

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. Gabriele M. Rune

**Einfluss von 17- $\beta$ -Östradiol auf die Spinesynapsendichte  
in der Molekularschicht des Gyrus dentatus**

Dissertation

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

vorgelegt von

Almut König-Kruse  
aus Marburg an der Lahn

Hamburg 2012

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski JS, Paysen D, König A, Rune GM. 2010. Roles of 17-beta-estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex* 12:2985-2995.

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.08.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Roland A. Bender

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Christiane K. Bauer

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Mancher wird nur deshalb kein Denker, weil sein Gedächtnis zu gut ist.

Friedrich Nietzsche

meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
2.1	Gegenstand der Arbeit .....	9
2.2	Anatomie des Hippocampus.....	10
2.3	Gyrus dentatus .....	12
2.4	Funktion des Hippocampus.....	14
2.5	Die Rolle von Östrogen im Hippocampus .....	14
2.5.1	Östrogenbiosynthese .....	15
2.5.2	Wirkweise von Östrogen im Hippocampus .....	16
2.6	Pathologische Veränderungen des Hippocampus .....	17
2.7	Überleitung zu den Experimenten.....	17
<b>3</b>	<b>Material</b> .....	<b>20</b>
3.1	Arbeitsmaterialien, Geräte .....	20
3.2	Chemikalien.....	21
3.3	Herstellung von Lösungen.....	22
3.3.1	Versuchslösungen .....	22
3.3.2	Medien (Gewebekulturen).....	23
3.3.3	Anästhesie-Injektionslösung .....	23
3.3.4	Schmerzbehandlung nach Ovariectomie .....	23
3.3.5	Gewebefixierung.....	24
3.3.6	Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie .....	25
3.4	Software.....	26
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>27</b>
4.1	Eingesetzte Tiere .....	27
4.2	Durchführung der Experimente <i>in vivo</i> mit adulten, weiblichen Mäusen (Experiment 1).....	28
4.2.1	Behandlung mit Letrozol bzw. Kontroll-Lösung.....	28
4.2.2	Ovariectomie.....	28

<b>4.3</b>	<b>Durchführung der Experimente <i>in vivo</i> mit immaturren, weiblichen Ratten (Experiment 2)</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4</b>	<b>Transkardiale Perfusion und Entnahme des Hippocampus</b> .....	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Herstellung und Behandlung organotypischer Gewebekulturen immaturren, weiblicher Ratten (Experiment 3)</b> .....	<b>30</b>
<b>4.6</b>	<b>Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie</b> .....	<b>31</b>
4.6.1	Nachfixierung.....	31
4.6.2	Dehydrierung .....	31
4.6.3	Polymerisierung .....	32
4.6.4	Schnittanfertigung und Einfärbung.....	32
4.6.5	Kontrastierung .....	32
<b>4.7</b>	<b>Elektronenmikroskopie und Anfertigung der Fotos</b> .....	<b>33</b>
<b>4.8</b>	<b>Bildanalyse und -auswertung</b> .....	<b>33</b>
<b>4.8</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Experiment 1: Behandlung adulter, weiblicher Mäuse mit Letrozol</b> .....	<b>36</b>
5.1.1	Einfluss von Letrozol auf die Spinesynapsendichte adulter Mäuse .....	36
5.1.2	Einfluss einer Ovariectomie auf die Spinesynapsendichte adulter Mäuse .....	37
<b>5.2</b>	<b>Experiment 2: Behandlung immaturren, weiblicher Ratten mit Letrozol</b> .....	<b>39</b>
<b>5.3</b>	<b>Experiment 3: Behandlung organotypischer Gewebekulturen mit Letrozol bzw. mit 17-<math>\beta</math>-Östradiol</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>44</b>
<b>6.1</b>	<b>Einfluss von 17-<math>\beta</math>-Östradiol auf die Spinesynapsendichte im Hippocampus</b> .....	<b>44</b>
<b>6.2</b>	<b>Einfluss von 17-<math>\beta</math>-Östradiol auf die Spinesynapsendichte spezifisch im Gyrus dentatus</b> .....	<b>46</b>
<b>6.3</b>	<b>Alters- und entwicklungsabhängige Effekte von 17-<math>\beta</math>-Östradiol im Gyrus dentatus</b> .....	<b>48</b>
<b>6.4</b>	<b>Klinische Bedeutung der Östradiolwirkung im Hippocampus</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>53</b>

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>8.1</b>	<b>Wissenschaftliche Publikationen .....</b>	<b>55</b>
<b>8.2</b>	<b>Ergänzende Fachliteratur, Dissertationen und Websites .....</b>	<b>65</b>
<b>8.3</b>	<b>Abbildungen .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>68</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
C/A	Commissur-/Assoziationsfasern
CA 1-3	<i>Cornu ammonis</i> 1-3 (Ammonshorn 1-3)
DDSA	<i>Dodecenylsuccinic anhydride</i> (Dodecenylbernsteinsäureanhydrid)
DG	<i>dentate gyrus</i> (Gyrus dentatus)
EC	<i>entorhinal cortex</i> (entorhinaler Kortex)
E2	17- $\beta$ -Östradiol
ER- $\alpha$	Östrogenrezeptor alpha
ER- $\beta$	Östrogenrezeptor beta
GA	Glutardialdehyd
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
iML	<i>inner molecular layer</i> (innere Molekularschicht)
i. p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
mML	<i>middle molecular layer</i> (mittlere Molekularschicht)
MNA	Methyl Nadic Anhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
oML	<i>outer molecular layer</i> (äußere Molekularschicht)
OVX	Ovariectomie
p	<i>probability</i> (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
PB	<i>phosphate buffer</i> (Phosphatpuffer)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
StAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>



## 2 Einleitung

### 2.1 Gegenstand der Arbeit

Ein riesiges Netzwerk von schätzungsweise 100 Milliarden Neuronen wirkt mit bis zu über einer Billionen Synapsen (Thompson 2001) zusammen, um hochkomplexe Vorgänge, darunter auch die Gedächtnisbildung, im menschlichen Gehirn auszuführen. Bei der Bildung deklarativer Gedächtnisinhalte kommt dem im Temporallappen des Großhirns lokalisierten Hippocampus eine maßgebliche Rolle zu. Eine wesentliche Voraussetzung für die Gedächtnisfunktion des Hippocampus ist die neuronale Plastizität, d. h. die ausgeprägte Fähigkeit seiner Neurone, synaptische Kontakte mit anderen Neuronen zu verstärken oder abzuschwächen. Diese Fähigkeit wird durch viele Faktoren reguliert.

Auch Hormone wie das Sexualhormon 17- $\beta$ -Östradiol (E2) spielen eine entscheidende Rolle in der neuronalen Plastizität (McEwen 2002, Rune et al. 2006). Insbesondere im Hippocampus übt 17- $\beta$ -Östradiol wichtige Funktionen aus. Es reguliert beispielsweise die Synapsendichte auf den dendritischen Dornfortsätzen („Spines“) hippocampaler Neurone und beeinflusst damit die für die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten erforderliche Langzeitpotenzierung (Gould et al. 1990, Cordoba et al. 1997, Foy et al. 1999, Kretz et al. 2004, Smith und McMahan 2005, Vierk et al. 2012). Die synaptische Plastizität im Hippocampus wird wesentlich durch die lokal im Hippocampus selbst stattfindende Synthese von 17- $\beta$ -Östradiol beeinflusst und nicht vorrangig von in den Gonaden gebildetem Östrogen (Kretz et al. 2004, Rune und Frotscher 2005, Mukai et al. 2006).

Die Wirkung von 17- $\beta$ -Östradiol auf die synaptische Plastizität ist bereits ausführlich in der CA1-Region untersucht, an den anatomisch wie funktionell gut charakterisierten Synapsen der sog. Schaffer-Kollateralen, die aus CA3 kommend mit den Dendriten von CA1-Pyramidenzellen synaptische Kontakte ausbilden. Über die Wirkung von 17- $\beta$ -Östradiol im übrigen Hippocampus ist vergleichsweise wenig bekannt.

Eine wichtige Schaltstelle im Hippocampus stellt der Gyrus dentatus dar. Ihn erreichen über den Tractus perforans Axone aus dem entorhinalen Cortex. Diese bilden im Stratum moleculare des Gyrus dentatus mit Körnerzellen die erste synaptische

Verschaltung eines trisynaptischen Schaltkreises durch den Hippocampus. Dieser Schaltkreis spielt bei Lernprozessen eine wichtige Rolle (Treves et al. 2008). Es stellt sich daher die Frage, ob 17- $\beta$ -Östradiol auch im Gyrus dentatus in der Lage ist, synaptische Eigenschaften plastisch zu modulieren. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass der Gyrus dentatus eine wichtige Quelle des im Hippocampus gebildeten 17- $\beta$ -Östradiols ist (Bender et al. 2010).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, welche Auswirkungen experimentell induzierte Veränderungen der Konzentration von 17- $\beta$ -Östradiol auf die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare des Gyrus dentatus haben können. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen *in vivo* – an Mäusen und Ratten verschiedener Altersstufen – sowie an einem *in vitro*-Modell, organotypischen Gewebekulturen des Gyrus dentatus.

## 2.2 Anatomie des Hippocampus

Der Hippocampus zählt zu den evolutionär ältesten Strukturen des Wirbeltiergehirns. Er besteht aus dem Ammonshorn („Cornu ammonis“, CA), dem Gyrus dentatus und dem Subiculum. Beim Menschen liegt der Hippocampus in der Tiefe des Temporallobens (Abb. 1). Bei Maus und Ratte befindet sich der Hippocampus weiter kranial (Abb. 2).

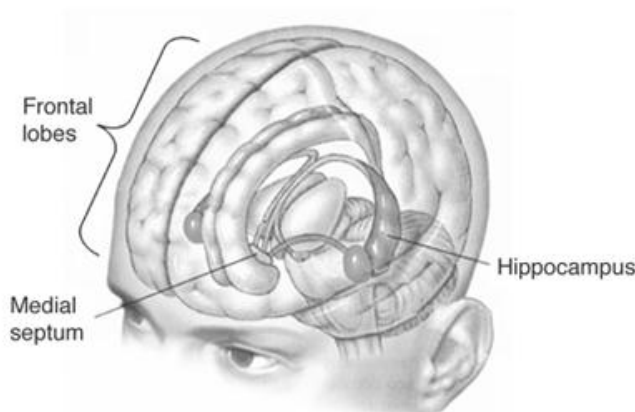


Abbildung 1: Lage des Hippocampus im menschlichen Gehirn. Miserlou 2008.

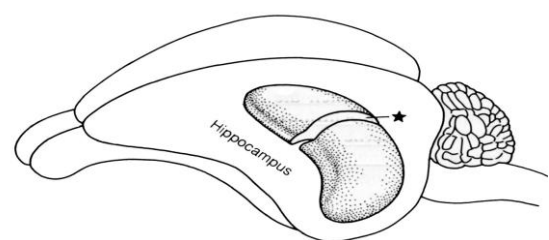


Abbildung 2: Lage des Hippocampus im Gehirn der Ratte. Akert 1994.

Der Hippocampus ist eine zentrale Schaltstelle des limbischen Systems und steht mit anderen Regionen dieses Systems (z. B. Hypothalamus, Septum-Kerne) über Bahn-systeme wie den Fornix in Verbindung.

Medizinhistorisch von Interesse ist, dass der venezianische Anatom Caesar Aranzi bereits 1564 den Hippocampus beschrieb als eine „Erhöhung, welche auf dem Boden des temporalen Hornes der Seitenventrikels entlang läuft“. Er verglich diese Struktur zunächst mit einem Seidenwurm und später mit einem Seepferdchen: „Hippocampus“ von griechisch: ἵππος, "Pferd" and griechisch κάμπος, "Meerungeheuer", dessen vordere Hälfte ein Pferd, der hintere Teil ein Fisch ist. Wohl wegen seiner optischen Ähnlichkeit mit einem Seepferdchen (Abb. 3) setzte sich seit 1706 der Begriff „Hippocampus“ durch.

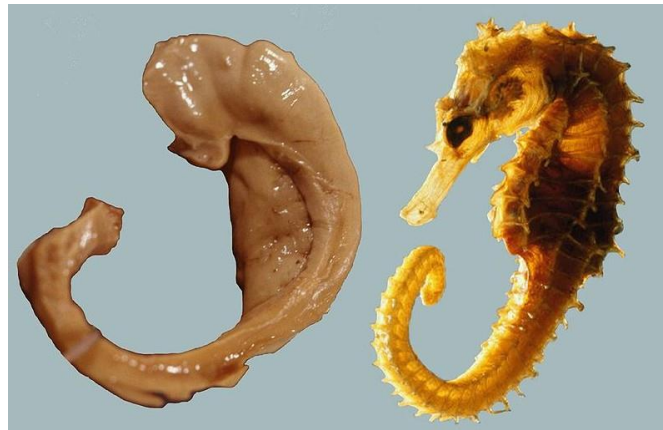


Abbildung 3: Vergleich Hippocampus und Seepferd. Seress 1980.

„Horn eines Widders“ schlug der dänische Anatom Jacob Winsløw 1732 als Bezeichnung vor und sein Pariser Kollege, der Chirurg René-Jaques Croissant de Garengeot prägte etwa zehn Jahre später den Begriff „cornu ammonis“ (= Horn des antiken ägyptischen Gottes Amun). Diese Begriffsgebung verwendete der spanische Mediziner Santiago Felipe Ramón y Cajal 1911 in seinen Zeichnungen in seiner Histologie des Nervensystems (Abb. 4), sie findet sich noch heute in den drei wichtigsten histologischen Untergliederungen des Hippocampus, CA1, CA2 und CA3 wieder (zur Medizinhistorie vgl. insgesamt <http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus>).

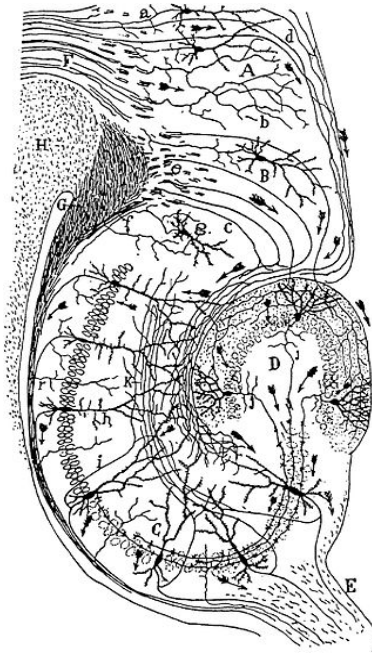


Abbildung 4: Zeichnung der neuronalen Verbindungen des Nagetier-Hippocampus. Cajal 1911.

Als archikortikale Struktur ist der Hippocampus dreischichtig: Im Ammonshorn und im Subiculum enthält die mittlere Schicht glutamaterge Pyramidenzellen. Die der Pia mater zugewandte, äußere Schicht, das Stratum moleculare, wird weiter unterteilt in ein Stratum lacunosum moleculare (SLM) und ein Stratum radiatum (SR), es ist zellarm und enthält vor allem die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen. Die innere, dem Ventrikellumen zugewandte Schicht (Stratum oriens, SO) enthält Zellkörper der hemmenden Korbzellen und polymorphe Zellen (Rohen 2001).

### 2.3 Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus umgibt das CA3-Ende des Cornu ammonis hufeisenförmig. Während der Hippocampus vorwiegend aus eng gepackten Pyramidenzellen besteht, finden sich im Gyrus dentatus kleine, dicht gepackte Körnerzellen. Sie entwickeln ihre Dendritenverzweigungen in nur einer Richtung auf die äußere Molekularschicht hin, alle anderen Zellen sind Interneurone. Die Körnerzellen sind glutamaterge Projektionsneurone, die dicht gepackt im Körnerzellband (Stratum granulare) gelegen sind. Zur Pia mater hin wird der Gyrus dentatus ebenfalls begrenzt durch ein Stratum moleculare, das die Dendriten der Körnerzellen enthält und auf der Grundlage unterschiedlicher axonaler Eingänge in eine innere, mittlere und äußere Schicht unterglie-

dert wird (siehe Abb. 5). Das polymorphe Stratum oriens der CA-Region entspricht im Gyrus dentatus dem Hilus.

Der Gyrus dentatus ist Eingangsstation für afferente Axone aus dem entorhinalen Cortex (EC). Diese Axone bilden in ihrer Gesamtheit den Tractus perforans und leiten dem Gyrus dentatus Informationen über nahezu alle Wahrnehmungen des Körpers zu. Sie enden im Stratum moleculare des Gyrus dentatus in sehr koordinierter Anordnung (Abb. 5): Axone aus dem medialen entorhinalen Cortex enden in der mittleren Zone, Axone aus dem lateralen entorhinalen Cortex in der äusseren Zone. Die innerste Zone des Stratum moleculare erhält assoziative und kommissurale Axone aus dem Gyrus dentatus selbst (Treves et al. 2008).

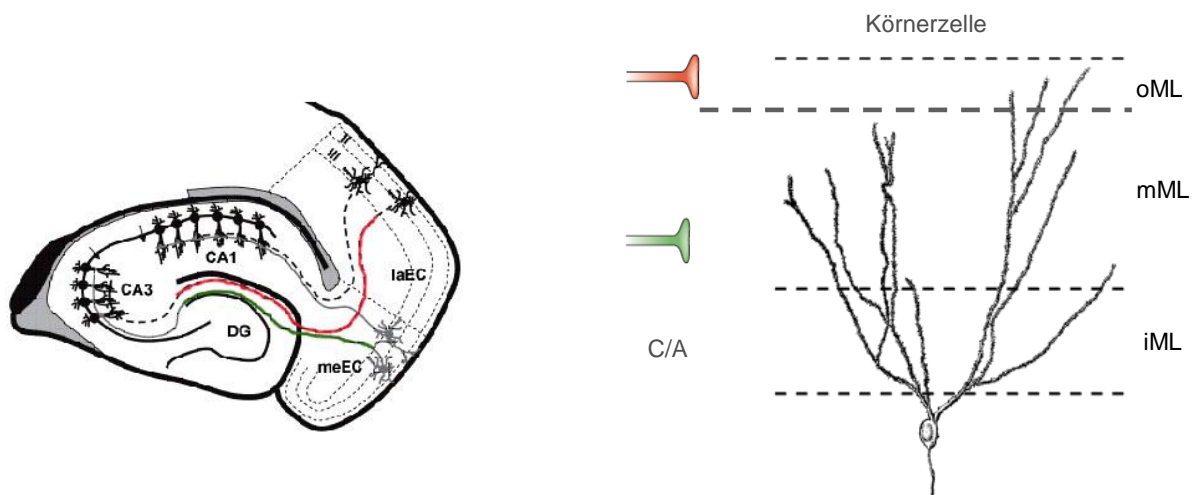


Abbildung 5: Projektion des Tractus perforans in das Stratum moleculare des Gyrus dentatus (modifiziert nach Förster et al. 2006)

Die synaptische Verbindung der Axone des Tractus perforans mit den Dendriten der Körnerzellen stellt die erste Station des trisynaptischen Schaltkreises durch den Hippocampus dar. Aktivierte Körnerzellen projizieren ihrerseits über die Moosfaserbahn zu Pyramidenzellen der CA3-Region als zweiter Station des Schaltkreises. Diese stellen über die Schaffer-Kollaterale mit Pyramidenzellen in CA1 als dritter Station Kontakt her, welche über eine Verbindung zurück zum entorhinalen Cortex – eventuell mit einer Zwischenstation im Subiculum – den Schaltkreis schließen. Somit kann die in den Hippocampus geschleuste Information an mehreren Stellen „bewertet“ und „bearbeitet“ werden.

## 2.4 Funktion des Hippocampus

Die medizinhistorisch älteste Hypothese ging davon aus, dass der Hippocampus eine Rolle im Bereich des Riechens spielt (Akert 1994). Diese Vorstellung war weitgehend durch die – später als nicht zutreffend bewertete – Vorstellung bestimmt, der Hippocampus erhalte direkte Afferenzen aus dem Bulbus olfactorius.

Nach heutiger Auffassung fließen im Hippocampus Informationen aus verschiedenen sensorischen Systemen zusammen, die dort verarbeitet und zum Neocortex zurückgesandt werden. Danach findet im Hippocampus die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis, die Gedächtniskonsolidierung statt (Wang und Morris 2010).

Der Hippocampus wird heute als Struktur gesehen, die über die Assoziation von sensorischen Eindrücken Erinnerungen generiert und auch für die Koordinierung der verschiedenen Gedächtnisinhalte verantwortlich ist. Bei Tieren hat der Hippocampus große Bedeutung für die räumliche Orientierung (Leutgeb et al. 2005).

## 2.5 Die Rolle von Östrogen im Hippocampus

Zahlreichen Studien zufolge ist 17- $\beta$ -Östradiol im Hippocampus an mehreren Funktionen wie der Regulierung der Spinesynapsendichte (Gould et al. 1990, Segal und Murphy 2001, Kretz et al. 2004), der synaptischen Aktivität (Smith und McMahon 2005), der Regulierung der Expression synaptischer Proteine (Furukawa et al. 1998, Mellon et al. 2001, Stoffel-Wagner 2001, Wehrenberg et al. 2001, Prange-Kiel et al. 2006, Fester et al. 2009b) oder der Neurogenese (Cambiasso 2000, Tanapat et al. 2001, Fester et al. 2006) beteiligt. Diese Effekte des 17- $\beta$ -Östradiol wurden zunächst auf eine Synapsen-modulierende Funktion der aus den Gonaden stammenden Östrogene zurückgeführt (Woolley und McEwen 1992). Allerdings wurde schon früher die Hypothese einer gonadenunabhängigen Wirkung von Steroiden im Gehirn aufgestellt (Corpéchet et al. 1981, 1983).

Nachdem entdeckt wurde, dass im Hippocampus Aromatase, das finale Enzym der Östradiolsynthese, exprimiert wird (Wehrenberg et al. 2001, Hojo et al. 2004) und in den Neuronen des Hippocampus 17- $\beta$ -Östradiol (E2) synthetisiert wird (Prange-Kiel et al. 2003, Kretz et al. 2004), entstand die Auffassung, dass das im Hippocampus selbst gebildete 17- $\beta$ -Östradiol – und nicht das aus den Gonaden stammende 17- $\beta$ -

Östradiol – maßgeblich als neuronaler Modulator im Hippocampus aktiv ist (Rune et al. 2006).

Andererseits ist aufgrund der Zyklus-Abhängigkeit der Effekte von 17- $\beta$ -Östradiol im Hippocampus davon auszugehen, dass die Östrogen-Produktion im Hippocampus der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Meethal et al. 2009) und damit auch der zyklischen Regulierung durch das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) unterliegt (Prange-Kiel et al. 2008, 2009).

Neurosteroide wirken offenbar neuroprotektiv – insbesondere Östrogene im Hippocampus (Green et al. 1997, Behl 2000, Lee und McEwen 2001, 2006, Astous et al. 2003, Brito et al. 2004, Schumacher et al. 2004, Stirone et al. 2005, Brann et al. 2007, Pike et al. 2008, Arevalo et al. 2009, 2011, DonCarlos et al. 2009) und können möglicherweise den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen, wie z. B. Morbus Alzheimer (Pike 1999, 2001, Behl 2005, Rosario und Pike 2008, Pike et al. 2009) oder Demenz verzögern (Tang et al. 1996, Kawas et al. 1997) bzw. nach Intoxikationen (Singer et al. 1999), bei Epilepsie und nach einem Schlaganfall die Prognose günstig beeinflussen (Garcia-Segura et al. 2001, Zhao et al. 2011).

Auch in der prä- und postnatalen Gehirnentwicklung üben Östrogene auf vielfältige, noch wenig erforschte Weise entscheidende Funktionen aus (McCarthy 2008, Pechenino und Frick 2009).

### 2.5.1 Östrogenbiosynthese

Östrogene sind Steroidhormone, die vorwiegend in den Gonaden (sowohl in den Ovarien als auch – in geringer Konzentration – in den Hoden) und in der Nebennierenrinde, in geringeren Mengen aber auch im Fett- und Muskelgewebe, sowie im Gehirn gebildet werden (Baulieu 1997, Zwain et al. 1999, Leidenberger et al. 2009).

Ausgangssubstanz der Biosynthese von 17- $\beta$ -Östradiol ist Cholesterol, das über mehrere Zwischenstufen zu Androstendion und Testosteron umgewandelt wird. Im letzten Schritt katalysiert Aromatase (Cytochrom P450 aro bzw. CYP19A1) – durch die Abspaltung der C19-Methylgruppe und Aromatisierung des Ringes A – die Umwandlung von Testosteron zu 17- $\beta$ -Östradiol (Löffler 2007).

Bemerkenswert war der Befund, dass Neurone des Hippocampus alle für die Steroidbiosynthese benötigten Enzyme exprimieren (Furukawa et al. 1998, Brake et al. 2001, Stoffel-Wagner 2001, Wehrenberg et al. 2001). Die Neurone des Hippocampus sind damit in der Lage, 17- $\beta$ -Östradiol *de novo* zu synthetisieren (Prange-Kiel et al. 2003, Hojo et al. 2004). Im Hippocampus von Ratten wurde sogar eine bis zu 6-fach höhere Konzentration von 17- $\beta$ -Östradiol als im Serum nachgewiesen (Hojo et al. 2004).

Vor diesem Hintergrund lässt sich aus der Feststellung, dass die Hemmung der Östrogensynthese im Hippocampus durch den Aromatase-Inhibitor Letrozol (Smith 1999) zu ganz erheblichen Veränderungen der Synapsendichte im Hippocampus führt (Kretz et al. 2004), schließen, dass es für die Regulierung der Synapsendichte im Hippocampus des in den Gonaden produzierten Östrogens nicht bedarf und im Hippocampus selbst synthetisiertes 17- $\beta$ -Östradiol entscheidenden Einfluss auf die synaptische Plastizität im Hippocampus hat (Prange-Kiel et al. 2004, Hojo et al. 2008, 2009). Das im Hippocampus gebildete 17- $\beta$ -Östradiol ist hier vermutlich der potentere Regulator (Rune et al. 2006).

### 2.5.2 Wirkweise von Östrogen im Hippocampus

Anders als in der Peripherie, wo Östrogene ihre Wirkung endokrin entfalten, wirken sie im Hippocampus para- und autokrin, d. h. sie gelangen durch Diffusion zu benachbarten Zellen und dort über Diffusion oder aktive Transportmechanismen durch die Plasmamembran ins Zytosol. Im Zytosol werden Östrogene an Rezeptorproteine gebunden und in den Zellkern transferiert. Diese Wirkweise wird als sogenannter „genomischer“ Weg bezeichnet (Levin 2005). Dabei sind bislang zwei Östrogenrezeptorsubtypen – ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  – bekannt (Österland et al. 1998, Morissette et al. 2008a), weitere Subtypen werden vermutet (Toran-Allerand 2004).

Die Expression und Freisetzung von 17- $\beta$ -Östradiol wird unter anderem durch neuronale Aktivität (Balthazart und Ball 2006) stimuliert und ihre Bindung an die Rezeptoren auf den Zielzellen bewirkt eine Veränderung dieser Zellen, die sehr schnell erfolgen kann. Neben der genomischen Signaltransduktion wird daher auch die Existenz nicht-genomischer Signaltransduktionswege über membranassoziierte Signalkaskaden vermutet (Beyer et al. 2003, Levin 2005, Jelks et al. 2007, Fernandez et al.



2008, Fan et al. 2010). Das neuronal freigesetzte 17- $\beta$ -Östradiol wird daher mehr als Neurotransmitter bzw. Neuromodulator denn als Hormon angesehen (Balthazart und Ball 2006).

## 2.6 Pathologische Veränderungen des Hippocampus

Pathologische Veränderungen des Hippocampus führen vor allem zu Verlusten des deklarativen Gedächtnisses und zu örtlicher Desorientierung (Spiers et al. 2001), das prozedurale Gedächtnis ist meist nicht betroffen. Die Bedeutung von Neurosteroiden bei diesen Symptomen wurde bei Morbus Alzheimer (Henneman et al. 2009b, Whar-ton et al. 2009), nach Zerebraltraumata und Schlaganfällen (Miller et al. 2005, Barre-to et al. 2009, Li et al. 2011), bei Morbus Parkinson (Garcia-Segura et al. 2001, Azcoitia et al. 2002, Kadish und van Groen 2002, Cho et al. 2003, Saunders-Pullmann 2003, Morisette et al. 2008b), Hypoxie, Enzephalitis (Trepel 2008), bei schizophrenen Krankheitsbildern (Harrison 2003), sowie bei Temporallappenepilepsie (Kurz et al. 2003, Duzel et al. 2004) untersucht.

Altern allein führt zwar nicht zu einem substantiellen Neuronenverlust im Hippocampus, doch die synaptischen Verbindungen verändern sich. Im Zusammenhang mit Alterungsprozessen beim Menschen fiel vor allem bei Frauen nach der Menopause ein Abbau der mnestischen Leistungsfähigkeit auf (Hampson 1990, Henderson 2009), der die Frage nach der Wirkung der Veränderungen des Östrogen-Haushaltes auf den Hippocampus aufwarf.

Es liegt nahe, nachlassende Gedächtnisleistungen auf einen in der Menopause herrschenden Östrogenmangel zurückzuführen. Ein erhöhter Östrogenspiegel wiederum kann sich offenbar positiv auf die Gedächtnisfunktion auswirken (Caldwell und Watson 1952, Campbell und Whitehead 1977, Sherwin 1988, 1996, 2003, Hampson 1990, Dreher et al. 2007, Henderson 2009). Grundlage dafür könnten die von zahlreichen Arbeitsgruppen beobachteten Wirkungen von 17- $\beta$ -Östradiol auf die synaptische Plastizität im Hippocampus sein.

## 2.7 Überleitung zu den Experimenten

Die Östrogenforschung im Hippocampus fokussierte sich lange Zeit auf die CA1-Region, in der die ersten von 17- $\beta$ -Östradiol abhängigen Effekte beobachtet wurden (Goeld et al. 1990, Woolley und McEwen 1992). Neuere Untersuchungen lassen

vermuten, dass Östrogenwirkungen im Hippocampus nicht auf die CA1-Region beschränkt sind.

Östrogenrezeptoren werden hoch konzentriert auch in der CA3-Region exprimiert (Shughrue und Merchenthaler 2000, Mehra et al. 2005) und – wie neue Arbeiten zeigen – auch im Gyrus dentatus, in welchem insbesondere in frühen Entwicklungsstadien eine markante Expression in speziellen, die Differenzierung fördernden Cajal-Retzius-Zellen gefunden wurde (Bender et al. 2010). Außerdem fördert das im Hippocampus gebildete 17- $\beta$ -Östradiol die Neurogenese von Körnerzellen im Gyrus dentatus (Tanapat et al. 1999, Fester et al. 2006).

Es liegt daher die Hypothese nahe, dass 17- $\beta$ -Östradiol im Gyrus dentatus Einfluss auf die Spinesynapsendichte nimmt – wie es in der CA1-Region beobachtet wurde (Leranth et al. 2003, Kretz et al. 2004).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Um die Wirkungen einer veränderten Produktion von 17- $\beta$ -Östradiol auf die neuronale Plastizität im Gyrus dentatus zu untersuchen, wurde adulten, zwölf Wochen alten, weiblichen Mäusen sieben Tage lang täglich intraperitoneal Letrozol injiziert. Letrozol ist ein potenter Inhibitor der Aromatase (Smith 1999), der die Aktivität des Enzyms bis auf zehn Prozent reduzieren kann und dadurch die Menge an zirkulierendem Östrogen massiv reduziert (Foidart et al. 1995, Geisler et al. 2002). Am Ende der Behandlungsperiode wurden die Mäuse getötet, der Hippocampus für eine elektronenmikroskopische Analyse aufbereitet, und die Dichte exzitatorischer Synapsen, d. h. Synapsen auf Dornfortsätzen („Spinesynapsen“) im Stratum moleculare des Gyrus dentatus bestimmt. Als Kontrollgruppen wurden nur mit Kontroll-Lösung behandelte weibliche sowie ovariectomierte Mäuse gleichen Alters gewählt.
2. Um zu überprüfen, ob die Wirkung von 17- $\beta$ -Östradiol im Gyrus dentatus entwicklungsabhängig auftritt, wurde in einem zweiten Versuchsansatz immaturren, neun Tage alten, weiblichen Ratten ebenfalls sieben Tage lang täglich intraperitoneal Letrozol injiziert. Als Kontrollgruppe wurden hier nur mit Kontroll-Lösung behandelte, gleichaltrige Tiere verwendet.

3. Organotypische Gewebekulturen des Hippocampus von immaturren, fünf Tage alten, weiblichen Ratten wurden verwendet, um zu testen, ob sich dieses Experimentalmodell für Untersuchungen *in vitro* eignet. In diesen Experimenten wurde den Kulturen in getrennten Ansätzen Letrozol bzw. 17- $\beta$ -Östradiol zugegeben. Untersucht wurden ebenfalls Auswirkungen auf die Dichte exzitatorischer Synapsen.

Die Versuche selbst wurden von Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt. Meine Aufgabe bestand darin, als vollständig geblindete Untersucherin die elektronenmikroskopisch angefertigten Fotos auszuwerten und die Resultate der experimentellen Ansätze miteinander zu vergleichen und zu bewerten. Die Beschreibung der Versuchsabläufe und -methoden basiert auf Protokollen und Darstellungen der Labormitarbeiter.

### 3 Material

#### 3.1 Arbeitsmaterialien, Geräte

Aluminiumfolie	LAGER UKE
Aesculap Rasierer	BRAUN
Brutschrank	MEMMERT
Chirurgisches Besteck	F.S.T. (Fine Science Tools)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	HERAEUS
Desinfektionsmittel (Sterillium)	BODE
Einmalkanüle	BRAUN
Einmalhandschuhe	HARTMANN
Einmalskalpell	BRAUN
Einmalspritzen 1 ml	BRAUN
Elektronenmikroskop MC 100	PHILIPS
Eukobrom SW Papierentwickler	TETENAL
Falcon Kulturplatten ("6 well")	BECTON DICKINSON
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BECTON DICKINSON
Fotopapier Nr. 3, DIN A 4	TETENAL
Gewebehäcksler (Tissue Chopper)	MC ILWAIN
Heidemannspatel	AESFULAP DE
Kühlschrank	BOSCH/LIEBHERR
Lichtmikroskop	OLYMPUS/ZEISS
Lupe	ZEISS
Millicell-CM (Biomembran)	MILLIPORE
Negativentwickler	KODAK
Pasteurpipetten	ASSISTENT
Perfusionspumpe Masterflex <sup>®</sup>	COLE PARMER
Pipetten, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Pipettenspitzen verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Reaktionsgefäße verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Rollrandschnappgläser	WINDAUS
Rotlichtlampe	HANAULUX
Scanner	BROTHER MFC 8440
Schere	FINE SCIENCE TOOLS

Serologische Pipetten	FALCON
Stericup Filter	MILLIPORE
Ultramikrotom	REICHERT JUNG
Waage	METTLER

### 3.2 Chemikalien

Aqua dest.	IONENAUSTAUSCHER/UKE
Aqua ad iniectabilia	BAXTER
Blei-II-citrat	MERCK
Carprofen (Rimadyl®)	PFIZER
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	MERCK
Dodeceny succinic anhydride (DDSA)	SERVA
Ethanol 100 %	MERCK
Glutamin	INVITROGEN
Glutardialdehyd	MERCK
Glycidether 100	SERVA
Hank´s Balanced Salzlösung (HBSS)	INVITROGEN
Ketamin	GRÄUB
Letrozol (fest)	FEMARA
Letrozol-Stammlösung	UKE-APOTHEKE
Methyl Nadic Anhydrid (MNA)	SERVA
Natriumchlorid	MERCK
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	MERCK
Natriumhydroxid	MERCK
Natriumhydrogencarbonat	INVITROGEN
Natriumtetraborat	MERCK
17-β-Östradiol (wasserlöslich)	SIGMA
Osmiumtetroxid	ROTH
Paraformaldehyd reinst	MERCK
PBS-Tabletten	INVITROGEN
Penicillin	INVITROGEN
Pferdeserum	INVITROGEN
Propylenoxid	SERVA
Saccharose	MERCK

Streptomycin	INVITROGEN
Toluidinblau	CHROMA
Trinatriumcitrat Dihydrat	MERCK
Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	SERVA
Uranylacetat	MERCK
Xylazin (Rompun <sup>®</sup> )	BAYER

### 3.3 Herstellung von Lösungen

#### 3.3.1 Versuchslösungen

##### *3.3.1.1 Letrozol-Ansatz für in vivo-Experimente mit Mäusen und Ratten*

Die Letrozol-Stammlösung 300 µg Letrozol in 50 µl 96 % Ethanol

(entspricht 6 µg Letrozol pro µl 96 % Ethanol) wurde für die Injektion

- adulter Mäuse 1 : 1
- immaturer Ratten 1 : 2 mit
- 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt.

##### *3.3.1.2 Letrozol-Ansatz für in vitro-Experimente (Gewebekulturen)*

Zur Herstellung der Lösung wurden 2,85 mg Letrozol in

- 1 ml 96 % Ethanol gelöst ( $10^{-2}$  M) und mit
- 99 ml Aqua dest. verdünnt (Arbeitskonzentration  $10^{-4}$  M). Anschließend wurde diese Lösung 1 : 1.000 mit Inkubationsmedium verdünnt (Endkonzentration:  $10^{-7}$  M).

##### *3.3.1.3 17-β-Östradiol (E2)-Lösung für in vitro-Experimente (Gewebekulturen)*

Zur Herstellung der Lösung wurden 2,72 mg E2 in 100 ml Aqua dest. (Arbeitskonzentration  $10^{-4}$  M) gelöst. Anschließend wurde diese Lösung 1 : 1.000 mit Inkubationsmedium (Endkonzentration:  $10^{-7}$  M) verdünnt.

### 3.3.2 Medien (Gewebekulturen)

#### *3.3.2.1 Präparationsmedium*

Zur Herstellung von 100 ml Präparationsmedium wurden

- 50 ml Minimum Essential Medium
- 1 ml Glutamin (200 mM) und
- 49 ml aqua ad iniectabilia steril gemischt.

Einstellung des pH auf 7,35 mit Natronlauge (1 M NaOH).

#### *3.3.2.2 Inkubationsmedium*

Zur Herstellung von 100 ml Inkubationsmedium wurden

- 25 ml Minimum Essential Medium
- 1 ml Glutamin, 200 mM, steril
- 0,58 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (7,5 %), steril
- 25 ml Hanks Balanced Salts (HBSS)
- 25 ml Pferdeserum, steril
- 1 ml Penicillin ( $10^4$  Units)/Streptomycin ( $10^4$  µg) und
- 22,42 Aqua ad iniectabilia steril gemischt.

Einstellung des pH auf 7,35 mit Natronlauge (1 M NaOH).

### 3.3.3 Anästhesie-Injektionslösung

Zur Herstellung von 10 ml Anästhesie-Injektionslösung vor Ovariectomie bzw. transkardialer Perfusion wurden

- 1,25 ml Ketamin-Lösung (100 mg/ml)
- 0,625 ml Xylazin (Rompun<sup>®</sup>-Lösung (20 mg/ml) mit
- 8,125 ml 0,9 % NaCl-Lösung gemischt.

Es wurden ca. 0,2 ml der Lösung pro Tier (Gewicht: 20 - 30 g) eingesetzt.

### 3.3.4 Schmerzbehandlung nach Ovariectomie

Zur Herstellung der Analgesie-Injektionslösung nach Ovariectomie wurde

- 0,1 ml Carprofen (Rimadyl<sup>®</sup>, 50mg/ml) mit 0,9 % NaCl auf 8 ml aufgefüllt.

### 3.3.5 Gewebefixierung

#### *3.3.5.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 1 x), 1.000 ml*

Hergestellt durch Lösung einer PBS-Tablette in 1 l Aqua dest. Diese enthält:

- 9 g Natriumchlorid (NaCl)
- 0,795 g Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 0,144 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Die Pufferlösung wurde abschließend mit Natronlauge (2M NaOH) auf einen pH von 7,4 eingestellt.

#### *3.3.5.2 Phosphatpuffer (PB, 0,2 M) 1.000 ml*

- 5,52 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )
- 42,88 g Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )  
wurden in
- 800 ml Aqua dest. gelöst, mit Natronlauge (2M NaOH) auf einen pH von 7,4 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1.000 ml aufgefüllt.

#### *3.3.5.3 Glutardialdehyd (GA, 2,5 %), in 0,1 M PB, 10 ml, für transkardiale Perfusion*

- 1 ml 25 % Glutardialdehydlösung wurden mit
- 4,5 ml 0,2 M PB und
- 4,5 ml Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt.

#### *3.3.5.4 Paraformaldehyd (PFA, 4 %) in PBS, 1.000 ml*

- 40 g Paraformaldehyd wurden in
- ca. 850 ml 1x PBS 15 min. auf 60 - 65 °C erhitzt und
- mit 10-molarer Natronlauge (10M NaOH) tropfenweise klar titriert
- auf Eis abgekühlt, bei Raumtemperatur mit Salzsäure (2M HCl) auf pH 7,4 eingestellt und mit PBS auf 1.000 ml Volumen aufgefüllt.



### 3.3.5.5 Paraformaldehyd (PFA, 4 %) / Glutardialdehyd (GA, 0,1 %)-Gemisch, in PBS, für die Fixierung von Gewebekulturen:

- zu 9,96 ml 4 % PFA-Lösung (in PBS) werden 0,04 ml 25 % GA-Lösung zugegeben.

## 3.3.6 Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie

### 3.3.6.1 Nachfixierung

Stammlösung A:

Zur Herstellung von 100 ml dieser Lösung (2 % Osmiumtetroxid) wurden

- 2 g Osmiumtetroxid in
- 100 ml Aqua dest. gelöst.

Stammlösung B:

Zur Herstellung von 100 ml dieser Lösung wurden

- 6,846 g Saccharose in
- 100 ml 0,2 M PB gelöst.

Stammlösung A und B wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

### 3.3.6.2 Dehydrierung

Zur Dehydrierung des Gewebes wurden eine aufsteigende Ethanolreihe (35 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %) und abschließend eine Propylenoxid verwendet.

### 3.3.6.3 Polymerisierung

Stammlösung A:

- 77 ml Glycidether wurden mit
- 125 ml DDSA gemischt.

Stammlösung B:

- 100 ml Glycidether wurden mit
- 89 ml MNA gemischt.

Die Stammlösungen A und B wurden im Verhältnis 4 : 6 mit 2 % Accelerator (= 2,4,4-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol) schlierenfrei angerührt.

#### 3.3.6.4 Einfärbung

Zur Herstellung der Lösung wurde

- 1 g Toluidinblau (1 %) in
- 100 ml Borax-Lösung (1 g Natriumtetraborat, 1 % in 100 ml 0,2 M PB) gelöst.

#### 3.3.6.5 Kontrastierung

Zur Herstellung der Kontrastierungslösung wurden

- 0,5 g Uranylacetat in 50 ml Aqua dest. gelöst

Zur Herstellung der Bleicitrat-Arbeitslösung nach Reynolds wurden

- 1,33 g Blei-II-Nitrat und
- 1,76 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat zunächst in
- 30 ml Aqua dest. gelöst, mit
- Natronlauge 1 M klartitriert und auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

### 3.4 Software

Adobe Reader 8.1.3. deutsch	ADOBE
Brother MFL-Pro Suite	BROTHER
Excel 2003	MICROSOFT
Photoshop CS3	ADOBE
Word 2003	MICROSOFT
GraphPadPrism	GRAPHPAD SOFTWARE INC.

## 4 Methoden

### 4.1 Eingesetzte Tiere

Die Versuchsreihe wurde von der zuständigen Behörde für Umwelt und Gesundheit, Referat Tierschutz genehmigt. Alle eingesetzten Tiere – Mäuse des Zuchtstammes C57BL/6N bzw. Ratten des Zuchtstammes WISTAR – stammten aus der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Tiere wurden in geräumigen Käfigen mit einem Licht-Dunkelzyklus von jeweils zwölf Stunden im Wechsel gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Insgesamt wurden drei Versuchsreihen gebildet, eine mit adulten Mäusen, eine mit immaturren Ratten und eine mit Gewebekulturen von immaturren Ratten. Bei allen drei Experimenten wurde das *in vivo* bzw. *in vitro* gewonnene Hippocampus-Gewebe für die Elektronenmikroskopie präpariert, ultradünn geschnitten und von den Schnitten elektronenmikroskopisch fotografische Aufnahmen aus dem Stratum moleculare (mittlere Schicht) angefertigt. In diesen Fotografien wurden exzitatorische Synapsen, die typischerweise an Dornfortsätzen – sog. „Spinesynapsen“ – zu finden sind, markiert, ihre Dichte quantifiziert (zum Verfahren der Quantifizierung siehe 4.8.) und die Resultate der experimentellen Ansätze miteinander verglichen.

Experimente <i>in vivo</i>	Behandlungsart, -dauer und Anzahl (n) eingesetzter Tiere		
<b>Experiment 1:</b> 10 weibliche, adulte Mäuse Injektionsbeginn 13. Lebenswoche	<b>Letrozol</b> 10 µg/g KG 7 Tage, 1 x täglich i. p.  <b>n = 3</b>	<b>Kontroll-Lösung</b> 7 Tage, 1 x täglich i. p.  <b>n = 4</b>	<b>OVX (11. Lebenswoche) + Kontroll-Lösung</b> 7 Tage, 1 x täglich i. p.  <b>n = 3</b>
<b>Experiment 2:</b> 9 weibliche, immaturre Ratten Injektionsbeginn 10. Lebenstag	<b>Letrozol</b> 4 µg/g KG 7 Tage, 1 x täglich i. p.  <b>n = 5</b>	<b>Kontroll-Lösung</b> 7 Tage, 1 x täglich i. p.  <b>n = 4</b>	

Tabelle 1: Schematische Übersicht über die *in vivo*-Experimente

Experimente <i>in vitro</i>	Behandlungsart, -dauer und Anzahl (n) eingesetzter Kulturen			
<b>Experiment 3:</b> 36 Gewebekulturen aus 8 weiblichen, 5 Tage alten Ratten	<b>Letrozol</b> 10 <sup>-7</sup> M 7 Tage  <b>n = 9</b>	<b>Kontroll-Lösung</b> 7 Tage  <b>n = 9</b>	<b>E2</b> 10 <sup>-7</sup> M 7 Tage  <b>n = 9</b>	<b>Kontroll-Lösung</b> 7 Tage  <b>n = 9</b>

Tabelle 2: Schematische Übersicht über die *in vitro*-Experimente

## 4.2 Durchführung der Experimente *in vivo* mit adulten, weiblichen Mäusen (Experiment 1)

### 4.2.1 Behandlung mit Letrozol bzw. Kontroll-Lösung

Um die Wirkung der Aromataseinhibition auf die Spinesynapsendichte in der Molekularschicht des Gyrus dentatus zu untersuchen, wurde in der ersten Versuchsreihe drei adulten, d. h. bei Versuchsbeginn zwölf Wochen alten, weiblichen Mäusen sieben Tage lang einmal täglich, jeweils zur gleichen Uhrzeit intraperitoneal Letrozol injiziert (10 µg/g KG, Injektionsvolumen 50-100 µl, Zhou et al. 2010). Letrozol ist in der heute üblicherweise verwendeten Konzentration nur in 96 % Ethanol gut löslich. Die adulten, etwa 25 g schweren Mäuse standen nach der Injektion einige Stunden erkennbar unter der Wirkung des Alkohols. Andere Möglichkeiten, das Letrozol in überprüfbarer Menge mit geringerer Belastung der Tiere zu applizieren, wurden geprüft, lagen aber nicht vor.

Vier adulten, zwölf Wochen alten, weiblichen Mäusen der einen Kontrollgruppe (Kontrollgruppe 1) wurde unter im Übrigen gleichen Bedingungen die Kontroll-Lösung (96 % Ethanol 1 : 1 verdünnt in 0,9 % NaCl) injiziert.

Um die Wirkung vollständiger systemischer Inhibition der Östrogenbildung durch Letrozol mit der Wirkung des Verlustes nur des gonadal produzierten Östrogens zu vergleichen, war eine weitere Kontrollgruppe (Kontrollgruppe 2) mit drei adulten, weiblichen Mäusen zuvor ovariectomiert worden (siehe 4.2.2). Ihnen wurde unter im Übrigen gleichen Bedingungen die Kontroll-Lösung injiziert.

### 4.2.2 Ovariectomie

Die Ovariectomie wurde zu Beginn der 11. Lebenswoche durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Mäuse zunächst mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, 0,2 ml i. p. bei ca. 25 g Körpergewicht) anästhetisiert. Diese Injektion führte nach etwa einer Minute zur tiefen Narkose der Tiere. Anschließend wurde im Abdomenbereich zunächst eine ca. 2 x 2 cm messende Fläche des Fells rechts und links oberhalb der Hinterläufe mit einem handelsüblichen Handrasierer rasiert. Nach Prüfung der Schmerzreflexe wurde die rasierte Haut mit einem Einmalskalpell ca. 1,5 cm inzisiert. Die Faszie und der darunter liegende Muskel wurden in Längsrichtung eröffnet. Nach Aufsuchen der Tuba uterina wurden deren zu- und abführende

Gefäße mit resorbierbarem Faden abgebunden und die Ovarien danach entfernt. Anschließend wurden Muskel und Muskelfaszie wieder vernäht und der Hautschnitt mit Klammern wieder verschlossen. Zur Schmerzlinderung wurde den Mäusen postoperativ 0,125 mg Carprofen (Rimadyl®) intraperitoneal verabreicht. Um postoperative Auskühlung zu verhindern, wurden die ovariectomierten Mäuse bis zum Abklingen der Narkose mit Rotlicht bestrahlt und nach Erwachen aus der Narkose zwei Stunden lang beobachtet. Zu Beginn der 13. Lebenswoche wurde diesen Mäusen analog zur Kontrollgruppe 1 (siehe 4.2.1) sieben Tage lang einmal täglich Kontroll-Lösung injiziert (Kontrollgruppe 2).

#### **4.3 Durchführung der Experimente *in vivo* mit immaturren, weiblichen Ratten (Experiment 2)**

In diesem Experiment wurde fünf immaturren – zu Beginn des Versuches neun Tage alten – weiblichen Ratten sieben Tage lang einmal täglich und jeweils zur gleichen Uhrzeit intraperitoneal eine Letrozol-Lösung injiziert. Da die immaturren Ratten die bei adulten Mäusen verwendete Letrozol-Konzentration nicht tolerierten, wurde ihnen eine geringere Konzentration injiziert (4 µg/g KG). Die Kontrollgruppe mit vier gleichaltrigen Ratten erhielt unter ansonsten gleichen Bedingungen sieben Tage täglich eine intraperitoneale Injektion der entsprechenden Kontroll-Lösung (96 % Ethanol 1 : 2 verdünnt in 0,9 % NaCl).

#### **4.4 Transkardiale Perfusion und Entnahme des Hippocampus**

Sechs Stunden nach der letzten Injektion wurden die mit Letrozol- bzw. Kontroll-Lösung behandelten adulten Mäuse oder immaturren Ratten wie unter 4.2.2. beschrieben mit einer Ketamin-Xylazin-Lösung narkotisiert. Die drei ovariectomierten Mäuse wurden nach Abschluss der 13. Lebenswoche ebenso behandelt. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere auf dem Rücken liegend fixiert.

In tiefer Narkose wurden mit einer Schere Bauchdecke und Peritoneum eröffnet, das Diaphragma durchtrennt und damit die Herzspitze sichtbar gemacht. Eine mit einem Perfusor verbundene Kanüle wurde in den linken Ventrikel geschoben und gleichzeitig der rechte Vorhof inzidiert. Über den Perfusor wurde zuerst das Blut mittels PBS aus dem Körper des Tieres gespült. Anschließend wurde das Tier etwa 15 Minuten lang transkardial perfundiert (mit 2,5 % GA in 0,1 M PB) und so eine erste Fixierung des Gehirns durchgeführt.

Nach Abschluss der Perfusion wurde das jeweilige Tier dekapitiert und die Haut über der Schädelkalotte resiziert. Nach median sagittaler Eröffnung des Schädeldachs mit einer feinen Schere wurde das Gehirn mit einem Heidemannspatel aus dem Schädel entnommen und auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt.

Das Kleinhirn wurde mit einem Skalpell abgetrennt und beide Gehirnhälften durch einen median-sagittalen Schnitt voneinander getrennt. Mit einem Heidemannspatel wurden aus beiden Gehirnhälften die Hippocampi herauspräpariert, in jeweils ein Röhrchen mit 10 ml 2,5 % Glutardialdehyd in 0,1 M PB gegeben und 48 Stunden lang bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Hippocampi weitere fünfzehn Stunden lang bei 4 °C in 0,1 M PB gelagert, welcher alle drei Stunden erneuert wurde.

#### **4.5 Herstellung und Behandlung organotypischer Gewebekulturen immaturer, weiblicher Ratten (Experiment 3)**

Zur Untersuchung der Wirkung von Letrozol und 17- $\beta$ -Östradiol *in vitro* wurden organotypische Gewebeschnittkulturen des entorhino-hippocampalen Systems nach der Methode von Li et al. (1994) angelegt und nach der Methode von Stoppini et al. (1991) kultiviert. Dafür wurden insgesamt acht, bei Kulturanlage fünf Tage alte, weibliche Ratten eingesetzt. Diese wurden durch einen Scherenschnitt dekapitiert, die Schädelkalotte eröffnet, das Gehirn entnommen und entlang der Fissura sagittalis halbiert. Der Hippocampus wurde zusammen mit dem benachbarten entorhinalen Cortex mit einem Heidemannspatel explantiert, auf die Ablage eines Gewebehäckslers (McIlwain) gelegt und in horizontaler Schnittebene geschnitten, so dass in den entstehenden, 400  $\mu$ m dicken Scheiben sowohl Hippocampus als auch entorhinaler Cortex zusammenhängend erhalten blieben. Bei dieser Schnitttechnik (Li et al. 1994) bleiben viele Axone des Tractus perforans einerseits erhalten, andererseits wachsen die während der Präparation durchtrennten Axone innerhalb von Tagen wieder in ihr Zielgebiet ein, so dass die entorhinal-hippocampale Verbindung substantiell erhalten bleibt.

Die Schnitte wurden anschließend in Präparationsmedium gesammelt und unter lichtmikroskopischer Kontrolle in jeweils benachbarte, morphologisch vergleichbare Pärchen (Schwesterkulturen) eingeteilt.

Unter sterilen Bedingungen wurden dann Zellkulturplatten (*six-wells*) mit jeweils 1 ml Inkubationsmedium befüllt und Biomembranen (Millicell: 0,4 µm Dicke, 30 mm Durchmesser) in diese eingelassen. Die ausgewählten Kulturen wurden auf die angefeuchteten Biomembranen transferiert und im befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> elf Tage lang kultiviert. „Schwesterkulturen“ wurden dabei auf verschiedene Membranen verteilt, die unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt wurden.

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde jede der insgesamt 36 Kulturen immer nur mit der entsprechenden „Schwesterkultur“ verglichen. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert.

Nach vier Tagen Vorinkubation wurde dem Medium Letrozol ( $10^{-7}$  M, 1 µl), E2 ( $10^{-7}$  M, 1 µl) bzw. in den „Schwesterkulturen“ nur das jeweilige Lösungsmittel (1 µl) zugesetzt. Die Inkubation mit diesen Substanzen wurde über sieben Tage beibehalten, das Medium dabei weiterhin jeden zweiten Tag gewechselt. Zum Abschluss wurden die noch auf der Membran fixierten Kulturen kurz mit PBS gespült und danach zur Gewebefixierung zwei Stunden lang mit einer Lösung von 4 % PFA und 0,1 % Glutaraldehyd (in PBS) überschichtet. Danach wurden die Kulturen von den Membranen abgelöst und weitere vier Stunden lang in Fixierungslösung und anschließend in 0,1 M PB gelagert.

## **4.6 Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie**

### 4.6.1 Nachfixierung

Zur Optimierung der Darstellbarkeit des Gewebes wurden die wie beschrieben vorfixierten Präparate nachfixiert. Dazu wurden eine Stammlösung mit 2 % Osmiumtetroxid und eine zweite Stammlösung mit Saccharose in 0,2 M PB hergestellt. Die beiden Stammlösungen wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Mit dieser Fixierlösung wurden die Präparate in Rollrandschnappgläsern jeweils eine (Hippocampus) bzw. zwei Stunden (Kulturen) lang vollständig bedeckt.

### 4.6.2 Dehydrierung

Um die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe zu entwässern, wurde zunächst 35 % Ethanol so in die Rollrandschnappgläser gegossen, dass die Präpa-

rate vollständig bedeckt waren. Nach zehn bis fünfzehn Minuten wurde der Alkohol abgegossen. Der Vorgang wurde mit 50 %, 70 %, 96 % und quasi 100 % Ethanol wiederholt. Um eine fast vollständige Entwässerung des Gewebes zu erreichen, wurden die Präparate etwa eine Stunde lang mit stark flüchtigem Propylenoxid inkubiert.

#### 4.6.3 Polymerisierung

Zur Polymerisierung wurden vier Teile einer DDSA enthaltenden Glycidether-Stammlösung und sechs Teile einer MNA enthaltenden Glycidether-Stammlösung mit einem der Aushärtung dienenden Accelerator schlierenfrei zu einer Gebrauchslösung angerührt. Um das Eindringen des Kunststoffes in das Gewebe zu verbessern, wurden drei Teile der Gebrauchslösung mit einem Teil Propylenoxid zu einem Intermedium gemischt, in welches die Präparate zur Einwirkung über Nacht überführt wurden. Die Präparate wurden in Flacheinbettungsformen überführt und zur Auspolymerisierung bei 68 °C im Brutschrank über Nacht gelagert. Anschließend wurden die Polymere getrimmt.

#### 4.6.4 Schnitthanfertigung und Einfärbung

Die Polymere wurden in die Haltevorrichtung des Mikrotoms eingespannt. Mit Diamantschneidern wurden 1-µm dicke Schnitte angefertigt und schwimmend aufgefangen und mit in Borax-Lösung (1 %) gelöstem Toluidinblau (1 %) bei 80 °C etwa zwei Minuten lang für die Lichtmikroskopie eingefärbt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, um geeignete Gewebeabschnitte unter der Lupe herauszupreparieren. Mit dem Ultramikrotom wurden maximal 0,1 µm dicke Schnitte angefertigt. Jeweils zwei Folgeschnitte wurden mit Platindrahtösen auf einen drei Millimeter Durchmesser großen Schlitzträger mit 200 mesh (Linien pro Inch) aufgezogen.

#### 4.6.5 Kontrastierung

Die Schnitte wurden mit in Aqua dest. gelöstem Uranylacetat (1 %) und nach der Methode von Reynolds (1963) hergestellten Bleicitrat-Lösung kontrastiert. Anschließend wurden die Schlitzträger mit Aqua dest. gespült und in Sammeldosen überführt.



#### 4.7 Elektronenmikroskopie und Anfertigung der Fotos

Im Elektronenmikroskop wurden in den Schnitten bei etwa 6.600-facher Vergrößerung geeignete Bereiche gesucht. Bereiche, welche von interferierenden Strukturen wie großen Dendriten oder Blutgefäßen erfüllt waren, wurden gezielt vermieden. Pro Schlitzträger wurden von den jeweiligen Schwesterpräparaten jeweils zehn verschiedene Felder ausgesucht und ein elektronenmikroskopisches Negativbild angefertigt (d. h. insgesamt zwanzig Aufnahmen bzw. zehn zu vergleichende Bildpaare), welches automatisch beschriftet und mit einem Maßstab versehen wurde.

Das Fotonegativ wurde entwickelt, fixiert und getrocknet, mit einem Vergrößerungsgerät Fotopapier (DIN A4-Format) belichtet, welches entwickelt, fixiert, gewässert und getrocknet wurde.

#### 4.8 Bildanalyse und -auswertung

Die Anzahl der Spinesynapsen wurde anhand eines Standard-Protokolls ermittelt (Leranth et al. 2000, Zhou et al. 2010). Die Analysen wurden vollständig mit kodierten Schnitten durchgeführt und die Untersucherin war nicht darüber informiert, welches Experiment sie bearbeitete.

Um eine vergleichbare Anzahl von Spinesynapsen zu erhalten, die möglichst unbeeinflusst von Veränderungen der Synapsengröße waren, wurde die Disector Technik nach Sterio (1984) angewendet. Dazu wurde zuerst auf eines der Bildpaare (Bild 1) mittels einer Folienschablone ein Zählrahmen aufgelegt, danach wurden die innerhalb dieses Rahmes enthaltenen Spinesynapsen aufgesucht und mit einem Farbmaler markiert.

Anschließend wurde die Folienschablone mit dem Zählrahmen auf das zweite Foto derselben Region (Bild 2) – welches die um  $0,1 \mu\text{m}$  vom zuvor untersuchten Bild 1 entfernte Schnittansicht zeigt – aufgelegt. Markante Strukturen, die zuvor in Bild 1 aufgefallen waren, wurden dabei in Bild 2 zur korrekten Orientierung des Zählrahmens wieder aufgesucht. Auch in Bild 2 wurden die Spinesynapsen innerhalb des Rahmens farbig markiert.

Bei der nachfolgenden Auszählung wurde wie folgt vorgegangen: Synapsen, die sowohl in Bild 1 als auch in Bild 2 enthalten waren, also doppelt markiert waren,

wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Gezählt wurden nur Synapsen, die entweder nur in Bild 1 oder nur in Bild 2 zu identifizieren waren. Dadurch wurde eine Mehrfachzählung derselben Synapse vermieden.

Entscheidend war dabei jedoch die Einhaltung strikter Kriterien zur Definition von „Spinesynapsen“. Als exzitatorisch Spinesynapse gewertet wurden nur Synapsen, an denen

- die präsynaptische Seite deutlich durch die Anwesenheit von synaptischen Vesikeln zu erkennen war,
- eine postsynaptische Dichte ausgebildet war, die es erlaubte, die Synapse als „asymmetrische“ Synapse (Kennzeichen einer exzitatorischen Synapse) zu identifizieren,
- zwischen prä- und postsynaptischer Seite ein durchgehender Synapsenspalt ausgebildet war.

Da die Fotos, insbesondere hinsichtlich ihrer Kontrastierung häufig unterschiedliche Qualität zeigten, wurde nach anfangs erfolgter manueller Auswertung der Vorgang zur Herstellung einer besseren Vergleichbarkeit der Fotopaare digitalisiert.

Dazu wurden die Fotos mit dem Scanner brother MFC 8440 und dem Programm brother MFL-Pro Suite mit einer Bildauflösung von 600 x 2.400 DPI eingescannt und mit dem Programm Adobe Reader in pdf-Dateien gewandelt, welche im Programm WORD eingefügt wurden, um anschließend die Zählung der Synapsen bei einer Vergrößerung von 200 % zu ermöglichen. Auch der Folien-Zählrahmen war in WORD digital erstellt worden.

Durch Einstellung von Helligkeit und Drehen der eingescannten und eingefügten Fotodateien um die senkrechte Achse konnten diese weit besser abgeglichen werden, als dies manuell mit den Folien möglich war. Auch konnten die Fotos durch Hintereinanderschalten in zwei Ebenen digital „übereinander“ gelegt werden und so durch einfachen Wechsel der beiden Ebenen die zu vergleichenden Gebiete exakter beurteilt werden. Indem die Fotos auf den beiden Ebenen vor der digitalen Folie jeweils an einer definierten Stelle fixiert werden konnten, wurde auch die Gefahr von Fehlern durch fehlerhaftes Neuanlegen der Folie verringert.

Die Referenzfläche des Zählrahmens betrug 16 x 16 cm. Anhand des abgebildeten Maßstabes konnte errechnet werden, dass die Fläche des Zählrahmens tatsächlich einer Fläche von 8  $\mu\text{m}$  x 8  $\mu\text{m}$  entspricht. Die der Zählrahmenfläche entsprechende tatsächliche Fläche wurde mit der Schnittdicke (0,1  $\mu\text{m}$ ) multipliziert, um das Disektor-Volumen zu errechnen. Die Spinesynapsendichte wurde errechnet, indem die Anzahl der gezählten Spinesynapsen durch das Disektor-Volumen dividiert wurde.

#### **4.8 Statistische Auswertung**

Pro untersuchtem Tier bzw. pro Gewebekultur wurden 20 elektronenmikroskopische Aufnahmen (d. h. 10 Fotopaare) ausgewertet. Aus den erhaltenen Daten wurde für jedes untersuchte Tier bzw. für jede Kultur ein Wert für die „Spinesynapsendichte“ (Anzahl der Spinesynapsen pro Volumen) im Stratum moleculare des Gyrus dentatus ermittelt.

Aus allen Werten einer experimentellen Gruppe („n“ = 1 Tier bzw. 1 Kultur) wurden Mittelwert und Standardfehler für die jeweilige Gruppe (mean +/- standard error of mean) errechnet.

Diese Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes „GraphPad Prism“ statistisch ausgewertet und auf ihre Signifikanz geprüft. Für den statistischen Vergleich experimenteller Gruppen in den *in vivo*-Experimenten wurde der „unpaired Student’s t-test“ verwendet. Die Resultate der *in vitro*-Experimente wurden, da hier stets nur „Schwesterkulturen“ miteinander verglichen wurden, über den „paired t-test“ bewertet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde bei 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) festgelegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Experiment 1: Behandlung adulter, weiblicher Mäuse mit Letrozol

#### 5.1.1 Einfluss von Letrozol auf die Spinesynapsendichte adulter Mäuse

Um die Wirkung einer Reduktion des physiologischen Östrogenspiegels im Gyrus dentatus von adulten, weiblichen Mäusen zu beobachten, wurde den zwölf Wochen alten Tieren eine Woche lang einmal täglich Letrozol und den – ebenfalls zwölf Wochen alten Tieren beider Kontrollgruppen – unter den gleichen Bedingungen – jeweils Kontroll-Lösung intraperitoneal injiziert. Der Behandlungszeitraum von einer Woche wurde hier gewählt, weil er – wie frühere Untersuchungen zeigten – für eine drastische Reduktion der Serum-Konzentration von 17- $\beta$ -Östradiol ausreicht (Zhou et al. 2010).

Intraperitoneal injiziertes Letrozol blockiert die Aromatase systemisch, d. h. in allen Körperorganen, einschließlich der Ovarien und dem Gehirn (Zhou et al. 2010). Um diese Wirkungen des Letrozols von Wirkungen abzugrenzen, die ausschließlich auf in den Gonaden gebildetes 17- $\beta$ -Östradiol zurückzuführen sind, wurde als weitere Vergleichsgruppe eine Gruppe zuvor ovariektomierter Mäuse herangezogen, die nicht mit Letrozol, jedoch für eine Woche mit Kontroll-Lösung injiziert worden war.

Die Analyse der Spinesynapsen im Stratum moleculare des Gyrus dentatus von weiblichen Mäusen, die mit Letrozol behandelt worden waren, ergab eine im Vergleich zu der nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe eine deutlich erniedrigte Spinesynapsendichte (Abb. 6 und 7). Diese war nach Letrozolbehandlung von  $1,97 \pm 0,16/\mu\text{m}^3$  ( $n = 4$ ) auf  $1,29 \pm 0,06/\mu\text{m}^3$  ( $n = 3$ ) verringert (Abb. 7). Dies entspricht einer Reduktion um ca. 35 %. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p = 0,02$ ).

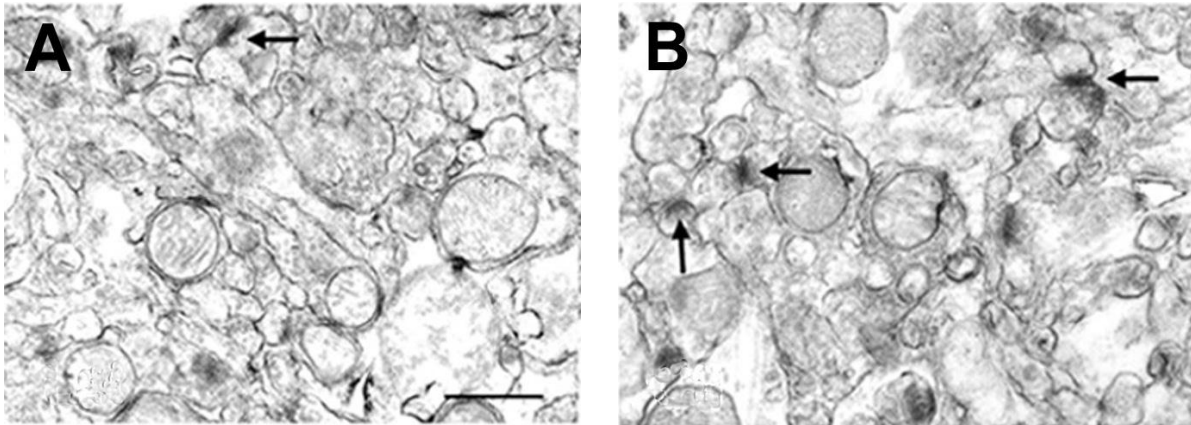


Abbildung 6: Auswirkungen der Letrozolbehandlung auf die Spinesynapsendichte: Exemplarische Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus dem Stratum moleculare des Gyrus dentatus adulter, weiblicher Mäuse, welchen sieben Tage lang intraperitoneal Letrozol (A) bzw. Kontroll-Lösung (B) injiziert worden war. Exzitatorische Synapsen (Pfeile) – erkennbar an der asymmetrischen postsynaptischen Dichte, Vesikelansammlungen auf der präsynaptischen Seite und einem synaptischen Spalt – waren nach Letrozolbehandlung verringert. Maßstab: 0,2  $\mu\text{m}$

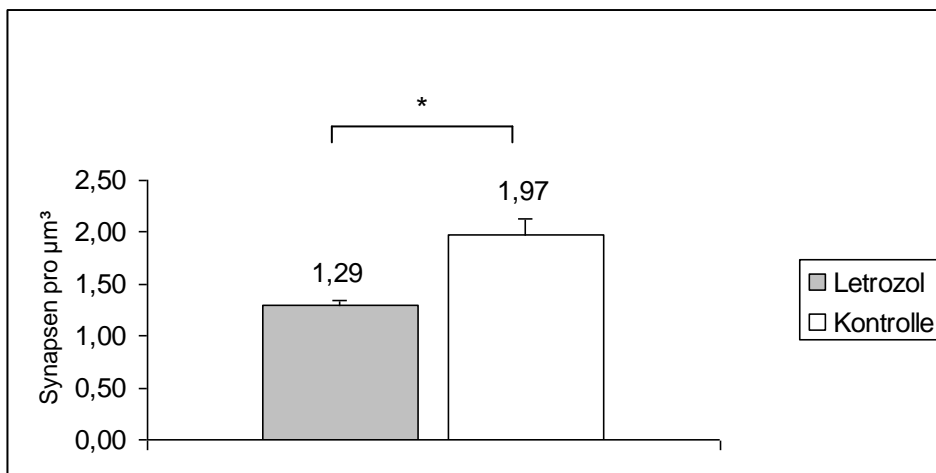


Abbildung 7: Spinesynapsen-Dichte im Stratum moleculare weiblicher, adulter Mäuse nach 7-tägiger intraperitonealer Behandlung mit Letrozol ( $MW = 1,29 \pm 0,06/\mu\text{m}^3$ ,  $n = 3$ ) bzw. Kontroll-Lösung ( $MW = 1,97 \pm 0,16 \mu\text{m}^3$ ,  $n = 4$ )  $p = 0,02$ .

### 5.1.2 Einfluss einer Ovariectomie auf die Spinesynapsendichte adulter Mäuse

Im Gegensatz zur Letrozol-Behandlung zeigte die Ovariectomie keine markanten Auswirkungen auf die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare. Zwar war die gemessene Spinesynapsendichte in den ovariectomierten Tieren etwas geringer im Vergleich zu den Kontrollen (von  $1,97 \pm 0,16/\mu\text{m}^3$  auf  $1,8 \pm 0,29/\mu\text{m}^3$ , Abb. 8). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,6$ ).

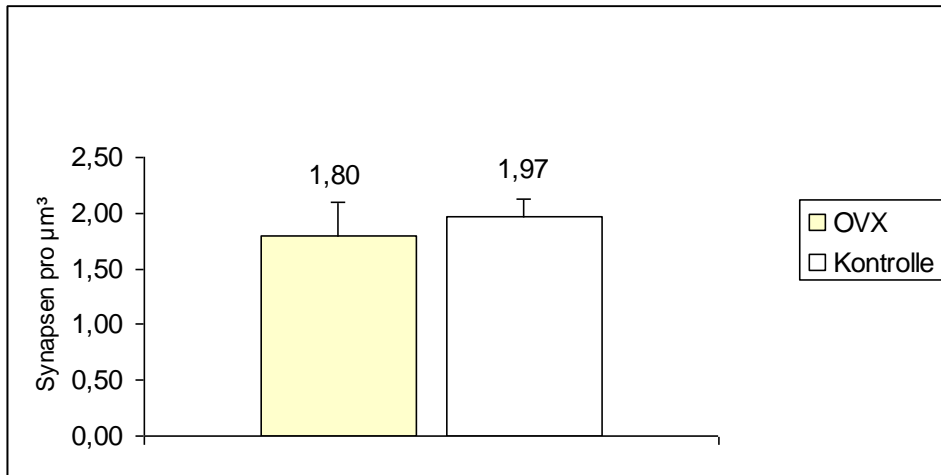


Abbildung 8: Spinesynapsen-Dichte weiblicher, adulter Mäuse im Stratum moleculare nach Ovariectomie und 7-tägiger Behandlung mit Kontroll-Lösung (OVX MW =  $1,80 \pm 0,29/\mu\text{m}^3$ , n = 3) bzw. nur nach 7-tägiger Behandlung mit Kontroll-Lösung (MW =  $1,97 \pm 0,16 \mu\text{m}^3$ , n = 4) p = 0,6.

Aus der Zusammenschau dieser Befunde kann geschlossen werden, dass aus den Ovarien stammendes 17- $\beta$ -Östradiol nicht entscheidend an der Regulierung der Spinesynapsendichte im Stratum moleculare des Gyrus dentatus beteiligt ist. Es ist daher zu vermuten, dass das im Hippocampus selbst gebildete 17- $\beta$ -Östradiol für die Regulierung der Spinesynapsendichte ursächlich ist (Abb. 9).

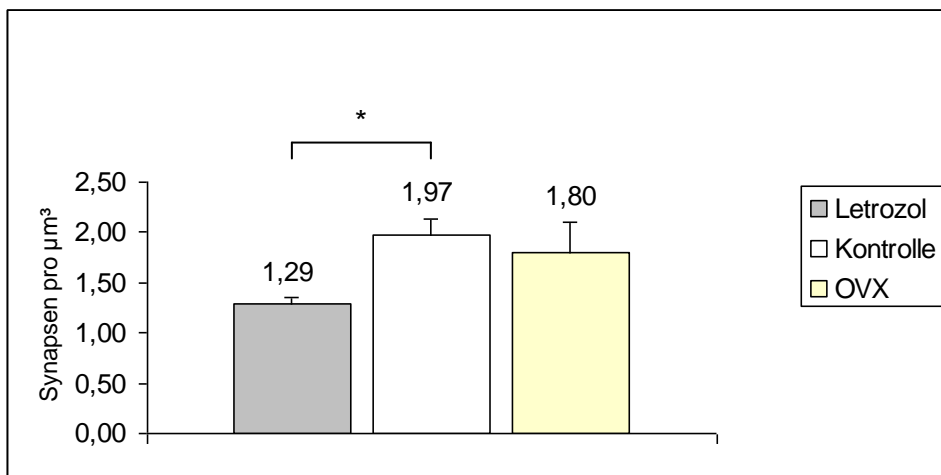


Abbildung 9: Zusammenschau der Spinesynapsen-Dichte im Stratum moleculare weiblicher, adulter Mäuse nach 7-tägiger Behandlung mit Letrozol (MW =  $1,29 \pm 0,06/\mu\text{m}^3$ , n = 3) bzw. mit Letrozol (MW =  $1,29 \pm 0,06/\mu\text{m}^3$ , n = 3) bzw. mit Kontroll-Lösung (MW =  $1,97 \pm 0,16 \mu\text{m}^3$ , n = 4) bzw. mit Kontroll-Lösung nach Ovariectomie (OVX MW =  $1,80 \pm 0,29/\mu\text{m}^3$ , n = 3).

## 5.2 Experiment 2: Behandlung immaturer, weiblicher Ratten mit Letrozol

Angeregt durch die Befunde einer parallel durchgeführten Untersuchung (Bender et al. 2010), die eine starke Expression von Aromatase im sich entwickelnden Gyrus dentatus und eine massive Expression von Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$ ) in Cajal-Retzius-Zellen – einem für den immaturren Hippocampus charakteristischen und an der Reifung des Tractus perforans beteiligten Zelltypus (Ceranik et al. 1999) – nachwies, wurde in einem weiteren Experiment die Auswirkung von Letrozol auf die Spinesynapsenbildung im immaturren Gyrus dentatus untersucht.

Für diese Untersuchungen wurden – wegen der leichteren Handhabung – immaturre, weibliche Ratten statt Mäuse eingesetzt. Diesen Tieren wurde ebenfalls sieben Tage lang einmal täglich intraperitoneal Letrozol injiziert, jedoch aufgrund des geringeren Lebensalters – und damit verbundener geringerer Verträglichkeit – in einer geringeren Konzentration, nämlich mit 4  $\mu\text{g/g KG}$  (statt mit 10  $\mu\text{g/g KG}$ ). Anschließend wurde die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare untersucht und mit der Spinesynapsendichte in nur mit Kontroll-Lösung injizierten Tieren verglichen.

Auch in diesem Experiment führte die sieben Tage andauernde, systemische Inhibition der Aromatase zu einer signifikanten Reduktion der Spinesynapsendichte im Stratum moleculare (Abb. 10 und 11).

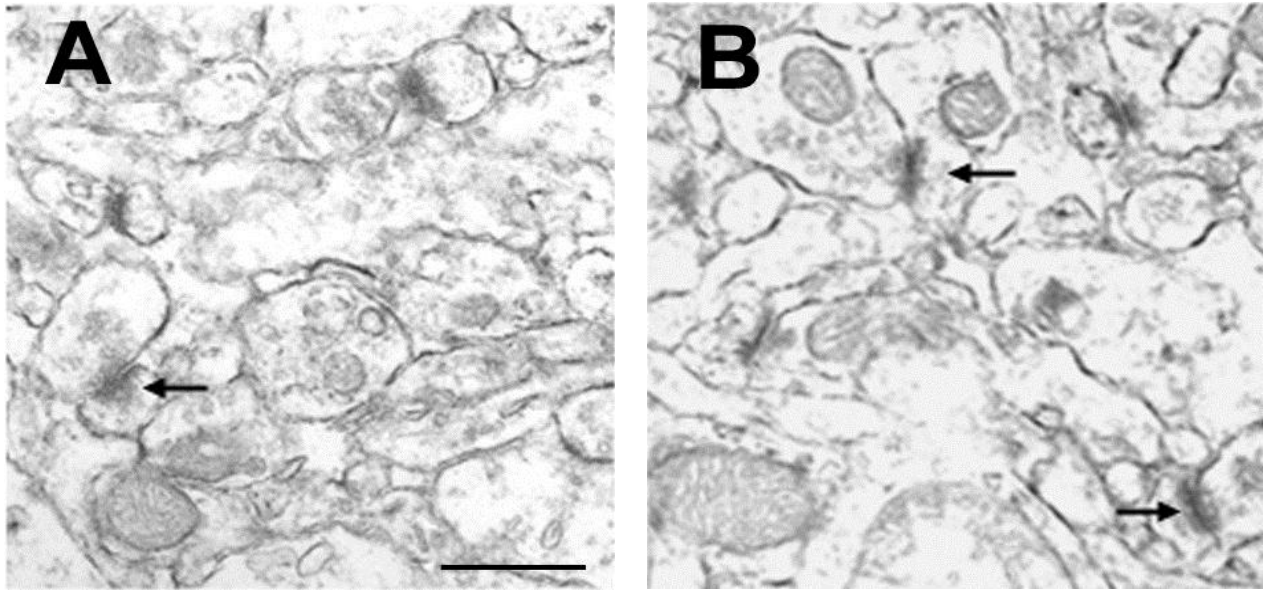


Abbildung 10: Auswirkungen der Letrozolbehandlung auf die Spinesynapsendichte: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen aus dem Stratum moleculare des Gyrus dentatus immaturer weiblicher Ratten, welchen sieben Tage lang intraperitoneal Letrozol (A) bzw. Kontroll-Lösung (B) injiziert worden war. Maßstab: 0,2  $\mu\text{m}$ .

Die Reduktion der Spinesynapsendichte war jedoch nicht so ausgeprägt wie in den adulten Tieren. Sie entsprach einer Verringerung um etwa elf Prozent (von  $1,98 \pm 0,02$ , Kontrolle  $n = 5$ , auf  $1,77 \pm 0,07$  Synapsen/ $\mu\text{m}^3$  nach Letrozolbehandlung,  $n = 4$ ,  $p = 0,04$ ; Abb. 11).

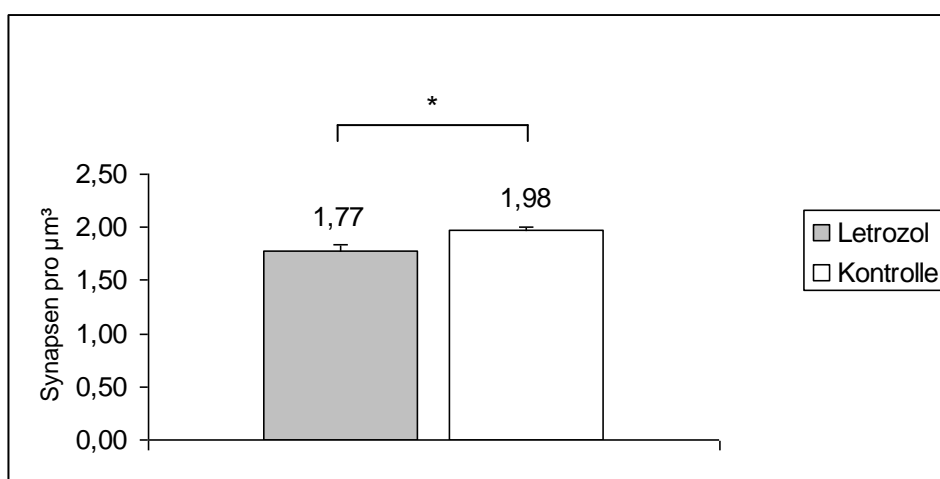


Abbildung 11: Spinesynapsen-Dichte im Stratum moleculare weiblicher, immaturer Ratten nach 7-tägiger Behandlung mit Letrozol ( $MW = 1,77 \pm 0,07/\mu\text{m}^3$ ,  $n = 5$ ) bzw. Kontroll-Lösung ( $MW = 1,98 \pm 0,02/\mu\text{m}^3$ ,  $n = 4$ )  $p = 0,04$ .



Dieses Resultat könnte dadurch zu erklären sein, dass die Regulierung der Spinesynapsendichte durch 17- $\beta$ -Östradiol in den jungen Tieren noch nicht so ausgeprägt ist wie in adulten Tieren. Es können aber auch andere Faktoren, wie eine möglicherweise unterschiedliche Empfindlichkeit der Östrogenrezeptoren von Ratten gegenüber denen von Mäusen oder die Verwendung geringerer Konzentrationen von Letrozol in immaturren gegenüber adulten Tieren zur geringeren Ausprägung des Effekts beigetragen haben.

### 5.3 Experiment 3: Behandlung organotypischer Gewebekulturen mit Letrozol bzw. mit 17- $\beta$ -Östradiol

In einem dritten Versuchsansatz wurden die Auswirkungen von Letrozol bzw. 17- $\beta$ -Östradiol in einem *in vitro*-System – der organotypischen Gewebekultur – untersucht. Mit diesem Versuchsaufbau sollte die lokale Östrogensynthese im Hippocampus – im Vergleich zu den *in vivo*-Experimenten – gezielter beeinflusst und ihre Rolle bei der Regulierung der Spinesynapsendichte im Stratum moleculare des Gyrus dentatus dadurch genauer bestimmt werden.

Die entorhino-hippocampalen Gewebekulturen wurden dafür aus immaturren, fünf Tage alten, weiblichen Ratten gewonnen und danach über einen Zeitraum von elf Tagen kultiviert. Ab dem fünften Tag wurde einer Gruppe der Kulturen ( $n = 9$ ) *in vitro* sieben Tage lang Letrozol ( $10^{-7}$  M) zugegeben, den „Schwesterkulturen“ ( $n = 9$ ) hingegen nur das Lösungsmittel (Kontroll-Lösung). In einem zweiten Versuchsansatz wurde einer anderen Gruppe von Kulturen ( $n = 9$ ) unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen sieben Tage lang 17- $\beta$ -Östradiol ( $10^{-7}$  M) zugegeben. Auch hier erhielten die Schwesterkulturen ( $n = 9$ ) nur die entsprechende Kontroll-Lösung. Am Ende der Behandlungsperiode wurden alle experimentell behandelten Kulturen gemeinsam mit ihren „Schwesterkulturen“ fixiert und elektronenmikroskopisch ausgewertet.

Bei der Analyse dieser Kulturen zeigte sich, dass Letrozol in der gewählten Konzentration, die in vergleichbaren Experimenten in der CA1-Region zu einer signifikanten Reduktion der Spinesynapsen geführt hatte (Kretz et al. 2004), keinen nachweisbaren Effekt auf die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare hatte. Zwar war die gemessene Spinesynapsendichte im Stratum moleculare der Kulturen nach Letrozolbehandlung etwas niedriger als in den Kontrollen ( $1,62 \pm 0,12$  im Vergleich zu

1,77 ± 0,13 Spinesynapsen/ $\mu\text{m}^3$  bei den Kontrollen; n = 9 pro Gruppe; Abb. 12). Dieser Unterschied war mit  $p = 0,4$  jedoch statistisch nicht signifikant.

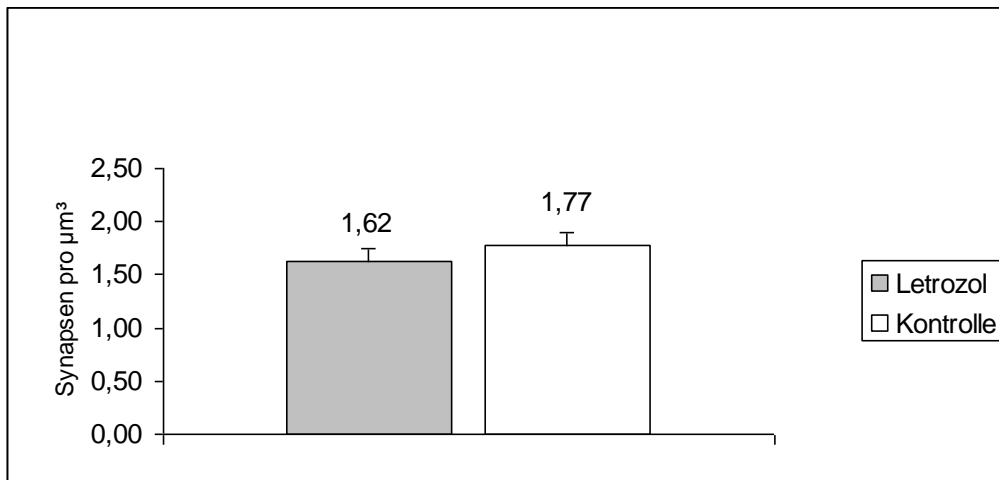


Abbildung 12: Spinesynapsen-Dichte von Gewebekulturen im Stratum moleculare immaturer, weiblicher Ratten nach 7-tägiger Behandlung mit Letrozol (MW  $1,62 \pm 0,12/\mu\text{m}^3$ , n = 9) bzw. mit Kontroll-Lösung (MW  $1,77 \pm 0,13/\mu\text{m}^3$ , n = 9)  $p = 0,4$ .

Noch geringer waren die Unterschiede, welche nach Behandlung mit 17- $\beta$ -Östradiol im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar waren. Hier wurden in den Kontroll-Kulturen  $1,61 \pm 0,10$  und in den mit 17- $\beta$ -Östradiol behandelten Kulturen  $1,66 \pm 0,11$  Spinesynapsen/ $\mu\text{m}^3$  (n = 9 pro Gruppe) gezählt (Abb. 13).

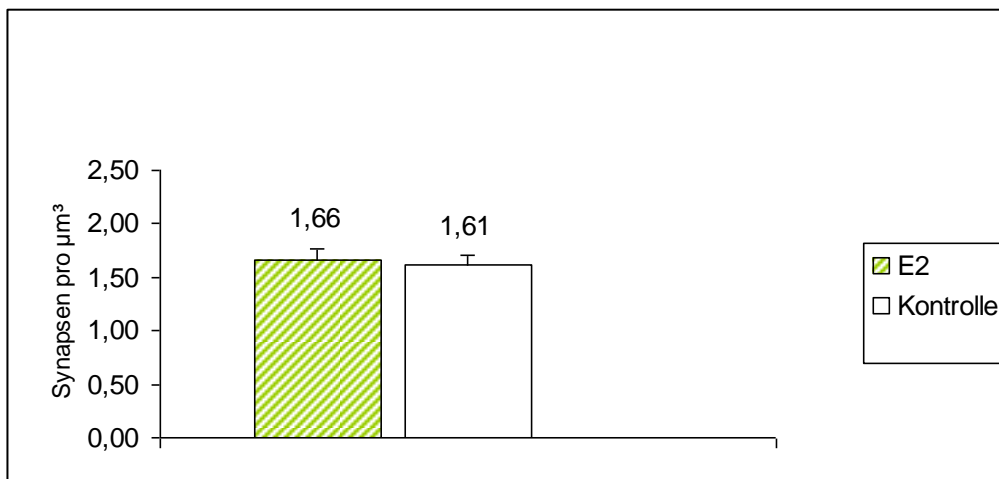


Abbildung 13: Spinesynapsen-Dichte im Stratum moleculare von Gewebekulturen immaturer, weiblicher Ratten nach 7-tägiger Behandlung mit 17- $\beta$ -Östradiol (MW  $1,66 \pm 0,11/\mu\text{m}^3$ , n = 9) bzw. mit Kontroll-Lösung (MW  $1,61 \pm 0,10/\mu\text{m}^3$ , n = 9).

Auffällig war in beiden Experimenten die – im Vergleich zu den *in vivo*-Experimenten – geringere Spinesynapsendichte in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis könnte dadurch bedingt sein, dass der Tractus perforans im Kultursystem etwas geringer als *in vivo* ausgebildet wurde.

## 6 Diskussion

In der vorgestellten Untersuchung wurde die Frage gestellt, welche Rolle endogen im Hippocampus gebildetes 17- $\beta$ -Östradiol für die Regulierung der Spinesynapsenbildung im Gyrus dentatus spielt. Verwendet wurde für die durchgeführten Experimente der Aromatase-Inhibitor Letrozol, mit dessen Hilfe die Produktion des im Hippocampus produzierten 17- $\beta$ -Östradiol stark vermindert wurde. Als wesentliche Ergebnisse wurden gefunden:

1. Im Stratum moleculare des Gyrus dentatus wird – wie in der CA1-Region des Hippocampus proper (Zhou et al. 2010) – die Spinesynapsendichte nach systemischer Gabe von Letrozol reduziert. Das deutet darauf hin, dass auch im Stratum moleculare die Spinesynapsendichte durch 17- $\beta$ -Östradiol reguliert wird.
2. Eine Ovariectomie hatte einen im Gegensatz zur systemischen Letrozolgabe keinen signifikanten Effekt auf die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare. Dies legt den Schluss nahe, dass im Hippocampus selbst gebildetes – und nicht aus den Ovarien entstammendes – 17- $\beta$ -Östradiol vorrangig an dieser Regulierung beteiligt ist.
3. Eine signifikante Verminderung der Spinesynapsendichte nach systemischer Letrozol-Gabe wurde auch bei immaturren Ratten beobachtet. Sie war jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den adulten Mäusen.
4. In entorhino-hippocampalen Gewebekulturen von immaturren Ratten ließ sich der Effekt der Senkung der Spinesynapsendichte nach systemischer Gabe von Letrozol nicht reproduzieren. Auch die Behandlung von 17- $\beta$ -Östradiol zeigte in den Gewebekulturen keinen Effekt.

Diese Ergebnisse sollen nachfolgend diskutiert werden.

### 6.1 Einfluss von 17- $\beta$ -Östradiol auf die Spinesynapsendichte im Hippocampus

17- $\beta$ -Östradiol fördert die Neurogenese (Tanapat et al. 1999, Fester et al. 2006), auch die Synaptogenese und damit die für die Gedächtnisbildung erforderliche synaptische Plastizität (Murphy und Segal 1996, Murphy et al. 1998, Woolley und

McEwen 1992, Wolley 1998, McEwen 2001, 2002, Rune et al. 2002, Kretz et al. 2004, Mukai et al. 2007, Hatanaka et al. 2009, Zhou et al. 2010, Vierk et al. 2012).

Östrogen wird *de novo* im Gehirn synthetisiert (Prange-Kiel et al. 2003, Amateau et al. 2004). Seine Vorläuferstufe Cholesterol wird in Neuronen und Gliazellen produziert und ist an der Ausreifung von Synapsen beteiligt (Barres und Smith 2001, Pfrieger 2003). Cholesterol stimuliert die Spinesynapsenbildung (Pfrieger 2003, Fester et al. 2009a). Für die Synaptogenese ist die Umwandlung von Cholesterol zu Östrogen erforderlich (Fester et al. 2009a). Die letzte Stufe dieser Umwandlung zu Östrogen wird durch das Enzym Aromatase katalysiert.

Das Enzym Aromatase wird auch im Gehirn exprimiert (Naftolin et al. 1975, Roselli et al. 1985, Balthazart 1991, Abdelgadir et al. 1994). Die neuronale Expression von Aromatase wurde lange Zeit mit einer neuroendokrinen Regulierung des Reproduktionszyklus in Verbindung gebracht. Diese Ansicht änderte sich, als nachgewiesen wurde, dass im Gehirn produziertes Östrogen bei Prozessen wie der Regulierung der synaptischen Plastizität, der Neurogenese oder Neuroprotektion eine Rolle spielt, die über die bekannte Wirkweise der in den Gonaden produzierten Hormone hinausgeht (Balthazart und Ball 2006, Prange-Kiel und Rune 2006, Rune et al. 2006, Garcia-Segura 2008).

Aromatase wurde im gesunden adulten und im gesunden immaturren Hippocampus nachgewiesen (Amateau et al. 2004, Kretz et al. 2004, Zhao et al. 2007), aber auch im epileptischen Hippocampus in vielen CA1-CA3-Pyramidenzellen, in Körnerzellen des Gyrus dentatus und in Interneuronen (Yague et al. 2008, 2010). Die ausgeprägte Expression der Aromatase in einer großen Neuronenpopulation im normalen und im geschädigten Hippocampus legt den Schluss nahe, dass die lokale Östrogen-Situation eine wichtige Rolle für die Funktion des Hippocampus und damit insbesondere für die Konsolidierung deklarativer Gedächtnisinhalte spielt.

Der potenteste Inhibitor der Aromatase ist das nichtsteroidale Letrozol (Smith 1999). Letrozol bindet reversibel an das Enzym, seine Wirkung wird jedoch durch Östrogen aufgehoben, es hemmt die Aromatase also kompetitiv und beeinträchtigt nicht die Östrogenrezeptorfunktion (Prange-Kiel et al. 2003, Puddefoot et al. 2002). Letrozol verringert die Menge an peripher zirkulierendem Östrogen (Foidart et al. 1995, Geisler et al. 2002) und kann die Aromataseaktivität erheblich reduzieren (Cohen et al.

2002). Wechselwirkungen mit anderen Enzymen sind bislang nicht bekannt. Obwohl Letrozol in den hier beschriebenen *in vivo*-Experimenten intraperitoneal injiziert wurde, zeigte sich eine signifikante Wirkung im Gehirn. Letrozol kann also offenbar die Blut-Hirn-Schranke überschreiten und Wirkungen im Gehirn nach sich ziehen. Es ist daher denkbar, dass in der Brustkrebstherapie häufig eingesetzte Aromataseinhibitoren mit vergleichbaren Eigenschaften die Gedächtnisfunktion negativ beeinträchtigen könnten.

Die in den vorliegenden Experimenten eingesetzte Letrozol-Dosis (10 µg/g KG bei adulten Mäusen) wurde gewählt, um eine signifikante Aromatase-Inhibition im Gehirn während des einwöchigen Behandlungszeitraumes zu gewährleisten. Sie liegt weit unter der Toxizitätsgrenze von Letrozol (als LD<sub>50</sub> wurden vom Hersteller für Mäuse 2.000 µg/g KG ermittelt, Novartis 2003). Es ist somit unwahrscheinlich, dass toxische Effekte den beobachteten Befunden zu Grunde liegen. Andererseits ist die gewählte Dosis deutlich höher, als die in der Brustkrebs-Therapie üblicherweise eingesetzte Dosis (2,5 mg pro Tag). Daher kann aus diesen Experimenten nicht direkt auf Effekte einer Letrozol-Therapie mit üblicherweise geringeren, jedoch längerfristig eingesetzten Dosen rückgeschlossen werden. Dies würde einen veränderten Versuchsaufbau voraussetzen. Untersuchungen, die Auswirkungen einer Letrozol-Langzeittherapie auf das menschliche Gedächtnis belegen, liegen bereits vor. Allerdings sind die Resultate teilweise widersprüchlich (Phillips et al. 2011, siehe dazu auch 6.4).

## **6.2 Einfluss von 17-β-Östradiol auf die Spinesynapsendichte spezifisch im Gyrus dentatus**

Eine stimulierende Wirkung von 17-β-Östradiol auf die Synaptogenese ist in der bereits gut untersuchten Region CA1 mehrfach belegt (Woolley und McEwen 1992, McEwen 2001, 2002, Rune et al. 2002, Kretz et al. 2004, Mukai et al. 2007, Hatana-ka et al. 2009, Zhou et al. 2010). Im Fokus der vorliegenden Untersuchung stand die Frage, ob endogen im Hippocampus gebildetes 17-β-Östradiol die Synapsenbildung im Gyrus dentatus in ähnlicher Weise beeinflusst, wie dies in der CA1-Region offenbar der Fall ist.

Der Gyrus dentatus ist Eingangsstation für Axone aus dem entorhinalen Cortex, die über den Tractus perforans das Stratum moleculare erreichen. Dort enden sie schichtenspezifisch und bilden exzitatorische Synapsen mit den Dendriten der Kör-

nerzellen. An diesen Synapsen findet die erste „Bewertung“ der aus dem entorhinalen Cortex eingehenden Information statt. Sie sind – wie die Synapsen der Schaffer-Kollateralen in CA1 – mit der Fähigkeit zur synaptischen Plastizität ausgestattet (Colino und Malenka 1993). Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen lassen darauf schließen, dass 17- $\beta$ -Östradiol auf die Regulierung dieser synaptischen Plastizität einen wesentlichen Einfluss hat. So war die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare nach systemischer Letrozolgabe *in vivo* in adulten Mäusen um ca. 35 % reduziert.

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse nach einer relativ kurzen Behandlungszeit von sieben Tagen untersucht. Die Ergebnisse hinsichtlich der Letrozol-Behandlung decken sich bei adulten, nicht ovariectomierten weiblichen Mäusen mit denen aus parallel durchgeführten Untersuchungen in der CA1-Region, in denen Letrozol über verschiedene Behandlungszeiträume (eine Woche und vier Wochen) appliziert wurde (Zhou et al. 2010, von Blittersdorf 2011). Die hier gefundenen Ergebnisse unterstützen somit die Hypothesen der neueren Neurosteroidforschung zur Östrogenvermittelten Synaptogenese. Östrogenmangel kann zu einer Verringerung der Spinesynapsendichte und damit zu kognitiven Defiziten vor allem im Bereich des deklarativen Gedächtnisses führen.

Im Gegensatz dazu führte eine Ovariectomie im Stratum moleculare des Gyrus dentatus nicht zu einem signifikanten Abfall der Spinesynapsendichte. Durch die Ovariectomie wird gezielt das in den Ovarien gebildete Östradiol entfernt. Andere Quellen – wie die Bildung von 17- $\beta$ -Östradiol im Gehirn – sind davon nicht betroffen, auch die – jedoch relativ geringfügige – Östrogenproduktion in anderen Geweben ist nicht berührt. Dies lässt den Schluss zu, dass der hier festgestellte Synapsenverlust hauptsächlich auf eine Verringerung des neuronal produzierten Östrogens zurückzuführen ist. Allerdings ist in Untersuchungen der CA1-Region auch ein signifikanter Synapsenverlust nach Ovariectomie festgestellt worden (Gould et al. 1990, Wallace et al. 2006, Zhou et al. 2010). In den Untersuchungen von Zhou et al. 2010 war der beobachtete Effekt nach Kombination von Ovariectomie und Letrozolbehandlung besonders ausgeprägt. Das deutet auf eine wesentliche Rolle des im Hippocampus gebildeten 17- $\beta$ -Östradiols hin, schließt einen Einfluss des aus den Ovarien stammenden 17- $\beta$ -Östradiols jedoch nicht völlig aus.

Mögliche Erklärungen für die leicht diskrepanten Befunde in der CA1-Region könnten sein:

Die CA1-Region könnte – möglicherweise durch stärkere Expression von Östrogenrezeptoren – eine ausgeprägtere Empfindlichkeit für 17- $\beta$ -Östradiol aufweisen. Expressionsstudien stützen diese Erklärung allerdings nicht unbedingt, da auch im Gyrus dentatus eine hohe Konzentration an Östrogenrezeptoren gefunden wurde (Bender et al. 2010).

Eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Hippocampusregionen für eine Regulierung der 17- $\beta$ -Östradiol-Synthese durch GnRH könnte für die leicht unterschiedlichen Effekte verantwortlich sein. Die Aktivität der im Hippocampus gebildeten Aromatase wird auch durch GnRH reguliert, welches selbst im Hypothalamus in Abhängigkeit von der Östrogenkonzentration im Blutserum ausgeschüttet wird (Prange-Kiel et al. 2008). Auch die im Hippocampus stattfindende Östrogensynthese steht danach, wenn auch indirekt, unter dem Einfluss peripherer, zyklus-abhängiger Regulierungsmechanismen. Eine unterschiedliche Ausstattung von Hippocampus-Regionen mit GnRH-Rezeptoren könnte daher zu unterschiedlichen Resultaten nach Ovariectomie führen. Über die Verbreitung und Regulierung der GnRH-Rezeptoren ist jedoch noch wenig bekannt, diese Hypothese kann daher noch nicht abschließend bewertet werden und erfordert weitere Untersuchungen.

### **6.3 Alters- und entwicklungsabhängige Effekte von 17- $\beta$ -Östradiol im Gyrus dentatus**

Die weiteren Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen auf eine mögliche Altersabhängigkeit der Spinesynapsen-Regulierung im Stratum moleculare des Gyrus dentatus durch 17- $\beta$ -Östradiol schließen.

Der immature Gyrus dentatus exprimiert – wie der Rattenhippocampus insgesamt – die den letzten Umwandlungsschritt in der Östradiol-Synthese katalysierende Aromatase (Amateau et al 2004, Kretz et al. 2004, Zhao et al. 2007, Bender et al. 2010). Gleichzeitig ist die Östrogenproduktion in den Ovarien während der ersten beiden postnatalen Wochen sehr niedrig (Lamprecht et al. 1976, Bakker und Baum 2008), so dass in den Ovarien produziertes Östradiol in dieser Entwicklungsphase kaum Einfluss auf die Synaptogenese nehmen kann. Es ist daher anzunehmen, dass die



beobachtete Reduktion der Spinesynapsendichte im Stratum moleculare immaturer Ratten nach Letrozol-Behandlung ebenfalls auf die Hemmung des endogen im Hippocampus gebildeten 17- $\beta$ -Östradiol zurückzuführen ist.

Der Effekt von Letrozol auf die Synaptogenese war jedoch in den immaturen Ratten deutlich geringer ausgeprägt als in adulten Mäusen. Dieses Ergebnis könnte auf Unterschiede zwischen beiden Spezies oder auf methodische Aspekte, wie die Verwendung geringerer Letrozolmengen bei immaturen Tieren, zurückzuführen sein.

Eine Erklärung könnte jedoch auch darin bestehen, dass 17- $\beta$ -Östradiol offenbar bevorzugt mature Synapsen beeinflusst, wie Arbeiten von Fester et al. (2009a) nahelegen. Synapsen des Tractus perforans mit Körnerzellen sind in der zweiten postnatalen Woche überwiegend noch unreif, d. h. noch nicht voll funktionsfähig ausgebildet, da der überwiegende Teil der Körnerzellen erst postnatal gebildet wird (Tamamaki 1999). Auch diese Tatsache könnte den geringeren Effekt des Letrozol auf die Spinesynapsendichte des Gyrus dentatus immaturer Ratten erklären. Möglicherweise sind die Spinesynapsen bei immaturen Ratten für die Regulierung durch 17- $\beta$ -Östradiol weniger sensibel.

Es fällt in diesem Zusammenhang jedoch auf, dass im immaturen Gyrus dentatus eine hohe Expression von Östrogenrezeptoren beobachtet wurde (Bender et al. 2010). Diese Rezeptoren befinden sich allerdings bevorzugt auf Cajal-Retzius-Zellen, einem Zelltyp, der insbesondere für den sich entwickelnden Hippocampus charakteristisch ist und dort wesentlich an der Regulierung der Migration neugebildeter Neurone beteiligt ist, die sich ohne das von den Cajal-Retzius-Zellen gebildete Protein Reelin nicht in der physiologischen Form eines Zellbandes anordnen (Förster et al. 2006). Reelin stimuliert darüber hinaus die postnatale Neurogenese, das neurale Wachstum und die Langzeitpotenzierung (Rogers und Weeber 2008, Pujadas et al. 2010). Ihm wird auch eine Leitfunktion für die in den Gyrus dentatus einwachsenden entorhinalen Axone zugesprochen (Ceranik et al. 1999).

Es ist daher denkbar, dass dem im immaturen Gyrus dentatus gebildeten 17- $\beta$ -Östradiol neben der Regulierung der Spinesynapsenbildung noch weitere regulatorische Funktionen zukommen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass das im Hippocampus produzierte Östradiol in primären neuronalen Kulturen auch die Neurogenese von Körnerzellen (Fester et al. 2006) und die neuronale Diffe-

renzierung (von Schassen et al. 2006) reguliert. Ähnliche Aufgaben lassen sich auch für eine pränatale Produktion von 17- $\beta$ -Östradiol im sich entwickelnden Neocortex von Ratten vermuten (Martinez-Cerdeno et al. 2007).

Im Gegensatz zu Letrozol-Injektionen immaturer Ratten *in vivo*, erbrachte eine Letrozol-Behandlung von organotypischen Gewebekulturen aus immaturen, weiblichen Ratten keine signifikante Verringerung der Spinesynapsendichte, obwohl eine Tendenz zur Synapsenverringerng zu beobachten war. Da diese Kulturen hinsichtlich ihres Entwicklungsstadiums den immaturen Ratten entsprachen, wirft dies die Frage auf, warum vergleichbare Ergebnisse *in vitro* nicht erzielt wurden.

Ein Grund könnte sein, dass der Tractus perforans in der Kultur geringer ausgebildet war. Dies war möglicherweise auf die Präparation zurückzuführen, bei der unvermeidlich Axone des Tractus perforans durchtrennt werden. Zwar wurde eine Präparationsmethode gewählt, bei der diese Durchtrennung möglichst gering ist und die entorhinalen Axone verfügen auch über eine starke Regenerationsfähigkeit (Li et al. 1994). Jedoch deutet die insgesamt geringere Spinesynapsendichte *in vitro* im Vergleich zu *in vivo* darauf hin, dass ein maßgeblicher Axonenverlust eingetreten ist.

Darüberhinaus ist zu bedenken, dass in der Gewebekultur möglicherweise auch andere, noch nicht ausreichend spezifizierte Faktoren fehlten, die zu einer optimalen Synapsenreifung notwendig sind. Beide Gründe könnten dazu beigetragen haben, dass deutliche Effekte nach Letrozol bzw. 17- $\beta$ -Östradiol in der Gewebekultur nicht nachweisbar waren.

#### **6.4 Klinische Bedeutung der Östradiolwirkung im Hippocampus**

Periodische Schwankungen der Steroidspiegel in den Ovarien während der reproduktiven Phase beeinflussen offenbar das Lernen (Crispino et al. 1999). Bei Frauen nach der Menopause fiel ein besonderer Abbau der mnestischen Leistungsfähigkeit auf (Henderson 2005, 2006, 2007, 2009 a, b, Frick 2009), der Fragen nach Ursachen und Therapiemöglichkeiten aufwirft.

Die Menopause geht mit einer drastischen Verminderung der Östradiol-Synthese in den Ovarien einher, welche daher seit einiger Zeit als mögliche Ursache für die Abnahme der mnestischen Leistungsfähigkeit vermutet wird. Die Ergebnisse der vorlie-

genden Untersuchung, sowie die Resultate einer begleitend durchgeführten Studie (Zhou et al. 2010) stützen diese These, rücken dabei den bislang noch unzureichend beachteten Faktor der Produktion von Östradiol im Gehirn selbst und insbesondere im – für deklarative Gedächtnisprozesse essentiellen – Hippocampus in den Fokus.

Verringerte Östradiol-Produktion im Hippocampus führt zum Spinesynapsenverlust im Hippocampus (Prange-Kiel et al. 2008, Bender et al. 2010, Zhou et al. 2010). Dieser Synapsenverlust ist – in Verbindung mit gleichzeitiger Abnahme des in den Ovarien produzierten 17- $\beta$ -Östradiol im Alter progredient (Zhou et al. 2010). Die Abnahme von 17- $\beta$ -Östradiol und der daraus folgende Synapsenverlusts kann zu kognitiven Defiziten führen. Unter Hormonsubstitution wurde die teilweise Revidierung der kognitiven Defizite beobachtet (Sherwin 1996, Berman et al. 1997, Cutter 2003), allerdings auch gefährliche periphere Nebenwirkungen befürchtet (DonCarlos et al 2009). Die Produktion von 17- $\beta$ -Östradiol im Hippocampus wird über GnRH auch zyklusabhängig reguliert (Prange-Kiel et al. 2008) und ist folglich von den hormonellen Veränderungen nach der Menopause betroffen.

Klinisch bedeutsam ist in diesem Zusammenhang auch die Verwendung von Aromatase-Inhibitoren bei der Behandlung von Mamma-Karzinomen. Bei mit dem Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen behandelten Frauen wurden kognitive Defizite als Nebeneffekte beobachtet (Paganini-Hill et al. 2000, Castellon et al. 2004, Bender et al. 2006). Zusätzliche Behandlung mit Aromataseinhibitoren führt noch zu einer Verstärkung dieser Defizite (Shilling et al. 2003, Jenkins et al. 2004). Andererseits wurde festgestellt, dass eine Therapie mit Letrozol nicht nur hinsichtlich des Ansprechens des Tumors auf die Therapie, als auch hinsichtlich der tumorprogressionsfreien Zeit (Cohen et al. 2002), sondern auch hinsichtlich der kognitiven Beeinträchtigungen Tamoxifen überlegen ist (Phillips et al. 2011). Die Entwicklung von Substanzen, mit denen die Nebenwirkungen vermindert oder sogar vermieden werden könnten, wäre für die betroffenen Frauen ein großer Gewinn. Ein verbessertes Verständnis der neuronalen Aromatase-Funktion, die eine solche Entwicklung eventuell ermöglicht, ist daher von beträchtlicher klinischer Relevanz.

Die Anzahl der Menschen, die mit zunehmendem Alter auch unter zunehmenden Einbußen ihrer kognitiven Fähigkeiten – insbesondere der deklarativen Gedächtnisleistung – leiden, wird angesichts der demografischen Entwicklung in der Zukunft

deutlich steigen und die Gesellschaft und das Gesundheitssystem vor große Herausforderungen stellen. Die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten zur Abmilderung des Verlustes kognitiver Fähigkeiten im Alter ist ebenfalls von hoher klinischer, gesellschafts- und gesundheitspolitischer Relevanz, welche sich am fachübergreifenden Interesse an der vorgestellten Thematik widerspiegelt.

## 7 Zusammenfassung

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass 17- $\beta$ -Östradiol die Spinesynapsendichte in den Regionen CA1-CA3 im Hippocampus reguliert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 17- $\beta$ -Östradiol auf die Synapsendichte im Gyrus dentatus untersucht, in dessen Stratum moleculare eine erste synaptische Verschaltung der axonalen Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex stattfindet.

Dazu wurde adulten Mäusen der Aromatase-Inhibitor Letrozol injiziert und nach einwöchiger Behandlung die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare des Gyrus dentatus analysiert. Nach systemischer Letrozol-Behandlung war die Spinesynapsendichte im Vergleich zu den Kontrollen signifikant (um ca. 35 %) vermindert. Da eine Ovariectomie adulter Mäuse nicht zu einer vergleichbaren Synapsenreduktion führte, kann aus diesen Experimenten geschlossen werden, dass nicht das in den Gonaden gebildete, sondern aus anderen Quellen stammendes, vermutlich im Hippocampus selbst gebildetes Östrogen an der Regulierung der Spinesynapsendichte im Stratum moleculare des Gyrus dentatus maßgeblich beteiligt ist.

Zur Überprüfung der Altersabhängigkeit der vermuteten Regulierung wurden immature weibliche Ratten mit Letrozol behandelt. Auch in diesen Ratten bewirkte eine einwöchige systemische Letrozol-Gabe eine signifikante Abnahme der Spinesynapsendichte in Stratum moleculare des Gyrus dentatus, die jedoch nicht so ausgeprägt war wie in den adulten Mäusen (ca. 11% im Vergleich zu den Kontrollen).

Desweiteren wurde der Versuch unternommen, die *in vivo* beobachteten Effekte an einen *in vitro*-Modell – der organotypischen Gewebekultur – zu reproduzieren. Hierfür wurden entorhino-hippocampale Kulturen eine Woche lang mit Letrozol bzw. mit 17- $\beta$ -Östradiol behandelt und anschließend die Spinesynapsendichte im Stratum moleculare analysiert. Diese Analyse zeigte weder nach Letrozol- noch nach 17- $\beta$ -Östradiol-Behandlung signifikante Veränderungen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass Östradiol auch im Gyrus dentatus eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Spinesynapsendichte zukommt. Die gefundenen Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass Östradiol die Spinesynapsendichte bei adulten Mäusen stärker fördert als bei immaturren Ratten. Sie stützen damit die Hypothese, dass die vermutete Regulierung der Spinesy-

napsendichte durch Östradiol altersabhängig ist und möglicherweise bereits während der Entwicklung eine Rolle spielt.

Zur weiteren Aufklärung der Frage, worin diese Rolle besteht und inwieweit Östradiol bei der Differenzierung von Neuronen und der Formierung von Neuronenverbänden für die physiologische Funktion von Bedeutung ist, sind weitere Experimente notwendig, die auch zur Findung neuer Therapieansätze – beispielsweise zur Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen von Aromatasehemmern in der Brustkrebstherapie auf die kognitiven Fähigkeiten oder zur Verbesserung deklarativer Gedächtnisleistungen postmenopausaler Frauen – beitragen könnten.

## 8 Literaturverzeichnis

### 8.1 Wissenschaftliche Publikationen

- Abdelgadir ES, Resko JA, Ojeda SR, Lephart ED, McPaul MJ, Roselli CE. 1994. Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in brain. *Endocrinology* 135:395-401.
- Amateau SK, Alt JJ, Stamps CL, McCarthy MM. 2004. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible *de novo* synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology* 145:2906-2917.
- Arevalo MA, Diz-Chaves Y, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. 2011. Selective Oestrogen Receptor Modulators Decrease The Inflammatory Response Of Glial Cells. *J Neuroendocrinol* 1365-2826.
- Arevalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2010. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochem Biophys Acta* 1800(10):1106-1112.
- Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM. 2002. Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res* 4: 235-245.
- Bakker J, Baum MJ. 2008. Role for estradiol in female-typical brain and behavioural sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29:1-16.
- Balthazart J, Ball GF. 2006. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 29:241-249.
- Balthazart J. 1991. Testosterone metabolism in the avian hypothalamus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:557-570.
- Barres BA, Smith SJ. 2001. Cholesterol – Masking or Breaking the Synapse: *Science* 294:1296-1297.
- Barreto G, Santos-Galindo M, Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2009. Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones. *Endocrinology* 150(11):5010-5.
- Baulieu EE. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog in Horm Res* 52:1-32.
- Behl C. 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Implications for prevention and therapy. *Subcell Biochem* 38:56-78.
- Behl C, Manthey D. 2000. Neuroprotective Activities of Estrogen: an Update. *J Neurocytol* 29:351-358.
- Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski JS, Paysen D, König A, Rune GM. 2010. Roles of 17-beta-estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex* 12:2985-2995.

- Bender CA, Sereika SM, Berga SL, Vogel VG, Brufsky AM, Paraska KK, Ryan CM. 2006. Cognitive impairment associated with adjuvant therapy in breast cancer. *Psychooncology* 15:422-430.
- Berman KF, Schmidt PJ, Rubinow DR, Danaceau MA, Van Horn JD, Esposito G, Ostrem JL, Weinberger DR. 1997. Modulation of cognition-specific cortical activity by gonadal steroids: a positronemission tomography study in women. *Proc natl Acad Sci USA* 94:8836-8841.
- Beyer C, Pawlak J, Karolczak M. 2003. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *J Neurochem* 87(3):545-550.
- Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, Grenngard P, McEwen BS. 2001. Novel Target Sites for Estrogen Action in the Dorsal Hippocampus. An Examination of Synaptic Proteins. *Endocrinology* 142:1284-1289.
- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72(5):381-405.
- Brito VI, Carrer HF, Cambiasso MJ. 2004. Inhibition of tyrosine kinase receptor type B synthesis blocks axogenic effect of estradiol on rat hypothalamic neurones *in vitro*. *Eur J Neurosci* 20: 331-337.
- Caldwell BM, Watson RI. 1952. An evaluation of psychologic effects of sex hormone administration in aged women. Results of therapy after six months. *J Gerontol* 7:228-244.
- Cambiasso MJ, Colombo JA, Carrer HF. 2000. Differential effect of estradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur J Neurosci* 12: 2291-2298.
- Campbell S, Whitehead M. 1977. Oestrogen therapy and the menopausal syndrome. *Clin Obstet Gynaecol* 4(1):31-47.
- Castellon SA, Ganz PA, Bower JE, Petersen L, Abraham L, Greendale GA. 2004. Neurocognitive performance in breast cancer survivors exposed to adjuvant chemotherapy and tamoxifen. *J Clin Exp Neuropsychol* 26:955-969.
- Ceranik K, Deng J, Heimrich B, Lübke J, Zhao S, Förster E, Frotscher M. 1999. Hippocampal Cajal–Retzius cells project to the entorhinal cortex: retrograde tracing and intracellular labelling studies. *Eur J Neurosci* 4278–4290.
- Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J. 2005. Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci* 25(36):8209-8216.
- Cho JJ, Iannucci FA, Fraile M, Franco J, Alesius TN, Stefano GB. 2003. The role of the estrogen in neuroprotection: implications for neurodegenerative diseases. *Neuro Endocrinol Lett* 24: 141-147.
- Cohen MH, Johnson JR, Li N, Chen G, Pazdur R. 2002. Approval Summary: Letrozole in the Treatment of Postmenopausal Women with Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 8(3):665-9.
- Colino A, Malenka RC. 1993. Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant path *in vitro*. *J Neurophysiol* 69:1150-1159.



- 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 U S A* 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.
- Crispino M, Stone DJ, Wei M, Anderson CP, Tocco G, Finch CE, Baudry M. 1999. Variations of Synaptotagmin I, Synaptotagmin IV, and synaptophysin mRNA Levels in Rat Hippocampus during the Estrous Cycle. *Experimental Neurology* 159:574-558.
- Cutter WJ, Craig M, Norbury R, Robertson DM, Whitehead M, Murphy DG. 2003. *In vivo* effects of estrogen on human brain. *Ann N Y Acad Sci* 1007:79-88.
- D'Astous M, Morissette M, Tanguay B, Callier S, Di Paolo T. 2003. Dehydroepiandrosterone (DHEA) such as 17beta-estradiol prevents MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse* 47(1):10-14.
- D'Astous M, Mendez P, Morissette M, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. 2006. Implication of the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signaling pathway in the neuroprotective effect of estradiol in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *Mol Pharmacol* 69(4):1492-1498.
- DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2009. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S113-122.
- 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 USA* 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 I H MRS metabolic abnormalities in temporal lobe epilepsy provide partially complementary information. *Eur J Neurol* 11: 195-205.
- Fan L, Zhao Z, Orr PT, Chambers CH, Lewis MC, Frick KM. 2010. Estradiol-induced object memory consolidation in middle-aged female mice requires dorsal hippocampal extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurosci*. 30(12):4390-4400.
- Fernandez SM, Lewis MC, Pechenino AS, Harburger LL, Orr PT, Gresack JE, Schafe GE, Frick KM. 2008. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *J Neurosci* 28(35):8660-8667.
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM. 2009 a. Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19:692-705.
- Fester L, Zhou L, Voets C, Ossig C, Disteldorf E, Peters C, Bläute F, Prange-Kiel J, Dudzinski D, Jarry H, Rune GM. 2009 b. The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:123-129.

- 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(4):1136-1144.
- Förster E, Zhao S, Frotscher M. 2006. Laminating the hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience* 7,259-268.
- Foidart A, Tlemçani O, Harada N, Abe-Dohmae S, Balthazart J. 1995. Pre- and post-translational regulation of aromatase by steroidal and non-steroidal aromatase inhibitors. *Brain Res* 701(1-2):267-278.
- Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. 1999. 17-beta-estradiol enhances NMDA-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81:925-929.
- Frick KM. 2009. Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Horm Behav* 55(1):2-23.
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y. 1998. Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Transcripts Constitutively Expressed in the Adult Rat Central Nervous System: Colocalization of StAR, Cytochrome P-450XCC/CYP XIA1, and 3 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase) in the Rat Brain. *J Neurochem* 71: 2231-2238.
- Garcia-Segura LM. 2008. Aromatase in the brain: not just für reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 20:705-712.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, ConCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* 63: 29-60. Harburger LL, Saadi A, Frick KM. 2009. Dose-dependent effects of post-training estradiol plus progesterone treatment on object memory consolidation and hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation in young ovariectomized mice. *Neuroscience* 160(1):6-12.
- Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lønning 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(3):751-757.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10:1286-1291.
- Green PS, Bishop J, Simpkins JW. 1997. 17 $\alpha$ -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. 2003. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology* 174:151-162.
- Hatanaka Y, Mukai H, Mitsuhashi K, Hojo Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Sato R, Kawato S. 2009. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 381(4):728-732.
- Henderson VW. 2005. Menopause and disorders of the central nervous system. *Minerva Ginecol* 57(6):579-592.

- Henderson VW. 2006. Estrogen-containing hormone therapy and Alzheimer's disease risk: understanding discrepant inferences from observational and experimental research. *Neuroscience* 138(3):1031-1039.
- Henderson VW. 2007. Cognition and cognitive aging. *Climacteric* 10 Suppl 2:88-91.
- Henderson VW. 2009a. Menopause, cognitive ageing and dementia: practice implications. *Menopause Int* 15(1):41-44.
- Henderson VW. 2009b. Aging, estrogens, and episodic memory in women. *Cogn Behav Neurol* 22(4):205-214.
- Henderson VW. 2010. Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochim Biophys Acta* 1800(10):1077-1183.
- Henneman WJP, Sluimer JD, Barnes J, van der Flier WM, Sluimer IC, Fox NC, Scheltens P, Vrenken H, Barkhof F. 2009b. Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease. *Neurology* 72:999-1007.
- Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, Kominami T, Kimoto T, Honma S, Poirier D, Kawato S. 2009. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* 150(11):5106-5112.
- Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, Kawato S. 2008. Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol* 290(1-2):31-43.
- Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H, Mukai H, Morrison JH, Janssen WGM, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kwato S. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes Estradiol from pregnenolone by cytochromes P450 17  $\alpha$  and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 865-870.
- Jelks KB, Wylie R, Floyd CL, McAllister AK, Wise P. 2007. Estrogen targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha. *J Neurosci* 27:6903-6913.
- 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.
- Kadish I, van Groen T. 2002. Low Levels of Estrogens Significantly Diminish Axonal Sprouting after Entorhinal Cortex Lesions in the Mouse. *Neurosci* 22: 4095-4102.
- 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):1517-1521.
- 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* 14: 483-493.

- Lamprecht SA, Kohen F, Ausher J, Zor U, Lindner HR. 1976. Hormonal stimulation of oestradiol-17-beta release from the rat ovary during early postnatal period. *J Endocrinol* 68:343-344.
- Lee SJ, McEwen B. 2001. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 569-591.
- 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, Shanabrough M, Horvath TL. 2000. Hormonal regulation of hippocampal spine synapse density involves subcortical mediation. *Neuroscience* 101(2):349-356.
- Leutgeb S, Leutgeb JK, Moser MB, Moser EI. 2005. Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Curr Opin Neurobiol* 15(6):738-746.
- Levin ER. 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19(8):1951-1959.
- Li D, Field PM, Yoshioka N, Raisman G. 1994. Axons regenerate with correct specificity in horizontal slice culture of the postnatal rat entorhino-hippocampal system. *Eur J Neurosci* 6(6):1026-1037.
- Li LX, Cheng YF, Lin HB, Wang C, Xu JP, Zhang HT. 2011. Prevention of cerebral ischemia-induced memory deficits by inhibition of phosphodiesterase-4 in rats. *Metab Brain Dis* 26(1):37-47.
- Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR. 2007. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. *Eur J Neurosci* 24:3475-3488.
- McCarthy MM. 2008. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 88(1):91-124.
- McEwen B. 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57: 357-384.
- McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, Li C, Yuen G, Milner TA. 2001. Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci* 98(13):7093-7100.
- Meethal SV, Liu T, Chan HW, Ginsburg E, Wilson AC, Gray DN, Bowen RL, Vonderhaar BK, Atwood CS. 2009. Identification of a regulatory loop for the synthesis of neurosteroids: a steroidogenic acute regulatory protein-dependent mechanism involving hypothalamic-pituitary-gonadal axis receptors. *J Neurochem* 110(3):1014-1027.
- Mehra RD, Sharma K, Nyakas C, Vij U. 2005. Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Res* 1056(1):22-35.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA. 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res. Brain Res Rev* 37: 3-12.
- Miller NR, Jover T, Cohen HW, Zukin RS, Etgen AM. 2005. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* 146(7):3070-3079.

- Morissette M, Al Sweidi S, Callier S, Di Paolo T. 2008b. Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. *Mol Cell Endocrinol* 290(1-2):60-69.
- Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, Estrada-Camarena E, Mendez P, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. 2008a. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108(3-5):327-338.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S. 2007. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100(4):950-967.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Ishii H, Kimoto T, Kawato S. 2006. Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology* 84(4):255-263.
- Murphy DD, Cole NB, Greenberger V, Segal M. 1998. Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:2550-2559.
- Murphy DD, Segal M. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16(13):4059-4068.
- Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Petro Z, Kuhn M. 1975. The formation and metabolism of estrogens in brain tissue. *Adv Biosci* 15:105-121.
- Nathan BP, Barsukova AG, Shen F, McAsey M, Struble RG. 2004. Estrogen Facilitates neurite Extension via Apolipoprotein E in Cultured Adult Mouse Cortical Neurons. *Endocrinology* 134: 3065-3073.
- Österlund M, Kuiper GGJM, Gustafsson JA, Hurd YL. 1998. Differential distribution and regulation of estrogen receptor a and b mRNA within the female brain. *Mol Brain Res* 54:175-180.
- Paganini-Hill A, Clark LJ. 2000. Preliminary assessment of cognitive function in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 64:165-176.
- Pechenino AS, Frick KM. 2009. The effects of acute 17beta-estradiol treatment on gene expression in the young female mouse hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.* 91(3):315-322.
- Pfriefer FW. 2003. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 60:1158-1171.
- Phillips KA, Ribi K, Fisher R. 2011. Do aromatase inhibitors have adverse effects on cognitive function? *Breast Cancer Res* 13:203.
- Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. 2009. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* 30(2):239-258.
- Pike CJ, Nguyen TV, Ramsden M, Yao M, Murphy MP, Rosario ER. 2008. Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Horm Behav* 53(5):693-705.

- Pike CJ. 2001. Testosteron attenuate  $\beta$ -amyloid toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 919: 160-165.
- Pike CJ. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-x(L) expression and beta-amyloid-induced apoptosis: Relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:1552-1563.
- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Jarry H, Rune GM. 2009. Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm* 116(11):1417-1425.
- Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM. 2008. Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180(2):417-426.
- Prange-Kiel J, Rune GM. 2006. Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138(3):765-772.
- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune GM. 2006. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16(5):464-471.
- Prange-Kiel J, Rune GM, Leranath C. 2004. Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats. *Eur J Neurosci* 19: 309-317.
- Prange-Kiel J., Wehrenberg U. Jarry H. Rune G.M. 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptor in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13: 184-192.
- Puddefoot JR, Barker S, Glover HR, Malouitre SD, Vinson GP. 2002. Non-competitive steroid inhibition of oestrogen receptor functions. *Int J Cancer* 101(1):17-22.
- Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martínez A, Delgado-García JM, Soriano E. 2010. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci* 30:4636-4649.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- Rogers JT, Weeber EJ. 2008. Reelin and apoE actions on signal transduction, synaptic function and memory formation. *Neuron Glia Biol* 4(3):259-270.
- Rosario ER, Pike CJ. 2008. Androgen regulation of beta-amyloid protein and the risk of Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 57(2):444-453.
- Roselli CE, Horton LE, Resko JA. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117:2471-2477.
- Rune GM, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M. 2006. Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res* 31(2):145-155.
- Rune GM, Frotscher M. 2005. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 136(3):833-842.
- Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelmann G, Frotscher M. 2002. Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113:167-175.

- Saunders-Pullman R. 2003. Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither or both? *Endocrine* 21: 81-87.
- Schumacher M, Guennoun R, Robert F et al. 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* 14: 18-33.
- Segal M, Murphy D. 2001. Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm Behav* 40:156-159.
- Sherwin BB. 2003. Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr rev* 24:133-151
- Sherwin BB. 1996. Hormones, mood, and cognitive functioning in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 8:20S-26S.
- Sherwin BB. 1988. Affective changes with estrogen and androgen replacement therapy in surgically menopausal women. *J Affect Disord* 14(2):177-187.
- 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.
- Shughrue PJ, Merchenthaler I. 2000. Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience* 99(4):605-612.
- Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. 1999. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19(7):2455-2463.
- 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 IE. 1999. Aromatase inhibitors: a dose-response effect? *Endocrine-Related Cancer* 6: 245-249.
- Spiers HJ, Maguire EA, Burgess N. 2001. Hippocampal amnesia. *Neurocase* 7: 357-382.
- Sterio DC. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134(Pt 2):127-136.
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2005. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol* 68(4):959-965.
- Stoffel-Wagner B. 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145: 669-679.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of neural tissue. *J Neurosci methods* 37:173-182.
- Tamamaki N. 1999. Development of afferent fiber lamination in the infrapyramidal blade of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 411:257-266.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19(14):5792-5801.

- Tang MX, Maestre G, Tsai WY, Liu XH, Feng L, Chung WY, Chun M, Schofield P, Stern Y, Tycko B, Mayeux R. 1996. Effect of age, ethnicity, and head injury on the association between APOE genotypes and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 802:6-15.
- Toran-Allerand CD. 2004. Estrogen and the brain: beyond ERalpha and Erbeta. *Exp Gerontol* 39:1579-1586.
- Treves A, Tashiro A, Witter ME, Moser EI. 2008. What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154:1155-1172.
- Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wikars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM. 2012. Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female mice by destabilizing the spine cytoskeleton. *J Neurosci*: in press.
- von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM. 2006. Oestrogen synthesis in hippocampus: role in axonal outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18:847-856.
- Wallace M, Luine V, Arellanos A, Frankfurt M. 2006. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Res* 1126:176-182.
- Wang SH, Morris RG. 2010. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 61:49-79, C1-4.
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM. 2001. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J. Neurochem* 76: 1879-1886.
- Wharton W, Gleason CE, Lorenze KR, Markgraf TS, Ries ML, Carlsson CM, Asthana S. 2009. Potential role of estrogen in the pathobiology and prevention of Alzheimer's disease. *Am J Transl Res* 1(2):131-147.
- Woolley CS. 1998. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav* 34(2):140-148.
- Woolley CS, McEwen BS. 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci* 12:3642-3650.
- Yague JG, Azcoitia I, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Muñoz A. 2010. Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain Res* 1315:41-52.
- Yague JG, Wang AC, Janssen WG, Hof PR, Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Morrison JH. 2008. Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Res* 1209:115-127.
- Zhao C, Fujinaga R, Tanaka M, Yanai A, Nakahama K, Shinoda K. 2007. Region-specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain: immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *J Comp neurol* 500:557-573.
- Zhao Y, Wang J, Liu C, Jiang C, Zhao C, Zhu Z. 2011. Progesterone influences postischemic synaptogenesis in the CA1 region of the hippocampus in rats. *Synapse* 65(9):880-891.



- Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegschneider K, Rune GM. 2010. Aromatase Inhibitors Induce Spine Synapse Loss in the Hippocampus of Ovariectomized Mice. *Endocrinology* Vol 151, No. 3 1153-1160.
- Zwain IH, Yen SSC. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140:3843-3852.

## 8.2 Ergänzende Fachliteratur, Dissertationen und Websites

- Benninghoff, D., Zenker (Ed.). Akert K. 1994. Das Limbische System. In: *Anatomie*, Band 2, Urban & Fischer, München.
- Benninghoff A, Drenckhahn D. 2004. *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen mit StudentConsult-Zugang: Band 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. Urban & Fischer-Verlag, München.
- Leidenberger F, Strowitzki T, Ortmann O. 2009. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 4. Auflage.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 8. Auflage.
- Novartis Pharmaceuticals Corporation. 2003. Material Safety Data Sheet for Femara 2,5 mg Tablets (Letrozole).
- Prange-Kiel J, Rune GM 2006. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen: 9. Auto- und parakrine Regulation im ZNS: Neurosteroid*. Springer Verlag, Berlin.
- Rohen JW. 2001. *Funktionelle Neuroanatomie, Lehrbuch und Atlas*. Schattauer-Verlag, Stuttgart, 6. Auflage.
- Trepel M. 2008. *Neuroanatomie mit StudentConsult-Zugang. Struktur und Funktion*. Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, 4. Auflage.
- Thompson RF. 2001. *Das Gehirn*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, München.
- von Blittersdorf B. 2011. Östrogenabhängige Spinesynapsendichte: Ein sexueller Dimorphismus. *Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf*.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus>. Stand 2011.03.19.

## 8.3 Abbildungen

- Abbildung 1: Lage des Hippocampus im Gehirn des Menschen. Miserlou. 2008.  
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hippolobes.gif>. Hippocampus.  
<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-2/IMAGES/Page191.gif>.  
 The original image was uploaded on en.wikipedia as en:Image:Hippolobes.gif.  
 Stand 2011.03.08.
- Abbildung 2: Lage des Hippocampus im Gehirn der Ratte. Oben: Lage des

Hippocampus im Rattenhirn. Unten: Hippocampus-Gewebeschnitt (die Schnittebene befindet sich vertikal zur Längsachse). Akert. 1994. Das Limbische System. In: Benninghoff, D., Zenker (Ed.), Anatomie, Band 2, Urban & Schwarzenberg, München.

- Abbildung 3: Vergleich Hippocampus und Seepferd. Prepariert von László Seress' 1980. Hippocampus\_and\_seahorse\_cropped.JPG. Laszlo Seress' preparation of a human hippocampus alongside a sea horse. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hippocampus\\_and\\_seahorse\\_cropped.JPG](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hippocampus_and_seahorse_cropped.JPG). Stand 2001.03.09.
- Abbildung 4: Zeichnung der neuronalen Verbindungen des Nagetier-Hippocampus. Cajal 1911. File:CajalHippocampus.jpeg from: Santiago Ramón y Cajal [1909] (1911). Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes. Paris: A. Maloine. <http://en.wikipedia.org/wiki>. Stand 2001.03.09.
- Abbildung 5: Projektion des Tractus perforans in das Stratum moleculare des Gyrus Dentatus. Förster E, Zhao S, Frotscher M. 2006. Laminating the hippocampus. Nature Reviews Neuroscience 7, 259-268.
- Abbildung 6: Auswirkungen der Letrozolbehandlung auf die Spinesynapsendichte: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen aus dem Stratum moleculare des Gyrus dentatus adulter, weiblicher Mäuse, welchen sieben Tage lang einmal täglich intraperitoneal Letrozol (A) bzw. Kontroll-Lösung (B) injiziert worden war. Institut für Neuroanatomie, Universität Hamburg, UKE, 2009.
- Abbildung 7: Spinesynapsen-Dichte weiblicher, adulter Mäuse nach 7-tägiger intraperitonealer Behandlung mit Letrozol bzw. Kontroll-Lösung. A. König-Kruse, Hamburg 2012.
- Abbildung 8: Spinesynapsen-Dichte weiblicher, adulter Mäuse nach Ovariectomie bzw. nach 7-tägiger Behandlung mit Kontroll-Lösung. A. König-Kruse, Hamburg 2012.
- Abbildung 9: Zusammenschau der Spinesynapsen-Dichten weiblicher, adulter Mäuse nach 7-tägiger Behandlung mit Letrozol bzw. mit Kontroll-Lösung bzw. mit Kontroll-Lösung nach Ovariectomie. A. König-Kruse, Hamburg 2012.
- Abbildung 10: Auswirkungen der Letrozolbehandlung auf die Spinesynapsendichte: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen aus dem Stratum moleculare des Gyrus dentatus immaturer weiblicher Ratten, welchen sieben Tage lang intraperitoneal Letrozol (A) bzw. Kontroll-Lösung (B) injiziert worden war. Institut für Neuroanatomie, Universität Hamburg, UKE, 2009.
- Abbildung 11: Spinesynapsen-Dichte weiblicher, immaturer Ratten nach 7-tägiger Behandlung mit Letrozol bzw. Kontroll-Lösung. A. König-Kruse, Hamburg 2012.
- Abbildung 12: Spinesynapsen-Dichte von Gewebekulturen aus der Molekularschicht immaturer, weiblicher Ratten nach 7-tägiger Behandlung mit Letrozol bzw. mit Kontroll-Lösung. A. König-Kruse, Hamburg 2012.
- Abbildung 13: Spinesynapsen-Dichte von Gewebekulturen aus der Molekularschicht immaturer, weiblicher Ratten nach 7-tägiger Behandlung mit 17- $\beta$ -Östradiol bzw. mit Kontroll-Lösung. A. König-Kruse, Hamburg 2012.

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

---

Ort, Datum, Unterschrift

## 10 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Rune für die Möglichkeit, die Dissertation in ihrer Abteilung durchführen zu können.

Herrn Prof. Bender danke ich für die Überlassung des Themas und seine konstruktive Betreuung.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Neuroanatomie danke ich für die gute Zusammenarbeit in vielen Bereichen, die interessanten Seminare und für die kritische Diskussion der Ergebnisse. Insbesondere danke ich Frau Asmus, Frau Herbort und Frau Kruck für ihre exzellente technische Assistenz.

Helge danke ich für die Hilfe bei der Bearbeitung der Scan-Dateien.

Meiner Mutter danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit und die stetige Ermutigung.

Omi Hannelore danke ich für die vielen schönen Tage, die Anneke mit ihr verbringen durfte und diese Dissertation so möglich wurde.

Stefan danke ich für die Hilfe bei der Überwindung aller vermeintlichen Excel-Tücken bis spät in die Nächte hinein und für all seine sonstige geduldige Unterstützung.