

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin

Institut für Neuroanatomie

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune

Östrogenabhängige Spinesynapsendichte: ein sexueller Dimorphismus

Dissertation

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

vorgelegt von:

Breda Maria Katharina Freiin von Blittersdorff
aus Heidelberg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.11.2011**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Herr Prof. Dr. med. Roland Bender

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: -----

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis	1
1. Abkürzungsverzeichnis	3
2. Einleitung	6
2.1. Der Hippocampus	7
2.2. Die Östrogensynthese	9
2.3. Östrogenwirkungen	10
2.4. Hemmung der Östrogensynthese	11
2.5. Nicht-steroidale Aromataseinhibitoren	12
2.6. Fragestellung	13
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.1.a. Arbeitsmaterialien, Geräte	15
3.1.b. Chemikalien	16
3.1.c. Lösungen	17
3.2. Methoden	20
3.2.a. Tiere	21
3.2.b. Ovariectomie	22
3.2.c. Beschreibung der Versuchsdurchführung	22
3.2.d. Tötung und Gewebebehandlung	23
3.2.e. Elektronenmikroskopie und Datenanalyse	24

4. Ergebnisse	26
4.1. Weibliche Mäuse	26
4.2. Weibliche ovariectomisierte Mäuse	28
4.3. Männliche Mäuse	30
4.4. Zusammenfassung	32
5. Diskussion	35
5.1. Gonadales und hippocampales Östrogen	36
5.2. Einfluss von Steroiden auf die synaptische Plastizität	37
5.3. Einfluss von Steroiden auf Lernen und Gedächtnis	40
6. Zusammenfassung	43
7. Literaturverzeichnis	44
8. Danksagung	52
9. Lebenslauf	53
10. Eidesstattliche Erklärung	54

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aufl.	Auflage
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
17β-HOR	17β-Hydroxysteroidoxidoreduktase
3β-HSD	3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase
bzw.	beziehungsweise
CYP	Cytochrom
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CA 1-4	Cornu ammonis 1-4
DDSA	2-Dodecanylsuccinacid anhydride
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
DHEA	Dehydroepiandrosteron
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potentiale
ER-α	Östrogenrezeptor Alpha
ER-β	Östrogenrezeptor Beta
et al.	Et alii (und andere)

etc.	et cetera (und so weiter)
GA	Glutardialdehyd
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde/n
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNA	Methylnadic anhydride
mRNA	messenger-ribonucleic acid
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nr.	Nummer
OVX	ovarektomiert

PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
®	registered trade mark
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
scc	side chain clearance enzyme
s.o.	siehe oben
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

2. Einleitung

Ein Teil des Großhirns wird vom Archikortex gebildet, dessen Hauptanteil der Hippocampus ausmacht. Diesem kommen viele bedeutende Aufgaben zu. So spielt er unter anderem eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Bewusstseins, beim Aggressions- und Motivationsverhalten, bei der Gedächtnisbildung und bei Lernvorgängen (Trepel 1999).

Seit langer Zeit ist bekannt, dass Steroide Wirkungen auf zerebrale Funktionen haben (Sakuma 1980). Insbesondere die neuroprotektiven Effekte sind in diesem Zusammenhang vielfach untersucht worden (Azcoita et al. 2001, Garcia-Segura et al. 2001). Man schreibt dabei hauptsächlich dem Steroidhormon Östrogen positive Auswirkungen auf verschiedene Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Alzheimer zu (Alvarez-de-la-Rosa et al. 2005). Aber nicht nur bei neurodegenerativen Erkrankungen können Östrogene den Verlauf positiv beeinflussen. Es spielt auch eine große Rolle bei Lernvorgängen (zur Übersicht siehe: Sherwin 2003). Mittlerweile ist der Zusammenhang zwischen Östrogen und synaptischer Plastizität bewiesen (Gould et al. 1990, Woolley und McEwen 1992, McEwen 2002). Östrogen bewirkt eine Zunahme der hippocampalen Spinesynapsendichte und eine Hochregulation synaptischer Proteine (Rune et al. 2002, Kretz et al. 2004, Zhou et al. 2010). Spines sind die postsynaptische Komponente der Synapsen der Dornfortsätze, im Gegensatz zu den Boutons, welche das präsynaptische Pendant darstellen.

Die Gonaden stellen den Hauptproduktionsort für Sexualhormone dar. Der Hippocampus ist ebenfalls zur Östrogenproduktion fähig (Prange-Kiel et al. 2003). Die Frage nach der Relevanz des hippocampalen Östrogens in Bezug auf die Synaptogenese ist bislang nicht hinreichend geklärt. Der Einfluß von gonadalem und hippocampalem Östrogen ist in vielen Studien untersucht worden. Diese beziehen sich entweder auf die Effekte *in vitro* (Rune et al. 2002, Prange-Kiel et al. 2003, Kretz et al. 2004, Fester et al. 2006), oder auf die Effekte *in vivo* (Woolley und McEwen 1993).

Wir beschäftigen uns in dieser Arbeit mit der Frage, ob gonadales und hippocampales Östrogen eine unterschiedliche Rolle in der Aufrechterhaltung der hippocampalen Spinesynapsendichte *in vivo* spielen. Hierzu hemmten wir zum einen das gonadale Östrogen durch Ovariectomie und zum anderen das hippocampale Östrogen zuerst durch Ovariectomie und anschließende Applikation des Aromatasehemmers Letrozol.

2.1. Der Hippocampus

Beim Menschen ist der Hippocampus im Temporallappen an der Medialseite des Unterhorns des Seitenventrikels lokalisiert. Der Hippocampus der Maus befindet sich weiter cranial dicht unter dem Kortex, rechts und links des Balken (Corpus callosum). Makroskopisch zeichnet sich dieser durch die charakteristische eingerollte Struktur aus. Die mikroskopische Struktur ist durch drei Bereiche gekennzeichnet: den Gyrus dentatus, das Subiculum und die dazwischen liegenden 4 Felder CA1 bis CA4 des Ammonshorn (Cornu ammonis).

Die Pyramidenzellneurone, welche der Entsendung efferenter Impulse des Hippocampus dienen, sind die größten Zellen des Hippocampus und bilden das Stratum pyramidale mit den Regionen CA1 bis CA4. Diese wird nach außen vom Stratum oriens, der Korbzellschicht begrenzt. Nach innen schließen sich der Pyramidenzellschicht das Stratum radiatum, das Stratum lacunosum und schließlich das Stratum molekulare an, welche insbesondere der interneuralen Verschaltung dienen.

In der CA1-Region finden sich vorherrschend kleine Pyramidenzellen. An diese schließt sich die CA2-Region mit ihren besonders großen Pyramidenzellen an, die ein dichtes, schmales Band bilden. Diese setzt sich in die CA3-Region fort, deren ebenfalls großen Pyramidenzellen sich in lockerer Anordnung befinden. Das Ammonshorn endet mit der besonders aufgelockerten Region CA4. Umfasst wird dieser Teil vom dichten Zellverband des Gyrus dentatus, welcher aus einem Stratum granulosum mit kleineren, körnerzellartigen Neuronen besteht.

Weitere zelluläre Bestandteile des Hippocampus bilden Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Diese Zellen sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Sie schützt die hippocampalen Neuronen vor toxischen Substanzen und versorgt sie mit wichtigen Substanzen wie z.B. Glucose und Cholesterol. Diese Stoffe können dann zur Energiegewinnung und zum Aufbau von Proteinen wie z.B. Estradiol genutzt werden.

Über das sich der CA1-Region anliegende Subiculum schließt sich dem Hippocampus der entorhinale Kortex des Gyrus parahippocampalis an, über welchen dem Hippocampus Impulse aus dem Riechhirn, dem Corpus amygdaloideum und dem Neokortex zufließen. Weitere Afferenzen erhält der Hippocampus aus dem Thalamus, dem Gyrus cinguli und dem Septum. Auf diese Weise kommen dem Hippocampus visuelle, olfaktorische, auditorische, somatosensible und motorische Informationen zu.

Die efferenten Fasern bilden den Fornix. Über ihn projiziert der Hippocampus in die Corpora mamillaria, diese wiederum über den Fasciculus mamillothalamicus (Synonym: Vicq-d'Azyr-Bündel) in den Nucleus anterior des Thalamus und von dort in den Gyrus cinguli, welcher Fasern zurück an den Hippocampus entsendet. Auf diese Weise entsteht einer der wichtigsten Neuronenkreise des limbischen Systems, der so genannte Papez-Neuronenkreis. Dieser spielt eine entscheidende Rolle beim Überführen von Gedächtnisinhalten vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis (Trepel 1990).

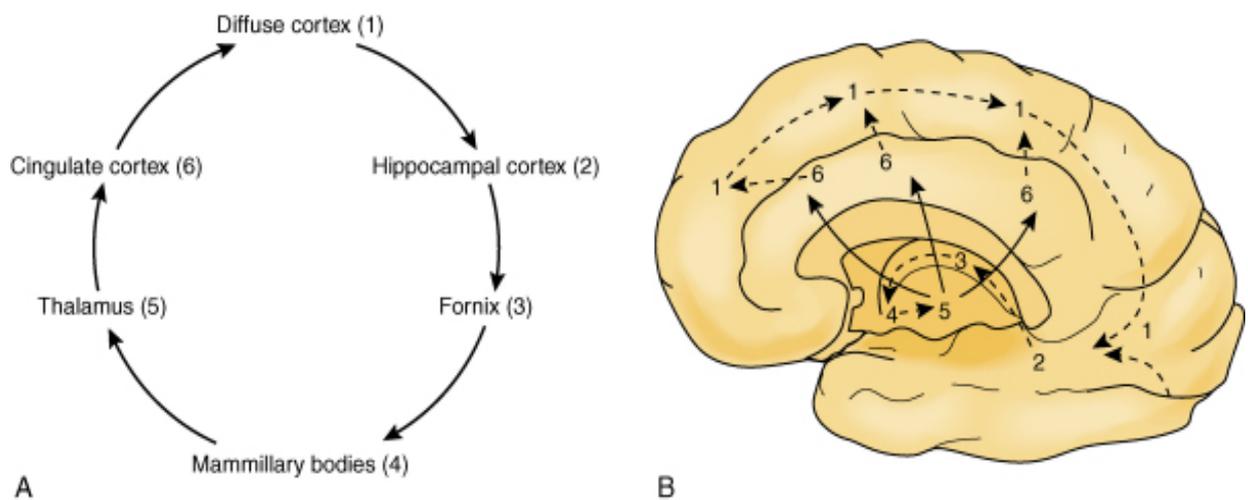


Abb. 1: Papez-Neuronenkreis. Aus Goetz CG, Wilson RS (1994) Neurology for the Non-Neurologist. Philadelphia, Lippincott, S. 184–194.

Der Hippocampus ist an der Entstehung zahlreicher pathologischer Prozesse beteiligt. Eine Schädigung des oben genannten Papez-Neuronenkreises hat beträchtliche Merkfähigkeitsstörungen zur Folge (Spiers et al. 2001). Eine Schädigung beider Hippocampi z.B. im Rahmen von Gehirnentzündungen (Enzephalitis) hat fatale Folgen. Dazu zählt nicht nur der oben erwähnte Verlust der Merkfähigkeit, sondern auch eine örtliche und zeitliche Desorientierung bis hin zu schwersten Bewusstseinsverlusten. In den Neuronen des Hippocampus besteht die Neigung zu plötzlicher elektrischer

Entladung, die zur Entstehung von epileptischen Anfällen führen kann (Trepel 1990, Kurz et al. 2003, Duzel et al. 2004). Der Hippocampus soll ebenfalls an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sein. Harrison et al. (2003) fanden heraus, dass eine Unterfunktion der glutamatergen hippocampalen Neuronen eine Rolle bei der Entstehung von schizophrenen Krankheitsbildern spielt (Trepel 1990).

2.2. Die Östrogensynthese

Steroide werden hauptsächlich in den Gonaden produziert. Das Vorhandensein aller für die Steroidbiosynthese benötigten Enzyme konnte jedoch auch in den Neuronen des Hippocampus nachgewiesen werden (Furukawa et al. 1998, Wehrenberg et al. 2001, Stoffel-Wagner, 2001). Prange-Kiel et al. gelang es 2003 erstmals nachzuweisen, dass hippocampale Neurone fähig sind Estradiol *de novo* zu synthetisieren (Prange-Kiel et al. 2003; Hojo et al. 2004).

Als Ausgangssubstanz aller Steroide dient Cholesterol. Folglich muss zunächst Cholesterol in die Zelle geschleust und zur inneren Mitochondrienmembran transportiert werden. Dieser Transport geschieht durch das Trägerprotein StAR (Stereogenic Acute Regulatory Protein) (Sugawara et al. 1996). Dies ist auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der so genannte *rate limiting step* der Östrogensynthese. An der inneren Mitochondrienmembran befindet sich das Cytochrom P450scc (*side chain cleavage enzyme*, CytP450scc), das erste Enzym aus der Familie der Cytochrom P450 Mischoxygenasen. CytP450scc verstoffwechselt Cholesterol zu Pregnenolon. Die nächsten Syntheseschritte laufen im endoplasmatischen Retikulum ab. Hier wird das Pregnenolon mit Hilfe des Enzyms Cytochrom P450c17 (17 α -Hydrolase/c17,20-Lyase) irreversibel in 17-Hydroxy-Pregnenolon und anschließend in Dehydroepiandrosteron (DHEA) überführt. Die Enzyme der beiden nächsten Syntheseschritte gehören nicht zur Gruppe der Cytochrom P450 Enzyme. DHEA wird reversibel mit Hilfe des Enzyms 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase (17 β -HOR) in Androstendion umgewandelt. Der nächste Schritt wird durch das Enzym 3 β -Hydrosteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) katalysiert, welches Androstendion durch Reduktion der 17-Ketogruppe in Testosteron überführt. Das Enzym Cytochrom P450 aro (CYP19A1, Aromatase) wandelt schließlich

im entscheidenden letzten Schritt der Östrogensynthese das Testosteron in 17 β -Estradiol um (E2). Dies geschieht durch Abspaltung der C19-Methylgruppe und durch Aromatisierung des Ringes A (vgl. Bütow 2007).

2.3. Östrogenwirkungen

Die klassische Wirkung von Estradiol wird über intrazelluläre Rezeptoren vermittelt. Östrogenrezeptoren (ERs), die zur Familie der Steroidrezeptoren gehören, binden an die DNA im Zellkern und beeinflussen die Genexpression. Durch Bindung seines Liganden Östrogen wird eine Konformationsänderung des zytosolischen Rezeptors bewirkt, welcher nun in den Zellkern transloziert. Hier wirkt er als Transkriptionsfaktor, in dem er mit den Promotern der spezifischen Zielgene interagiert und deren Transkriptionsrate reguliert (Klinge 2001, Thiemann et al. 2007). Es sind zwei Östrogenrezeptorsubtypen bekannt: Östrogenrezeptor- α (ER- α) und Östrogenrezeptor- β (ER- β). Sie besitzen eine hohe Homologie im Aufbau und sind beide im Hippocampus nachgewiesen worden (Shunghrue und Merchenthaler 2001, Rune et al. 2002, Prange-Kiel et al. 2003).

Für die beiden Rezeptortypen scheinen unterschiedliche Regulationsmechanismen zu existieren. So konnte nach Stimulation mit Östrogen in hippocampalen Gewebekulturen ein Anstieg von ER- α , nicht aber von ER- β festgestellt werden (Rune et al. 2002). In hippocampalen Dispersionskulturen beobachtete man sogar nach Östrogenstimulation einen Anstieg des ER- α und einen Abfall des ER- β (Prange-Kiel et al. 2003).

Östrogen wirkt vor allem auf die Neurone der CA3-Region (Rune et al. 2002). In diesen Untersuchungen fand man in CA3 eine höhere Expression des ER- α und auch des ER- β gegenüber der CA1-Region. Gemeinsam mit den Ergebnissen von Prange-Kiel et al. (2003) lässt sich folgern, dass durch Östrogen am stärksten der Östrogenrezeptorsubtyp ER- α in CA3 beeinflusst wird. Eine Erhöhung der Spinesynapsendichte nach Östrogenapplikation konnte jedoch ausschließlich in CA1 festgestellt werden. Auch die Zunahme von Synaptophysin, einem Protein der Vesikelmembran, das als präsynaptischer Marker gilt, wurde nach Östrogenbehandlung vor allem in CA1 beobachtet. 2006 wiesen Prange-Kiel et al. in

der CA3-Region eine deutlich höhere Expression von StAR und Aromatase als in CA1-Region nach.

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Spine-induzierende Wirkung des Östrogens nicht nur auf direktem Weg geschieht.

Die Pyramidenzellen der CA3-Region projizieren über so genannten Schaffer-Kollateralen in die CA1-Region. Durch die Resultate von Prange-Kiel et al. (2003, 2006) und Rune et al. (2002) kann man somit annehmen, dass über eine Stimulation in der CA3-Region die Bildung von Spinesynapsen in der CA1-Region über die Schaffer-Kollateralen angeregt wird.

Die Wirkungen über diese Östrogenrezeptoren besitzen eine lange Latenzzeit von mehreren Stunden bis Tagen (Beyer 1999, Behl und Manthey 2000).

Außer über diesen klassischen Weg kann Östrogen auch über andere Mechanismen wirken. Über membranständige Östrogenrezeptoren und hierüber die Aktivierung schneller Signaltransduktionswege z.B. Aktivierung der MAP-Kinase (mitogen aktiviertes Protein), Produktion von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) oder G-Protein-gekoppelte Kalziummobilisation (Carrer et al. 2003, Revankar et al. 2005) vermittelt es seine Wirkung in Sekunden bis Minuten (Beyer 1999).

Für diese schnellen Wirkungen seien als Beispiel die protektiven Eigenschaften des Östrogens genannt, über die sich eine Zelle gegen die durch β -Amyloid verursachte Apoptose (Zelltod) schützen kann (Green et al. 1997, Pike 1999, Behl und Manthey 2000). Außerdem ist Östrogen an der Modulation von Nerven und Gefäßzellen beteiligt (Kelly und Levin 2001).

2.4. Hemmung der Östrogensynthese

Die Östrogensynthese kann auf verschiedene Weisen gehemmt werden. Zum Beispiel hemmen Statine (Medikamente zur Behandlung einer Hypercholesterinämie) das Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese, die HMG-CoA-Reduktase, wodurch die Konzentration des Cholesterols abnimmt, das die Ausgangssubstanz aller Steroide darstellt (Fester et al. 2009).

Ebenfalls sind Inhibitoren der Steroidsynthese untersucht worden. Trilostan, ein Inhibitor der 3 β -Hydrosteroid-Dehydrogenase, also der Testosteronsynthese, wirkt sich hemmend auf das Wachstum von Tumoren aus (Puddefoot et al. 2002).

Von hoher klinischer Relevanz sind auch die Antiöstrogene. Zu dieser Gruppe gehören die Östrogenrezeptormodulatoren (z.B. Tamoxifen) und die Aromataseinhibitoren (z.B. Letrozol, Anastrozol). Sie finden ihren Einsatz in der Therapie des ER-positiven Mammakarzinoms, da Östrogen als Wachstumsfaktor die Proliferation des Tumors fördert (Santen 2009). Durch ihren Einsatz kann eine Reduktion der Tumormasse erreicht werden. Sie werden ausschließlich nach der Menopause eingesetzt, da sie bei prämenopausalen Frauen zu erheblichen Störungen der Fruchtbarkeit führen können.

2.5. Nicht-steroidale Aromataseinhibitoren

Nicht-steroidale Aromataseinhibitoren binden mit einer hemmenden Untereinheit kompetitiv an das Enzym Cytochrom P450aro (Aromatase), wodurch die katalytische Reaktion der Aromatase und damit die Umwandlung von Testosteron in 17 β -Estradiol (E2) behindert wird (Bhatnagar et al 2001).

Aromatasehemmer werden seit vielen Jahren in der Therapie des Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms eingesetzt. In der Mehrzahl aller Mammakarzinome findet sich eine Erhöhung der Aromataseaktivität (Santen 2009). Durch Einsatz von Aromataseinhibitoren z.B. durch Letrozol (Femara®), Anastrozol (Arimidex®) oder Aminoglutethimid (Orimeten®) kann eine Hemmung der Proliferation des Tumors erreicht und somit die Prognose der Erkrankung verbessert werden. Aromatasehemmer sind in zahlreichen klinischen Studien untersucht worden (Lønning et al. 2003, Thiantanawat et al. 2003).

Es hat sich gezeigt, dass Letrozol der potenteste Inhibitor der Aromatase ist. Seine Bindung ist reversibel und durch Östrogene vollständig wieder aufhebbar, d.h. nach Absetzen erfolgt die Umwandlung von Testosteron zu Estradiol wie zuvor. Die Östrogenrezeptorfunktion wird demnach nicht beeinträchtigt (Puddefoot et al. 2002, Prange-Kiel et al. 2003). Letrozol ist in der Lage die Menge an zirkulierendem Östrogen zu verringern (Foidart et al. 1995, Geisler et al. 2002) und die

Aromataseaktivität auf 10% zu reduzieren (Höffken 1999). Es hat eine 10.000-fach stärkere Wirkung als Aminoglutethimid (Orimeten®) und eine 10-fach stärkere Wirkung als Anastrozol (Arimidex®) (Smith 1999, vgl. von Schassen 2006).

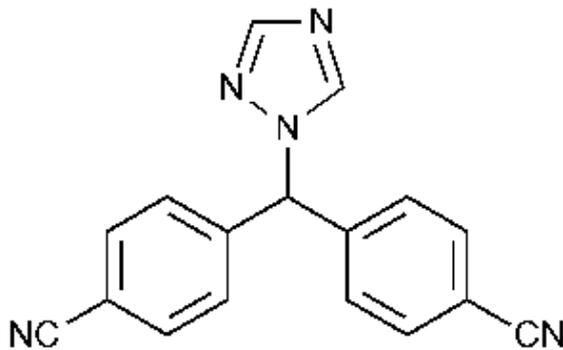


Abb.2: Strukturformel Letrozol

2.6. Fragestellung:

Letrozol ist ein klinisch etabliertes Medikament. Trotz des häufigen Einsatzes gibt es wenige Untersuchungen auf mögliche Konsequenzen einer Therapie im Bezug auf zerebrale Funktionen.

Da Aromataseinhibitoren Blut-Hirn-Schrankengängig sind und bislang keine Daten über mögliche Auswirkungen auf das Gehirn vorliegen, sind die Ergebnisse unseres Versuches unter klinischen Gesichtspunkten von hoher Relevanz.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Synaptogenese *in vitro* und *in vivo* fördert. Des Weiteren wurde der Effekt des Aromataseinhibitors Letrozol auf die Synaptogenese vielfach untersucht und eine Reduktion der Spinesynapsendichte und synaptischer Proteine gefunden.

In der vorliegenden Arbeit soll nun geklärt werden, ob eine Hemmung der Östrogensynthese durch Applikation von Letrozol *in vivo* eine Änderung der Spinesynapsendichte in der CA1-Region des Hippocampus nach sich zieht.

Um mögliche unterschiedliche Auswirkung von gonadalem und hippocampalem Östrogen auf die Dichte der Spinesynapsen voneinander abgrenzen zu können, wurde der Tierversuch sowohl mit weiblichen, als auch mit weiblichen ovariectomierten Tieren durchgeführt.

Da sich bisherige Untersuchungen bislang nur auf weibliche Tiere konzentrierten und bislang keine Daten über mögliche Auswirkungen der Hemmung der Östrogensynthese bei männlichen Tieren vorliegen, nahmen wir auch männliche Tiere in unseren Versuch auf.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.a. Arbeitsmaterialien, Geräte

Aluminiumfolie	LAGER UKE
Autoclip	BECTOR DICKINSON
Aesculap Rasierer	BRA
Chirurgisches Besteck	F.S.T. (Fine Science Tools)
Cutfix Surgical Disposable Scalpel	BRAUN
Deckgläser 21x26mm	MARIENFELD
Durst Laborator 1200	DURST
Einmalspritzen 1ml	BRAUN
Einmalkanülen	BRAUN
Elektronenmikroskop MC 100	PHILIPS
Eukobrom SW Papierentwickler	TETENAL
Fixierbad Superfix	TETENAL
Fixierbad-Prüfer	MERCK
Foliodrape	HARTMANN
Handschuhe, Größe S	HARTMANN
Heidemannspachtel	AESULAP
Kosmetiktücher Samtess	WEPA
Kühlschrank, 4°C	BOSCH
Laborabzug	WESTERMANN
Lampe	HANAULUX

Lichtmikroskop Axiovert 25	ZEISS
Negativentwickler KODAK D19	KODAK
Perfusionspumpe Masterflex®	COLE PARMER
Photopapier Nr.3, 24x30cm	TETENAL
Pipetten 2, 20,100, und 1000 µl	EPPENDORF AG
Pipettenspitzen	EPPENDORF AG
Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
Ultramikrotom	REICHERT JUNG
Vicryl 3-0, resorbierbar	ETHICON
Zellstofftücher	WEPA

3.1.b. Chemikalien

2-Dodecanylsuccinic acid anhydride (DDSA)	SERVA
2,4,4-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	SERVA
Aqua dest.	BAXTER
Bepanthen®	BAYER
Bleicitrat nach Reynolds	MERCK
Carprofen (Rimadyl®)	PFIZER
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK
di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat	MERCK
Ethanol 35%, 50%, 70%, 96%, 100%	MERCK

Fixierbad Superfix	TETENAL
Fixierbad-Prüfer	MERCK
Glutardialdehyd 6%, 40%	MERCK
Glycidether 100	SERVA
Kaliumchlorid	MERCK
Kaliumhydrogenphosphat	MERCK
Ketamin (Ketanest®)	GRÄUB
Letrozol (Femara®)	NOVARTIS
Methylnadic anhydride (MNA)	SERVA
Natriumchlorid 0,9%	MERCK
Natrium-dihydrogen-phosphat Monohydrat	MERCK
Osmiuntetroxid	ROTH
Paraformaldehyd reinst., 4005	MERCK
Propylenoxid	SERVA
Saccharose	MERCK
Uranylacetat 0,1%	MERCK
Xylocain 2% (Rompun®)	BAYER

3.1.c. Lösungen

Carprofenlösung ansetzen, 8 ml:

- 0,1 ml Rimadyl® 50mg/ml
- 7,9 ml NaCl-0,9%

Glycidether- Mischung:

Stammlösung A:

- 77 ml Glycidether 100
- 125 ml 2-Dodecanylsuccinic acid anhydride (DDSA)

Stammlösung B:

- 100 ml Glycidether 100
- 89 ml Methyladipic anhydride (MNA)

Gebrauchslösung:

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

Letrozol ansetzen, ca. 90 ml:

- Löslichkeit in Ethylalkohol: 6,25 mg/ml
- 10 mg Letrozol auf 48 ml Ethylalkohol
- Verdünnung mit 43,2 ml 0,9% NaCl (entspricht 1:9 Verhältnis)

Kontrolllösung ansetzen, ca. 90 ml:

- 48 ml Ethylalkohol
- Verdünnung mit 43,2 ml 0,9% NaCl (entspricht 1:9 Verhältnis)

0,2 M Natriumphosphatpuffer, 1 Liter:

- 5,52 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat

- 42,88 g di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat
- in 1000 ml Aqua dest. lösen

0,2 M Natriumphosphatpuffer mit Saccharose, 100ml:

- 100 ml 0,2 M Natriumphosphatpuffer
- 6,846 g Saccharose

Narkose ansetzen, 2 ml:

- 500 µl Ketamin® (25 mg/ml)
- 125 µl Rompun® (2,5 mg/ml)
- auffüllen mit 1375µl 0,9% NaCl auf 2ml

2% Osmiumtetroxid, 50 ml:

- 1 g Osmiumtetroxid
- in 50 ml Aqua dest. lösen

PBS 1 Liter:

- 8g NaCl
- 0,2g KCl
- 1,44 g di-Natriumhydrogenphosphat
- 0,2g Kaliumhydrogenphosphat
- 1 Liter Aqua dest.
- ph=7,4 bei R

0,1M Phosphatpuffer (PB), ca. 100 ml:

- 10 ml 0,5 M NaH₂PO₄
- 10 ml 0,5 M Na₂HPO₄
- 70 ml Aqua dest.
- pH =7,4 bei RT

PFA (Paraformaldehyd) 4%ig, 150 ml:

- 4g Paraformaldehyd
- 50 ml H₂O, 15 min. auf 60-65 °C erhitzen
- 1 Tropfen 10M NaOH
- auf Eis abkühlen
- 2 x 50ml PBS zugeben
- pH 7,4 bei RT

3.2. Methoden

Da es sich um einen Tierversuch handelt, wurde das Versuchsvorhaben im Vorfeld einer Ethik-Kommission vorgetragen, von dieser geprüft und bewilligt.

3.2.a. Tiere

Der Versuch wurde zwei Mal durchgeführt. Es wurden pro Versuch 18 Mäuse des Zuchtstamms C57BL/6N verwendet (insgesamt 36 Tiere), 6 männliche, 6 weibliche und 6 ovariectomierte weibliche (s.u.) (Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg (UKE)). Bei Versuchsbeginn waren die Tiere 7 Wochen alt. Um die

Haltungsbedingungen zu optimieren und Rankkämpfe weitgehend zu vermeiden wurden immer drei Tiere gleichen Geschlechts mit freiem Zugang zu Futter und Wasser mit einem je 12 Stunden Licht- und je 12 Stunden Dunkelheitszyklus in einer Box untergebracht. Das Experiment wurde gemäß den geltenden gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt.

Es wurden 6 Gruppen gebildet:

Gruppe ♂-L: 3 männliche Tiere, tägliche Letrozol Applikation

Gruppe ♀-L: 3 weibliche Tiere, tägliche Letrozol Applikation

Gruppe ♀-ovx-L: 3 weibliche ovariectomierte Tiere, tägliche Letrozol Applikation

Gruppe ♂-K: 3 männliche Tiere, tägliche Applikation der Kontroll-Lösung

Gruppe ♀-K: 3 weibliche Tiere, tägliche Applikation der Kontroll-Lösung

Gruppe ♀-ovx-K: 3 weibliche ovariectomierte Tiere, tägliche Applikation der Kontroll-Lösung

	Gruppe L (Letrozolgruppe)	Gruppe K (Kontrollgruppe)
♂	3	3
♀	3	3
♀-ovx	3	3

3.2.b. Ovariectomie

Nach einer Adaptationszeit von einer Woche wurden 6 weibliche Tiere im Alter von 8 Wochen in tiefer Narkose ovariectomiert. Für die Anästhesie verwendeten wir ein

Gemisch aus Ketanest-S® (S-Ketamin) und Rompun® (Xylazine), das pro ml aus 25 mg Ketanest® und 2,5 mg Rompun® bestand. Bei einem Gewicht von ca. 25 Gramm verabreichten wir pro Tier 2 ml Lösung intraperitoneal, dies entspricht pro Tier 50 mg Ketanest® und 5 mg Rompun®. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen®-Creme benetzt. Nachdem wir die Schmerzreflexe der narkotisierten Tiere überprüft hatten, wurde zunächst mit Hilfe eines elektrischen Rasierers eine ca. 2cm x 2cm messende Fläche rechts und links oberhalb der Hinterläufe im Abdomenbereich vom Fell befreit. Anschließend wurde die Haut mit einem Einmalskalpell ca. 1,5 cm inzidiert. Danach eröffneten wir die Faszie und den darunter liegenden Muskel in Längsrichtung. Nun suchten wir die Tube auf, banden die zu- und abführenden Gefäße mit resorbierbarem Faden ab und entfernten die Ovarien. Anschließend wurden Muskel und Muskelfaszie wieder vernäht und die Haut zugeklammert. Die Tiere erhielten zur Linderung der Schmerzen postoperativ 0,125 mg Rimadyl® (Carprofen) subkutan. Dies entspricht einer Dosis von 5mg/kg/KG. Um postoperative Auskühlung zu verhindern wurden Sie bis zum Abklingen der Narkose mit Rotlicht bestrahlt. Nach Erwachen aus der Narkose wurden sie für 2h nachbeobachtet.

3.2.c. Beschreibung der Versuchsdurchführung

1 Woche nach der Operation wurde mit der Behandlung begonnen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Mäuse 8 Wochen alt. Vor der ersten Injektion entfernten wir die Klammern der ovariectomierten Tiere. Beide Gruppen erhielten 21 Tage lang täglich zur gleichen Uhrzeit eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml Lösung. Die Tiere wurden am Schwanz aus der Box gehoben und im Nackenbereich fixiert. Es erfolgte die Injektion im linken unteren Quadranten des Abdomens. Nach der Injektion wurde das Tier in eine andere Box gesetzt, um Verwechslungen und Doppelinjektionen zu vermeiden. Nachdem alle 3 Tiere einer Box die Injektion erhalten hatten, wurden sie in ihre ursprüngliche Box zurückgesetzt.

Gruppe L erhielt das Letrozol-Gemisch. Dies entspricht einer Dosis von 5mg/kg/KG (0,125mg/Tier/Tag). Mit der Dosierung richteten wir uns nach den Angaben des Herstellers, der die Pharmakodynamik von oral verabreichtem Letrozol bei

4-10 mg/kg/KG getestet hat und keine toxischen Erscheinungen beschrieben hat. Die Kontrollgruppe K erhielt die gleiche Menge an Kontrolllösung.

3.2.d. Tötung und Gewebebehandlung

Am 21. Behandlungstag wurden die Tiere im Alter von 11 Wochen geopfert. 4-6 h nach der letzten Injektion wurden sie zunächst in tiefe Narkose versetzt (s.o.). Anschließend erfolgte eine transkardiale Perfusion, zuerst mit PBS, anschließend mit 4% PFA + 2,5% GA in 0,1 M PB. Unmittelbar im Anschluss wurde das Schädeldach mit einer feinen Schere eröffnet, Knochenreste mit einer Pinzette entfernt und das Gehirn mit Hilfe eines Heidemannspatels aus dem Schädel entnommen. Das Gehirn wurde auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt, das Kleinhirn mit einem Skalpell abgetrennt und beide Gehirnhälften durch einen median-sagittalen Schnitt voneinander getrennt. Danach wurden die Hippocampi aus beiden Hirnhälften mit einem Heidemannspatel vorsichtig herauspräpariert und sofort in ein Röhrchen mit 10 ml 2,5% GA in 0,1 M PB gegeben und für 48 h bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Hippocampi für weitere 15 h in 0,1 M PB bei 4°C gebettet, alle 3 h erfolgte ein Wechsel des Phosphatpuffers. Insgesamt wurde dieser drei Mal gewechselt. Nach Beendigung der Lagerung wurden die Hippocampi quer halbiert, mit dem Mikroskop die CA1 Region des Stratum radiatum aufgesucht und aus dem mittleren Drittel 1mm x 1mm x 1mm große Gewebestücke zugeschnitten. Diese wurden nach folgendem Schema in Kunstharz eingebettet:

Fixierung in 2,5%igem Glutardialdehyd in 0,05M Natriumphosphatpuffer für 20 min

1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit Saccharose für 2 h

35% Ethanol unvergällt für 15 min

50% Ethanol unvergällt für 15 min

70 % Ethanol unvergällt für 15 min

96% Ethanol unvergällt für 15 min

100% Ethanol unvergällt	für 15 min
Propylenoxid	für 15 min
Propylenoxid	für 15 min
Propylenoxid/ Glycidether-Gebrauchslösung (1:1)	für 60 min
Propylenoxid/ Glycidether-Gebrauchslösung (1:3)	für 10 h

Glycidether-Gebrauchslösung mit 2% Accelerator bei 60°C polymerisieren lassen.

Die ausgehärteten Gewebeblöcke wurden auf einen Aluminiumträger geklebt und anschließend im Ultramikrotom Ultradünnschnitte von ca. 0,08 µm bis 0,1 µm angefertigt. Diese kontrastierten wir erst für 30 min. mit Uranylacetat 0,1% und für weitere 5 min. mit Bleicitrat nach Reynolds.

3.2.e. Elektronenmikroskopie und Datenanalyse

Die fertig behandelten Ultradünnschnitte wurden auf runde Schlitzträger (grids) mit einem Durchmesser von 3mm und Gitterabständen von 200 mesh gelegt. Wie bereits erwähnt enthielten die Schnitte das mittlere Drittel der CA1-Region des Stratum radiatum.

Mit einer Vergrößerung um den Faktor 6600 wurden nun mit dem Elektronenmikroskop Negativbilder dieser Region geschossen, der Untersucher wurde hierfür verblindet. Es wurden markante Strukturen auf den Schnitten aufgesucht und Bilder derselben Ausschnitte von jeweils zwei direkt aufeinander folgenden Schnitten angefertigt. Pro Tier fertigten wir so 10 vergleichende Bildpaare an (20 Schnitte).

Anschließend entwickelten wir die Negative mit einer Vergrößerung um den Faktor 3 auf Photopapier des Formats 24cm x 30cm. Da 4cm auf dem Papier einer Strecke von 2µm entsprechen, wurde so ein Ausschnitt des Stratum radiatum der CA-1 Region von 2880µm² abgebildet.

Die Anzahl der Spinesynapsen wurde anhand unseres Standardprotokolls ermittelt (Leranth et al., 2000). Der Untersucher wurde hierfür wiederum verblindet. Mit Hilfe einer Referenzfläche von 16cm x 16cm wurden nur in diesem Bereich die Anzahl der Spinesynapsen der Pyramidenzellendendriten gezählt und zwar immer im linken oberen Teil des Bildes. Dies entspricht einer tatsächlichen Fläche von $8\mu\text{m} \times 8\mu\text{m} \times 0,1 \mu\text{m}$, also $6,4\mu\text{m}^3$. Auf dem fortlaufenden Bild wurde exakt dieselbe Fläche untersucht.

Als Spinesynapse wurden nur Strukturen identifiziert, die sowohl einen erkennbaren synaptischen Spalt, als auch präsynaptische Vesikel im Axonende, als auch eine postsynaptische Verdichtung aufwiesen. Als Spinesynapsen wurden nur solche gewertet, die auf dem ersten Bild eines zugehörigen Bildpaares zu sehen waren, nicht aber auf dem zweiten Bild (Braendgaard und Gundersen 1986). Aus diesen Ergebnissen wurden Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen (SEM) ermittelt und diese auf Signifikanz geprüft. Das Konfidenzintervall beträgt $p < 0,05$.

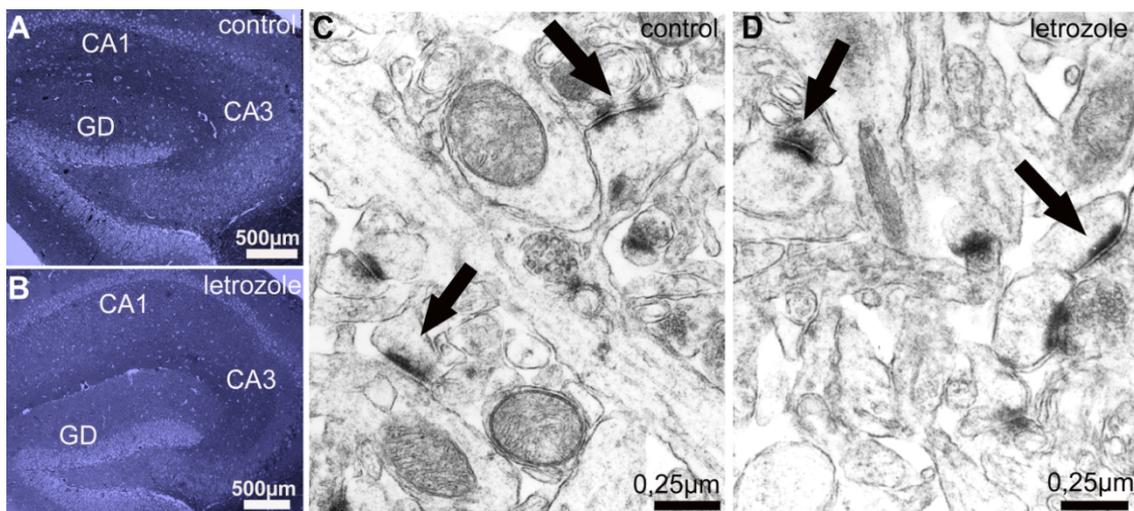


Abb. 3. A, B: Semidünnschnitt des Hippocampus von adulten Mäusen, die mit Kontroll-Lösung (A) und Letrozol (B) behandelt wurden. Quelle: Institut für Neuroanatomie, UKE, Hamburg.

Abb. 3. C, D: EM-Aufnahme hippocampaler Spinesynapsen aus der CA1- Region nach Behandlung mit Kontroll-Lösung (C) und Letrozol (D). Quelle: Institut für Neuroanatomie, UKE, Hamburg.

4. Ergebnisse: Quantitative Bestimmung der Spinesynapsendichte mittels Elektronenmikroskopie

4.1. Weibliche Mäuse

Abbildung 5 zeigt die quantitative Bestimmung der Spinesynapsendichte der sechs weiblichen Versuchstiere des ersten Versuchs. Es sind diejenigen die mit Letrozol behandelt wurden (Gruppe ♀-L.1) denen die mit der Kontrolllösung behandelt wurden (Gruppe ♀-K.1) im Vergleich gegenübergestellt.

Abbildung 6 zeigt die quantitative Bestimmung der Spinesynapsendichte der sechs weiblichen Versuchstiere des zweiten Versuchs. Es sind diejenigen die mit Letrozol behandelt wurden (Gruppe ♀-L.2) denen die mit der Kontrolllösung behandelt wurden (Gruppe ♀-K.2) wieder im Vergleich gegenübergestellt.

Die Bestimmung der Spinesynapsendichte wurde wie im Versuchsprotokoll dargelegt durchgeführt (siehe hierzu 3.2.e.).

In der Auswertung ist jeweils der Mittelwert der Spinesynapsendichte aus 20 Ausschnitten (10 vergleichende Bildpaare) der CA1 Region des Stratum radiatum des Hippocampus der drei Tiere dargestellt. Auf der X-Achse ist die Behandlungsform und Gruppenzugehörigkeit dargestellt, auf der Y-Achse der errechnete Mittelwert der Spinesynapsendichte auf $6,4 \mu\text{m}^3$.

Die Mittelwerte der mit Letrozol behandelten Gruppen ♀-L.1 (MW= 4,46) und ♀-L.2 (MW=4,53) sind im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erniedrigt (MW von ♀-K.1= 6,3 und MW von ♀-K.2=6,17).

Versuch 1 $p=0,00013$ und Versuch 2 $p=0,00076$. Das heißt, es besteht ein höchst signifikanter Unterschied in der Dichte der Spinesynapsen der beiden Gruppen.

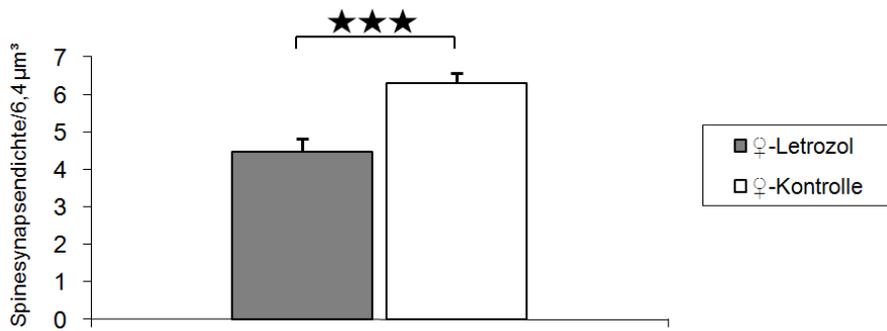


Abb. 5: Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aus Versuch 1 aus jeweils 20 Ausschnitten der CA1 Region des Stratum radiatum der Hippocampi der Gruppen ♀-L.1 (n=3) und ♀-K.1 (n=3) mittels Elektronenmikroskopie. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★★★ p<0,001 (höchst signifikant), ★★ p<0,01 (hoch signifikant), ★ p<0,05 (signifikant).

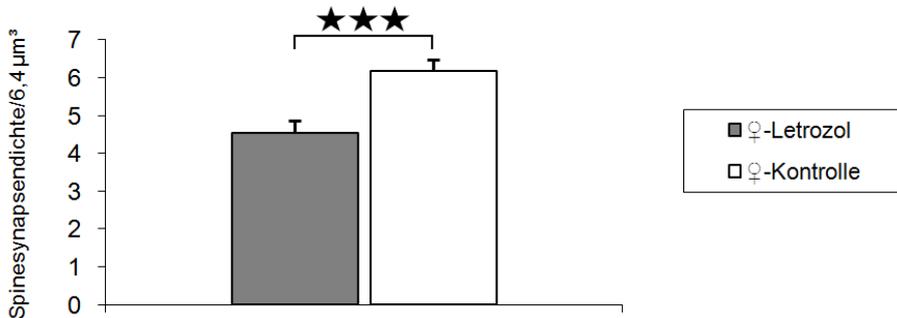


Abb. 6: Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aus Versuch 2 aus jeweils 20 Ausschnitten der CA1 Region des Stratum radiatum der Hippocampi der Gruppen ♀-L.2 (n=3) und ♀-K.2 (n=3) mittels Elektronenmikroskopie. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★★★ p<0,001 (höchst signifikant), ★★ p<0,01 (hoch signifikant), ★ p<0,05 (signifikant).

4.2. Weibliche ovariectomierte Mäuse

Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen die quantitative Bestimmung der Spinesynapsendichte der sechs weiblichen, ovariectomierten Versuchstiere des ersten und des zweiten Versuchs.

In Abbildung 7 sind diejenigen Tiere des ersten Versuchs die mit Letrozol behandelt wurden (Gruppe ♀-ovx-L.1) denen die mit der Kontrolllösung behandelt wurden (Gruppe ♀-ovx-K.1) im Vergleich gegenübergestellt.

In Abbildung 8 sind diejenigen Tiere des zweiten Versuchs die mit Letrozol behandelt wurden (Gruppe ♀-ovx-L.2) denen die mit der Kontrolllösung behandelt wurden (Gruppe ♀-ovx-K.2) im Vergleich gegenübergestellt.

Die Bestimmung der Spinesynapsendichte wurde wie im Versuchsprotokoll dargelegt durchgeführt (siehe 3.2.e.).

Die Mittelwerte der mit Letrozol behandelten Gruppen ♀-ovx-L.1 (MW=3,03) und ♀-ovx-L.2 (MW=2,43) sind im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erniedrigt (MW von ♀-ovx-K.1=4,1 und MW von ♀-ovx-K.2=3,45).

Versuch 1 $p=0,012$ und Versuch 2 $p=0,034$, das bedeutet, es besteht ein signifikanter Unterschied.

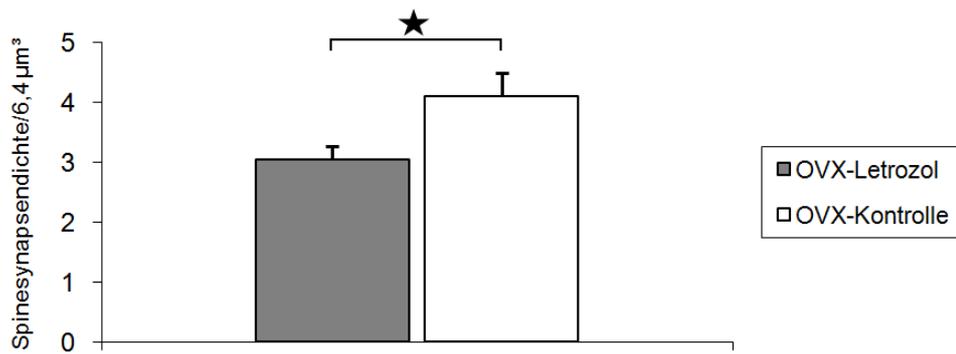


Abb. 7: Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aus Versuch 1 aus jeweils 20 Ausschnitten der CA1 Region des Stratum radiatum der Hippocampi der Gruppen ♀-ovx-L.1 (n=3) und ♀-ovx-K.1 (n=3) mittels Elektronenmikroskopie. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★★★ p<0,001 (höchst signifikant), ★★ p<0,01 (hoch signifikant), ★ p<0,05 (signifikant).

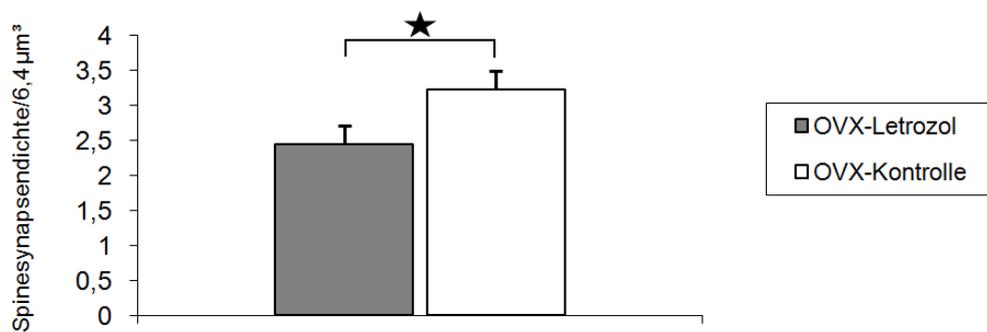


Abb. 8: Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aus Versuch 2 aus jeweils 20 Ausschnitten der CA1 Region des Stratum radiatum der Hippocampi der Gruppen ♀-L.2 (n=3) und ♀-K.2 (n=3) mittels Elektronenmikroskopie. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★★★ p<0,001 (höchst signifikant), ★★ p<0,01 (hoch signifikant), ★ p<0,05 (signifikant).

4.3. Männliche Mäuse

Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen die quantitative Bestimmung der Spinesynapsendichte der sechs männlichen Versuchstiere des ersten und des zweiten Versuchs.

In Abbildung 9 sind diejenigen Tiere des ersten Versuchs die mit Letrozol behandelt wurden (Gruppe ♂-L.1) denen die mit der Kontrolllösung behandelt wurden (Gruppe ♂-K.1) im Vergleich gegenübergestellt.

In Abbildung 10 sind diejenigen Tiere des zweiten Versuchs die mit Letrozol behandelt wurden (Gruppe ♂-L.2) denen die mit der Kontrolllösung behandelt wurden (Gruppe ♂-K.2) im Vergleich gegenübergestellt.

Die Bestimmung der Spinesynapsendichte wurde wie im Versuchsprotokoll dargelegt, durchgeführt (siehe 3.2.e.).

Der Mittelwert (MW) der Spinesynapsendichte der Gruppen, die mit Letrozol behandelt wurden (MW von ♂-L.1=4,8 und MW von ♂-L.2=4,2) ist nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (MW ♂-K.1=3,9 und MW ♂-K.2=3,46).

Versuch 1 $p=0,151$ und Versuch 2 $p=0,099$.

Addiert man jedoch die Anzahl der Versuchstiere des ersten und zweiten Versuchs (ngesamt=6), so ist der Unterschied in der Spinesynapsendichte signifikant (s. 4.4 Versuch 1+2).

Das bedeutet, dass männliche Mäuse, denen Letrozol appliziert wurde, eine signifikant höhere Spinesynapsendichte aufweisen als die zugehörige Kontrollgruppe.

Zur Erläuterung s. S. 39-41.

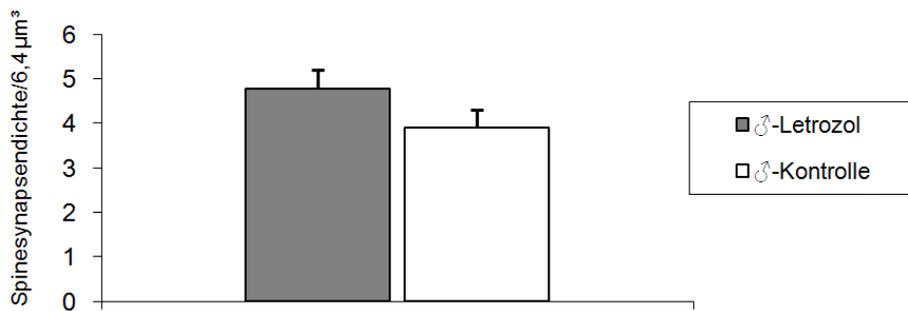


Abb. 9: Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aus Versuch 1 aus jeweils 20 Ausschnitten der CA1 Region des Stratum radiatum der Hippocampi der Gruppen ♂-L.1(n=3) und ♂-K.1 (n=3).

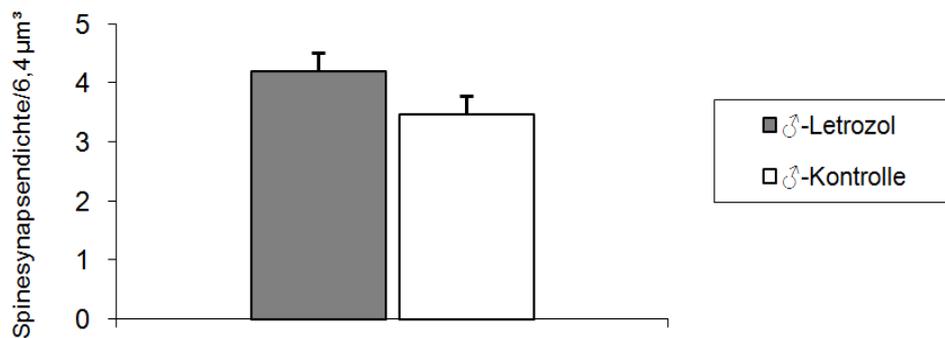


Abb. 10: Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aus jeweils 20 Ausschnitten der CA1 Region des Stratum radiatum der Hippocampi der Gruppen ♂-L.2 (n=3) und ♂-K.2 (n=3) mittels Elektronenmikroskopie.

4.4. Zusammenfassung

Abbildung 11, 12 und 13 dienen der besseren Übersicht der bereits in 4.1 bis 4.3 beschriebenen Ergebnisse. Abbildung 13 zeigt die Gesamtanzahl der Tiere (n=6) aller Versuchsgruppen.

Versuch 1:

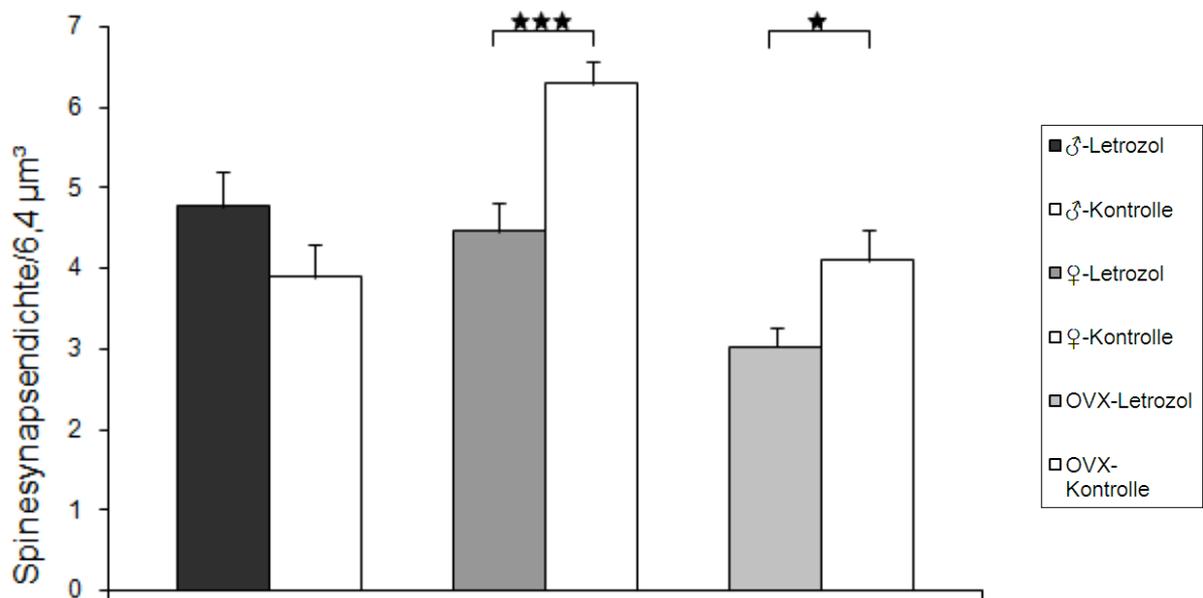


Abb. 11: Vergleich der Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aller Versuchsgruppen des ersten Versuchs. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★★★ p<0,001 (höchst signifikant), ★★ p<0,01 (hoch signifikant), ★ p<0,05 (signifikant).

Versuch 2:

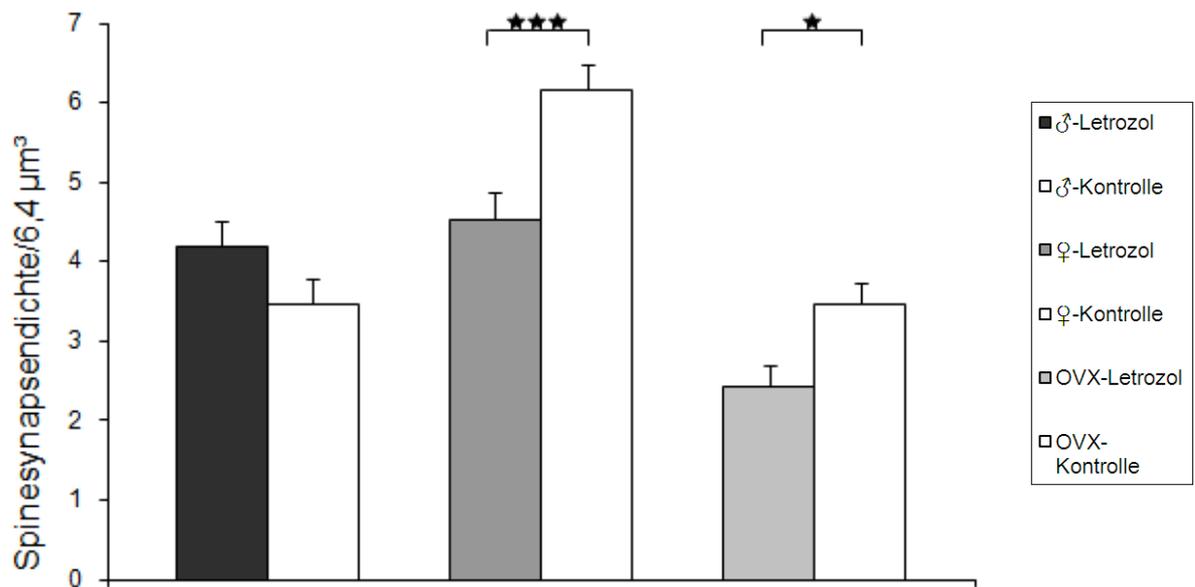


Abb. 12: Vergleich der Mittelwerte aus der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aller Versuchsgruppen des zweiten Versuchs. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★★★ p<0,001 (höchst signifikant), ★★ p<0,01 (hoch signifikant), ★ p<0,05 (signifikant).

Versuch 1+2:

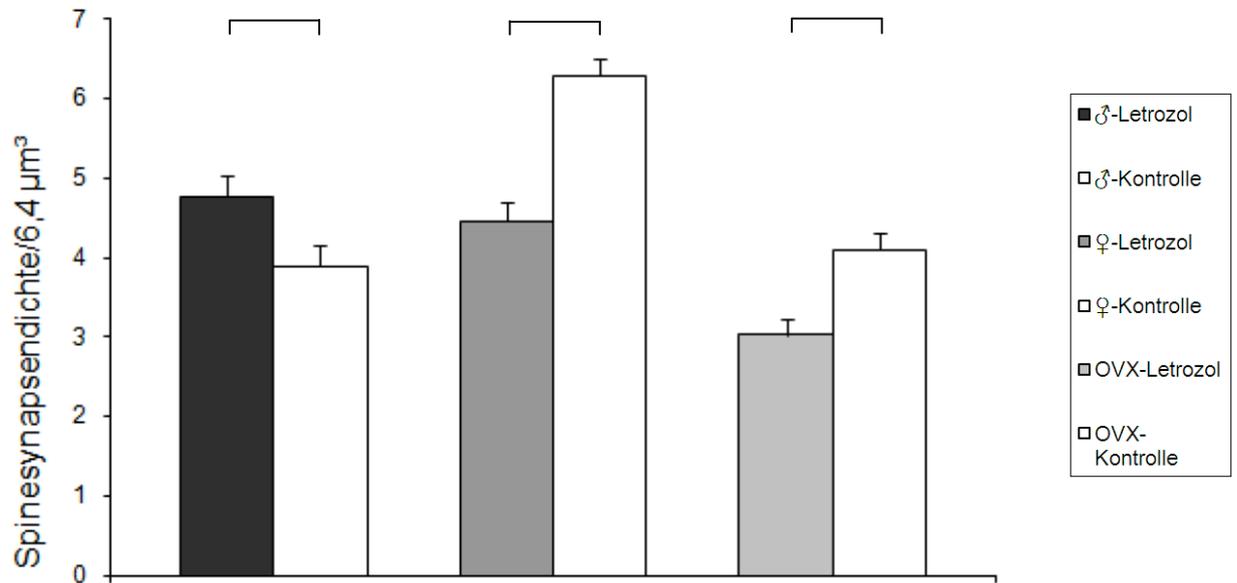


Abb. 13: Vergleich der Mittelwerte aus der quantitativen Bestimmung der Spinesynapsendichte aller Versuchsgruppen des ersten und zweiten Versuchs. Die Anzahl der Tiere aus Versuch 1 und 2 wurde addiert ($n=6$). Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★★★ $p<0,001$ (höchst signifikant), ★★ $p<0,01$ (hoch signifikant), ★ $p<0,05$ (signifikant).

5. Diskussion

Die Wirkungen von Östrogen sind in der Vergangenheit vielfach untersucht worden. Seit mehr als 30 Jahren ist bekannt, dass Östrogen Auswirkungen auf das Gehirn von Versuchstieren hat (Sakuma 1980). Während man sich früher hauptsächlich auf Fragen bezüglich der Reproduktion konzentrierte, ist heute zunehmend die neuroprotektive Wirkung von Östrogen in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. So weiß man heute, dass Östrogen den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer oder Demenz, verzögern kann (Tang et al. 1996, Kawas et al. 1997, Yue et al. 2005). Laut diesen Studien haben Frauen in der Menopause, die sich einer Östrogentherapie unterziehen, ein geringeres Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken. Auch bei Epilepsien und nach einem Schlaganfall wirkt sich Östrogen günstig auf die Prognose aus (Garcia-Segura et al. 2001).

Frauen in der Menopause leiden besonders unter dem Mangel an Östrogen. Die Einstellung der Produktion von Sexualhormonen in den Ovarien hat vielfältige physische und psychische Auswirkungen zur Folge. Die meisten Frauen klagen unter anderem über Hitzewallungen, Kopfschmerzen, Stimmungsschwankungen und Schlafstörungen (Freemann et al. 2008). Andere Folgen des Östrogenmangels können die Demineralisierung der Knochen im Sinne eines Kalziumverlustes mit erhöhtem Risiko für Frakturen und Osteoporose sein (Coxam 2003). Durch die geringere Konzentration von Östrogen vermindert sich auch die gefäßprotektive Wirkung (Stirone et al. 2005). Weitere Konsequenzen betreffen einige zerebrale Funktionen. Der weiblichen Zyklus wirkt sich z. B. auf das verbale Gedächtnis aus und hohe Serum-Östrogenwerte haben einen positiven Einfluss auf das verbale Gedächtnis (Hampson 1990, Sherwin 2003, Dreher et al. 2007). Außerdem wurden Defizite in der Koordination der Feinmotorik, verlängerte Reaktionszeiten, Depressionen, Angstzustände und erhöhte Schmerzsensitivität beobachtet (McEwen und Alves 1999). Die genannten vielfachen Auswirkungen der natürlichen und der „nicht natürlichen“ Menopause, z. B. nach Ovariectomie oder Therapie mit Aromatasehemmern, haben dazu geführt bei dieser Gruppe von Frauen eine „hormone replacement therapy“ (HRT) mit Östrogen, auch „estrogen replacement therapy“ (ERT) genannt, durchzuführen. Östrogenhaltige Medikamente gegen Wechseljahresbeschwerden können das Risiko an Brustkrebs zu erkranken jedoch um bis zu 45 % erhöhen (Siegmond-Schultze et al. 2008). Demnach sollten diese stets mit Bedacht eingesetzt werden.

5.1. Gonadales und hippocampales Östrogen

Östradiol (E2) wird aus Testosteron mit Hilfe des Enzyms CYP19A1 (Aromatase) gebildet (Azcoitia et al. 2001) und ist im ganzen Körper des Menschen verbreitet, so auch im Gehirn.

Der Begriff der Neurosteroiden wurde in den 80er Jahren geprägt. Baulieu stellte sich bereits 1980 die Frage, ob Steroide unabhängig von peripheren Quellen im Gehirn synthetisiert werden können (Baulieu 1980). Es gelang der Beweis, dass Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron, also Ausgangssubstanzen der Steroidbiosynthese, in hohen Konzentrationen im Nervensystem vorliegen. In nachfolgenden Studien konnte dies auch nach Adrenalectomie und Ovariectomie gezeigt werden (Corpéchet et al. 1981, 1983). Inzwischen sind alle Enzyme der Steroidbiosynthese im Gehirn nachgewiesen worden (Furukawa et al. 1998, Compagnone und Mellon 2000, Stoffel-Wagner 2001, Wehrenberg et al. 2001).

Die Aromatase befindet sich unter anderem in hippocampalen Neuronen (Sanghera et al. 1991, Abdelgadir 1994, Garcia-Segura et al. 2001, Wehrenberg et al. 2001), welche *in vitro* in der Lage sind Östrogen *de novo* zu synthetisieren. Dieser Nachweis gelang erstmalig Prange-Kiel et al. 2003. Welche Bedeutung dieses hippocampale Östrogen hat, ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Fester et al. fanden 2006 heraus, dass hippocampales Östrogen proliferationsfördernde Effekte besitzt. Von Schassen et al. wies 2006 die wachstumsinduzierende Wirkung von hippocampalen Östrogen auf die Axonlänge anhand der GAP43-Expression, einem Marker für Axonenwachstum, nach.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass diese *de novo* Synthese, die unabhängig von der gonadalen Östrogensynthese stattfindet, über Hemmung der Aromatase mit einem Aromataseinhibitor (Letrozol) *in vivo* regulierbar ist und zur Verringerung der hippocampalen Spinesynapsendichte führt.

5.2. Einfluss von Steroiden auf die synaptische Plastizität

Der Einfluss von Östrogen auf die synaptische Plastizität ist mittlerweile bewiesen. Es existieren zahlreiche Studien, die sich mit dieser Frage bereits auseinander gesetzt haben (McEwen 2002). Man fand heraus, dass die Applikation von Östrogen eine Erhöhung der Dichte von Spinesynapsen in der CA1-Region des Hippocampus bewirkt. Dies konnte *in vitro* und *in vivo* an ovariectomierten Tieren demonstriert werden (Woolley und McEwen 1993), und zwar sowohl für Spines (postsynaptische Struktur) als auch für Boutons (präsynaptische Struktur). Amanteau und McCarthy beobachteten 2002 bei ovariectomierten Tieren nach Stimulation mit Östrogen die Hochregulation von Spinophilin, einem typischen Protein der postsynaptischen Spines und die Erhöhung der Spinesynapsendichte.

Wir stellen uns die Frage, ob *in vivo* durch Hemmung der Aromatase mit dem Aromataseinhibitor Letrozol eine Veränderung der Dichte von hippocampalen Spinesynapsen herbeigeführt werden kann. Dabei interessierte uns besonders der Unterschied zwischen ovariectomierten Tieren, denen kein gonadales Östrogen mehr zur Verfügung steht, und nicht ovariectomierten Tieren.

Woolley und McEwen wiesen in ihren Arbeiten auf die Bedeutung von gonadalem Östrogen hin (Woolley und McEwen 1993). Die Wirkung von neuronalem Östrogen auf die Synaptogenese ist bislang nicht ausreichend untersucht worden. Gerade im Hinblick auf den häufigen klinischen Einsatz bei der Behandlung des Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms sind in diesem Zusammenhang weitere Untersuchungen von großer Wichtigkeit.

Östrogen beeinflusst die Synaptogenese. Ein Mangel an Östrogen bewirkt eine Verringerung der Synapsendichte. Aber welchen Einfluß haben die Vorläufermoleküle des Östrogens, wie Cholesterol und Testosteron?

Cholesterol wird in Neuronen und Gliazellen produziert und ist an der Ausreifung von Synapsen beteiligt (Barres und Smith 2001). Untersuchungen von Göritz et al. (2002) zeigen, dass die Spinesynapsenbildung nach Stimulation durch Cholesterol erhöht ist. Die Arbeit von Fester et al. (2009) gibt Hinweise darauf, dass die Überführung von Cholesterol zu Östrogen zur Neuentstehung von Synapsen notwendig ist.

Der Wirkung des Testosterons für die Aufrechterhaltung der Spinesynapsen kommt vermutlich ebenfalls große Bedeutung zu. Testosteron kann über zwei Mechanismen

wirken: erstens über die Umwandlung in Östrogen durch die Aromatase und zweitens über Bindung an Testosteron-spezifische intranukleäre Adrenorezeptoren (Thieman et al. 2007).

Aromataseinhibitoren führen zur Erhöhung des Serum-Testosterons bei älteren Männern (Leder et al. 2004). Nach Gonadektomie männlicher und weiblicher adulter Ratten findet sich eine Reduktion der Synapsendichte in der CA1 Region des Hippocampus. Nach Applikation von Testosteron ist dieser Effekt wieder aufgehoben (Leranth et al. 2003, 2004). Ob dieser Effekt darauf beruht, dass Testosteron dem Östrogen wieder als Substrat zur Verfügung steht, ist nicht vollständig geklärt. Denn einerseits kann das Testosteron über Aromatisierung zu Östrogen verstoffwechselt werden und somit über die Östrogenrezeptoren wirken. Andererseits kann es auch Aromatase-unabhängig über die oben genannten Testosteron-spezifischen Adrenorezeptoren wirken.

Die neuroprotektiven Effekte des Östrogens in Bezug auf den Zelltod, konnten auch für Testosteron nachgewiesen werden. Pike (2001) untersuchte die Wirkung auf hippocampale Neurone und fand, wie es auch für Östrogen bekannt ist, eine Reduktion der Toxizität von β -Amyloid. Kürzlich wurde sogar ein Östrogen-unabhängiger protektiver Effekt von Testosteron auf die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz bei männlichen Versuchstieren nachgewiesen (Mc Allister et al. 2010).

Unsere Ergebnisse unterstreichen ebenfalls die Bedeutung des Testosterons für männliche Versuchstiere.

Wie bereits mehrfach erwähnt, führt eine Behandlung mit Letrozol zur Verringerung der Spinesynapsendichte. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass durch Letrozolgabe der letzte Schritt der Östrogenbiosynthese, nämlich die Umwandlung von Testosteron in Östrogen, durch das Enzym Aromatase blockiert wird. Bei den männlichen Tieren erwarteten wir also wie bei den weiblichen Tieren eine Verringerung der Spinesynapsendichte nach Letrozolapplikation. In unserem Versuch trat dies nicht ein. Nach Behandlung mit dem Aromatasehemmer fanden wir keinen signifikanten Unterschied in der Dichte der Spinesynapsen im Vergleich zur Kontrollgruppe, sogar einen Anstieg, welcher jedoch nicht signifikant war. Dieses überraschende Ergebnis veranlasste uns, den Versuch ein zweites Mal durchzuführen, da wir zunächst eine Materialverwechslung vermuteten. Bei der Auswertung des Materials des zweiten Versuchs ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren.

Wir addierten nun die Anzahl der männlichen Versuchstiere des ersten und des zweiten Versuchs ($n_{\text{gesamt}}=6$) und es ließ sich nun ein signifikanter Unterschied in der Spinesynapsendichte nachweisen. Jedoch anders als erwartet, beobachteten wir in dieser Gruppe einen Anstieg der Spinesynapsendichte nach Aromataseinhibition.

Dieses überraschende Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass für männliche Versuchstiere nicht nur das Östrogen ein notwendiges Steroid für die Aufrechterhaltung der hippocampalen Spinesynapsendichte ist, sondern auch die Vorläufermoleküle der Östrogensynthese wie Cholesterol und Testosteron zu diesem Zwecke von Bedeutung sind. Bisläng ist dieses Phänomen nicht untersucht worden und es kann über die Gründe dieses Effekts nur spekuliert werden.

Offensichtlich wirken sich hohe Konzentrationen von Testosteron protektiv gegen Spinesynapsenverlust bei männlichen Versuchstieren aus. Die Gewebekonzentration von Estradiol im Hippocampus männlicher Ratten ist signifikant niedriger als bei weiblichen Ratten. Dies zeigen aktuelle Studien unseres Instituts, die zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht sind. Möglicherweise bedarf es zum Synapsenerhalt bei den männlichen Tieren weniger Östrogen als bei den weiblichen Tieren. Eine mögliche Erklärung könnte lauten, dass das im Serum befindliche Testosteron der männlichen Versuchstiere, welches in höherer Konzentration vorliegt als bei weiblichen Versuchstieren, ausreichend ist und durch eine gewisse Restaktivität der Aromatase wieder zu Östrogen verstoffwechselt wird. Fester et al. (2009) wiesen jedoch nach, dass die Umwandlung von Cholesterol in Östrogen notwendig ist, damit die Synaptogenese angeregt wird. In einer Arbeit von Prange Kiel et al. (2008) konnte bewiesen werden, dass GnRH die Estradiolsynthese in hippocampalen Gewebekulturen stimuliert.

Hayes et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen der GnRH-Sekretion bei Männern. Durch medikamentöse Aromataseblockade resultierten signifikant geringere Estradiolkonzentrationen im Blut, korrespondierend hierzu fanden sich erhöhte Testosteronlevel. Reaktiv wurden ebenfalls erhöhte GnRH-Blutlevel nachgewiesen. Das bedeutet, dass durch Aromataseblockade im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus des Hypothalamo-Hypophysären-Gonadalen Regelkreises mehr Ausgangssubstrat (Cholesterol, Testosteron) zur Verfügung gestellt wird. Wie bereits erwähnt wurden passend hierzu in einer Studie bei älteren Männern durch Aromataseblockade erhöhte Serumtestosteronwerte nachgewiesen (Leder et al. 2004).

Und wie bereits in Kapitel 5.2. erwähnt, kann Testosteron auch direkt und Aromatase-unabhängig über Testosteron-spezifische Adrenorezeptoren wirken. Dies könnte ein anderer Grund für die Aufrechterhaltung der Spinesynapsendichte bei den männlichen Versuchstieren sein.

In einer aktuellen Studie wurde eine positive Assoziation zwischen hohen Blut- und Gehirnkonzentrationen von Testosteron auf Gedächtnis und synaptische Plastizität bei männlichen Ratten gefunden (Schulz und Korz 2010). Hatanaka et al. (2009) beobachteten einen Anstieg der Spinedichte von CA3-Neuronen des Hippocampus männlicher Ratten nach Applikation von Dihydrotestosteron und Testosteron und sogar eine Östrogen-induzierte Spinedegeneration. Auch diese Beobachtungen legen nahe, dass bei männlichen Tieren andere Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Spinesynapsendichte zur Wirkung kommen als bei weiblichen Tieren.

5.3. Einfluss von Steroiden auf Lernen und Gedächtnis

Der Einfluss des Hippocampus auf die Gedächtnisfunktion ist bereits dargelegt worden (2. Einleitung, 2.1. Der Hippocampus). Es ist bekannt, dass bei der Langzeitpotenzierung (LTP), also beim Überführen von Gedächtnisinhalten vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis, neue Synapsen entstehen. Demzufolge muss die Neubildung von Synapsen in den charakteristischen Hirnregionen direkten Einfluss auf das Gedächtnis haben. Es gibt verschiedene Wege den Einfluss von Steroiden auf die Gedächtnisfunktion zu untersuchen. Hierzu steht eine Vielzahl von Tests zur Verfügung. Man muss allerdings bedenken, dass der Begriff „Gedächtnis“ ein Sammelbegriff ist und es sich aus einzelnen Komponenten zusammensetzt, die nicht nur in verschiedenen Regionen des Gehirns lokalisiert sind, sondern auch bei Männern und Frauen unterschiedliche Schwerpunkte aufweisen. Man geht davon aus, dass diese Differenzen kognitiver Funktionen aus einer unterschiedlichen Exposition von Sexualhormonen auf das Gehirn in der Fetalentwicklung resultieren (Beyer 1999).

Erhöhte Östrogenspiegel wirken sich bei verschiedenen Zielgruppen positiv auf die Gedächtnisfunktion aus. Eine frühe Studie, in der dies nachgewiesen werden konnte,

wurde 1952 an Frauen in der Menopause durchgeführt (Caldwell and Watson 1952). Diese fanden heraus, dass die Frauen, die 12 Monate lang Estradiolbenzoat statt eines Placebos erhielten, im Wechsler-Intelligenztest deutlich besser abschnitten. Wurde das Östrogen nach dieser Zeit wieder abgesetzt, verschlechterte sich das Ergebnis des IQ-Tests. Seitdem sind zahlreiche weitere Studien zu diesem Thema durchgeführt worden (Campbell and Whitehead 1977, Sherwin 1988, Miller et al. 2002). Zwar sind die Ergebnisse der Studien teils kontrovers, allerdings konnte deutlich gezeigt werden, dass sich eine Östrogenbehandlung auf die Art von Gedächtnis, die in einem Geschlecht stärker ausgeprägt ist, positiv auswirkt, bei Frauen also u.a. auf das verbale Gedächtnis (Zec and Trivendi 2002). Eine Verbesserung des visuellen Gedächtnisses durch Östrogengabe konnte in diesen Tests dagegen nicht gezeigt werden. Ross et al. (2003) untersuchten junge Mädchen mit Turner-Syndrom, denen auf Grund ihrer Erkrankung kein gonadales Östrogen zur Verfügung steht. Bei jenen Mädchen mit Östrogenbehandlung beobachtete man eine Steigerung der Gedächtnisleistung.

Eine andere gängige Methode zur Prüfung der kognitiven Leistungsfähigkeit stellt im Tierversuch der „Morris Water Maze“ dar, ein etabliertes Modell für das Labyrinthlernen bei Nagern (Morris 1984). Xu und Zhang (2006) untersuchten im Morris Water Maze ovariectomierte Mäuse, denen Estradiolbenzoat appliziert wurde und fanden eine deutliche Verbesserung im Labyrinthlernen, verglichen mit der unbehandelten ovariectomierten Kontrollgruppe, heraus. Ultrastrukturell fanden sie bei den ovariectomierten Versuchstieren, denen Estradiolbenzoat substituiert wurde, eine Rückbildung der Veränderungen, die durch Ovariectomie ausgelöst wurden (Verkleinerung des synaptischen Spalts, Zunahme der postsynaptischen Verdichtung und präsynaptischer Vesikel) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es gibt weiterhin klinische Hinweise darauf, dass es bei Patientinnen mit Mammakarzinom, die mit einem Aromatasehemmer behandelt werden, zu Lern- und Gedächtnisdefiziten kommt (Shilling et al. 2003, Jenkins et al. 2004).

Lernen induziert LTP im Hippocampus (Whitlock et al. 2006) und LTP induziert die Entstehung von Spinesynapsen im Hippocampus (Engert und Bonhoeffer 1999). Der NMDA-Rezeptor ist an der Langzeitpotenzierung und am Östrogen-vermittelten Anstieg der Spinesynapsendichte in der CA1-Region des Hippocampus beteiligt (Murphy und Segal 1996, Woolley et al. 1997). Die Applikation von Östrogen führt zu einer Steigerung NMDA-Rezeptor-vermittelter EPSPs (exzitatorische postsynaptische

Potentiale) und LTP (Cordoba et al. 1997, Foy et al. 1999, Smith und McMahon 2005 und 2006, Yun et al. 2007). Das Ausmaß der Östrogen-vermittelten LTP wird von einem Anstieg der Spinesynapsendichte begleitet (Smith und McMahon 2005 und 2006). Nach Letrozolbehandlung kommt es *in vivo* zur Abnahme der hippocampalen Spinesynapsendichte und Herunterregulation der synaptischen Proteine Spinophilin, Synaptophysin und des NMDA-Rezeptor Subtyps NR1 (Zhou et al. 2010). Somit lässt sich die These stützen, dass eine Behandlung mit dem Aromatase-Inhibitor Letrozol einen negativen Einfluss auf das Lernen hat.

6. Zusammenfassung

Neuronale Plastizität wird durch Steroide beeinflusst. Eine Reduktion der Östrogenkonzentration durch Ovariectomie oder durch den Einsatz eines Aromatasehemmers z.B. Letrozol führt zur Reduktion der hippocampalen Spinesynapsendichte in Schnittkulturen. Der häufige medizinische Einsatz von Aromatasehemmern in der Behandlung des postmenopausalen Mammakarzinoms und die geringe Datenlage über mögliche zerebrale Auswirkungen des Medikaments bildeten den Hintergrund für diese Arbeit.

Wir untersuchten den Einfluss des reversiblen Aromatasehemmers Letrozol auf die Spinesynapsendichte im Hippocampus von männlichen, weiblichen und ovariectomierten Mäusen *in vivo*, um die unterschiedlichen Auswirkungen von gonadalem und hippocampalem Östrogen voneinander abzugrenzen.

Hierzu applizierten wir 21 Tage lang den 3 Versuchsgruppen Letrozol oder die gleiche Menge Kontrollösung und bestimmten nach Beendigung des Versuchs die quantitative Spinesynapsendichte in der CA1 Region des Hippocampus mittels Elektronenmikroskopie.

Wir fanden in allen Gruppen nach Letrozolapplikation eine signifikante Veränderung der Spinesynapsendichte. Sowohl bei den ovariectomierten, als auch bei den weiblichen Tieren ohne Ovariectomie war die Spinesynapsendichte nach Letrozolgabe signifikant erniedrigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht nur das gonadale Östrogen für die Aufrechterhaltung der Spinesynapsen *in vivo* essentiell ist, sondern auch das hippocampale Östrogen von Bedeutung ist. Bei den männlichen Versuchstieren fanden wir, anders als angenommen, einen Anstieg der Spinesynapsendichte nach Aromataseinhibition.

Dieses überraschende Ergebnis weist darauf hin, dass bei männlichen Tieren andere Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Spinesynapsendichte zur Wirkung kommen als bei weiblichen Tieren.

Diese Hypothese ist bislang nicht untersucht worden und bedarf weiterer Experimente zur Prüfung.

7. Literaturverzeichnis

Abdelgadir ES, Resko JA, Ojeda SR, Lephart ED, McPaul MJ, Roselli CE (1994) Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleid acid in brain. *Endocrinology*; 135:395-401.

Alvarez-de-la-Rosa M, Silva I, Nilsen J, Pérez MM, García-Segura LM, Avila J, Naftolin F (2005) Estradiol prevents neural tau hyperphosphorylation characteristic of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*; 1052:210-24.

Amanteau SK, McCarthy MM (2002) A Novel Mechanism of Dendritic Spine Plasticity Involving Estradiol Induction of Prostaglandin-E2. *J Neurosci.*; 22(19):8586-8596.

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

Barres BA, Smith SJ (2001) Cholesterol-Making or Breaking the Synapse. *Science*; 294:1296-1297.

Baulieu EE (1980) Steroid hormone receptors. *Expos Annu Biochim Med.* 1980; 34:1-25.

Behl C, Manthy D (2000) Neuroprotective activities of estrogen: An update. *J Neurocytology*; 29:351-359.

Beyer C (1999) Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol*; 199:379-390.

Bhatnagar AS, Brodie AMH, Long BJ, Evans DB, Miller WR (2001) Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatase inhibitors. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 76:199-202.

Braendgaard H, Gundersen HJ (1986) The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods.* 18:39-78.

Bütow A (2007) Einfluss verschiedener Metaboliten der Steroidbiosynthese auf die Expression von Synaptophysin und Spinophilin im Hippocampus der Ratte; *Med. Dissertation, Universitätsklinikum Hamburg.*

Caldwell BM, Watson RI (1952) An evaluation of psychologic effects of sex hormone administration in aged women. I. Results of therapy after six months. *J Gerontol.*; 7:228-44.

Campbell S, Whitehead M (1977) Oestrogen therapy and the menopausal syndrome. *Clin Obstet Gynaecol.*; 4(1):31-47.

Carrer HF, Cambiasso MJ, Brito V, Gorosito S (2003) Neurotrophic Factors and Estradiol Interact To Control Axogenic Growth in Hypothalamic Neurons. *Ann N Y Acad Sci*; 1007:306-316.

Compagnone NA, Mellon SH (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*; 21:1-56.

Cordoba Montoya DA, Carrer HF (1997) Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res*; 778:430-438.

Corpéchet C, Robel P, Axelson M, Sjövall J, Baulieu EE (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78(8):4704-4707.

Corpéchet C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjövall J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res*; 270(1):119-125.

Coxam V (2003) Prevention of osteopaenia by phyto-oestrogens: animal studies. *Br J Nutr*. 2003 Jun; 89 Suppl 1:75-85.

Dreher JC, Schmidt PJ, Kohn P, Furman D, Rubinov D, Berman KF (2007) Menstrual cycle phase modulates reward-related neural function in women. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104:2465-2470.

Duzel E, Kaufmann J, Guderian S, Szentkuti A, Schott B, Bodammer N, Hopf M, Kanowski M, Tempelmann C, Heinze HJ (2004) Measures of hippocampal volumes, diffusion and 1H MRS metabolic abnormalities in temporal lobe epilepsy provide partially complementary information. *Eur J Neurol*; 11:195-205.

Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*; 399:66-70.

Fester L (2003) Funktionelle Bedeutung der Aromatase bei der lokalen ÖstrogenSynthese im Hippocampus. *Diplomarbeit Humanbiologe. Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald*.

Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M, Rune GM (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells requires local estrogen synthesis. *J Neurochem*; 97:1136-44.

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* 2009 Aug 19(8):692-705.

- Foidart A, Tlemcani O, Harada N, Abe-Dohmae S, Balthazart J (1995)** Pre-and-posttranslational regulation of aromatase and non-steroidal aromatase inhibitors. *Brain Res*;701:267-278.
- Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW (1999)** 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol*; 81:925-929.
- Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR, Kapoor S. (2008)** Symptoms in the menopausal transition: hormone and behavioral correlates. *Obstet Gynecol*.2008 Jan;111(1):127-36.
- Furukawa A, Myatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998)** Steroidogenic Acute Regulatory Protein(StAR) Transcripts Constitutively Expressed in the Adult Rat Central Nervous System: Colocalization of StAR, Cytochrome P-450_{SCC} (CYP 11A1), and 3 β - Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Rat Brain. *J Neurochem*; 71:2231-2238.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Don Carlos LL (2001)** Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology* ;63:29-60.
- Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE (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*; 20:751-757.
- Göritz C, Mauch DH, Nägler K, Pfrieger FW (2002)** Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J Physiol Paris*; 96(3-4):257-63.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, Mc Ewen BS (1990)** Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10:1286-1291.
- Green PS, Bishop J, Simpkins JW (1997)** 17 α -Estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci*; 17:511-515.
- Hampson E (1990)** Variations in sex-related cognitive abilities across the menstrual cycle. *Brain Cogn*; 14:26-43.
- Harrison PJ, Law AJ, Eastwood SL (2003)** Glutamate Receptors and Transporters in the Hippocampus in Schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*; 1003:94-101.
- Hatanaka Y, Mukai H, Mitsuhashi K, Hojo Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Sato R, Kawato S. (2009)** Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17;381(4):728-32.

Hayes FJ, DeCruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF Jr. (2001) Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jan; 86(1):53-8.

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

Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H, Mukai H, Morrison JH, Janssen WGW, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes Estradio from Pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:865-870.

Jenkins V, Shilling V, Fallowfield L, Howell A, Hutton S (2004) Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? A pilot study. *Psychooncology*; 13:61-66.

Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, Metter E.(1997) A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology*; 48(6):1517-21.

Kelly MJ, Levin ER (2001) Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.*; 12(4):152-6.

Klinge CM (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*; 29:2905-2919.

Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004) Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *J Neurosci*; 24:5913-5921.

Kurz JE, Rana A, Parsons JT, Churn SB (2003) Status epilepticus- induced changes in the subcellular distribution and activity of calcineurin in rat forebrain. *Neurobiol Dis*; 483-493.

Leder BZ, Rohrer JL, Rubin SD, Gallo J, Longscope C (2004) Effects of aromatase inhibition in elderly men with low or borderline-low testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab.*; 89(3): 1174-80.

Leranth C, Shanabrough M, Horvath TL (2000). Hormonal regulation of hippocampal spine synapse density involves subcortical mediation. *Neuroscience.*; 101(2):349-56.

Leranth C, Petnehazy O, Mac Lusky NJ (2003) Gonadal Hormones Affect Spine Synaptic Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Male Rats. *J Neuroscience*; 23(5):1588-1592.

Leranth C, Hajszan T, Mac Lusky NJ (2004) Androgens Increase Spine Synapse Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Ovariectomized Female Rats. *J of Neuroscience*; 24(2):495-499.

Lønning PE, Geisler J, Bhatnager A (2003) Development of aromatase inhibitors and their pharmacologic profile. *Am J Clin Oncol.*; 26(4):S3-8.

McAllister C, Long J, Bowers A, Walker A, Cao P, Honda S, Harada N, Staufenbiel M, Shen Y, Li R (2010) Genetic targeting aromatase in male amyloid precursor protein transgenic mice down-regulates beta-secretase (BACE1) and prevents Alzheimer-like pathology and cognitive impairment. *J Neurosci.* 26; 30(21):7326-34.

McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*; 20(3):279-307.

McEwen BS. (2002) Estrogen Actions Throughout the Brain. *Recent Prog Horm Res.*; 57:357-384.

Miller KJ, Conney JC, Rasgon NL, Fairbanks LA, Small GW (2002) Mood symptoms and cognitive performance in women estrogen users and nonusers and men. *J Am Geriatr Soc.*;50(11):1826-30.

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*; 11:47-60.

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

Pike CJ (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-XL expression and beta-amyloid-induced apoptosis:relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem*; 72:1552-1563.

Pike CJ (2001) Testosterone attenuate β -amyloid toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*; 919:160-165.

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptor in hippocampal neurons. *Hippocampus*; 13:184-192.

Prange-Kiel J, Rune GM (2006) Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience*;138(3):765-772.

- Prange-Kiel, J, Jarry, H, Schoen, M, Kohlmann, P, Lohse, C., Zhou, L, Rune, G.M (2008)** Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180:417-26.
- Puddefoot JR, Barker S, Glover HR, Malouitre SDM, Vinson GP (2002)** Non-competitive steroid inhibition of estrogen receptor functions. *Int J Cancer*; 101:17-22.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005)** A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science*;307:1625-1630.
- Ross JL, Roeltgen D, Stefanatos GA, Feullan P, Kushner H, Bondy C, Cutler Jr GB (2003)** Androgen- responsive aspects of cognition in girls with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*; 88:292-296.
- Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002)** Estrogen up- regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*; 113(1):167-175.
- Sakuma Y, Pfaff DW (1980)** Excitability of female rat central gray cells with medullary projections: changes produced by hypothalamic stimulation and estrogen treatment. *J Neurophysiol.*; 44(5):1012-23.
- Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED (1991)** Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*; 129:2834-2844.
- Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A (2009)** *History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target.* *Endocr. Rev.* 30(4): 343–75.
- Schulz K, Korz V. (2010)** Hippocampal testosterone relates to reference memory performance and synaptic plasticity in male rats. *Front Behav Neurosci.* 4:187.
- Sherwin BB (1988)** Affective changes with estrogen and androgen replacement therapy in surgically menopausal women. *J Affect Disord*; 14(2):177-87.
- Sherwin BB (2003)** Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr rev*; 24:133-151
- Shilling V, Jenkins V, Fallowfield L, Howell T (2003)** The effects of hormone therapy on cognition in breast cancer. *J steroid Biochem Mol Biol*; 86:405-412.
- Shunghrue P. J., Merchenthaler I. (2001)** Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*; 436:64-81.

Siegmund-Schultze N, Zylka-Menhorn V, Leinmüller R, Meyer R (2008)

Hormontherapie und Brustkrebs: Ein Blick auf aktuelle Datenlage. *Dtsch Arztebl*; 105(6): A-260 / B-234 / C-230.

Smith IE (1999) Aromatase inhibitors: a dose-response effect? *Endocr Relat Cancer*; 6:245-249.

Smith CC, McMahon LL (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci*; 25:7780-7791.

Smith CC, McMahon LL (2006) Estradiol-induced increase in the magnitude long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci*; 26:8517-8522.

Spiers HJ, Maguire EA, Burgess N (2001) Hippocampal amnesia. *Neurocase*; 7:357-382.

Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2005) Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol* 2005 Oct; 68(4):959-65.

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

Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF 3rd (1996) Steroidogenic factor-1 dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry*; 35:9052-9.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 17; 348(9025):429-32.

Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM (2003) Signaling Pathways of Apoptosis by Aromatase Inhibitors and Antiestrogens. *Cancer Res*; 63:8037-8050.

Thiemann WJ, Palladino MA, Lazar T (2007) Biotechnologie. *Pearson Studium, München*

Trepel (1999) Neuroanatomie: Struktur und Funktion; 2. Auflage. *Urban und Fischer Verlag, München, Stuttgart, Lübeck, Jena, Ulm*; S. 196-199.

von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol*; 18(11):847-56.

- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001)** Steroidgenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem*; 76:1879-1886.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006)** Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*; 313:1093-1097.
- Woolley CS, McEwen BS. (1992)** Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*; 12:2549-2554.
- Woolley CS, McEwen BS (1993)** Roles of Estradiol and Progesterone in Regulation of Hippocampus Dendritic Spine Density during the Estrous Cycle in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*; 338:293-306.
- Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA (1997)** Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA 1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci*; 17:1848-1859.
- Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, Haranda N, Zhong Z, Shen Y, Li, R (2005)** Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102(52):19198-203.
- Yun SH, Lee DS, Lee H, Baeg EH, Kim YB, Jung MW (2007)** LTP induction modifies functional relationship among hippocampal neurons. *Learn Mem*; 14:190-194.
- Xu X, Zhang Z (2006)** Effects of estradiol benzoate on learning-memory behaviour and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sciences* 79; 16:1553-1560.
- Zec RF, Trivendi MA (2002)** The effects of estrogen replacement therapy on neuropsychological function in postmenopausal women with and without dementia: a critical and theoretical review. *Neuropsychol Rev* 12: 65-109.
- Zhou L, Fester L, von Bittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM (2010)** Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology* 2010 Mar;151(3): 1153-60.

8. Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zur Entstehung und zum Abschluss dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben.

Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune, die mir die Möglichkeit gegeben hat, einen Einblick in die wissenschaftliche Arbeit Ihres Instituts zu bekommen und mich von der Auswahl des Themas bis zur Fertigstellung dieser Arbeit ermutigt und unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Lepu Zhou, der mich sowohl beim experimentellen Teil begleitet hat, als auch durch den oftmals undurchsichtigen Akt des Niederschreibens. Durch seine immer freundliche und geduldige Art auf all meine Fragen zu antworten, hat er mir bei der Lösung vieler scheinbar unlösbarer Probleme geholfen.

Für die Unterstützung im Labor und in der Dunkelkammer bin ich insbesondere Frau Bettina Kruck und Frau Brigitte Asmus sehr dankbar, die mich durch ihre fachliche Kompetenz und ihre liebenswerte Hilfsbereitschaft vor der ein oder anderen Krise bewahrt haben.

Herrn PD Dr. rer. nat. Roland Bender danke ich für seine wertvollen Ratschläge und die konstruktive Kritik beim Korrekturlesen. Meinem Schwager Sascha Kopp-von Blittersdorff für die Unterstützung bei den technischen Problemen am PC.

Und zuletzt und allen voran danke ich meinem lieben Partner Felix Pohl. Durch deine uneingeschränkte Geduld, deinen diplomatischen Umgang mit dem ein oder anderen geistigen Hindernis und deine ständige Ermutigung ist diese Arbeit endlich fertig.

Danke!

10. Eidesstattliche Erklärung

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

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

Unterschrift: