (Pike, 1999). In diesem Zusammenhang wird allgemein angenommen, dass die höhere Inzidenz neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz bei postmenopausalen Frauen zum Teil durch die Abnahme ihrer Estrogenproduktion bedingt ist (Simpkins et al., 1994; Behl et al., 1997). Im Einklang damit wurde in Studien bei Frauen, die eine HRT (Hormonersatztherapie) mit Estrogen

erhielten, ein geringeres Risiko beobachtet, an Demenz zu erkranken (Paganini-Hill und Henderson, 1996; Tang et al., 1996).

Das Gehirn ist nicht nur ein wichtiges Zielorgan der Estrogene, vielmehr ist es selbst in der Lage, insbesondere im Hippocampus, solche zu bilden (Wehrenberg et al., 2001; Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004; Hojo et al., 2004; Prange-Kiel und Rune, 2006). Es ist daher von großem Interesse der Neurowissenschaft, die zugrundeliegenden Mechanismen der Estrogenwirkung im Gehirn, vor allem im Hinblick auf ihre Konsequenz für den klinischen Alltag, zu erforschen und aufzuklären. Dabei stand der Hippocampus am häufigsten im Fokus dieser Forschungsarbeiten. Seine hohe synaptische Plastizität macht ihn zu einem beliebten Forschungsobjekt. Auch in dieser Dissertation steht der Hippocampus im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Es ist bekannt, dass Estrogene auch in der Tumorbilogie des Mammakarzinoms involviert sind. Sie tragen nicht nur zur Entstehung, sondern auch zum Wachstum vieler dieser Karzinome bei (Yue et al., 2005; Fuhrman et al., 2012; Santen et al., 2015). Eine große Zahl von Mammakarzinomen sind estrogensensibel, d.h. Estrogenrezeptor positiv (ER+). Basierend auf dieser Erkenntnis entwickelte sich die antihormonelle Therapie bei estrogenabhängigen Mammakarzinomen zu einer wichtigen Behandlungsoption. Neben der etablierten Therapie mit den Estrogenrezeptorantagonisten wie Tamoxifen kamen in den letzten Jahren Aromatasehemmer (Aromataseinhibitoren=AI) zunehmend zum Einsatz. Diese unterbinden den letzten Schritt der Estrogensynthese aus Androgenen und führen somit zu einem Estrogenentzug. Unter der Therapie mit AI wurde in klinischen Studien beobachtet, dass die damit behandelten Frauen häufig über Lern- und Gedächtnisstörungen klagten (Shilling et al., 2003; Buwalda und Schagen, 2013).

Da Estrogene, wie oben erwähnt, die synaptische Plastizität im Hippocampus positiv beeinflussen, wird diese unerwünschte Arzneimittelwirkung in Zusammenhang mit der Hemmung der Estrogensynthese gebracht (Vierk et al., 2012; Bian et al., 2014; Bayer et al., 2015).

In zahlreichen vorangegangenen Tierexperimenten konnte *in vitro* gezeigt werden, dass neuronale Strukturen wie z.B. die Spinesynapsen und die Expression

synaptischer Proteine im Hippocampus von Estrogen moduliert werden (Rune et al., 2002; Rune und Frotscher, 2005; Kretz et al., 2004; Rune et al., 2006; Fester et al., 2009; Vierk et al., 2012). Basierend auf diesen *in vitro* Befunden soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine Behandlung von Mäusen mit dem Aromatasehemmer Letrozol auch *in vivo* zu einer Verminderung der Expression von den synaptischen Proteinen Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin, die als Marker für Synapsen betrachtet werden, führt und somit die synaptische Plastizität beeinflusst. Dabei untersuchen wir diese Proteine immunhistochemisch in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus von weiblichen, männlichen und ovariectomierten Mäusen.

2.2 Anatomie und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus ist ein Teil des Großhirns und gehört zum limbischen System. Er liegt im Temporallappen und grenzt an die mediale Wand des Unterhorns vom Seitenventrikel. Der Hippocampus ist paarig angelegt. Er streckt sich von ventral bogenförmig nach dorsal bis zum kaudalen Ende des Corpus callosum (Balken) und bildet weiter eine Verbindung zu den Faserstrukturen des Fornix (Schiebler et al., 1999; Trepel, 2015). Seine bogenförmige Gestalt ist durch die Rotationsbewegung beider Hemisphären während der Embryonalentwicklung bedingt.

Der Hippocampus ist Teil des berühmten Papez-Neuronenkreises, der 1937 von James Papez beschrieben wurde (Abb.1). Seinen Ursprung hat der Papez-Neuronenkreis im Hippocampus. Er zieht über den Fornix zu den Corpora mamillaria, von dort aus über das mamillothalamische Bündel zum anterioren Nucleus des Thalamus und anschließend zum Gyrus cinguli. Der Gyrus cinguli projiziert Fasern zur Area entorhinalis des Gyrus parahippocampalis und von dort über den Tractus perforans zurück zum Hippocampus, so dass der Kreis geschlossen wird. Diesem Neuronenkreis wird eine entscheidende Funktion bei der Gedächtnisbildung zugeschrieben (Trepel, 2015).

Zum Hippocampus gehören der Gyrus dentatus (DG), das Cornu ammonis (CA) und das Subiculum. Diese werden auch als Hippocampusformation bezeichnet.

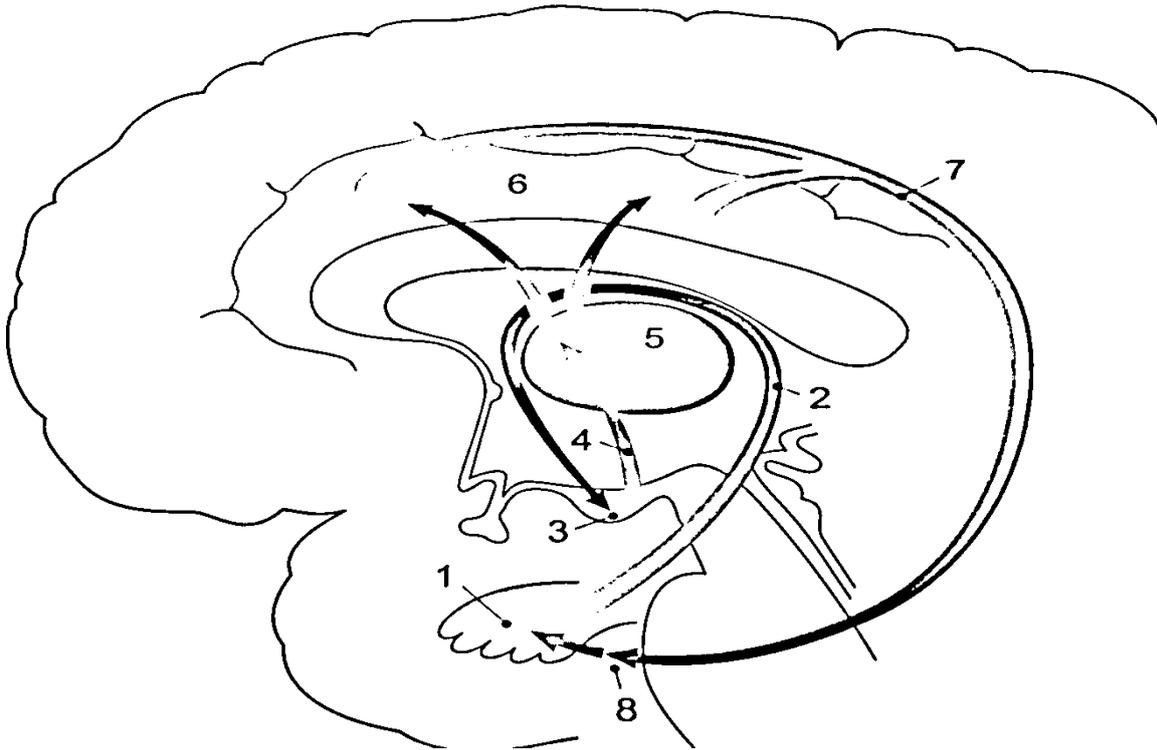


Abb.1: Papez-Neuronenkreis; 1. Hippocampus, 2. Fornix, 3. Corpus mammillare, 4. Fasciculus mamillothalamicus, 5. Thalamus, 6. Gyrus singuli, 7. Cingulus (Fasertrakt des Gyrus singuli), 8. Area enterohinalis
Quelle: Trepel, Neuroanatomie, Aufl. 2015

Das CA wird aufgrund seiner unterschiedlichen Neuronendichte in CA1-CA3 unterteilt (Abb. 2).

Histologisch ist der Hippocampus im Gegensatz zum sechsschichtigen Cortex dreischichtig aufgebaut (Schiebler et al., 1999). In einem Querschnitt zu seiner Längsachse zeigen sich zwei ineinander umgreifende, C-förmig gebogene Zellschichten (Abb. 2). Diese sind glutamaterge erregende Neurone. Sie haben ihre Dendriten in den jeweils angrenzenden zellarmen Schichten. Die Pyramidenzellen des CA bilden mit ihren apikalen Dendriten das Stratum moleculare, das in stratum radiatum und Stratum lacunosum- moleculare unterteilt wird, und mit ihren basalen Dendriten das Stratum oriens, welches auch die Zellkörper der hemmenden Korbzellen enthält.

Die Dendriten der Körnerzellen (Stratum granulare) des Gyrus dentatus bilden das Stratum moleculare, welches in eine innere und äußere Schicht untergliedert wird.

Die proximalen Dendriten der Körnerzellen liegen in der inneren Molekularschicht und die distalen Dendriten in der äußeren Molekularschicht.

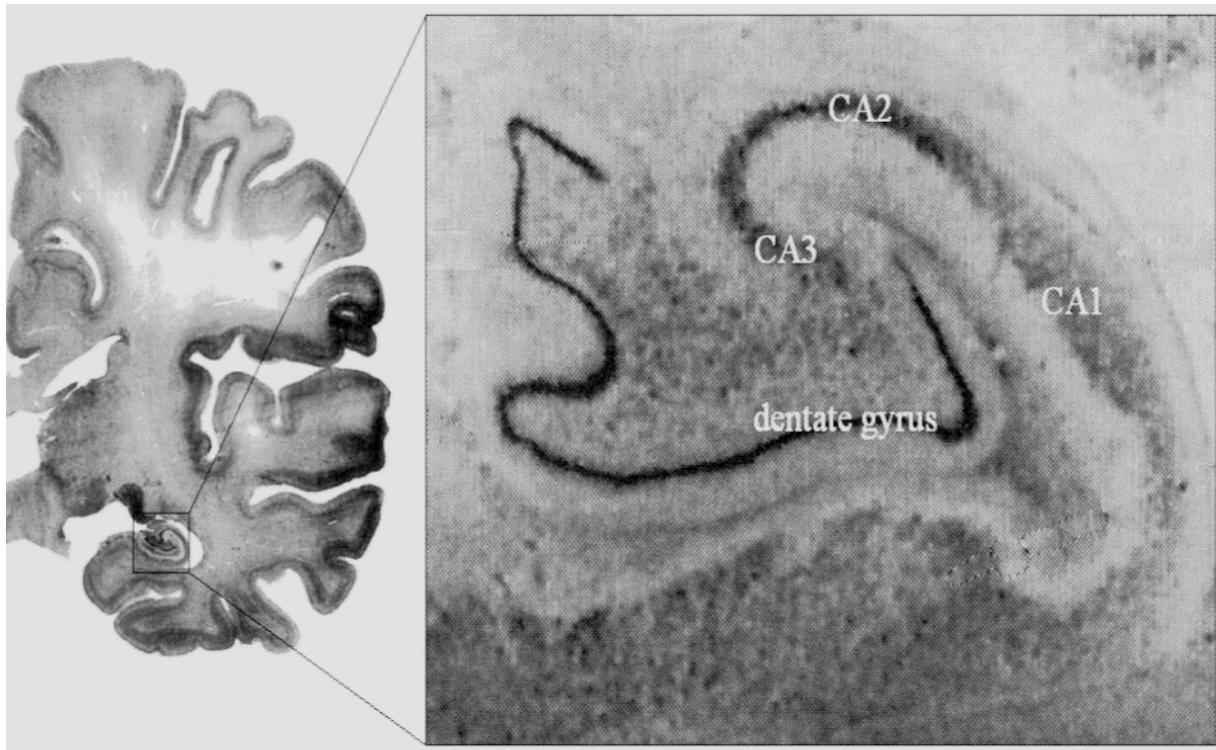


Abb. 2: Frontalschnitt menschlicher Hippocampus

Quelle: Steward, Functional Neuroscience, 1st Edition, 2000, Springer, New York, S. 471

Über den DG fließen die Informationen in den Hippocampus ein. Afferenzen erhält der Hippocampus über den Tractus perforans von der Regio enterohinalis. Aus dem Kortex, dem Corpus amygdaloidium, dem Thalamus, und dem Gyrus cinguli fließen Informationen zum Hippocampus. Er wird somit mit visuellen, olfaktorischen, auditorischen, somato-sensiblen und motorischen Informationen in modulierter Form versorgt. Fast alle Efferenzen verlassen den Hippocampus über das Subiculum zum Fornix. Aus dem Fornix ziehen dann Fasern zum Septum, zum Corpus amygdaloidium, zum Hypothalamus, und zu den Corpora mammillaria. Der Informationsfluss im Hippocampus wird, vereinfacht dargestellt, wie folgt beschrieben; enterohinaler Kortex → Gyrus dendatus → CA3 → CA1 → Subiculum → Fornix (Trepel, 2015).

Eine der wichtigen Funktionen des Hippocampus ist die Gedächtniskonsolidierung, d.h. die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeitgedächtnis in das

Langzeitgedächtnis. Des Weiteren ist der Hippocampus durch seine zentrale Schaltstelle vieler neuraler Verbindungen an endokrinen, emotionalen und vegetativen Vorgängen beteiligt. Eine beidseitige Schädigung des Hippocampus hat somit gravierende Folgen für den Betroffenen. Es kommt zu einer anterograden Amnesie, d.h. der Betroffene ist nicht mehr in der Lage, neue Gedächtnisinhalte in das Langzeitgedächtnis zu speichern. Die vor der Schädigung länger zurückliegenden Gedächtnisinhalte können grundsätzlich weiter abgerufen werden. Also was vor der Schädigung gespeichert wurde, kann auch erinnert werden (Scoville und Millner, 1957).

2.3 Synapsen und dendritische Spines

Der Begriff Synapse wurde Ende des achtzehnten Jahrhunderts von Charles S. Sherrington geprägt. Bei Synapsen handelt es sich um hochspezialisierte Kontaktstellen zwischen Neuronen untereinander oder zwischen einem Neuron und einer anderen Zielzelle, z.B. einer Drüsenzelle oder Muskelzelle. Ihre Zahl im Gehirn eines erwachsenen Menschen wird auf etwa 100 Billionen geschätzt. Funktion der Synapse ist die Signalübertragung von einer Zelle auf eine andere Zelle. Abhängig vom Mechanismus der Signalübertragung wird zwischen elektrischen und chemischen Synapsen unterschieden.

Elektrische Synapsen ermöglichen eine direkte und schnelle Signalübertragung zwischen zwei Zellen. Grundbausteine solcher Synapse sind Konnexone. Das sind Proteinkomplexe, die so in die Zellmembranen zwei sehr eng aneinander liegender Zellen eingebaut sind, dass ein Kanal (*Gap Junction*) entsteht. Dieser Kanal ermöglicht ohne Zeitverzögerung Ionenströme zwischen den Zellen. Auf dieser Weise wird das Aktionspotenzial von einer Zelle auf eine andere Zelle übertragen. Die Signalübertragung kann bei der elektrischen Synapse im Gegensatz zur chemischen Synapse bidirektional erfolgen (Klinke und Silbernagel, 2001).

Im ZNS befinden sich fast ausschließlich chemische Synapsen. Sie bestehen aus einer präsynaptischen Membran, einem synaptischen Spalt (ca. 20 bis 30 nm breit) und einer postsynaptischen Membran (Abb. 3, S.13).

Grundvoraussetzung der Signalübertragung an der chemischen Synapse ist die Umwandlung eines elektrischen Signals in ein chemisches Signal. Eine an der präsynaptischen Membran ankommende elektrische Erregung führt zur Membrandepolarisation. Diese bedingt die Öffnung spannungsaktivierter Ca^{+2} -Kanäle und damit einen Ca^{+2} -Einstrom in die Zelle. Durch Interaktion von Ca^{+2} mit den synaptischen Proteinen kommt es zur Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran. Die synaptischen Vesikel enthalten Neurotransmitter (chemische Botenstoffe), die auf diese Weise in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Dieser Vorgang wird als Exozytose bezeichnet.

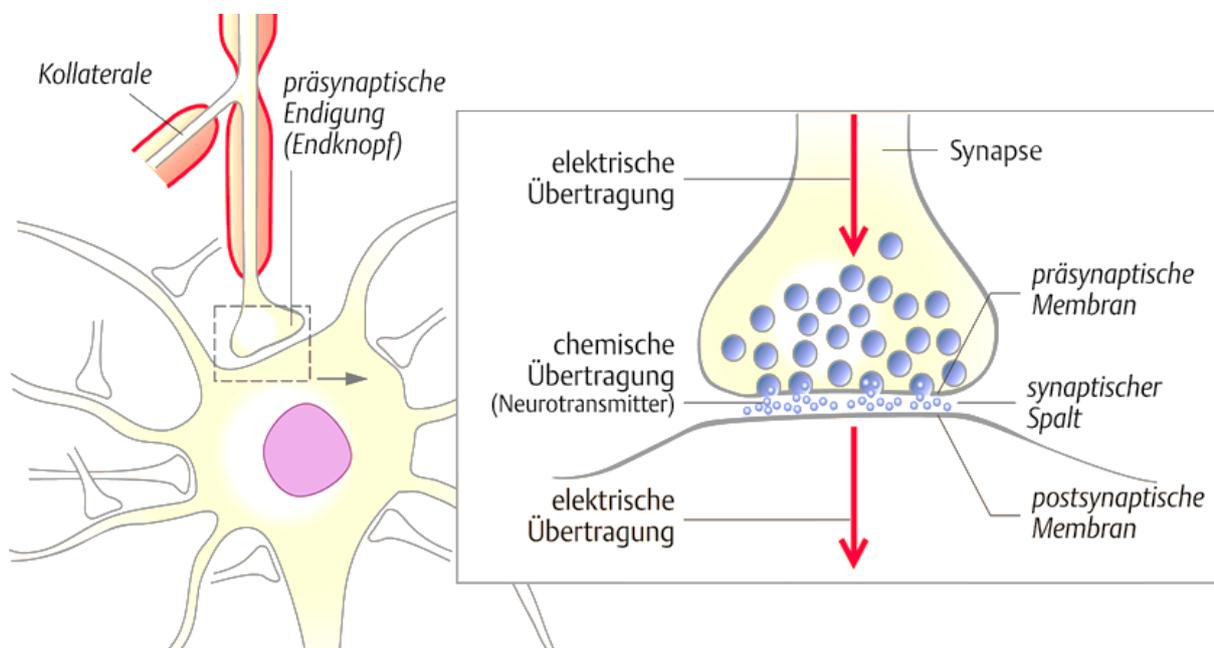


Abb. 3: Aufbau einer chemischen Synapse

Quelle: [https://viamedici.thieme.de/learnmodule/histologie/aufbau von Synapsen](https://viamedici.thieme.de/learnmodule/histologie/aufbau_von_Synapsen), Stand [18.08.2017]

Der in den synaptischen Spalt freigesetzte Neurotransmitter diffundiert innerhalb kurzer Zeit (wenige ms) zur postsynaptischen Membran und bindet dort an transmitterspezifische Rezeptoren. Diese Rezeptoren können dann über verschiedene Signalwege das Ruhepotenzial der postsynaptischen Membran ändern. Es kommt je nach Synapsen-Typ zu einer Erregung (Exzitation) oder zu einer Hemmung (Inhibition) der Postsynapse. Glutamat ist ein typischer exzitatorischer Neurotransmitter in ZNS, während GABA (γ -Aminobuttersäure) der bekannteste inhibierende Neurotransmitter ist.

Dendritische Spines (Dornfortsätze) sind winzige Ausstülpungen an den Dendriten von Nervenzellen. Sie wurden erstmals vor über hundert Jahren von Ramón Cajal beschrieben. Spines stellen die postsynaptische Komponente der meisten exzitatorischen synaptischen Verbindungen dar (Gray, 1959; Harris und Kater, 1994). Sie werden nach ihrer Morphologie in "thin" (dünne), "stubby" (kurze) oder "mushroom shaped" (pilzförmige) eingeteilt. Die pilzförmigen gelten als reife (Gedächtnis) Spines (Harris und Kater, 1994; Fester et al., 2009), (Abb. 4).

Die Spines bestehen aus einem Spine-Kopf "spine head", der die eigentliche Synapse enthält, und einem engen, schlauchförmigen Spine-Nacken "spine neck", (Abb.4). Ihre Länge beträgt 1-3 µm und ihr Durchmesser variiert zwischen 0.5 und 1.5 µm (Harris und Kater, 1994)

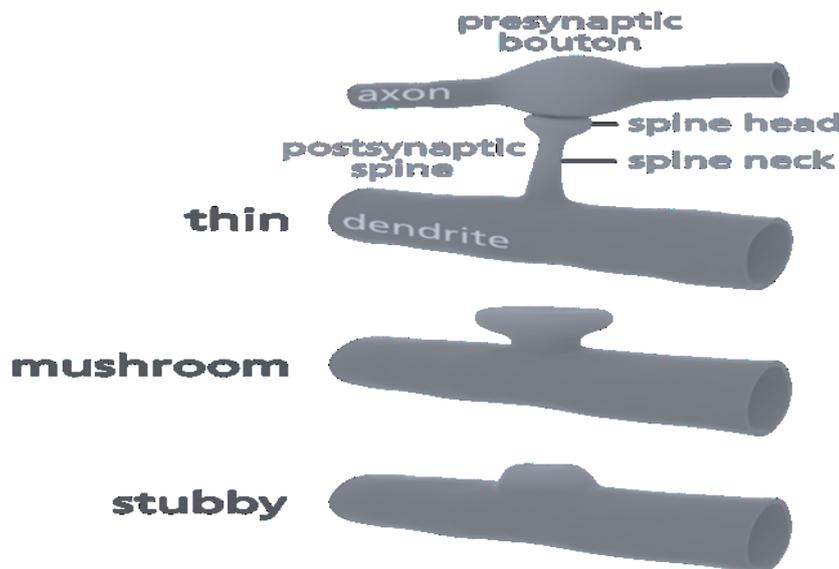


Abb. 4: Typen von Dornfortsätzen=Spines
 Quelle: wikipedia.org/wiki/ Spine [Stand 22.08.2018]

Dendritische Spines besitzen an ihrem Ende nahe der postsynaptischen Membran eine Zone, die aufgrund ihrer hohen Dichte im Elektronenmikroskop als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird. Die PSD steht im engen Zusammenhang mit dem Aktinzytoskelett (Matus et al., 1982). Sie besteht aus verschiedenen Rezeptormolekülen und Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Walikonis et al., 2000; Kennedy, 2000).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Spines ist der Spineapparat, ein Organell, das bei ca. 20 % aller Spines und am häufigsten (ca. 80%) in den pilzförmigen (reifen) Spines anzutreffen ist (Spacek und Harris, 1997; Fester et al., 2009). Er besteht aus elektronendichten Platten und glattem endoplasmatischem Retikulum "smooth sarcoplasmic reticulum" (SER) (Deller et al., 2003). Seine Funktion wird als spinespezifischer Ca^{+2} -Speicher angenommen (Vlachos et al., 2009).

Dendritische Spines können ihre Form und Größe innerhalb von Sekunden umgestalten (Fischer et al., 1998). Veränderung der Größe und Anzahl der dendritischen Spines moduliert die Intensität der Verbindungen zwischen den Neuronen (Harris et al., 2003). Dieser Prozess wird als Grundlage für Lernen und Gedächtnisbildung angenommen (Harris und Kater, 1994; Wiegert und Oertner, 2011). Die morphologische Anpassung der Spines wird durch Veränderungen der synaptischen Aktivität reguliert und ergibt sich aus Umlagerungen des Aktinzytoskeletts (Fischer et al., 1998). Dabei spielt das Gerüstprotein Aktin eine wichtige Rolle (Fifkova und Delay, 1982; Matus et al., 1982).

In zahlreichen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Synaptogenese/Spinogenese im Hippocampus vom Estrogen abhängig ist (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2007; Fester et al., 2009). So zeigten Li et al. (2004) beispielhaft, dass die Behandlung ovariectomierter Mäuse mit Estradiol zu einer Zunahme von pilzförmigen Spines im Hippocampus führt. Solche Mäuse zeigten signifikant bessere Ergebnisse in einem hippocampus-abhängigen räumlichen Gedächtnistest als die Kontrollgruppe. Zusätzlich wurde als Reaktion auf Estradiolbehandlung eine Zunahme prä- und postsynaptischer Proteine bei diesen Mäusen beobachtet (Li et al., 2004).

2.4 Synaptische Plastizität, LTP

Der Psychologe Donald O. Hebb formulierte 1949 folgendes Postulat, das als Hebb'sche Lernregel bekannt ist: "Wenn ein Axon des Neurons A nahe genug an einem Neuron B liegt, so dass Zelle B wiederholt oder anhaltend von Neuron A erregt wird, so wird die Effizienz von Neuron A für die Erregung von Neuron B durch einen Wachstumsprozess oder eine Stoffwechseländerung in beiden oder einem der beiden Neurone erhöht". Dies gilt als Grundlage der synaptischen Plastizität, d.h. Neurone

können untereinander neue Synapsen formieren oder abhängig von ihrer Aktivität die Stärke der bestehenden Synapsen modifizieren, also die Aktivität der Signalübertragung verstärken oder ruhen lassen.

Ein klassisches Beispiel einer aktivitätsabhängigen Plastizität im Sinne der Hebb'schen Regel ist die Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus. Die LTP ist dadurch charakterisiert, dass kurze regelmäßige elektrische Stimulationen von erregenden Synapsen zu einer Erhöhung der synaptischen Effizienz führen (Bliss und Lomo, 1973). LTP gilt als elektrophysiologisches Korrelat für Lern- und Gedächtnisvorgänge (Vierk et al., 2012; Bayer et al., 2015). Neben einer Erhöhung der synaptischen Effizienz kann es auch zu einer Abschwächung synaptischer Übertragung kommen, die dann als Langzeitdepression (long-term depression, LTD) bezeichnet wird.

LTP im Hippocampus wird von Estrogen induziert (Vierk et al., 2012). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Estrogensynthese mit dem Aromatasehemmer Letrozol in hippokampalen Sliceulturen weiblicher Mäuse zu einer Reduktion der LTP, gefolgt von einem signifikanten Synapsenverlust führt (Vierk et al., 2015). Diese Effekte wurden bei männlichen Mäusen nicht beobachtet, was auf sexualspezifische Wirkungen des Estrogens im Hippocampus hindeutet (Vierk et al., 2012; Brandt et al., 2013).

2.5 Synaptische Proteine

2.5.1 Synaptophysin, ein präsynaptisches Markerprotein

Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein präsynaptischer Vesikel. Sein Anteil beträgt etwa 10% des gesamten Proteingehalts synaptischer Vesikel (Gordon et al., 2011). Es wird außer im Hippocampus auch in der Netzhaut, dem Rückenmark und den Nebennieren nachgewiesen (Wiedenmann und Franke, 1985). Es steht in Interaktion mit zahlreichen synaptischen Proteinen der Präsynapse (Südhof et al., 1987; Johnston und Südhof, 1990).

Synaptophysin ist an der Exozytose der Neurotransmitter und am Recycling von synaptischen Vesikel und somit an der synaptischen Signalübertragung beteiligt (Alder et al., 1992; McMahon et al., 1996). So führte eine Bindung von Synaptophysin durch

Antikörper zu einer Reduktion der Neurotransmitterfreisetzung (Alder et al., 1992). Darüber hinaus scheint Synaptophysin bei aktivitätsabhängiger Formation von Synapsen im Hippocampus eine Rolle zu spielen (Tarsa und Goda, 2002). In diesem Zusammenhang zeigten Synaptophysin-Ko-Mäuse eine Beeinträchtigung des räumlichen Lernens und des Gedächtnisses (Schmitt et al., 2009).

Aufgrund seiner spezifischen Lokalisation in den synaptischen Vesikeln wird Synaptophysin als präsynaptischer Marker betrachtet (Brake et al., 2001; Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004). In unserem Labor konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Expression von Synaptophysin von der lokalen Estrogensynthese im Hippocampus *in vitro* reguliert wird (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Prange-Kiel und Rune, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von Synaptophysin als präsynaptischer Marker immunhistochemisch untersucht.

2.5.2 Spinophilin, ein postsynaptisches Markerprotein

Spinophilin ist ein postsynaptisches Protein, das in dendritischen Spines angereichert ist (Allen et al., 1997). Es steht in enger Beziehung zum Aktin-Zytoskelett und der Proteinphosphatase1(PP1) (Feng et al., 2000). Aufgrund dieser Beziehung wird angenommen, dass Spinophilin eine wichtige Rolle bei Bildung und Aufrechterhaltung der Spines spielt (Allen et al., 1997; Feng et al., 2000; Muly et al., 2004). Die PP1 ist an der Regulation von Glutamatrezeptoren beteiligt. Feng et al. (2000) zeigten, dass diese Regulation bei Spinophilin-Ko -Mäusen beeinträchtigt ist.

Spinophilin wurde in vorangegangenen Arbeiten als postsynaptischer Marker untersucht (Brake et al., 2001; Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2006; Kretz et al., 2004). Seine Expression ist *in vitro* von der lokalen Estrogensynthese im Hippocampus abhängig (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von Spinophilin als postsynaptischer Marker bei Mäusen nach systemischer Behandlung mit Letrozol immunhistochemisch untersucht.

2.5.3 Synaptopodin, ein postsynaptisches Protein und Marker für Spinereife

Synaptopodin ist aktin-assoziiertes postsynaptisches Protein mit hohem Anteil an der Aminosäure Prolin. Es wurde erstmals 1997 in differenzierten Podozyten der Niere und in dendritischen Spines in mehreren Regionen (Bulbus olfactorius, Hippocampus und Cortex) des Telencephalons beschrieben (Mundel et al., 1997). Seine Expression ist altersabhängig und erreicht ihr höchstes Niveau in der Adoleszenz (Mundel et al., 1997). Synaptopodin reguliert die Dynamik des Aktinzytoskeletts und spielt bei der synaptischen Plastizität eine wichtige Rolle (Deller et al., 2003; Asanuma et al., 2006; Okubo-Suzuki et al., 2008). Durch seine Assoziation mit Aktin wird Synaptopodin eine besondere Rolle bei morphologischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Rahmen der Formation neuer Synapsen zugeschrieben (Asanuma et al., 2006; Vlachos et al., 2009).

Synaptopodin ist mit der postsynaptischen Dichte (PSD) und dem Spineapparat assoziiert (Deller et al., 2000, 2003). Deller et al. (2003) zeigten, dass Synaptopodin für die Bildung von Spineapparat essentiell ist. Synaptopodin-Ko-Mäuse bilden keinen Spineapparat und zeigen eine Beeinträchtigung der LTP (Deller et al., 2003). Ein enger Zusammenhang zwischen Synaptopodin-Expression und der lokalen hippokampalen Estrogensynthese konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden (Fester et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von Synaptopodin als Marker für Spinereife untersucht.

2.6 Estrogensynthese

Zu den natürlich vorkommenden Estrogenen gehören das Estron (E1), das Estriol (E3) und das biologisch wirksamere Estradiol (E2, auch 17 β -Estradiol). Sie zählen neben Androgenen, Gestagenen, Mineralo- und Glukokortikoiden zu den Steroidhormonen, die aus Cholesterol gebildet werden. Die Estrogensynthese findet im Mitochondrium und endoplasmatischen Retikulum statt.

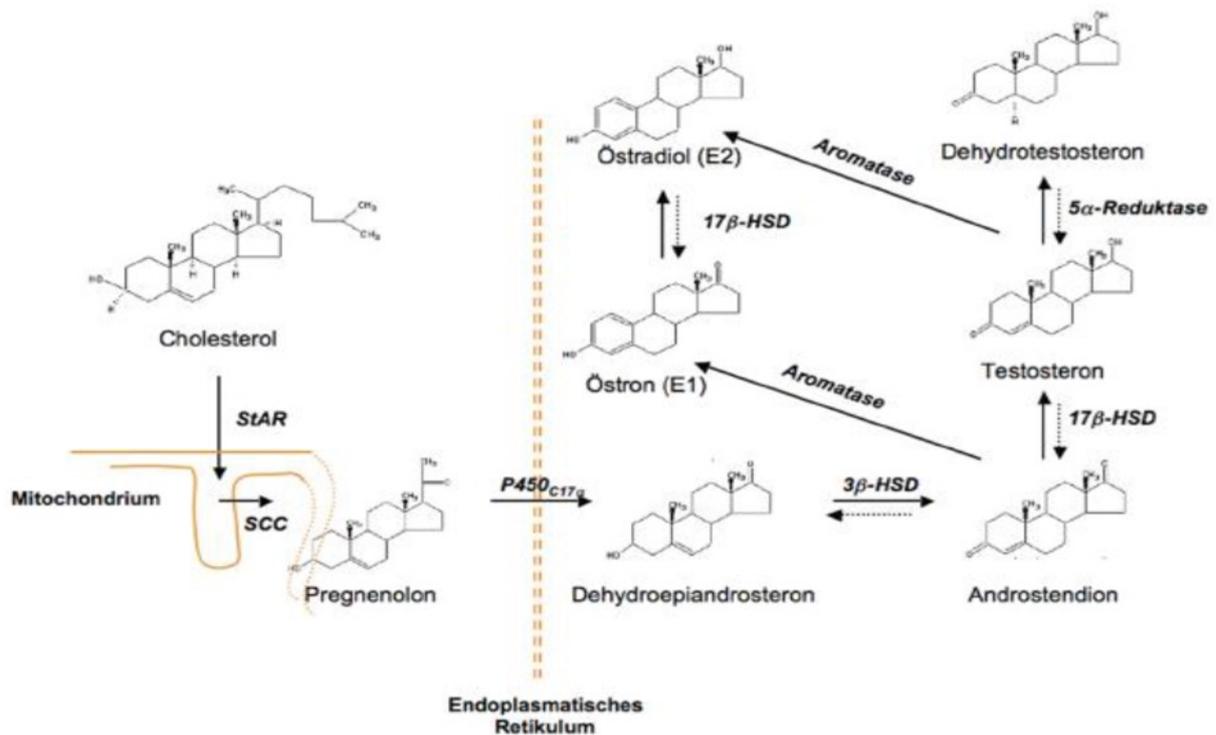


Abb. 5: Schritte der Estrogensynthese, die im Mitochondrium und endoplasmatischen Retikulum stattfindet.
 Quelle: Fester et al., 2007, Neuroforum 4/2007

Das erste Enzym (Cytochrom P450scc) der Estrogensynthese befindet sich an der inneren Membran des Mitochondriums. Das Cholesterin wird aktiv in das Innere des Mitochondriums transportiert. Dabei fungiert das Enzym StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) als Transporter. Dieser Schritt ist gleichzeitig der „rate limiting step“ der Synthese. Das transportierte Cholesterin wird nun von dem an der inneren mitochondrialen Membran lokalisierten Enzym, Cytochrom P450scc (*side chain cleavage enzyme*) in Pregnenolon umgewandelt. Die zwei darauffolgenden Synthesereaktionen werden irreversibel vom Cytochrom P450c17 (17α-Hydroxylase/c17, 20-Lyase) katalysiert, wodurch aus Pregnenolon über das Zwischenprodukt 17-Hydroypregnenolon Dehydroepiandrosteron (DHEA) entsteht. Im nächsten Schritt wird DHEA reversibel zum Androstendiol umgebaut. Diese Reaktion wird von der 17β-hydroxysteroid-Oxidoreduktase katalysiert. Anschließend wandelt die 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Androstendiol irreversibel in Testosteron um.

Die Aromatase, Cytochrom P450aro (CYP19A1), katalysiert im letzten Schritt die Abspaltung der C19-Methylgruppe und die Aromatisierung des Rings A zu Estradiol aus Testosteron (Löffler et al., 2007; Fester et al., 2007) (Abb. 5).

Estrogene entfalten ihre Wirkung über nukleäre Rezeptoren, von denen zwei Isoformen (ER- α und ER- β) bekannt sind (Kuiper et al., 1997; Shughrue und Merchenthaler, 2001; Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003). Diese sind Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung ihrer Liganden Rezeptordimere bilden und durch eine Konformationsänderung in den Zellkern gelangen. Sie binden dort spezifische DNA-Sequenzen und aktivieren somit die Transkription estrogenabhängiger Gene. Beide Estrogenrezeptoren werden im Hippocampus exprimiert (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003).

Neben dieser rezeptorvermittelten genomischen Wirkung, die einige Stunden bis Tage in Anspruch nehmen können, wurde eine Vielzahl von nicht genomischen, raschen Effekten von Estrogenen beschrieben. Für diese schnellen Wirkungen werden membranständige Estrogenrezeptoren postuliert (Toran-Allerand et al., 2002; Beyer et al., 2003). Im Rahmen dieser membranrezeptorvermittelten Estrogenwirkungen werden intrazellulär Ca^{+2} -abhängige Signalkaskaden z.B. über Proteinkinasen aktiviert. Diese nicht genomischen Wirkungen der Estrogene werden schnell innerhalb von Sekunden bzw. Minuten vermittelt (Revankar et al., 2005).

2.7 Estrogen im Hippocampus und seine Wirkung

Die Vorstellung, dass Steroidhormone, zu denen auch Estrogene zählen, im ZNS gebildet werden, liegt über 40 Jahre zurück. In diesem Zusammenhang beschrieben Naftolin et al. das Vorkommen der Aromatase in unterschiedlichen Regionen des Gehirns (Naftolin et al., 1971). Das Konzept der Neurosteroiden beschreibt Hormone, die im ZNS synthetisiert werden und lokal auf parakrinem bzw. autokrinem Wege ihre Wirkungen entfalten (Baulieu und Robel, 1990; Compagnone und Mellon, 2000; Prange-Kiel et al., 2003).

Sämtliche Enzyme, die für die Estrogensynthese notwendig sind, wurden im Hippocampus sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen (Abdelgardir et al., 1994; Furukawa et al., 1998; Stoffel-Wagner et al., 1998; Wehrenberg et al., 2001).

In unserem Labor konnte erstmals die *de novo* Synthese des Estradiols in hippocampalen Zellkulturen nachgewiesen werden (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et

al., 2004). Diese Estrogensynthese ist *in vitro* geschlechtsunabhängig und findet losgelöst von den gonadalen Estrogenen statt (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004). Es wurde sogar nachgewiesen, dass die Estradiolkonzentration im Hippocampus männlicher Ratten im Vergleich zur Serumkonzentration 6 Mal höher ist (Hojo et al., 2004).

Erste Hinweise, dass Estrogene die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflussen, wurden in den 90er Jahren von McEwen und Mitarbeiter gefunden (Gould et al., 1990; Woolley et al., 1990). Gould et al. (1990) fanden heraus, dass nach Ovariectomie von Ratten und dem dadurch bedingten Estrogenentzug eine Abnahme der Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus stattfindet. Eine Behandlung dieser Tiere mit Estradiol machte den beobachteten Spineverlust rückgängig (Gould et al., 1990). Woolley et al. (1990) berichteten über Schwankungen der Spinedichte im Hippocampus in Abhängigkeit von Estradiolspiegel im Serum während des Menstruationszyklus von Ratten. In der Proestrusphase mit der höchsten Serumkonzentration an Estradiol zeigte sich dementsprechend eine maximale Spinedichte.

Eine Arbeitsgruppe unseres Institutes um Prange-Kiel (2008) zeigte, dass die oben erwähnte Zyklusabhängigkeit der Spinedichte im Hippocampus wahrscheinlich auf zyklische Freisetzung von Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) aus dem Hypothalamus zurückzuführen ist und nicht durch Schwankungen der gonadalen Estrogene während des Menstruationszyklus bedingt ist. In hippocampalen Zellkulturen wird die lokale Estrogensynthese von GnRH dosisabhängig reguliert (Prange-Kiel et al., 2008). Mit niedrigen GnRH-Dosen kommt es zu einer Zunahme der Estrogensynthese bei gleichzeitiger Erhöhung der Spinesynapsen und der synaptischen Markerproteine Synaptophysin und Spinophilin. Dagegen bewirken hohe Dosen von GnRH eine Abnahme dieser Parameter (Prange-Kiel et al., 2008; Fester et al., 2012).

Mittels pharmakologischer Blockade der Aromatase durch Aromatasehemmer können verschiedene Effekte von Estrogen im Hippocampus untersucht werden. Nach einer Behandlung hippocampaler Zellkulturen mit Letrozol kommt es zu einem Verlust von Synapsen, Spinesynapsen und einer Downregulation synaptischer Proteine (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2013)

Zahlreiche weitere Arbeiten bestätigen den Einfluss von Estrogenen auf die synaptische Plastizität und ihre neuroprotektiven Wirkungen im Hippocampus (McEwen, 2002; Rune und Frotscher, 2005; Rune et al., 2006; Prange-Kiel und Rune 2006; Mukai et al., 2007). Außerdem sind Estrogeneffekte auf Neurogenese und Axonwachstum im Hippocampus gefunden worden (Tanapat et al., 2005; Fester et al., 2006; Von Schassen et al., 2006).

Zusammengenommen weisen aktuelle Forschungsarbeiten mehr auf die Wirkung des lokal im Hippocampus synthetisierten und nicht des peripheren (gonadalen) Estrogens bei Aufrechterhaltung der Synapsen hin (Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2008; Vierk et al., 2012; Fester et al., 2017).

2.8 Aromatase, das Schlüsselenzym der Estrogensynthese

Die Aromatase (Cytochrom-P450Aro, auch Estrogensynthase genannt) gehört zu den Cytochromen, die viele Reaktionen der Steroidsynthese und der Verstoffwechslung von Pharmazeutika katalysieren. Sie wird in verschiedenen Geweben (Gehirn, Ovarien, Hoden, Knochen, Fettgewebe und Plazenta) exprimiert (Simpson, 2004; Stoffel-Wagner et al., 1998; Stoffel-Wagner, 2001). Das Aromatase-Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 15q21.1 lokalisiert. Die Aromatase ist am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und katalysiert dort den letzten Schritt der Estrogensynthese aus Androgenen, dabei spaltet sie, wie oben im Abschnitt 2.6 bereits beschrieben, die C19-Methylgruppe von Testosteron ab und aromatisiert den Ring A, sodass 17 β -Estradiol (E2) als Endprodukt entsteht (Vgl. Abb. 5, S.18)

Im Hippocampus ist die Aromatase sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen (Abdelgadir et al., 1994; Wehrenberg et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2016).

Sie besitzt im Hippocampus neuroprotektive Eigenschaften (Azcoitia et al., 2001; Garcia-Sigura et al., 2003; Garcia-Sigura, 2008). Darüber hinaus spielt sie eine wichtige Rolle bei den estrogenvermittelten Effekten in der Neurogenese (Fester et al., 2006), beim Axonwachstum (Von Schassen et al., 2006) und reguliert die Synthese

von synaptischen Proteinen (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2013).

Die Regulation der Aromataseaktivität ist komplex und noch nicht vollständig verstanden (Roselli et al., 2009; Fester et al., 2016). Zum einen wird ihre Aktivität auf einem langdauernden genomischen Weg reguliert. Die Transkriptionskontrolle des Aromatase-Gens wird von Hormonen, Zytokinen, und weiteren gewebespezifischen Faktoren reguliert (Simpson, 2004). Dieser genomische Mechanismus kann Stunden bis Tage in Anspruch nehmen. Zum anderen konnte auch gezeigt werden, dass die Aktivität der Aromatase schnell innerhalb von Sekunden über ihre Phosphorylierung durch Ca^{2+} -transienten reguliert werden kann (Balthazart et al., 2005; Fester et al., 2016, 2017). Ihre Phosphorylierung wird über eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von Proteinkinasen (PK) wie PK-A und PK-C induziert. Die Phosphorylierung der Aromatase und damit ihre Inaktivierung kann auch durch Magnesium und ATP erfolgen (Balthazart et al., 2005, 2006). Fester et al. (2016) zeigten, dass die Behandlung von hippocampalen Zellkulturen mit Letrozol zu einer Phosphorylierung der Aromatase und damit zur Reduktion ihrer Aktivität führte. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Expression der Aromatase nach solcher Behandlung gemessen. Sie schlussfolgerten, dass die Estrogensynthese durch die Aromatase im Hippocampus auch autokrin reguliert wird (Fester et al., 2016).

2.9 Aromatasehemmer in der Therapie des Mammakarzinoms

Jährlich wird in Deutschland bei ca. 70.000 Frauen die Diagnose Mammakarzinom neu gestellt (Zentrum für Krebsregisterdaten, RKI, 2012). Bei zwei Drittel dieser Mammakarzinome fungieren die Estrogene als Wachstumsfaktor (Höffken, 1999). Sie sind nicht nur ein wichtiger Wachstumsfaktor für viele Mammakarzinome, sondern begünstigen auch deren Entstehung (Fuhrmann et al., 2012). Vor diesem Hintergrund nimmt die antiestrogene Therapie einen wichtigen Stellenwert in der Behandlung hormonsensibler Mammakarzinome ein. Verschiedene Therapieoptionen stehen in diesem Zusammenhang zu Verfügung. Die Aromatasehemmer blockieren den letzten Schritt der Estrogensynthese und führen auf dieser Weise zu einem Estrogenentzug. In den aktuellen S3-Leitlinien werden sie als first-line-Therapie bei hormonsensiblen

Mammakarzinomen von postmenopausalen Frauen empfohlen (S3-Leitlinien Mammakarzinom, 2017). In klinischen Studien konnte außerdem neben einer höheren Verträglichkeit auch eine bessere Antitumorwirkung der Aromatasehemmer gegenüber der Therapie mit dem Estrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen gezeigt werden (Cuzick et al., 2010).

Die z.Z. in der Therapie hormonabhängiger Mammakarzinome eingesetzten Aromatasehemmer (AI) der dritten Generation werden in steroidale und nicht-steroidale eingeteilt. Zu den steroidalen AI zählt das Exemestan, das die Aromatase irreversibel hemmt. Anastrozol und das in der vorliegenden Arbeit verwendete Letrozol sind nichtsteroidale AI (Abb. 6, Strukturformel von Letrozol). Sie binden kompetitiv an die Häm-Gruppe der Cytochrom-P450-Untereinheit und hemmen das Enzym so reversibel (Höffken, 1999).

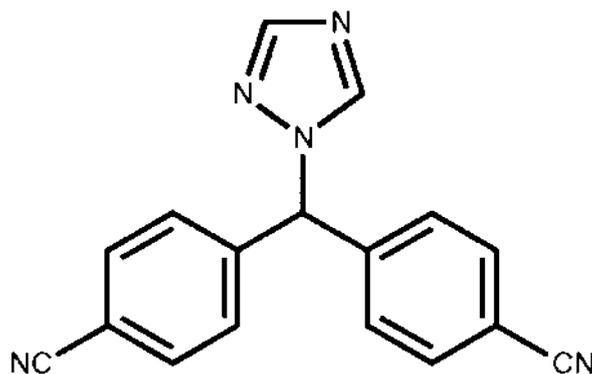


Abb. 6: Strukturformel von Letrozol
Quelle: <http://www.drugs.com/pro/femara.html>. [Stand 18.08.2017]

Die Aromatase-vermittelte Estrogensynthese hat wie bereits erwähnt neuroprotektive Effekte und beeinflusst die synaptische Plastizität im Hippocampus (Azcoita et al., 2001; Garcia-Segura et al., 2003, Rune und Frotscher, 2005; Fester et al., 2006). Damit stellt sich die interessante Frage, ob eine Behandlung mit AI die Estrogen-vermittelten Effekte auf die synaptische Plastizität im Hippocampus negativ beeinflussen könnte.

Tatsächlich wurde in diesem Zusammenhang in klinischen Studien bei Frauen, die mit AI behandelt wurden, z.B. eine Verschlechterung des Gedächtnisses beobachtet (Shilling et al., 2003; Jenkins et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von den synaptischen Proteinen, (Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin) und deren Einfluss auf die synaptische Plastizität im Hippocampus von Mäusen nach systemischer Behandlung mit dem Aromatasehemmer Letrozol untersucht.

2.10 Fragestellung

In vorangegangenen Erläuterungen wurde dargelegt, dass Estrogene zur Entwicklung eines Mammakarzinoms beitragen können. Estrogene stimulieren die Zellproliferation und erhöhen die Anzahl genetischer Mutationen im Verhältnis zu mitotischen Teilungen so, dass genetische Mutationen bei gleichzeitig bestehendem Einfluss auf das Wachstum überproportional zunehmen. Eine alternative Hypothese ist, dass Estrogene direkt zu genotoxischen Substanzen metabolisiert werden (Yue et al., 2005). Vor diesem Hintergrund kann der Einsatz von AI in der Therapie des Mammakarzinoms gegenüber der Therapie mit Antiestrogenen, die Estrogenrezeptoren blocken, ohne die Estradiolkonzentration zu verändern, als überlegen eingeschätzt werden. Aromatasehemmer werden daher zunehmend in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt.

Da in vorausgegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass AI *in vitro* zu einer Abnahme von Synapsen und synaptischen Proteinen im Hippocampus führt (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004, Prange-Kiel et al., 2006, 2009), soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob dieser Effekt nach systemischer Gabe von Letrozol, einem potenten Aromatasehemmer, in Mäusen ebenfalls nachweisbar ist. Es sollen dabei weibliche, männliche und ovariectomierte Mäuse untersucht werden, da Aromatasehemmer vorwiegend bei postmenopausalen Frauen eingesetzt werden, da anderenfalls diese Therapie mit einer bestehenden Reproduktionsfähigkeit interagiert.

In der vorliegenden Arbeit soll also geklärt werden, ob eine systemische Behandlung von Mäusen mit Letrozol auch *in vivo* zu einer Verminderung der Expression synaptischer Proteine wie Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin im Hippocampus führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, eine mögliche Erklärung der beobachteten kognitiven Störungen bei Frauen unter der Therapie mit Aromatasehemmern zu liefern und in Zusammenschau anderer Untersuchungen die geschlechtsspezifische Estrogenwirkung im Hippocampus besser zu verstehen.

3. Material, Geräte, Chemikalien und Lösungen

3.1 Material und Geräte

Aluminiumfolie	Materiallager UKE
Cryo-Star HM 560 M	MICROM International GmbH, Deutschland
Cutfix Scalpel	BRAUN
Deckgläser Marienfeld 100, 24x32mm	MARIENFELD
Einmalspritzen, verschiedene Größen	BRAUN
Ep TIPS, verschiedene Größen	Eppendorf AG
Gefrierschrank	LIEBHERR
Handschuhe	KIMBERLY-CLARK
Heidemannspatel	AESULAP DE
Instrumentenkasten	Merck
Kühlschrank, 4°C	BOSCH
Kühlschrank, -20°C,-25°C	LIEBHERR
Mikroskop LSM Axiovert	Zeiss, Deutschland
Openlab 3.1.5 Software	Improvision, Coventry, UK
Pasteurpipetten, 25cm	Merck
Pinzette	Merck
Pipetten, verschiedene Volumina	Gilson
Pipettenspitzen	BECTON DICKINSON, LABWARE
Schere	AESULAP DE
Waage	SARTORIUS
Windows 2000	Microsoft

Windows 10	Microsoft
Word 2003	Microsoft
Word 2016	Microsoft
Zellstofftücher	WEPA

3.2 Chemikalien

Aceton	Baker
BSA	SIGMA
Aqua dest.	BAXTER Deutschland
Cy3, monoclonal, goat anti mouse	JACKSON
Cy3, polyclonal, goat anti rabbit	JACKSON
DAPCO	SIGMA
DAPI	SIGMA
Formaldehydlösung	MERCK
Letrozol	NOVARTIS
Natronlauge	MERCK
PBS Tabletten	GIBCO
Salzsäure	MERCK
Spinophilin, polyclonal, Host: rabbit	Upstate, Biotechnologie
Synaptophysin, monoclonal, Host: mouse	Chemicon, Hofheim
Synaptopodin, monoclonal, Host: mouse	PROGEN Biotechnik

3.3 Lösungen

BSA

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

PBS:

- 8g NaCl
- 0,2g KCl
- 1,44 Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2g Kaliumhydrogenphosphat
- 1Liter Aqua dest.
- PH bei 7,4 bei RT

PBS alternativ:

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

PFA (Paraformaldehyd) 4%ig:

- 4g Paraformaldehyd
- 50ml H₂O, 15min. auf 60-65°C erhitzen
- 10M NaOH(1Tropfen)
- Auf Eis abkühlen
- 50ml 2XPBS zugeben, PH 7,4 bei RT

DABCO:

- 50% Glycerol in PBS
- 2,5g DABCO auf 10 ml Glycerol-PBS

4. Methoden

4.1 Verwendete Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle Untersuchungen Mäuse des Zuchtstamms C57/Bl6 (Charles River, Germany) im Alter von 12 Wochen verwendet. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Wasser und Futter stand ihnen *ad libitum* zur Verfügung. Alle Experimente wurden gemäß den geltenden gesetzlichen Bestimmungen für den Tierschutz und im Einvernehmen mit der Ethikkommission durchgeführt.

Insgesamt wurden sechs Gruppen bestehend aus jeweils 5 Versuchstieren (n=5) gebildet. Zwei Gruppen aus männlichen und weiblichen Mäusen wurden als Kontrolle definiert und nur mit einer Trägerlösung behandelt. Zwei weitere weibliche und männliche Gruppen wurden mit Letrozol behandelt. Um die Effekte gonadaler Estrogene auszuschalten, wurden die Tiere der fünften und sechsten Gruppe ovariectomiert. Eine Gruppe aus ovariectomierten Mäusen diente als Kontrolle. Diese Mäuse wurden ebenfalls mit der Trägerlösung behandelt. Die zweite Gruppe aus ovariectomierten Mäusen wurde mit Letrozol behandelt (Siehe hierzu Abschnitt 4.2).

Die Gruppen werden bei Darstellung der Ergebnisse wie folgt bezeichnet:

Gruppe 1: weibliche Kontroll-Mäuse: Behandlung mit Trägerlösung; *w*

Gruppe 2: männliche Kontroll-Mäuse: Behandlung mit Trägerlösung; *m*

Gruppe 3: weibliche Mäuse: Behandlung mit Letrozol; *w+l*

Gruppe 4: männliche Mäuse: Behandlung mit Letrozol; *m+l*

Gruppe 5: ovariectomierte Kontrollmäuse: Behandlung mit Trägerlösung; *ovx*

Gruppe 6: ovariectomierte Mäuse: Behandlung mit Letrozol; *ovx+l*

4.2 Behandlung der Versuchstiere mit Letrozol

Zu Beginn der Behandlung mit Letrozol waren die Tiere 12 Wochen alt. Die Ovariectomie der Tiere war bereits eine Woche vor Beginn der Behandlung mit Letrozol bzw. der Trägerlösung durchgeführt worden. Die Mäuse waren mit einer Injektion von 3,3 ml / kg / KG einer Ketamin-Xylazin-Mischung (Ketamin 12 mg / ml, Xylazin 0,16% in Kochsalzlösung intraperitoneal) tief betäubt und danach ovariectomiert worden.

Die Behandlung weiblicher, männlicher und ovariectomierter Mäuse mit Letrozol erfolgte intraperitoneal täglich zur gleichen Zeit (morgens) in einer Dosis von 40µg/ Kg/ KG in 0,05 ml Alkohol und 0,05 ml 0,9% NaCl über 4 Wochen. Die Kontrollgruppen erhielten nur eine Trägerlösung (0,05 ml Alkohol (96%) und 0,05 ml 0,9% NaCl). Am Ende der Behandlungsperiode wurden die Tiere mit einer Injektion von Ketamin-Xylazin-Mischung effektiv betäubt und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS zur Immunhistochemie transkardial perfundiert, um im nächsten Schritt das Gehirn zu entnehmen und die Hippocampi der Mäuse zu präparieren.

4.3 Präparation der Hippocampi von Mäusen

Die Präparation der Hippocampi wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Das Schädeldach wurde mit einer geraden Schere eröffnet. Mit einer Pinzette wurden die Reste des Schädeldaches entfernt, ohne cerebrale Strukturen zu verletzen.

Im nächsten Schritt wurde das Gehirn mit einem Heidemannspatel dem Schädel entnommen. Die entnommenen Gehirne wurden auf einen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) getränkten Schwamm gelegt. Mit einem Skalpell wurde das Kleinhirn entfernt und die beiden Großhirnhälften entlang des Interhemisphärenspaltes durchtrennt. Die einzelnen Hirnhälften wurden in 2-Methyl-Buthan schockgefroren und anschließend bei -25°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

4.4 Vorbereitung der Schnitte für die Immunhistochemie

Mit Hilfe des Kryostaten (Cryo-Star HM560M, MICROM International GmbH, Germany) wurden von den Gehirnhälften entlang der Hippocampi sagittal 20µm dicke Schnitte hergestellt, die einzeln auf Objektträger gezogen und bei RT getrocknet wurden. Anschließend wurden die Objektträger in kaltem Aceton im Kühlfach für 10 Minuten fixiert. Im nächsten Schritt wurde die Acetonlösung entfernt und die Schnitte wurden für weitere 10 Min. an der Luft getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die so fixierten Schnitte bei -20°C gelagert.

4.5 Immunhistochemie

In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen verwendet, um die Expression von Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin zu quantifizieren. Für jede Versuchsreihe wurden jeweils 3 Schnitte pro Gruppe untersucht. Es wurden zwei Versuchsreihen für jedes Protein durchgeführt, also insgesamt 6 Präparate pro Gruppe (n=6).

Nach Entnahme aus dem Gefrierschrank wurden die Gewebeschnitte für ca. 30 Min. bei RT aufgetaut und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 3 Mal je 5 Min. mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt des immunhistochemischen Versuchs erfolgte eine Blockierung mit BSA (Verdünnung 3:100 in PBS), um unspezifische Immunreaktionen zu verhindern. Dazu wurde jeder Schnitt mit 50µl der Blockierungslösung für 30 Min. behandelt. Danach wurden die Primärantikörper zugegeben. Die eingesetzten Primärantikörper sind Anti-Synaptophysin (monoklonal, in einer Verdünnung 1:750 in PBS), Anti-Spinophilin (polyklonal, in einer Verdünnung 1:500 in PBS) und Anti-Synaptopodin (Monoklonal, unverdünnt). Auf jeden Schnitt wurden 50µl von Anti-Synaptophysin und Anti-Spinophilin bzw. 30µl von Anti-Synaptopodin gegeben. Die Negativkontrolle wurde ohne Primärantikörper weiter behandelt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht für mind. 12 h bei 4°C im Kühlschrank. Am nächsten Tag wird die Lösung mit dem ersten Antikörper vorsichtig ausgewaschen, dann die Schnitte erneut 3 Mal für jeweils 5 Min. gespült.

Im Anschluss erfolge die Zugabe des Sekundärantikörpers. Hierfür wurden Cy3-markierte Antikörper (für Synaptophysin- und Synaptopodin-Versuchsreihe ein monoclonaler Cy3-AK; goat anti mouse), (für Spinophilin-Versuchsreihe polyclonaler Cy3-AK; goat anti rabbit) in einer 1:350 Verdünnung verwendet. Die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei RT. Dieser Schritt wurde im Dunkeln durchgeführt, damit es zu keiner Ausbleichung der Färbung kommt. Anschließend wurde die Lösung wieder entfernt und die Schnitte erneut 3 Mal für jeweils 5 Min. mit PBS gespült. Danach wurden die Kerne mit DAPI (Verdünnung 1:100.000 in PBS) gefärbt. Die Einwirkzeit der DAPI-Lösung betrug 3 Minuten. Im nächsten Schritt erfolgte ein erneuter Spülvorgang wie oben beschrieben. Danach konnten die Schnitte mit DABCO und einem Deckglas eingedeckt werden. Bis zur mikroskopischen Bearbeitung wurden die fertigen Schnitte im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

4.6 Bildanalyse und Statistik

Die Bildaufnahme wurde mit einem Laser Scanning Mikroskope (LSM, Axiovert, Zeiss, Deutschland) durchgeführt. Zuerst wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop die aufzusuchenden Regionen (CA1 und CA3) dargestellt. Dabei wurden zuerst die Zellkerne mit dem DAPI-Filter anhand der blau erscheinenden Farbe unter dem Mikroskop eingestellt. Die an konkaven Seite von Pyramidenzellband liegende Schicht, also das Stratum radiatum, zeigte sich mit dem Cy3-Filter rötlich. Die Bilder wurden in Stratum radiatum der CA1- und der CA3-Region im Hippocampus aufgenommen. Es wurden durchschnittlich 3-4 Aufnahmen in jeder Region gefertigt. Dabei wurde ein HeNe LASER mit einer Wellenlänge von 543 nm verwendet. Zu Beginn der Aufnahmen wurden alle Einstellungen anhand der Negativkontrolle, die wie oben beschrieben ohne den primären AK weiterbearbeitet wurde, am Mikroskop gespeichert und für die weiteren Messungen aller Gruppen beibehalten, damit die Ergebnisse untereinander vergleichbar sind.

Die angefertigten Aufnahmen wurden im Anschluss mit einem speziellen Software-Programm (*open lab 3.1.5* von Improvision) weiterbearbeitet. Mit diesem Programm kann die Farbintensität der Bilder in Zahlen umgewandelt werden, wodurch eine Quantifizierung der Proteine in den einzelnen Tiergruppen möglich wird.

Die mit diesem Programm ermittelten Werte wurden in eine *Excel*-Tabelle übertragen. Es wurden die Mittelwerte, Standardabweichung (SEM, *standard error in mean*) zur graphischen Darstellung ermittelt.

In der graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde die Farbintensität als *Staining index* der zu Kontrolle dienenden weiblichen und männlichen Mäusen mit 100% gleichgesetzt und die der anderen Gruppen prozentual zur Kontrolle berechnet. Hier ergibt sich die Einheit *relativer staining index in % of control*, die auf der Y-Achse ablesbar ist. Die X-Achse definiert die untersuchten Gruppen.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm (SPSS 13.0.). Dabei wurde die Varianzanalyse mit ANOVA durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\leq 5\%$ ($P < 0,05$) bestimmt.

5. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine immunhistochemische Quantifizierung von synaptischen Markerproteinen Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus von Mäusen nach 4-wöchiger Behandlung mit dem reversiblen Aromatasehemmer Letrozol.

Da bereits in vorangehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe *in vitro* gezeigt wurde, dass eine Hemmung der Aromatase mittels Letrozol in hippokampalen Zellkulturen zu einer Herunterregulation dieser Proteine führt (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009), soll in dieser Arbeit der Effekt einer solchen Behandlung *in vivo* untersucht werden.

5.1 Expression von Synaptophysin

Synaptophysin ist ein präsynaptisches Vesikelprotein, das als Marker für die präsynaptische Seite (Boutons) mehrfach untersucht wurde (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Fester et al., 2009). Seine immunhistochemische Intensität haben wir - wie bereits beschrieben - nach 4-wöchiger Behandlung der Versuchstiere mit Letrozol untersucht. Die immunhistochemische Intensität von Synaptophysin präsentiert sich als punktförmige Anreicherung im Stratum radiatum der CA1- und CA3-Region, wie in Abb.7 beispielhaft von einer weiblichen Maus aus der Kontrollgruppe dargestellt ist.

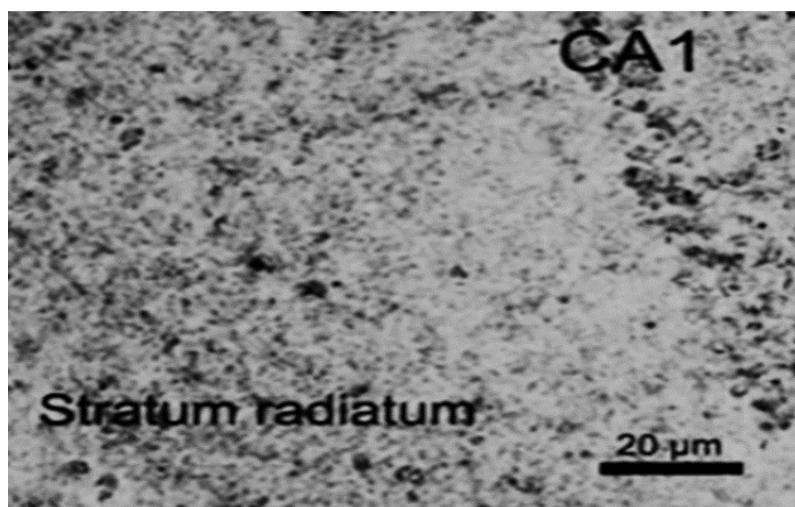


Abb. 7: immunhistochemische Intensität von Synaptophysin als punktförmige Anreicherung in Stratum radiatum in CA1-Region einer weiblichen Kontrollmaus(w)
Quelle: Institut für Neuroanatomie, UKE, Hamburg

Die graphische Darstellung in Abb. 8 zeigt die Expression von Synaptophysin in CA1 als *staining index* (Y-Achse).

Nach systemischer Applikation von Letrozol kam es zu einer signifikanten Abnahme von Synaptophysin sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den mit Letrozol behandelten ovariectomierten Mäusen zeigte sich dagegen eine signifikante Hochregulierung von Synaptophysin im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe.

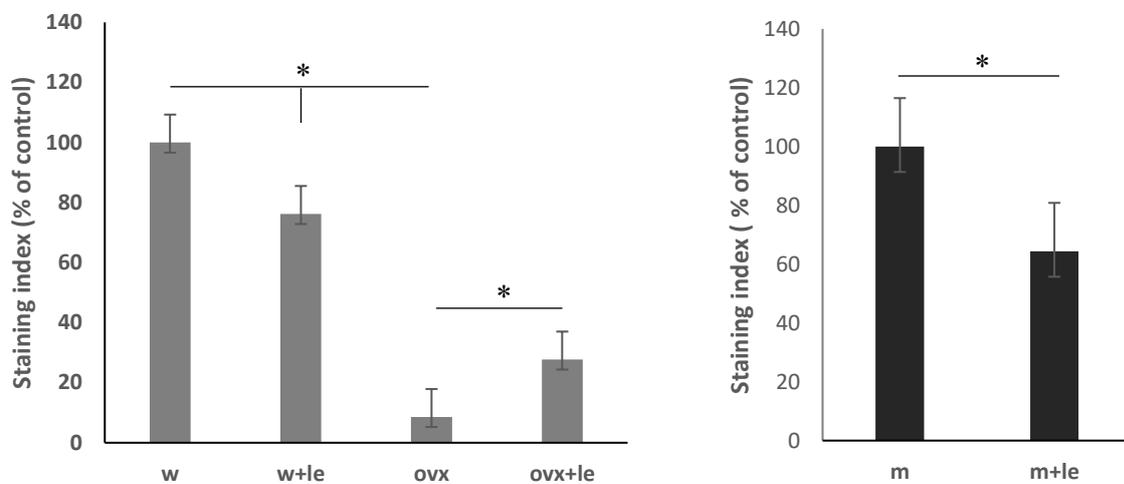


Abb. 8: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von Synaptophysin in der CA1-Region des Hippocampus mit Letrozol behandelte Mäuse (w+le, m+le, ovx+le) im Vergleich zu Kontrollmäusen (w, m, ovx), Mittelwert± SEM, (*p ≤ 0,05).

Der Abb. 9 ist die Messung der Synaptophysin-Expression in der CA3-Region zu entnehmen. Es zeigte sich nach Letrozolbehandlung ebenfalls eine signifikante Abnahme von Synaptophysin sowohl bei cyclischen weiblichen als auch bei männlichen Mäusen. Bei mit Letrozol behandelten ovariectomierten Mäusen war dagegen eine signifikante Hochregulation von Synaptophysin im Vergleich zu den ovariectomierten Kontrolltieren zu beobachten.

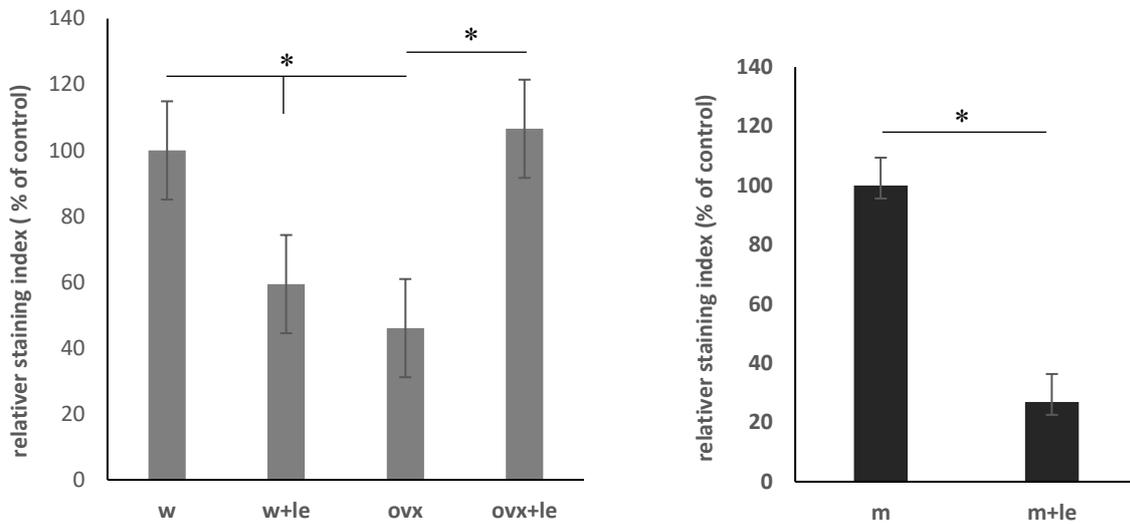


Abb. 9: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von Synaptophysin in der CA3-Region des Hippocampus von behandelten Mäusen mit Letrozol (w+le, m+le, ovx+le) im Vergleich zu Kontrollmäusen (w, m, ovx), Mittelwert \pm SEM, (* $p \leq 0,05$).

5.2 Expression von Spinophilin

Spinophilin ist ein postsynaptisches Protein, das in den dendritischen Spines angereichert ist (Allen et al., 1997). Es spielt bei Bildung und Aufrechterhaltung der Spines eine wichtige Rolle (Feng et al., 2000; Muly et al., 2004). Die Expression von Spinophilin untersuchten wir ebenfalls in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus.

Abb.10 zeigt beispielhaft die Immunreaktivität von Spinophilin als punktförmige Anreicherung in der CA1-Region weiblicher Maus aus der Kontrollgruppe.

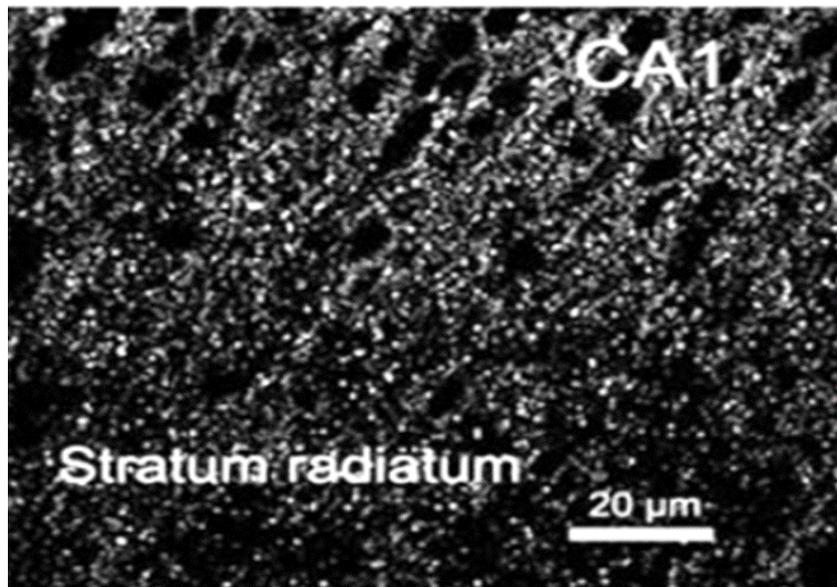


Abb. 10: immunohistochemische Intensität von Spinophilin als punktförmige Anreicherung in Stratum radiatum der CA1-Region einer weiblichen Kontrollmaus(w).
Quelle: Institut für Neuroanatomie, UKE, Hamburg

Abb. 11 zeigt die Synthese von Spinophilin als *staining index* in der CA1-Region. Letrozolbehandlung von Mäusen über einen Zeitraum von 4 Wochen führte zu einer signifikanten Abnahme von Spinophilin. Dieser Effekt war sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Mäusen zu beobachten.

Die Behandlung ovariectomierter Mäuse mit Letrozol ergab dagegen eine signifikante Zunahme der Immunreaktivität von Spinophilin im Vergleich zu ovariectomierten Kontrollmäusen.

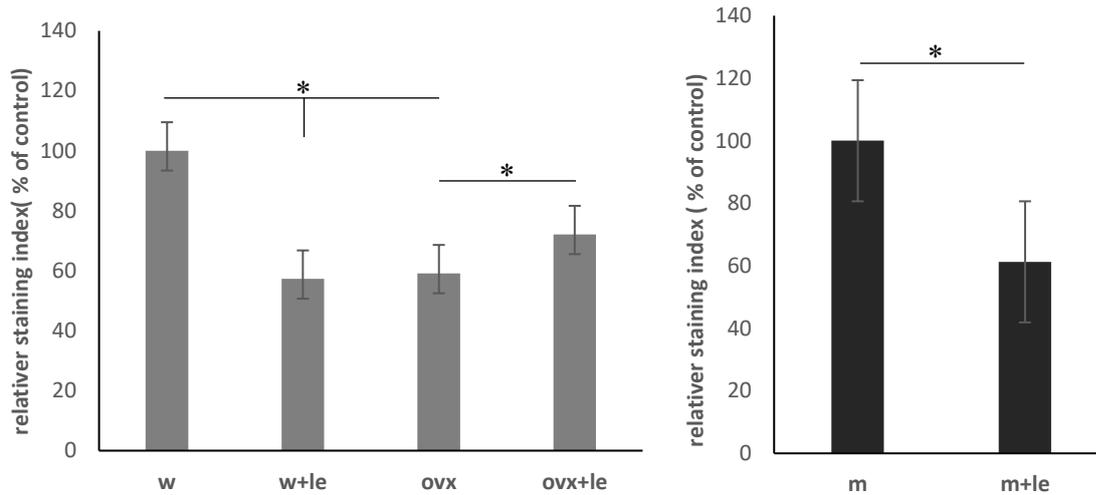


Abb. 11: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von Spinophilin in der CA1-Region des Hippocampus von behandelten Mäusen mit Letrozol (w+le, m+le, ovx+le) im Vergleich zu Kontrollmäusen (w, m, ovx). Mittelwert \pm SEM, (* $p \leq 0,05$).

In der Abb. 12 ist die Expression von Spinophilin in der CA3-Region dargestellt. Systemische Behandlung weiblicher und männlicher Mäuse führte zu einer signifikanten Abnahme von Spinophilin. Dieser Effekt wurde bei den mit Letrozol behandelten ovariectomierten Mäusen nicht beobachtet. Es zeigte sich hier eine signifikante Hochregulation von Spinophilin im Vergleich zu ovariectomierten Kontrollmäusen.

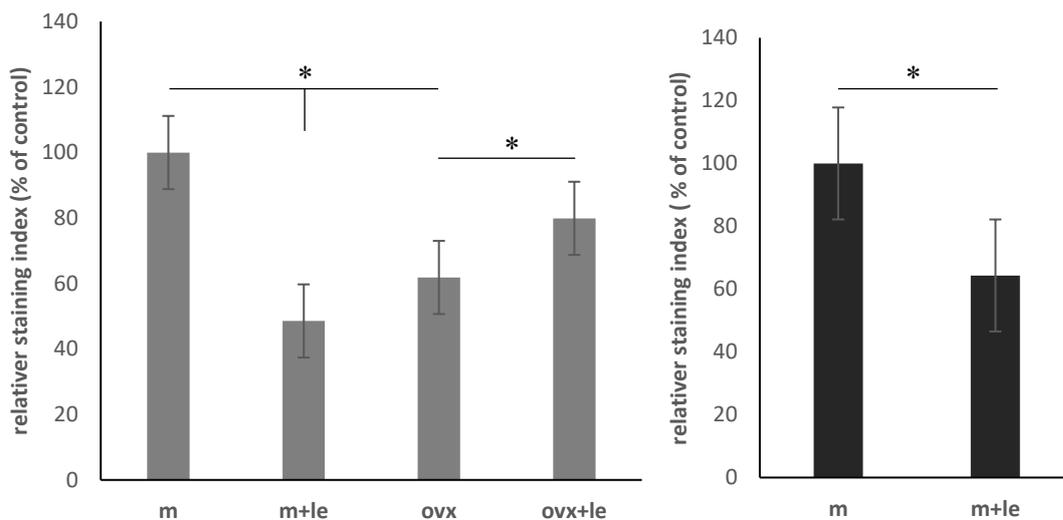


Abb. 12: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von Spinophilin in der CA3-Region des Hippocampus von behandelten Mäusen mit Letrozol (w+le, m+le, ovx+le) im Vergleich zu Kontrollmäusen (w, m, ovx). Mittelwert \pm SEM, (* $p \leq 0,05$).

5.3 Expression von Synaptopodin

Synaptopodin ist ein postsynaptisches Protein, das als Marker für reife (pilzförmige) Spines angesehen wird (Deller et al., 2003) und in ca. 80% dieser Spines nachweisbar ist. Es nimmt eine wichtige Rolle im Rahmen der synaptischen Plastizität ein (Fester et al., 2016, 2017). Ferner konnte gezeigt werden, dass seine Expression von der Aromataseaktivität abhängt (Fester et al., 2009, 2016). In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir *in vivo* die Synthese von Synaptopodin immunhistochemisch in CA1 und CA3 des Hippocampus nach Hemmung der Aromatase mit Letrozol.

Abb. 13 zeigt beispielhaft die immunhistochemische Darstellung von Synaptopodin als punktförmige Anreicherung in der CA1-Region eines weiblichen Hippocampus aus der Kontrollgruppe.

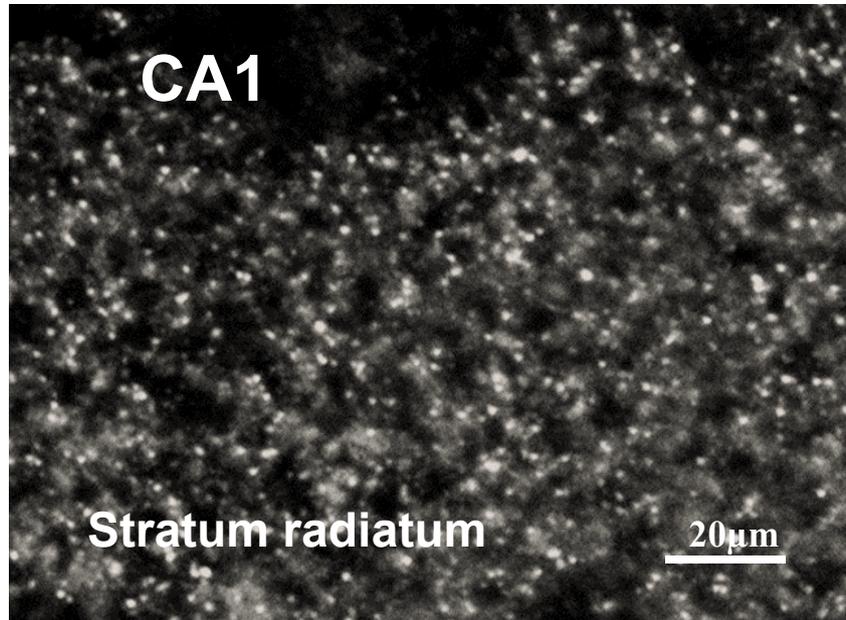


Abb. 13: Immunhistochemische Intensität von Synaptopodin als punktförmige Anreicherung in Stratum radiatum der CA1-Region einer weiblichen Kontrollmaus(w).

Abb. 14 zeigt die Expression von Synaptopodin in der CA1-Region an. Nach systemischer Behandlung von Mäusen mit Letrozol beobachteten wir eine signifikante Abnahme von Synaptopodin sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Versuchstieren. Ovarektomierte mit Letrozol behandelte Mäuse zeigten dagegen eine Hochregulation von Synaptopodin im Vergleich zur ovarektomierten Kontrollgruppe.

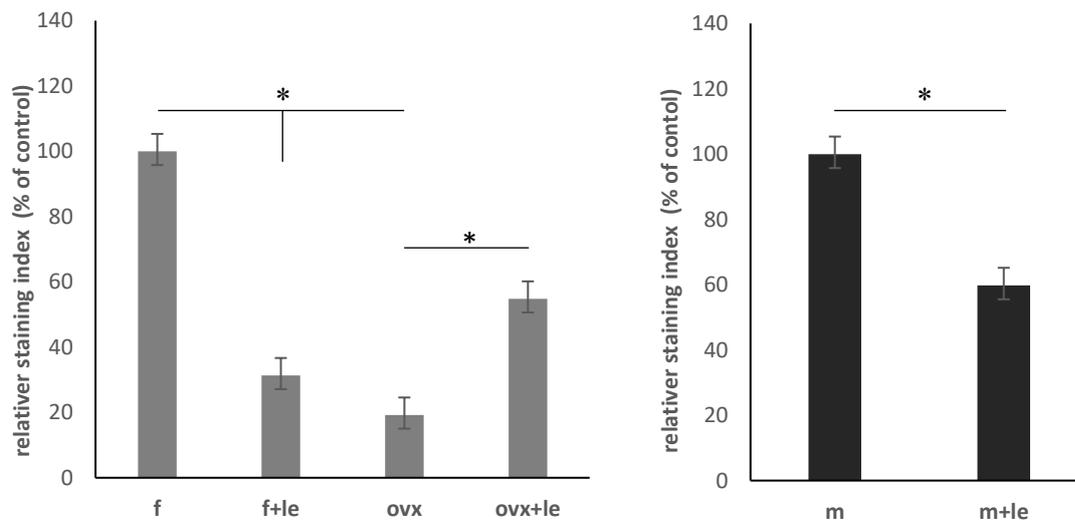


Abb. 14: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von Synaptopodin in der CA1-Region des Hippocampus von behandelten Mäusen mit Letrozol (w+le, m+le, ovx+le) im Vergleich zu Kontrollmäusen(w, m, ovx). Mittelwert \pm SEM, (* $p \leq 0,05$).

In der Abb. 15 ist die Synthese von Synaptopodin in der CA3-Region als *staining index* dargestellt. Letrozol-Behandlung führte bei weiblichen und männlichen Mäusen zu einer signifikanten Abnahme von Synaptopodin. Bei ovarektomierten Mäusen war nach Letrozolbehandlung eine Zunahme von Synaptopodin im Vergleich zur ovarektomierten Kontrollgruppe zu beobachten.

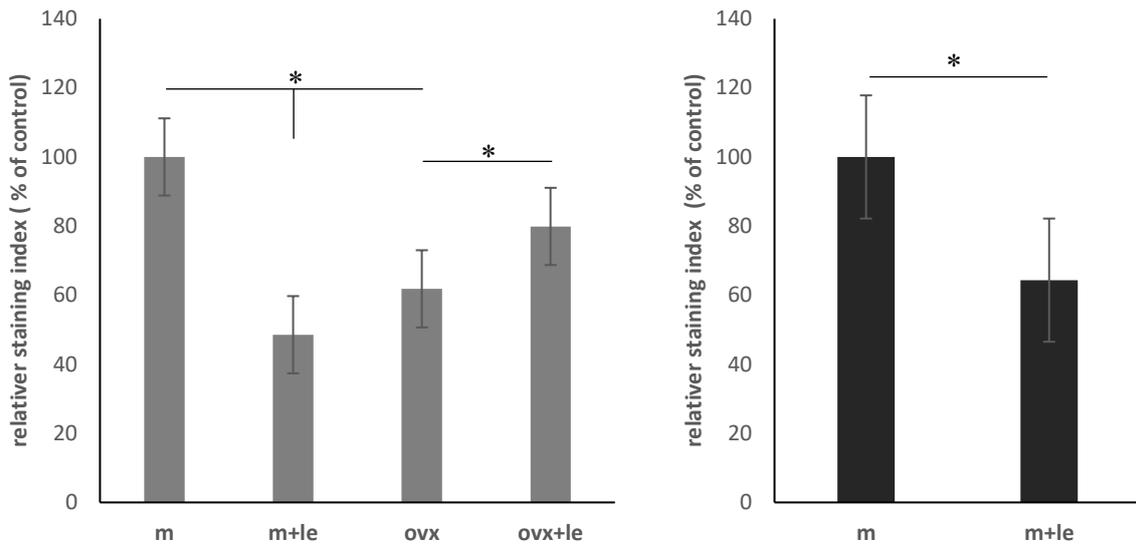


Abb. 15: Quantitative Auswertung der Immunreaktivität von Synaptopodin in CA3-Region des Hippocampus von behandelten Mäusen mit Letrozol (w+le, m+le, ovx+le) im Vergleich zu Kontrollmäusen(w, m, ovx). Mittelwert± SEM, (*p ≤ 0,05)

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Abb.16 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von Synaptophysin in CA1 und CA3 zusammen dargestellt.

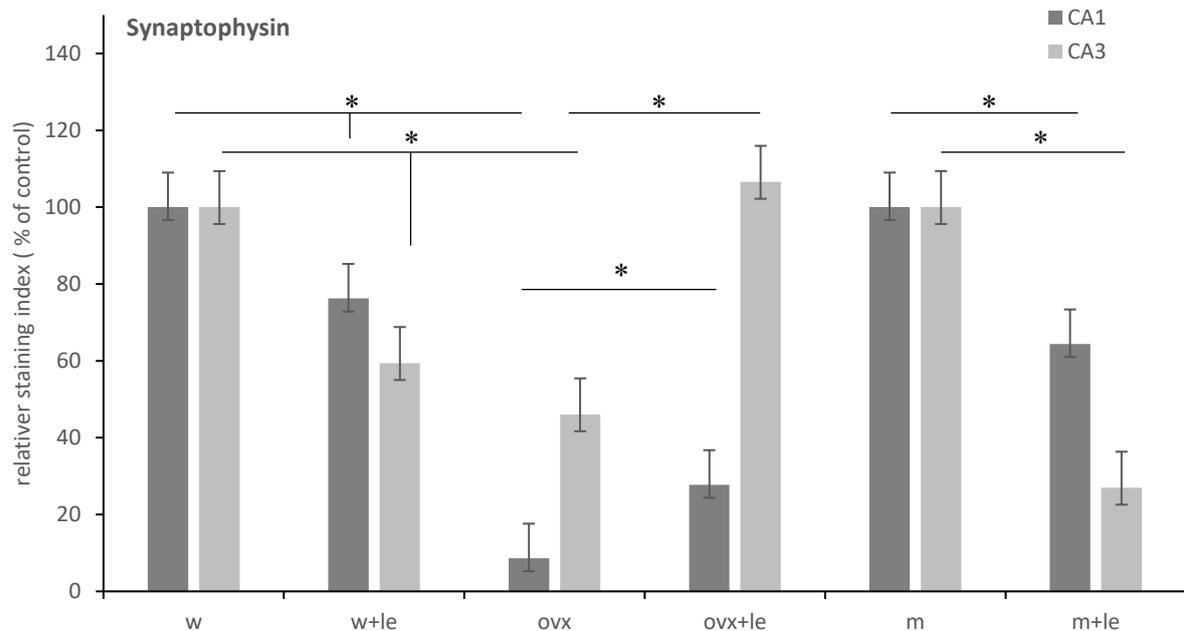


Abb. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expression von Synaptophysin in CA1 und CA3. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin. (*p ≤ 0,05).

In der Abb. 17 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von Spinophilin in CA1 und CA3 zusammen dargestellt.

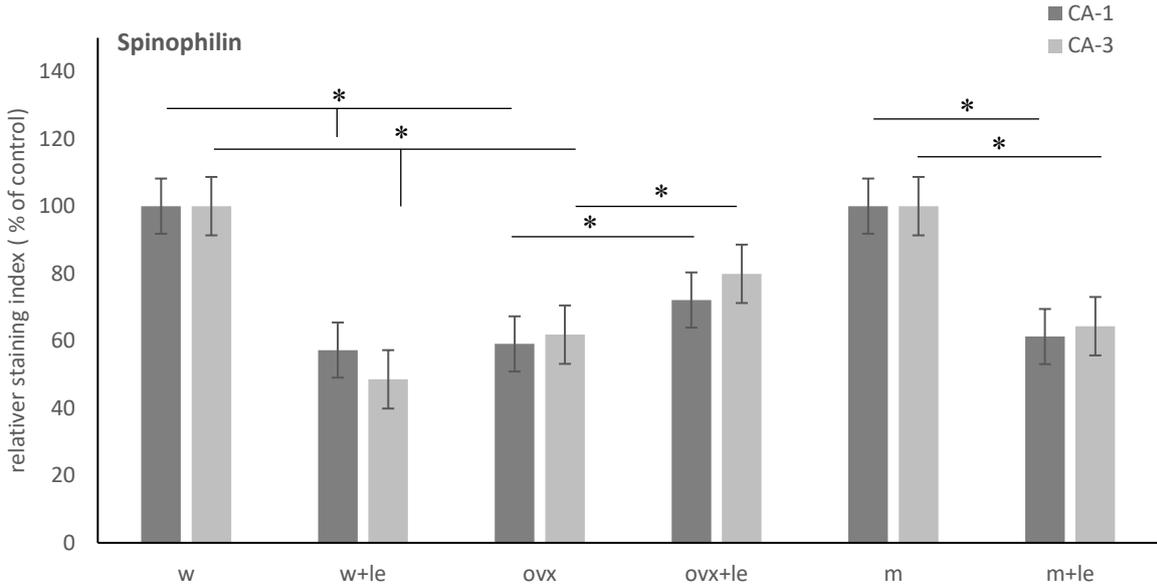


Abb.17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expression von Spinophilin in CA1 und CA3. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (*p ≤ 0,05).

In der Abb. 18 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von Synaptopodin in CA1 und CA3 zusammen dargestellt.

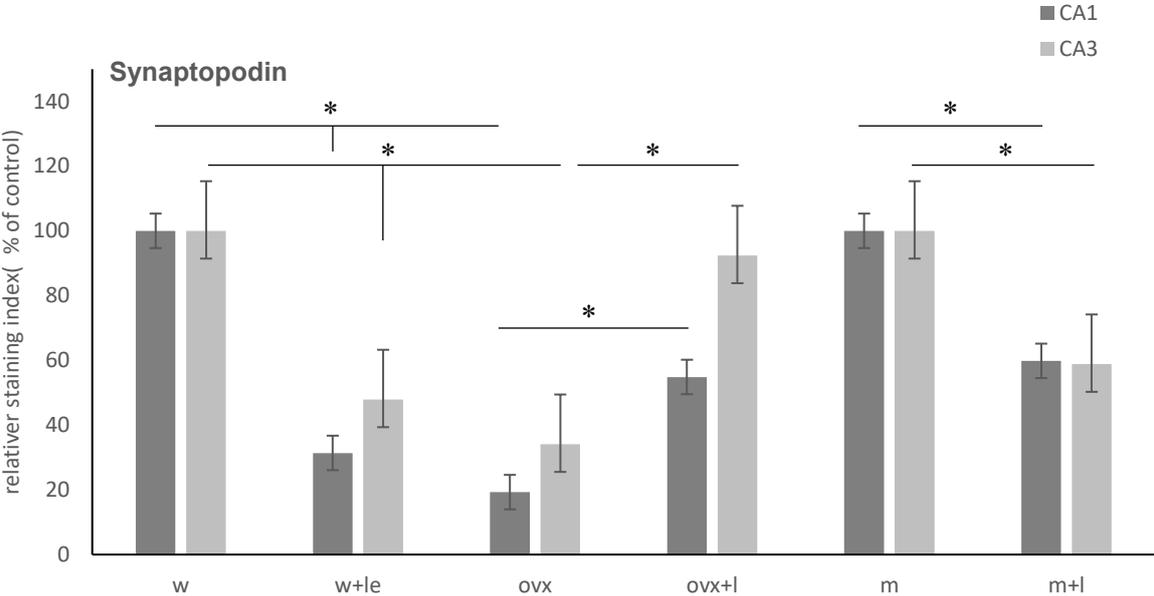


Abb.18 Zusammenfassung der Ergebnisse der Expression von Synaptopodin in CA1 und CA3. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (*p ≤ 0,05).

6. Diskussion

Seit dem Nachweis der *de novo* Synthese von Estradiol im Hippocampus (Prange-Kiel et al., 2003) ist sein Einfluss auf die synaptische Plastizität, der über eine autokrine/parakrine Regulation zustande kommt, mehrfach beschrieben worden (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004; Von Schassen et al., 2006; Prange-Kiel et al., 2009; Fester et al., 2009; Vierk et al., 2012; Fester et al., 2017). Estradiol besitzt neuroprotektive Eigenschaften (Garcia Segura et al., 2003; Fester et al., 2006). Es trägt im Hippocampus unter anderem zur Aufrechterhaltung von Synapsen bei (Kretz et al., 2004) und induziert darüber hinaus LTP synaptischer Aktivität (Vierk et al., 2012; Fester et al., 2012).

Außerdem gibt es aus klinischen Studien Hinweise, dass der Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz durch Estrogen positiv beeinflusst werden könnte. So konnte gezeigt werden, dass Estrogen einen protektiven Effekt gegen das β -Amyloid hat, das zur Degeneration von Neuronen führt (Green et al., 1996; Pike, 1999). Diesen Studien zufolge ist eine HRT bei postmenopausalen Frauen mit geringerem Risiko verbunden, eine Demenz zu entwickeln (Tang et al., 1996; Sherwin, 2005, 2006), auch wenn zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erhoben worden sind (Rapp et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine 4-wöchige systemische Behandlung weiblicher und männlicher Mäuse mit Letrozol zu einer Abnahme der synaptischen Proteine Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus führt. Bei ovariectomierten Mäusen zeigte sich nach einer solchen Behandlung dagegen eine Hochregulierung der genannten Proteine im Vergleich zu ovariectomierten Kontrolltieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen nochmal die Rolle von Estradiol in Rahmen der Regulation synaptischer Proteine im Hippocampus und entsprechen den *in vitro* Befunden vorausgegangener Untersuchungen (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Rune und Frotscher, 2005; Prange-Kiel et al., 2006; Fester et al., 2009).

6.1 Expression synaptischer Proteine in weiblichen und männlichen Mäusen nach systemischer Behandlung mit Letrozol

Das Schlüsselenzym der Estrogensynthese ist die Aromatase. Sie katalysiert den letzten Schritt der Estrogensynthese aus Androgen. Dieses Enzym wird im Hippocampus unabhängig vom Geschlecht exprimiert (Wehrenberg et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2003) und die Kapazität der Estrogensynthese *in vitro* unterscheidet sich zwischen weiblichem und männlichem Hippocampus nicht (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004). Dagegen wurde *in vivo* ein abweichender Befund hinsichtlich der Estradiolkonzentration im weiblichen und männlichen Hippocampus beschrieben. Fester et al. (2012) stellten eine höhere Estradiolkonzentration im weiblichen Hippocampus als im männlichen fest. Dieser Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* Befunden lässt annehmen, dass die Regulation der Neurosteroiden und ihre regulatorische Wirkung im Hippocampus einem sexuellen Dimorphismus unterliegt. Aktuelle Forschungsarbeiten deuten darauf hin, dass die Wirkung von Estrogen auf die Synapsendichte spezifisch für den weiblichen Hippocampus ist, während Androgene (Testosteron und sein aktiver Metabolit Dihydrotestosteron (DHT)) für die Stabilität und Aufrechterhaltung der Synapsen im männlichen Hippocampus offenbar essenziell sind (Leranth et al., 2003; Brandt et al., 2013; Fester und Rune, 2015). Behandelt man hippocampale Slice-Kulturen mit Letrozol kommt es bei weiblichen Tieren zu einem signifikanten Verlust von Synapsen und Spinesynapsen. Im männlichen Hippocampus kommt es dagegen nach einer solchen Behandlung tendenziell zu einem Anstieg von Spinesynapsen (Fester et al., 2012; Brandt et al., 2013). Dieser Anstieg kommt möglicherweise dadurch zustande, dass durch Hemmung der Aromatase mehr Testosteron anfällt, das in seinen aktiven Metaboliten DHT umgewandelt wird, das wiederum die Synapsenformation im männlichen Hippocampus induziert (Leranth et al., 2003, 2004; Fester und Rune, 2015; Kind, med. Dissertation, 2016)

Wie bereits erwähnt, zeigten vorausgegangene Untersuchungen, dass die Aromatase bei weiblichen Versuchstieren über estrogenvermittelte Mechanismen eine Schlüsselrolle bei Synaptogenese und Spinogenese im Hippocampus spielt (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2016, 2017).

Die Aromataseaktivität ist im Rahmen neurodegenerativer Prozesse verändert (Azcoitia et al., 2001). Des Weiteren scheint die Aromataseaktivität Stimmung und Affekt zu beeinflussen (Dalla et al., 2004; Kravitz et al., 2006). In diesem Zusammenhang zeigen weibliche ArKo-Mäuse depressives Verhalten (Soma, 2006). Somit liegt es nahe, dass eine Induktion dieses Enzyms und die daraus resultierende erhöhte Estrogensynthese ein vielversprechender therapeutischer Ansatz im Rahmen zukünftiger Therapieoptionen neuropsychiatrischer Erkrankungen sein könnte.

Letrozol als ein reversibler Aromatasehemmer der dritten Generation wird in der endokrinen Therapie hormonsensibler Mammakarzinome bei postmenopausalen Frauen eingesetzt. Der therapeutische Einsatz von Letrozol kann das progressionsfreie Intervall des Karzinoms verlängern. Es wurde auch eine Verbesserung der Gesamtüberlebensrate unter dieser Therapie nachgewiesen (S3-Leitlinien Mammakarzinom, 2017).

In Kenntnis der o.g. neuroprotektiven Eigenschaften der Aromatase lässt sich vermuten, dass eine Hemmung dieses Enzyms unerwünschte Begleitwirkungen im ZNS hervorrufen könnte, indem die positiven Effekte des Aromataseproduktes, des Estrogens, beeinträchtigt würden. So wurde in der Tat unter der Therapie mit Aromatasehemmern mehrfach über Lern- und Gedächtnisstörung der behandelten Frauen berichtet (Jenkins et al., 2002; Shilling et al., 2003; Bayer et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit behandelten wir die Versuchstiere systemisch mit Letrozol. Letrozol wurde den Versuchstieren täglich über vier Wochen intraperitoneal verabreicht. Im Anschluss der Behandlung untersuchten wir immunhistochemisch die synaptischen Markerproteine Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin in Stratum radiatum der CA1- und CA3-Region des Hippocampus.

Synaptophysin ist präsynaptisches Vesikelprotein. Es wurde als Marker für die Präsynapse in zahlreichen Arbeiten untersucht und seine Expression wurde als Maß für die präsynaptischen Boutons angenommen (Brake et al., 2001; Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004).

Spinophilin ist als postsynaptisches Markerprotein (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2008) in den dendritischen Spines angereichert (Allen et al., 1997). Es ist an der Regulation der Spinemorphologie beteiligt und trägt zur synaptischen Plastizität bei (Feng et al., 2000; Muly et al., 2004).

Frühere Forschungsarbeiten zeigten die Reaktivität von Synaptophysin und Spinophilin auf die lokale Estrogensynthese im Hippocampus (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Fester et al., 2009). So konnten Kretz et al. (2004) nachweisen, dass eine Hemmung der Aromatase mit Letrozol zu einer signifikanten Abnahme von Synaptophysin und Spinophilin in Schnittkulturen neonataler Hippocampi von Ratten führt. Diese Herunterregulierung wurde sowohl im weiblichen als auch im männlichen Hippocampus beobachtet. Eine gleichzeitige Behandlung dieser Zellkulturen mit Estradiol hob die hemmende Wirkung von Letrozol auf (Fester et al., 2009). Behandelt man diese Zellkulturen mit Estradiol, kommt es zu einer Zunahme von Synaptophysin- und Spinophilin-Expression. Diese Zunahme wurde allerdings nicht bei physiologischer Estradiolkonzentration von 1nM, sondern bei nur hoher suprphysiologischer Dosis von 100nM beobachtet (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004). Obwohl die Synthese von Synaptophysin und Spinophilin nach Estradiolbehandlung hochreguliert wurde, zeigte sich keine Änderung der Anzahl der Spinesynapsen weder bei physiologischer noch bei suprphysiologischer Estradioldosis (Kretz et al., 2004). Dies lässt annehmen, dass die Regulation der Synthese dieser Proteine durch Estrogen direkt und unabhängig von Synapsen erfolgt (Fester et al., 2009; Brandt et al., 2013).

In Bezug auf den Einfluss von Estradiol auf Synapsen/Spinesynapsen lieferten Untersuchungen aus unserem Institut jedoch unterschiedliche Ergebnisse im weiblichen und männlichen Hippocampus (Vierk et al., 2012; Brandt et al., 2013). Vierk et al. (2012) fanden in ihren Untersuchungen, dass die Behandlung weiblicher Ratten mit Letrozol zu einer Beeinträchtigung von LTP, gefolgt von einem signifikanten Spineverlust im Hippocampus führt. Diese Effekte wurden bei männlichen Tieren nicht beobachtet (Vierk et al., 2012). In unserer immunhistochemischen Untersuchung von Synaptophysin und Spinophilin führte die Behandlung mit Letrozol sowohl bei weiblichen als auch männlichen Mäusen zu einer Abnahme dieser Proteine. Estradiol scheint somit für die Regulierung der Synapsendichte bei Männchen nicht essenziell, wohl aber an der Regulation synaptischer Proteine beteiligt zu sein (Fester et al., 2009; Brandt et al., 2013; Fester et al., 2017).

Synaptopodin ist ein hoch estrogenresponsives Protein und kommt in reifen, pilzförmigen Spines vor (Fester et al., 2016; 2017). Es reguliert die aktin-abhängige Dynamik des Zytoskelettes der Zellen (Assauma et al., 2006; Fester et al., 2009, 2017). In früheren *in vitro* Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Estrogensynthese mit Letrozol in hippocampalen Zellkulturen zu einer Abnahme von Synaptopodin führt (Fester et al., 2009). In einer kürzlich von Fester et al. (2017) publizierten Arbeit wurde die Expression von Synaptopodin in ArKo-Mäusen untersucht. Sie fanden heraus, dass diese mutierten Mäuse ebenfalls eine Abnahme von Synaptopodin im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zeigen. Dieser Befund konnte sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Mäusen beobachtet werden. In der gleichen Arbeit zeigte diese Forschungsgruppe außerdem, dass eine *in vivo* Hemmung der Aromatase mit Letrozol bei weiblichen und männlichen Tieren den gleichen Effekt hat (Fester et al., 2017).

Fester et al. (2017) nehmen an, dass die Regulation von Synaptopodin durch Estrogen unabhängig von Synapsenformation stattfindet und weisen auch auf eine funktionelle Bedeutung der Aromatase im männlichen Hippocampus hin. Unterstützend zu dieser Annahme stellten Deller et al. (2003) eine unveränderte Synapsendichte bei weiblichen und männlichen Synaptopodin-Ko-Mäusen fest.

Da im Hippocampus männlicher Ratten eine 6-fache höhere Konzentration an Estradiol im Vergleich zum Serum vorliegt, wie von Hojo et al. (2004) beschrieben wurde, könnte man davon ausgehen, dass Estrogen auch im männlichen Hippocampus von funktioneller Bedeutung ist (Hojo et al., 2004). Dies ist bisher im Einzelnen noch nicht hinreichend geklärt. Es bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Hemmung der Aromatase mit Letrozol ebenfalls die Synthese von Synaptopodin wie die von Synaptophysin und Spinophilin im weiblichen und männlichen Hippocampus runterreguliert. Unsere Ergebnisse stimmen somit mit den oben zitierten Forschungsarbeiten überein.

Letrozol ist lipophil (Chang et al., 2013). Es kann die Blut-Hirn-Schranke passieren (Zhou et al., 2010; Nelson et al., 2016) und somit die lokale Estrogensynthese im Hippocampus hemmen und folglich eine Downregulation der o.g. synaptischen Proteinen bewirken.

6.2 Expression synaptischer Proteine in ovariectomierten Mäusen nach systemischer Behandlung mit Letrozol

Die experimentelle Ovariectomie stellt eine simulierende Methode für die Postmenopause der Frau dar. Bei Frauen sind die Ovarien vor der Menopause der Hauptsyntheseort von Estrogenen. Estrogene werden darüber hinaus in kleinen Mengen in Nebennieren und im Fettgewebe gebildet.

Die peripheren (gonadalen) Sexualsteroidhormone können über die Blutzirkulation das Gehirn, auch den Hippocampus, erreichen und dort neuronale Strukturen beeinflussen. Diese Hypothese stützt sich auf Arbeiten von B. McEwen und Kollegen in den 90er Jahren. Gould et al. (1990) beschrieben, dass ovariectomierte Ratten einen Verlust von Spinesynapsen in der CA1-Region des Hippocampus aufwiesen. Die Behandlung dieser Tiere mit E2 stellte den beobachteten Spineverlust wieder her (Gould et al., 1990). Eine Arbeit von Woolley et al. (1990) kam zu dem Ergebnis, dass die Spinedichte während des ovariellen Zyklus bei Ratten positiv mit dem Estradiolspiegel im Serum korreliert. So war die Spinedichte in der Proestrus, der Phase mit der höchsten Estradiolkonzentration im Plasma, am höchsten, während die Spinedichte in der Estrusphase mit niedrigem Estradiolspiegel im Plasma am niedrigsten war (Woolley et al., 1990). Diese Befunde legten nahe, dass gonadale Estrogene die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflussen (McEwen, 2002). Im Widerspruch dazu zeigten Kretz et al. (2004), dass die Behandlung von isolierten hippocampalen Neuronenkulturen mit Estradiol keinen Effekt auf die Dichte der Synapsen und Spinesynapsen hat, aber eine Behandlung dieser Zellkulturen mit Letrozol und somit die Hemmung der hippocampalen Estrogensynthese zu einem signifikanten Verlust von Spines, Spinesynapsen und einer Abnahme von synaptischen Markerproteinen Synaptophysin und Spinophilin führte. Kretz et al. wiesen folglich auf die Wirkung von lokal im Hippocampus gebildetem Estrogen zur Aufrechterhaltung von Synapsen hin. Weitere *in vitro* und *in vivo* Forschungsarbeiten konnten den Einfluss von lokal im Hippocampus synthetisiertem Estrogen auf die synaptische Plastizität bestätigen (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Rune und Frotscher, 2005; Prange-Kiel et al., 2008; Zhou et al., 2010; Prange-Kiel et al., 2013; Fester et al., 2016, 2017).

Die o.g. zyklische Schwankung der Spinedichte während des ovariellen Zyklus wird auf die regulatorische Wirkung von dem Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) auf die gonadale und hippokampale Estrogensynthese zurückgeführt (Prange-Kiel et al., 2008).

Das GnRH ist das Schlüsselhormon in der hypothamisch-hypophysären-gonadalen-Achse (HHG-Achse). Bei der Frau bewirkt seine pulsatile Freisetzung aus dem Hypothalamus eine Stimulation der FSH- und LH- Freisetzung aus der Hypophyse. Diese hypophysären Hormone stimulieren ihrerseits die Synthese von Estrogen in den Follikelzellen der Ovarien. Über Feedbackmechanismen wird die Hormonfreisetzung aus dem Hypothalamus und Hypophyse durch Estrogen reguliert. So führen erhöhte Estradiolkonzentration über einen negativen Feedbackmechanismus zur Hemmung von GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus sowie von FSH und LH aus der Hypophyse.

GnRH reguliert bekanntlich auch die Estrogensynthese in den Ovarien direkt und dosisabhängig (Janssens et al., 2000). Aufgrund starker Expression von GnRH-Rezeptoren im Hippocampus (Prange-Kiel et al., 2008) untersuchten Prange-Kiel und Kollegen die Wirkung von GnRH auf die Estrogensynthese im Hippocampus. Sie wiesen nach, dass diese Synthese in hippokampalen Zellkulturen ebenfalls über einen aromatasemittelten Mechanismus dosisabhängig von GnRH reguliert wird. So führte niedrig dosierte GnRH-Behandlung zu einer Stimulation von Estradiolsynthese, Neubildung von Spinesynapsen und erhöhter Synthese von Spinophilin und Synaptophysin, während hohe GnRH-Dosis einen hemmenden Effekt auf die genannten Parameter zur Folge hatte (Prange-Kiel et al., 2008, 2013).

Wie das GnRH den Hippocampus erreicht, bleibt bisher unklar. Die Möglichkeit direkter Faserprojektionen zwischen Hypothalamus und Hippocampus wurde diskutiert, konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden (Prange-Kiel et al., 2013). Das GnRH ist in der Cerebrospinalflüssigkeit nachweisbar (Skinner und Caraty, 2002). Es wird angenommen, dass GnRH durch Diffusion aus den Ventrikeln seine Wirkungen im Hippocampus entfalten könnte (Skinner und Caraty, 2002; Nelson et al., 2016).

In unserer Arbeit fanden wir bei ovariectomierten Kontrolltieren eine signifikante Abnahme der untersuchten synaptischen Proteine im Vergleich zur weiblichen cyclischen Kontrollgruppe. Nach Ovariectomie ist der hemmende Effekt von Estrogen auf die GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus aufgehoben, da bei ovariectomierten Mäusen kein Estradiol im Serum nachweisbar ist (Zhou et al., 2010). Auch bei postmenopausalen Frauen, also ähnlich wie eine experimentelle Ovariectomie, lassen sich erhöhte Konzentration von GnRH, FSH und LH nachweisen (Gill et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass nach Ovariectomie der Versuchstiere hohe nicht physiologische GnRH-Spiegel vorliegen, die eine Hemmung der hippocampalen Estrogensynthese bewirken und somit eine Abnahme der synaptischen Proteine zu Folge haben könnte (Prange-Kiel et al., 2008), da Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin estrogenresponsive Proteine sind (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009, 2017).

Überraschenderweise führte eine 4-wöchige Behandlung ovariectomierter Mäuse mit Letrozol nicht zu einem weiteren Abfall der o.g. Proteine im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe. Wir fanden dagegen eine deutliche und signifikante Hochregulation ihrer Immunreaktivität. Eine Arbeitsgruppe unseres Institutes untersuchte den Effekt einer solchen Behandlung mit Letrozol auf die Dichte der Synapsen im Hippocampus ovariectomierter Mäuse. Es zeigte sich, dass die Synapsendichte auch bei diesen Mäusen im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe abnimmt (Zhou et al., 2010). Außerdem untersuchte diese Arbeitsgruppe die Synthese von Synaptophysin, Spinophilin und die Synapsendichte nach 7 tägiger Behandlung mit Letrozol und stellte fest, dass die Synapsenzahl und die Synthese der synaptischen Proteine nach dieser Kurzbehandlung sowohl bei cyclischen als auch bei ovariectomierten Tieren herunterreguliert wird.

Es scheint eine zeitlich begrenzte Korrelation zwischen Synapsendichte und Synthese von synaptischen Proteinen zu bestehen. Nach 4-wöchiger Behandlung zeigt sich diese Korrelation nur bei cyclischen nicht jedoch bei ovariectomierten Mäusen. Es wird angenommen, dass dieser unerwartete Effekt auf die Proteinsynthese bei den mit Letrozol behandelten ovariectomierten Mäusen möglicherweise ein kompensatorischer Mechanismus darstellen könnte, damit die Effizienz der noch bestehenden Synapsen aufrechterhalten bleibt (Zhou et al., 2010).

6.3 Estrogen und Kognition

Die Prävalenz neurodegenerativer und psychiatrischer Erkrankungen im höheren Alter ist bei Frauen höher als bei Männern (Zandi et al., 2002; Grigoriadis und Robinson, 2007; Frick et al., 2011). Dies lässt annehmen, dass die Sexualsteroidhormone und deren Effekte zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Pathogenese dieser Erkrankungen beitragen. Bei neuropsychiatrischen Krankheiten ist der Hippocampus häufig als erste Hirnstruktur von pathologischen Veränderungen betroffen. So wurde z.B. in Studien eine Volumenabnahme des Hippocampus bei Individuen mit Depression und Alzheimer-Demenz beobachtet (Sheline, 2001; Karas et al., 2004). Estradiol wird im Hippocampus *de novo* synthetisiert (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004) und trägt zur Synaptogenese /Spinogenese bei (Kretz et al., 2004; Rune und Frotscher, 2005).

Die Spinedichte im Hippocampus korreliert positiv mit dem Estradiolspiegel im Serum (Woolley et al., 1990; Prange-Kiel et al., 2008). Bestimmte kognitive Fähigkeiten bei Frauen wie z.B. das verbale Gedächtnis korreliert ebenfalls positiv mit dem Serumspiegel des Estradiols. Auch bei Primaten wurde eine verbesserte Gedächtnisleistung nach Behandlung ovariectomierter Versuchstiere mit Estradiol beobachtet (Luine et al., 2003; Nelson et al., 2016).

Zusammengenommen weisen diese Befunde darauf hin, dass Estrogen in der synaptischen Plastizität im Hippocampus involviert ist und dementsprechend höhere kognitive Funktionen wie Lernprozesse und Bildung von Gedächtnisinhalten bei Frauen fördern könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit den *in vitro* Befunden früherer Forschungsarbeiten (Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009) dahingehend konsistent, dass eine systemische Behandlung von Mäusen mit Letrozol eine Veränderung prä- und postsynaptischer Proteine bewirkt. Dies könnte zu kognitiven Störungen bei Frauen beitragen, die im Rahmen endokriner Therapie des Mammakarzinoms mit Aromatasehemmern behandelt werden.

7. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass eine 4-wöchige systemische Behandlung von Mäusen mit dem AI Letrozol zur Veränderung der synaptischen Proteine Synaptophysin, Spinophilin und Synaptopodin im Hippocampus führt. Sowohl bei zyklischen weiblichen als auch bei männlichen Mäusen fanden wir nach dieser Behandlung eine Abnahme der genannten Proteine. Dieser Effekt wurde bei ovariectomierten Versuchstieren nicht beobachtet. Hier zeigte sich dagegen eine Hochregulation der untersuchten Proteine im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe. Dieser Effekt könnte ein Kompensationsmechanismus darstellen, damit die synaptische Effizienz aufrechterhalten bleibt, da unsere Arbeitsgruppe nach vier Wochen Letrozolbehandlung auch bei ovariectomierten Mäusen eine Abnahme der Spinesynapsen verglichen mit ovariectomierten Kontrolltieren beobachtet hat (Zhou et al., 2010). Die Rolle dieser Proteine als Marker für die Formation von Synapsen scheint somit fraglich zu sein. Die Regulation der untersuchten synaptischen Proteine durch Estrogen scheint direkt und unabhängig von Synapsen zu erfolgen.

Obwohl Forschungsarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen unseres Institutes gezeigt haben, dass die Synapsendichte im männlichen Hippocampus durch Estrogen nicht beeinflusst wird (Vierk et al., 2012; Brandt et al., 2013), beobachten wir auch bei männlichen Mäusen nach Letrozolbehandlung eine Abnahme der synaptischen Proteine. Dies lässt auch eine funktionelle Bedeutung der Aromatase im männlichen Hippocampus annehmen (Fester et al., 2017). Diese Bedeutung ist noch nicht ganz verstanden und bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

Summary

The systemic treatment of mice with the aromatase inhibitor letrozole over a period of 4 weeks alters the expression of the synaptic proteins synaptophysin, spinophilin and synaptopodin in the hippocampus. In both cyclic female and male mice, we observed a reduction of these proteins, while in ovariectomized mice, this effect was not observed. We found an upregulation of the examined proteins in comparison to ovariectomized control mice.

This effect seems to be a compensatory mechanism to maintain synaptic efficiency. Even in ovariectomized mice, our group found a decrease in spine synapses after letrozole treatment compared to the ovariectomized control group (Zhou et al., 2010). The role of these proteins as markers for the formation of synapses is therefore questionable. The regulation of synaptic proteins by estrogen seems to be direct and independent of synapses.

Numerous studies have shown that estrogen does not affect the synaptic density in the male hippocampus (Vierk et al., 2012; Brandt et al., 2013). We also observed a downregulation of synaptic proteins in male mice after letrozole treatment. This indicates a functional importance of the aromatase in the male hippocampus. This discrepancy is not sufficiently clarified and requires further research.

8. Literaturverzeichnis

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

Alder J, Xie ZP, Valtorta F, Greengard P, Poo M (1992) Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 9: 759-68.

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

Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol.* 8: 485-91.

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

Balthazart J, Baillien M, Charlier TD, Ball GF (2005) Effects of calmodulin on aromatase activity in the preoptic area. *J Neuroendocrinol* 13: 664-71.

Balthazart J, Cornil CA, Taziaux M, Charlier TD, Baillien M, Ball GF (2006) Rapid changes in production and behavioral action of estrogens. *Neuroscience* 138: 783-91.

Baulieu EE, Robel P (1990) Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37 :395-403.

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: 213-25.

Behl Christian, Thomas Skutella, Frank Lezoualc' H, Anke Post, Martina Widmann, Christopher J. Newton, Florian Holsboer (1997) Neuroprotection against Oxidative Stress by Estrogens. *Structure-Activity Relationship Molecular Pharmacology* 51: 535-541.

Behl C (2002) Sex hormones, neuroprotection and cognition. *Prog Brain Res.*, Volume 138: 135-42.

Beyer C, Pawlak J, Karolczak M. Membrane receptors for oestrogen in the brain (2003) *J Neurochem.* 87: 545-50.

Bian C, Zhao Y, Guo Q, Xiong Y, Cai W, Zhang J (2014) Aromatase inhibitor letrozole downregulates steroid receptor coactivator-1 in specific brain regions that primarily related to memory, neuroendocrine and integration *J Steroid Biochem Mol Biol.* 141: 37-43.

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232: 331-56.

Brake Wayne G., Stephen E. Alves John C. Dunlop Susan J. Lee Karen Bulloch Patrick B. Allen Paul Greengard Bruce S. McEwen (2001) Novel Target Sites for Estrogen Action in the Dorsal Hippocampus: An Examination of Synaptic Proteins *Endocrinology* 142: 284-1289.

Brandt N, Vierk R and Rune GM (2013) Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus. *Int. J. Dev. Biol.* 57: 351-356.

Buwalda B, Schagen SB (2013) basic research providing answers if adjuvant anti-estrogen treatment of breast cancer can induce cognitive impairment? *Life Sci.* 93: 581-8.

Chang P. K.-Y., S. Boridy, R. A. McKinney, and D. Maysinger (2013) Letrozole Potentiates Mitochondrial and Dendritic Spine Impairments Induced by β Amyloid. *Journal of Aging Research*, Volume 2013.

Compagnone NA, Mellon SH (2000) Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21: 1-56.

Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, Forbes JF (2010) ATAC/LATTE investigators. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial *Lancet Oncol.* Vol.11.

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.

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

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

Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 9287-92.

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.* 97:1136-44.

Fester Lars, Janine Prange-Kiel und Gabriele M. Rune (2007) Hippokampale Estrogensynthese und synaptische Plastizität *Neuroforum* 04/2007: 127-133.

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

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 β . *J Steroid Biochem Mol Biol*. 138: 455-61.

Fester L, Rune GM (2015) Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Res*.162: 162-9.

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.

Fester L, Zhou L, Ossig C, Labitzke J, Bläute C, Bader M, Vollmer G, Jarry H, Rune GM (2017) Synaptopodin is regulated by aromatase activity. *J Neurochem*. 140: 126-139.

Fifková E, Delay RJ (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95: 345-350.

Fischer, M, Kaech, S, Knutti, D und Matus, A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-54.

Frick KM, Zhao Z, Fan L (2011) The epigenetics of estrogen: epigenetic regulation of hormone-induced memory enhancement. *Epigenetics* 6: 675– 680.

Fuhrman BJ, Schairer C, Gail MH, Boyd-Morin J, Xu X, Sue LY, Buys SS, Isaacs C, Keefer LK, Veenstra TD, Berg CD, Hoover RN, Ziegler RG (2012) Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 104: 326-39.

Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem*. 71: 2231-2238

Garcia-Segura LM (2008), Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol*. 20: 705-712.

Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I (2003) Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol*. 71: 31-41.

Gill S, Sharpless JL, Rado K, Hall JE (2002) Evidence that GnRH decreases with gonadal steroid feedback but increases with age in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2290-2296.

Gordon Sarah L, Leube Rudolf E, and Cousin Michael A (2011), Synaptophysin is required for synaptobrevin retrieval during synaptic vesicle endocytosis *J Neurosci*. 31: 14032-14036.

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

Gray E G (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Anat.* 93:420-433.

Green PS, Gridley KE, Simpkins JW (1996) Estradiol protects against beta-Amyloid-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 218: 165-8.

Grigoriadis S, Robinson GE (2007) Gender issues in depression. *Ann Clin Psychiatry* 19: 247-255.

Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 17: 341-71

Harris KM, Fiala JC, Ostroff L (2003) Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358: 745-8.

Höffken K (1999), Aromatasehemmer der 3. Generation in der Therapie des Mammakarzinoms. *Der Onkologe* 5: 58-67, Springer-Verlag.

Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morison JH, Janssen WGM, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes Estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 865-870.

Janssens, R M, L Brus, D J Cahill, J A Huirne, J Schoemaker, C B Lambalk (2000) Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum Reprod Update* 6(5): 505-18

Jenkins V, Shilling V, Fallowfield L, Howell A, Hutton S (2004) Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? A pilot study. *Psychooncology* 13: 61-6.

Johnston PA, Südhof TC (1990) The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homo-oligomerization. *J Biol Chem.* 265: 8869-73.

Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, Visser PJ, van Schijndel RA, Fox NC, Barkhof F (2004) Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage* 23: 708-716.

Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290: 750-4.

Kind, Simon Manfred Maria, medizinische Dissertation (2016), Testosteron-induzierte synaptische Plastizität im männlichen und weiblichen Hippocampus. UKE, Hamburg

Klinke Rainer und Silbernagel Stefan (2003), Lehrbuch der Physiologie, 4. korrigierte Auflage, Georg-Thieme Verlag.

Kravitz H M, Janssen I, Lotrich F E, Kado D M, Bromberger J T (2006) Sex steroid hormone gene polymorphisms and depressive symptoms in women at midlife. *Am J Med.* 119: 87-93.

Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci.* 24: 5913-21

Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2015.

Kuiper G G J M, Carlsson B, Grandien K, Enmark A, Häggblad J, Nilsson S Gustaffson J A (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138: 863-70.

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 C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, Magarinos AM, Allen PB, Greengard P, Luine V, McEwen BS (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci.* 101: 2185-2190.

Luine VN, Jacome LF, Maclusky NJ (2003) Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. *Endocrinology* 144: 2836-44.

Löffler G, Petrides P E (2007) Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg: Springer Verlag.

Matus A , Ackermann M , Pehling G , Byers HR , Fujiwara K (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci.* 79: 7590-4.

McEwen BS, Alves SE (1999), Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev.* 20: 279-307.

McEwen B (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res.* 57: 357-84.

McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Sudhof TC (1996) Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 4760-4764.

Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007) Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem.* 100: 950-67.

Muly EC, Smith Y, Allen P, Greengard P (2004) Subcellular distribution of spinophilin immunolabeling in primate prefrontal cortex: localization to and within dendritic spines. *J Comp Neurol.* 469: 185-97.

Mundel P, Heid H W, Mundel T M, Kruger M, Reiser J and Kriz W (1997) Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J. Cell Biol.* 139: 193-204.

Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z (1971) Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab.* 33: 368-70.

Nelson Britta S, Katelyn L Black and Jill M Daniel (2016) Circulating Estradiol Regulates Brain-Derived Estradiol via Actions at GnRH Receptors to Impact Memory in Ovariectomized Rats. *ENEURO.* 3(6): 1-10

Okubo-Suzuki R, Okada D, Sekiguchi M, Inokuchi K (2008) Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 38: 266-76.

Paganini-Hill A, Henderson VW (1996) Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med.* 156: 2213-7.

Pike CJ (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-Amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 72: 1552-63.

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13: 226-34.

Prange-Kiel J, Rune GM (2006) Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138: 765-72.

Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune GM (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16: 464-71.

Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008) Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol;* 180: 417-26.

Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Jarry H, Rune GM (2009) Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm.* 116: 1417-25.

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.

Prange-Kiel J, Dudzinski DA, Pröls F, Glatzel M, Matschke J, Rune GM (2016) Aromatase Expression in the Hippocampus of AD Patients and 5xFAD Mice. *Neural Plast.* 2016.

Rapp SR, Espeland MA, Shumaker SA, Henderson VW, Brunner RL, Manson JE, Gass ML, Stefanick ML, Lane DS, Hays J, Johnson KC, Coker LH, Dailey M, Bowen D; Whims Investigators (2003) Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 289: 2663-72.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307: 1625-30.

Roselli CE, Liu M, Hurn PD (2009) Brain aromatization: classic roles and new perspectives. *Semin Reprod Med.* 27: 207-17.

Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002) Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113: 167-75.

Rune GM, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M. (2006) Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res.* 31: 145-55.

Rune GM, Frotscher M (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 136: 833-42.

S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion, 2017.

Santen RJ, Yue W, Wang JP (2015) Estrogen metabolites and breast cancer. *Steroids* 99: 61-6.

Schiebler H.Theodor, Schmidt, Karl Walter (Hrsg) Zilles (1999) *Anatomie, Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 8. Auflage, Springer Verlag.

Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE (2009) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 2: 234-43.

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

Sherwin, BB (2005) Estrogen and memory in woman: how can we reconcile the findings? *Horm Behav.* 47: 371-5.

Sherwin, BB (2006) Estrogen and cognitive aging in woman. *Neuroscience* 138: 1021-6.

Sheline, YI (2001) Depression and the Hippocampus: Cause or Effect? *Biol Psychiatry* 70: 308-309.

Shilling V, Jenkins V, Fallowfield L, Howell T (2003) The effects of hormone therapy on cognition in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86: 405-12.

Shughrue PJ, Merchenthaler I (2001) Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 436: 64-81.

Simpkins, J W, M Singh, and J Bishop (1994) The potential role for estrogen replacement therapy in the treatment of the cognitive decline and neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging Suppl.* 15: 195-197.

Simpson ER (2004) Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. *Semin Reprod Med.* 22: 11-23.

Skinner, D C and A Caraty (2002) Measurement and possible function of GnRH in cerebrospinal fluid in ewes. *Reproduction* 59: 25-39.

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

Soma KK (2006) Testosterone and aggression: berthold, birds and beyond. *J Neuroendocrinol* 18: 543-551.

Stoffel-Wagner B (2001) Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol.* 145: 669-79.

Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, Schwaab R, Schramm J, Bidlingmaier F, Klingmüller D (1998) Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in the human temporal Biochem Biophys Res Commun. 244: 768-71.

Südhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn R (1987) A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions., *Neuron*, Volume 2: 1475-481.

Tanapat P, Hastings NB, Gould E (2005) Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol.* 48: 252-65.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348: 429-32.

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

Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES Jr, 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.* 22: 8391-401.

Trepel, *Neuroanatomie, Struktur und Funktion* (2015) 6. Auflage, Urban & Fischer Verlag.

Yue W, Wang JP, Li Y, Bocchinfuso WP, Korach KS, Devanesan PD, Rogan E, Cavalieri E, Santen RJ (2005). Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin Cancer Res.* 11: 925-930.

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

Vierk R, Bayer J, Freitag S, Muhia M, Kutsche K, Wolbers T, Kneussel M, Sommer T, Rune GM (2015) Structure-function-behavior relationship in estrogen-induced synaptic plasticity *Horm Behav.* 74: 139-48.

Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, Copanaki E, Deller T and Segal M (2009) Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 29: 1017-1033.

Von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol.*18: 847-56.

Walikonis RS, Jensen ON, Mann M, Provance DW Jr, Mercer JA, Kennedy MB (2000) Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci.* 20: 4069-80.

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: 1879-86.

Wiedenmann B, Franke WW (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell.* 41: 1017-28.

Wiegert Simon J und Oertner Thomas G (2011) Dendritische Spines: Dynamische Bausteine des Gedächtnisses, *Neuroforum* 01/2011: 12-20.

Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.*10: 4035-4039.

Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JC (2002) Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 288: 2123-2129.

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.

9. Danksagung

Zuerst möchte ich mich besonders bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune für die Überlassung dieses spannenden Themas sowie für die ausgezeichnete fachliche Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer PD. Dr. rer. nat. Lars Fester bedanken, der mich in die praktische Arbeit im Labor einwies und bei Problemen immer den richtigen Rat für mich hatte.

Meinem Kollegen Dr. med. Hartmut Bessler danke ich auch für seine motivierenden Worte und Ermutigung bei der schriftlichen Verfassung dieser Dissertation.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank für ihre große, liebevolle Unterstützung. Diese Arbeit ist meiner Frau Hanaa und meinen Kindern Sinan, Jan und Sam gewidmet.

10. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Bad Salzuflen.....

Basel Hassu