Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie I
Zelluläre Neurobiologie

Leiterin: Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Untersuchung des Spine Apparates in hippocampalen Spines unter dem Einfluss von Estradiol

Dissertation

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

von Erik Disteldorf
aus Ludwigshafen/Rhein

Hamburg, 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 18.03.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: Prof. Dr. E. Förster

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof Dr. M. Glatzel

Inhaltsangabe:

1. Abkürzungsverzeichnis 5

2. Einleitung 8

2.1 Hippocampus 9

2.1.1 Anatomie des Hippocampus 9

2.1.2 Histologie des Hippocampus 9

2.1.3 Informationsfluss im Hippocampus 10

2.2 Neuronen und Synapsen 11

2.2.1 Anatomie von Neuronen und Synapsen 11

2.2.2 Synaptische Übertragung 12

2.2.3 Langzeitpotenzierung der hippocampalen Synapsen 13

2.3 Dendritische Spines 14

2.4 Der Spine Apparat 18

2.5 Synaptopodin 20

2.6. Estradiol 22

2.6.1 Estradiolsynthese 22

2.6.2 Letrozol 23

2.6.3 Estradioleffekte im Hippocampus 23

2.6.4 Estradiol und sein Einfluss auf die LTP 26

2.6.5 Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration und die Rolle von Thaspsigargin 28

2.6.6 Der Einfluss von Estradiol auf Entstehung und Folgen Epilepsie-äquivalenter Übererregung im Hippocampus 29

2.8 Bicuculline 31

3. Methoden **32**

3.1 Hippocampale Slicekulturen 32

3.1.1 Präparationstechnik des Hippocampus aus der Ratte 32

3.1.2 Kultivierung der Slicekulturen mit den entsprechenden Substanzen 33

3.2 Semidünnschnitte 34

3.3 Herstellung der Ultradünnschnitte, Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder und deren Auswertung 35

3.4 Material 35

3.4.1 Material und Geräte 35

3.4.2 Chemikalien 36

3.4.3 Lösungen und Kulturmedien 37

4. Ergebnisse **38**

4.1 Einfluss von Letrozol und Estradiol auf das Vorkommen des Spine Apparates 38

4.2 Einfluss von Thapsigargin auf Größe, Form und Vorkommen des Spine Apparates 41

4.3 Einfluss von Bicuculline und Bicuculline in Kombination mit Estradiol auf Spines und den Spine Apparat 42

5. Diskussion 47

5.1 Estradiol und Letrozol vermindern die Anzahl Spine Apparat tragender Synapsen 48

5.2 Thapsigargin führt zu einer Vergrößerung des Spine Apparates aber nicht zu einer quantitativen Zunahme der Spine Apparat tragenden Spines 50

5.3 Ist der Spine Apparat eine Calciumspeicher und so an der calciumabhängigen Regulation von Synaptopodin beteiligt 52

5.4 Estradiol verhindert einen Spineverlust im Hippocampus während neuronaler Überstimulation durch den GABA A Rezeporblocker Bicuculline 53

6. Zusammenfassung **55**

7. Literaturverzeichnis **57**

8. Danksagung **71**

9. Lebenslauf **72**

10. Eidesstattliche Versicherung **73**

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acetyl Co-A	Acetyl Coenzym A
Ak	Antikörper
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
Aro	Aromatase
Aufl.	Auflage
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
ca.	circa
CA1	Cornu ammonis 1
CA2	Cornu ammonis 2
CA3	Cornu ammonis 3
CA4	Cornu ammonis 4
CO_2	Kohlenstoffdioxid
dest.	destillata (destilliert)
d.h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
Diag.	Diagram
E_2	17β-Estradiol
EM	Elektronenmikroskop
EPON	Epoxidharz
EPSP	postsynaptische Potentiale
ER	Östrogenrezeptoren
ERα	Östrogenrezeptor Alpha
ERβ	Östrogenrezeptor Beta
ERE	Estrogen Response Element
Et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
Fig.	Figure

F-Aktin	filamentöse Form der Aktinfilamente
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAD	Glutamat Decarboxylase
G-Protein	G für Guanylnukleotid
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobuline d. Klasse d. Gammaglobuline
K-Da	Kilo Dalton
KM	Kulturmedium
l	Liter
LTP	*long term potentiation* Langzeitpotenzierung
M	Molar
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
mRNA	messenger RNA
min	Minute
ml	Mililiter
nM	nano Molar
NFG	Nerv-Grow-Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Milimolar
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
PBS	phosphate buffered saline
pH	pondus Hydrogenii
PSD	post-synaptic density
PTP	post tetanic potentation
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCC	side chain cleavage enzyme
SER	smooth endoplasmic retikulum
S.	Seite
s.o.	siehe oben
SPSS	Statistical Package fort he Social Sciences
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
STP	short term potentation
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderen
UKE	Univeritätsklinikum Hamburg Eppendorf
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

2. Einleitung

Das zentrale Nervensystem des Menschen steuert und beeinflusst unser Verhalten. Die Regulation dieses Organs ist komplex und abhängig von einer Vielzahl äußerer Einflüsse. Lernen und Gedächtnis sind zentrale Funktionen des menschlichen Gehirns. Wie erlernte Inhalte im neuronalen Zellverband abgespeichert werden, ist Gegenstand zahlreicher neurophysiologischer Studien. Aus neuroanatomischer Sicht steht der Hippocampus, welcher als Ort der Gedächtnisbildung angesehen wird, im Fokus der Betrachtung. Die dort stattfindende Langzeitpotenzierung (LTP), ein Mechanismus, der zur erhöhten Effektivität synaptischer Übertragung beiträgt, wird als elektrophysiologisches Korrelat für Lernen und Gedächtnis betrachtet. Die morphologischen und funktionellen Veränderungen, die durch dieses Phänomen an den Synapsen ausgelöst werden, bezeichnet man als synaptische Plastizität.

Im Fokus dieser Arbeit steht der Spine Apparat. Er ist in den Spines der Synapsen, welche das postsynaptische Element bilden, lokalisiert. Im Hippocampus und im Striatum findet man ihn vor allem in reifen, sogenannten Mushroom Spines (Spacek *et* Harris, 1997). Der Spine Apparat ist eng mit dem Protein Synaptopodin assoziiert. In Synaptopodin-defizienten Mäusen ist er nicht zu finden (Deller *et al*., 2003). Seine Funktion ist noch nicht ausreichend geklärt. Möglicherweise fungiert er als Calciumspeicher (Fifkova *et al*., 1983; Lisman, 1989; Svoboda *et* Mainen, 1999) und ist an der Expression bestimmter synaptischer Proteine beteiligt (Pierce *et al*., 2001).

Synaptopodin-defiziente Mäuse zeigen deutliche Defizite beim Lernen und der LTP Induktion (Deller *et al*., 2003). Diese Befunde bringen den Spine Apparat und das Snaptopodin in Verbindung mit der Modifikation synaptischer Plastizität.

Estradiol spielt im ZNS eine große Rolle als lokal wirkender Neurotransmitter (Woolley *et al*., 1990; Pozzo-Miller *et al*., 1999; McEwen, 2001, 2004; Segal *et* Murphy, 2001; Kretz *et al*., 2004). Es kann im Hippocampus *de novo* synthetisiert werden und dort para- und autokrin wirken (Prange-Kiel *et al*., 2003; Fester *et al*., 2009). Es ist weiterhin bekannt, dass Estradiol den Schwellenwert zur Auslösung einer LTP senken und so synaptische Aktivität steuern kann (Good *et al*., 1999, Zamani *et al*., 2000).

Gibt es also einen Zusammenhang zwischen dem offenbar eng mit diesen Mechanismen assoziierten Spine Apparat bzw. dem Protein Synaptopodin und dem Neurosteroid Estradiol? Im Folgenden wird der Einfluss von Estradiol auf das Vorkommen und die Funktion des Spine Apparates untersucht und darüber hinaus ein Einblick in die

aktivitätsabhängige Regulation der Estradiolsynthese und Synaptopodinexpression gewonnen.

2.1 Hippocampus

2.1.1 Anatomie des Hippocampus

Der Hippocampus als Teil des limbischen Systems bildet den Hauptanteil des Archikortex. Umgeben wird er von anderen archikortikalen Strukturen wie z.B. Teilen des Gyrus cinguli. Er liegt beim Menschen zum größten Teil im Lobus Temporalis an der Medialwand des Seitenventrikelunterhorns. Nach kaudal-dorsal schließt er einen Bogen bis zum kaudalen Ende des Corpus Callosum, von wo er sich in die Faserstruktur des Fornix fortsetzt, welche über dem 3. Ventrikel verläuft. Er endet dann schließlich in den Corpora mamillaria. Der Hippocampus besteht aus sechs verschiedenen Regionen: Gyrus dentatus, Ammonshorn (Cornu Ammonis), Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum und entorhinaler Kortex. Die im Querschnitt sichtbare Struktur des Cornu ammonis kommt durch die eingerollte Archikortexstruktur zustande. Bei der Ratte, welche sich phylogenetisch vom Menschen unterscheidet, befindet sich der Hippocampus weiter kranial und durchzieht unmittelbar unter dem Kortex die jeweilige Hemisphäre von rostral nach kaudal entlang einer C-förmigen Achse (Amaral *et* Witter, 1989).

2.1.2 Histologie des Hippocampus

Der histologische Aufbau des Hippocampus der Ratte ist der des Menschen sehr ähnlich. Das Cornu Ammonis (CA) zeigt überwiegend den im Folgenden beschriebenen Aufbau, welcher von konvexseitig angegeben wird. An eine oberflächliche Faserschicht (Alveus) schließt sich eine Korbzellschicht (Stratum oriens) an, durch welche die Axone der mittleren, großzelligen Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale) mit glutamatergen Neuronen zum Fornix ziehen. Es folgen das Stratum radiatum, das Stratum lacunosum und schließlich eine zellarme Molekularschicht (Stratum

moleculare), welche vor allem der interneuronalen Verschaltung dient. Im Stratum moleculare finden wir Dendriten, die besonders dicht mit Spines besetzt sind. Das Cornu Ammonis wird beim Menschen histologisch in die Felder CA1 - CA3 eingeteilt. Das Stratum pyramidale der CA1 Region enthält viele kleine Pyramidenzellen, das der CA2 Region besonders große Pyramidenzellen und das der CA3 Region ist eher locker angeordnet. Der Gyrus dentatus, welcher von der CA Region umrundet wird, besteht überwiegend aus Körnerzellen, die ein dichtes Zellband bilden und als Stratum granulare dem Stratum pyramidaler der CA Region entsprechen (Benninghoff *et* Drenckhahn, 2004).

2.1.3 Informationsfluss im Hippocampus

Innerhalb des Hippocampus sorgt ein so genannter trisynaptischer Kreislauf für die Hauptverschaltung der Information. In die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (1. Neuron) projizieren afferente Fasern über den so genannten Tractus perforans. So kommen ihm Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex, dem Thalamus, dem Subiculum, dem Gyrus cinguli und dem medialen Septum zu. Die Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus, welche sehr dicht mit Spines besetzt sind, reichen bis in die Lamina molecularis. Die Axone der dortigen Interneurone projizieren über Moosfasern zu CA3 Pyramidenzellen (2. Neuron). Deren Axone laufen über den Fornix zu den Septalkernen und den Corpora mamillaria. Zusätzlich geben die Axone je eine Kollaterale ab (Schaffer-Kollaterale), welche die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in CA1 erreicht (3. Neuron). Oben genannte Afferenzen aus dem Thalamus, dem Gyrus cinguli und dem medialen Septum erreichen über die Fornix, die zweite Hauptafferenz des Hippocampus, zusätzlich die gesamte Molekularschicht. Efferenzen des Hippocampus verlaufen fast vollständig im Fornix mit Abzweigungen an das Septum, das Corpus amygdaloideum und den Hypothalamus. Endpunkt des Hauptteiles der Fasern sind jedoch die Corpora mamillaria. Diese projizieren über den Fasciculus mamillothalamicus (Vicq d`Azyr-Bündel) in den Nucleus anterior des Thalamus, dieser in den Gyrus cinguli und von dort laufen Fasern zurück zum Hippocampus. Dieser Faserverlauf wird als „Papez-Neuronenkreis“ in der Literatur beschrieben (Papez, 1937; Klüver *et* Bucy, 1939). Der Papez-Neuronenkreis spielt sehr wahrscheinlich eine

entscheidende Rolle beim Transfer von Inhalten vom Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis. Darüber hinaus findet im Hippocampus auch postnatal eine Neurogenese statt, was die lange vermutete Annahme widerlegt, dass bei der Geburt bereits alle Neuronen ausgebildet sind (Altmann *et al*., 1965). Die so genannte Neuro- bzw. Synaptogenese stellt die Grundvoraussetzung für die Ausbildung der synaptischen Plastizität dar, welche als morphologisches Korrelat für Lernen und Gedächtnis angesehen wird. Neben diesen Funktionen werden dem Hippocampus noch Aufgaben für das Zustandekommen von Aggression, Affektverhalten, Bewusstsein und Motivation zugeschrieben. Zudem stellt der Hippocampus einen Ort des Zustandekommens für sehr spezifische Formen der Epilepsie dar, die bei bereits schon kleinen pathologischen Veränderungen (Tumoren etc.) ausgelöst werden können (Meyer *et al*., 1955).

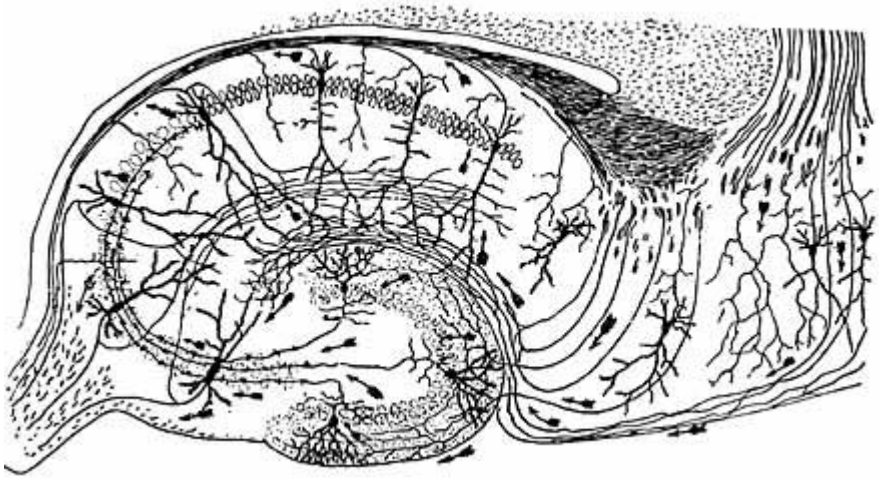

Abb. 1: Zeichnung der neuronalen Verbindungen des Nagetier-Hippocampus von Santiago Ramón y Cajal (1911).

2.2 Neuronen und Synapsen

2.2.1 Anatomie von Neuronen und Synapsen

Synapsen bilden die strukturelle Grundlage für die unidirektionale Signalübertragung vom prä- zum postsynaptischen Element. Das präsynaptische Element wird vom Axonenende gebildet und enthält Vesikel mit synaptischen Transmittern. Es folgen ein

extrazellulärer Raum (synaptischer Spalt) und das entsprechende postsynaptische Element, das je nach Zielstruktur entweder Soma, Axon, oder Dendrit sein kann. Man unterscheidet symmetrische Synapsen (Gray Typ 1) von asymmetrischen Synapsen (Gray Typ 2). Gray Typ 1 Synapsen sind 1-2 μm^2 groß, funktionell exzitatorisch und der synaptische Spalt enthält flockiges extrazelluläres Material. Gray Typ 2 Synapsen sind funktionell inhibitorisch, der etwas engere Synapsenspalt enthält kein extrazelluläres Material und im präsynaptischen Element ist die Zahl der Vesikel oft reduziert. In dieser Arbeit konzentriere ich mich auf die axodendritischen Synapsen, welche häufig vom Typ Gray1 sind. Das postsynaptische Element dieser exzitatorischen Synapsen besteht häufig aus dem dendritischen Spine (Benninghoff *et* Drenckhahn, 2004).

2.2.2 Synaptische Übertragung

Die meisten Synapsen sind so genannte „Chemische Synapsen", d.h. die elektrische Erregung wird an der Synapse über einen Transmitter auf das nächste Neuron übertragen. Der Transmitter wird im präsynaptischen Element in Vesikeln gespeichert und nach einem Stimulus in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Diese Ausschüttung wird durch Depolarisation der präsynaptischen Membran mit nachfolgender Öffnung von Calciumkanälen und dadurch Erhöhung der Calciumkonzentration in der Nervenendigung getriggert. Der Transmitter bindet nun an Rezeptormoleküle des postsynaptischen Elementes, öffnet dort Ionenkanäle für Natrium, Kalium und Calcium (exzitatorische Synapsen) oder für Kalium und Chlorid (inhibitorische Synapsen). Die Erregung kommt durch Depolarisation und die Hemmung durch Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran zustande. Der wichtigste erregende Transmitter im ZNS ist Glutamat und die wichtigsten hemmenden Transmitter sind Glycin und γ-Aminobuttersäure (GABA). Dopamin, Noradrenalin und Serotonin können an verschiedenen Zellen sowohl erregend als auch hemmend wirken (Schmidt *et al*., 1995).

2.2.3 Langzeitpotenzierung der hippocampalen Synapsen

LTP ist ein elektrophysiologischer Mechanismus, welcher eine Verstärkung der synaptischen Effektivität bei wiederholter Reizdarbietung auslöst. Dieser Vorgang wurde bereits 1949 in „the organization of behavior“ (Hebb, 1949) in den Zusammenhang mit der Speicherung von Gedächtnisinhalten gebracht. Findet an einer exzitatorischen Synapse eine kurzeitige, hochfrequente Erregung statt, so sind die folgenden postsynaptischen Potentiale (EPSPs) auf längere Zeit vergrößert. Bleibt die Verstärkung der synaptischen Übertragung länger als 15 Minuten bestehen, spricht man von LTP. Handelt es sich um einen Zeitraum zwischen 10 und 15 Minuten, spricht man von STP (short term potentiation). Kürzere Aktivitätsverstärkungen werden „Post Tetanic Potentiation“ (PTP) genannt (Frenguelli *et al*., 1996; Schulz *et al*., 1997). Im Einzelnen läuft der zur LTP führende Mechanismus nach folgendem Schema ab: Der Transmitter Glutamat kann an die membrangebundenen NMDA bzw. AMPA Rezeptoren binden. Im Ruhezustand der Synapse ist der NMDA Rezeptor durch Mg 2+ Ionen geblockt und nicht zugänglich für Glutamat. Dieses kann in diesem Falle nur an den AMPA Rezeptor binden und über einen schnellen Natriumeinstrom zur Depolarisation des postsynaptischen Elementes führen. Wird dieses wiederholt depolarisiert, wird der Magnesium-Block der NMDA Rezeptoren gelöst, so dass Glutamat nun auch hieran binden kann, was zu einem starken, postsynaptischen Calcium- und Natriumeinstrom führt. Calcium aktiviert in den dendritischen Spines verschieden Kinasen (Proteinkinase C, Calmodulin, Tyrosinkinase). Dies leitet die Langzeitpotenzierung ein und führt zur Verstärkung der Signalintensität gleichzeitig aktiver Synapsen. In der späten Phase einer LTP (l-LTP) kommt es zudem zu einer veränderten Genexpression und zu verstärkter Proteinbiosynthese. Dies führt sowohl zu einer Stabilisierung vorhandener neuronaler Synapsen als auch zur vollständigen Neubildung. LTP kann als Grundlage der Informationsspeicherung im ZNS gewertet werden (Muller *et al*., 2000; Martin *et al*., 2000).

2.3 Dendritische Spines

Spines sind kleine Ausstülpungen der dendritischen Zellmembran und bilden postsynaptische Elemente axodendritischer Synapsen. Sie kommen am häufigsten an den Dendriten der Pyramidenzellen des cerebralen Cortex und denen der Purkinje-Zellen des Kleinhirns vor. Man findet sie jedoch auch an Dendriten in anderen Regionen des ZNS wie z.B. der Substantia gelatinosa des Thalamus. Spines sind nicht zwangsläufig nur an Dendriten lokalisiert, sondern erscheinen auch an neuronalen Somata oder sogar am Initialsegment des Axon (Westrum, 1970). Sie sind vor allem Bestandteil der exzitatorischen Synapsen, die wiederum zu über 90% zwischen Axonen und dendritischen Spines gebildet werden. Bei inhibitorischen Synapsen kommen zwischen Axon und Dendrit meist keine Spines vor. Die Anzahl der dendritischen Spines steigt mit zunehmender Entfernung vom Zellkörper. Mungai (1967) zählte im Cortex der Katze 0-2 Spines/ 100µm² am Hauptstammdendriten, 5-25/100µm² in der mittleren Verzweigungszone und 10-37/100µm² in der terminalen Zone.

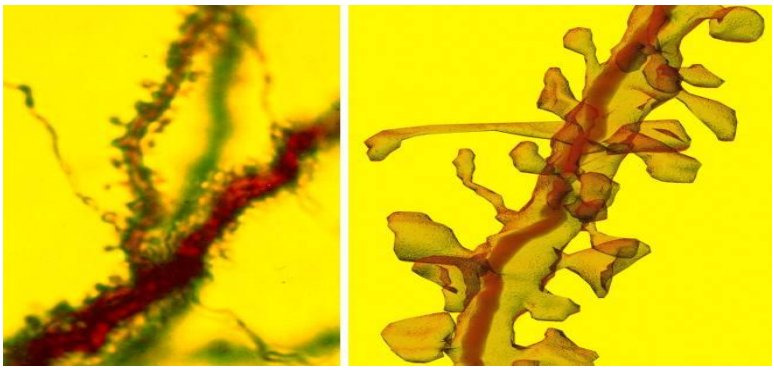

Abb. 2: Spines, erkennbar als Ausstülpungen am Dendriten. (Josef Spacek, 2006)

Die Ultrastruktur dendritischer Spines des cerebralen Cortex wurde erstmals von Gray (1959) beschrieben. Sie unterteilten den Spine in zwei Anteile: einen engen Hals und einen ovalen Bulbus. Peters *et* Kaisermann-Abramof (1970) fanden in den Pyramidenzellen der Schichten II/III des parietalen Rattencortex drei unterschiedliche Spinetypen:

1. Spines mit langem, dünnem Hals und kleinem Bulbus

Abb. 3: Dünner, dendritischer Spine mit axo-dendritischer Synapse im Rattenhippocampus (S = Spine, D = Dendrit). Weißer Balken entspricht 250nm. Aufnahme von Josef Spacek, 2006.

2. Kleine, kurze („stubby“) Spines

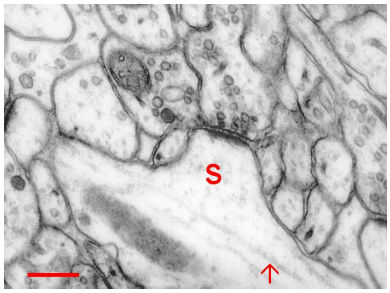

Abb. 4: Kurzer, dendritischer Spine mit axo-dendritischer Synapse im Rattenhippocampus (S = Spine, Pfeil = Mikrotubulus). Roter Balken entspricht 300 nm. Aufnahme von Josef Spacek, 2006.

3. Pilzförmige Spines mit kurzem Hals und großem Bulbus („Mushroom Spines“)

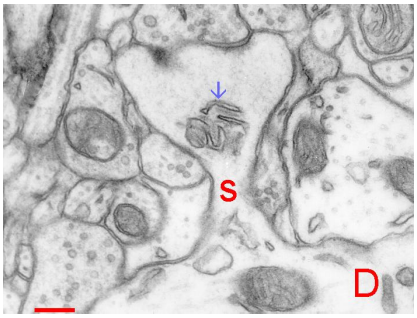

Abb. 5: Pilzförmiger, dendritischer Spine mit axo-dendritischer Synapse im Rattenhippocampus (S = Spine, D = Dendrit, blauer Pfeil = Spine Apparat). Roter Balken entspricht 300 nm. Aufnahme von Josef Spacek, 2006.

Charakteristisch für alle Spines ist das Vorhandensein einer ungefähr 30nm breiten, elektronendichten Fläche unmittelbar unter dem synaptischen Spalt. Es handelt sich um

die so genannte postsynaptischen Dichte (post synaptic density, PSD), welche aus Rezeptor-, Verankerungs- und Signalproteinen besteht. Somit ist die PSD wesentlich an der synaptischen Signalverarbeitung und an Signaltransduktionsmechanismen beteiligt (Walikonis *et al*., 2000). Innerhalb des Spinehalses findet sich in der elektronenmikroskopischen Darstellung sehr charakteristisches flockiges („fluffy“) Material, das einem auf Aktin basierendem Zytoskelett entspricht. Dieses ist in der PSD verankert und verbindet den Spine mit dem Dendriten (Kaech *et al*., 2001). Außerdem findet man Polyribosomen in Kopf, Hals und an der Basis dendritischer Spines, was auf eine ortsständige Proteinproduktion schließen lässt (Peters *et* Kaiserman-Abramof, 1970; Stewart *et al.*, 1982). Eines dieser spinogenen Proteine ist Spinophilin, welches u.a. für die Strukturgebung der Spines verantwortlich ist, indem es Aktinfilamente bündelt und die Produktion von F-Aktin reguliert (Kaech *et al*., 2001). Die Spinophilinexpression korreliert gut mit der Spinedichte und wird von einigen Autoren als indirekter Marker für Spines angesehen (Brake *et* Alves, 2001). Ein anderes Protein, Synaptopodin, das für diese Arbeit von besonderer Wichtigkeit ist, wird in den nachfolgenden Abschnitten genau beschrieben. Spines besitzen eine erstaunliche Dynamik und können sich innerhalb relativ kurzer Zeit (Minuten bis Stunden) bilden, retrahieren und ihre Form modifizieren (Engert *et* Boenhoffer, 1999). Grundlage für die dynamische Variation ist das oben beschrieben Aktinzytoskelett (Segal *et al*., 2005). Dies wird durch die Tatsache untermauert, dass die Spinebeweglichkeit durch die Depolymerisation von Aktin mit Cytochalasin B aufgehoben werden kann (Fischer *et al*., 1998). Eine Zunahme der synaptischen Aktivität, z.B. über die Stimulation des in der PSD lokalisierten NMDA-Rezeptors mit nachfolgendem Calciumeinstrom führt zu einer Neubildung von Spines (Engert *et* Bonhoeffer, 1999). Dies beruht wiederum auf einer calciumabhängigen Regulation des Aktinzytoskelettes (Oertner *et* Matus, 2005). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die anschließende Stabilisierung der Spines auf die Aktivierung von AMPA Rezeptoren zurückzuführen ist und die Spines inklusive Aktinzytoskelett retrahieren, wenn die AMPA Rezeptorstimulation unter einen bestimmten kritischen Schwellenwert fällt (Fischer *et al*., 1998). Die hauptsächliche Funktion der Spines ist nicht eindeutig geklärt. Eine wichtige Aufgabe könnte z.B. die Bildung abgeschlossener Calciumkompartimente sein. Calcium kann nach Aktivierung Liganden-gesteuerter Ionenkanäle (NMDA/AMPA-Rezeptoren) einströmen, woraufhin eine schnelle, diffuse und gleichmäßige Verteilung des Calciums im Spinekopf entsteht (Yuste *et al*., 2000).

Calcium kann im Spine ebenfalls aus intrazellulären Speichern über den so genannten „Calcium induzierten Calcium Release“ (CIC) freigesetzt werden (Emptage *et al*., 1999). Interessanterweise stehen Spineform, Spinegröße und Höhe der intrazellulären Calciumkonzentration in gegenseitiger Wechselwirkung zueinander (Berridge *et al*., 1998). Hohe Calciumkonzentrationen bewirken eine Längenzunahme der Spines (Korkortian *et* Segal, 1999). Es ist zudem bekannt, dass Unterschiede in Länge und Größe der Spines Auswirkung auf die Intensität der synaptischen Übertragung haben (Matsuzaki *et al*., 2004; Segal *et al*., 2005). Des Weiteren könnte eine wichtige Funktion die elektrische Isolierung des restlichen Neurons durch die Spines sein. Starke postsynaptischen Potentialänderungen können durch den Spine „abgepuffert“ werden und so kann das restliche Neuron vor strukturellen Schäden bewahrt werden, die durch exzitatorische Reize entstehen könnten (Segal *et al*., 2005). Andererseits bietet die Verengung durch den Spinehals die Möglichkeit, die Ladungsübertragung zum Dendritenschaft zu verlangsamen und somit ein temporär limitiertes, größeres Potential im Spineköpfchen zu erzeugen, welches dort eine stärkere Aktivierung spannungsabhängiger Kanäle ermöglicht. Da die meisten Spinehälse jedoch nicht lang oder dünn genug sind, um eine komplette Ladungsübertragung auf den Dendriten zu verhindern, kann Ladung auch auf benachbarte Spines übertreten. Dies erzeugt eine synergistische Wirkung, also eine simultane Aktivierung benachbarter Spinesynapsen (Svoboda *et al*., 1996). Spines reagieren äußerst sensibel auf Veränderungen in ihrer Umgebung. Scheibel *et al.* (1967 a und b) zeigten, dass sich die Anzahl der dendritischen Spines im visuellen Cortex nach Enukleation oder nach Läsionen des lateralen Corpus geniculatum signifikant reduzierte. Auch im Hippocampus kann man einen Spineverlust in der äußeren Molekularschicht nach Läsionen im entorhinalen Cortex beobachten. Nach fünf Tagen kann dieser sogar bis zu 20% betragen. Spineverluste können jedoch auch wieder nach einiger Zeit rekompensiert werden. Dies wird einem kollateralen Wachstum (sprouting) zugeschrieben, welches von den verbliebenen Axonen ausgeht (Parnavelas *et al*., 1974). Westrum *et al*. demonstrierten 1964, dass nach induzierter fokaler Epilepsie eine Verminderung der Spinedichte zu verzeichnen ist. Frotscher *et al*. zeigten 1995, dass nach fehlenden afferenten Impulsen die Anzahl der Spines im Hippocampus zurückgeht. Wie bereits erwähnt kommt es andererseits nach erneuter Zunahme der synaptischen Aktivität, z.B. Induktion einer Langzeitpotenzierung (LTP) der Synapse zu einer *de novo* Ausbildung dendritischer Spines (Engert *et* Bonnhoeffer, 1999) und zu einer Änderung der Spinegröße

(Matsuzaki *et al*., 2004). Insgesamt haben Spines eine wesentliche Aufgabe bei der Modifikation synaptischer Übertragung. Man kann dieses Phänomen der so genannten „synaptische Plastizität“ zuordnen und festhalten, dass den Spines hierbei eine unerlässliche Rolle zuteil wird. Die genauen strukturellen und physiologischen Korrelate dieses Vorganges sind Bestandteil der folgenden Kapitel.

2.4 Der Spine Apparat

Der Spine Apparat wurde erstmals 1959 von Gray beschrieben und erscheint typischerweise in exzitatorischen, dendritischen Spines des cerebralen Cortex. Er wurde im Einzelnen im Hippocampus (Westrum *et* Blackstad, 1962) und im Thalamus (Colonnier *et al.*, 1968) beschrieben. Außerdem ist er in den basalen Kerngebieten (Wilson *et al*., 1983) und punktuell in der Medulla oblongata (Scheibel *et* Scheibel, 1968) lokalisiert. Sein Vorkommen ist nicht nur auf dendritische Spines beschränkt. Man findet ihn gelegentlich in Dendritenstämmen und öfters im axonalen Initialsegment, in welchem man ihn dann „Cisternal Organelle“ nennt (Westrum, 1970; Kosaka, 1980).

Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Spine Apparates im Stratum radiatum der CA1-Region einer Schnittkultur des Hippocampus der Ratte nach 2 Wochen (→ kennzeichnet den Spine Apparat).

Josef Spacek veröffentlichte 1985 eine sehr detaillierte Studie zum Spine Apparat. Er besteht aus zwei oder mehr gegenüberliegenden Cisternae aus glattem endoplasmatischem Retikulum, welche sich zwischen dünnen Schichten aus elektronendichtem Material befinden. Ausstülpungen des elektronendichten Materials reichen bis an die PSD und einige Cisternae sind so mit dem glatten endoplasmatischen Retikulum der Dendriten verbunden. Spacek *et* Harris (1997) fanden in 67,5% der dendritischen Spines des visuellen Kortex Spine Apparate. Die meisten (fast 100% Spine Apparate pro Spine) und ausdifferenziertesten Spine Apparate fand Spacek in den großen („mushroom“) Spines komplexer Synapsen. Man kann so geformte Spines den maturen Spines zuordnen. Kleine Spines mit dünnem, langem Hals und einfachen Synapsen besitzen in der Regel keinen Spine Apparat. In der CA1 Region des Hippocampus adulter Ratten fand Spacek in rund 80% der „mushroom“ Spines Spine Apparate (Spacek *et* Harris, 1997). Insgesamt kann man in durchschnittlich 20% aller dendritischer Spines des Hippocampus einen Spine Apparat identifizieren (Deller *et al*., 2003). Deller *et al*. demonstrierten 2003, dass der Spine Apparat an das Vorkommen des Proteins Synaptopodin gebunden ist. So konnten so genannte „Synaptopodin Knock-out Mäuse“, welche defizient für das Protein Synaptopodin sind, keinen Spine Apparat mehr ausbilden. Mittels Immunogoldlabeling für Synaptopodin konnte die Kolokalisation von Synaptopodin und dem Spine Apparat veranschaulicht werden (Deller *et al*., 2003). Zudem sind die Zytoskelett-bildenden Proteine F-Aktin und α-Aktinin mit dem Spine Apparat assoziiert (Wyszynski *et al*., 1998; Deller *et al*., 2000 a, b). Die Funktion des Spine Apparates ist noch nicht ausreichend geklärt. Es wird stark vermutet, dass er als Calciumspeicher innerhalb des Spine verantwortlich für die Abgabe und Aufnahme von Calcium ist (Fifkova *et al*., 1983; Lisman, 1989; Svoboda *et* Mainen, 1999). Calcium, welches über NMDA-Rezeptoren in die Zelle einströmt oder aus internen Calciumspeichern freigesetzt wird, besitzt verschiedenste Funktionen in der Signaltransduktion und neuronalen Plastizität (Sabatini *et al*., 2002). Ebenso wird eine Rolle des Spine Apparates bei der Synthese und Modifikation membrangebundener Proteine diskutiert (Pierce *et al*., 2001). Nach einer induzierten Läsion des entorhinalen Cortex fand sich im Hippocampus der Ratte eine deutliche Verminderung von Spine Apparaten pro Spine. Ebenso kann in diesem Fall eine Reduktion von Synaptopodin demonstriert werden. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der verminderten Aktivität einstrahlender Afferenzen in den Hippocampus (Deller *et*

al., 2006). Dies würde bedeuten, dass das Vorkommen des Spine Apparates einer aktivitätsabhängigen Regulation unterliegt. Bas Orth *et al*. konnten 2007 zeigen, dass auch die o.g. Cisternal Organelle, welche morphologische große Ähnlichkeit mit dem Spine Apparat aufweist, an das Vorkommen von Synaptopodin gebunden ist. In der Synaptopodin defizienten Maus konnte keine Cisternal Organelle gefunden werden. Im Gegensatz zum Spine Apparat scheint die Cisternal Organelle keinen Einfluss auf die Ausbildung und Qualität der LTP zu haben.

2.5 Synaptopodin

Synaptopodin ist ein 100 kDa schweres, an Prolin (20%) reiches Protein, welches erstmals in renalen Podozyten nachgewiesen wurde. Dort ist es an F-Aktin assoziiert und beteiligt sich an der Regulation des kontraktilen Apparates der Fußfortsätze (Mundel *et al*., 1997). Synaptopodin mRNA befindet sich ebenfalls in telencephalen Strukturen wie dem olfaktorischen Bulbus, dem Neokortex, dem Striatum und dem Hippocampus. Dort ist es meist exklusiv in dendritischen Spines zu finden (Mundel *et al.*, 1997; Deller *et al*., 2000). In cerebellären Strukturen des ZNS lässt es sich nicht nachweisen, somit ist sein Vorkommen auf das Telencephalon beschränkt. Zur „Synaptopodinfamilie“ gehören zudem Myopodin, welches in Herz- und Skelettmuskelzellen zu finden ist sowie Fesselin, welches in glatter Muskulatur lokalisiert ist und dort an der Aktin-Polymerisation beteiligt ist (Leinweber *et al.*, 1999). Synaptopodin erscheint überwiegend in reiferen und ausdifferenzierteren Entwicklungsstufen der hippocampalen Neuronen und wird am stärksten im adulten Hippocampus vorgefunden. Im Hippocampus kann man es jedoch schon unmittelbar nach der Geburt in der CA3 Region finden und ab Tag 6 postnatal in der CA1 Region (Czarnecki *et al.*, 2005). Im Hippocampus ist Synaptopodin im Wesentlichen in den Pyramidenzellen des Cornu ammonis (CA1-CA3), in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und dort vor allem in den dendritischen Spines vorhanden (Mundel *et al*., 1997; Deller *et al*., 2000 a, b). Die Verteilung von Synaptopodin in diesem Bereich folgt einem Lamina spezifischen Muster und erscheint inhomogen (Deller *et al*., 2002; Bas Orth *et al*., 2005). Interessanterweise sind vor allem jene Schichten reich an Synaptopodin, welche überwiegend glutamaterge Afferenzen erhalten, also

exzitatorischen Charakter haben (Deller *et al*., 2007). Innerhalb des Spines wird Synaptopodin an der PSD und im Spinehals lokalisiert. Jedlicka *et al*. (2008) fanden Synaptopodin exklusiv in den dendritischen Strukturen hippocampaler Neurone, nicht jedoch im Soma. Dort ließ sich lediglich Synaptopodin mRNA nachweisen. Hieraus könnte der Schluss gezogen werde, dass es einen Transportmechanismus geben könnte, welcher für den Transfer des Proteins vom Soma zum Spine zuständig ist (Deller *et al*., 2000). Die oben genannte enge Assoziation an den Spine Apparat innerhalb des Spines konnte mittels Immunogoldlabeling für Synaptopodin bewiesen werden (Deller *et al*., 2003). Es ist bemerkenswert, dass die Verteilung von Synaptopodin im Spinehals und an der PSD der örtlichen Verteilung von Aktin entspricht (Matus *et al*., 1982; Kaech *et al*., 1997). Synaptopodin bindet zudem nicht ausschließlich an Aktin sondern zusätzlich auch an α-Aktinin-2 (Asanuma *et al*., 2005; Kremerskothen *et al*., 2005). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Synaptopodin mit α-Aktinin-2 eine Verlängerung von Aktin Filamenten sowie die Bildung von parallel angeordneten Aktin Bündeln zu Folge hat (Asanuma *et al*., 2005, 2006). Dies lässt die Vermutung zu, dass Synaptopodin auch an der *in vivo* Regulation von parallel angeordneten Aktin Fasern beteiligt ist, wie sie typischerweise im Spinehals zu finden sind (Matus *et al*., 1982; Cohen *et al*., 1985; Fifkova *et al*., 1989). Über α-Aktinin-2 könnte Synaptopodin sogar direkt mit dem NMDA Rezeptor verbunden sein, da α-Aktinin-2 an zwei Untereinheiten des NMDA Rezeptors binden kann (Wyszynski *et al*., 1997). Kremerskothen *et al*. (2008) postulieren eine weitere, mögliche Funktion des Synaptopodin könnte die Verknüpfung des Spine Apparates mit dem Zytoskelett sein. Dies würde eine dynamische Regulation des Spine Apparates ermöglichen. Ebenso wird Synaptopodin und dem Spine Apparat eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung synaptischer Plastizität zugeordnet (s.o.), was durch die Beobachtung bekräftigt wird, dass nach LTP Induktion eine verstärkte Expression von Synaptopodin beobachtet werden kann (Yamazaki *et al*., 2001; Fukazawa *et al*., 2003). Dies könnte im Zusammenhang mit der oben beschriebenen spezifischen Zuordnung von Synaptopodin zu besonders „aktiven“, mit exzitatorischen Afferenzen versehen Laminae stehen (Deller *et al*., 2007). Die Expression von Synaptopodin und anderen Regulatorproteinen ist abhängig von Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen und somit wiederum vom synaptischen Erregungszustand (Korkotian *et* Segal, 1999; Yuste *et al*., 2000; Fischer *et al*., 2000; Oertner *et* Matus, 2005). Die beschriebene Reduktion der LTP in „Synaptopodin Knock-out Mäusen“ (Deller *et al*., 2003) lässt ebenfalls einen

solchen Zusammenhang vermuten. Interessanterweise enthält das Cerebellum keinen Spine Apparat (Spacek, 1985), keine Synaptopodinexpression und eine verminderte Expression von α-Aktinin-2 (Wyszynski *et al.*, 1998). Möglicherweise ist aus diesem Grund dort auch keine LTP auslösbar. Zusammengenommen zeigen diese Daten den Zusammenhang von synaptischer Aktivität bzw. Plastizität und dem Spine Apparat und Synaptopodin.

2.6 Estradiol

2.6.1 Estradiolsynthese

Die Expression der Aromatase, die das Schlüsselenzym der Estrogensynthese darstellt, in telencephalen Strukturen ist lange bekannt (Naftolin *et al*., 1971). Es dauerte allerdings 30 Jahre, bevor erstmals gezeigt wurde, dass hippocampale Neurone in vitro in der Tat Estrogene synthetisieren (Prange-Kiel et al., 2003; Fester et al., 2009). Da im Hippocampus alle nötigen Enzyme zur Estradiolsynthese vorhanden sind, ist die dortige Steroidsynthese mit der gonadalen identisch (Garcia-Seguera *et al*. 1999; Wehrenberg *et al*., 2001; Hojo *et al*., 2004). Ausgangssubstanz ist wie bei allen Steroiden das Cholesterol, zu dessen Synthese alle Zellen exklusive der Erythrozyten im Stande sind. Cholesterol wird *de novo* aus Acetyl Co-A synthetisiert und mit Hilfe von StAR (steroidogenic acut regulatory protein) zur inneren Mitochondrienmembran transportiert (rate limiting step). Dort findet durch die Cytochrom P450 Enzyme mittels oxidativer Verkürzung der Seitenketten die Umwandlung zu Steroidhormonen statt. Mit Hilfe der Desmolase wird es zu Pregnenolon hydroxyliert, was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Estrogensynthese darstellt. Dieses wird irreversibel durch Cytochrom P450 c17 über das Zwischenprodukt 17-OH-Pregenolon zu DHEA (Dehydroepiandrosteron) umgewandelt.
17β-Hydroxysteroiddehydrogenase reduziert DHEA zu Androstendiol (reversibel), welches mittels 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase in Testosteron überführt wird (irreversibel). Es folgt die Abspaltung des C19 Methylrestes und dadurch die Aromatisierung des Ringes A, katalysiert durch Cytochrom P450 aro (CYP19A1, Aromatase). Dies führt zum Endprodukt 17β-Estradiol (Sugawara *et al*., 1996).

2.6.2 Letrozol

Letrozol ist ein potenter, nicht steroidaler Aromatasehemmer und vermindert so die Konzentration an zirkulierendem Estradiol (Geisler *et al*., 2002). In hippocampalen Dispersionskulturen adulter Tiere kommt die Estradiolsynthese ab einer Dosis von 10^{-9} M Letrozol zum vollständigen Erliegen (Prange-Kiel *et al*., 2003).
Es werden anders als bei den meisten anderen Antiöstrogenen keine direkten Wechselwirkungen mit Östrogenrezeptoren beobachtet (Nilsson *et* Gustafsson, 2002). Die Östrogenrezeptorfunktion bleibt erhalten. Letrozol eignet sich deshalb als effektiver Synthesehemmer hervorragend, um die Wirkweise von Estradiol indirekt zu verdeutlichen (Puddefoot *et al*., 2002; Prange-Kiel *et al*., 2003).

2.6.3 Estradioleffekte im Hippocampus

Es ist lange bekannt, dass Steroidhormone einen Einfluss auf hippocampale Strukturen haben. So wurde gezeigt, dass Estradiol in der Embryogenese des ZNS eine wesentliche Rolle als Differenzierungsfaktor spielt (Beyer *et al*., 1999). Darum ist es nicht verwunderlich, dass zahlreiche Studien über den Einfluss von Estradiol auf Spines und axospinale Synapsen vorliegen. Da insbesondere die Ovarien als Estradiolproduzenten bekannt sind, fanden erste Experimente, die auf eine Aufklärung der Estradioleffekte zielten, an ovarektomierten Ratten statt. Gould *et al*. (1990) fanden bei diesen Tieren eine Reduktion der dendritischen Spines in der CA1 Region des Hippocampus. Wurden ovarektomierte Tiere systemisch mit Estradiol stimuliert, fand man einen Zuwachs an dendritischen Spines. Auch zyklusabhängige Estradiolschwankungen zeigen entsprechend der Estradiolkonzentration einen Einfluss auf die Spinedichte (Woolley *et al*., 1990; Wooley *et* McEwen, 1992). Neuere Studien an ovarektomierten Mäusen zeigten, dass nach systemischer Estradiolzugabe vor allem ein Wachstum von Mushroomspines zu erzielen ist (Li *et al*., 2005). Aus diesen Studien leitet sich die Annahme ab, dass die Anzahl hippocampaler Spines von der Konzentration des Estradiols im Plasma abhängt und somit über die Peripherie (Ovarien) reguliert werden kann. Es existiert jedoch eine von den Gonaden unabhängige *de novo* Synthese von Estradiol aus Cholesterol im Hippocampus (Prange-Kiel *et al*., 2003). Alle zur

Estradiolsynthese benötigten Enzyme wie StAR, Aromatase, Cytochrom P450 und 3β-hydroxy-steroiddehydrogenase sind im Hippocampus in den Pyramidenzellen der Regionen CA1- CA3, den Körnerzellen des Gyrus Dentatus sowie in Interneuronen auf mRNA bzw. Proteinebene enthalten (Garcia-Seguera *et al*., 1999; Wehrenberg *et al*., 2001; Hojo *et al*., 2004). In elektronenmikroskopischen Analysen mittels Immunogold Markierung hippocampaler Slices fanden Mukai *et al*. (2006) Aromatase und CYP-450 in den post- bzw. präsynaptischen Regionen der jeweiligen Neuronen. Dies wäre ein Hinweis für einen möglichen parakrinen, „synaptokrinen" Wirkmechanismus von Estradiol im Hippocampus, welches über ortsständige Rezeptoren wirken könnte. Hojo *et al*. (2004) fanden zudem in den Zellen des Hippocampus eine 6-fach höhere Estradiolkonzentration als im Serum. Außerdem ist die ortsständige Estradiolproduktion möglicherweise aktivitätsabhängig. Hojo *et al.* (2004) konnten zeigen, dass sich die hippocampale Estradiolkonzentration abhängig von synaptischer Aktivität (NMDAR-induziert) schnell und stark verändern kann, wobei die des Plasmas relativ konstant bleibt. Estradiol wirkt über Estradiolrezeptoren (ERs), die klassischerweise genomische Effekte auslösen. Intrazelluläre, inaktive Transkriptionsfaktoren, die nach der Bindung von Estradiol dimerisieren, können so über „Estrogen Responsive Elements" die Transkription beeinflussen. Man spricht von „ligandengesteuerten" Transkriptionsfaktoren. Es existieren die beiden Isoformen ERα und ERβ mit jeweils unterschiedlicher Affinität zu natürlichen und synthetischen Östrogenen (Kuiper *et al*., 1998). Die mRNA dieser beiden Isoformen wurde in Slice- und Dispersionskulturen hippocampaler Neuronen von Wehrenberg *et al*. (2001) und Prange-Kiel *et al*. (2003) mittels RT-PCR und *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Diese funktionellen Estradiolrezeptoren befinden sich in den Interneuronen des Hippocampus (Weiland *et al*., 1997) und in den Zellen der Pyramidenzellschicht der CA-Regionen bzw. des Gyrus dentatus (Wehrenberg *et al*., 2001). Mittels spezifischer Antikörper gegen ERα und ERβ wurde ihr Vorkommen im neuronalen Zytoplasma, im Nucleus aber auch in apikalen Dendriten, also nahe der synaptischen Übertragungsstellen nachgewiesen (Rune *et al*., 2002; Prange-Kiel *et al*., 2003). Es ist bekannt, dass die Expression von Estradiolrezeptoren des reproduktiven Systems von Estradiol selbst beeinflusst werden kann (Xiao *et* Goff, 1999). Prange-Kiel *et al*. (2003) konnte einen Effekt von Estradiol auf die beiden Rezeptoren ebenso im Dispersionskulturmodell hippocampaler Neuronen beweisen. Es findet sich eine gegensätzliche Regulation von ERα und ERβ unter Estradioleinfluss, im Sinne einer Hochregulation von ERα und einer Herunterregulation

von ERβ. Gegensätzliches findet sich nach Aromatasehemmung mittels Letrozol. Hiernach findet man weniger ERα und mehr ERβ in den Zellkulturen. Diese Befunde machen deutlich, dass im Hippocampus eine para- bzw. autokrine Regulation der ERs durch Estradiol stattfindet. Die Versuche von Prange-Kiel *et al*. (2003) fanden in völlig steroid- und plasmafreiem Medium statt. Dies verdeutlicht die Unabhängigkeit der hippocampalen Estradiolsynthese und Regulation der ERs von gonadale produziertem Estradiol. In neueren Studien konnte in Pyramidenzellen der CA2 Region ein weiterer Estradiolrezeptor identifiziert werden. Dieser ist jedoch kein klassischer, genomisch wirkender ER sondern ein membrangebundener, G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPR 30). Dieser wird durch 17β-Estradiol Bindung aktiviert und führt so zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Funakoshi *et al*., 2006). Estradiol vermittelte Effekte im Hippocampus können wie bereits erwähnt indirekt, durch Aromatasehemmung mittels Letrozol anschaulich gemacht werden. Letrozolbehandlung führt zu einer reduzierten Spinedichte, Synapsenanzahl und zu einer Verminderung der präsynaptischen Boutons. Dabei wurde eine verminderte Expression von synaptischen Proteinen wie Synaptophysin (präsynaptisch) und Spinophilin (postsynaptisch) gezeigt (Kretz *et al*., 2004; Prange-Kiel *et al.*, 2006). Interessanterweise sind die durch Letrozol erzielten Effekte nach 32 h vollständig reversibel (Prange-Kiel *et al*., 2003). Wie zuvor erwähnt, zeigt sich durch Letrozolbehandlung hippocampaler Slicekulturen eine signifikante Abnahme der Spine- und Boutonanzahl im elektronenmikroskopischen Bild der CA1 Region. Den größten Effekt erreichte man in der Studie von Kretz *et al*. (2004) mit einer Konzentration von 10^{-7} M Letrozol, weshalb in unseren Versuchen dieselbe Konzentration gewählt wurde. Durch exogene Stimulation mit Estradiol konnte in verschiedenen in vivo und in vitro Experimenten ein Spinwachstum beobachtet werden (Gould *et al*., 1990; Woolley *et* Mc Ewen, 1993; Mc Ewen, 2002; Murphy *et* Segal, 1996; Murphy *et al.*, 1998; Pozzo-Miller *et al*., 1999). Überraschenderweise kann dies in der Studie von Kretz *et al*., 2004 nicht verifiziert werden. Es fand nachweislich kein Spinewachstum nach Stimulation durch Estradiol statt, obwohl mit der Konzentration 10^{-7} M Estradiol gearbeitet wurde, die in den zitierten Studien den gewünschten Effekt erzielte und auch in der Studie von Rune *et al*., 2002 zur ERα Induktion führte.

Wie bereits angedeutet, ist die Verteilung von Estradiol und den o.g. Proteinen im Hippocampus nicht gleichmäßig. So befinden sich in der CA3 Region signifikant mehr StAR, Aromatase und ERα. Es findet also auch eine vermehrte Estradiolsynthese in dieser Region statt (Rune *et al*., 2002; Prange-Kiel *et al*., 2003). Es lassen sich im

Hippocampus auch indirekte Estradioleffekte, welche ihren Ursprung in einer anderen Region haben als den Ort des Effektes, beobachten. Leranth *et al*. (2001) verdeutlichten dies, indem sie bei ovarektomierten Ratten eine einseitige Durchtrennung des Fornix vornahmen und so den Hippocampus von wichtigen subkortikalen Efferenzen isolierten. Nach systemischer Estradiolbehandlung der Tiere zeigte sich nur auf der Seite mit intaktem Fornix ein signifikanter Spinezuwachs. Auf der kontralateralen Seite fand sich kein Unterscheid zur Kontrolle. Implantiert man mit Estradiol gefüllte Cannulae in die Mediane Raphe, welche über den Fornix von subkortikal in den Hippocampus projiziert, findet sich ein signifikanter Zuwachs an synaptische Spines in der Zielregion CA1 (Prange- Kiel *et al*., 2004).
Zusammenfassend lassen die Studien den Schluss zu, dass die endogene, ortsständige Estradiolproduktion über para- bzw. autokrine Mechanismen einen entscheidenden Einfluss auf synaptische Plastizität und den Erhalt dendritischer Spines im Hippocampus hat. Die degenerativen Effekte nach Aromatasehemmung unterstreichen dies.

2.6.4 Estradiol und sein Einfluss auf die LTP

Der Einfluss von Estradiol auf die Funktion des Gedächtnisses wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Phillips *et* Sherwin, 1992a, b; Rapp *et al*., 2003). Das Auftreten von LTP als Ausdruck synaptischer Plastizität im Hippocampus korreliert eng mit der Ausbildung von Gedächtnis (Malenka *et* Bear, 2004). Es ist gezeigt worden, dass erhöhte 17β-Estradiol Spiegel die Stärke der LTP Intensität an Synapsen der CA1-CA3 Region des Hippocampus anheben (Warren *et al*., 1995; Good *et al*., 1999). In hippocampalen Slices reduziert sich die zur LTP Induktion benötigte Schwellenfrequenz nach Estradiol Stimulation signifikant (Zamani, *et al*. 2000). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung zeigte sich nach Vorbehandlung mit Estradiol eine Verstärkung der NMDAR induzierten EPSPs in CA1, welche über die Schaffer-Kollaterale ausgelöst wurden (Woolley *et al*., 1997). Zamani *et al*. (2000) untersuchten dieses Phänomen näher und fanden in mit Estradiol vorbehandelten Schnitten vor allem eine Verstärkung der späten NMDAR vermittelten EPSPs, dem eine Estradiol vermittelte Glutamatausschüttung im Stratum radiatum bzw. eine Proliferation von CA1 Synapsen zugrunde liegen könnte. In Experimenten von Pozzo-

Miller *et al*. (1999) führte Estradiolbehandlung zu einer Erhöhung der Spinedichte und des NMDAR abhängigen Calcium Einstroms in CA1 Neuronen. Nach afferenter Stimulation wird ein erhöhter Calciumstrom beschrieben, der innerhalb der Spines deutlich stärker ist als im angrenzenden Dendriten. In mit Estradiol behandelten Slices der CA1 Region fällt der Calciumstrom insgesamt stärker aus. Zudem ist der Calciumgradient zwischen Spine und Dendrit größer als in den unbehandelten Kontrollslices. Die Spines besaßen nach Estradiolbehandlung neue, funktionelle postsynaptische Einheiten, die mit AMPA/NMDA Rezeptoren besetzt sind und somit LTP induzieren können. Zudem ist der synaptische Input über diese Rezeptoren nach Estradiol Gabe verstärkt (Pozzo-Miller *et al*., 1999). Smith *et* McMahon untersuchten 2005, ob hormonell induziertes Spinewachstum und die durch Estradiol induzierte Steigerung der NMDAR-Übertragung in direktem Zusammenhang stehen. Sie fanden in mit Estradiol behandelten hippocampalen Slices ovarektomierter Ratten eine Steigerung der LTP Intensität, nur wenn gleichzeitig eine Erhöhung der Spinedichte bei relativer Steigerung der NMDAR-Übertragung gegenüber der AMPAR-Übertragung stattfindet. Kommt es im weiteren Verlauf wieder zu einer Normalisierung des Quotienten AMPAR/ NMDAR-Aktivität bei gleich bleibend erhöhter Spinedichte, normalisiert sich die Stärke der LTP wieder. Werden die genomischen ERs mittels Tamoxifen bzw. die NMDAR mittels MK-801 geblockt, findet man die genannten Effekte nicht. Dies lässt eine Beziehung zwischen diesen morphologischen (Spinewachstum) und den funktionellen (NMDAR-Aktivität) Veränderungen vermuten. Es existiert aber auch ein alternativer, „schneller Weg“ der LTP Steigerung über membrangebunde Estradiolrezeptoren. Bei in vitro Versuchen mit Estradiol stimulierten hippocampalen Slices zeigten Kim *et al*. (2002) eine NMDAR-Expressions- und LTP-Steigerung innerhalb von Sekunden, also einen schnellen Effekt, welcher so nicht über den genomisch wirkenden ERα vermittelt werden kann, sondern wahrscheinlich den oben beschriebenen membrangebundenen G-Protein gekoppelten ER benötigt. Es handelt sich hierbei möglicherweise um einen G -Protein-gekoppelten Rezeptor, welcher verschiedene Proteine phosphorylisiert und so Einfluss auf deren Aktivität nehmen kann (Qui *et al*., 2003). Mit Hilfe solcher membranöse Effekte könnte erklärt werden, warum nach Estradiolbehandlung eine Abschwächung der nach NMDAR-Aktivität stattfindenden Hyperpolarisation abgeschwächt werden kann (Carrer *et al*., 2003). Intrazelluläre Calcium Spiegel und Kalium- bzw. Calciumkanalfunktionen

würden über membranöse Effekte alteriert und so könnte eine schnellere Wiedererregbarkeit der Synapse ermöglicht werden.

2.6.5 Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration und die Rolle von Thapsigargin

Calcium ist ein äußerst wichtiger „Botenstoff“ bei der Regulation synaptischer Plastizität, insbesondere im Rahmen der LTP -Induktion im Hippocampus (Frenguelli *et al*., 1996; Schulz *et al*., 1997). Die Calcium Konzentration innerhalb eines Spines kann auf verschiedenen Wegen beeinflusst werden. Calcium kann aus dem Extrazellularraum über membranöse Calciumkanäle einströmen: Zum einen über NMDAR-gekoppelte Kanäle, die auf die Bindung des Liganden Glutamat reagieren (receptor operated calcium channel, ROCC), zum anderen über Kanälen, welche auf Spannungsänderung, also Depolarisation reagieren (voltage operated calcium channel, VOCC). Aus intrazellulären Speichern, wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum (store operated calcium channel, SOCC), kann Calcium durch Aktivierung von Inositol-3-Phosphat bzw. so genannter Ryanodine Rezeptoren freigesetzt werden (Yuste *et al*., 2000; Korkotian *et* Segal, 2006). Ryanodine Rezeptoren setzen Calcium Ionen aus intrazellulären Speichern frei, indem sie selbst wiederum durch Calcium aktiviert werden. Man spricht von einer Calcium-induzierten Calciumfreisetzung („CIC“) (Emptage *et al*., 1999). Sharp *et al*. (1993) zeigten in immunzytochemischen Studien hippocampaler Zellkulturen, dass IP3- und Calcium-induzierte Calciumfreisetzung zwar in verschiedenen zellulären Kompartimenten ablaufen, jedoch funktionell miteinander verknüpft sind. Nach vorheriger Depolarisation und nachfolgender Calciumfreisetzung über die beschriebenen Mechanismen werden ca. 20% des intrazellulären Calciums entweder über Natrium/Calcium-Austauscher oder über Calcium-ATPasen der Plasmamembran (Plasma Membrane Calcium ATPase, PMCA) aus der Zelle heraus in den Extrazellularraum transportiert (Carafoli *et al.,* 1994). Die restlichen 80% des freigesetzten Calciums werden über eine Calcium ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums (SERCA) aktiv in intrazelluläre Speicher aufgenommen. Die ATPasen können unter anderem von Thapsigargin (einem Sesquitterpen Lakton) gehemmt werden (Thastrup *et al*., 1990). Während einer Behandlung mit Thapsigargin in

niedrigen Dosen (z.B. 1nM) werden die intrazellulären Calciumspeicher initial entleert, wobei die Funktion von Calciumkanälen unbeeinträchtigt bleibt (Nelson *et al*., 1994). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Calciumströme aus intrazellulären Speichern nach Behandlung mit Thapsigargin signifikant vermindert werden (Behnisch *et* Reymann, 1995; Kovalchuk *et al*., 2000). Die erhebliche Bedeutung der intrazellulären Calciumfreisetzung für die Induktion von LTP wird in einer Arbeit von Matias *et* Quinta-Ferreira (2002) verdeutlich. Nach Hemmung der SERCA (und somit Reduktion des CIRC) mittels Thapsigargin konnte eine deutlich Reduzierung tetanisch evozierter Calciumströme in CA1 gemessen werden und somit eine STP- und LTP-Induktion effektiv verhindert werden. Es kann also der Schluss erfolgen, dass die Ausbildung von LTP stark im Zusammenhang mit einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern steht.

2.6.6 Der Einfluss von Estradiol auf Entstehung und Folgen von Epilepsie-äquivalenter Übererregung im Hippocampus

Bereits 1955 zeigten Meyer *et al*., dass der Hippocampus eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Epilepsie einnimmt. Im Falle einer Übererregung des hippocampalen Gewebes, wie sie bei einem fokalen Anfall stattfindet, also dem pathologischen Zustand entspricht, wird ein signifikanter Verlust von Spinesynapsen verzeichnet. Dies wurde von Drakew *et al*. (1996) beobachtet, nachdem hippocampale Slice Kulturen über einen Zeitraum von 3 Tagen mit Bicuculline, einem GABA A Rezeptorblocker behandelt wurden. Es wurde eine deutliche, bis zu 40 prozentige Reduktion von Spines im elektronenmikroskopischen Bild beschrieben. Ursächlich für den Spineverlust könnten funktionelle Veränderungen des Aktinozytoskletts nach Überexzitation sein. Halpain *et al.* zeigten 1998, dass ein massiver Calcium Einstrom via NMDAR mit signifikantem Spineverlust einhergeht, welcher von den Autoren auf eine F-Aktin Destabilisierung zurückgeführt wurde. In der bereits zitierten Studie von Kretz *et al*. (2004) wurde nachgewiesen, dass Estradiol im Hippocampus essentiell für den Erhalt von Spines und Spinesynapsen ist und die Hemmung der Aromatase durch Letrozol ebenfalls zu einem signifikanten Spineverlust führt. Beruht eine strukturelle Schädigung, wie sie im Rahmen der Epilepsie beschrieben wird, möglicherweise auf einer Veränderung des hippocampalen Estradiolstoffwechsels?

Die Rolle, die Estradiol im Rahmen der Pathophysiologie der Epilepsie zugeordnet wird, erscheint komplex und widersprüchlich. Belelli *et* Herd beschrieben 2003, dass endogene Neurosteroide regulatorisch in den GABA Stoffwechsel eingreifen können. Estradiol scheint im Sinne einer Verstärkung der exzitatorischen Reize und einer Reduktion der inhibitorischen Reize zu wirken (Woolley *et al*., 2000). GABA A Rezeptoren Untereinheiten werden unter Estradioleinfluss vermindert hergestellt. Des Weiteren führt die Stimulation mit Estradiol zu einer reduzierten Synthese von GABA und es fällt so die GABA vermittelte Hemmung weg. Dies wiederum findet seinen möglichen Ursprung in einer verringerten Synthese des GABA bildenden Enzyms GAD (Glutamat Decarboxylase) (Murphy *et al*., 1998). Unterstützend hierzu konnten in hippocampalen Dispersionskulturen nach Estradiol Behandlung eine verminderte Anzahl von GAD positiven Neuronen und eine geringere Expression von GAD 65 Protein festgestellt werden (Murphy *et al*., 1998). Ovarektomierte weibliche Ratten zeigen ebenfalls eine geringere Immunoreaktivität für GAD 65 im Gegensatz zu ihren unbehandelten Artgenossinnen (Rudnick *et* Woolley, 2001). Da Estradiol zudem auch im agonistischen Sinne auf NMDAR der CA1 Region wirkt (Pozzo-Miller *et al*., 1999), kann der Substanz eine insgesamt exzitatorische Funktion zugeordnet werden. Im Tiermodell wurde durch Estradiol in pharmakologischen Dosen eine verringerte Auslöschwelle für epileptische Anfälle sowie eine Verstärkung und Verlängerung dieser nachgewiesen (Beyenburg *et al*., 2001; Buterbaugh, 1989; Buterbaugh *et* Hudson, 1991; Edwards *et al*., 1999; Klein *et* Herzog, 1998; Herzog, 1995; Woolley, 2000). Einige Studien weisen auf eine erhöhte Krampfneigung bei Frauen unter dem Einfluss von erhöhten Estradiolspiegeln während der follikulären Phase im weiblichen Zyklus hin (Herkes *et al*., 1993; Morrell *et al*., 1999). Solche prokonvulsive Effekte könnten auf die durch Estradiol bedingte Aufhebung der GABA vermittelten Inhibiton zurückgeführt werden. Das in einigen Studien nach Behandlung mit Estradiol beobachtete verstärkte Spinewachstum wird ebenfalls als Folge der reduzierten GABA Produktion sowie einer reduzierten neuronalen Aktivitätshemmung bewertet (Murphy *et al*., 1998; Rudnick *et* Woolley, 2001). Erstaunlicherweise wurde in einer Studie von Weiland *et al*. (1992) eine Hochregulation der für GAD kodierenden mRNA durch Estradiol beobachtet, also ein Befund, die dem oben genannten widerspricht. Außerdem konnte bislang nicht bewiesen werden, dass ein durch Ovarektomie induzierter systemischer Östrogenmangel bei Ratten vor Epilepsie schützt bzw. zu einer Veränderung des zur Krampfauslösung benötigten Schwellenreizes führt (Hoffmann *et al*., 2003).

Rudnick und Woolley zeigten 2001, dass die Anzahl GAD positiver Neuronen, wie oben erwähnt, in ovarektomierten Ratten reduziert ist und sich nach Stimulation mit Estradiol weiter reduzieren ließ, es jedoch nach einem zweiten Estradiolstimulus nach 48h zu einer Normalisierung der Anzahl GAD positiven Neuronen kam. Es existieren auch Hinweise, die auf eine potentiell neuroprotektive Funktion durch Estradiol im Rahmen der Epilepsie hinweisen. Veliskova *et al.* beschrieben 2006, dass ovarektomierte weibliche Ratten nach Vorbehandlung mit Estradiol von einem gewissen Schutz vor hippocampalen Schäden nach induziertem Status Epilepticus profitierten. Hoffmann *et al*. zeigten 2003 ähnliche Befunde. So konnte durch zusätzliche Gabe von Estradiol nach synthetisch induzierter Überexzitation ein signifikant verminderter Verlust von Neuronen verzeichnet werden. Passend hierzu zeigten Suzuki *et al*. (2007), dass nach neuronalen Traumata die Expression der Aromatase deutlich gesteigert ist. Es verlangt also weiterer Studien, um die Rolle, welche Estradiol im Zusammenhang mit der Entstehung von Epilepsie und der durch Epilepsie induzierten funktionellen und morphologischen Veränderung im hippocampalen Gewebe einnimmt, zu entschlüsseln.

2.6.7 Bicuculline

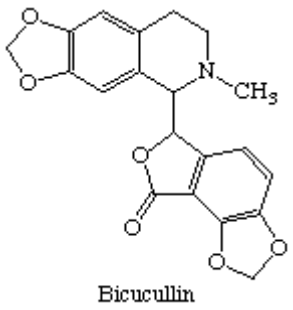

Abb.7: Strukturformel von Bicuculline

Bicuculline, ein Alkaloid und bekanntes „Krampfgift“, blockiert selektiv und kompetetiv den GABA A Rezeptor (Curtis *et al*., 1970). In hippocampalen Slice Kulturen kann man Bicuculline zur Auslösung epileptischer Aktivitäten ab einer Konzentration von 10 µM verwenden. Dieser Effekt zeigt sich vor allem in der CA 3 Region (Ikegaya *et al*., 1998).

3. Methoden

3.1 Hippocampale Slicekulturen

3.1.1 Präparationstechnik des Hippocampus aus der Ratte

Die Präparation und Kultivierung der Hippocampi wurden in Anlehnung an die Methode von Stoppini *et al*. (1991) durchgeführt. Dies erfolgte unter semisterilen Bedingungen nach Frotscher *et* Heimrich (1995). Wir verwendeten drei bis fünf Tage alte, sowohl männliche als auch weibliche Ratten (Verhältniss 1:1). Diese wurden dekapitiert und anschließend die Kopfhaut vom Nacken her abgetrennt. Mit einer feinen Schere wurde der Schädel eröffnet, um dann das Gehirn mittels eines Heidemannspatels herauszulösen und es auf einem mit PBS getränkten Schwämmchen zu platzieren. Nachdem das Kleinhirn mittels eines Skalpells entfernt wurde, erfolgte die Trennung der beiden Hemisphären. Um nun die beiden Hippocampi sorgfältig mittels Heidemannspatel zu präparieren, benötigt man die Sichtvergrößerung einer Stereolupe.
Mit einem Tissue Chopper (H. Sauer) konnten die einzelnen Hippocampi nun in 400 µm dicke Frontalschnitte zerteilt werden. Die ausgewählten Schnitte wurden für 30-60 Minuten in ein auf 4°C gekühltes Präparationsmedium gegeben (Minimal Essential Medium, MEM und 2 mM Glutamine). Im Anschluss erfolgte die Trennung der Schnitte unter Stereolupensicht wiederum mittels Heidmannspatel. Es wurden nun 10 Slices ausgewählt, welche auf einem Kultursieb glatt aufgelegt wurden. Diese Slices wurden im Folgenden in eine 6 Well Platte gesetzt, mit 1,0-1,2 ml MEM pro Well versetzt und hiernach in einen Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem CO2 Gehalt von 5% gestellt. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Der PH des Inkubationsmediums musste vor jedem Mediumwechsel neu auf PH 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt werden. Hierzu verwendet man 1M NaOH bzw. 1M HCl. Auf Sterilität während des Wechsels ist besonders zu achten. Mit der Stimulation wurde nach 14 Tagen begonnen, da sich nach diesem Zeitintervall Spine Apparate gebildet hatten.

3.1.2 Kultivierung der Slicekulturen mit den entsprechenden Substanzen

Während der entsprechenden Stimulation wurden jeweils zwei Well mit der gleichen Substanz behandelt.

Stimulationsreihe 1: Letrozol 10^{-7} M, Estradiol 10^{-7} M sowie zwei Kontrollwell ohne Substanz mit Kulturmedium (s.u.).
Stimulationsreihe 2: 1 µmol/l Bicuculline, 10 µmol/l Bicuculline,
10 µmol/l Bicuculline + Estradiol 10^{-7} M, 1 µmol/l Bicuculline + Estradiol 10^{-7} M, 1 µmol/l Bicuculline + Letrozol 10^{-7} M so wie zwei Kontrollwell ohne Substanz mit Kulturmedium (s.u.).
Stimulationsreihe 3: 0,1 µmol/l Thapsigargin, 0,01 µmol/l Thapsigargin, 0,01 µmol/l Thapsigargin + Letrozol 10^{-7} M so wie zwei Kontrollwell ohne Substanz mit Kulturmedium (s.u.).

Diese Behandlungen wurden in 2 tägigem Abstand über den Zeitraum von 7 Tagen wiederholt. Es wurden insgesamt je 3 Stimulationen durchgeführt. Für Estradiol und Letrozol wurde die pharmakologische, jedoch nicht toxische Dosis 10^{-7} M gewählt, da unter Stimulation in physiologischen Estradiolkonzentrationen 10^{-10} M bei der weiblichen und 10^{-11} M bei der männlichen Ratte keine Effekte auf die synaptische Plastizität gesehen werden konnten (Rune *et al*., 2006).
Die Fixierung nach Beendigung der Stimulation erfolgte nach Absaugen des Mediums. Es wurde zweimal mit PBS (Phosphatpuffer: NaH2HPO4 = 0,5 M; Na2HPO4 = 0,5 M) bei 37°C gespült und einmal mit PBS bei 4°C. Hiernach führte ich die Fixierung mit 2,5%iger Glutaraldehydlösung für drei Stunden bei 4°C und einem PH-Wert von 7,4 durch. Anschließend wurde erneut mit PBS (diesmal 0,1M) bei 4°C gespült. Mittels aufsteigernder Alkoholreihe (beginnend mit 30%) wurde der Flüssigkeitsentzug realisiert. Abschließend wurden die nun fixierten Slices flach zwischen zwei Folien in EPON 820 eingebettet (Serva, Heidelberg, Germany; Rune *et al*., 1992)

3.2 Semidünnschnitte

Die 1µm dicken Semidünnschnitte wurden mittels eines Diamanten auf einem Reichert-Jung OmU3 Ultramikrotom angefertigt. Im Anschluss wurde das Präparat mit 1%iger Toluidinblaulösung in schwimmender Färbung eingefärbt. Zum Erreichen einer Zweifarbigkeit wurden ein paar Tropfen Pyronin zugeführt. Es wurde im weiteren Verlauf filtriert.

3.3 Herstellung der Ultradünnschnitte, Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder und deren Auswertung

Die einzelnen Blöcke wurden so zurechtgeschnitten, dass nur das Stratum pyramidale und das Stratum radiatum der CA1 Region erhalten blieben. Aus den oben erwähnten Semidünnschnitten wurden ca. 90 nm dicke Ultradünnschnitte gefertigt. Dabei wurden zufällige Serien von Ultradünnschnitten produziert, welche aus dem oberen und mittleren Drittel der CA1 Region des Stratum radiatum stammten. Die Vergrößerung des CM 100, PW 6021 Elektronenmikroskop betrug 6600-fach. Regionen mit größeren Dendriten oder Blutgefäßen wurden ausgespart, um so eine mögliche Fehlerquelle beim späteren Auszählen zu minimieren. Nach Fotografie der EM Bilder und deren Entwicklung auf DIN A 4 messendes Fotopapier erfolgte die Auswertung der Bilder.
Zur korrekten Identifizierung der Synapsen mussten Vesikel in den terminalen Axonen sowie die postsynaptische Dichte (PSD) als elektronendichte „Membran“ erkannt werden. Als Spine wurde der sich an die PSD anschließende Bereich, welcher entweder leer oder mit dem Spine Apparat gefüllt war, gewertet. Der Spine Apparat ist als Organelle mit mindestens drei elektronendichten Schichten und dazwischenliegenden Strukturen, die endoplasmatischem Retikulum ähneln, definiert. Nur wenn diese Kriterien erfüllt waren und die Organelle im Spine zu finden war, wurde ein Spine Apparat als solcher gezählt. Nach diesem Vorgehen wurden in den EM Bilder Spinesynapsen mit und ohne Spine Apparat gezählt. In der Auswertung wurde die Gesamtzahl aller Spinesynapsen und die Zahl derjenigen Spinesynapsen, die einen Spine Apparat trugen, berücksichtigt. Hieraus wurde die Prozentzahl der Spine Apparate pro Spine ermittelt. Die gemessenen Gruppen wurden mit SPSS auf signifikante

Unterschiede geprüft. Hierzu wurde ANOVA (analysis of variance*)* genutzt, gefolgt von einem *post-hoc* Test nach Dunett.

3.4. Material

3.4.1 Material und Geräte

Axio Cam	HRcZeiss, Oberkochen
Brutschrank, WTC	Binder, Tuttlingen
Cryogenic Vials	NALGENE BRAND Rochester, USA
Cutfix Scalpell	BRAUN, Melsungen
epT.I.P.S. Standard 500 -1000µl	EPPENDORF AG, Hamburg
Epon 820	Serva, Heidelberg, Germany, Rune et al.,1992
Heidemannspatel M	AESCULAPDE (Braun), Melsungen
Nuclon Surface, 24 Wellplatte	NUNC BRAND PRODUCTS, Rochester, USA
Stereolupe	ZEISS, Oberkochen
Tissue chopper	H. SAUER, USA
Wasserbad mit Schüttler	Memmert

Semidünnschnittgerät	Leica RM 2065
Ultradünnschnittgerät	Ultra Cut, Reichert-Jung OmU3
Elektronenmikroskop	CM 100, Phillips, PW 602

3.4.2 Chemikalien

Bicuculline methiodide	B 6889, Sigma Aldrich, USA
Estradiol	E 4389 Beta- Estradiol- Water solouble, Sigma Aldrich, USA
Ethanol 70%ig	Apotheke UKE, Hamburg
Glutaraldehyd 2,5%ig	Merck
HCl 1M	Merck
Letrozol	Novartis
NaOH 1M	Merck
Pyronin	Merck
Toloidinblau	Merck
Trilostan	Sanofi Winthrop 220/510

3.4.3 Lösungen und Kulturmedien

PBS (Phosphat-Bufferde Saline):

- 8g Natriumchlorid
- 0,2g Kaliumchlorid
- 1,44g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2g Kaliumhydrogenphosphat
- Ad 1000ml mit aqua bidest
- PH 7,4; Raumtemperatur

Präparationsmedium für Slicekulturen:

Ansatz für 100ml:

- 50 ml Minimum Essential Medium(MEM), steril, 2fach konzentriert
- 1ml Glutamin (200mM), steril
- 49 ml aqua bidest pro Kultur. Alternativ Tissue culture water, steril
- Durch Zugab von steriler 1M NaOH bzw. 1M HCl wird das Präparationsmedium auf einen PH von 7,35 eingestellt.
- Das Präparationsmedium wird im Kühlschrank aufbewahrt und sollte zur Präparation 4°C kühl sein.

Kulturmedium für Slicekulturen:

Ansatz für 100ml:

- 25 ml Minimum Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert
- 1ml Glutamin 200mM, steril,
- 580 µl 7,5%ige Sodium Bicarbonat Lösung steril
- 23.42 ml aqua pro Ansatz oder Tissue Kulturwasser, steril
- 25ml Hanks Balanced Salts (HBSS)
- 25ml Pferdeserum, steril, hitzeinaktiviert
- Pro Well werden 1,0 ml Inkubationsmedium eingesetzt
- Der PH des Inkubationsmediums muss vor jedem Mediumwechsel neu eingestellt werden. Hierzu verwendet man 1M NaOH, steril bzw. 1M HCl, steril.
- PH 7,4; Raumtemperatur.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von Estradiol und Letrozol auf das Vorkommen des Spine Apparates

Nach 14- tägiger Vorkultur wurde mit der Stimulation begonnen. Es folgten 3 Stimulationen im Zeitraum von 7 Tagen mit Estradiol und Letrozol. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Anschließend, nach Fixation der Slices, wurde die elektronenmikroskopische Auswertung nach dem beschrieben Verfahren durchgeführt. Zunächst bestimmte ich die absolute Anzahl aller in den Bildern vorkommender Spines nach den genannten Kriterien. Hiernach identifizierte ich diejenigen Spines, die eine Spine Apparat beinhalteten, und errechnete hieraus die relative Anzahl Spine Apparat tragender Spines pro Stimulation. Es wurden jeweils 40 Bilder (n) pro Gruppe mit einer Fläche von je 50 μm^2 ausgezählt. Insgesamt konnten so in der Kontrollgruppe 840, in der Estradiolgruppe 999 und in der Letrozolgruppe 649 Spines gezählt werden. Die Zählungen wurden nach o.g. statistischem Verfahren ausgewertet. Es zeigte sich eine Abnahme der absoluten Spineanzahl in der Letrozolgruppe gegenüber der Estradiol- und Kontrollgruppe. Die Zugabe von Estradiol führte zu keiner signifikanten Veränderung der absoluten Spineanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Anzahl der Spines mit einem Spine Apparat reduzierte sich sowohl in der Estradiol- als auch in der Letrozolgruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Zwischen Letrozol- und Estradiolstimulation konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied erreicht werden. Der relative Anteil Spine Apparat tragender Spines war nach Estradiolstimulation niedriger als nach Letrozolstimulation. Berechnete man jedoch die Anzahl der Spines Apparate pro 50 μm^2 (entsprechende der Fläche eines EM-Bildes) konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Estradiol- und Letrozolgruppe gezeigt werden.

Stimulation	Spines gesamt (absolut)	Spine Apparat tragende Spines (absolut / relativ)
Kontrolle	840	109 / 12,98 %
Letrozol 10^{-7} M	694	54 / 7,93 %
Estradiol 10^{-7} M	999	55 / 5,41 %

Tab. 1: Auswertung der Zählung der Spines und Spine Apparate. Absolute Anzahl der Spines in 40 ausgewerteten EM Bildern. Absoluter und relativer Anteil der Spine Apparat tragenden Spines pro Gesamtspinezahl. Stimulation mit Estradiol und Letrozol in den angegebenen Konzentrationen.

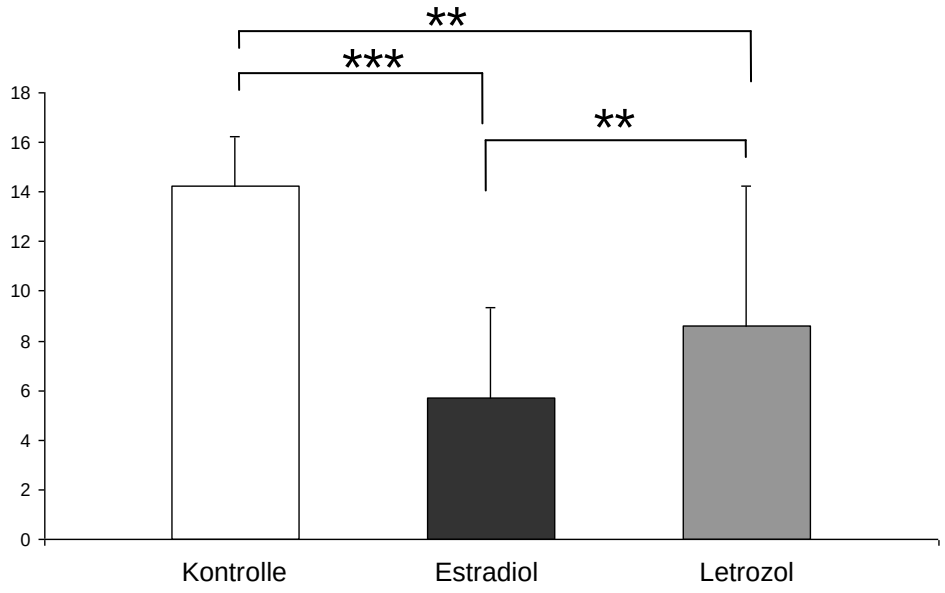

Fig. 1: Auswertung der Spinezählung. Relativer Anteil (%) der Spine Apparat tragenden Spines in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen Estradiol 10^{-7} M und Letrozol 10^{-7} M. Die Prozentzahl bezieht sich auf den Anteil der Spine Apparat tragenden Spines an der Gesamtzahl der Spines in den ausgezählten elektronenmikroskopischen Bilder (n= 40 pro Gruppe). Dargestellt sind der Mittelwert ± SEM. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (** $p \leq 0{,}01$, *** $p \leq 0{,}001$).

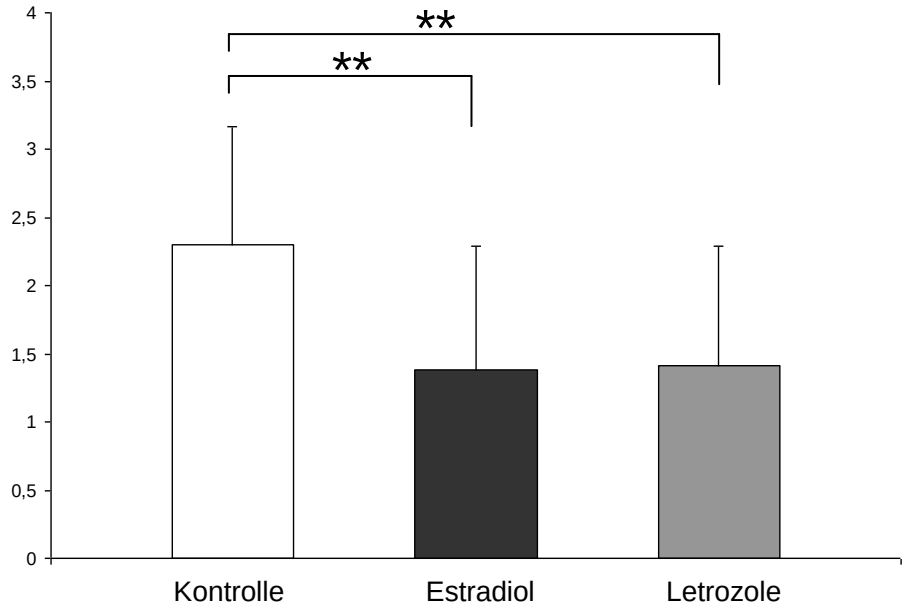

Fig. 2: Auswertung der Zählung der Spine Apparate pro elektronenmikroskopischem Bild. Dargestellt ist die absolute Anzahl pro EM Bild (Spine Apparat pro 50 μm^2) in den unterschiedlichen Stimulationgruppen Estradiol 10^{-7} M und Letrozol 10^{-7} M. Abgebildet sind der Mittelwert ± SEM. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (** $p \leq 0{,}01$).

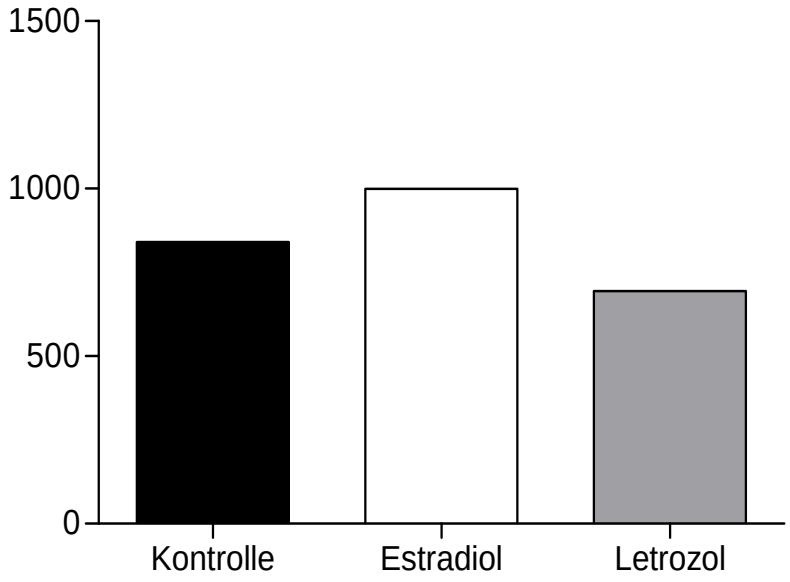

Fig. 3: Auswertung der Zählung der absoluten Anzahl der Spines. Dargestellt ist die kumulative Anzahl aller gezählten Spines in je 40 ausgewerteten elektronenmikroskopischen Bildern (50 μm^2/ Bild) in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen Kontrolle, Estradiol 10^{-7} M und Letrozol 10^{-7} M. Abgebildet sind der Mittelwert ± SEM.

4.2 Einfluss von Thapsigargin auf Größe, Form und Vorkommen des Spine Apparates

Um zu untersuchen, welchen Effekt die Blockade des intrazellulären Calciumflusses durch Hemmung der SERCA mittels Thapsigargin hat, wurden nach dem oben beschriebenem Procedere Slice Kulturen 3-5 Tage alter, männlicher Ratten hergestellt. Die Stimulation erfolgte mit Thapsigargin in der Konzentration 0,1 µmol/l bzw. 0,01 µmol/l und mit Thapsigargin 0,01µmol/l + Letrozol 10^{-7} M für insgesamt 7 Tage. Entsprechende EM Bilder der CA1 Region wurden nach Vorkommen von synaptischen Spines und Spine Apparaten in oben beschriebener Art und Weise ausgewertet. Die Zugabe von Thapsigargin hatte in diesem Falle keine Auswirkung auf das quantitative Vorkommen des Spine Apparates. Auch konnte kein Effekt auf die Spinedichte gezeigt werde. Interessanterweise erbrachte die simultane Stimulation von Thapsigargin + Letrozol keine signifikante Herunterregulation von Spine Apparaten und Spinedichte, wie in den anderen Stimulationsgruppen gezeigt. Beides konnte in der Auswertung auf Kontrollniveau dargestellt werden. Insgesamt fiel bei dieser Stimulationsreihe jedoch auf, dass die Spine Apparate nach Behandlung mit Thapsigargin in der Konzentration 0,1 µmol/l deutlich größer erschienen als jene in der Kontrollsituation. Die Spine Apparate, welche wie oben beschrieben aus Lamellenstapeln mit dazwischen liegendem elektronendichten Material bestehen, hatten in der Thapsigargingruppe deutlich mehr Lamellen. Wir einigten uns in der Arbeitsgruppe, alle Spine Apparate, welche mehr als 4 Lamellen besitzen, als vergrößert zu werten und quantifizierten deren Vorkommen in den jeweiligen Gruppen. Der prozentuale Anteil der entsprechend vergrößerten Spine Apparate war in der Thapsigargingruppe verdoppelt.

	Spines Gesamt (absolut)	Spines ohne Spine Apparat (absolut)	Spines mit Spine Apparat (absolut)	Anteil Spine Apparat (relativ)	Spine Apparat >4 Lamellen (absolut / realtiv)
Kontrolle	1393	1324	69	4,95 %	9 / 13,03%
Thaspsigargin 0,01µmol/L	1491	1430	61	4,09 %	9 /14,75%
Thaspsigargin 0,1 µmol/L	1434	1376	58	4,05 %	16 / 28,00%
Letrozol 10^{-7} M + Thaspsigargin 0,01µmol/L	1482	1406	76	5,13%	12 / 15,7%

Tab. 3: Auswertung der Zählung der Spines und Spine Apparate. Absolute Anzahl der Spines und absolute Anzahl der Spine Apparate in 50 ausgewerteten EM Bildern. Relativer Anteil der Spine Apparate tragenden Spines pro Spinegesamtzahl sowie absolute Anzahl und relativer Anteil (in Klammern) von Spine Apparaten mit mehr als 4 Lamellen (pro Spine Appart Gesamtzahl) in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen, in angegebener Konzentration.

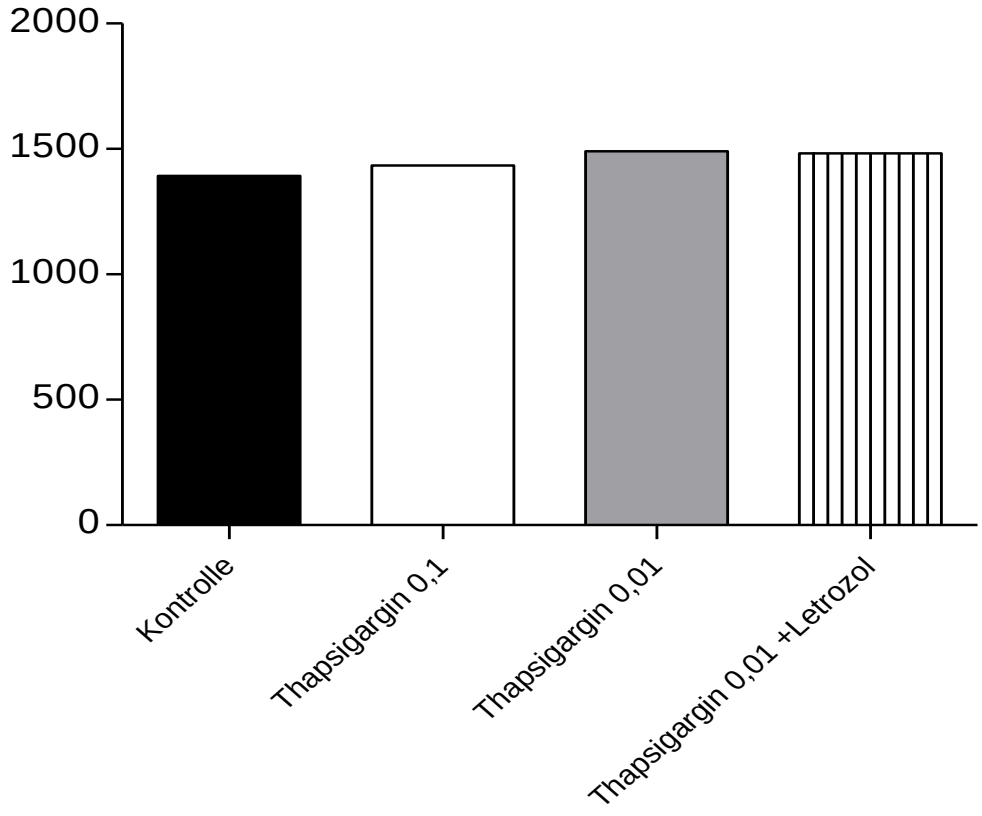

Fig. 4: Auswertung der Zählung der absoluten Anzahl aller Spines in je 50 ausgewerteten elektronenmikroskopischen Bildern (50 μm^2 /Bild) in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen Kontrolle, Thapsigargin und Thapsigargin + Letrozol 10^{-7}M in den angegebenen Konzentrationen (µmol/l). Dargestellt sind die absoluten Zahlen aller gezählten Spines (n=50).

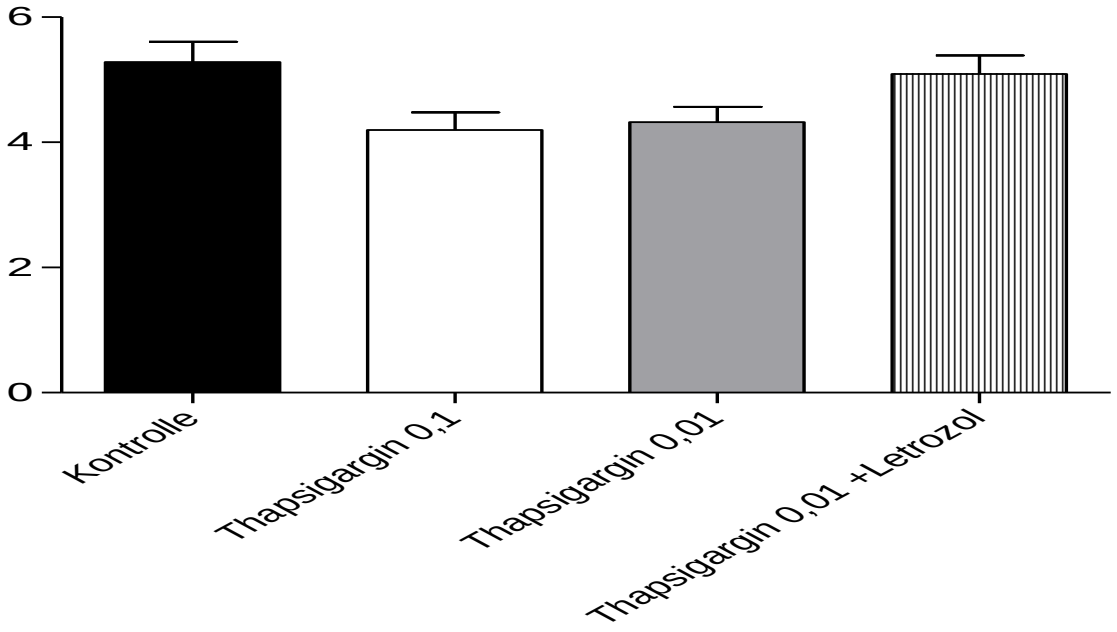

Fig. 5: Auswertung der Zählung der Spine Apparate. Relativer Anteil (%) der Spine Apparat tragenden Spines in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen Thapsigargin sowie Thapsigargin + Letrozol 10^{-7} M in den angegebenen Konzentrationen (µmol/l). Die Prozentzahl bezieht sich auf den Anteil der Spine Apparat tragenden Spines an der Gesamtzahl der Spine in den ausgezählten elektronenmikroskopischen Bilder (n= 50). Dargestellt sind der Mittelwert ± SEM (n=50). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (P< 0,05) wurde nicht erreicht.

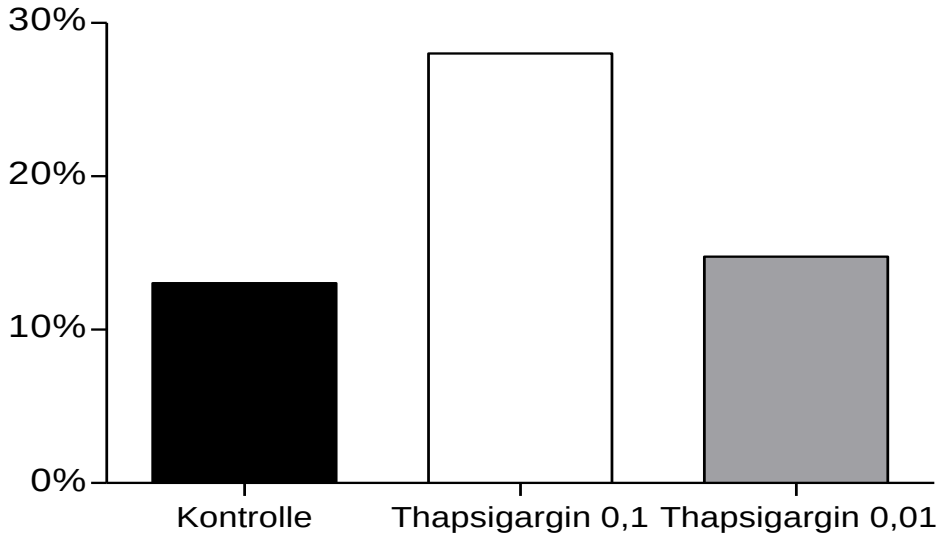

Fig. 6: Prozentualer Anteil der Spine Apparate mit mehr als 4 Lamellen. Dargestellt ist der relative Anteil der Spine Apparate mit > 4 Lammellen an den insgesamt gezählten Spine Apparaten pro Stimulationsreihe (50 EM Bilder pro Gruppe) Kontrolle sowie Thapsigargin in den angegebenen Konzentrationen (µmol/l).

4.3 Einfluss von Bicuculline und Bicuculline in Kombination mit Estradiol und Letrozol auf Spines und den Spine Apparat

Das im Folgenden beschriebene Experiment zielt auf die Frage, ob es einen aktivitätsabhängigen Einfluss auf das Vorkommen des Spine Apparates gibt und ob in diesem Zustand ein neuromodulatorischer Effekt durch Estradiol bzw. den Aromatasehemmer Letrozol zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurden die hippocampalen Slicekulturen gleich alter Tiere (s.o.) mit Bicuculline in unterschiedlicher Dosierung stimuliert. Durch die so erzielte selektive Blockade des GABA A Rezeptors kann eine andauernde, einem cerebralen Krampfanfall ähnliche Situation in vitro induziert werden. Es wurden wiederum hippocampale Schnittkulturen verwendet, die nach o.g. Schema hergestellt wurden und über insgesamt 2 Wochen stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte zum Einen mit Bicuculline in der Konzentrationen 1µmol/l, 10µmol/l und zum Anderen mit Bicuculline in Kombination mit Estradiol 10^{-7} M sowie Letrozol 10^{-7} M. Zeitgleich wurde eine Kontrollkultur angelegt, welche nicht stimuliert wurde und mit Inkubationsmedium behandelt wurde. Nach o.g. Schema produzierten wir erneut elektronenmikroskopische Bilder, welche entsprechend den anderen Experimenten ausgewertet wurden. Es zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der absoluten Anzahl der Spines pro elektronemikroskopischem Bild in den Bicucullinegruppen. Hierbei war sowohl nach Stimulation mit 1µmol/l Bicuculline als auch mit 10µmol/l Bicuculline ein etwa gleich starker Spineverlust zu verzeichnen. Zwischen den Ergebnissen dieser beiden Gruppen kam es zu keinem signifikanten Unterschied. Der prozentuale Anteil der Spine Apparate blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe unvermindert. Die Kombination von Bicuculline (1µmol/l, 10µmol/l) mit Estradiol (10^{-7} M) zeigte einen überraschenden Effekt. Die Gesamtanzahl (absolut) der gezählten Spines hielt sich in beiden Gruppen auf Kontrollniveau. Wie gewohnt reduzierte sich jedoch die Anzahl der Spine Apparate (relativ) zur Kontrollgruppe auf signifikantem Niveau.

Eine letzte Stimulation wurde mit Bicuculline 1µm und Letrozol 10^{-7} M durchgeführt. Hier dokumentierten wir eine Reduktion sowohl der absoluten Spineanzahl als auch der relativen Anzahl der Spine Apparate.

	Spines + Spine Apparat (absolut)	Spines gesamt (absolut)	Anteil Spine Apparat (relativ)
Kontrolle	100	940	10,64%
Bicuculline 1µmol/l	62	562	11,03%
Bicuculline 10µmol/l	55	488	11,20%
Bicuculline 10µmol/l + Estradiol 10^{-7} M	45	780	5,76%
Bicuculline 1µmol/l + Estradiol 10^{-7} M	40	750	5,30%
Bicuculline 1µmol/l + Letrozol 10^{-7} M	30	523	5,73%

Tab. 3: Auswertung der Zählung der Spines und Spine Apparate. Absolute Anzahl der Spines und absolute Anzahl der Spine Apparate in je 50 ausgewerteten EM Bildern. Relativer Anteil der Spine Apparat tragendenen Spines an der Gesamtzahl der gezählten Spines. Stimulation mit Bicuculline sowie Bicuculline plus jeweils Estradiol und Letrozol in den angegebenen Konzentrationen.

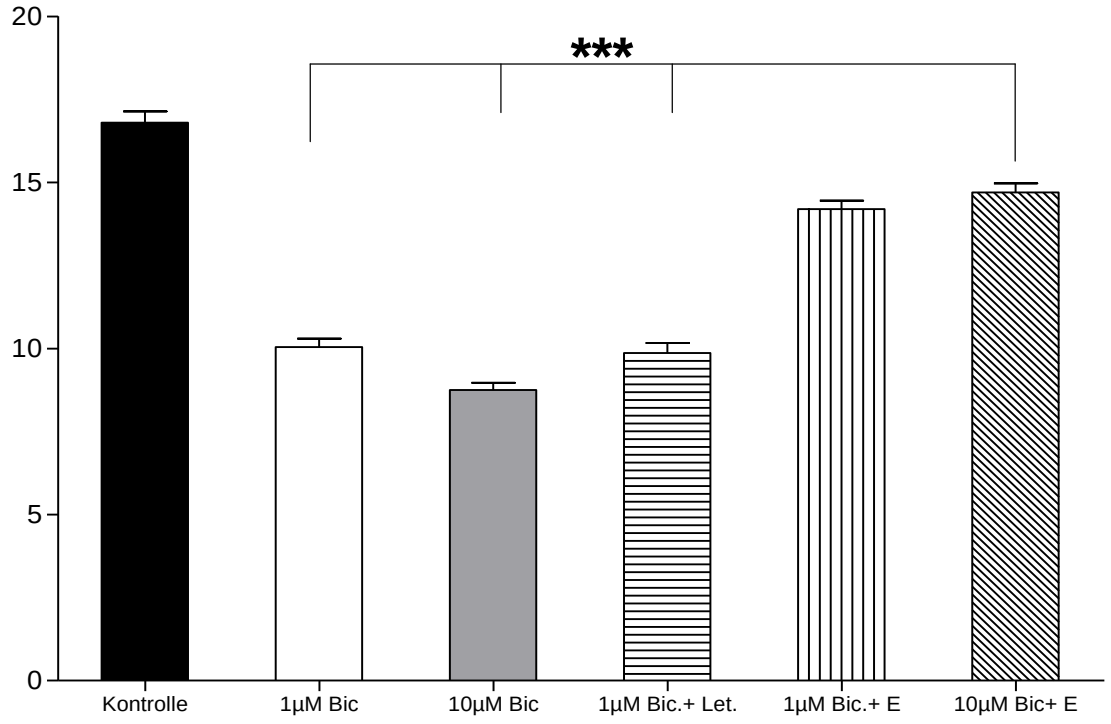

Fig.7: Auswertung der Zählung der absoluten Anzahl der Spines in je 50 ausgewerteten elektronenmikroskopischer Bildern (50 μm^2 /Bild) in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen Bicuculline 1µmol/l, 10µmol/l und Bicuculline 1 µmol/l + jeweils Estradiol 10^{-7} M und Letrozol 10^{-7} M. Dargestellt sind die Anzahl der gezählten Spines pro EM Bild. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (*** $p \leq 0{,}001$).

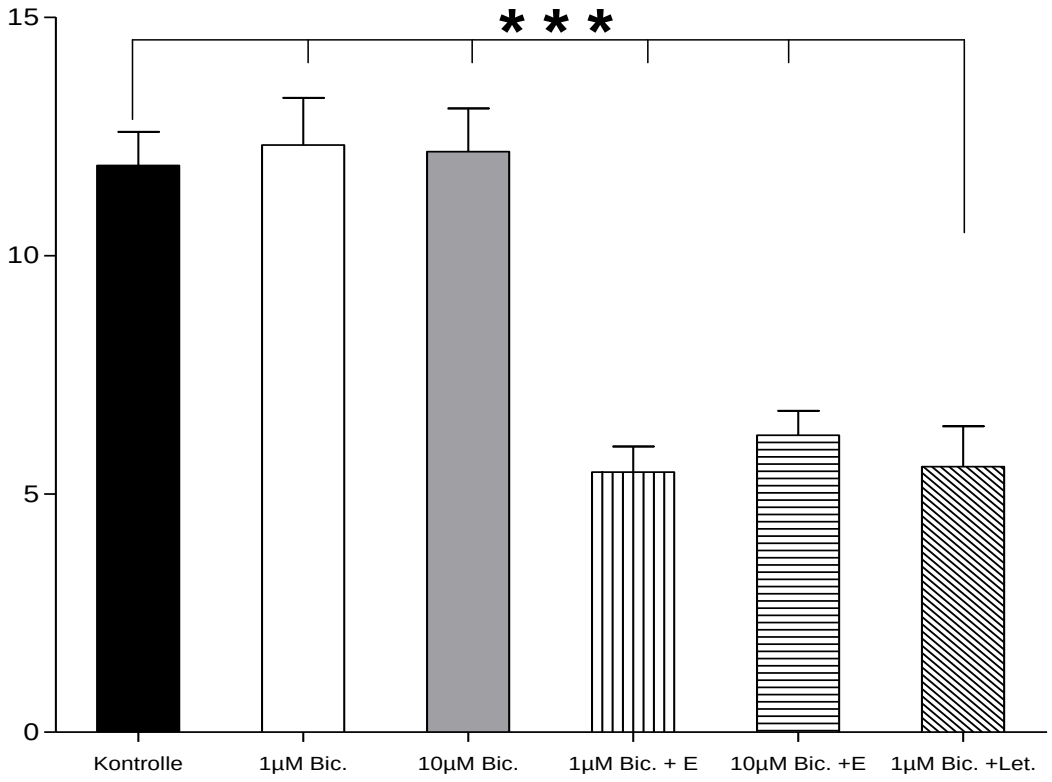

Fig.8: Auswertung der Zählung der Spine Apparate. Relativer Anteil (%) der Spine Apparat tragenden Spines in den unterschiedlichen Stimulationsgruppen Bicuculline 1µmol/l, 10µmol/l und Bicuculline 1 µM + jeweils Estradiol 10^{-7} M und Letrozol 10^{-7} M. Die Prozentzahl bezieht sich auf den Anteil der Spine Apparat tragenden Spines an der Gesamtzahl der Spines in den ausgezählten elektronenmikroskopischen Bilder (n= 50).Dargestellt sind der Mittelwert ± SEM (n=50). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (*** $p \leq 0{,}01$).

5. Diskussion

Es ist bekannt, dass Estradiol *de-novo* von Neuronen im Hippocampus synthetisiert werden kann (Prange-Kiel *et al*., 2003). Bisher nicht abschließend geklärt und viel diskutiert ist die Frage nach der exakten Funktion, die von diesem Steroidhormon dort eingenommen wird. Die Beobachtung, dass unter Einfluss von endogenem Estradiol eine unterschiedliche Regulation der ER Isoformen verursacht wird, liefert Hinweise auf einen para- bzw. autokrinen „Loop", welcher bisher nur im reproduktiven System zu beobachten ist (Prange-Kiel *et al*., 2003).

In dieser Arbeit konnte ich erstmalig zeigen, dass der Spine Apparat, dessen Funktion bisher nicht exakt definiert werden konnte, welcher jedoch wahrscheinlich als intrazellulärer Calciumspeicher fungiert, in seinem Vorkommen einer Regulation durch Estradiol unterliegt. Dies entspricht der Tatsache, dass Synaptopodin, welches unmittelbar mit dem Spine Apparat im Spine kolokalisiert (Deller *et al*., 2000, 2003), ebenfalls durch Estradiol reguliert wird (Bläute, Dissertation 2009). Estradiol verringert die Anzahl Spine Apparat tragender Spines. Überraschenderweise konnte dieser Effekt ebenfalls durch den Aromatasehemmer Letrozol, einem potenten Antiöstrogen erzielt werden. Dieser scheinbar widersprüchliche Zusammenhang wird im Folgenden diskutiert. Wesentlich für eine mögliche Erklärung dieses Sachverhaltes ist der Verweis auf die aktivitätsabhängige Regulierung der Aromatase, welche über einen exzitatorischen Input gehemmt werden kann und Einfluss auf die Synaptopodinexpression hat (Labitzke, Dissertation 2009). Zudem haben verschiedene Studien demonstriert, dass Estradiol einen Einfluss auf die synaptische Aktivität im Sinne einer Initiierung und Verstärkung der LTP hat (Warren *et al*., 1995; Good *et al*., 1999; Zamani *et al*., 2000). Die aktivitätsabhängige Regulation dieses Neurosteroids auf der einen Seite und die neuronale Aktivitätsinduktion durch Estradiol mit den damit verbundenen Effekten auf synaptischen Plastizität und Morphologie wie z.B. den Spine Apparat auf der anderen Seite, sind wesentliche Fragen, zu deren Klärung diese Arbeit ein Stück weit beitragen kann.

5.1 Estradiol und Letrozol vermindern die Anzahl Spine Apparat tragender Spines

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass das Vorkommen der Spine Apparat tragenden Synapsen nach 7 tägiger Stimulation mit 17-β Estradiol in der Konzentration 10^{-7} mol/l signifikant vermindert ist. Paradoxerweise ließ sich dieser Effekt ebenfalls mit dem Aromatasehemmer Letrozol in gleicher Dosierung 10^{-7} M erzielen. Bemerkenswert hierbei war, dass nach Letrozolbehandlung auffällig weniger Spines zu zählen waren als in den Kontrollbildern. Dies korreliert mit den Daten von Kretz *et al*. (2004), die nach direkter Aromatasehemmung mit Letrozol einen Spineverlust darstellen konnten. Im Unterschied zur Letrozolbehandlung war jedoch die absolute Anzahl aller Spines nach Estradiolstimulation unverändert auf Kontrollniveau. Dies deckt sich ebenso mit den Ergebnissen von Kretz *et al*. (2004), welche nach Estradiolbehandlung keine Zunahme der Spinedichte verzeichneten. Insgesamt scheinen Estradiol und Letrozol vor allem die Anzahl Spine Apparat tragender Spines selektiv zu reduzieren, da sich durch beide Substanzen der prozentuale Anteil dieser Spines im Vergleich zur Kontrollgruppe in gleichem Maße reduzieren ließ. Letrozol verringert zudem die Anzahl jener Spines, die keinen Spine Apparat tragen und von Estradiol nicht beeinflusst werden. Die Arbeitsgruppe Rune *et al*. untersuchte die Immunreaktivität von Synaptopodin nach Letrozolbehandlung. Durch Aromatasehemmung mittels 30-minütiger Letrozolstimulation ließ sich die Immunreaktivität von Synaptopodin signifikant reduzieren. Erstaunlicherweise zeigte eine Stimulation mit dem Aromataseendprodukt Estradiol das gleiche Ergebnis, nämlich eine signifikante Reduktion der Synaptopodinimmunoreaktiviät. Somit scheinen Letrozol und Estradiol einen gleichsinnig regulierenden Effekt auf Synaptopodin sowie Spine Apparat tragende Spines zu haben. In der Literatur wurde die Abhängigkeit des Spine Apparates von Synaptopodin mehrfach beschrieben (Deller *et al*., 2000, 2003) und wird durch unsere Befunde nun bestätigt. Die Reduktion des Spine Apparates durch beide Substanzen geht mit einer Herunterregulation des Synaptopodins einher. Letrozol verringert aber zusätzlich auch die Anzahl der dünnen, Spine Apparat negativen Spines. Dieser bereits von Kretz *et al*. (2004) beobachtete und hier bestätigte Effekt scheint unabhängig von Synaptopodin zu sein, da nach Estradiolbehandlung das Niveau dünner Spines konstant bleibt. In Kapitel 5.4 wird dieser Sachverhalt vertieft.

Es stellt sich die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus, welcher die Regulation von Synaptopodin steuert. Wie in der Einleitung erwähnt zeigten Prange-Kiel *et al*. (2003), dass die Estradiolrezeptoren ER α und ER β gegensinnig reguliert werden können und dass die Behandlung von hippocampalen Dispersionkulturen mit Letrozol zu einer Abnahme von ER α und einer Zunahme von ER β führt. In bisher unveröffentlichten Daten konnte die Arbeitsgruppe Rune *et al*. zeigen, dass der ER β Agonist DPN zu einer Reduktion der Synaptopodinsynthese führt, während dies für den ER α Agonisten PPT nicht gezeigt werden konnte. Letrozol induziert also den ER β und dessen Aktivierung könnte zu der beobachteten Reduktion des Synaptopodins und somit zu einem Verlust Spine Apparat tragender Spines führen. Dies erklärt jedoch nicht, warum Estradiol in diesem Falle gleichsinnig wirkt, da nach Prange-Kiel *et al*. (2003) durch Estradiol der ER β herunterreguliert werden sollte. Eine Erklärung könnte sein, dass unabhängig von den genomischen, für Steroidhormone typische Wirkmechanismen, welche z.B. die Proteinsynthese (ER β) regulieren, ein alternativer, nicht genomischer Signalweg durch Estradiol aktiviert werden kann. Zaho *et al*. (2005) diskutieren eine Estradiol-vermittelte Calciumfreisetzung, welche über N-Typ spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle, den Ryanodinrezeptor und den IP3-Rezeptor, erfolgen könnte. Zu dieser Hypothese passen u.a. die Arbeiten von Revankar *et al*. (2005) und Funakoshi *et al*. (2006), die einen G-Protein gekoppelten (GPR30) Estradiolrezeptor beschreiben, der membranständig, z.B. im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und nach Stimulation über die sogenannte Calcium induzierte Calcium Freisetzung (CIC) zu einer intrazellulären Erhöhung der Calcium Konzentration führt. Balthazart *et al*. (2003), konnten im präfrontalen Kortex von Wachteln zeigen, dass die Aromatase über eine durch Calcium induzierte Phosphorylierung innerhalb von Minuten, also im Sinnes eines „schnellen Effektes“, inaktiviert werden kann. Estradiol könnte also auf dem Wege eines „rapid effects“, nämlich einer intrazellulären Calciumfreisetzung und Phosphorylierung der Aromatase, eine Enzymhemmung erwirken und so die weitere Estradiolsynthese hemmen. Die Vermutung unserer Arbeitsgruppe ist, dass Estradiolstimulation über membranständige Rezeptoren schon nach kurzer Zeit zu einem CIC führt, welcher den genannten „rapid effect“ zeigt und so zu einer „netto“ Reduktion der intrazellulären Estradiolkonzentration führt. Dies hätte nach Prange-Kiel *et al*. wiederum die Induktion des ER β zur Folge und somit eine Reduktion von Synaptopodin und Spine Apparat. In bisher nicht veröffentlichte Daten von Rune *et al*. kann die Synaptopodinreduktion auch

durch an bovines Serumalbumin gebundenes Estradiol, welches nicht in die Zelle diffundieren kann, reproduziert werden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein eines membranständigen Rezeptors. Es ist möglich, dass Estradiol nicht, wie bisher postuliert, frei durch die Zellmembran diffundieren kann, sondern einem endozytären Aufnahmemechanismus unterliegt, es also durch externe Zugabe von Estradiol in das Nährmedium nicht zwangsläufig zu einer intrazellulären Konzentrationserhöhung käme.

5.2 Thapsigargin führt zu einer Vergrößerung des Spine Apparates aber nicht zu einer quantitativen Zunahme der Spine Apparat tragenden Spines

Eine weiteres Ziel der Arbeitsgruppe Rune *et al*. ist die Klärung der Frage, welchen Effekt die Blockierung der intrazellulären Wiederaufnahme in den Calciumspeicher auf die Konzentration des Proteins Synaptopodin bzw. auf das Vorkommen des Spine Apparates hat. Hierzu wurde die SERCA, eine Ca-ATPase, mit Hilfe des Sesquitterpen Lakton Thapsigargin gehemmt und es kann nach initialer Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher kein erneutes Auffüllen dieser mehr stattfinden (Thastrup *et al*., 1990). Hiernach bleibt die Funktion der Calciumspeicher erhalten. Der intrazelluläre Calciumfluss ist stark vermindert. Die zytosolische Calciumkonzentration erhöht sich durch die Blockierung der Wiederaufnahme. (Behnisch *et* Reymann, 1995; Kovalchuk *et al*., 2000). In hippocampalen Dispersionskulturen konnten nach Zugabe von Thapsigargin höhere Synaptopodinexpression gemessen werden (Voets, Dissertation 2009). Dieses Ergebnis erscheint zunächst nicht mit der o.g. Theorie übereinzustimmen, wonach die Aromatasehemmung durch Calcium eine Synaptopodinherunterregulation zur Folge haben müsste. Interessanterweise wurde nach simultaner Applikation von Estradiol und Thapsigargin ebenfalls ein signifikant erhöhter Synaptopodinspiegel gemessen (Voets, Dissertation 2009). Die Hemmung der Calciumwiederaufnahme in die depletierten, intrazellulären Stores durch Thapsigargin scheint die Negativregulation von Synaptopodin durch Estradiol aufheben zu können. Die mit der SERCA-Hemmung verbundene intrazelluläre Calciumkonzentrationserhöhung scheint in diesem Falle keine Rolle zu spielen. Nach den Erkenntnissen von Baltharzart *et al*. (2006) wird die

Aromatase über Calcium induzierte Phosphorylierung negativ reguliert. Man kann dies vermutlich einem Calciumrelease aus intrazellulären Speichern zuschreiben. Möglicherweise ist für die Aromatasehemmung aber nicht die einfache zytosolische Calciumkonzentration ausschlaggebend, sondern der transiente Calciumrelease (CICR), um durch eine „delta“ Konzentrationsänderung die Aromatase effektiv zu hemmen. Um diese Annahme zu erhärten, wurde die Estradiolkonzentration nach Thapsigarginbehandlung gemessen und es zeigte sich eine erhöhte Estradiolkonzentration sowie eine erhöhte Aromataseaktivität nach Thapsigarginbehandlung (Voets, Dissertation 2009). Ein ähnlicher Mechanismus lässt sich auch nach synaptischer Aktivierung durch NMDA nachweisen. In diesem Falle führt eine geringer Calciumeinstrom von extrazellulär zu einem intrazellulären CICR mit nachfolgender Hemmung der Aromatase. Synaptopodin wurde in diesen Experimenten herunterreguliert, ein Effekt, der sich ebenfalls durch Thapsigargin aufheben ließ. (Labitzke, Dissertation 2009).

In dieser Arbeit habe ich den Einsfluss von Thapsigargin auf die Morphologie und das Vorkommen des Spine Apparates untersucht. Es wäre zu erwarten, dass nach oben Genanntem ggf. eine Vermehrung der Spine Apparat tragenden Spinesynapsen zu verzeichnen ist, da Synaptopodin durch einen nun verhinderten CIC und somit ausbleibende Phosphorylierung der Aromatase nicht mehr negativ reguliert werden kann. Der Anteil Spine Apparat tragender Spines blieb aber in allen Gruppen gleich. Zu meiner Überraschung habe ich festgestellt, dass sich nach Gabe von Thapsigargin in der Konzentration 0,1 µmol/l der Anteil an Spine Apparaten mit mehr als 4 Lamellen annährend verdoppeln ließ. Diese Beobachtung, nämlich die morphologische Vergrößerung der Zellorganelle nach Blockade der SERCA, könnte im Zusammenhang mit der nun erhöhten Synaptopodinkonzentration stehen. Es erhöht sich jedoch nicht der Anteil Spine Apparat tragender Spines, was nach Zunahme der Synaptopodinkonzentration durchaus zu erwarten wäre. Der Spine Apparat wird nach Thapsigarginbehandlung größer. Eine alternative Erklärung für die beobachtete Größenzunahme könnte die komplette Calciumdepletion des möglichen Calciumspeichers Spine Apparat sein. Um dies zu klären, sind weitere experimentelle Erkenntnisse notwendig. Interessanterweise konnte ich im Rahmen der Simultangabe von Thapsigargin (0,01 µmol/l) und Letrozol in der gewohnten Dosierung 10^{-7} M zeigen, dass eine Herunterregulation der Spinedichte und der Anzahl der Spine Apparat tragenden Spines, wie es nach alleiniger Letrozolgabe zu erwarten wäre, ausblieb und

sich beide Parameter auf Kontrollniveau darstellen ließen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Blockade der SERCA und der ausbleibende CIC einen Rescueeffekt auf die direkte Aromatasehemmung durch Letrozol und hierdurch vermittelte Reduktion der Synaptopodinkonzentration hat. Um dies zu verifizieren, müsste z.B. in Dispersionskulturen trotz Letrozolgabe immer noch eine erhöhte Synaptopodinkonzentration gemessen werden. Ebenso sollte der Effekt der Simultangabe von Thapsigargin und Estradiol auf das quantitative und morphlogische Vorkommen des Spine Apparates untersucht werden.

5.3 Ist der Spine Apparat ein Calciumspeicher und so an der calciumabhängigen Regulation von Synaptopodin beteiligt?

Unter Zusammenschau der oben diskutierten Befunde könnte sich nun ein funktionell und morphologisch richtungweisendes Bild für den Spine Apparat ergeben. In der Literatur wird der Spine Apparat häufig als möglicher Calciumspeicher bewertet (Fifkova *et al*., 1983). Dieser könnte am Calcium vermittelten Calciumrelease (CIRC) beteiligt sein und über die beschrieben Hemmung der Aromatase mit nachfolgender Synaptopodinregulation sein eigenes Vorkommen steuern. Die Tatsache, dass sich bei Synaptopodindefizienz und somit dem Fehlen des Spine Apparates deutlich weniger LTP induzieren lässt (Deller *et al*., 2003), deckt sich mit der beschriebenen Assoziation von Synaptopodin, Spine Apparat und dem Zytoskelett (Mundel *et al*., 1997; Kremerskothen *et al*., 2005; Asanuma *et al*., 2005, 2006). Der Spine Apparat könnte somit als intrazelluläre calciumspeichernde Organelle auf aktivitätsvermittelte Reize reagieren und Calcium freisetzten. Mögliche Stimuli wären z.B. extrazellulär NMDAR Aktivierung, worauf ein Calciumeinstrom nach intrazellulär folgen würde. Dies würde einen CICR auslösen. Möglich wäre auch eine direkte intrazelluläre Stimulation über z.B. Estradiol via GPR 30. Der in beiden Fällen ausgelöste CICR könnte wie oben diskutiert zu einer Aromatasehemmung führen, eine Synaptopodinreduktion nach sich führen und so eine Regulation des Zytoskeletts bewirken. Nach Calciumdepletion mittels SERCA Hemmung findet eine morphologische Änderung des Spine Apparates statt (s.o.). Dies lässt ebenfalls die Annahme zu, dass diese Organelle eine Rolle als Calciumspeicher spielen könnte. Zur Verifizierung der genannten Vermutungen

müssten der von Revankar *et al*. (2005) und Funakoshi *et al*. (2006) beschriebene Estradiolrezeptor GPR 30, welcher am endoplasmatischen Retikulum beschrieben wird, sowie die durch Thapsigargin geblockte SERCA in der Wand des Spine Apparates nachgewiesen werden. Die Darstellung von intrazellulären Calciumströmen mittels Multiphotonenmikroskopie scheint ebenfalls eine möglich, attraktive Methode zum Beweis der erhobenen Hypothesen zu sein.

5.4 Estradiol verhindert einen Spineverlust im Hippocampus während neuronaler Überstimulation durch den GABA A Rezeptorblocker Bicuculline

In dieser Arbeit untersuchte ich ebenfalls die quantitativen Veränderungen von Spines und Spine Apparaten der CA1 Region des Hippocampus nach Behandlung mit Bicuculline, einem GABA A Rezeptorblocker, welcher zu einer starken Überexzitation im hippocampalen Zellverband führt. Die Auswertungen zeigen, dass es nach alleiniger Behandlung mit Bicuculline sowohl in der Konzentration 1µM als auch in der Konzentration 10µM zu einer erheblichen Reduktion der Anzahl von Spines im elektronenmikroskopischen Bild kam. Der relative Anteil der Spine Apparat tragenden Spines blieb unverändert. Interessanterweise ließ sich der Spineverlust durch gleichzeitige Zugabe von Estradiol in der Konzentration 10^{-7} M verhindern. Die absolute Anzahl der gezählten Spines blieb hiernach auf Kontrollniveau. Der relative Anteil Spine Apparate tragender Spines war nach simultaner Bicuculline- und Estradiolstimulation im Vergleich zur Kontroll- und Bicucullinegruppe signifikant niedriger. Dies entspricht den bereits gezeigten Daten, wonach Estradiol zu einer selektiven Reduktion von Spine Apparat tragenden Spines führt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass Estradiol offensichtlich protektiv für dünne, Spine Apparat negative Spines ist. Es kann festgehalten werden, dass Estradiol während einer „epileptoiden“ Überexitation zu einem „Rescue“ jener Spines führt, welche morphologische den dünnen Spines zugeordnet werden, keine Spine Apparate tragen und als eher unreif bezeichnet werden können. Die Zugabe des Aromatasehemmers Letrozol erbrachte in diesem Experiment keinen „Rescue“ des durch Bicuculline induzierten Spineverlustes. Wie bereits aus den Vorexperimenten bekannt, sahen wir

nach Letrozolbehandlung eine Verminderung der Spine Apparat tragenden Spines im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine zusätzliche Reduktion der Gesamtzahl aller Spinesynapsen durch Letrozol in Kombination mit Bicuculline konnte nicht festgestellt werden. Zhou *et al*., (2007) bestimmten in mit Bicuculline behandelten „epileptischen" Slicekulturen die Estradiolkonzentration und fanden eine signifikante Reduktion der Estradiolkonzentration in den jeweiligen Medien. Es ist somit denkbar, dass der Spineverlust einem Estradiolmangel unterliegt und exogen zugeführtes Estradiol den Spineverlust verhindern kann. Diese Hypothese passt zu den bereits veröffentlichten Erkenntnissen, dass es nach einem Spineverlust durch den Aromatasehemmer Letrozol ebenfalls zu einem „Rescue-Effekt", also Spinogenese durch Estradiol kommen kann (Kretz *et al*., 2004; Rune *et al*. 2006; von Schassen *et al*., 2006).

Gleichzeitig zu meinem Experiment konnte die Arbeitsgruppe Zhou *et al*. (2007) zeigen, dass die Estradiolsynthese im Hippocampus wie bereits vermutet durch neuronale Aktivität beeinflusst wird. Interessanterweise ist die gemessene, quantitative Reduktion der Estradiolkonzentration durch Bicuculline mit jener nach direkter Aromatasehemmung durch Letrozol zu vergleichen.

Führt also die pathologische Überexzitation im Krampfanfall zu einer Hemmung der Estradiolsynthese und erklärt so den beobachteten Spineverlust? Halpain *et al*. zeigten 1998, dass ein massiver Ca 2+ Einstrom via NMDA Rezeptoren mit signifikantem Spineverlust einhergeht. Die Arbeitsgruppe führte dies auf eine mögliche konsekutive F-Aktin Destabilisierung zurück. Wie bereits in dieser Arbeit im Zusammenhang mit den anderen Experimenten diskutiert ist bekannt, dass nach Calciumeinstrom von exogen via eines intrazellulären CICR eine effektive Aromatasehemmung resultieren kann (Balthazart *et al*., 2006). Dies wäre eine mögliche Erklärung, weshalb nach Bicucullinestimulation eine messbare Reduktion des Estradiolniveaus zu vermerken ist. Diese entspricht in ihrem quantitativ messbaren Ausmaß jener, wie sie nach Letrozolbehandlung zu dokumentieren ist (Zhou *et al*., 2007). Dies würde zudem erklären, warum sich die simultane Gabe von Bicuculline und Letrozol nicht additiv auf den Spineverlust auswirken, da beide eine an sich schon effektive Aromatasehemmung bewirken. Bemerkenswert bei diesem Experiment ist, dass die in vitro induzierte Übererregung mit einem massiven Spineverlust einhergeht, was einem substantiellen Schaden der hippocampalen Region, wie er *in vivo* nach Krampfanfällen beobachtet wird, entsprechen könnte. Die übererregungsbedingte Depletion des Estradiolspiegels kann verhindert werden, indem gleichzeitig Estradiol zugegeben wird. Es stellt sich die

Frage, ob ein bereits manifester Spineverlust nach Bicucullinebehandlung ebenfalls durch Estradiol aufgehoben werden kann. Es ist bekannt, dass nach Stimulation des ERα ein Spinewachstum in der CA1 Region zu beobachten ist (Mukai *et al*., 2007) und dass es nach Estradiolgabe zu einer Zunahme der ERα Expression kommt (Prange-Kiel *et al*., 2003). Dies würde klären, ob Estradiol in diesem Falle nicht nur eine neuroprotektive Funktion während des Ereignisses der Übererregung einnehmen könnte, sondern auch als potentiell therapeutische Substanz nach einer Epilepsie-bedingten Schädigung diskutiert werden kann. Eine Reihe von Studien postulierten eine Interaktion des Estradiols als vermutlich prokonvulsive Substanz mit dem GABA Stoffwechsel (Murphy *et al*., 1998; Weiland *et al*., 1997; Hart *et* Woolley, 2000). Zhou *et al*. (2007) zeigen in ihrer Studie, dass Estradiol keinen Effekt auf die GABA Synthese oder GAD Expression hippocampaler Neuronen hat. Offensichtlich spielen Interaktionen mit dem GABA Stoffwechsel in diesem Falle eine untergeordnete Rolle.
In Zusammenschau der Erkenntnisse lässt sich also festhalten, dass eine pathologische Übererregung, wie sie beim Krankheitsbild der Epilepsie vorkommt, zu einer Reduktion des Estradiolniveaus in hippocampalen Neuronen führt und dies möglicherweise die Ursache für einen substantiellen Schaden ist, welcher sich gegebenenfalls durch Estradiolgabe verhindern lässt.

6. Zusammenfassung

Der Spine Apparat ist ein Spine-spezifisches Zellorganell, das in 80% aller reifen „Mushroom- Spines“ vorkommt, aber nur in 20% aller Spines. Es ist davon auszugehen, dass der Spine Apparat ein Spine-spezifischer Kalziumspeicher ist. Er setzt sich aus Lamellen von endoplasmatischem Retikulum zusammen, zwischen denen elektronendichte Platten zu finden sind. Synaptopodin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, das eng mit dem Spine Apparat assoziiert ist. In der Synaptopodin-Knockout-Maus fehlen Spine Apparate; die Tiere zeigen eine verringerte LTP und Verhaltensdefizite. In vorausgegangenen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Rune und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass Estradiol und erstaunlicherweise auch der Aromatasehemmer Letrozol zu einer Herunterregulation des Proteins Synaptopodin führt.
In der vorliegenden Doktorarbeit konnte die enge Assoziation von Synaptopodin an den Spine Apparat bestätigt werden. In hippocampalen Schnittkulturen war der Anteil Spine

Apparate-tragender Spines sowohl nach Estradiol als auch nach Letrozol signifikant verringert. Eine Entleerung der Speicher in den Kulturen durch Thapsigargin, welches verhindert, dass Kalzium in die internen Speicher wieder zurück gepumpt wird, hatte zur Folge, dass die Spine Apparate sich vergrößerten. Dieser Befund untermauerte die Rolle des Spine Apparats als interner Kalziumspeicher. Ein durch Übererregung induzierten Spineverlust, der mit einer reduzierten Estradiolsynthese der Kulturen einherging, ließ sich durch Estradiol wieder aufheben, nicht jedoch der Verlust an Spine Apparat tragenden Spines. Dagegen ließ sich ein durch Letrozol hervorgerufenen Verlust von Spine Apparat tragenden Spines durch Thapsigargin wieder aufheben.

Die Ergebnisse unsere Experimente zeigen, dass der Spine Apparat ein dynamisches Zellorganell ist. Die Ergebnisse nach Behandlung mit Thapsigargin unterstreichen die Funktion des Spine Apparates als interner Kalziumspeicher. Die Reduktion der Spine Apparat-tragenden Spines sowohl nach Letrozol als auch nach Estradiol lassen vermuten, dass Estradiol durch einen bereits bekannten Kalzium-induzierten Kalziumrelease (CIC) aus dem Spine Apparat die Aromatase hemmt und sich auf dieser Weise der scheinbare Widerspruch erklären lässt. Letztendlich zeigen die Ergebnisse auch, dass Estrogen-induzierte Spinebildung nur dünne aber nicht reife Spines betrifft.

7. Literaturverzeichnis

- Adam G., Matus A. (1996) Role of actin in the organisation o brain postsynaptic densities. Brain Res. Mol. Brain Res. 43: 246-250.

- Altman J., Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol 124: 319-35

- Amaral D.G., Witter M.P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience; 31(3):571-91.

- Asanuma K., Kim K., Mundel P. (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundlinig activity o alpha actin in an isoform-speciffic manner. J. Clin. Invest. 115: 1188-1198.

- Asanuma K., Kim K., Mundel P. (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation o RhoA signalling. Nat. Cell Biol. 8: 485-491.

- 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 C.M., Frotscher M., Deller T. (2007) Loss of the cisternal organelle in the axon initial segment of cortical neurons in synaptopodin-deficient mice. The journal of comparative Neurology, 5: 441-449.

- Balthazart J., Baillien M., Charlier TD., Ball GF. (2003) Calcium dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail; European Journal of Neuroscience 17: 1591-1606.

- Balthazart J., Ball GF. (2006) Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? Trends Neurosci 29: 241-9.

- Behnisch T., Reymann KG. (1995) Thapsigargin blocks long-term potentiation induced by weak, but not strong tetanisation in rat hippocampal CA1 neurons. Neurosci Lett192: 185-8.

- Belelli D. and Herd M. (2003) The contraceptive agent Provera enhances $GABA_A$ receptor-mediated inhibitory neurotransmission in the rat hippocampus: evidence for endogenous neurosteroids?, J. Neurosci. 23, pp. 10013–10020.

- Benninghoff A., Drenckhahn D. (2004b) Aufl. 16 Anatomie Band 2. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsevier S.506- 509.

- Berridge M.J. (1998) Neuronal calcium signaling. Neuron 21: 13-26.

- Beyenburg B., Stoffel-Wagner J., Bauer M., Watzka L., Blumcke F. ,Bidlingmaier C.E., C. Elger (2001) Neuroactive steroids and seizure susceptibility, Epilepsy Res. 44: 141–153.

- Beyer C. (1999) Estrogen and the developing mammalian brain. Anat Embryol (Berl) 199(5):379-90.

- Bläute F. (2009) Einfluss von Östradiol auf die neuronale Synaptopodinexpression. Universität Hamburg.

- Brake W.G., Alves S.E., Dunlop J.C., Lee S.J., Bulloch K., Allen P.B., Greengard P. McEwen B.S. (2001) Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. Endocrinology. 142: 1284-9.

- Buterbaugh G.G. (1989) Estradiol replacement facilitates the acquisition of seizures kindled from the anterior neocortex in female rats, Epilepsy Res. 4: 207–215.

- Buterbaugh G.G. and Hudson G.M. (1991) Estradiol replacement to female rats facilitates dorsal hippocampal kindled seizure acquisition, Exp. Neurol. 111: 55–64.

- Carafoli E. (1994) Biogenesis: Plasma membran Calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. October 1, 1994 The FASEB Journal vol. 8 no. 13: 993-1002.

- Carrer HF., Araque A., Buño W. (2003) Estradiol regulates the slow Ca^{2+} - activates K^{+} current in hippocampal pyramidal neurons, The journal o Neuroscience. 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.

- Coss RG., Globus A. (1978) Spine stems on tectal interneurons in jewel fish are shortened by social stimulation. Science 200: 787-90.

- 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.

- Curtis D.R., Duggan A.W., Felix D., Johnston G.A. (1970) GABA, Bicuculline and central inhibition. Nature. 27; 226(5252):1222–1224.

- Czarnecki K., Haas C.A., Bas Orth C., Deller T., Frotscher M. (2005) Postnatal development of synaptopodin expression in the rodent hippocampus. The journal of comparative neurology 490: 133-144.

- Deller T., Orth C.B., Del Turco D., Vlachos A., Burbach G.J., Drakew A., Chabanis S., Korte M., Schwegler H., Haas C.A., Frotscher M. (2007) A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. Ann Anat 189: 5-16.

- Deller T., Merten T., Roth S.U., 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 apparatuss of principal neurons. The journal of comparative neurology 418: 164-181.

- 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. Neurology 499: 471-484.

- 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., Mundel P., Frotscher M. (2002) Laminar Distribution of Synaptopodin in normal and reeler mouse brain depends on the position of spine-bearing neurons. The Journal of comparative neurology 453: 33-44.

- 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.

- Edwards H.E., W.M. Burnham, A. Mendonca, D.A. Bowlby and N.J. MacLusky (1999) Steroid hormones affect limbic discharge thresholds and kindling rates in adult female rats, Brain Res. 838, pp. 136–150.

- Emptage N., Bliss TV., Fine A. (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release o 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 oeestrogen synthesis. Journal of Neurochemistry 97: 1136.

- Fester L., Zhou L., Bütow A., Huber C., von Lossow R., Prange-Kiel J., Jarry H.,Rune G.M. (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. Hippocampus 19(8): 692-795.

- Fifkova E., Morales M. (1989) Calcium-regulated contractile and cytoskeletal proteins in dendritic spines may control synaptic plasticity. Ann N Y Acad Sci 568: 131-7.

- Fifkova E., Markham J.A., Delay R.J. (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. Brain Res 266: 163-168.

- 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) Learn Mem. 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(1):5-16.

- Frotscher M., Zafirow S., Heimrich B. (1995) Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. Prog Neurobiol 352: 55-68.

- 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 M.M., Mizukami Y. (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane., Biochem Biophys Res Commun. 346: 904-10.

- Garcia-Segura L.M., Naftolin F., Hutchison J.B., Azcoitia I., Chowen JA. (1999) Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. J Neurobiol. 40: 574-84.

- Garcia-Segura LM., Wozniak A., Azcoitia I., Rodriguez JR., Hutchison RE., Hutchison JB. (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. Neuroscience. 89: 567-78.

- Geisler J., B. Haynes, G. Anker, M. Dowsett and P.E. Lonning (2002) Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study, J. Clin. Oncol. 20 751–775.

- Gray E.G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. J. Anat. 83: 20-433.

- Good M., Day M., Muir J.L. (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 C.S., Frankfurt M., McEwen B.S. (1990) Gonadal steoids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J. Neurosci. 10: 1286-1291.

- Halpain S., Hipolito A., Saffer L. (1998) Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. J Neurosci. 18(23):9835-44.

- Hebb D. (2002) The organization of behavior. A neuropsychological theory. Erlbaum Books, Mahwah (Nachdruck der Ausgabe New York 1949).

- Herkes G.K., Eadie M.J., Sharbrough F. and Moyer T. (1993) Patterns of seizure occurrence in catamenial epilepsy. Epilepsy Res. 15: 47–52.

- Herzog A.G. (1995) Hormonal changes in epilepsy. Epilepsia 36: 323–326.

- Hoffmann, G.E., Moore, N., Fiskum, G., Murphy, A.Z. (2003) Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death aftre kainic acid treatment. Experimental Neurology 18: 124-134.

- 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 P45017α andd P450 aromatase localized in neurones. Proc Natl Acad Sci USA 101: 865-870.

- Hom A.C. and G.G. Buterbaugh (1986) Estrogen alters the acquisition of seizures kindled by repeated amygdala stimulation or pentylenetetrazol administration in ovariectomized female rats, Epilepsia 27: 103–108.

- Howell A. (2000) Faslodex (ICI 182780). An oestrogen receptor downregulator. Eur J Cancer 4: S87-8.

- Ikegaya Y., Ikeda Y., Saito H, Nishiyama N. (1998) Suppression of synaptogenesis by epileptiform discharges in hippocampal slice culture. Biol Pharm Bull. 21(3):231-4.

- Jedlicka P., Vlachos A., Schwarzacher S.W., Deller T. (2008) A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. Behav Brain Res 192: 12-9.

- 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.

- 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.

- Klein P. and A.G. Herzog (1998) Hormonal effects on epilepsy in women, Epilepsia. 39: 9–16.

- Klüver H., Bucy P. (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. Arch Neurol Psych 42: 979.

- Korkotian E., Segal M. (1999) Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. 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.

- Korkotian E., Segal M. (2006) Spatially confined diffusion of calcium in dendrites of hippocampal neurons revealed by flash photolysis of caged calcium. Cell Calcium 40: 441-9.

- 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 o 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. The journal of Neuroscience 24: 5913-5921.

- Krucker T., Siggins G.R., Halpain S. (2000) Dynamic actin filaments are requuuired for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 o the hippocmpus; Proc Natl Acad SCi USA 97: 6856-61.

- Kuiper G.G., Shughrue P.J., Merchenthaler I., Gustafsson J.A. (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. Endocrinology. 139: 4252-63.

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

- Leinweber B.D, Fredricksen RS, Hoffman D.R, Chalovich J.M. Fesselin (1999) a novel synaptopodin-like actin binding protein from muscle tissue.J Muscle Res Cell Motil. 20(5-6):539-45.

- 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.

- Leranth C., Shanabrough M. (2001) Supramammillary area mediates subcortical estrogenic action on hippocampal synaptic plasticity. Exp Neurol. 167: 445-50.

- Leranth C., Lâm T.T. (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.

- Leranth C., Petnehazy O., MacLusky N.J. (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.

.

- Li C., Brake W.G., Romeo R.D., Dunlop J.C., Gordon M., Buzescu R., Magarinos A.M., Allen P.B., Greengard P., Luine V., McEwen B.S. (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.

- Malenka R.C., Bear M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches Neuron. 44(1):5-21.

- Martin P.D., Shapiro M.L. (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 J.C., Quinta-Ferreira M.E. (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 T.G. (2000) Influx of extracellular calcium regulates actin-dependent morphological plasticity in dendritic spines. Neuropharmacology. 47: 669-76.

- Matsuzaki M, Ellis-Davies G.C, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons.Nat Neurosci. 4(11):1086-92.

- McCarthy J., Brian and Milner Teresa A. (2003) Dendritic ribosomes suggest local protein synthesis duuring estrous synaptogenesis. Developmental Neuroscience 14: 1357-1360.

- McEwen B., Akama K., Alves S., Brake W.G., Bulloch K., Lee S., Li C., Yuen G., Milner T.A. (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. (2002) Estrogen actions throughout the brain. Recent Prog Horm Res. 57: 357-84.

- McEwen B.S., Li C., Brake W.G., Romeo R.D., Dunlop J.C., Gordon M., Buzescu R., Magarinos A.M., Allen P.B., 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.

- McEwen B.S. (2001) Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. J Appl Physiol. 91: 2785-801.

- Morrell M.J. (1999) Epilepsy in women: the science of why it is special, Neurology 53: 42–48.

- Meyer A, Beck E. (1955) The hippocampal formation in temporal lobe epilepsy. Proc R Soc Med. 48 (6):457-62.

- Mukai H., Takata N., Ishii H.T., 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.

- Mukai H., Tsurugizawa T., Murakami G., Kominami S., Ishii H., Ogiue-Ikeda M., Takata N., Tanabe N., Furukawa A., Hojo Y., Ooishi Y., Morrison J.H., Janssen W.G., Rose J.A., Chambon P., Kato S., Izumi S., Yamazaki T., Kimoto T., Kawato S. (2007) Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. J Neurochem 100: 950-976.

- Muller D. (2000) Spine changes associated with long term potentiation. Hippocampus 10: 596-674.

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

- Mungai J.M. (1967) Dendritic patterns in the somatic sensory cortex of the cat. J Anat. 101(Pt 3): 403–418.

- Murphy D.D., N.B. Cole, V. Greenberger and M. Segal (1998) Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons, J. Neurosci. 18: 2550–2559.

- Murphy D.D., Segal M. (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. J Neurosci. 16: 4059-68.

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

- Nilsson S. and J.A. Gustafsson (2002) Estrogen receptor action, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 14: 237–257.

- Nelson EJ., Li CC., Bangalore R., Benson T., Kass R.S., Hinkle P.M. (1994) Inhibition of L-type calciumchannel activity by thapsigargin and 2,5-t-butylhydroquinone, but not by cyclopiazonic acid. J Biochem 302: 147-54.

- Oertner T.G., 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. Neuroscience. 71: 1005-11

- Papez J.W. (1995) A proposed mechanism of emotion. 1937. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 7: 103-12.

- Parnavelas J.G., Lynch G., Brecha N., Cotman C.W., Globus A. (1974) Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. Nature 248: 71-3.

- Peters A., Kaiserman-Abramof I.R. (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. Am J Anat. 127: 321-55.

- Phillips S.M., Sherwin B.B. (1992) Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. Psychoneuroendocrinology. 17(5):485-95.

- Pierce J.P., Milner T.A. (2001) Parallel increases in the synaptic and surface areas of mossy fiber terminals following seizure induction. Synapse. 39: 249-56.

- Prange-Kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Jarry, H., Rune, G.M. (2009) Estrous cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms J Neural Transm 116(11):1417-25.

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

- Prange-Kiel J., Rune G.M. (2006). Direct and Indirect effects of estrogen on rat hippocampus. Neuroscience 138: 765-772.

- Prange-Kiel J., Rune G.M., Zwirner M., Wallwiener D., Kiesel L. (2001) Regulation off 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 G.M. (2006) Inhibition of Hippocampal estrogen syntheses causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. Hippocampus 16: 464-71.

- Puddefoot J.R., S. Barker, H.R. Glover, S.D.M. Malouitre and G.P. Vinson (2002) Non-competitive steroid inhibition of estrogen receptor functions, Int. J. Cancer 101: 17–22.

- Pozzo-Miller L.D., Inoue T., Murphy D.D. (1999) Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca2+ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. J Neurophysiol. 81: 1404-11.

- Qui J., Bosch M.A., Tobias S.C., Grandy D.K., Scanlan T.S., Ronnekleiv O.K., Kelly M.J. (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 F.A., Streit P., Roberts J.D., Somogyi P. (2000) NMDA receptor content of synapses in stratum of the hippocampal CA1 area. J. Neurosci. 20: 2512-2522.

- Rae M.G, Martin D.J, Collingridge G.L, Irving A.J. (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. (2007) Procedures in current practice on the writing of scientific papers. 1937. Clin Orthop Relat Res.455: 14-7.

- Rapp S.R., Espeland M.A., Shumaker S.A., Henderson V.W., Brunner R.L., Manson J.E., Gass M.L., Stefanick M.L., Lane D.S., Hays J., Johnson K.C., Coker L.H., Dailey M., Bowen D. (2003) WHIMS Investigators Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. JAMA 289 (20):2663-72.

- Revankar C.M., Cimino D.F., Sklar L.A., Arterburn J.B., Prossnitz E.R. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signalling. Science 307: 1625-30.

- Roth-Alpermann C., Morris R.G., Korte M., Bonhoeffer T. (2006) Homeostatic shutdown of long-term potentiation in the adult hippocampus. PNAS, 103: 11039-11044.

- Rune G.M., Frotscher M. (2002) Estrogen up-regulates estrogen receptor α and synaptophysin in slice cultures o rat hipoocampus. Neuroscience. 113: 167-175.

- 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 G.M., Frotscher M. (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: Role in synaptic plasticity. Neuroscience. 136: 833-842.

- Rune G.M., von Schassen C., Fester L, Prange-Kiel J. (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth. Journal of Neuroendocrinology 18: 847-856.

- Rudnick C.N., C.S. Woolley (2001) Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in the adult rat**,** J. Neurosci. 21: 6532–6543.

- Sabatini BL., Oertner TG., Svoboda K. (2002) The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines .Neuron. 33: 439-52.

- Sharp A.H., McPherson P.S., Dawson T.M., Aoki C., Campbell K.P., Snyder S.H. (1993) Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca2+ release channels in rat brain. J Neurosci. 13(7):3051-63.

- Scheibel M.E., Scheibel A.B. (1968) Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. Brain Res. 9: 32-58.

- Scheibel M.E., Lindsay R.D., Tomiyasu U., Scheibel A.B. (1976) Progressive dendritic changes in the aging human limbic system. Exp Neurol. 53: 420-30.

- Schmidt M., Fasselt B., Rümenapp U., Bienek C., Wieland T., van Koppen C.J., Jakobs K.H. (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 P.E., Fitzgibbons J.C. (1997) Differing mechanisms of expression for short- and long-term potentiation. J Neurophysiol. 78: 321-34.

- Schulz P.E. (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 termplasticity. Nat. Rev. Neurosci. 6: 277-284.

- Smith C.C., McMahon L.L. (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.

- Spacek J. (1985) Three dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplsdmic components, Anat. Embryal (Berl) 171: 235-243.

- Spacek J., Harris K.M. (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 C.M. (1982) Neurochemical transmission, neurotransmitters, and clinical correlations. J Neurosurg Nurs. 14: 303-8.

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

- Sugawara T., Holt J.A., Kiriakidou M., Strauss J.F. 3rd. (1996) Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. Biochem 35: 9052-9.

- Suzuki S, Gerhold L.M., Böttner M., Rau S.W., Dela Cruz C., Yang E., Zhu H., Yu J., Kindy M.S., Merchenthaler I., Gage F.H., Wise P.M. (2007) Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. J Comp Neurol. 500(6):1064-75.

- Svoboda K., Mainen Z.F. (1999) Synaptic [Ca2+]: intracellular stores spill their guts. Neuron. 22: 427-30.

- Thastrup O., Cullen P.J., Drøbak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (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.

- Veliskova J. (2006) The role of estrogens in seizures and epilepsy: the bad guys or the good guys? Neuroscience 138**:** 837–844.

- Veliskova J., L. Galanopoulou and A.S. Sperber (2000) Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult rats after status epilepticus, Epilepsia 41: 30–35.

- Voets C. (2008) Zur Rolle des Calcium bei Estrogen-vermittelter synaptischer Plastizität. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg.

- Warren S.G., Humphreys A.G., Juraska J.M., Greenough WT. (1995) LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. Brain Res. 703: 26-30.

- Walikonis R.S., Jensen O.N., Mann M., Provance D.W., Mercer J.A., Kennedy M.B. (2000) Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. J Neurosci. 20: 4069-80.

- Weiland N.G., Orikasa C., Hayashi S., McEwen B.S. (1997) Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. J Comp Neurol. 388: 603-12.

- Weiland G. (1992) Glutamic acid decarboxylase messenger ribonuleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus, Endocrinology 92 :1316–2697.

- Westrum L.E., Blackstad T.W. (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 L.E. (1970) Observations on initial segments of axons in the prepyriform cortex of the rat. J Comp Neurol. 139: 337-56.

- Wehrenberg U., Rune G.M. (2001) Steroidgenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-locolization with StAR and aromatase. J. Neurochem 76: 1879-1886.

- Wilson C.J., Groves P.M., Kitai S.T., Linder J.C. (1983) Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. J Neurosci. 3: 383-8.

- Woolley C.S., Gould E., Frankfurt M., McEwen B.S. (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci. 10: 4035-9.

- Woolley C.S. (2000) Estradiol facilitates kainic acid-induced, but not flurothyl-induced, behavioral seizure activity in adult female rats, Epilepsia 41: 510–515.

- Woolley C.S. and B.S. McEwen (1992) Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat, J. Neurosci. 12: 2549–2554.

- Woolley C.S., N.G. Weiland, B.S. McEwen and P.A. Schwartzkroin (1997) Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density, J. Neurosci. 17: 1848–1859.

- Wyszynski M., Kharazia V., Shanghvi R., Rao A., Beggs A.H., Craig A.M., Weinberg R., Sheng M. (1998) Differential regional expression and ultestructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptoranchoring protein, in rat brain. J. Neurosci. 18: 1383-1392.

- Xiao C.W., Goff A.K. (1999) Hormonal regulation of oestrogen 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. Journal of Neurochemistry 79: 192-199.

- Yuste R., Majewska A., Holthoff K. (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. Nat Neurosci 3: 653-9.

- Zamani M.R., Desmond N.L., Levy W.B. (2000) Estradiol modulates long-term synaptic depression in female rat hippocampus. J Neurophysiol. 84: 1800-8.

- Zhao L., Chen S., Ming Wang J., Brinton R.D. (2005) 17β-estradiol iniduces Ca2+ influx, dendritic and nuclear Ca 2+ rise and subsequent cyclic amp response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. Neuroscience 132: 299-311.

- Zhou L., Lehan N., Wehrenberg U., Disteldorf E., von Lossow R., Mares U., Jarry H., Rune G.M. (2007) Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. Exp Neurol. 203(1):72-81.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Rune für die Überlassung des spannenden Themas und insbesondere für die stets unkomplizierte und aufschlussreiche fachliche Unterstützung während der Arbeit bedanken.
Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Lepu Zhou bedanken, der mich in die Arbeit mit den Zellkulturen sowie die Auswertung der elektronenmikroskopischen Bildern einwies und stets erreichbar und ansprechbar bei Problemen und offenen Fragen war.
Ein besonderer Dank gilt Beate Kruck, die mich bei meiner Arbeit im Labor mit ihrer großen Erfahrung unterstützt und mir viel Hilfe und Anleitung bei der Arbeit mit den empfindlichen Zellkulturen gab. Frau Asmus und Frau Schaefer danke ich herzlich für die Einweisung und die große Unterstützung bei der Erstellung und Entwicklung der elektronenmikroskopischen Bildern. Meinen Mitdoktoranden und guten Freunden Florian Bläute und Corinna Bläute (geb. Voets) danke ich für Unterstützung und Gedankenaustausch während und außerhalb der Laborzeit.
Zu ganz besonderem Dank bin ich meiner Familie und meiner Freundin Katharina Staus verpflichtet, die mich mit viel Verständnis, Geduld und guten Ratschlägen während der Erstellung dieser Arbeit begleitet haben.

10. Lebenslauf

Geboren:	05.09.1978 Städ. Klinikum Ludwigshafen/Rhein
Grundschule:	01.08.1985 - 01.08.1989 Kurpfalzschule, Wachenheim a.d. Weinstr.
Gymnasium:	10.08.1989 – 03.07.1998 Werner Heisenberg Gymansium Bad Dürkheim Abschluss: Abitur
Zivildienst:	03.08.1998 -01.08.1999 Rettungswache des Dt. Roten Kreuzes, Kreisverband Bad Dürkheim, Ausbildung zum Rettungssanitäter
Berufsausbildung:	01.10.1999 - 20.07.2000 verkürzte Ausbildung zum Rettungsassistenten, Franz-Anton-Mai-Schule Mannheim
Berufstätig:	01.08.2000 - 01.03.2001 Rettungswache des Dt. Roten Kreuzes, Kreisverband Bad Dürkheim
Studium:	01.04.2001 – 01.11.2007 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum): September 2003 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Examen): Oktober 2007 Endnote: Sehr gut (1,5)
Ärztliche Tätigkeit:	01.12. 2007 bis 31.12. 2008: Assistenzarzt im KH Winsen an der Luhe Abtl. für Innere Medizin Seit 01.01. 2009: Assistenzarzt im Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg III. Med. Klinik; Abtl. für Rheumatologie und Nephrologie

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.