

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Anatomie I
Zelluläre Neurobiologie

Leiterin: Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Einfluss von Östradiol auf die neuronale Synaptopodinexpression

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Florian Ansgar Bläute
aus Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 04.11.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Eckart Förster

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Wiedemann

Inhaltsangabe

1. Abkürzungsverzeichnis.....	4
2. Einleitung.....	7
2.1 Hippocampus.....	8
2.2 Spines	10
2.3 Spineapparat	11
2.4 Synaptopodin.....	12
2.5 Signalwege von Östrogen.....	14
2.6 Östrogeneffekte	15
2.7 Langzeitpotenzierung (LTP)	18
2.8 Hemmung der Östrogenwirkung durch ICI 182,780 (Faslodex®)	20
2.9 PC-12 Zellen	21
2.10 Fragestellung	21
3. Methoden	22
3.1 Methoden bei PC-12 Zellen	22
3.2 Methoden bei Dispersionskulturen.....	23
3.4 Mikroskopische Messung und Auswertung.....	26
4. Material.....	27
4.1 Arbeitsmaterial, Geräte	27
4.2 Chemikalien	28
4.3 Lösungen	29
5. Ergebnisse	30
5.1 PC-12 Zellen	30
5.2 Charakterisierung hippocampaler Dispersionskulturen	30
5.3 Einfluss von Östradiol auf die Morphologie der Kulturen.....	32
5.4 Synaptopodinexpression in PC-12 Zellen unter Östradiol Stimulation	32
5.5 Effekte von physiologischen Konzentrationen von Östradiol auf die PC-12 Zellen	34
5.6 Effekt von Östradiol auf hippocampale Dispersionskulturen	35
5.7 Effekte von physiologischen Konzentrationen von Östradiol auf hippocampale Dispersionskulturen.....	36
5.8 Effekte von Östradiol und ICI 182,780 auf PC-12 Zellen	37
6. Diskussion	39
7. Zusammenfassung.....	46
8. Literaturverzeichnis.....	47
9. Danksagung	59
10. Lebenslauf.....	60
11. Eidesstattliche Versicherung.....	61

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
Aufl.	Auflage
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
ca.	circa
CA1	Cornu ammonis 1
CA2	Cornu ammonis 2
CA	Cornu ammonis 3
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	rot fluoreszierendes Indocarbocyanin 3
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
dest.	<i>destillata</i> (destilliert)
d.h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
Diag.	Diagram
Dipl.	Diplom
DIV	days in vitro
E ₂	17 β -Estradiol
EPSP	postsynaptische Potentiale
ER	Östrogenrezeptoren
ER α	Östrogenrezeptor Alpha
ER β	Östrogenrezeptor Beta
ERE	Estrogen Response Element
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i>

evtl.	eventuell
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
G-Protein	G für Guanylnukleotid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobuline d. Klasse d. Gammaglobuline
K-Da	Kilo Dalton
KM	Kulturmedium
l	Liter
LSM	laser scanning microscope
LTP	long term potentiation - Langzeitpotenzierung
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
mRNA	messenger RNA
ml	Mililiter
mM	Milimolar
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid (Natriumlauge)
NFG	Nerve-Grow-Factor
nM	nano Molar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nr.	Nummer
PBS	phosphate buffered saline
PC-12 Zellen	Phäochromocytom 12 Zelllinie
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PSD	post-synaptic density
PTP	post tetanic potentiation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S.	Seite
SEM	standard error of the mean
SER	smooth endoplasmic retikulum
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
STP	short term potentiation
Tab.	Tabelle
TAF	Transkriptions-Aktivierungsfunktionen
u.a.	unter anderen
U/min	Umdrehungen pro Minute
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

2. Einleitung

Das Gehirn ist das komplexeste Organ des Menschen. Als zentrales Nervensystem steuert und beeinflusst es jedes Lebewesen. Dabei werden Reize vom Körper und von der Umwelt aufgenommen und über mehrere Stationen zum Gehirn geleitet (Afferenzen). Erst die neuronale Interpretation und Bewertung dieser Reize ermöglicht die bewusste Wahrnehmung und die Ausbildung einer Reizantwort. Diese folgt den Nervenbahnen vom ZNS in die Peripherie (Efferenzen).

Bei der neuronalen Weiterleitung kommt den Synapsen zwischen dem Axon und dem Dendrit oder dem Zellkörper eines anderen Neurons eine bedeutende Funktion zu, denn sie steuern und ermöglichen die Reizweiterleitung.

Hier wird zwischen dem präsynaptischen und postsynaptischen Element und dem synaptischen Spalt unterschieden. Das präsynaptische Axonende (Bouton) speichert in Vesikeln spezifische Transmitter, welche bei einer Depolarisation in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Diese Transmitter binden an spezifische Rezeptoren des postsynaptischen Elements und verändern so spezifisch die Permeabilität der postsynaptischen Membran für Ionen. Durch den Einstrom und Ausstrom von Ionen wird die Impulsübertragung gesteuert.

Gray (1959) und Colonnier (1968) beschreiben zwei Gruppen von Synapsen: symmetrische und asymmetrische Synapsen.

Die symmetrischen Synapsen weisen kein spezielles postsynaptisches Element auf und sind fast ausschließlich am Zellsoma lokalisiert. Diese wirken auf das Neuron inhibitorisch und verwenden als Transmitter vor allem γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin. Sie unterdrücken am Zellsoma nahe des Axonabganges am Axonhügel die Reizweiterleitung durch Hyperpolarisation der Postsynapse. Bei den asymmetrischen Synapsen bildet das postsynaptische Element eine Zellausstülpung, einen so genannten Spine. Diese Dornen wurden erstmals von Ramón y Cajal (1891) beschrieben, der sie an Neuronen in Golgifärbung entdeckte. Die Spines sind ausschließlich an den Dendriten der Neurone lokalisiert. Die asymmetrischen Synapsen wirken auf die Dendriten exzitatorisch, das heißt sie depolarisieren die Postsynapse. Glutamat ist hierbei der häufigste Transmitter.

Spines werden anhand morphologischer Kriterien in kurze („stubby“), dünne („thin“) und in pilzförmige („mushroomshape“) eingeteilt. Pilzförmige Spines gelten als reife

Spines. Sie haben eine Größe von 1-2 μm^2 und man findet sie mit einer Dichte von 1-10 Spines pro μm^2 .

Der äußere Abschnitt eines Spine, der Spinekopf, weist elektronenmikroskopisch eine 30 nm breite Verdickung der postsynaptischen Membran unmittelbar unter dem synaptischen Spalt auf, welche als elektronendichte Matrix imponiert. Diese Matrix besteht aus Rezeptoren, Verankerungs- und Signalproteinen (post-synaptic density, PSD). Die PSD stellt somit die postsynaptische Komponente der Signalverarbeitung dar (Walikonis *et al.*, 2000). Sie ist über ein auf Aktin basierendes Zytoskelett mit dem Spine verbunden, das sich elektronenmikroskopisch als flockiges („fluffy“) Material darstellt (Kaech *et al.*, 2001). Ferner finden sich Polyribosomen vornehmlich an der Basis dendritischer Spines, die auf eine ortsständige Proteinproduktion deuten könnten (Peters und Kaiserman-Abramof, 1970; Stewart und Levy, 1982).

In den Spines findet man Anteile des glatten endoplasmatischen Retikulums (smooth endoplasmic reticulum, SER). Die Tubuli des endoplasmatischen Retikulums liegen häufig als Spineapparat in den Spineköpfen vor. Dieser besteht aus mehreren Schichten von SER, zwischen denen sich elektronendichte Platten befinden (Deller *et al.*, 2000). 20 % aller Spines und 80 % aller pilzförmigen Spines weisen einen Spineapparat auf (Spacek und Harris, 1997). Die genaue Funktion des Spineapparates ist bis heute noch nicht bekannt. Eine Rolle als Calciumspeicher wird diskutiert, über die die synaptische Plastizität beeinflusst werden könnte.

2.1 Hippocampus

Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems und bildet den Hauptteil des Archikortex. Der Hippocampus der Ratte liegt kranial unter dem Kortex und durchzieht beide Hemisphären von rostral nach kaudal entlang einer C-förmigen Achse.

Der Hippocampus der Ratte besteht aus sechs verschiedenen Regionen, die denen des Menschen in ihrem histologischen Aufbau sehr ähnlich sind: Gyrus dentatus, Ammonshorn, Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum. Das Ammonshorn wird nochmals in die Regionen CA1-CA3 aufgeteilt. Der Gyrus dentatus und das Ammonshorn entsprechen dem phylogenetisch älteren Allocortex. Er besteht im Gegensatz zu dem sechsschichtigen Isocortex aus drei Schichten, die Pyramiden- und Körnerzellen aufweisen. Die CA1 Region enthält in Gegensatz zur CA2 Region, die

durch große Pyramidenzellen gekennzeichnet ist, vorwiegend kleine Pyramidenzellen. Die nachfolgende CA3 Region weist eine lockere Anordnung von großen Pyramidenzellen auf, das Stratum pyramidale. Dieses wird auf der inneren Seite vom Stratum molekulare und auf der äußeren Seite vom Stratum oriens begrenzt.

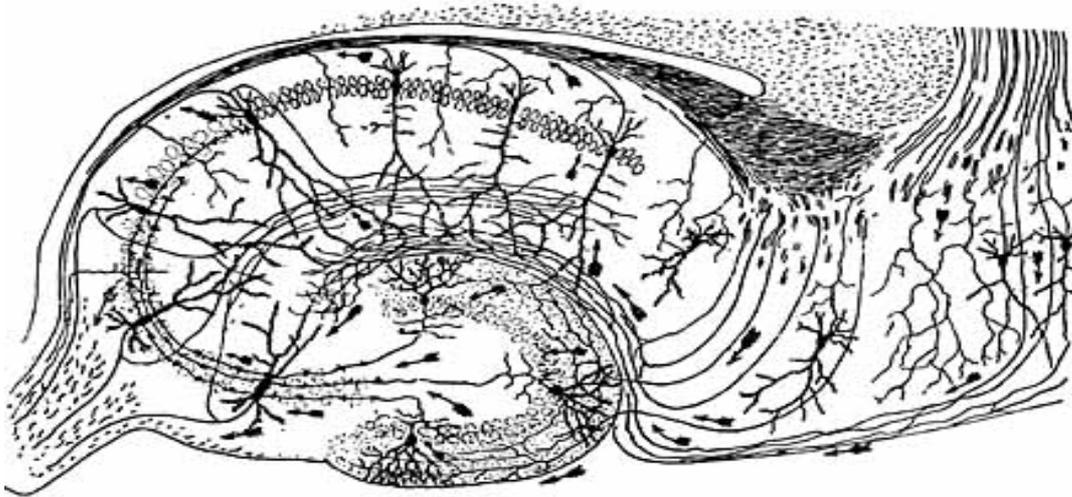


Abbildung 1: Hippocampus Santiago Ramon y Cajal 1911

Pyramiden- und Körnerzellen werden zusammen als Prinzipalneurone bezeichnet. Diese bilden einen trisynaptischen Kreislauf, der den Hauptverschaltungsweg im Hippocampus bildet. Afferenzen erhält der Hippocampus hauptsächlich aus der Regio entorhinalis, aber auch aus dem Thalamus, Gyrus cinguli und dem Septum. So erreichen visuelle, somatische, olfaktorische und auditorische Informationen den Hippocampus. Diese afferenten Fasern erreichen über den Tractus perforans die Körnerzellen im Gyrus dentatus (1. Synapse), die weiter über Moosfasern zu Pyramidenzellen der CA3 Region projizieren (2. Synapse), die wiederum über die Schaffer-Kollateralen zu CA1 Pyramidenzellen projizieren (3. Synapse). Alle drei Synapsen sind exzitatorisch.

Die Efferenzen des Hippocampus verlaufen im Fornix und enden, nachdem sie Teilfasern an das Septum, Corpus amygdaloideum und den Hypothalamus abgegeben haben, in den Corpora mamillaria. Hier werden die Impulse auf das Vicq d'Azyr-Bündel umgeschaltet, das zum Nucleus anterior thalami zieht. Dieser projiziert zur Rinde des Gyrus cinguli. Von hier ziehen die Faserbündel des Cingulum zurück zum Hippocampus. Diesen Verschaltungsweg nennt man Papez-Neuronenkreis.

Der Hippocampus hat nach heutigen Vorstellungen eine entscheidende Funktion für die Übermittlung von Emotionen und Motivation, für Gedächtnisprozesse, sowie für das Verhalten.

Der Hippocampus speichert zunächst neu zu verarbeitende Informationen und transferiert diese nach und nach in neokortikale Bereiche (Bailey *et al.*, 1993). Für die Gedächtnisfunktion haben Langzeitpotenzierungen eine entscheidende Rolle. Nach wiederholter Stimulation konnte nachgewiesen werden, dass die Reizantwort intensiver ausfällt als zuvor, und dass bei aufrechterhaltener Langzeitpotenzierung (LTP) neue Synapsen gebildet werden. Die Langzeitpotenzierung ist somit ein Ausdruck für synaptische Plastizität und ermöglicht die Erhöhung der Antwortfähigkeit von Synapsen.

2.2 Spines

Spines sind kleine Fortsätze von Dendriten. Sie bilden das postsynaptische Element asymmetrischer Synapsen (Gray, 1959). Durch ihre hohe Dynamik sind sie Grundlage für neuronale Plastizität. Das Verhalten der Spines ist Gegenstand vieler Studien. So wurde gezeigt, dass sich die Größe, Form und Anzahl der Spines in Abhängigkeit zum gezeigten Verhalten der Versuchstiere (Coss *et al.*, 1978; Bradley *et al.*, 1979; Brandon und Coss, 1982; Rausch und Scheich, 1982), vom Hormonstatus der ausgewachsenen weiblichen Ratte (Gould *et al.*, 1990; Woolley *et al.*, 1990), von der elektrischen Aktivität (Fifková and van Harreveld, 1977; Hosokawa *et al.*, 1995; Papa und Segal, 1996; Drakew *et al.*, 1996; Rusakov *et al.*, 1997) und von der Anwesenheit einstrahlender Afferenzen (Parnavelas *et al.*, 1974; Caceres *et al.*, 1983; Frotscher, 1983) ändert.

Fischer *et al.* (1998) beobachteten Spines an lebenden Neuronen, wobei sich ihre Form innerhalb von Sekunden veränderte.

Die Dynamik in der Spinemorphologie könnte die Adaption des postsynaptischen Neurons an die Veränderungen der präsynaptischen Aktivität darstellen. Diese Wechselbeziehungen zwischen neuronaler Aktivität und Spinemorphologie lässt aktuell den Schluss zu, dass Spines eine große Rolle in der Ausbildung der neuronalen Plastizität spielen.

Dendritische Spines besitzen durch ein spezielles Zytoskelett die Fähigkeit, schnell die Morphologie zu verändern. Als Hauptbestandteil des Zytoskeletts konnte Aktin nachgewiesen werden (Fifková und Delay, 1982; Matus *et al.*, 1982; Cohen *et al.*, 1985; Fifková *et al.*, 1989). Die Depolymerisation von Aktin mit Cytochalasin B führt zur Aufhebung der Spinebeweglichkeit (Fischer *et al.*, 1998). Dies zeigt den direkten Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit der Spines und der Polymerisation von Aktin. Viele Vorgänge, die die Funktion und Aktivität von Aktin steuern, sind calciumabhängig. So könnte durch Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels die aktinabhängige Beweglichkeit der Spines koordiniert werden (Holcman *et al.*, 2004; Matus *et al.*, 2004; Oertner *et al.*, 2005; Segal *et al.*, 2005).

2.3 Spineapparat

Der Spineapparat wurde erstmals 1959 von Gray beschrieben. Er besteht aus zwei oder mehreren Schichten von glattem endoplasmatischem Retikulum zwischen denen sich elektronendichte Platten befinden. Die Ausläufer des elektronendichten Materials reichen bis in die PSD.

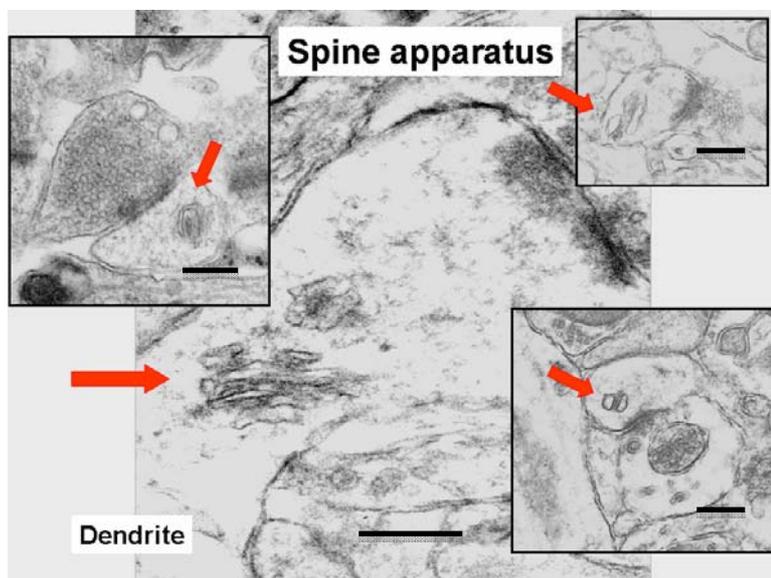


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung von Spineapparaten in hippocampalen Dendriten. (→ kennzeichnet den Spineapparat) Scalebar = 200 nm.

Der Spineapparat ist in dendritischen Spines des cerebralen Kortex, im Hippocampus (Westrum und Blackstad, 1962), im Thalamus (Colonier *et al.*, 1968), in den basalen

Kerngebieten (Wilson *et al.*, 1983) und vereinzelt in der Medulla oblongata (Scheibel *et al.*, 1968) lokalisiert. Eine dem Spineapparat morphologisch ähnliche Struktur findet sich im axonalen Initialsegment, wo es als „cisternal organelle“ bezeichnet wird (Westrum *et al.*, 1970; Kosaka *et al.*, 1980). Im Hippocampus befinden sich in 5-10 % aller Spines ein Spineapparat (Deller *et al.*, 2003). Die meisten Spineapparate pro Spine finden sich in den großen ausdifferenzierten „mushroom“ Spines. In 80 % aller pilzförmigen Spines in der CA1 Region adulter Ratten findet man einen Spineapparat (Spacek *et al.*, 1997). Die exakte Rolle des Spineapparates in Neuronen ist bis heute nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass es sich um einen intrazellulären Calciumspeicher handelt (Fifková *et al.*, 1983; Lisman, 1989; Svoboda und Mainen, 1999). Der durch den NMDA-Rezeptor ausgelöste Calciueinstrom könnte die Freisetzung des Calciums aus dem Spineapparat triggern (Sabatini *et al.*, 2002). Desweiteren könnte er in der Synthese oder in der Modifikation von Proteinen eine Rolle spielen (Pierce *et al.*, 2001). Die Existenz des Spineapparates in den Neuronen ist an das Protein Synaptopodin gekoppelt (siehe 2.4), da bei der Synaptopodin-Knockout-Maus kein Spineapparat in den Spines zu finden ist (Deller *et al.*, 2003).

2.4 Synaptopodin

Synaptopodin wurde 1997 von Mundel entdeckt und zuerst in Niere und Gehirn beschrieben. Es ist ein 100 kDa schweres, Prolin-reiches Protein. In der Niere wurde Synaptopodin im Zytoskelett von Podocyten gefunden, wo es wahrscheinlich in der Koordination des kontraktile Apparates von Podozytenfüßchen involviert ist (Mundel *et al.*, 1997). Im Gehirn wird Synaptopodin in Spines von telencephalischen Neuronen, im Bulbus olfactorius, im cerebralen Kortex, im Striatum und im Hippocampus exprimiert. Im Hippocampus findet sich Synaptopodin vor allem in den Dendriten der Pyramidenzellen des Cornu ammonis und in den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus (Mundel *et al.*, 1997).

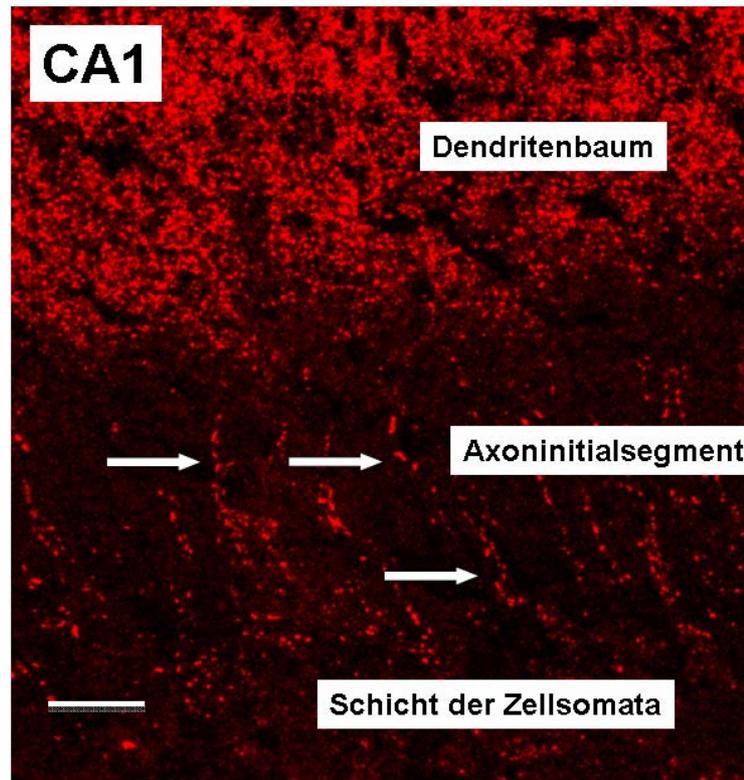


Abbildung 3: Immunocytochemie mittels Synaptopodin-Antikörper im Hippocampus der Ratte. (→ Kennzeichnet Synaptopodin) Scalebar = 10 µm.

Im Kleinhirn und anderen Regionen des ZNS ist Synaptopodin nicht vorhanden, d.h. die Expression ist auf das Telencephalon beschränkt. Aufgrund der Lokalisation in den Synapsen und den Podozyten des Nierenendothels, wurde der Name Synaptopodin für das Protein gewählt.

Synaptopodin ist in den dendritischen Spines lokalisiert. Es ist dort im Spinehals mit dem Spineapparat assoziiert. In geringen Mengen lässt sich Synaptopodin auch in den Spineköpfen und in den dendritischen Schäften nachweisen. Dort ist es meist in der Nähe vom glatten endoplasmatischen Retikulum zu finden (Mundel *et al.*, 1997; Deller *et al.*, 2000; Bas Orth *et al.*, 2005). Synaptopodin scheint essentiell für die Bildung des Spineapparates zu sein, da bei der homozygoten Synaptopodin-Knockout-Maus kein Spineapparat in den dendritischen Spines nachweisbar ist (Deller *et al.*, 2003). Die Synaptopodindeletion ist nicht von einer Veränderung in der Spinedichte, -anzahl oder -länge begleitet. Jedoch konnte bei Synaptopodin-Knockout-Mäusen eine Reduktion

hippocampaler LTP (long-term potentiation) gezeigt werden. In Lern- und Verhaltenstests zeigten diese Mäuse Defizite.

Nach LTP in hippocampalen Neuronen konnte eine verstärkte Expression von Synaptopodin-mRNA (Yamazaki *et al.*, 2001; Fukazawa *et al.*, 2003) sowie eine *de novo* Ausbildung dendritischer Spines (Engert und Bonhoeffer, 1999) beobachtet werden.

Nach einer induzierten Läsion des entorhinalen Kortex fand sich im Hippocampus der Ratte sowohl eine deutliche Verminderung von Spineapparaten als auch von Synaptopodin. Die verminderte neuronale Aktivität der einstrahlenden Afferenzen führte wahrscheinlich zur Degeneration von Spineapparaten (Deller *et al.*, 2006).

Eine *in vivo* Studie konnte zeigen, dass es nach einer LTP zu einer verstärkten Expression von F-Aktin kommt. Diese war vor allem für die Ausbildung der late-LTP entscheidend. Diese Phänomene wurden über NMDA-Rezeptoren induziert (Fukazawa *et al.*, 2003).

Die Synaptopodin-Knockout-Maus zeigt eine Reduktion der LTP in der CA1 Region, was mit dem Fehlen des Spineapparates in Zusammenhang stehen könnte (Deller *et al.*, 2003).

Die Lokalisation von Synaptopodin in den Podozytenfüßchen der Niere und den dendritischen Spines – zwei Bereiche, die zu schnellen dynamischen morphologischen Veränderungen fähig sind – lässt die Vermutung zu, dass Synaptopodin in der Regulation dieser Dynamik eine tragende Rolle spielen könnte.

2.5 Signalwege von Östrogen

Klassische Östrogenrezeptoren sind induzierbare Transkriptionsfaktoren, die im Zytoplasma in einer inaktiven Form vorkommen. Durch Bindung eines spezifischen Liganden werden die Rezeptoren aktiviert, dimerisieren und bewegen sich in den Nukleus. Dort induziert dieser durch Östrogen aktivierte Rezeptor die Transkription von spezifischen Genen nach Bindung des Estrogen Response Elements (ERE) (Klinge *et al.*, 2001). Es wurden zwei Formen von Östrogenrezeptoren (ER) mit unterschiedlicher Affinität zu natürlichen und synthetischen Östrogen gefunden, ER α und ER β , die beide im Hippocampus gefunden wurden. Die mRNA dieser beiden Rezeptoren wurde mittels RT-PCR in Slice- und Dispersionskulturen nachgewiesen (Wehrenberg *et al.*, 2001;

Prange-Kiel *et al.*, 2003). Die Verteilung dieser Östrogenrezeptoren ist geschlechtsunspezifisch (Kuiper *et al.*, 1998).

Diese Rezeptoren sind in den Interneuronen des Hippocampus (Weiland *et al.*, 1997) und in der Pyramidenzellschicht des Gyrus dentatus (Wehrenberg *et al.*, 2001) lokalisiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden die Östrogenrezeptoren im Nucleus, im neuronalen Zytoplasma und im apikalen Dendriten nachgewiesen (Rune *et al.*, 2002; Prange-Kiel *et al.*, 2003).

Neben den zytoplasmatischen Östrogenrezeptoren α und β wurden auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren entdeckt. Der G-Proteinrezeptor 30 ist ein Östrogenrezeptor in der Plasmamembran (Zhao *et al.*, 2005). Er wird auf Pyramidenzellen in der CA2 Region des Hippocampus exprimiert. Die Stimulation dieses Rezeptors mit 100 nM Östrogen zieht einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach sich. Dieser Effekt persistiert für mehr als fünf Minuten (Funakoshi *et al.*, 2006). Ein membrangebundener Östrogenrezeptor, der den Calciumhaushalt der hippocampalen Pyramidenzellen steuert, wurde auch von Carrer *et al.* (2003) beschrieben. Diese schnellen Östrogeneffekte beschreiten nicht den Weg der Transkription, sondern diese G-Proteinrezeptoren aktivieren nach Östrogenbindung die Phospholipase C, mit nachfolgender verstärkter Bildung der Protein-Kinase C. Dies führt zur Phosphorylierung weiterer spezifischer Proteine, die dadurch aktiviert oder inaktiviert werden (Kelly *et al.*, 2003).

In vitro Versuche mit hippocampalen Slice Kulturen zeigen unter Östrogenstimulation einen Anstieg der NMDA- und AMPA-Rezeptor-Aktivität und eine LTP-Steigerung innerhalb von Minuten (Kim *et al.*, 2002). Diese schnellen Effekte werden nicht über einen genomischen Östrogenrezeptor vermittelt, sondern werden über einen membrangebunden Östrogenrezeptor initiiert, welcher wahrscheinlich mit einem G-Protein gekoppelt ist und eine Proteinkinase aktiviert (Kuroki *et al.*, 2000).

2.6 Östrogeneffekte

Eine Östrogenwirkung auf das Gehirn wurde schon in vielen Studien beschrieben. Da Östrogene im Gehirn auch nach Entfernung der Gonaden nachweisbar sind, bedeutet dies, dass es eine lokale Steroidbiosynthese im ZNS gibt.

Ausgangssubstanz aller Steroide ist das Cholesterol, welches in den Mitochondrien durch eine Desmolase in Pregnenolon umgewandelt wird. Dazu wird Cholesterol von dem Trägerprotein „steroidogenic acute regulatory protein“ (StAR) zur inneren Mitochondrienmembran transportiert. Dieser Schritt stellt den geschwindigkeitbestimmenden Schritt in der Östrogensynthese dar. Die Hydroxylierung der Seitenketten erfolgt während der Biosynthese mittels Cytochrom-P450-Mischoxygenasen. Die weitere Synthese findet im Endoplasmatischen Retikulum statt. Dort wird es durch das Enzym P450c-17 irreversibel in 17-Hydroxy-Pregnenolon und in Dehydroepiandrosteron (DHEA) umgewandelt. DHEA wird reversibel durch das Enzym 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 β -HOR) zu Androstendion verändert und durch eine Reduktion der 17-Ketogruppe mit Hilfe der 3 β -Hydrosteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) irreversibel in Testosteron überführt. Die Enzyme 17 β -HOR und 3 β -HSD gehören nicht in die Familie der Cytochrom-P450- Enzyme. Durch die Abspaltung der Methylgruppe C19 durch die Cytochrom-P450aro (Aromatase) erfolgt die Aromatisierung des Ringes A und Bildung von 17 β -Östradiol.

Das Schlüsselenzym Aromatase wurde in hippocampalen Neuronen sowohl als mRNA (Abdelgadir *et al.*, 1994; Wehrenberg *et al.*, 2001), als auch als Protein nachgewiesen (Sanghera *et al.*, 1991; Garcia-Segura *et al.*, 1999).

Die Aktivität dieser Enzyme wurde *in vitro* (Prange-Kiel *et al.*, 2003) und *in vivo* (Hojo *et al.*, 2004) gezeigt. Bei der Östrogensynthese in Dispersions- und Slicekulturen handelt es sich um eine *de novo* Synthese, da Östrogene in einem primär steroidfreien und serumfreien Kulturmedium gemessen wurden (Prange-Kiel *et al.*, 2003).

Ein weiteres Indiz dafür, dass die Östrogensynthese im Hippocampus stattfindet, ist eine sechsmal höhere Konzentration von Östrogenen im Hippocampus als im Plasma der männlichen Ratte (Hojo *et al.*, 2004).

Der Östrogengehalt im Gehirn kann sich in Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad des NMDA-Rezeptors verändern, so dass eine Rolle als modulierendes Neurosteroid diskutiert wird (Hojo *et al.*, 2004).

Die Verteilung der für die Östrogensynthese benötigten Enzyme ist im Hippocampus nicht homogen, so wird in der CA3 Region des Hippocampus mehr StAR, Aromatase und Östrogenrezeptor α exprimiert als in den anderen Hippocampusregionen (Rune *et al.*, 2002; Prange-Kiel *et al.*, 2006).

Bei ovariectomierten Ratten ist die Spindichte der Pyramidenzellen in der CA1 Region im Hippocampus deutlich verringert. Setzt man diesen Ratten einer systemischen Gabe

von Östradiol aus findet man einen Zuwachs an dendritischen Spines (Woolley *et al.*, 1990; McEwen, 2004). Weitere Effekte unter Östrogenstimulation sind die Zunahme dendritischer Spines bzw. axospinaler Synapsen *in vivo* (Segal und Murphy, 2001; McEwen, 2002) und *in vitro* (Murphy und Segal 1996, 1998; Pozzo-Miller *et al.*, 1999). Synaptophysin, ein präsynaptisches Protein, wird unter Östrogenstimulation vermehrt synthetisiert (Brake *et al.*, 2001; Rune *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2003; Kretz *et al.*, 2004). Für das postsynaptische Protein Spinophilin konnte eine verstärkte Expression gezeigt werden, die jedoch aufgrund der hohen Varianz nicht signifikant war. Jedoch wurde durch die Inhibition der endogenen Östrogensynthese durch Letrozolgabe, einem Aromataseinhibitor, Spinophilin signifikant vermindert exprimiert.

Die Zahl der präsynaptischen Boutons nimmt unter Östradiol Stimulation ebenfalls zu (Woolley *et al.*, 1996; Yankova *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse konnten in einer Studie von Rune *et al.* (2002) und Kretz *et al.* (2004) nicht verifiziert werden. Es fand kein Spinewachstum statt, obwohl mit einer Östrogenkonzentration von 10^{-7} M gearbeitet wurde. Diese widersprüchlichen Ergebnisse stellen einen aktuellen Diskussionspunkt dar, es werden unter anderem indirekte Östrogeneffekte erörtert (Prange-Kiel *et al.*, 2006)

Die Wirkweise von Östrogenen kann man sehr gut verdeutlichen, indem die endogene Östrogensynthese der Zellen durch Letrozol, einem reversiblen Aromataseinhibitor, unterdrückt wird (Höffken, 1999). Letrozol hat keine agonistischen Effekte wie es bei anderen Antiöstrogenen beobachtet wurde, da es ein nicht steroidaler reversibler Aromatase Inhibitor ist. Somit ist eine Interaktion mit den Östrogenrezeptoren ausgeschlossen (Prange-Kiel *et al.*, 2003). In hippocampalen Dispersionskulturen kann die Östradiolsynthese ab einer Dosis von 10^{-9} M Letrozol etwa sechsfach reduziert werden. Dieses findet Ausdruck in einem signifikant verringerten Östradiolspiegel im Medium der behandelten Zellkultur (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Die Effekte des Aromatasehemmers sind nach 32 Stunden vollständig reversibel (Prange-Kiel *et al.*, 2006). Letrozolbehandlung führt zu einer reduzierten Spinedichte, Synapsenanzahl und zu einer Verminderung der präsynaptischen Boutons. Dabei wurde eine verminderte Expression von Synapsenproteinen wie Synaptophysin (präsynaptisch) und Spinophilin (postsynaptisch) gezeigt (Kretz *et al.*, 2004; Prange-Kiel *et al.*, 2006). Diese Punkte zeigen die Bedeutung von endogen erzeugten Östrogenen zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität.

Prange-Kiel *et al.* (2006) demonstrierten indirekte Effekte von Östrogenen. Durch Implantation einer östrogengefüllten Sonde in die mediane Raphe, welche in den Hippocampus projiziert, konnte eine Zunahme der Spinedichte erreicht werden. Dies zeigt, dass Östrogene über einen indirekten Weg das Spinewachstum induzieren können. Die gleichen Effekte sind durch gezielte Stimulation des medialen Broca Bandes (Leranth *et al.*, 2003) und der supramammillären Region (Leranth *et al.*, 2001) gezeigt worden.

Ferner zeigten Fester *et al.* (2006), dass die Proliferation von Körnerzellen abnimmt und die Apoptoserate zunimmt, wenn die endogene Steroidsynthese gehemmt wird. Dies bedeutet, dass die Proliferation von neuronalen Zellen unter anderem durch die endogen produzierten Östrogene gesteuert wird.

2.7 Langzeitpotenzierung (LTP)

Die Verstärkung der synaptischen Effektivität, ausgelöst durch wiederholte Reizdarbietung, wird als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet. Diese vergrößert die excitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP). Bleiben die postsynaptischen Potentiale länger als 15 Minuten bestehen, so spricht man von einer Langzeitpotenzierung. Bei einer Aktivitätssteigerung von 10 bis 15 Minuten spricht man von einer short term potentiation (STP), bei noch kürzeren Zeitintervallen spricht man von post tetanic potentiation (PTP) (Frenguelli *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 1997).

Der Mechanismus, der zur Ausbildung einer LTP führt, geht mit einer Aktivierung von NMDA-Rezeptoren einher. Der Neurotransmitter Glutamat trifft postsynaptisch auf zwei unterschiedliche Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren und nicht NMDA-Rezeptoren, hier steht der AMPA-Rezeptor im Vordergrund. NMDA-Rezeptoren sind in Ruhe von Magnesiumionen blockiert und somit nicht aktivierbar durch Glutamat. Sie werden erst aktivierbar, wenn die postsynaptische Membran vordepolarisiert ist. Die Depolarisation erfolgt ebenfalls über den Transmitter Glutamat. Dieser bindet an den nicht blockierten AMPA-Rezeptor. Der schnelle Einstrom von Natrium, Kalium und Calcium in die postsynaptische Membran führt zu einer Depolarisation. Wird die Membran wiederholt vordepolarisiert, so löst sich das Magnesium und aktiviert so den NMDA-Rezeptor. Die Glutamatbindung triggert einen starken Natrium- und Calciumeinstrom in den dendritischen Spine. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert

verschiedene Kinasen (Proteinkinase C, Tyrosinkinase, Calmodulin), welche die LTP einleiten (Schmidt *et al.*, 1995). In der späten Phase der LTP (L-LTP) wurde eine veränderte Genexpression und Proteinsynthese beobachtet. Dies führt zu einer Stabilisierung der neuronalen Synapse. Man deutet diese Veränderungen als Grundlage der Informationsspeicherung im ZNS (Martin *et al.*, 2000).

Der NMDA-Rezeptor scheint durch α -Aktinin-2 mit Synaptopodin und dem Spineapparat verbunden zu sein (Wyszynski *et al.*, 1998; Racca *et al.*, 2000; Asanuma *et al.*, 2005). Dies stützt die Idee, dass durch den Calciumeinstrom *via* NMDA-Rezeptor die Calciumabgabe aus dem Spineapparat ausgelöst wird. Dies verdeutlicht den engen Zusammenhang zwischen LTP, Spineapparat, Calciumhaushalt und NMDA-Rezeptoraktivität.

Unter erhöhtem Östradiolspiegel kommt es zu einer verstärkten Ausbildung der LTP im Hippocampus (Warren *et al.*, 1995; Good *et al.*, 1999), da unter anderem der Schwellenwert zur Ausbildung einer LTP erniedrigt ist (Zamani *et al.*, 2000).

Smith und McMahon (2005) untersuchten den Zusammenhang zwischen dem durch Östrogene induzierten Spinewachstum, dem verstärkten LTP sowie dem Zusammenspiel von AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Sie fanden in hippocampalen Slices von ovariectomierten und östrogensubstituierten Ratten nur dann eine Erhöhung der Intensität der LTP, wenn gleichzeitig die Spinedichte und eine relative erhöhte NMDA-Rezeptoraktivität im Vergleich zur AMPA-Rezeptor-Aktivität vorlag. Nach der Östrogenstimulation normalisierte sich die Intensität der LTP bei immer noch erhöhter Spinedichte wieder, was mit einer nun einsetzenden erhöhten AMPA-Rezeptor-Aktivität vergesellschaftet war. Dieser verspätete Anstieg normalisierte das Verhältnis zwischen NMDA-Rezeptor und AMPA-Rezeptor-Aktivität wieder. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht die erhöhte Spinedichte, sondern auch das Verhältnis zwischen den NMDA- und AMPA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der verstärkten Ausbildung der LTP spielt. Die initial erhöhte NMDA-Rezeptor-Aktivität könnte durch die neu entstehenden Rezeptoren in den neu gebildeten Spines zustande kommen.

Bei einer Blockade der Östrogenrezeptoren durch Tamoxifen sind diese Effekte nicht mehr nachweisbar. Dies zeigt die entscheidende Rolle des Östrogens beim Spinewachstum und der verstärkten NMDA-Rezeptoraktivität und damit auch die Ausbildung des LTP. Die verminderte GABA Hemmung ausgelöst durch Östradiol spielt bei dem Spinewachstum wohl nur eine untergeordnete Rolle (Segal *et al.*, 2005).

2.8 Hemmung der Östrogenwirkung durch ICI 182,780 (Faslodex®)

Die Substanz ICI 182,780 (Faslodex®) ist ein steroidales Antiöstrogen und hat eine 100-fach höhere Affinität zum zytosolischen Östrogenrezeptor als Östradiol. Nach der Bindung kann der Östrogenrezeptor aufgrund der langen Seitenkette des ICI 182,780 nicht mehr dimerisieren und in den Zellkern translozieren, so dass die Wirkung des ER auf Transkriptionsebene unterbunden wird. Unter ICI 182,780 -Therapie wird dieser Östrogenrezeptor herunterreguliert (Howell *et al.*, 2001).

In vitro und *in vivo* Versuche zeigen, dass ICI 182,780 keine agonistischen Effekte bezogen auf Östrogenrezeptoren induziert.

Der Östrogenrezeptor weist zwei Transkriptions-Aktivierungsfunktionen (TAF) auf. Das Antiöstrogen ICI 182,780 ist in der Lage sowohl die TAF-1 als auch die TAF-2-abhängige Transkription zu unterbinden. Andere Antiöstrogene, wie z.B. Tamoxifen (Astra Zeneca), blockieren nur einen der zwei TAF. Sie zeigen agonistische Effekte im Endometrium des Uterus. ICI 182,780 dagegen inhibiert das Wachstum von Brust- und Endometriumgewebe. Es kann als „reines“ Antiöstrogen bezeichnet werden. ICI 182,780 wird zur Behandlung von postmenopausalen Frauen mit Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs eingesetzt.

In Tiermodellexperimenten passiert ICI 182,780 nicht die Blut-Hirnschranke und weist keine Effekte in Beziehung zu Knochen- und Fettgewebe auf.

Für die folgenden Experimente wurde ICI 182,780 ausgewählt, um die zytosolischen Östrogenrezeptoren zu blockieren und so die Wirkung der membranständigen Rezeptoren zu untersuchen.

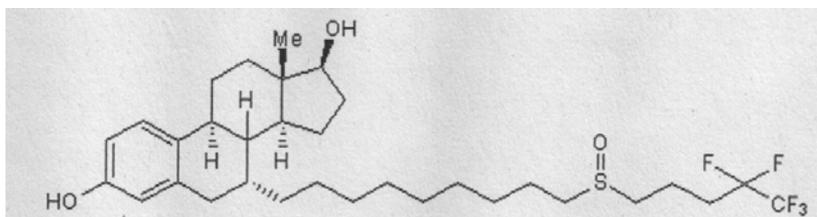


Abbildung 4: Strukturformel von ICI 182,780 (Faslodex®)

2.9 PC-12 Zellen

Die permanente Zelllinie PC-12 wurde 1967 aus einem Tumor des Nebennierenmarks der Ratte isoliert. PC-12 Zellen differenzieren sich in sympathische Neurone in Abhängigkeit von extern zugegebenen Stimulantien wie z. B. „Nerve Grow Factor“ (NGF). NGF wirkt über eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Über multiple second messenger wird die Differenzierung induziert. In Abhängigkeit dieser Stimulation entwickeln die PC-12 Zellen Axone und Wachstumskegel.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Zelllinie ein Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Zelldifferenzierung darstellt.

2.10 Fragestellung

In dieser Arbeit sollen zwei Fragen untersucht werden. Auf der einen Seite soll geklärt werden, inwieweit die Expression von Synaptopodin einem Einfluss von Östrogenen unterliegt und auf der anderen Seite soll bei einer potentiellen Beeinflussung die Beteiligung von Östrogenrezeptoren untersucht werden.

3. Methoden

Im folgenden Kapitel werden die angewandten Methoden dargestellt, die zur Durchführung der Experimente nötig waren. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt.

3.1 Methoden bei PC-12 Zellen

Die PC-12 Zellen wurden in kollagenbeschichteten Flaschen in Kultur gehalten, wobei das Nährmedium dreimal pro Woche gewechselt wurde. Die Kultur erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Aussaat der PC-12 Zellen

Einen Tag vor dem Aussäen werden die Chamber Slides mit Kollagen Typ 1 beschichtet. In jedes Well wird 400 µl Kollagenstammlösung (0,2 %) gegeben. Diese Lösung verbleibt mindestens 1 Stunde in den Wells und wird danach abgesaugt. Die Chamber Slides lässt man über Nacht trocknen.

Die PC-12 Zellen werden in zuvor mit Kollagen beschichtete Chamber Slides ausgesät. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt und je 1000 Zellen zusammen mit 0,25 ml Nährmedium in jedes Well gegeben. Dies ist die Zellzahl mit der alle folgenden Ergebnisse gewonnen wurden.

Die ausgesäten Zellen werden für 2 Tage im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit erholen sich die Zellen vom Aussäen und haften an das Kollagen.

Stimulation der PC-12 Zellen

Die Zellen werden insgesamt dreimal stimuliert, wobei immer zwei Tage zwischen den Stimulationen liegen. Das Nährmedium wird mit NGF sowie mit verschiedenen Konzentrationen von Östradiol versetzt, um einen konzentrationsabhängigen Effekt nachzuweisen. Die Östradiolkonzentrationen belaufen sich auf 10⁻⁷ M und die physiologischen Konzentrationen auf 10⁻¹⁰ M und 10⁻¹² M. Eine unbehandelte Kontrollgruppe wird nur mit Nährmedium versetzt. Nach Beendigung der Stimulationsreihe werden die Zellen fixiert.

Für die Stimulationsreihe mit Östradiol und ICI 182,780 wird nach dem gleichen oben beschriebenen Schema verfahren, jedoch mit Konzentrationen von je 10^{-7} M. Während der Stimulationszeit werden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Fixierung der PC-12 Zellen

Nach erfolgter 6-tägiger Stimulation werden die Zellen mit Paraformaldehyd (4 %) fixiert. Bei der Fixierung werden die Wells auf Eis gelagert, hierfür wird das Nährmedium aus den Wells vorsichtig abpipettiert und durch Paraformaldehyd (4 %) ersetzt. Dies verbleibt für zehn Minuten in den Inkubationskammern.

Daraufhin wird dreimal für je fünf Minuten mit PBS gespült. Die so fixierten Zellen können nun im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3. 2 Methoden bei Dispersionskulturen

Präparation der Hippocampi

Die Präparation hippocampaler Neurone wird nach der Methode von G. J. Brewer (Brewer *et al.*, 1997) durchgeführt. Ein Tag vor der Präparation der Hippocampi wird in jedes Well einer 24-Well Platte je ein Gläsplättchen gegeben. Die Wells werden eine Stunde bei Raumtemperatur unter der Sterilbank mit 600 µl Poly-D-Lysin inkubiert. Das Poly-D-Lysin wird dann abgesaugt und die Wells werden einmal mit Neuobasal A mit Phenolrot gespült. Nach erneutem Absaugen lässt man die 24-Well Platten trocknen.

Die verwendeten Versuchstiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten, Nahrung und Wasser waren *ad libitum*. Es werden Ratten im Alter von ca. fünf Tagen des Zuchtstammes WISTAR verwendet. Die Ratten werden decapitiert und die Haut über der Schädelcalotte entfernt. Das Schädeldach wird nun median sagittal mit einer Schere eröffnet. Die Knochenplatten werden mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Das so freigelegte Gehirn wird mit einem Heidemann-Spatel herauspräpariert und auf einen PBS getränkten Schwamm gelegt.

Der Hirnstamm und das Kleinhirn werden mit einem Skalpell entfernt, das Gehirn median-sagittal halbiert und beide Hemisphären voneinander getrennt. Nach Entfernung des Mittelhirns kann der nun freiliegende Hippocampus herauspräpariert werden. Die Hippocampi werden in PBS Lösung gegeben und auf Eis gelegt. Die beschriebenen Arbeitsschritte werden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt.

Die präparierten Hippocampi werden nun unter der Sicherheitswerkbank mehrmals mit PBS gespült, wodurch überschüssiges Gewebe entfernt wird. Die Hippocampi werden mit einer Klinge zerkleinert. Die zerkleinerten Zellen werden mit 25 ml PBS in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wird bei 4°C und 5000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Es folgt ein Verdau der extrazellulären Matrixproteine. Das Pellet wird pro Hippocampus mit 250 µl Trypsin/EDTA versetzt, resuspendiert und in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Während des zweieinhalb-minütigen Verdauens können sich die Zellen voneinander lösen. Der Verdau wird durch Hinzugeben von 25 ml Neurobasal A mit Phenolrot gestoppt.

Mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebes werden größere unverdaute Zellbestandteile aufgefangen. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei 4°C mit 5000 U/min für fünf Minuten. Der Überstand über dem Pellet wird verworfen und durch 20 ml Neurobasal A Medium (ohne Phenolrot) ersetzt. Eine weitere Zentrifugation bei 4°C mit 5000 U/min folgt für fünf Minuten. Der Überstand über dem Pellet wird verworfen und durch 25 ml Neurobasal A ohne Phenolrot Medium ersetzt. Phenolrot wird nicht verwendet, da es im Verdacht steht Östrogen ähnliche Wirkungen zu erzeugen.

Nach Zellzahlbestimmung mittels der Neubauer-Zählkammer werden 100 000 Zellen in die vorher beschichteten Wells gegeben. Diese Zelldichte wird bei allen weiteren Versuchen verwendet.

Die Zellkulturplatte wird für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ in den Brutschrank gestellt. Während dieser Zeit sollen sich die Zellen an die Glasplättchen heften können. Danach werden die Glasplättchen in ein neues Well überführt. Diesem Well wird je 1 ml Neurobasal Kulturmedium (37°C) mit 1 µl bFGF zugegeben. Nach 24 Stunden wird die Platte ein- bis zweimal mit jeder Längsseite gegen die Tischkante geklopft, um die Zelltrümmer zu lösen. Das Nährmedium wird anschließend gewechselt. Der weitere Wechsel erfolgt alle 48 Stunden. Nach vier Tagen Vorkultur kann die Stimulation der Zellen erfolgen.

Stimulation der Dispersionskulturen

Nach vier Tagen Vorkultur erfolgt die erste Stimulation der neuronalen Zellen der Dispersionskultur mit 17β-Östradiol. Das Nährmedium wird mit Östradiol in einer Konzentration von 10⁻⁷ M und mit den physiologischen Konzentrationen 10⁻¹⁰ M und 10⁻¹² M versetzt. Eine unbehandelte Kontrollgruppe wird nur mit Nährmedium versetzt.

Die Stimulation erfolgt an den Tagen vier, sieben, neun und endet am elften Tag nach der Präparation mit der Fixierung. Während der Stimulationszeit werden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert.

Fixierung der Dispersionskulturen:

Die Fixierung der Dispersionskultur erfolgt zwei Tage nach der letzten Stimulation. Zunächst wird hierfür eine 3,7% Formaldehyd-Lösung (Formalin) in PBS angesetzt, pro Well wird je 1 ml für zehn Minuten gegeben. Anschließend wird dreimal mit je 1 ml PBS für fünf Minuten gespült. Die so fixierten Zellen werden mit Parafilm umschlossen und können so für drei Monate bei 4°C gelagert werden.

3.3 Immuncytochemie

Das Verfahren der Immuncytochemie ist bei den PC-12 Zellen und bei den Dispersionskulturen identisch. Die Zellkulturen werden initial für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 3 % BSA blockiert, um unspezifische Immunreaktionen zu verhindern. Das BSA wird aus den Wells pipettiert und durch den Primäantikörper ersetzt. Als Primäantikörper wird unverdünnt Anit-Synaptodin verwendet. Die Zellen werden für 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Kulturen dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Sekundäantikörper. Hier wird ein monoklonaler Cy3-Antikörper in der Verdünnung 1:350 mit PBS verwendet. Die Kulturen werden für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wird dreimal für fünf Minuten mit PBS gespült.

Das Verfahren zur Eindeckelung der Zellen unterscheidet sich bei den PC-12 Zellen in Chamber Slides und bei den Dispersionskulturen auf Glasplättchen. Bei den Chamber Slides wird der Aufbau von dem Objektträger abgehoben. So entsteht ein planer Objektträger. Auf diesen wird DABCO (fluoreszenzfreies Eindeckmedium) gegeben und so die Zellen mit einem Deckglas verschlossen.

Bei den Dispersionskulturen werden die Glasplättchen aus den Wells entnommen und auf einen vorher beschrifteten Objektträger gelegt. Auf das Glasplättchen wird ein Tropfen DacoCytomation Fluorescent Mounting Medium gegeben. Danach werden die Glasplättchen mit einem Deckglas verschlossen um bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.4 Mikroskopische Messung und Auswertung

Die Zellkulturen mit abgeschlossener Immunhistochemie wurden durch ein Laser Scanning Mikroskop (LSM, Carl Zeiss, Inc.) mit einem 63x/1.4NA Objektiv fotografiert. Dabei wurden bei allen Versuchen die gleiche Belichtungszeit und Wellenlänge (546 nm für Cy3) verwendet. Die so gewonnenen Fotos wurden mit Openlab 3.1.5 von Improvision® ausgewertet. Dieses Programm verrechnet eine Fläche mit der Intensität. Hierdurch wird ein relativer Färbeindex (relative staining index) ausgerechnet. Bei der Auswertung wurde immer eine definierte gleich große Fläche ausgewählt und ausgewertet, d.h. es wurden immer gleich große Quadrate aus dem Zellzytoplasma ausgeschnitten und ausgewertet, so dass Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Zellgrößen bei der Auswertung vermieden wurden. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS einfaktoriell nach ANOVA, das für die Versuchsreihen den jeweiligen Mittelwert, die Standardabweichung und das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) nach Dunnett (zweiseitig) im Vergleich zur Kontrolle berechnete. Alle Daten wurden als Mittelwerte mit SEM („standard error of the mean“) und die Ergebnisse graphisch mit Excel 2003 dargestellt.

4. Material

4.1 Arbeitsmaterial, Geräte

Aluminiumfolie	Lager UKE
B27-Supplement	Gibco/Invitrogen
Brutschrank WTC	Binder
Cutfix Surgical Disposable Skalpell	Braun
Chamber Slides 8 Well	Nalge Nunc International
Deckgläser, 21 X 26 mm	Marienfeld
Deckgläser, 24 X 60 mm	Marienfeld
Diverse PC/Macintosh-Systeme	verschiedene Hersteller
Einmalspritzen, verschiedene Größen	Braun
ep T.I.P.S. Standard verschiedene Größen	Eppendorf AG
Excel 2003	Microsoft
Falcon Cell Stainer, 40 µm	Nylon Becton Dickinson Labware
Falcon Tissue Culture Plate, 24 Well	Becton Dickinson Labware
Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson Labware
FotoCanvas 2.0	ACD
Gefrierschrank, -25°C	Liebherr
Handschuhe	Kimberly-Clark
Heidemannspatel	Aesculap De
Histobond Adhäsions-Objektträger	Marienfeld
Horse Serum, 100 ml	Gibco/Invitrogen
Kosmetiktücher Samtes	Wepa
Kühlschrank, 4°C	Bosch
Mikroskop Axiovert 2, + AxioCam HRc	Zeiss
Neubauer Zählkammer, Tiefe: 0,1 mm; 0,0025 mm ²	Brand Germany
Openlap 3.1.5.	Improvision
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25 cm	Merk
PCR Tubes, 0,5 ml	Eppendorf AG
Pinzette nach Dumont	Merk

Pipettenspitzen 5 ml, 10 ml und 25 ml	Becton Dickinson Labware
Pipetus-Classic	Hirschmann Laborgeräte
Reaktionsgefäße 3810X; 1,5 ml	Eppendorf AG
Schere	Aesculap
Sicherheitswerkbank der Stufe 2	Heraeus
SPSS for Windows	SPSS
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad mit Schüttler	GFL
WindowsXP, Word	Microsoft
Zellstofftücher	Wepa
Zentrifuge Universal 32R	Hettrich

4.2 Chemikalien

Albumine, bovine	Sigma
<i>Aqua ad iniectabilia</i> , 1 L	Baxter Deutschland
B27 Supplement	Gibco/Invitrogen
Barrycidal 36, Desinfektionsmittel	Helmut Schröder
Beta-Estradiol-Water solube, 100 mg	Sigma
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Human Rekombinant	Gibco/Invitrogen
Cy3, monoklonal, goat-anti-mouse IgG	Sigma
DABCO	Sigma
Ethanol, 70 % und 96 %	Apotheke UKE
Formaldehydlösung	Merk
Human FGF-basic, 50 µg	Peppo Tech
ICI 182, 780; 1047 (Faslodex®)	Tocris
L-Glutamin, 200 mM	Gibco/Invitrogen
Neurobasal A Medium ohne Phenolrot	Gibco/Invitrogen
Nerve Growth Factor 2.5S (NGF 2.5S)	Gibco/Invitrogen
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin ohne Phenolrot	Gibco/Invitrogen
PBS Tabletten	Gibco/Invitrogen

Penicillin/ Streptomycin	Gibco/Invitrogen
Pferdeserum	Gibco/Invitrogen
Poly-D-Lysin	Sigma
Synaptopodin Antikörper	Progen Biotechnik
Trypsin/EDTA	Biochrom

4.3 Lösungen

bFGF:

- 5 mM Tris in *Aqua dest.* gelöst, pH = 7,6; sterilfiltern
- 50 µL bFGF in 1000 µL Tris-Lösung, vortexen, aliquotieren
- Bei -25°C lagern

BSA:

- 3 g bovine Albumin in 100 ml PBS lösen, suspendieren

Kulturmedium für PC-12 Zellen:

- 42 ml RPMI
- 7,5 ml Pferdeserum 15 %
- 0,5 ml Penicillin/Streptomycin 1 %

Nährmedium für Dispersionkulturen:

- 50 ml Neurobasal A ohne Phenolrot
- 500 µl Penicillin / Streptomycin
- 500 µl B27
- 125 µl Glutamin
- 50 µl bFGF

PBS:

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

Kollagenstammlösung (0,2 %):

- 100 mg Kollagen in 50 ml sterilem Na-Citrat (0,079 M) lösen

5. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse präsentiert, deren Grundlage die vorher beschriebenen Experimente sind.

5.1 PC-12 Zellen

Die PC-12 Zellen stammen von einer Zelllinie eines Phäochromozytoms der Ratte ab (Greene und Tischler, 1976). Die Stammkultur wird in Gewebeflaschen kultiviert, wobei diese zuerst mit Kollagen beschichtet werden, um die Zellhaftung zu ermöglichen. Ohne Kollagen wachsen die Zellen als Suspension und haften nicht an den Plastikoberflächen der Flaschen.

Nach dem Auftauen der Kultur aus flüssigem Stickstoff war die Haftung an das Kollagen sehr schlecht, diese besserte sich jedoch nach erfolgter halbjähriger Kultur. Da die Zellen sehr anfällig für mechanische Einflüsse sind, erfolgt die Entfernung des Nährmediums immer mit einer Pipette und nicht mit einem elektronischen Sauger, um so die einwirkenden Kräfte möglichst gering zu halten. Jedoch muss man beim Umsetzen der Zellen diese durch mehrmaliges Ziehen in eine Pasteurpipette wieder vereinzeln, um so die Entstehung von Zellhaufen zu vermeiden.

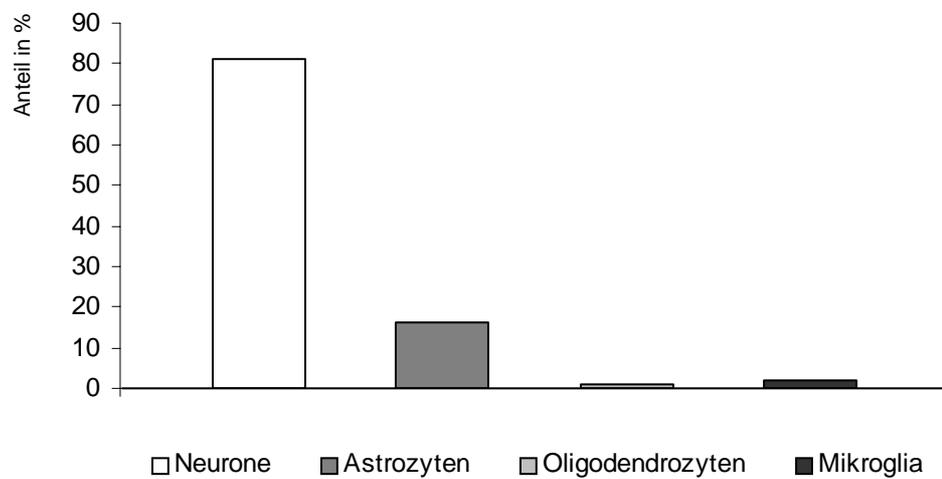
An kollagenbeschichteten Oberflächen wachsen die PC-12 Zellen einzeln und bilden Neuriten aus, was durch Zugabe von NGF noch verstärkt wird. Diese Neuriten nehmen mit der Zeit untereinander Kontakt auf und wachsen schließlich zu einem konfluierenden Zellteppich zusammen. Hierbei beträgt die Verdopplungszeit der Zellen ungefähr zwei Tage.

5.2 Charakterisierung hippocampaler Dispersionskulturen

Um die Ergebnisse aus den Versuchen mit hippocampalen Dispersionskulturen richtig interpretieren zu können, muss man die unterschiedlichen Zelltypen und ihre Quantität kennen. Für diese Charakterisierung wurden 49 Wells aus vier verschiedenen Tierpräparationen nach 10 Tagen Kultur fixiert und immunocytochemisch untersucht. Die Auswertung ergab ein Zellbild, welches zu mehr als 80 % aus Neuronen besteht. Desweiteren fanden wir Astrozyten und andere Gliazellen (siehe Tab.1. und Diag. 1.).

Antikörper	Zelltyp	Anteil in %
MAP2-positive	Neurone	81
GFAP-positive	Astrozyten	16
MOSP-positive	Oligodendrozyten	1
CD11b-positive	Mikroglia	2

Tab. 1.: Charakterisierung von hippocampalen Dispersionskulturen



Diag. 1.: Charakterisierung von hippocampalen Dispersionskulturen

5.3 Einfluss von Östradiol auf die Morphologie der Kulturen

Bei der Beobachtung der Morphologie der Zellen fällt auf, dass sowohl PC-12 Zellen als auch die hippocampalen Dispersionskulturen Zellausläufer bilden. Über diese Neuriten nehmen die Zellen untereinander Kontakt auf. Die Zugabe von Östradiol zum Nährmedium in einer Konzentration von 10^{-7} M lässt die Zellen vitaler erscheinen. Sie wachsen schneller als eine unbehandelte Kontrollgruppe. Sie bilden vermehrt Neuriten aus und verstärken so die zelluläre Kontaktaufnahme untereinander. Ferner besitzen die Östradiol behandelten Zellen weniger Einschlüsse in Form von Vesikeln und Vakuolen als Zeichen ihrer Vitalität. Diese Beobachtungen sind sowohl bei den PC-12 Zellen als auch bei den hippocampalen Dispersionskulturen festzustellen. Die Zugabe von Östradiol in physiologischen Konzentrationen lässt keine Veränderung der Morphologie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe sichtbar werden.

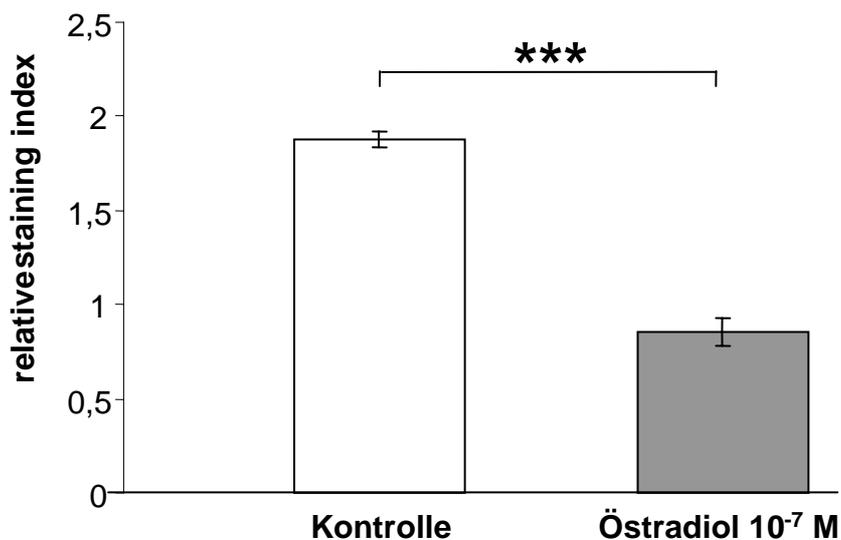
5.4 Synaptopodinexpression in PC-12 Zellen unter Östradiol Stimulation

Die PC-12 Zellen wurden sechs Tage lang mit einer Östradiol Konzentration von 10^{-7} M stimuliert. Die Synaptopodinexpression wurde nach erfolgter Immuncytochemie per digitaler Fotografie und digitaler Auswertung bestimmt und statistisch ausgewertet (siehe Methoden).

Es zeigte sich eine hochsignifikante Herunterregulation der Synaptopodinexpression unter einer Östradiol Konzentration von 10^{-7} M. Dieser Unterschied wurde nach einer sechstägigen Stimulation gemessen (siehe Tab. 2. und Diag. 2.).

	staining index	Standard-abweichung	n	SEM	Signifikanz
Kontrolle	1878	282,9	50	40	
Östradiol 10^{-7} M	857	522,3	50	73,9	0

Tab. 2.: Synaptopodinexpression unter Östradiol Stimulation 10^{-7} M bei PC-12 Zellen



Diag. 2.: Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin bei PC-12 Zellen nach Behandlung mit Estradiol 10⁻⁷ M. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM (n = 50). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (***) p \leq 0,001).

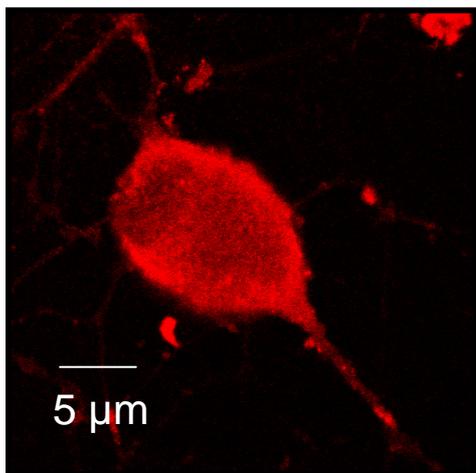


Abb. 5.:
PC-12 Zelle ohne Östradiol Stimulation
Antikörper: Synaptopodin

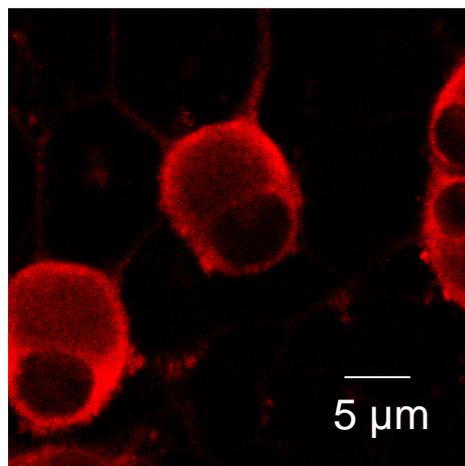


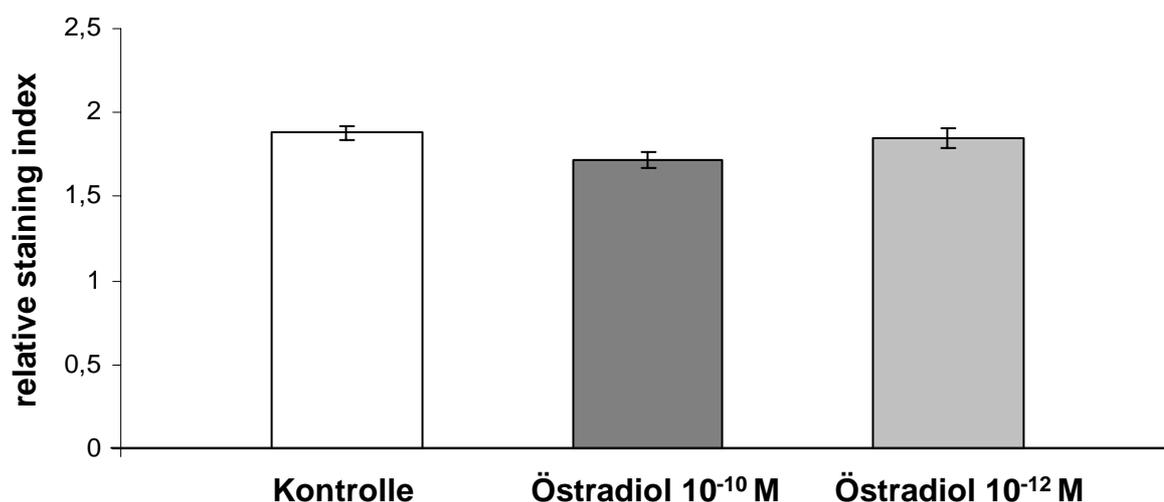
Abb. 6.:
PC-12 Zelle mit Östradiol Stimulation 10⁻⁷ M
Antikörper: Synaptopodin

5.5 Effekte von physiologischen Konzentrationen von Östradiol auf die PC-12 Zellen

Die PC-12 Zellen wurden sechs Tage lang mit einer Östradiol-Konzentration von 10^{-10} M oder 10^{-12} M stimuliert. Dies entspricht der physiologischen Konzentration von Östradiol in weiblichen und männlichen Tieren. Die Synaptopodinexpression wurde danach gemessen. Als Maß für die Synaptopodinexpression diente wieder der staining index. Aus jeder Zelle wurde wie im oben beschriebenen Verfahren jeweils ein gleich großes Quadrat ausgeschnitten, welches so den relative staining index pro Zelle widerspiegelt basierend auf einer genormten Fläche. Die so gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die physiologischen Konzentrationen von Östradiol keinen sichtbaren Effekt auf die Expression von Synaptopodin haben (siehe Tab. 3. und Diag. 3.).

	staining index	Standard-abweichung	N	SEM	Signifikanz
Kontrolle	1878	282,9	50	40	
Östradiol 10^{-10} M	1720	340	50	48	0,399
Östradiol 10^{-12} M	1852	403	50	57	0,641

Tab. 3. Synaptopodinexpression unter Östradiol Stimulation 10^{-10} M und 10^{-12} M bei PC-12 Zellen



Diag. 3.: Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin bei PC-12 Zellen nach Behandlung mit Östradiol in den Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-12} M. Dargestellt sind der Mittelwert \pm SEM (n = 50).

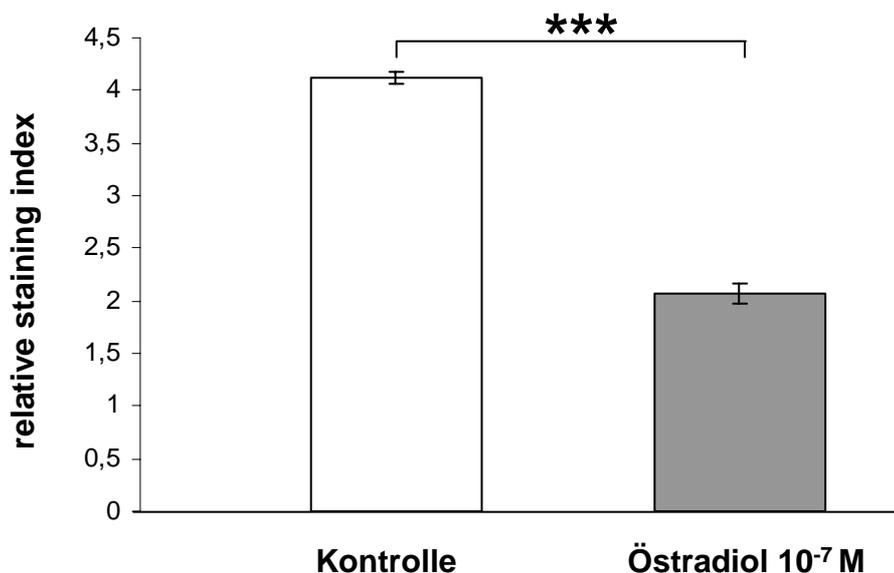
5.6 Effekt von Östradiol auf hippocampale Dispersionskulturen

Bei folgender Auswertung soll der Einfluss von Östradiol auf hippocampale Dispersionskulturen untersucht werden. Es wurde wieder der relative staining index als Maß für die Synaptopodinexpression ermittelt. Die Dispersionskulturen wurden mit einer Östradiol Konzentration von 10^{-7} M stimuliert. Nach zehn Tagen wurden die Kulturen fixiert und die Synaptopodinexpression gemessen. Bei der Auswertung ging jeweils pro Zelle ein genormtes Quadrat in die Messung ein.

Es zeigte sich eine hochsignifikante Herunterregulation der Synaptopodinexpression durch eine Östradiol Konzentration von 10^{-7} M. Dieser Unterschied wurde nach einer sechstägigen Stimulation gemessen (siehe Tab. 4. und Diag. 4.).

	staining index	Standard-abweichung	N	SEM	Signifikanz
Kontrolle	4,1142	0,432	50	0,06	
Östradiol 10^{-7} M	2,07	0,737	50	0,1	0

Tab. 4. Synaptopodinexpression unter Östradiol Stimulation 10^{-7} M bei Dispersionskulturen



Diag. 4.: Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin bei Dispersionskulturen nach Behandlung mit Östradiol in der Konzentration 10^{-7} M. Dargestellt sind der Mittelwert \pm SEM (n = 50). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (***) $p \leq 0,001$.

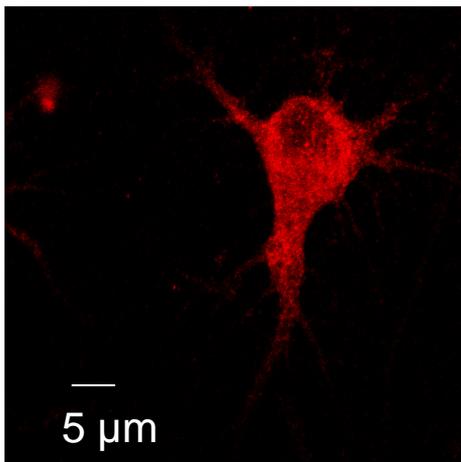


Abb. 7.:
Dispersionskultur ohne Östradiolstimulation
Antikörper: Synaptopodin

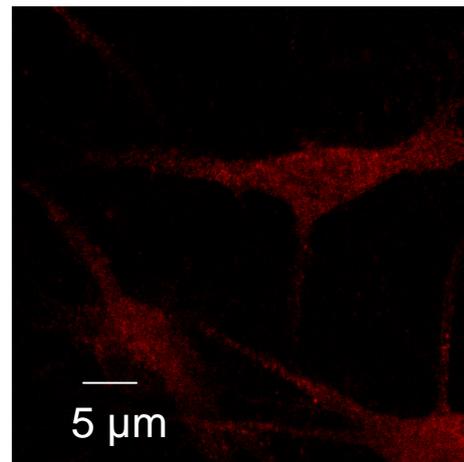


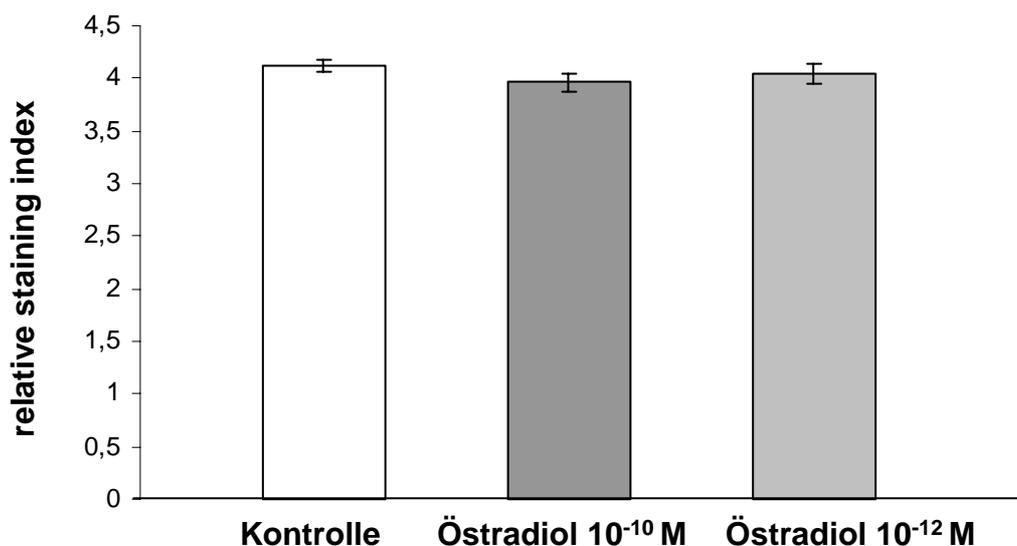
Abb. 8.:
Dispersionskultur mit Östradiolstimulation 10^{-7} M
Antikörper: Synaptopodin

5.7 Effekte von physiologischen Konzentrationen von Östradiol auf hippocampale Dispersionskulturen

Die Dispersionskulturen wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren mit physiologischen Konzentrationen von Östradiol behandelt. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 10^{-10} M oder 10^{-12} M. Nach sechstägiger Stimulation erfolgte die Fixierung und die Auswertung mittels digitaler Fotografie und Ermittlung des relative staining indexes. Auch hier gingen nicht die gesamten Zellen in die Auswertung ein, sondern nur jeweils ein definierter Ausschnitt der Zelle, um so Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Zellgrößen zu vermeiden. Die so gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die physiologischen Konzentrationen von Östradiol keinen sichtbaren Effekt auf die Expression von Synaptopodin haben (siehe Tab. 5. und Diag. 5.).

	staining index	Standard-abweichung	n	SEM	Signifikanz
Kontrolle	4,1142	0,432	50	0,06	
Östradiol 10^{-10} M	3,96	0,539	50	0,08	0,429
Östradiol 10^{-12} M	4,04	0,646	50	0,09	0,891

Tab. 5. Synaptopodinexpression unter Östradiol Stimulation 10^{-10} M und 10^{-12} M bei Dispersionskulturen



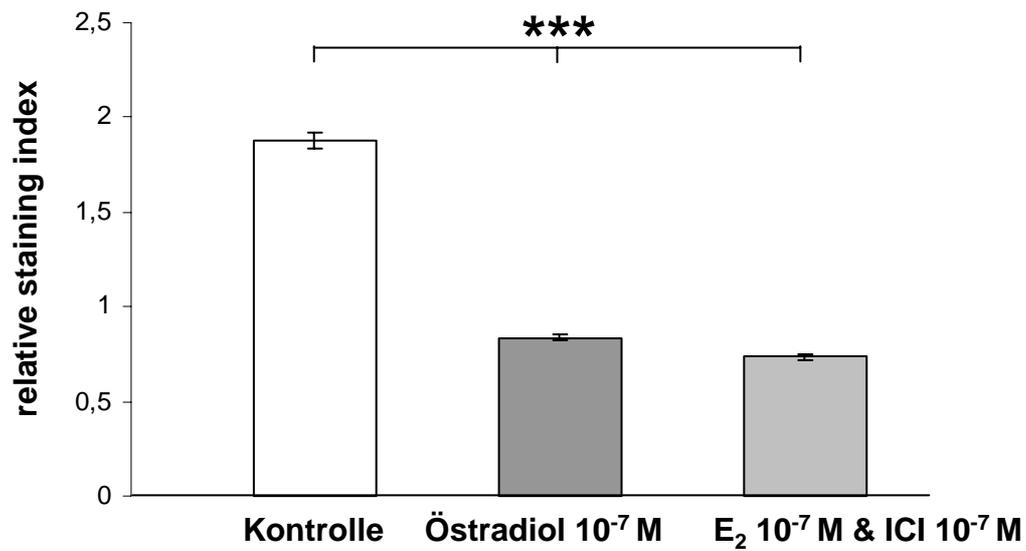
Diag. 5.: Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin bei Dispersionskulturen nach Behandlung mit Östradiol in den Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-12} M. Dargestellt sind der Mittelwert \pm SEM (n = 50).

5. 8 Effekte von Östradiol und ICI 182,780 auf PC-12 Zellen

Die PC-12 Zellen wurden mit Östradiol und dem Antiöstrogen ICI 182,780 stimuliert. Die eingesetzten Konzentrationen beliefen sich jeweils auf 10^{-7} M. Die Fixierung und Auswertung der Zellen erfolgte nach sechs Stimulationstagen. Für die Berechnung des relative staining indexes wurde jeweils ein definierter Ausschnitt pro Zelle herangezogen. Die Daten zeigen, dass die Synaptopodinexpression unter der alleinigen Zugabe von Östradiol in einer Konzentration von 10^{-7} M erniedrigt ist. Dies bestätigt die oben beschriebenen Versuche. Die erniedrigte Synaptopodinexpression ist auch bei einer simultanen Stimulation mit Östradiol von 10^{-7} M und ICI 182,780 von 10^{-7} M festzustellen (siehe Tab. 6. und Diag. 6.).

	staining index	Standard-abweichung	n	SEM	Signifikanz
Kontrolle	1878	282,9	50	40	
E2 10^{-7} M	837,36	132	50	18,67	0
E2 10^{-7} M & ICI 182,780 10^{-7} M	735,81	103	50	14,57	0

Tab. 6. Synaptopodinexpression unter Östradiol Stimulation 10^{-7} M und ICI 182,780 und Östradiol Stimulation von je 10^{-7} M von 6 Tagen bei PC-12 Zellen



Diag. 6.: Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin bei PC-12 Zellen nach Behandlung mit Östradiol in der Konzentration 10^{-7} M und Östradiol und ICI jeweils in der Konzentration 10^{-7} M. Dargestellt sind der Mittelwert \pm SEM (n = 50). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (***) $p \leq 0,001$).

6. Diskussion

Seit der Entdeckung der Spines durch Ramón y Cajal (1891) sind sie Gegenstand neuronaler Forschung. Die Wissenschaft ist fasziniert von der Idee, dass Spines möglicherweise eine entscheidende Rolle für die Ausbildung des Gedächtnisses spielen. Diese Arbeit soll den Stellenwert und die Wichtigkeit des Östrogens in der Ausbildung neuronaler Plastizität aufzeigen und belegen.

Die Steuerung der neuronalen Plastizität ist vielfältig. Steroide scheinen hierbei eine zentrale Rolle einzunehmen, da es eine von den Gonaden unabhängige Steroidbiosynthese im ZNS gibt (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Eine gezielte Unterdrückung der Östradiolsynthese durch Letrozol reduziert die Spinedichte. Daraus lässt sich schließen, dass die im ZNS produzierten Östrogene eine wichtige Rolle in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität haben.

Der Spineapparat, dessen exakte Funktion bis heute nicht genau geklärt ist, ist ein auf das Vorhandensein von Synaptopodin essentiell angewiesenes Zellorganell. Es wird vermutet, dass der Spineapparat als Calciumspeicher den Calciumhaushalt der Spines mit beeinflusst und / oder in der lokalen Proteinbiosynthese eingebunden ist. Wir wissen, dass das Fehlen des Spineapparates bei der Synaptopodin-Knockout-Maus mit eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten und mit einer reduzierten Ausbildung des LTP einhergeht (Deller *et al.*, 2003). Gleichzeitig findet sich eine verstärkte Expression der Synaptopodin-mRNA nach LTP-Induktion (Yamazaki *et al.*, 2001), was darauf hindeutet, dass der Spineapparat in der Ausbildung der neuronalen Plastizität eine Schlüsselfunktion einnimmt.

In dieser Arbeit ist erstmalig untersucht worden, in wie weit die Ausbildung der Spineapparate durch Östrogene beeinflussbar ist.

Die Stimulation mit physiologischer Östrogenkonzentration zeigte keinen Einfluss auf die Synaptopodinexpression im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. Durch die Zugabe von Östradiol in einer Konzentration von 10^{-7} M konnte ein signifikanter Unterschied erzielt werden. Die Synaptopodinexpression war durch diese

Stimulation deutlich erniedrigt. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob Synaptopodin in Signalkaskaden eingebunden ist, welche für Östrogene sensibel sind.

Untersuchungen an der Synaptopodin-Knockout-Maus belegen, dass die Existenz des Spineapparates von Synaptopodin abhängig ist (Deller *et al.*, 2003). So gingen wir von der Theorie aus, dass die Synaptopodinexpression mit dem Vorhandensein des Spineapparates korreliert. Dies würde bedeuten, dass durch die Zugabe von Östradiol nicht nur die Synaptopodinexpression reduziert wird, sondern gleichzeitig auch der Spineapparat in weniger Spines zu finden ist. Zur Überprüfung, ob die Anzahl der Spineapparate in den Spines verringert sind, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von hippocampalen Slicekulturen ausgewertet und so das Auftreten des Zellorganells quantifiziert. Hierbei zeigte sich ein deutlich vermindertes Vorkommen des Spineapparates bei den mit Östrogenen behandelten Slicekulturen (Disteldorf, Dissertation 2009).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Synaptopodinexpression mit dem quantitativen Auftreten des Spineapparates korreliert.

Deller *et al.* (2003) und Bas Orth und Deller (2005) postulierten ebenfalls, dass durch die Markierung von Synaptopodin der Spineapparat identifiziert werden kann. Bei einer Untersuchung der Spines zeigte sich eine über 95%ige positive Korrelation für Synaptopodin. Die Verteilung gleicht der Lokalisation von Spineapparaten, wie sie von Gray (1959) und Spacek und Harris (1997) beschrieben wurden.

In einer aktuellen Arbeit (Bas Orth *et al.*, 2007) konnte gezeigt werden, dass Synaptopodin neben dem Spineapparat für ein weiteres Zellorganell essentiell ist, nämlich das Axoninitialsegment von Neuronen. Es enthält die so genannte „Cisternal Organelle“, die aus glattem endoplasmatischem Retikulum mit dazwischenliegendem elektronendichten Material besteht. Dieses Zellorganell hat große morphologische Ähnlichkeit mit dem Spineapparat. Bei der Synaptopodin-Knockout-Maus konnte weder die Cisternal Organelle noch der Spineapparat gefunden werden. Das Fehlen der Cisternal Organelle beeinflusst nicht die Ausbildung und Qualität des Aktionspotentials (Bas Orth *et al.*, 2007). Inwieweit die Cisternal Organelle einem Einfluss der Östrogene unterliegt, ist bis jetzt nicht bekannt.

Die Tatsache, dass Synaptopodin für beide Zellorganellen essentiell ist, könnte den Schluss nahe legen, dass sie beide ähnliche Funktionen erfüllen. So könnte die für den Spineapparat propagierte Rolle als Calciumspeicher auch für die Cisternal Organelle gelten.

Die klassische Östrogenwirkung wird über die zytoplasmatischen Östrogenrezeptoren α und β vermittelt. Nach einer Aktivierung bewegen sie sich in den Nukleus und induzieren die Transkription spezifischer Gene.

In den vergangenen Jahren wurden auch G-Proteinrezeptoren entdeckt, welche spezifisch für Östrogene sind. Interessanterweise wird der G-Proteinrezeptor 30 auf Pyramidenzellen des Hippocampus exprimiert (Funakoshi *et al.*, 2006).

Für uns stellte sich die Frage, in welche Signalkaskade die oben beschriebenen Östrogeneffekte eingebettet sind. Durch die Zugabe von ICI 182,780 werden die zytoplasmatischen Rezeptoren geblockt. Da ICI 182,780 keine agonistischen Effekte mit Östrogen ausübt, ist eine solche potentielle Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen. Die Wirkung des exogen zugefügten Östrogens ist trotz der Blockade der zytoplasmatischen Rezeptoren noch sichtbar. Dies lässt den Schluss zu, dass die Östrogenwirkung nicht über die durch ICI 182,780 geblockten zytoplasmatischen Östrogenrezeptoren vermittelt wird. Die Östrogenwirkung müsste demnach über membrangebundene Rezeptoren an die Zelle weitergegeben werden.

Funakoshi *et al.* (2006) berichteten über einen östrogensensiblen G-Proteinrezeptor, der nach einer Stimulation einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach sich zog. Dieser Anstieg des zytoplasmatischen Calciums könnte einen Calciumstrom aus dem Spineapparat triggern. Dies wäre dann eine Calcium vermittelte Calciumfreisetzung. Diese Veränderung der Calciumkonzentration im Spine könnte eine Signalkaskade induzieren, welche die Expression von Synaptopodin verringert. Diese verminderte Expression, des für den Spineapparat essentiellen Bausteins, würde sich dann in einer reduzierten Anzahl von Spineapparaten widerspiegeln.

Auf der anderen Seite ist aber auch vorstellbar, dass der Calciumstrom aus dem Spineapparat mit dessen Auflösung oder Verkleinerung einhergeht. Sowohl die Auflösung des Spineapparates als auch die verminderte Synthese von Synaptopodin würde die gemessene verminderte Expression von Synaptopodin erklären.

Die Stimulation der PC-12 Zellen mit Östrogenen in physiologischen Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-12} M zeigte keine Veränderung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. Eine signifikante Reduktion des Synaptopodins konnte bei einer Östrogenkonzentration von 10^{-7} M erzielt werden.

Somit zeigen die Dispersionskulturen mit PC-12 Zellen vergleichbare Ergebnisse. Dies ist überraschend, da PC-12 Zellen keinen Spineapparat ausbilden. Dies deutet auf eine vom Spineapparat unabhängige Herunterregulation hin. Die Tatsache, dass die Zellen Synaptopodin synthetisieren, lässt den Schluß zu, dass eine vom Spineapparat unabhängige Funktion vorliegt. Hier könnte die bereits mehrfach beschriebene enge Bindung zu α -Aktinin (Kremerskothen *et al.*, 2005) eine bedeutende Rolle spielen.

Die These, dass sich der Spineapparat auflöst oder verkleinert, wenn Calciumionen ausströmen, rückt somit mehr in den Hintergrund, da dieser Mechanismus bei den PC-12 Zellen nicht stattfinden kann.

Somit stellt sich die Frage, welche Signalwege durch die Östrogene induziert werden und zu einer verminderten Expression von Synaptopodin führen.

Die Östrogensynthese im Gehirn wird durch Calcium reguliert. Durch den Calciumeinstrom werden calciumabhängige Kinasen stimuliert und das Schlüsselenzym der Östrogensynthese, die Aromatase, phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu einer Inhibition des Enzyms (Balthazart *et al.*, 2003).

Diese Inhibition der Aromatase wäre ein potentieller Auslöser, welcher die Auflösung von Synaptopodin induzieren könnte. Somit wäre dann der Calciumeinstrom, ausgelöst über die NMDA-Rezeptoren oder über membranständige Östrogenrezeptoren, der Reiz, welcher zu einer Inhibition der Aromatase führt. Interessanterweise führt auch die Stimulation von PC-12 Zellen mit Diethylstilbestrol (DES), einem synthetischen Östrogen, zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Janevski *et al.*, 1993). Dieser Calciumeinstrom würde dann auch bei den PC-12 Zellen Synaptopodin herunterregulieren.

Die Inhibition der Aromatase kann auch durch Letrozol erreicht werden. Die Letrozolgabe bindet das Enzym und inhibiert es reversibel. Dies würde den phosphorylierten Zustand des Enzyms induzieren. Hierbei zeigt sich das Synaptopodin ebenfalls deutlich herunterreguliert (Rune, noch nicht veröffentlichte Daten).

Sicher lässt sich nun sagen, dass die Synaptopodinexpression unabhängig vom Spineapparat reguliert wird. Es liegt nahe, den angesprochenen Calciumanstieg als einen der entscheidenden Faktoren zu sehen, der die Synthese oder den Abbau von Synaptopodin kontrolliert.

Funktion des Spineapparates und der Spines

Die Spines stellen das postsynaptische Element der asymmetrischen Synapsen dar (Gray, 1959). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Spines zu hoch dynamischen Veränderungen fähig sind. Diese Veränderungen könnten die Adaption des postsynaptischen Neurons an die präsynaptische Aktivität darstellen. Dies könnte die morphologische Komponente der neuronalen Plastizität darstellen. Spines scheinen einen wichtigen Teil in der Ausbildung des Gedächtnisses zu spielen.

Einige Autoren hingegen sprechen Spines eine ganz andere Aufgabe im ZNS zu. Die Spines stellen in ihren Augen ein Kompartiment dar, welches die Vorgänge an der Synapse isoliert. Durch diese Isolierung sollen die Veränderungen im Transmittergleichgewicht nur lokal auf die Synapse wirken und so ein unerwünschter Einfluss auf den Dendriten unterbunden werden (Segal *et al.*, 2005).

Obwohl die Beweglichkeit der Spines hinreichend beschrieben wurde, ist der molekulare Mechanismus, welcher präsynaptische Aktivität in Spineveränderungen überträgt, nicht bekannt. Die Spinebeweglichkeit wird durch das Zytoskelett der Zellen ermöglicht. Aktin als ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts wurde in den Spines nachgewiesen (Fifková *et al.*, 1989). Die Regulation von Aktin könnte daher der entscheidende Mechanismus für die Entstehung oder Untergang von Synapsen und Spines sein. Synaptopodin ist aufgrund der Bindung an Aktin (Mundel *et al.*, 1997), α -Aktinin (Kremerskothen *et al.*, 2005) und seiner Position im Spine ein potentieller Kandidat für die Steuerung dieser Prozesse. Der zytoplasmatische Calciumspiegel ist ein entscheidender Botenstoff bei der Steuerung des Zytoskeletts (Oertner und Matus *et al.*, 2005). An dieser Stelle könnte der Spineapparat als Calciumspeicher in die Steuerung dieser Prozesse eingreifen.

Ferner scheint der Spineapparat über Aktin und α -Aktinin-2 mit NMDA-Rezeptoren verbunden zu sein (Wyszynski *et al.*, 1998). Somit könnte auch eine vom NMDA-Rezeptor abhängige Freisetzung von intrazellulärem Calcium möglich sein (Emptage *et al.*, 1999).

Die erhöhte Expression von Synaptopodin-mRNA 75 Minuten und dreieinhalb Stunden nach einer stattgefundenen LTP, beruht auf der verstärkten Aktivität des NMDA-Rezeptors. Durch die Blockade des Rezeptors mit MK801, einem nicht kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten, konnte die Zunahme der Synaptopodinexpression durch eine LTP unterdrückt werden (Yamazaki *et al.*, 2001).

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt in das oben dargestellte Modell einordnen. Durch die Aktivität des NMDA-Rezeptors kommt es zu einem Calciumeinstrom in den Spine und somit zu einer Inaktivierung der Aromatase. Dies geht mit einer Auflösung von Synaptopodin und des Spineapparates einher. Die verminderte Konzentration von Synaptopodin wird dann im zeitlichen Verlauf wieder ausgeglichen durch die verstärkte mRNA-Expression, von welcher Proteinbiosynthese durch Translation erfolgt. Dort könnte Synaptopodin entweder bestehende Spineapparate vergrößern oder als Baustein für neue Spineapparate dienen. Somit könnte die Existenz des Spineapparates direkt von der präsynaptischen neuronalen Aktivität abhängen.

Eine verstärkte Ausprägung des LTP konnte durch eine Östradiolstimulation erreicht werden. Dies ist wahrscheinlich kein direktes Resultat der hier dargestellten verminderten Synaptopodinexpression. Die LTP Zunahme ist durch eine Veränderung des Verhältnisses von NMDA-Rezeptoren zu AMPA-Rezeptoren begründet (Smith und McMahon, 2005). In einer nachfolgenden Arbeit konnte der für diesen Effekt verantwortliche Rezeptor identifiziert werden. Östrogene induzieren eine Zunahme von NR2B-Rezeptoren. Über diese verstärkte Expression und der damit verbundenen verstärkten Expression von NMDA-Rezeptoren wird eine Zunahme der LTP erreicht (Smith und McMahon, 2006).

Calcium

Der Botenstoff Calcium war zwar kein direkter Teil der durchgeführten Experimente, soll jetzt aber aufgrund der zentralen Rolle in den Signalwegen in den Spines hier gesondert erörtert werden.

Calcium nimmt in der Ausbildung der neuronalen Plastizität und vor allem in der Ausbildung der LTP eine entscheidende Rolle ein. Die Calciumkonzentration im Plasma eines Spines kann sich durch Einstrom von Calcium von extrazellulär oder durch Entleerung intrazellulärer Speicher verändern. Der Einstrom von extrazellulär wird durch spannungsabhängige Calciumkanäle, durch NMDA- und Östrogenrezeptoren vermittelt. Die intrazelluläre Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum kann durch die Familie der Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Ryanodinrezeptoren ausgelöst werden. Diese Rezeptoren werden durch geringe Veränderungen des Calciumspiegels aktiviert. Man spricht dann von einer

Calcium induzierten Calciumfreisetzung (Garaschuk *et al.*, 1997; Emptage *et al.*, 1999 Rae *et al.*, 2000).

Die Calciumspeicher werden nach Entleerung durch eine Ca-ATPase aufgefüllt. Diese Calcium-Pumpen können durch Thapsigargin gehemmt werden (Thastrup *et al.*, 1990). Hierbei bleibt die Funktion der Calciumspeicher erhalten. Durch die Blockierung können sich die Speicher nach initialer Abgabe des Calciums nicht wieder auffüllen, wodurch die intrazelluläre Calciumfreisetzung vermindert wird (Behnisch und Reymann, 1995; Kovalchuk *et al.*, 2000).

Die Bedeutung der intrazellulären Calciumfreisetzung aus Calciumspeichern für die Entstehung von LTP konnte in einer Studie von Matias *et al.* (2002) gezeigt werden. Durch die Blockade der Ryanodinrezeptoren waren die Calciumströme in der CA1 Region des Hippocampus deutlich verringert und die Ausbildung einer STP und LTP konnte so unterdrückt werden. Dies zeigt, dass die Ausbildung der LTP auf eine Calciumfreisetzung aus intrazellulärem Calciumspeicher angewiesen ist. Bei diesen Versuchen wurde nach einer initialen geringen Depolarisation ein unbeeinträchtigter geringer Calciumfluss innerhalb der Zelle gemessen trotz Blockierung der intrazellulären Calciumspeicher durch Thapsigargin. Dieser Calciumfluss wird wahrscheinlich durch einen NMDA-Rezeptor induziert. Dieser Calciumeinstrom könnte die Calcium induzierte Calciumfreisetzung bewirken.

Diese beschriebenen Daten stellen die Grundlage für weitere Experimente dar. Vor allem wäre es interessant herauszufinden, ob die Modifikation des Calciumhaushaltes durch den Einsatz von Thapsigargin einen Einfluss auf die Aktivität der Aromatase und auf die Expression von Synaptopodin und damit auf den Spineapparat hat.

7. Zusammenfassung

Der Einfluss von Östrogenen auf die synaptische Plastizität wurde hinreichend beschrieben (McEwen *et al.*, 2002, 2004; Kretz *et al.*, 2004). Desweiteren wird den Östrogenen eine Rolle als modulierendes Neurosteroid zugeschrieben. Bei dieser Regulation nimmt die Modifikation der Aromatase als Schlüsselenzym der Östrogensynthese eine zentrale Rolle ein.

Synaptopodin stellt einen essentiellen Baustein für den Spineapparat dar, so dass die Quantität von Synaptopodin mit der Zahl der Spineapparate korreliert. Das Fehlen der Spineapparate geht mit einem reduzierten LTP einher, so wird diesem Zellorganell eine Schlüsselfunktion in der Ausbildung des Gedächtnis zugesprochen (Deller *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der exogen zugeführten Östrogene auf die Expression von Synaptopodin bei hippocampalen Dispersionskulturen der Ratte und bei PC-12 Zellen untersucht. Der Zusatz von ICI 182,780 zu den Kulturen sollte Aufschluss über beteiligte Östrogenrezeptoren geben.

Unter einer Östradiolstimulation von 10^{-7} M zeigte sich die Expression von Synaptopodin bei den Dispersionskulturen und bei den PC-12 Zellen reduziert. Dies deutet auf eine vom Spineapparat unabhängige Regulation von Synaptopodin hin, da PC-12 Zellen keinen Spineapparat ausbilden. Eine Zugabe von Östradiol in physiologischen Konzentrationen zeigte keinen Effekt. Diese dargestellten Effekte wurden nicht über zytoplasmatische Östrogenrezeptoren vermittelt, da die reduzierte Synaptopodinexpression auch unter ICI 182,780-Gabe persistierte.

Unter Östrogenstimulation bei gleichzeitig geblockten zytoplasmatischen Östrogenrezeptoren wird offensichtlich durch membranständige, östrogensensible Rezeptoren ein Calciumeinstrom induziert. Durch den Calciumeinstrom werden calciumabhängige Kinasen stimuliert und das Schlüsselenzym der Östrogensynthese, die Aromatase, phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu einer Inhibition des Enzyms (Balthazart *et al.*, 2003). Diese Inhibition der Aromatase wäre ein potentieller Auslöser, welcher die Auflösung von Synaptopodin und den Spineapparaten induzieren könnte.

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. *Endocrinol* 135: 395-401.
- Adam G., Matus A., (1996) Role of actin in the organisation of brain postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res* 43: 246-250.
- Anahara R., Toyama Y., Maekawa M., Yoshida M., Kai M., Ishino F., Toshimori K., Mori C. (2006) Anti-estrogen ICI 182.780 and anti-androgen flutamide induce tyrosine phosphorylation of cortactin in the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in the mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 276-80.
- Asanuma K., Kim K., Mundel (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha actin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 115: 1188-1198.
- Asanuma K., Kim K., Mundel (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 8: 485-491.
- Bailey CH., Kandel ER. (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Ann Rev Physiol* 55: 397-426.
- Balthazart J., Baillien M., Charlier TD., Ball GF. (2003) Calcium dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. *Eur J Neurosci* 17: 1591-1606.
- Balthazart J., Baillien M., Charlier TD., Cornil CA., Ball GF.(2003) Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86: 367-79.
- Bas Orth C., Deller T. (2005) Lamina-specific distribution of Synaptopodin, an actin-associated molecule essential for the spine apparatus, in identified principal cell dendrites of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 487: 227-39.
- Bas Orth C., Schultz C., Müller CM., Frotscher M., Deller T. (2007) Loss of the cisternal organelle in the axon initial segment of cortical neurons in synaptopodin-deficient mice. *J Comp Neurol* 5: 441-449.
- Behnisch T., Reymann KG. (1995) Thapsigargin blocks long-term potentiation induced by weak, but not strong tetanisation in rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Lett* 192: 185-8.
- Birge SJ., McEwen BS., Wise PM. (2001) Effects of estrogen deficiency on brain function. Implications for the treatment of postmenopausal women. *Postgrad Med* 11-6.

-
- Bradley R., Kirby FD. (1979) Anomalous development of the spinal cord in a calf. *Vet Pathol* 16: 49-59.
 - Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, Greengard P, McEwen BS. (2001) Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinol* 142: 1284-9.
 - Brandon JG., Coss RG. (1982) Rapid dendritic spine stem shortening during one-trial learning: the honeybee's first orientation flight. *Brain Res* 252: 51-61.
 - Brewer GJ. (1997) Isolation und Culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 71: 143-155.
 - Brünig I., Kaech S., Brinkhaus H., Oertner TG., Matus A. (2004) Influx of extracellular calcium regulates actin-dependent morphological plasticity in dendritic spines. *Neuropharmacol* 47: 669-76.
 - Caceres A., Payne MR., Binder LI., Steward O. (1983) Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1738-42.
 - Carrer HF., Araque A., Buño W. (2003) Estradiol regulates the slow Ca²⁺ - activates K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 23: 6338-6344.
 - Cohen RS., Chung SK., Pfaff DW. (1985) Immunocytochemical localization of actin in dendritic spines of the cerebral cortex using colloidal gold as a probe. *Cell Mol Neurobiol* 5: 271-84.
 - Colonnier M. (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9: 268-87.
 - Coss RG., Globus A. (1978) Spine stems on tectal interneurons in jewel fish are shortened by social stimulation. *Science* 200: 787-90
 - Czarnecki K., Haas CA., Bas Orth C., Deller T., Frotscher M. (2005) Postnatal development of synaptopodin expression in the rodent hippocampus. *J Comp Neurol* 490: 133-144.
 - Deller T., Merten T., Roth SU., Mundel P., Frotscher M. (2000) Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J Comp Neurol* 418: 164-181.
 - Deller T., Mundel P., Frotscher M. (2000) Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus* 10: 569-581.
 - Deller T., Mundel P., Frotscher M. (2002) Laminar Distribution of Synaptopodin in normal and reeler mouse brain depends on the position of spine-bearing neurons. *J Comp Neurol* 453: 33-44

-
- 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: 10494-9.
 - Deller T., Bas Orth C., Mundel P. (2006) Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion. *J Comp Neurol* 499: 471-484.
 - Deller T., Orth CB., Del Turco D., Vlachos A., Burbach GJ., Drakew A., Chabanis S., Korte M., Schwegler H., Haas CA., Frotscher M. (2007) A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Ann Anat* 189: 5-16.
 - Dillon C., Goda Y. (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28: 25-55.
 - Disteldorf E., Stereologische Untersuchung des Spineapparates in hippocampalen Spines unter dem Einfluss von E2. Dissertation noch nicht veröffentlicht.
 - Drakew A., Müller M., Gähwiler BH., Thompson SM., Frotscher M. (1996) Spine loss in experimental epilepsy: quantitative light and electron microscopic analysis of intracellularly stained CA3 pyramidal cells in hippocampal slice cultures. *Neuroscience*. 70: 31-45.
 - Emptage N., Bliss TV., Fine A. (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22: 115-124.
 - Engert F., Bonhoeffer T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399: 66-70.
 - 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. *Journal of Neurochemistry*, 97: 1136.
 - Fifková E., Van Harrevelde A. (1977) Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area. *J Neurocytol* 6: 211-30.
 - Fifková E., Delay R.J. (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95: 345-350.
 - Fifková E., Markham JA., Delay RJ. (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res* 266: 163-168.
 - Fifková E., Morales M. (1989) Calcium-regulated contractile and cytoskeletal proteins in dendritic spines may control synaptic plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 568: 131-7.
 - Fischer M., Kaech S., Knutti D., Matus A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-854.

-
- Frenguelli BG., Malinow R. (1996) Fluctuations in intracellular calcium responses to action potentials in single en passage presynaptic boutons of layer V neurons in neocortical slices. *Learn Mem* 3: 150-9.
 - Frotscher M., Deller T., (2007) Role of the spine apparatus in synaptic plasticity. *Ann Anat* 189: 5-16.
 - Fukazawa Y., Saitoh Y., Ozawa F., Ohta Y., Mizuno K., Inokuchi K. (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38: 447-460.
 - Funakoshi T., Yanai A., Shinoda K., Kawano MM., Mizukami Y. (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 904-10.
 - Garaschuk O., Yaari Y., Konnerth A. (1997) Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 502: 13-30.
 - Garcia-Segura LM., Wozniak A., Azcoitia I., Rodriguez JR., Hutchison RE., Hutchison JB. (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neurosci* 89: 567-78.
 - Garcia-Segura LM., Naftolin F., Hutchison JB., Azcoitia I., Chowen JA. (1999) Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40: 574-84.
 - García-López P., García-Marín V., Freire M. (2007) The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Prog Neurobiol* 83: 110-30.
 - García-Marín V., García-López P., Freire M. (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci* 30: 479-87.
 - Gray E.G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. *J Anat* 83: 20-433.
 - Greene LA., Tischler AS. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2424-8.
 - Goldin M., Segal M. (2003) Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 17: 2529-2539.
 - Good M., Day M., Muir JL. (1999) Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* 11: 4476-80.
 - 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.

-
- Hao J., Janssen WG., Tang Y., Roberts JA., McKay H., Lasley B., Allen PB., Greengard P., Rapp PR., Kordower JH., Hof PR., Morrison JH. (2003) Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 465: 540-50.
 - Harris KM. (1989) Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9: 2982-2997.
 - Harris KM., Jensen FE., Tsao B. (1992) Threedimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12: 2685-2705.
 - Harris KM (1999) Structure, development, and plasticity in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 9: 343-348.
 - Harris K.M. (1999) Calcium from internal store modifies dendritic spine shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12213-5.
 - Höffken K. (1999) Aromatasehemmer der 3. Generation in der Therapie des Mammacarcinoms. *Onkologie* 5:58-67.
 - Hojo Y., Hattori T. A., Enami T., Furukawa A., Suzuki K., Ishii H. T., Mukai H., Morrison J.H., Jannssen W. G., Kominami S., Harada N., Kimoto T., Kawato S. (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurones. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 865-870.
 - Holcman D., Schuss Z., Korkotian E. (2004) Calcium dynamics in dendritic spines, modeling and experiments. *Eur J Neurosci* 20: 2649-63.
 - Hosokawa T., Rusakov DA., Bliss TV., Fine A. (1995) Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J Neurosci* 15: 5560-73.
 - Howell A. (2000) Faslodex (ICI 182,780). An oestrogen receptor downregulator. *Eur J Cancer* 4: 87-8.
 - Howell A., Osbourne CK. (2001) ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel „pure“ antiestrogen. *Cancer* 91: 455.
 - Jaber BM., Gao T., Huang L., Karmakar S., Smith CL. (2006) The pure estrogen receptor antagonist ICI 182,780 promotes a novel interaction of estrogen receptor-alpha with the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein-binding protein/p300 coactivators. *Mol Endocrinol* 20: 2695-710.
 - Janevski J., Choh V., Stopper H., Schiffmann D., De Boni U. (1993) Diethylstilbestrol alters the morphology and calcium levels of growth cones of PC12 cells in vitro. *Neurotoxicol* 14: 505-11.

-
- Kaech S., Parmar H., Roelandse M., Bornmann C., Matus A. (2001) Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7086-92.
 - Kelly MJ., Qiu J., Wagner EJ., Rønnekleiv OK. (2002) Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83: 187-93.
 - Kennedy MB., Carlisle HJ. (2005) Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 28: 182-7.
 - Kim JS., Kim HY., Kim JH., Shin HK., Lee SH., Lee YS., Son H. (2002) Enhancement of rat hippocampal long-term potentiation by 17 beta-estradiol involves mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent components. *Neurosci Lett* 332: 65-9.
 - Klinge CM., Ramsey TL. (2001) Estrogen response element binding induces alterations in estrogen receptor-alpha conformation as revealed by susceptibility to partial proteolysis. *J Mol Endocrinol* 27: 275-92.
 - Korkotian E., Segal M. (1999) Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12068-72.
 - Korkotian E., Holcman D., Segal M. (2004) Dynamic regulation of spine-dendrite coupling in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 20: 2649-63.
 - Kosaka T. (1980) The axon initial segment as a synaptic site: ultrastructure and synaptology of the initial segment of the pyramidal cell in the rat hippocampus (CA3 region). *J Neurocytol* 9: 861-82.
 - Kovalchuk Y., Eilers J., Lisman J., Konnerth A. (2000) NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 1791-9.
 - Kremerskothen J., Plaas C., Kindler S., Frotscher M., Barnekow A. (2005) Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin/alpha-actinin binding protein. *J Neurochem* 92: 597-606.
 - Kretz O., Fester L., Wehrenberg U., Zhou L., Brauckmann S., Zhao S., Prange-Kiel J., Naumann T., Jarry H., Frotscher M., Rune GM. (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24: 5913-5921.
 - Krucker T., Siggins GR., Halpain S. (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 97: 6856-61.
 - Kuiper GG., Shughrue PJ., Merchenthaler I., Gustafsson JA. (1998) The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19: 253-86.

-
- Kuiper GG., Lemmen JG., Carlsson B., Corton JC., Safe SH., van der Saag PT., van der Burg B., Gustafsson JA. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol* 139: 4252-63.
 - Kuroki Y., Fukushima K., Kanda Y., Mizuno K., Watanabe Y. (2000) Putative membrane-bound estrogen receptors possibly stimulate mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 400: 205-9.
 - Léránth C., Frotscher M. (1983) Commissural fibers terminate on non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus -- a combined Golgi/EM degeneration study. *Brain Res* 265: 289-93.
 - Léránth C., Frotscher M. (1983) Commissural afferents to the rat hippocampus terminate on vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive non-pyramidal neurons. An EM immunocytochemical degeneration study. *Brain Res* 276: 357-61.
 - Léránth C., Shanabrough M. (2001) Supramammillary area mediates subcortical estrogenic action on hippocampal synaptic plasticity. *Exp Neurol* 167: 445-50.
 - Léránth C., Lâm TT. (2003) Role of the medial septum diagonal band of Broca cholinergic neurons in oestrogen-induced spine synapse formation on hippocampal CA1 pyramidal cells of female rats. *Eur J Neurosci* 17: 1997-2005.
 - Léránth C., Petnehazy O., MacLusky NJ. (2003) Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci* 23: 1588-92.
 - Lisman J. (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9574-8.
 - Martin PD., Shapiro ML. (2000) Disparate effects of long-term potentiation on evoked potentials and single CA1 neurons in the hippocampus of anesthetized rats. *Hippocampus* 10: 207-12.
 - Matias C., Dionísio JC., Quinta-Ferreira ME. (2002) Thapsigargin blocks STP and LTP related calcium enhancements in hippocampal CA1 area. *Neuroreport* 13:2577-80.
 - 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 USA* 79: 7590-7594.
 - Matus A., Brünig I., Kaech S., Brinkhaus H., Oertner TG. (2000) Influx of extracellular calcium regulates actin-dependent morphological plasticity in dendritic spines. *Neuropharmacol* 47: 669-76.
 - McCarthy J., Brian and Milner Teresa A. (2003) Dendritic ribosomes suggest local protein synthesis during estrous synaptogenesis. *Developmental Neurosci* 14: 1357-1360.

-
- McEwen B., Akama K., Alves S., Brake WG., Bulloch K., Lee S., Li C., Yuen G., Milner TA. (2001) Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7093-100.
 - McEwen B. (2001) Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91: 2785-801.
 - McEwen B. (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57: 357-84.
 - McEwen B., Li C., Brake WG., Romeo RD., Dunlop JC., Gordon M., Buzescu R., Magarinos AM., Allen PB., Greengard P., Luine V. (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2185-90.
 - Mukai H., Takata N., Ishii HT., Tanabe N., Hojo J, Furukawa A., Kimoto T., Kawato S. (2006) Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity. *J Neurosci* 138: 757-64.
 - Muller D. (2000) Spine changes associated with long term potentiation. *Hippocampus* 10: 596-674.
 - Mundel P., Heid HW., Mundel TM., Krüger M., Reiser J., Kriz W. (1997) Synaptopodin: an actin associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Biol* 139: 193-204.
 - Murphy DD., Segal M. (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16: 4059-68.
 - Murphy DD., Cole NB., Segal M. (1998) Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11412-7.
 - Oertner TG., Matus A. (2005) Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37: 477-82.
 - Papa M., Segal M. (1996) Morphological plasticity in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *Neurosci* 71: 1005-11.
 - Parnavelas JG., Lynch G., Brecha N., Cotman CW., Globus A. (1974) Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature* 248: 71-3.
 - Peters A., Kaiserman-Abramof IR. (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127: 321-55.
 - Pierce JP., Milner TA. (2001) Parallel increases in the synaptic and surface areas of mossy fiber terminals following seizure induction. *Synapse* 39: 249-56.

-
- Prange-Kiel J., Rune GM., Zwirner M., Wallwiener D., Kiesel L. (2001) Regulation of estrogen receptor alpha and progesterone receptor (isoform A and B) expression in cultured human endometrial cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 231-7.
 - Prange-Kiel J. (2003) Para/Autocrine Regulation of Estrogen Receptors in Hippocampal Neurons. *Hippocampus* 13: 226-234.
 - Prange-Kiel J., Fester L., Zhou L., Lauke H., Carrétero J., Rune GM. (2006) Inhibition of Hippocampal estrogen syntheses causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16: 464-71.
 - Prange-Kiel J., Rune GM. (2006). Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neurosci* 138: 765-772.
 - Pozzo-Miller LD., Inoue T., Murphy DD. (1999) Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* 81: 1404-11.
 - Puzzo D., Arancio O. (2006) Fibrillar beta-amyloid impairs the late phase of long term potentiation. *Curr Alzheimer Res* 3: 179-83.
 - Qiu J., Bosch MA., Tobias SC., Grandy DK., Scanlan TS., Ronnekleiv OK., Kelly MJ. (2003) Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23: 9529-40.
 - Racca C., Stephenson FA., Streit P., Roberts JD., Somogyi P. (2000) NMDA receptor content of synapses in stratum of the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 20: 2512-2522.
 - Rae MG, Martin DJ, Collingridge GL, Irving AJ. (2000) Role of Ca²⁺ stores in metabotropic L-glutamate receptor-mediated supralinear Ca²⁺ signaling in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 8628-36.
 - Ramón y Cajal S (1891) Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères. *La Cellule* 7:125-176.
 - Ramón y Cajal S. (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Vols. 1 and 2. A. Maloine.
 - Rausch G., Scheich H. (1982) Dendritic spine loss and enlargement during maturation of the speech control system in the mynah bird (*Gracula religiosa*). *Neurosci Lett* 29: 129-33.
 - Ross WN., Nakamura T., Watanabe S., Larkum M., Lasser-Ross N. (2005) Synaptically Activated Ca²⁺ release from internal stores in CNS neurons. *Cell Mol Neurobiol* 25: 283-95.

-
- Roth SU., Sommer C., Mundel P., Kiessling M. (2001) Expression of synaptopodin, an actin-associated protein, in the rat hippocampus after limbic epilepsy. *Brain Pathol* 11: 169-81.
 - Roth-Alpermann C., Morris RG., Korte M., Bonhoeffer T. (2006) Homeostatic shutdown of long-term potentiation in the adult hippocampus. *Proc Nat Acad Sci* 103: 11039-11044.
 - Rune GM., Frotscher M. (2002) Estrogen up-regulates estrogen receptor α and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neurosci* 113: 167-175.
 - Rune GM., Frotscher M. (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: Role in synaptic plasticity. *Neurosci* 136: 833-842.
 - Rune G.M., 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: 145-155.
 - Rune GM., von Schassen C., Fester L, Prange-Kiel J. (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18: 847-856.
 - Rusakov DA., Davies HA., Harrison E., Diana G., Richter-Levin G., Bliss TV., Stewart MG. (1997) Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neurosci* 80: 69-77.
 - Rusakov DA., Richter-Levin G., Stewart MG., Bliss TV. (1997) Reduction in spine density associated with long-term potentiation in the dentate gyrus suggests a spine fusion-and-branching model of potentiation. *Hippocampus* 7: 489-500.
 - Sabatini BL., Oertner TG., Svoboda K. (2002) The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines. *Neuron* 33: 439-52.
 - Sanghera MK., Simpson ER., McPhaul MJ., Kozlowski G., Conley AJ., Lephart ED. (1991) Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinol* 129: 2834-44.
 - Scheibel ME., Scheibel AB. (1968) Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res* 9: 32-58.
 - Schmidt M., Fasselt B., Rumenapp U., Bienek C., Wieland T, van Koppen CJ., Jakobs KH. (1995) Rapid and persistent desensitization of m3 muscarinic acetylcholine receptor-stimulated phospholipase D. Concomitant sensitization of phospholipase C. *J Biol Chem* 270: 19949-56.
 - Schulz PE., Fitzgibbons JC. (1997) Differing mechanisms of expression for short- and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 78: 321-34.
 - Schulz PE. (1997) Long-term potentiation involves increases in the probability of neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5888-93.

-
- Segal M., Murphy D. (2001) Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm Behav* 40: 156-9.
 - Segal M. (2005) Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6: 277-284.
 - Smith CC., McMahon LL. (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci* 25: 7780-91.
 - Smith CC., McMahon LL. (2006) Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci* 26: 8517-22.
 - Spacek J. (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat Embryol (Berl.)* 171: 235-243.
 - Spacek J., Harris KM. (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17: 190-203.
 - Stewart CM. (1982) Age-related changes in the nervous system. *J Neurosurg Nurs* 14: 69-73.
 - Stewart CM. (1982) Neurochemical transmission, neurotransmitters, and clinical correlations. *J Neurosurg Nurs* 14: 303-8.
 - Svoboda K., Mainen ZF. (1999) Synaptic [Ca²⁺]: intracellular stores spill their guts. *Neuron* 22: 427-30.
 - Swanson LW., Grant G., Hökfelt T., Jones EG., Morrison JH. (2007) A century of neuroscience discovery: reflecting on the Nobel Prize awarded to Golgi and Cajal in 1906. *Brain Res Rev* 55:191-2.
 - Thastrup O., Cullen PJ., Drøbak BK., Hanley MR., Dawson AP. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2466-70.
 - Torres-Fernández O. (2006) The Golgi silver impregnation method: commemorating the centennial of the Nobel Prize in medicine (1906) shared by Camillo Golgi and Santiago Ramón y Cajal. *Biomedica* 26: 498-508.
 - Warren SG., Humphreys AG., Juraska JM., Greenough WT. (1995) LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 703: 26-30.
 - 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., Rune G. M. (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76: 1879-1886.
 - Weiland NG., Orikasa C., Hayashi S., McEwen BS. (1997) Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol* 388: 603-12.
 - Westrum LE., Blackstad TW. (1962) An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior, CA 1) with particular emphasis on synaptology. *J Comp Neurol* 119: 281-309.
 - Westrum LE. (1970) Observations on initial segments of axons in the prepyriform cortex of the rat. *J Comp Neurol* 139: 337-56.
 - Wilson CJ., Groves PM., Kitai ST., Linder JC. (1983) Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. *J Neurosci* 3: 383-8.
 - Woolley CS., Gould E., Frankfurt M., McEwen BS. (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10: 4035-9.
 - Wyszynski M., Kharazia V., Shanghvi R., Rao A., Beggs AH., Craig AM., Weinberg R., Sheng M. (1998) Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* 18: 1383-1392.
 - Xiao CW., Goff AK. (1999) Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *J Reprod Fertil* 115: 101-9.
 - Yamazaki M., Matsuo R., Fukazawa Y., Ozawa F., Inokuchi K. (2001) Regulated expression of an actin-associated protein, synaptopodin, during long-term potentiation. *J Neurochem* 79: 192-199.
 - Yankova M., Hart SA., Woolley CS. (2001) Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3525-30.
 - Zamani MR., Desmond NL., Levy WB. (2000) Estradiol modulates long-term synaptic depression in female rat hippocampus. *J Neurophysiol* 84: 1800-8.
 - Zhao L., Chen S., Ming Wang J., Brinton RD. (2005) 17 β -estradiol induces Ca²⁺ influx, dendritic and nuclear Ca²⁺ rise and subsequent cyclic amp response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neurosci* 132: 299-311.

9. Danksagung

Ich möchte hier vor allem Frau Prof. Rune danken, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben hat in Ihrem Team zu arbeiten und so diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Ich bin heute noch dankbar, dass die Tür zu Ihrem Büro immer für mich offen stand. Zu großem Dank bin ich auch Herdis Sommer und Helga Herbort verpflichtet, da Sie mich in die Geheimnisse der Zellkultur eingeführt haben und mir viele Stunden im Labor mit Ihrer freundlichen Art versüsst haben. Desweiteren möchte hier noch Lars Fester und Nadine Lehan danken, da Sie mir bei der Lösung vieler Fragen zur Seite standen. Ich habe mich während der letzten Jahre im gesamten Team von Frau Prof. Rune sehr wohl gefühlt und so möchte hier allen noch mal von Herzen Danken für die gute Stimmung, die durch die Anatomieräume wehte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Doris und Rüdiger für die nie endende Unterstützung, die ich bis jetzt erfahren durfte. Für die Erwärmung meines Herzens auch in kalten Stunden danke ich meiner Freundin. Das Handling des PCs wäre ohne die Tipps meines Bruders nicht möglich gewesen.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keine anderen als die von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Desweiteren erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder an einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, den 06.08.09