

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Die Beteiligung der Östrogenrezeptoren α und β bei östrogen-induzierter synaptischer Plastizität

Dissertation

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

vorgelegt von

Christoph R. Behem
aus Hamburg

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.06.2014**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. L. Fester

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. S. Windhorst

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Östrogene werden im Hippocampus <i>de-novo</i> synthetisiert | 5 |
| 1.2 Der Hippocampus..... | 8 |
| 1.3 Östrogen-induzierte synaptische Plastizität..... | 10 |
| 1.4 Dendritische Spinesynapsen und der Spineapparat | 13 |
| 1.5 Synaptische Proteine und synaptische Plastizität..... | 18 |
| 1.6 Die Rolle der Östrogenrezeptoren | 19 |
| 1.7 Fragestellung..... | 23 |
| 2. Material | 24 |
| 2.1 Geräte und Materialien..... | 24 |
| 2.2 Chemikalien und Substanzen | 27 |
| 2.3 Antikörper | 29 |
| 2.4 Ansätze..... | 29 |
| 2.5 DNA für die Synthese der siRNA | 32 |
| 3. Methoden | 35 |
| 3.1 Untersuchungen anhand hippocampaler Sliceulturen, Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie..... | 35 |
| 3.1.1 Herstellung von hippocampalen, organoiden Schnittkulturen (Sliceulturen) | 35 |
| 3.1.2 Behandlung der Slicekultur mit spezifischen Antagonisten | 36 |
| 3.1.3 Immunhistochemische Nachweise von Synaptopodin und Synaptophysin und deren Auswertung | 37 |
| 3.1.4 Die Herstellung von elektronenmikroskopischen Ultradünnschnittbildern und quantitative Auswertung der Spinesynapsen | 40 |
| 3.2 Die Klonierung von ER- α -Knockout-Mäusen und deren Behandlung mit Östradiol..... | 43 |
| 3.2.1 Die Klonierung von ER- α -Knockout-Mäusen..... | 43 |
| 3.2.2 Die Behandlung der ER- α -Knockout-Mäuse mit Östradiol..... | 43 |
| 3.2.3 Die Präparation der ER- α -Knockout-Mäuse..... | 43 |
| 3.2.4 Die Herstellung von elektronenmikroskopischen Ultradünnschnittbildern und quantitative Auswertung der Spinesynapsen | 44 |
| 3.3 Die Herstellung von siRNA gegen ER- α und ER- β , die Transfektion hergestellter Zelldispersionskulturen sowie die immunocytochemische Färbung von Dispersionskulturen mit Antikörpern gegen ER- α und ER- β . | 45 |
| 3.3.1 Die Herstellung von Zelldispersionskulturen | 45 |
| 3.3.2 Die Auswahl der siRNA | 46 |
| 3.3.3 Die Herstellung der siRNA | 47 |
| 3.3.4 Die Transfektion der Zelldispersionskulturen mit siRNA | 48 |
| 3.3.5 Der Nachweis von ER- α und ER- β in Zelldispersionskulturen | 49 |
| 4. Ergebnisse | 51 |
| 4.1 Der Einfluss von Antagonisten gegen ER- α und ER- β auf Spinesynapsendichte | 51 |
| 4.2 Spinesynapsendichte in ovariectomierten ER- α -KO-Mäusen nach Östradiolbehandlung | 54 |
| 4.3 Expression synaptischer Proteine | 56 |
| 4.4 Weitere Untersuchungen..... | 62 |
| 4.4.1 Der Einfluss von siRNA gegen ER- α und ER- β | 62 |
| 4.4.2 Untersuchungen von Synaptophysin und Synaptopodin in der Region CA3 | 64 |
| 4.4.3 Die Kombination der Antagonisten mit dem Aromataseinhibitor Letrozol | 65 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Diskussion | 66 |
| 5.1 Methodische Überlegungen | 66 |
| 5.1.1 Untersuchungen zur Spinesynapsendichte in CA1 | 66 |
| 5.1.2 Untersuchungen von Slicekulturen..... | 67 |
| 5.1.3 Untersuchung von synaptischen Proteinen..... | 67 |
| 5.1.4 Untersuchungen von ER-KO-Mäusen..... | 68 |
| 5.1.5 Die Verwendung von chemischen Substanzen..... | 69 |
| 5.1.6 Die Spezifität der verwendeten Substanzen | 69 |
| 5.1.7 Die Komplexität der ERs | 70 |
| 5.2 Der Einfluss von ER-Antagonisten auf die Spinesynapsendichte | 71 |
| 5.3 Die Auswirkung des ER-α-Knockouts auf östradiol-induzierte synaptische Plastizität..... | 72 |
| 5.4 Der Einfluss von Letrozol und ER-Antagonisten auf synaptische Proteine | 74 |
| 5.5 siRNA gegen ER-α und ER-β führt <i>in-vitro</i> zum Zelltod von hippocampalen Zelldispersionskulturen | 77 |
| 5.6 ER-Heterodimere | 78 |
| 5.7 Cytosolische Signalkaskaden und membrangebundene ERs..... | 78 |
| 5.8 Sowohl der ER-α als auch der ER-β sind bei synaptischer Plastizität beteiligt..... | 80 |
| 6. Zusammenfassung | 81 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis | 82 |
| 8. Literaturverzeichnis..... | 85 |
| 9. Danksagung | 98 |
| 10. Eidesstattliche Versicherung | 99 |

1. Einleitung

1.1 Östrogene werden im Hippocampus *de-novo* synthetisiert

Sexualhormone wie Östradiol sind nicht nur in den Gonaden sondern auch in anderen peripheren Organen wie dem Gehirn nachweisbar. Dabei liegen Sexualhormone im Nervengewebe teilweise in höheren Konzentrationen als im Plasma vor (Baulieu und Robel 1990). Zudem verändern sich nach Adrenektomie und Gonadektomie die Konzentrationen dieser Steroidhormone nicht (Corpéchet et al., 1981; Corpéchet et al., 1983). Dies führte zu der Annahme, dass Sexualhormone und andere Steroidhormone in Nervengewebe *de-novo* synthetisiert werden. Baulieu und Robel (1990) fanden erste Hinweise für eine Synthese von Steroidhormonen aus Cholesterin im Gehirn von Ratten. Sie nannten diese von endokrinen Organen unabhängig produzierten Steroide Neurosteroid.

Östrogene können auch im Hippocampus nachgewiesen werden. Sie liegen im Hippocampus in deutlich höheren Konzentrationen als im Plasma vor (Hojo et al., 2004). Zu den Östrogenen gehören Östradiol, Östriol und Östron. Nur Östradiol besitzt die volle Östrogenwirkung. Östriol sowie Östron müssen erst in dieses umgewandelt werden (Kronenberg, 2011). Die Synthese von Östradiol ist in Abbildung 1 dargestellt. Östrogene entstehen aus Cholesterin. Dazu wird eine Reihe von Enzymen benötigt. Für eine *de-novo* Synthese von Östrogenen im Hippocampus müssten diese dort nachweisbar sein.

Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese von Östrogenen ist der Transport von Cholesterin in das Mitochondrium, welcher durch StAR, Steroidogenic acute regulatory protein, reguliert wird (Kronenberg, 2011). Furukawa et al. (1998) und Wehrenberg et al. (2001) wiesen die mRNA von StAR bzw. das Protein im Gehirn nach. Besonders im Hippocampus fanden sie hohe Konzentrationen. Danach wird Cholesterol in Pregnenolon umgewandelt, katalysiert durch Cytochrom p450_{scc} (Kronenberg, 2011).

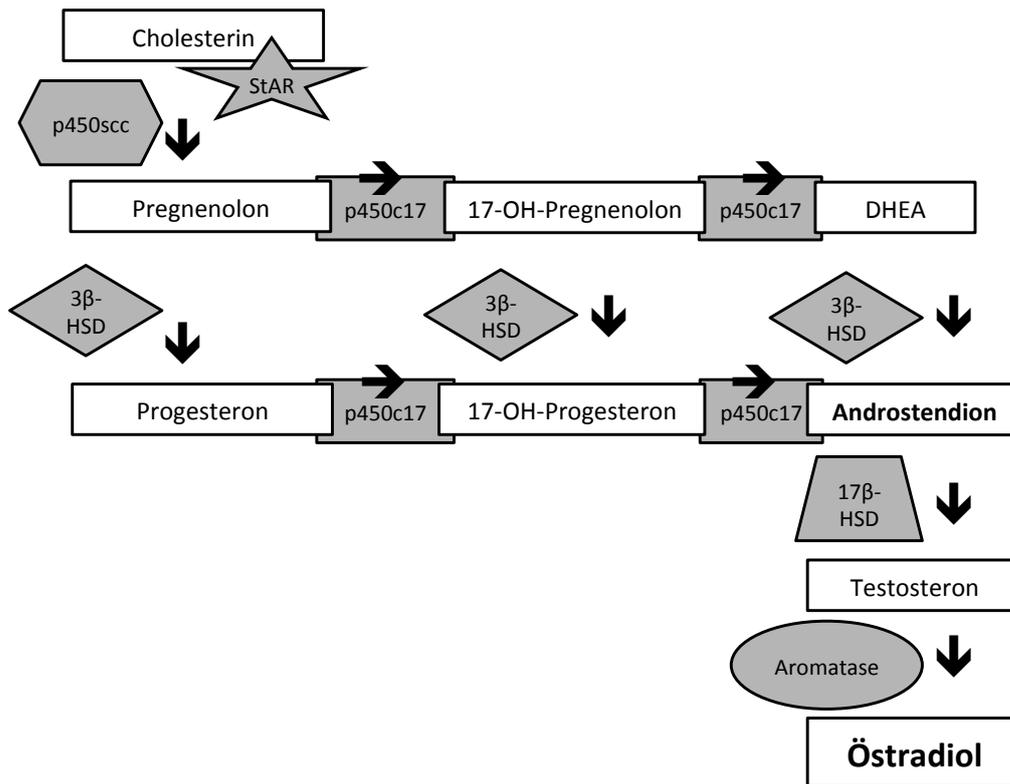


Abb. 1, Synthese der Steroidhormone (nach Löffler et al., 2007)

Baulieu und Robel (1990) konnten erstmals Cytochrom p450scc im Gehirn von Ratten nachweisen. Cytochrom p450scc konnte auch im Hippocampus nachgewiesen werden (Furukawa et al., 1998).

Des Weiteren sind für die Östrogensynthese zusätzlich 3β-HSD-II, Cytochrom p450c17 und 17β-HSD-I verantwortlich (Kronenberg, 2011). Die Koexpression von StAR, 3β-HSD-II und Cytochrom p450scc ließ sich in hippocampalen Neuronen ebenfalls nachweisen (Furukawa et al., 1998, Wehrenberg et al., 2001). Im letzten Schritt entsteht aus Testosteron durch die Aktivität der Aromatase Östradiol. Auch Cytochrom p450-Aromatase findet sich im ZNS. Naftolin et al. (1971) konnten bereits Anfang der 1970er Jahre die Aromatase im limbischen System nachweisen. Abdelgadir et al. (1994) gelang erstmals der Nachweis der Aromatase in Neuronen des Hippocampus auf mRNA-Ebene. Auf Proteinebene zeigte sich eine deutliche Immunreaktivität für Aromatase in Neuronen des Hippocampus nicht jedoch in Gliazellen (Sanghera et al., 1991; Hojo et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Enzyme der Östrogensynthese im Hippocampus vorliegen und mit großer Wahrscheinlichkeit auch aktiv sind.

Der definitive Nachweis der Aromataseaktivität gelang erstmals Prange-Kiel et al. (2003). Sie untersuchten dazu dissoziierte hippocampale Zellkulturen. Sie bestanden aus hippocampalen Zellen von Ratten und enthielten etwa 95% Neuronen und 5% Oligodendrozyten. Das Kulturmedium war frei von Serum und Steroiden. Mit einem Radioimmunassay (RIA) konnten erhebliche Mengen von Östradiol im Überstand der Kulturen gemessen werden, deren Syntheseort nur die hippocampalen Neuronen sein konnten. Die Abnahme der Östradiolmenge nach Hemmung der Synthese durch einen Aromatasehemmer unterstützte den Nachweis, dass hippocampale Neuronen in der Lage sind, Östrogene zu synthetisieren. Die Wirksamkeit des hippocampal synthetisierten Östradiols im Sinne einer auto/parakrinen Regulation ließ sich am Verhalten der Östrogenrezeptoren ablesen, da es sich bei diesen Rezeptoren um Transkriptionsfaktoren handelt, die durch ihren Liganden stimulierbar sind. Ein Absenken der Östradiolsynthese hatte eine geringere Expression des Östrogenrezeptors α zur Folge. Bei Zugabe von 17β -Östradiol kam es zu einer entgegengesetzten Regulation des Östrogenrezeptors α . Für den ER- α konnte eine Regulation auch nach Gabe von Cholesterol gezeigt werden (Fester et al., 2009a), da Cholesterol die Östradiolsynthese in den Neuronen dramatisch stimuliert. Auch in hippocampalen Slicekulturen konnte eine Östradiolproduktion mittels RIA nachgewiesen werden, welche durch Zugabe von Letrozol signifikant reduziert wurde (Kretz et al., 2004). Slicekulturen ermöglichen die Untersuchung von Nervenzellen im intakten Zellverband *in-vitro*. Somit konnte eine Östrogensynthese auch im intakten Zellverband demonstriert werden.

Die *de-novo* Synthese von Östradiol aus Cholesterol im Hippocampus konnte schließlich von Fester et al. (2006) gezeigt werden. Sie wiesen eine signifikante Reduktion der Östradiolsynthese nach Knockdown von StAR nach. Dazu nutzten sie siRNA gegen StAR mRNA. Die mit Fluoreszenzfärbung kontrollierte Transfektionsrate betrug 40-60%, der Knockdown von StAR wurde immunocytochemisch nachgewiesen. Da StAR den ersten Schritt bei der Synthese von Steroidhormonen aus Cholesterol darstellt, würde eine verminderte Östradiolproduktion nach StAR-Knockdown eine verminderte *de-novo* Synthese von Östrogenen aus Cholesterol widerspiegeln. Tatsächlich kommt es nach StAR-Knockdown zu einer Reduktion der Östradiolproduktion um 20% (Fester et al., 2006).

1.2 Der Hippocampus

Der Hippocampus ist funktionell entscheidend für die Entstehung von Gedächtnisinhalten. Er wird als anatomisches Korrelat von Lernen und Gedächtnis angesehen. Er wird klassischerweise zum Archikortex gezählt und gehört zum limbischen System als Teil des Papez-Kreises (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

Der im Frontalschnitt S-förmige Hippocampus besteht aus dem Gyrus dentatus und dem Ammonshorn, Cornu ammonis (CA). Der Hippocampus befindet sich im Temporallappen am Boden des Unterhorns des Seitenventrikels (Benninghoff und Drenckhahn, 2004). Einen wichtigen Input erlangt der Hippocampus aus dem entorhinalen Cortex über den Tractus perforans, der an Körnerzellen des Gyrus dentatus endet (Bear et al., 2009). Daneben steht der Hippocampus mit den kognitiven Arealen des gesamten Neocortex in Verbindung.

Der dreischichtige Gyrus dentatus besteht aus einer mittleren Körnerzellschicht (Stratum (St.) granulare), einer Schicht aus apikalen Dendriten (St. moleculare) und dem Hilum. Die Dendriten besitzen viele dornenartige Fortsätze, die dendritischen Spines, an denen sich v.a. exzitatorische Synapsen befinden. Axone des Gyrus dentatus bilden das Moosfasersystem mit großen präsynaptischen Boutons, welche ausschließlich an Zellen von CA3 und CA4 enden.

Das Ammonshorn besitzt ebenfalls einen dreischichtigen Aufbau. In der mittleren Schicht, dem St. pyramidale finden sich Pyramidenzellen. Apikale Dendriten projizieren in drei Schichten: in das St. radiatum, das St. lacunosum und das St. moleculare. Basale Dendriten erstrecken sich bis in das St. oriens. Axone des Cornu ammonis verlaufen über den Alveus in den Fornix. CA1 Pyramidenzellen projizieren außerdem zum Subiculum und zur Area entorhinalis. Axone von CA3 geben sogenannte Schaffer-Kollaterale ab, die CA3 mit CA1 verbinden. Im distalen St. moleculare enden Projektionsfasern aus der Area entorhinalis, im St. lacunosum und oriens enden Kommissurenfasern aus dem kontralateralen Hippocampus und im St. radiatum enden die Schaffer-Kollaterale aus CA3. Im St. oriens enden ebenfalls

Schaffer-Kollateralen. Auch an den Dendriten des Cornu ammonis finden sich reichlich Spines mit ebenfalls v.a. exzitatorischen Spinesynapsen (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass über den Tractus perforans aus dem entorhinalen Cortex Informationen zum Gyrus dentatus laufen, weiter über Moosfasern zu CA3 und über Schaffer-Kollateralen Informationen weiter zu CA1 gelangen (Bear et al., 2009). Von CA1 gehen Efferenzen direkt oder über das Subiculum zurück zur Area entorhinalis und zum Corpus amygdaloideum (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

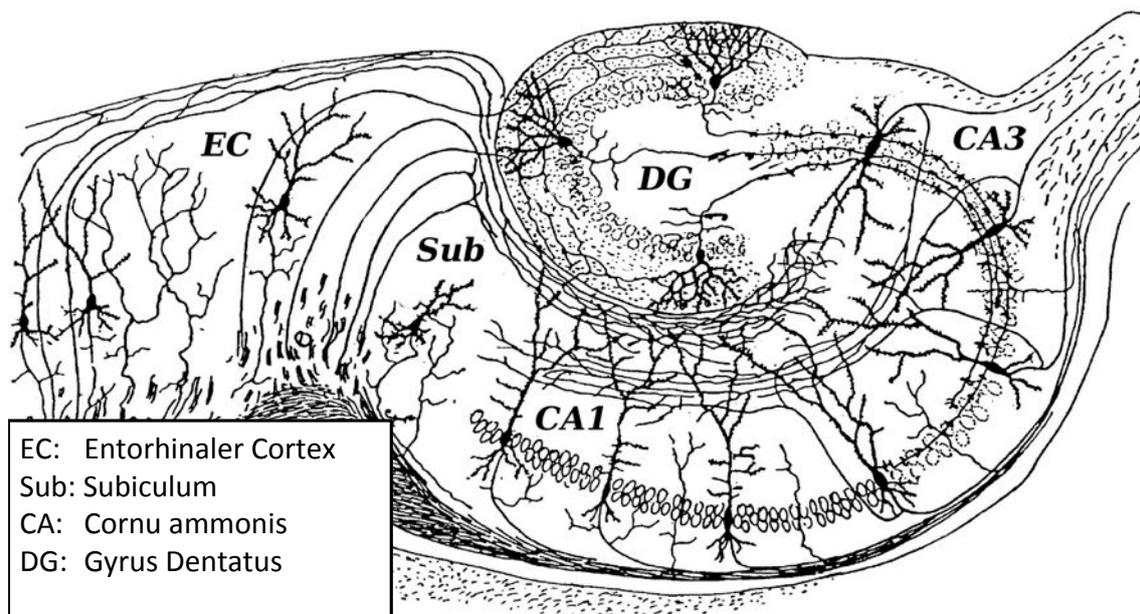


Abb. 2, Hippocampus (Ramon y Cajal, 1909)

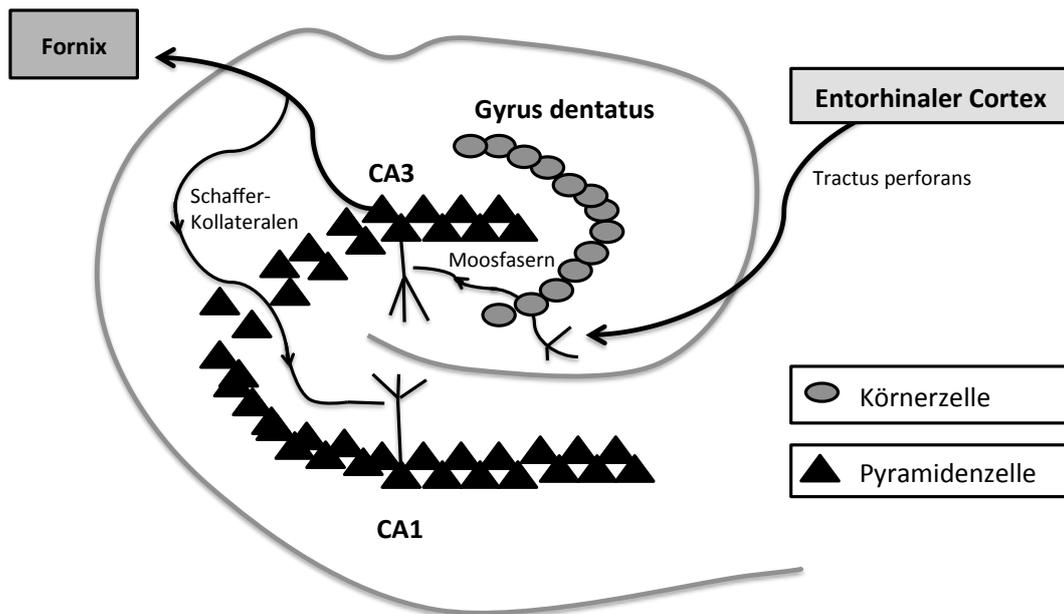


Abb. 3, Verbindungen und synaptische Verschaltungen im Hippocampus (nach Bear et al., 2009)

1.3 Östrogen-induzierte synaptische Plastizität

Östrogene beeinflussen synaptische Plastizität. Synapsen zwischen Nervenzellen sind keine starren Strukturen, sie sind vielmehr flexibel und unterliegen einer stetigen Modifizierung. Der Begriff „synaptische Plastizität“ beschreibt die Fähigkeit einer Synapse sich aufgrund von vermehrter oder verminderter Aktivierung in ihrer Stärke zu verändern. Dies kann sowohl in funktioneller als auch in struktureller Hinsicht sowie auf biochemischer und molekularer Ebene erfolgen. Östrogene verändern die Struktur von Synapsen. Gould et al. (1990) zeigten, dass eine Ovariectomie zu einem Abfall der Synapsendichte führt. Dazu untersuchten sie an Ratten sogenannte dendritische Spinesynapsen im Hippocampus. Spinesynapsen sind Synapsen, die an dornenartigen Vorsprüngen von Dendriten, den Spines, vorkommen. Spines sind bedeutsam für synaptische Plastizität. Morphologische Veränderungen von Spinesynapsen korrelieren mit einer Veränderung der Stärke von Synapsen und sind mit synaptischer Plastizität assoziiert (Yuste und

Bonhoeffer, 2001). Nach Ovariectomie kommt es zu einer Reduktion der Spinesynapsendichte. Die zusätzliche Gabe von Östradiol führt hingegen zu einem Rescue des Spinesynapsenverlustes (Gould et al., 1990). Zudem schwankt die Spinesynapsendichte in Abhängigkeit vom Zyklus. In Phasen hoher Plasmaöstrogenspiegel kommt es zu einem Anstieg der Spinesynapsendichte (Woolley et al., 1990; Prange-Kiel et al., 2008). Die Gabe von Östradiol *in-vivo* führt ferner zu einer Zunahme der Spinesynapsendichte in CA1 im Hippocampus (Woolley und McEwen, 1992).

Kretz et al. (2004) zeigten eine Reduktion der Spinesynapsendichte nach Gabe des Aromataseinhibitors Letrozol. In Slicekulturen konnte anhand von quantitativer Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine Abnahme der Spinesynapsendichte festgestellt werden. Auch in Zelldispersionskulturen an Lucifer-yellow-gefüllten Neuronen kommt es zu einer Herunterregulation der Spinesynapsendichte nach Letrozolgabe. Zudem wurde eine Abnahme apikaler Spinesynapsen in Biocytin-gefüllten CA1 Pyramidenzellen in Slicekulturen festgestellt. In weiteren Versuchen ließ sich der Spinesynapsenverlust nach Letrozolgabe wiederholen (Zhou et al., 2007; Fester et al., 2009a). Eine Zunahme der Spinesynapsen in organotypischen Slicekulturen und Zelldispersionskulturen nach Zugabe von Östradiol hingegen konnte nicht gezeigt werden (Kretz et al., 2004). Die gemeinsame Gabe von Letrozol und Östradiol führt gleichwohl zu einem Rescue (Zhou et al., 2007). Auch die Gabe von Cholesterol bewirkt einen Anstieg der Spinesynapsendichte (Fester et al., 2009a). Zusammengefasst weist dies auf eine Regulation der Spinesynapsen durch *de-novo* synthetisierte Östrogene hin.

Östrogene beeinflussen zudem an synaptischer Plastizität beteiligte synaptische Proteine. Östrogene regulieren die Expression von Synaptophysin und Synaptopodin im Hippocampus. Nach Induktion synaptischer Plastizität konnte eine vermehrte Synthese von Synaptophysin und Synaptopodin festgestellt werden. Dazu wurden Stimulationselektroden in den Tractus perforans eingebracht. Synaptische Plastizität wurde in Form von elektrophysiologisch messbarer, langandauernder Verstärkung der synaptischen Übertragung durch elektronische Stimulation ausgelöst. Daraufhin

konnte ein Anstieg sowohl von Synaptophysin als auch von Synaptopodin festgestellt werden (Mullany und Lynch, 1997; Yamazaki et al., 2001). Nach Östradiolgabe kommt es zu einer Reduktion von Synaptopodin in Zelldispersionskulturen. Dies wird begleitet von einer Herabregulation von Spinesynapsen, die einen Spineapparat beinhalten (Fester et al., 2009b). Zudem kommt es nach Östradiolgabe zu einem Anstieg der Synaptophysinexpression (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009a; Fester et al., 2009b). Fester et al. (2009a) zeigten, dass es zu einer Regulation von Synaptophysin auch nach Cholesterolgabe kommt. Zudem resultiert ein StAR-Knockdown in einer verminderten Expression von Synaptophysin, ein Rescue kann nur durch Zugabe von 17β -Östradiol und nicht durch Zugabe von Cholesterol erreicht werden. Synaptophysin wird zudem nach Gabe von Letrozol herunterreguliert, ein Rescue kann ebenfalls durch Östradiol erzielt werden (Kretz et al., 2004; J. Prange-Kiel et al., 2006; Fester et al., 2009a, Zhou et al., 2010). Die Ergebnisse legen die Regulation synaptischer Proteine durch aus Cholesterol *de-novo* synthetisierte Östrogene nahe.

Wie lassen sich Veränderungen der Spinesynapsendichte und der Expression von synaptischen Proteinen nach Blockade der Östrogensynthese durch Letrozol sowie Knockdown von StAR mit zyklischen Schwankungen der Spinesynapsendichte in Einklang bringen? Prange-Kiel et al. (2008) konnten zeigen, dass eine Abhängigkeit der Spinesynapsendichte von GnRH besteht. GnRH ist das Schlüsselhormon der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. GnRH wird vom Hypothalamus pulsatil ausgeschüttet und führt zur Freisetzung von LH und FSH aus der Hypophyse (Löffler et al., 2007). Eine GnRH-abhängige *de-novo* Synthese von Östrogenen im Hippocampus könnte die Veränderungen der Spinesynapsendichte in Abhängigkeit vom Zyklus erklären. Tatsächlich werden nach niedrigen Dosen von GnRH die Östradiolsynthese, die Spinesynapsendichte sowie das synaptische Protein Spinophilin hochreguliert, während hohe Dosen GnRH zu einer Herabregulation führen (Prange-Kiel et al., 2008). Zyklische Schwankungen der Spinesynapsendichte könnten unabhängig von Östrogenen des Plasma aus pulsatilem GnRH-Release des Hypothalamus resultieren, da GnRH die *de-novo*

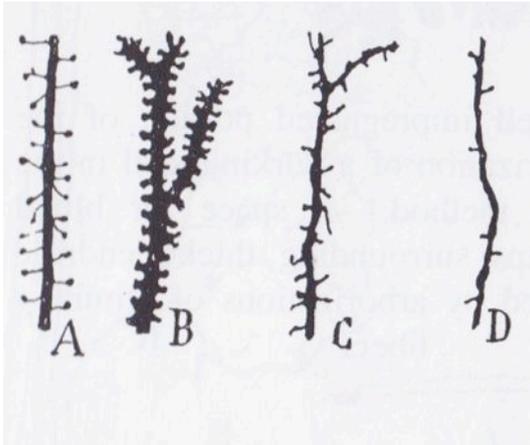
Östrogensynthese im Hippocampus beeinflusst und *de-novo* synthetisierte Östrogene wiederum die Spinesynapsendichte regulieren.

Eine Blockade der *de-novo* Synthese von Östrogenen könnte zudem Auswirkungen auf die Kognition besitzen. Ein Verlust von Spinesynapsen nach Gabe von Letrozol konnte auch *in-vivo* gezeigt werden (Zhou et al., 2010; Vierk et al., 2012). Bei postmenopausalen Frauen werden Letrozol und andere Aromatasehemmer für die endokrine Therapie mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren empfohlen (Burstein et al., 2010; Kreienberg et al., 2012). Nach Therapie mit Aromataseinhibitoren konnte eine Verschlechterung von Gedächtnisleistungen festgestellt werden (Jenkins et al., 2004). Im Labor von Prof. Rune und Prof. Büchel unterstützen erste Ergebnisse einer klinischen Studie diese Hypothese.

1.4 Dendritische Spinesynapsen und der Spineapparat

Dendriten des zerebralen Cortexes besitzen dornenförmige Projektionen, die Spines (Gray, 1959). Bereits Cajal vermutete, dass Dendriten durch Spines ihre rezeptive Oberfläche vergrößern und engere Kontakte mit Axonen knüpfen (Ramon y Cajal, 1899).

An diesen Spines besteht tatsächlich ein synaptischer Kontakt (Gray, 1959). Synaptische Verbindungen an Spines werden als Spinesynapsen bezeichnet. Spines kann man in mehrere Formen unterteilen. Jones und Powell (1969) unterschieden „pedunculated“ von „sessile“ Spines. Peters und Kaiserman-Abramof (1970) unterteilten weiter in die drei Hauptformen: „stubby“ Spines (entsprechen „sessile“ Spines), „mushroom-shaped“ Spines und „thin“ Spines (entsprechen beide „pedunculated“ Spines).



A: Spines einer Pyramidenzelle
 B: Spines einer Purkinjezelle
 C: Spines einer Korbzelle
 D: Spines einer Golgizelle

Abb. 4, Spinevarianten (Ramon y Cajal, 1899)

Zusätzlich lassen sich noch verzweigte „branched“ Spines davon unterscheiden (Harris et al., 1992).

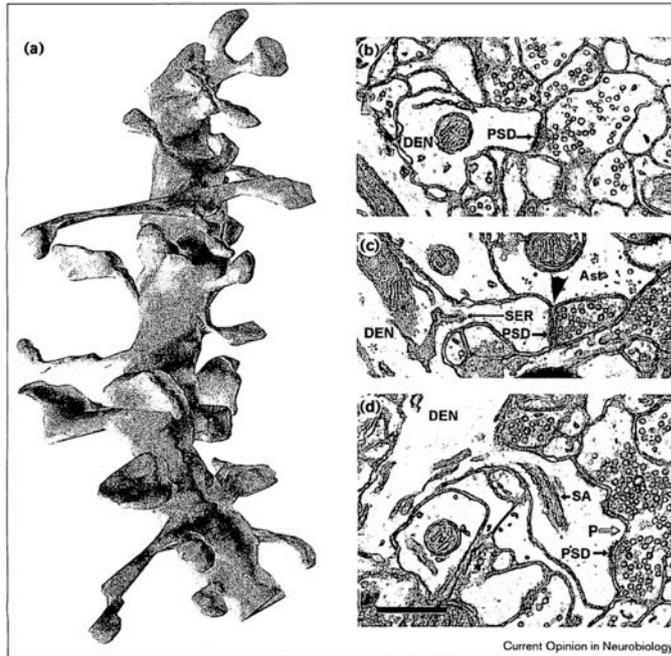
Daneben gibt es im frühen Stadium der Spinogenese noch dendritische Filopodien. An einem Dendriten kommen dendritische Spines und Spinesynapsen unterschiedlicher Form und Dichte vor.

TABLE 1
Shapes and lengths of dendritic spines

| Shapes | Dimensions |
|---------------------------|---|
| <p>1. Stubby</p> | <p>Average length 1.0 μ Range 0.5–1.5 μ</p> |
| <p>2. Mushroom-shaped</p> | <p>Average length 1.5 μ Range 0.5–2.5 μ Average stalk length 0.8 μ Average bulb dimensions 1.4 \times 0.6 μ</p> |
| <p>3. Thin</p> | <p>Average length 1.7 μ Range 0.5–4.0 μ Average stalk length 1.1 μ Average bulb dimensions 0.6 μ</p> |

Abb. 5, Formen und Längen dendritischer Spines (Peters und Kaiserman-Abramof, 1970)

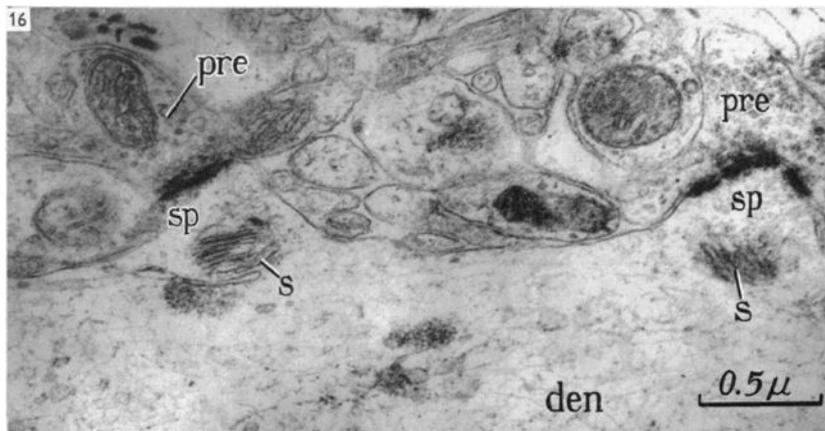
Dendritische Spines bilden die postsynaptische Seite exzitatorischer Synapsen im Hippocampus und besitzen postsynaptische Verdichtungen (post-synaptic-densities, PSDs) welche ca. 10% ihrer Oberfläche ausmachen (Harris, 1999).



- (a) Dendritische Spines in der erwachsenen Ratte
- (b) Stubby Spine
- (c) Thin Spine
- (d) Mushroom Spine mit Spineapparat (SA=Spineapparat)

Abb. 6, dendritische Spines in der erwachsenen Ratte (Harris, 1999)

Viele mushroom-spines besitzen einen Spineapparat, eine Struktur im Cytoplasma von Spines die weder im Perikaryon noch im Dendritenstamm vorkommt. Dieser Spineapparat besteht aus glattem endoplasmatischem Retikulum (von Gray als „Sacs“ bezeichnet) sowie elektronendichten Platten (von Gray als „dense band“ bezeichnet) (Gray, 1959). Während nur ca. 20% aller Spines einen Spineapparat besitzen, so findet er sich bei mushroom-spines zu 80% (Harris, 1999). Es wird vermutet, dass nur Spines mit Spineapparat in den Prozess der synaptischen Plastizität involviert sind (Spacek & Harris, 1997; Harris, 1999). Nach Östradiolgabe nimmt die Anzahl der Spineapparat-beinhaltenden Spinesynapsen um ca. 60% ab (Fester et al., 2009b).



pre: Präsynapse

sp: Spine

s: Spineapparat

den: Dendrit

Abb. 7, Spines und Spineapparat im elektronenmikroskopischen Bild (Gray, 1959)

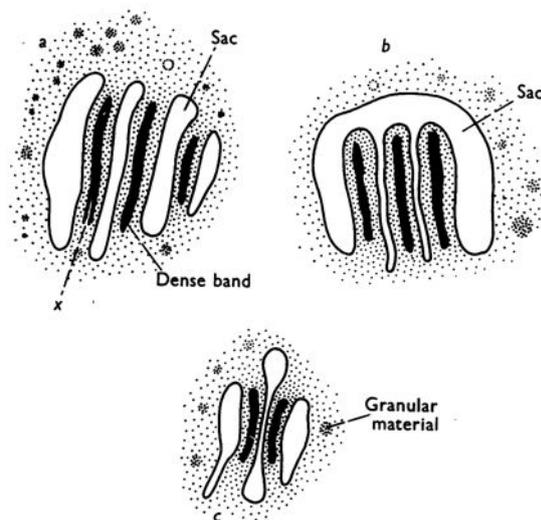
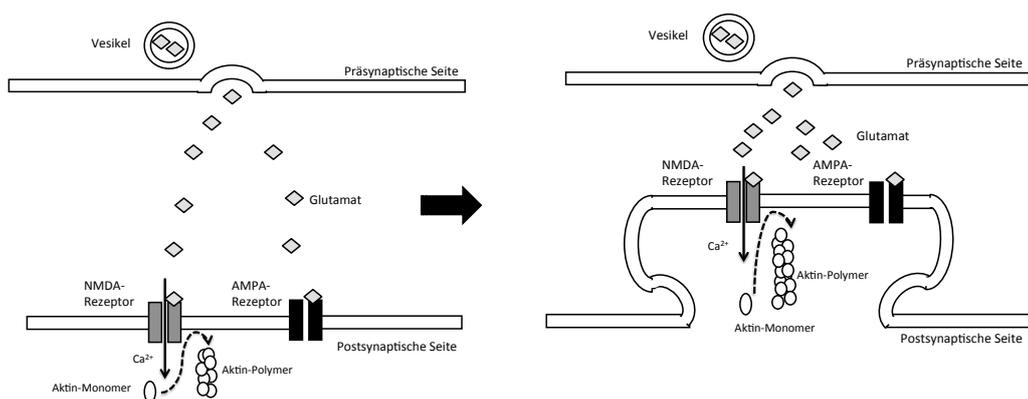


Abb. 8, Illustrationen von verschiedenen Anordnungen des Spineapparats (Gray, 1959)

Dem Spineapparat könnte bei der synaptischen Plastizität eine bedeutende Rolle zukommen, da es sich dabei um einen intrazellulären Calciumspeicher handelt. Calcium sorgt für Aktivierung des Cytoskeletts und könnte so die Morphologie von Spines beeinflussen (Fifková et al., 1983). Calciumeinstrom verändert das Cytoskelett u.a. durch die Polymerisierung des Strukturproteins Aktin (Lamprecht und LeDoux, 2004). Spines können sich bewegen. Über Aktin kommt es innerhalb von Sekunden zu einer schnellen Motilität von Spines (Fischer et al., 1998). Diese Veränderungen sind zu schnell, als dass man sie durch nukleäre Mechanismen oder Proteinsynthese erklären könnte. Neben langsamen Veränderungen gibt es also auch schnelle Veränderungen über das Aktincytoskelett (Lamprecht und LeDoux, 2004). Abbildung 9 zeigt die Entstehung eines neuen Spines nach calcium-induzierter Aktinpolymerisation.



Extrazelluläre Stimulation induziert eine schnelle Aktinpolymerisation und führt zur Bildung neuer Spines

Abb. 9, Spineentstehung nach calcium-induzierter Aktinpolymerisation (nach Lamprecht und LeDoux, 2004)

Die Aktinpolymerisation ist zudem durch die Phosphorylierung von Cofilin reguliert. Nach Letrozolgabe kommt es zu einer Dephosphorylierung von Cofilin (Vierk et al., 2012).

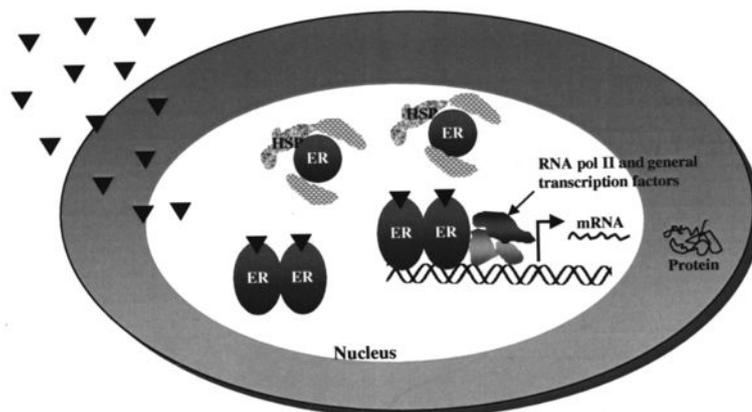
1.5 Synaptische Proteine und synaptische Plastizität

Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein in synaptischen Vesikeln (Valtorta et al., 2004). Synaptophysin ist Bestandteil von präsynaptischen Vesikeln und ist somit ein gut etablierter präsynaptischer Marker (Südhof und Jahn, 1991). Induktion von synaptischer Plastizität durch elektrophysiologische Stimulation von hippocampalen Slicekulturen ist mit einem Anstieg der Synaptophysinexpression assoziiert (Bozdagi et al., 2000). Auch wenn Synaptophysin selbst für eine Neurotransmitterfreisetzung nicht essentiell ist, so konnte eine essentielle Funktion für synaptische Plastizität durch Untersuchungen an Synaptophysin-KO-Mäusen gezeigt werden (Janz et al., 1999). Zudem ist Lernen und Gedächtnis bei Synaptophysin-KO-Mäusen beeinträchtigt (Schmitt et al., 2009).

Synaptopodin ist ein prolin-reiches und aktin-bindendes Protein (Mundel et al., 1997; Asanuma et al., 2005; Faul et al., 2008; Okubo-Suzuki et al., 2008), welches von Mundel et al. (1997) als solches benannt wurde, da es nicht nur in Podozyten der Niere vorkommt, sondern ebenfalls im Gehirn. Dort ist es mit dem Aktin-Cytoskelett postsynaptischer Verdichtungen sowie mit Spinesynapsen assoziiert. Synaptopodin verbindet den Spineapparat mit dem Aktin-Cytoskelett und könnte so bei der aktin-vermittelten Plastizität durch Formung von Spines beteiligt sein (Deller et al., 2000). Synaptopodin markiert nur Spineapparat-beinhaltende Spines. Fehlt Synaptopodin, so fehlt auch der Spineapparat, was wiederum zu einer Verminderung von synaptischer Plastizität sowie von Lernleistungen führt (Deller et al., 2003).

1.6 Die Rolle der Östrogenrezeptoren

Östrogene beeinflussen synaptische Plastizität. Östrogene wirken klassischerweise über Östrogenrezeptoren (ER). Östrogenrezeptoren sind liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren der Nuklear-Hormon-Rezeptorfamilie (Dahlman-Wright et al., 2006). Sie liegen bis zur Bindung durch den Liganden assoziiert an Komplexen mit Hitzeschockproteinen vor. Nach Bindung ihrer Liganden dissoziieren die Hitzeschockproteine von den Östrogenrezeptoren. Die Östrogenrezeptoren bilden Dimere und gelangen schließlich in den Zellkern, um dort an estrogen-receptor-response-elements (ERE) der DNA zu binden und die Transkription zu beeinflussen (Österlund und Hurd, 2001).



Die Östrogenrezeptor-Aktivierung: Östrogene diffundieren durch die Zellwand und binden an unbesetzte Östrogenrezeptoren (ER), gefolgt von einer Dissoziation von Hitzeschockproteinen (HSP) und der Rezeptor-Dimerisierung. Die ER-Dimere binden an estrogen-receptor-response-elements (ERE) der Zielgene und regulieren die Transkription.

Abb. 10, Östrogenrezeptoraktivierung (Österlund und Hurd, 2001)

Es gibt zwei verschiedene Subtypen des Östrogenrezeptoren, den Östrogenrezeptor α (ER- α) und den Östrogenrezeptor β (ER- β) (Kuiper et al., 1997). Beide Östrogenrezeptoren bestehen aus fünf verschiedenen Regionen, der N-terminalen Domäne (A/B), der DNA-bindenden Domäne (C), einer kurzen Gelenkstruktur (D), einer großen Ligandenbindungsdomäne (E) sowie einer kurzen C-terminalen Domäne (F) (Österlund und Hurd, 2001).

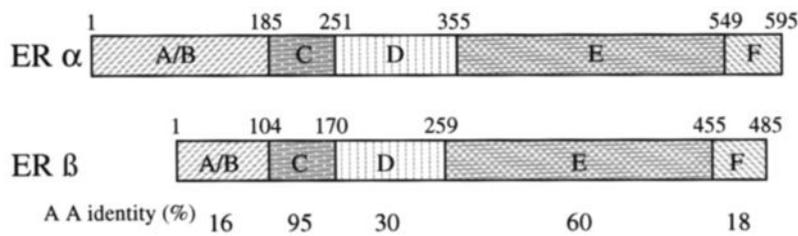


Abb. 11, Vergleich von ER- α und ER- β (Österlund und Hurd, 2001)

Die N-terminale A/B Domäne besitzt eine transkriptionsaktivierende Funktion, welche Zielgene durch Interaktion mit dem Transkriptionsapparat aktiviert. Die C-Domäne besitzt zwei Typ II Zink-Finger-Proteine, welche bei der spezifischen DNA-Bindung sowie bei der Rezeptor-Dimerisierung beteiligt sind. Die Liganden-bindende Domäne beinhaltet nicht nur Bereiche für die Ligandenbindung, sondern ist auch an der Rezeptor-Dimerisierung, Lokalisation in den Zellkern sowie Interaktionen mit Transkriptions-Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren beteiligt (Kuiper und Gustafsson, 1997). Die Östrogenrezeptoren sind teilweise annähernd identisch, so sind sie im Bereich der DNA-Bindungs-Domäne zu fast 95% homolog, im Bereich der C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne zu 55% (Kuiper et al., 1997; Kuiper und Gustafsson, 1997). Unterschiede bestehen jedoch in der N-terminalen Region. Die Östrogenrezeptoren besitzen zwei Transkriptionsfunktion-aktivierende Domänen, AF1 am N-terminalen Ende und AF2 am C-Terminus. Unterschiede in der Transkriptionsaktivität der beiden Rezeptoren lassen sich auf AF1 am N-Terminus zurückführen (Delaunay et al., 2000).

Östrogenrezeptoren binden als Dimere an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte estrogen-receptor-response-elements (ERE) mit dem Palindrom GGTCAnnnTGACC (Dahlman-Wright et al., 2006). Klassischerweise bilden Östrogenrezeptoren Homodimere. Daneben binden ER- α und ER- β auch als Heterodimere an die EREs (Cowley et al., 1997; Kuiper und Gustafsson, 1997; Pettersson et al., 1997). Dabei wird die Bindungsaffinität dieser Heterodimere als vergleichbar mit der von ER- α Homodimeren und sogar höher als die von ER- β Homodimeren beschrieben (Cowley et al., 1997).

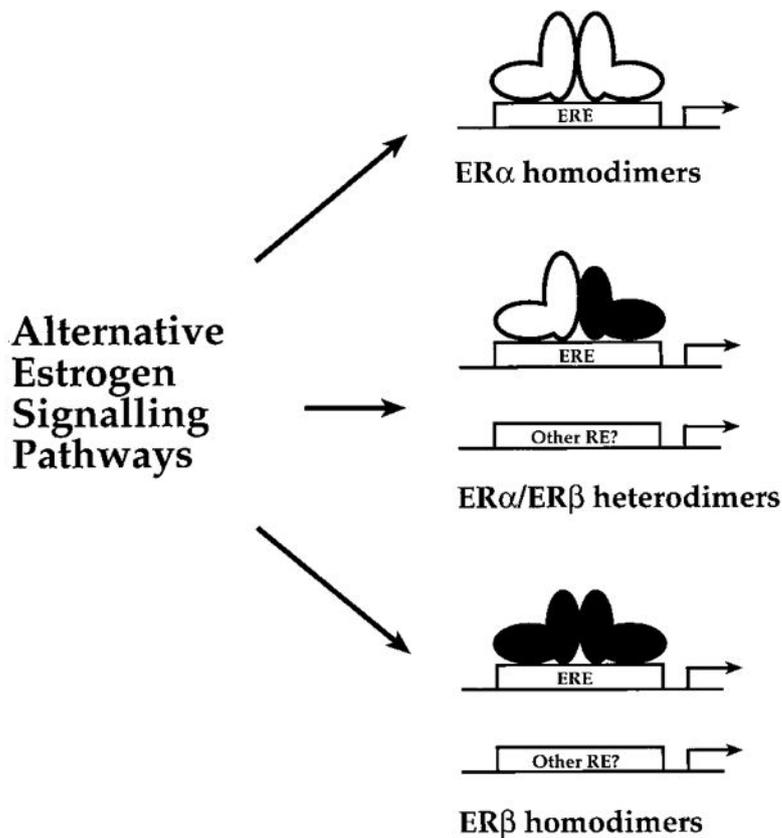


Abb. 12, alternative Signalwege von Östrogenen (Kuiper und Gustafsson, 1997)

Neben den nukleären Östrogenrezeptoren wurden zusätzlich membran-gebundene Östrogenrezeptoren im Gehirn entdeckt. Im Gehirn binden Östrogene an G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren (Becker, 1999). Einer dieser Rezeptoren ist der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor GPR30. Der GPR30 konnte immunhistochemisch im Hippocampus nachgewiesen werden und scheint die intrazelluläre Calciumkonzentration zu beeinflussen (Brailoiu et al., 2007).

Zudem gibt es Hinweise für eine direkte, schnelle Wirkung der ERs auf intrazelluläre Signalkaskaden. Östrogene aktivieren Proteinkinasen im Hypothalamus (Lagrange et al., 1997; Kelly et al., 1999) und ERs aktivieren die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) direkt im Cytoplasma von kortikalen Neuronen (Singer et al., 1999). Dabei kommt es vermutlich zu Bildung von Komplexen der ERs mit anderen Proteinen (Singh et al., 1999). Östradiol könnte über die MAPK u.a. die Spinogenese beeinflussen (Hojo et al. 2011).

Beide Rezeptoren, sowohl der ER- α als auch der ER- β , konnten im Hippocampus in CA1 und CA3 nachgewiesen werden. Dabei konnten die Östrogenrezeptoren sowohl auf mRNA-Ebene (Shughrue und Merchenthaler, 2000; Österlund und Hurd, 2001; Wehrenberg et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2003; Kalita et al., 2005), als auch immunhistochemisch auf Proteinebene, sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma nachgewiesen werden (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2003; Kalita et al., 2005). Autoradiographische Untersuchungen belegten die Bindung von Östrogenen an ihre Rezeptoren *in vivo* (Shughrue und Merchenthaler, 2000). Die Anzahl der Östrogenrezeptoren im Hippocampus ist dabei nicht abhängig vom Geschlecht (Hösli und Hösli, 1999). Allerdings gibt es lokale Unterschiede. Sowohl in Gewebe als auch in Schnittkulturen ist die mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β in CA3 höher als in CA1. Die Immunreaktivität des ER- α war in CA3 ebenfalls stärker ausgeprägt (Rune et al., 2002).

Die Expression von Östrogenrezeptoren wird durch ihren Liganden reguliert (Schwartz et al., 1997; Xiao und Goff, 1998; Pillai et al., 2002; Murata et al., 2003). Prange-Kiel et al. (2003) konnten zeigen, dass die Regulation der Östrogenrezeptoren durch von hippocampalen Neuronen synthetisierte Östrogene im Hippocampus vorhanden ist. Unter Stimulation mit Östradiol kommt es im Hippocampus zu einem Anstieg des ER- α während der ER- β herunterreguliert wird. Umgekehrt kommt es unter Blockade der Östrogensynthese durch den Aromataseinhibitor Letrozol zu einem Anstieg des ER- β , während die Konzentration des ER- α abnimmt (Prange-Kiel et al., 2003).

1.7 Fragestellung

Östrogene besitzen einen bedeutenden Einfluss im Hippocampus. Östrogene werden vom ZNS *de-novo* synthetisiert und beeinflussen synaptische Plastizität. Dabei ist bislang noch unklar, über welche der beiden Rezeptoren die Wirkung von Östrogenen erfolgt bzw. wie stark der Einfluss der beiden Rezeptoren jeweils ist. Sowohl der ER- α als auch der ER- β scheinen dabei beteiligt zu sein (Mukai et al., 2007; Liu et al., 2008; Spencer-Segal et al., 2012). Die Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β könnten aber auch einen unterschiedlichen Einfluss nehmen. In welcher Weise werden synaptische Proteine durch ER- α und ER- β reguliert, welchen Einfluss besitzen die Östrogenrezeptoren auf Spinesynapsen im Hippocampus und welche Bedeutung für synaptische Plastizität weisen sie somit auf? Diese Fragen sollen mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse beantwortet werden. Die bisher in der Literatur veröffentlichten kontroversen Ergebnisse werden im Anschluss mit den Ergebnissen verglichen und diskutiert werden. Das Wissen über die Rezeptorwirkung könnte man nutzen, um Neuronen des Hippocampus spezifisch zu aktivieren und so synaptische Plastizität zu beeinflussen. Insbesondere in Bezug auf verminderte Kognition unter Therapie mit Aromataseinhibitoren könnten die Ergebnisse wichtige Erkenntnisse liefern. Diese Arbeit untersucht die Beteiligung der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β bei östrogen-induzierter synaptischer Plastizität.

2. Material

2.1 Geräte und Materialien

| | |
|--|-------------------|
| Abzug: Vinitex Air | Vinitex |
| Cryostat: Cryostar Microm HM 560 | Thermo Scientific |
| Cryostat-Klingen: Microtome Blades S 35 | Feather |
| Datenbank: NCBI Nucleotide | NCBI |
| Deckgläser: Superior Deckglas No. 1, 24 x 60 mm | Marienfeld |
| Deckgläser: 12 mm Deckglas, rund (als Zellkulturplättchen) | Assistent |
| Digitale Stoppuhr | Roth |
| Digitalwaage: BP 301 S | Sartorius |
| Digitalwaage: Scout Pro 2000 g | Ohaus |
| Elektronenmikroskop CM 100 | Philips |
| Falcon Tubes: Cellstar Tubes 50 ml | greiner bio-one |
| Fermacidal D2 | IC Products SA |
| Filter cartridges (siRNA) | ambion |
| Glasküvette | Assistent |
| Gewebeschneider: Tissue Chopper | Sauer Laborbedarf |
| Gewebeschneider, Klingen: Klingen extra dünn | Rotbart |
| Gläser und Erlenmeyerkolben, diverse Größen | Schott Jenaglas |
| Gradientencycler: Mastercycler gradient | Eppendorf |
| Handschuhe: Peha-soft satin powderfree | Hartmann |
| Inkubator | Binder |
| Inkubator | Heraeus |
| Instrumente: Heidemann Spatel | Aesculap |
| Instrumente: Pinzette, diverse Formen | Dumont, W. Link |
| Instrumente: Schere, diverse Größen und Formen | Hifa |
| Instrumente: Skalpell | Braun |
| Kamera: AxioCam HRC | Zeiss |
| Kopierfolien: A4 182.406 | IMPEGA |
| Kosmetiktücher: Clou Prestige | Wepa |
| Kulturplatte: Multiwell, 6-Well Zellkulturplatte | Falcon |

| | |
|---|-------------------------------|
| Kulturplatten: Tissue Culture Plate, 24 Well | Falcon |
| Kulturschale: Glass Bottom Culture Dish | Mat Tek |
| Kulturschale: Tissue Culture Dish, 100 x 20 mm | Falcon |
| Kulturschale: Tissue Culture Dish, 60 x 15 mm | Sarstedt |
| Magnetrührer: MR 82 | Heidolph |
| Messbecher, diverse Größen | Brand |
| Messbecher, diverse Größen | Hirschmann |
| Mikroskop: Axiolab E | Zeiss |
| Mikroskop: Axioskop 2 | Zeiss |
| Mikroskop: Axiovert 25 | Zeiss |
| Mikroskop: LSM Axiovert 100 | Zeiss |
| Mikroskop: LSM 5.1, HeNe 543 Laser | Zeiss |
| Mikroskop: Stemi DV 4 | Zeiss |
| Mikroskop: Stemi SV 11 | Zeiss |
| Mikrowelle: M 696 | Miele Elektronik |
| Neubauer Zählkammer 0,0025 mm ² , Tiefe 0,100 mm | Marienfeld Superior |
| Objektträger: Super Frost Plus Objektträger 72 x 25 mm | Karl Hecht Assistent |
| Parafilm 4 In. x 125 ft. | Pichiney plastic packaging |
| Parafilm M laboratoy film | American Can Company |
| pH-Meter (digital): Digital pH-Meter 646 | Knick |
| pH-Meter: MP 220 pH Meter | Mettler Toledo |
| Photometer: Ultrospec 3000 | Pharmacia Biotech |
| Photopapier: work b/w paper 310 glossy 24x30 | Tetenal |
| Pinself: diverse Größen | Pelikan |
| Pipette: Eppendorf Reference Pipette, diverse Größen | Eppendorf |
| Pipette: Pipet Man, diverse Größen | Gilson |
| Pipette: Serological Pipet Advantage, diverse Größen | Falcon |
| Pipettenspitze: 200 µl | Sarstedt |
| Pipettenspitze: Tip One Extended length Filter Tip, diverse Größen | Steri Lab |
| Pipettenspitzen: ep T.I.P.S. Standard, diverse Größen | Eppendorf |

| | |
|---|--------------------------------------|
| pipetus-akku | Hirschmann |
| Rasierklingen | Imatech |
| Scheibenschleifmaschine | Proxxon |
| Semidünnschnittgerät Supercut | Reichert-Jung |
| Sicherheitswerkbank: Hera Safe | Thermo |
| Sicherheitswerkbank: Laminair HVR 2472 | Heraeus |
| Silencer [®] siRNA Construction Kit (1620) | ambion |
| Software: Adobe Photoshop Elements 10 Editor | Adobe |
| Software: Axiovision | Zeiss |
| Software: Gimp 2.8.0 | GIMP |
| Software: ImageJ 1.44 | National Institute of Health, USA |
| Software: LSM Axiovert | Zeiss |
| Software: Mendeley Desktop | Mendeley |
| Software: Microsoft Excel 2003 | Microsoft |
| Software: Microsoft Excel für Mac 2011 | Microsoft |
| Software: Microsoft Powerpoint 2003 | Microsoft |
| Software: Microsoft Powerpoint für Mac 2011 | Microsoft |
| Software: Microsoft Word 2003 | Microsoft |
| Software: Microsoft Word für Mac 2011 | Microsoft |
| Software: PASW Statistics 18 (SPSS) | SPSS |
| Software: siRNA Target Finder | ambion |
| Software: Zen 7.1 | Zeiss |
| Stericup+Steritop | Millipore |
| Sterilfilter Flaschen: Nunclos Surface | NunC |
| Sterile Spritzenvorsatzfilter w/o, 2 µm, Cellulose acetate membran | VWR international |
| Stoppuhr | Junghans |
| Sub-cell GT System | Bio Rad |
| Textliner: 48 refill; rot, grün und blau | Faber-Castell |
| Tool: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) | NCBI |
| Tubes (siRNA) | ambion |
| Ultradünnschnittgerät Ultra Cut | Reichert-Jung |
| Vortex: MS2 Minishaker | IKA Works Inc. |

| | |
|--|-----------------------|
| Vortex: Vortex Genie 2 | scientific industries |
| Wasserbad | Memmert |
| Zeitmesser | Junghans |
| Zellkultureinsätze: Cell Culture Inserts 0,4 µm, 30 mm steril | Millicell |
| Zellstofftücher | Wepa |
| Zentrifuge: Combi spin centrifuge FVL 2400 | Boeco |
| Zentrifuge: Hettich Universal 32 R | Hettich |
| Zentrifuge: Mini centrifuge C-1200 | National Labnet Co. |
| Zentrifuge: Seputech Biofuge 15 | Heraeus |

2.2 Chemikalien und Substanzen

| | |
|--|----------------|
| 17β Östradiol | Sigma |
| 2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol (Accelerator) | Serva |
| 2-Dodecanylsuccinic acid anhydride (DDSA) | Serva |
| Aceton (CH ₃) ₂ CO | J.T. Baker |
| Aqua ad iniectabilia | Braun |
| B-27 50%, Cat. No. 17504-044 | Gibco |
| B-27 17504-044 | Invitrogen |
| BSA | Sigma |
| BES: B 4554-25G | Sigma-Aldrich |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O: mr 147,02 | Fluka analytic |
| DAPI: 4',6-Diamiclino-2-Phenylindole | |
| Dihydrochloride D8417 | Sigma-Aldrich |
| DePeX | Serva |
| di-Natriumtetraborat-10-hydrat | Merck |
| di-Natrium-hydrogen-phosphat Heptahydrat | Merck |
| Einbettmedium: Dako Fluorescent Mounting Medium | Dako |
| Ethanol | Walter CMP |
| Ethanol, unvergällt (96%,100%) | Merck |
| GFP | Abcam |

| | |
|--|---------------|
| Glutamax 35050-038 | Invitrogen |
| Glutardialdehyd Lösung 25% | Merck |
| Glycid ether 100 | Serva |
| HBSS 14180-146 | Gibco |
| HCl | Merck |
| HEPES H3537 | Sigma |
| L-Glutamin 200 MM steril filtered, cell culture tested G7513 | Sigma-Aldrich |
| Letrozol | Apotheke UKE |
| MEM 31095-029 | Invitrogen |
| MPP | Tocris |
| NaCl 0,9% | Braun |
| Natriumchlorid M 58,44 g/mol | Carl Roth |
| Natrium-dihydrogen-phosphat Monohydrat | Merck |
| Na ₂ HPO ₄ : MG: 177,99 | Merck |
| Na ₂ HPO ₄ : (di-sodiumhydrogenphosphat) M=141,96 g/mol | Merck |
| NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O Natriumdihydrogenphosphat M=137,99 g/mol | Merck |
| NaOH | Merck |
| Neurobasal A 10888-022 | Invitrogen |
| Neurobasal A ohne Phenolrot 12349015 | Invitrogen |
| NGS | Sigma |
| Nuclease-free aqua dest. | Gibco |
| Osmiumtetroxid | Roth |
| Penicillin/Streptomycin 100x 15140122 | Invitrogen |
| PFA (Paraformaldehyd) | Merck |
| Pferdeserum 16050-130 | Invitrogen |
| PHTPP | Tocris |
| Poly-L-Lysin-hydrobromid P2636 | Sigma-Aldrich |
| Propylenoxid | Serva |
| Pyronin | Merck |
| Saccharose: 342,29 g/mol | Merck |
| Silencer [®] siRNA Construction Kit | ambion |
| Sodium bicarbonate 7,5% | Sigma-Aldrich |

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| Tissue Tek O.C.T. Compound | Sakura Finetek |
| Toluidin blau | Chroma, Merck |
| tri-Natriumcitrat 2xH ₂ O | Merck |
| Trypsin/EDTA | Biochrom |
| Zellkulturwasser | Sigma-Aldrich |

2.3 Antikörper

| | |
|---|----------------------------|
| Alexa fluor 488 goat-anti-rabbit IgG, Best.-Nr.: A-11034 | Molecular probes |
| Alexa fluor 488 goat-anti-mouse IgG, Best.-Nr.: A-11001 | Molecular probes |
| Cy3-conjugated Affini pure goat-anti-mouse IgG, Bestellnummer: 115-165-003 | Jackson Immuno Research |
| Cy3-conjugated Affine pure F(ab) ² goat-anti-rabbit IgG, Bestellnummer: 111-166-045 | Jackson Immuno Research |
| ER α , monoklonal (mouse), ab2746 | abcam |
| ER β , polyclonal (rabbit), ab3577 | abcam |
| Synaptopodin polyklonal (rabbit), Bestellnr.: 163002 | Synaptic Systems |
| Synaptophysin monoklonal (mouse), Bestellnr.: MAB 5258 | Chemicon |
| TAU polyclonal AB 5868 | Chemicon |
| TAU monoclonal T 5530 | Sigma |

2.4 Ansätze

2xBBS (100 ml) für Transfektion:

280 mM NaCl: 1,64g, 1,5 mM Na₂HPO₄ (wasserfrei): 21,3 mg, 50 mM BES:
1,07 g lösen in 80 ml ddH₂O; pH einstellen und auf 100 ml mit H₂O auffüllen; pH
kontrollieren; sterilfiltrieren

Bleicitrat für EM-Kontrastierung:

1,33 g Blei(II)-nitrat, 1,76 g tri-Natriumcitrat $2xH_2O$ in 30 ml aqua dest. (abgekocht, O_2 frei) lösen; max. 7 ml NaOH 1 M zugeben bis die Lösung klar ist; auf 50 ml mit aqua dest. auffüllen

L-Glutamin: 0,2 M

2,9 g L-Glutamin (Sigma, MG 146,1) in 100 ml Zellkulturwasser (Sigma) lösen; sterilfiltrieren; bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ einfrieren, angewendete Konzentration: 12,5 ml/l der 0,2 M Lösung

Borax 1%:

5 g di-Natriumtetraborat-10-hydrat auf 500 ml aqua dest.

2,5 M $CaCl_2$ für Transfektion:

18,38 g $CaCl_2 \times 2H_2O$ in 50 ml H_2O sterilfiltrieren und in Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lagern

2,5% Glutalaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer:

für 10 ml: 1 ml 0,5 M $Na_2H_2PO_4$, 1 ml 0,5 M Na_2HPO_4 , 1 ml 25% Glutalaldehydlösung, 6 ml aqua dest.; pH auf 7,4 einstellen; auf 10 ml mit aqua dest. auffüllen

Glycidether-Mischung:

Stammlösung A: 77 ml Glycid ether 100 und 125 ml DDSA

Stammlösung B: 100 ml Glycid ether 100 und 89 ml MNA

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

HBSS (ohne Ca/Mg, mit 10 mM HEPES):

50 ml 10xHBSS, 5,04 ml HEPES; auf 450 ml mit aqua dest. auffüllen; pH einstellen auf 7,3; auf 500 ml mit aqua dest. auffüllen; sterilfiltrieren

Kulturmedium für Slicekulturen:

Für 100 ml Kulturmedium:

25 ml MEM 2fach, 25 ml Pferdeserum, 25 ml HBSS, 1 ml Penicillin/Streptomycin, 1 ml 2-Glu, 1,25 ml Saccharose, 580 µl Sodium Bicarbonat; mit aqua dest. auf 90 ml auffüllen; pH auf 7,4 einstellen; mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen

0,2 M Natriumphosphatpuffer mit Saccharose:

5,52 g Natrium-dihydrogen-phosphat Monohydrat und 42,88 g di-Natriumhydrogen-phosphat Heptahydrat in 1000 ml aqua dest. lösen

Neurobasalmedium ohne Phenolrot für die Zelldispersionskulturen:

50 ml Neurobasalmedium (ohne Phenolrot), 500 µl B 27, 125 µl L-Glutamin 200 mM, 500 µl Penicillin/Streptomycin

2% Osmiumtetroxid:

1 g Osmiumtetroxid in 50 ml aqua dest. lösen

PBS (phosphat buffered saline): pH 7,4, 2 l

17,8 g 1 M NaCl, 16 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, auffüllen auf 1800 ml, pH einstellen auf 7,4; auf 2 l auffüllen

Perfusionslösung: 2,5% PFA in PBS gelöst, auf pH 7,4 eingestellt

4% PFA:

2 g PFA in Glasflasche; mit 50 ml PBS auffüllen; erwärmen auf 60 °C bis gelöst; abkühlen bei Raumtemperatur

0,1 M Phosphatpuffer:

für 10 ml Puffer:

1 ml 0,5 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 ml 0,5 M Na_2HPO_4 ; mit aqua dest. auf 9 ml auffüllen; pH auf 7,4 einstellen; auf 10 ml mit aqua dest. auffüllen

Pyronin 1%:

1 g Pyronin, 100 ml aqua dest.

Toluidin 1%:

1 g Toluidin blau, 100 ml Borax 1%

Toluidin / Pyronin:

2 Teile 1% Pyronin, 8 Teile 1% Toluidin, vor Gebrauch filtrieren

Uranylacetat 1%:

Uranylacetat 0,5 g in 50 ml aqua dest. lösen und in eine dunkle Flasche filtrieren

2.5 DNA für die Synthese der siRNA

Für die Erstellung der Target Sequenzen und Oligonukleotidsequenzen wurde der siRNA Finder von ambion verwendet.

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Oligonukleotide: Auftragsnummer 2074237

Eurofins MWG

ER α 1:

Target sequence 1: AAAGCCTCGGGAATGGCCTTG

Position in gene sequence: 22

Sense: OD 5,5, 161 μ g, 18,3 nmol, Tm 70,9 °C, MW 8789 g/mol, GC-Gehalt 58,6%, Synthese-Maßstab 0,01 μ mol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AACAAAGGCCATTCCCGAGGCTCCTGTCTC

Antisense: OD 5,0, 147 µg, 16,5 nmol, Tm 70,9 °C, MW 8869 g/mol, GC-Gehalt 58,6%, Synthese-Maßstab 0,01 µmol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AAAGCCTCGGGAATGGCCTTGCCTGTCTC

ERα 2:

Target sequence 4: AACGAGCTGGAGCCCCTCAAT

Position in gene sequence: 61

Sense: OD 4,0, 117 µg, 13,2 nmol, Tm 70,9°C, 8869 g/mol, GC-Gehalt 58,6%, Synthese-Maßstab 0,01 µmol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AAATTGAGGGGCTCCAGCTCGCCTGTCTC

Antisense: OD 4,0, 117 µg, 13,3 nmol, Tm 70,9 °C, MW 8798 g/mol, GC-Gehalt 58,6%, Synthese-Maßstab 0,01 µmol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AACGAGCTGGAGCCCCTCAATCCTGTCTC

ERβ 1:

Target sequence 1: AACTACAGTGTTCCCGGCAGC

Position in gene sequence: 28

Sense: OD 3,7, 106 µg, 12,0 nmol, Tm 70,9 °C, MW 8878, GC-Gehalt 58,6%, Synthese-Maßstab 0,01 µmol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AAGCTGCCGGGAACACTGTAGCCTGTCTC

Antisense: OD 6,2, 185 µg, 21,1nmol, Tm 70,9 °C, MW 8789 g/mol, GC-Gehalt 58,6%, Synthese-Maßstab 0,01 µmol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AACTACAGTGTTCCCGGCAGCCCTGTCTC

ERβ 2:

Target sequence 3: AAGCCCAAATGTGCTATGGCC

Position in gene sequence: 87

Sense: OD 6,1, 176 µg, 19,9 nmol, Tm 69,5 °C, MW 8853 g/mol, GC-Gehalt 55,2%, Synthese-Maßstab 0,01 µmol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AAGGCCATAGCACATTTGGGCCCTGTCTC

Antisense: OD 4,7, 137 µg, 15,6 nmol, Tm 69,5 °C, MW 8813 g/mol, GC-Gehalt 55,2%, Synthese-Maßstab 0,01 µmol, Reinigung HPSF

Sequenz 5'-3': AAGCCCAAATGTGCTATGGCCCCTGTCTC

3. Methoden

3.1 Untersuchungen anhand hippocampaler Slicekulturen, Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie

3.1.1 Herstellung von hippocampalen, organoiden Schnittkulturen (Slicekulturen)

Tiere: Wistar Ratten, nur weiblich, 5. Tag postnatal

Die Präparation erfolgte unter semisterilen Bedingungen. Es wurden sterile Instrumente verwendet und die Präparation erfolgte auf einer mit Alufolie ausgelegten Arbeitsfläche. Die Aluminiumfolie wurde mit Ethanol 70% desinfiziert.

Die Tiere wurden mit einer Schere dekapitiert. Von kaudal nach rostral wurde mit einer Schere die Kopfhaut aufgetrennt und mit einer Pinzette nach lateral abgezogen. Mit einer Schere wurde ein Schnitt in die noch knorpelige Schädeldecke von kaudal nach rostral gemacht. Zusätzlich wurden zwei Entlastungsschnitte von medial nach lateral in Höhe der Augen durchgeführt. Sodann wurden die Hälften der Schädeldecke jeweils nach lateral abgezogen. Mit einem Heidemannspatel wurde von rostral nach kaudal das Gehirn von den Hirnnerven getrennt und somit das Gehirn herausgelöst. Das Gehirn wurde zur weiteren Präparation auf einen mit Medium befeuchteten Schwamm gelegt. Zunächst wurden Kleinhirn und Stammhirn mit einem Skalpell mittels eines Horizontalschnittes abgetrennt. Dann wurden die beiden Hemisphären mit einem Messer durch einen Sagitalschnitt getrennt. Die weitere Präparation erfolgte für beide Hemisphären in gleicher Weise. Als nächstes wurde der Thalamus mit einem Spatel herausgelöst. Dann wurde das Corpus Callosum mit einem Spatel vom Hippocampus getrennt. Anschließend wurde der Hippocampus mit einem Spatel in das Kulturmedium überführt. Die Klinge des

Tissue Chopper wurde mit Alkohol 70% desinfiziert. Mit dem Tissue Chopper wurden horizontale, 375 µm Schnittdicke betragende Schnitte gefertigt. Diese wurden mit Hilfe zweier Heidemannspatel in eine Petrischale mit Medium überführt. Unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskopes wurden mit einem Spatel die Slices getrennt. Jeweils ungefähr 3-8 Schnitte wurden in ein Well überführt, indem sie mit einer Pipette mit zunächst mittels einer Schere abgeschnittener Pipettenspitze mit somit vergrößerter Öffnung aufgenommen wurden. Es waren ca. 3-6 Tiere für zwei gefüllte 6-Well Platten nötig.

3.1.2 *Behandlung der Slicekultur mit spezifischen Antagonisten*

Ein Mediumwechsel fand alle 2 Tage statt, beginnend mit dem Folgetag der Präparation. Hierzu wurde mit einer sterilen Glaspipette das Medium abgesaugt und neues Medium mit einer Eppendorf-Pipette und einer sterilen Pipettenspitze zugegeben. Nachdem für 4 Tage die Vorkultur nur in Medium stattfand, begann die Stimulation der Slices, wobei zuvor erneut ein Mediumwechsel stattfand. Die Wells wurden sorgfältig beschriftet, damit die Gruppen eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Stimulation erfolgte über 7 Tage, auch hierbei wurden alle 2 Tage das Medium sowie die Stimulationssubstanzen gewechselt. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer sterilen Bench durchgeführt.

Für die Stimulationsmedien wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Gruppe 1, Kontrolle: Nur Kulturmedium

Gruppe 2, Letrozol: 10^{-7} M

Gruppe 3, MPP: 10^{-6} M

Gruppe 4, PHTPP: 10^{-6} M

Gruppe 5, MPP: 10^{-6} M + Letrozol: 10^{-7} M

Gruppe 6, PHTPP: 10^{-7} M + Letrozol: 10^{-7} M

Für die Immunhistochemie wurden die Slices in 4% PFA fixiert und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das PFA entfernt und PBS mit 25% Saccharose zugegeben. In den beiden nachfolgenden Tagen wurden die

Slices eingebettet. Hierzu wurden die Slices mit einem Pinsel unter einem Lichtmikroskop getrennt. Die Deckgläschen wurden beschriftet und auf eine schwarze Folie gelegt. Dann wurde auf das Deckgläschen ein Tropfen Saccharose gegeben. Der Slice wurde mit einem Pinsel darauf gelegt und vorsichtig mit einem Tuch die restliche Saccharose entfernt. Dann wurde der Slice mit TissueTek übergossen und sofort auf Trockeneis gelegt. Auf ein Deckgläschen wurden jeweils 1-2 Slices eingebettet. Danach wurden die eingebetteten Slices in Falcons gesteckt und die Falcons wurden mit der jeweiligen Gruppe nochmals beschriftet. Schließlich wurden die Slices zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Für die EM-Bilder wurde zunächst das Medium abgesaugt, 2 x mit 37 °C PBS gespült, 1 x mit 4 °C PBS gespült und schließlich mit 4 °C 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Dann wurde mit 2,5% Glutaraldehyd-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer für 3 Stunden bei 4°C fixiert. Schließlich wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer bei 4 °C gespült.

3.1.3 Immunhistochemische Nachweise von Synaptopodin und Synaptophysin und deren Auswertung

Die Slices wurden mit dem Kryostat geschnitten. Auf dem Schneideteller wurden die Slices mit TissueTek fixiert und dann das Deckgläschen durch leichtes Herüberstreichen mit dem Finger vom eingebetteten Slice gelöst. Durch das Deckgläschen hatte sich eine gerade Schnittfläche ergeben. Es wurden 10 µm dünne Schnitte angefertigt, welche auf beschichtete Objektträger gelegt wurden. Auf einen Objektträger kamen 1-4 Schnitte. Mit einem Lichtmikroskop wurde überprüft, ob die gewünschte Region erhalten war. Die Objektträger wurden mit Kulturnummer, Gruppenname sowie Slicenummer beschriftet und dann für ca. 10 Minuten in Aceton bei 4 °C gelegt. Danach wurden die Objektträger für ca. 15-30 Minuten unter einen Abzug gelegt. Die Objektträger wurden zur weiteren Behandlung bei -80 °C aufbewahrt nachdem die Kästen mit Parafilm sorgfältig verschlossen wurden.

Danach erfolgte die immunhistochemische Färbung von Synaptophysinproteinen und Synaptopodinproteinen. Für die immunhistochemische Färbung von Synaptophysinproteinen wurden die Schnitte zunächst 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Nun fixierte man die Slices für 5 Minuten mit 4% PFA in einer Glasküvette. Dann wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen, wobei man im ersten Schritt, nachdem man zuvor das PFA abgoss und die Küvette mit PBS auffüllte, das PBS sofort wieder abgoss und durch frisches PBS ersetzte. In den weiteren beiden Schritten wurde jeweils das PBS nur einmal gewechselt. Die Objektträger wurden dann aus der Küvette entfernt; man ließ sie abtropfen und tupfte vorsichtig das überschüssige PBS weg. Die Objektträger kamen in eine feuchte Kammer und die Slices wurden für 30 Minuten mit 3% NGS blockiert, indem man das NGS mit einer Pipette auf jeden Slice gab. Danach saugte man mit einer Eppendorf-Pipette das NGS ab und gab den 1. Antikörper, Synaptophysin monoklonal in einer Verdünnung von 1:500 in 1% NGS, darauf. Über Nacht beließ man die Schnitte in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Antikörper abgegossen und zunächst erneut 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen, wobei wieder das erste Mal das hinzugegebene PBS sofort wieder abgegossen und durch neues ersetzt wurde. Die Objektträger wurden abgetupft und erneut in die feuchte Kammer gelegt. Dann wurde der 2. Antikörper, Cy3 goat-anti-mouse in 1:250 Verdünnung auf die Schnitte gegeben und für die Bindung eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Von da an wurde im abgedunkelten Raum gearbeitet und die feuchte Kammer wurde zwischen den Arbeitsschritten in einen nahezu lichtfreien Schrank gelegt.

Nach einer Stunde wurden die Objektträger 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen und danach noch einmal für 10 Minuten. Dann wurde, ebenfalls in einer Glasküvette, für eine 1 Minute mit Dapi 1:1000 die Kernfärbung durchgeführt. Als nächstes wurde nochmals 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und schließlich das PBS abgegossen. Die Glasküvette wurde mit aqua dest. aufgefüllt. Zuletzt wurden die Objektträger wieder abgetupft und mit DAKO Mounting Medium eingedeckt. Die fertigen Objektträger wurden in Objektträgermappen bis zur weiteren Verwendung bei -4 °C aufbewahrt.

Die immunhistochemische Färbung der Synaptopodinproteine erfolgte analog zu der Immunhistochemie mit Synaptophysin, wobei die Antikörper in folgenden Verdünnungen verwendet wurden:

1. Antikörper: Synaptopodin polyklonal in Konzentration 1:200 in 1% NGS verdünnt

2. Antikörper: Cy3 goat-anti-rabbit in Konzentration 1:250

Anschließend wurde mit Zen 7.1 unter Verwendung des LSM 5.1 das St. radiatum in der Region CA1 und CA3 aufgenommen.

Für die Aufnahme wurde das 63 Oil Objektiv verwendet. Folgende Einstellungen wurden für die Aufnahme von Synaptophysin verwendet:

Image Size: 512x512, 8bit; Dimensions: 71,29x71,29 µm; Scan mode: plane; Zoom: 2,0; Objective: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC; Pixel dwell: 1,60 µs; Average: line4; Mastergain: 620; Digital gain: 1,00; Digital offset: -0,09; Pinhole: 108 µm; Filters: BP 560-615; Beam splitters: MBS: HFT UV/488/543/633 DBS1: Mirror DBS2: NFT 490; Lasers: 543 nm: 50%; Scantime: Speed 9 (Max.); Direction: =>; Ch 3

Für die Aufnahmen von Synaptopodin wurden dieselben Einstellungen mit folgenden Änderungen verwendet:

Mastergain: 651, Digital gain: 1,01, Digital offset: -0,06

Die gewünschte Region wurde zunächst lichtmikroskopisch ausgewählt und dann mit dem Laser aufgenommen. Für die Aufnahmen der Cy3-markierten Antikörper wurde der HeNe543 Laser verwendet. Aufgenommen wurden die Bilder der Region St. radiatum in CA1 und CA3. Es wurde zunächst die gesamte Region von Subiculum bis CA2 aufgenommen, wobei, wenn der Schnitt die gesamte Region erfasste, ca. 10 Bilder gemacht wurden. Ausgewertet wurden nur Bild 3-5, da dies der gesuchten Region des St. radiatum in CA1 entsprach. Dann wurde von Ende CA2 bis zum Ende CA3 aufgenommen wobei bei vollständig erhaltener Region ca. 7 Bilder gemacht wurden. Nur Bild 1 und 2 wurden verwendet, da sie das St. radiatum in der

Region CA3 am besten repräsentierten. Wenn die Region nicht vollständig erhalten war, wurde bei der Auswahl der Bilder für die Auswertung entsprechend korrigiert.

Anschließend erfolgte die Auswertung der Bilder mit ImageJ, wobei die Integrated Density gemessen wurde.

Folgende Einstellungen wurden sowohl für Synaptophysin als auch für Synaptopodin verwendet (Set Measurements): Ausgewählt wurden area, min&max gray value, integrated density, mean gray value, limit to threshold, redirect to: none, decimal places (0-9): 0.

Für Synaptophysin wurden die threshold level wie folgt festgesetzt: lower threshold level: 110; upper threshold level: 255. Für Synaptopodin wurden die threshold level wie folgt festgesetzt: lower threshold level: 130; upper threshold level: 255.

Zunächst wurden pro Bild vier 15,07 x 15,07 µm messende Areale gewählt und ausgewertet. Die Areale wurden gewählt, da teilweise Löcher im Schnitt waren. Es wurden jeweils die 4 Areale mit den augenscheinlich größten Intensitäten gewählt. Die Ergebnisse wurden als einzelne Excel-Dateien gespeichert und später in eine gemeinsame Excel-Tabelle eingetragen.

Die Ergebnisse wurden schließlich mit PASW mittels UNIANOVA ausgewertet.

3.1.4 Die Herstellung von elektronenmikroskopischen Ultradünnschnittbildern und quantitative Auswertung der Spinesynapsen

Zunächst erfolgte die Einbettung der Slices in Kunstharz. Von der Slicekultur wurde pro Gruppe jeweils ein Slice zufällig ausgewählt. Den fixierten Slices wurde zunächst die Flüssigkeit entzogen und sie wurden in Kunstharz eingebettet. Zunächst wurden die Slices in 1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit Saccharose für eine halbe Stunde bei 4 °C gegeben. Dazu wurde Glutaldehyd abgegossen, Puffer zugegeben und zuletzt Osmiumtetroxid zugegeben. Dann wurden die Slices für jeweils 10-15 Minuten in unvergällten Ethanol gegeben. Dabei wurden Ethanol-Konzentrationen in

folgender Reihenfolge verwendet: 35%, 50%, 70%, 96%. Als letztes wurden die Slices für 20 Minuten in 100% Ethanol gegeben. Nun wurde Propylenoxid für 20 Minuten hinzugegeben. Anschließend kamen die Slices für 3 Stunden in Propylenoxid/Glycidether (Verdünnung 1:3) mit 2% Accelerator. Das Propylenoxid diente dem Glycidether als Intermedium. Zuletzt wurden die Slices zur Polymerisation in einer Glycidether-Mischung mit 2% Accelerator bei 60 °C über Nacht inkubiert. Dazu wurde der Glycidether vorgelegt, der Slice hinzugegeben und die Position unter einem Mikroskop kontrolliert.

Darauf folgte die Anfertigung und Färbung von Semidünnschnitten. Dazu wurden die eingebetteten Slices mit einem Zweikomponentenkleber auf Metallstifte geklebt und mit einer Scheibenschleifmaschine und einer Rasierklinge zurechtgetrimmt. Mit einem Diamanten mittels Ultramikrotom wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte gemacht. Die Schnitte wurden mit einer Öse in eine wassergefüllte Schale übertragen und bei 80 °C auf einer Wärmebank mit Toluidin schwimmend gefärbt. Dazu kamen sie zunächst in aqua dest. Dies bewirkte eine Streckung der Schnitte. Dann wurden sie für ca. 90 Sekunden mit Toluidin/Pyronin gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte 3 Mal in aqua dest. zum Spülen gelegt. Die Schnitte wurden mit einer Öse auf Objektträger gelegt und es wurde mit Fließpapier das Wasser entfernt. Als letztes wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckt.

Anschließend erfolgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten. Dazu wurden die einzelnen Blöcke zurechtgeschnitten, um die gewünschte Region (CA1 St. radiatum) zu erhalten. Danach wurden Ultradünnschnitte angefertigt, wobei zwei Schnitte im Abstand von ca. 80-100 nm ein Paar ergaben.

Sodann wurden die Bilder mit dem CM 100, PW 6021 aufgenommen. Es wurden von beiden Schnitten der Pärchen annähernd identische Regionen ausgewählt und aufgenommen, wobei Blutgefäße ausgespart wurden, um möglichst gleichwertige Bilder zu bekommen. Die Bilder wurden auf DIN A4 Fotopapier entwickelt.

Dann erfolgte die stereologische Auszählung der EM Bilder. Dabei wurde die Dissektor-Technik angewendet (Brændgaard und Gundersen, 1986). Es

wurden immer zwei Bilderpärchen miteinander verglichen. Zunächst wurden auf dem ersten Bild sämtliche Synapsen markiert, indem eine durchsichtige Folie aufgelegt wurde. Die Folie wurde oben links bündig angelegt und mit einem Klebestreifen fixiert. Nun wurden in roter Farbe sämtliche Synapsen markiert. Als Kriterium galt: Eine Synapse musste einen sichtbaren synaptischen Spalt sowie prä- und postsynaptische Verdichtungen beinhalten. Danach wurde die Folie entfernt und auf das zugehörige zweite Bild gelegt. Die Folie musste in der Position etwas angepasst werden, da das zweite Bild von der Region nicht immer zu 100% dem ersten entsprach. Auf dem Bild wurde die Position der Folie markiert. Nun wurde verglichen, welche Synapsen des ersten Bildes auch auf dem zweiten Bild zu finden waren. Als Spinesynapsen wurden nur solche gewertet, welche sich lediglich auf einem der Bilder befanden. Die Synapsen, welche nur auf dem ersten Bild zu erkennen waren, wurden mit grün markiert. Dann wurden alle Synapsen in blau markiert, welche sich nicht auf dem vorigen Bild befanden. Schließlich wurde eine $8 \times 8 \mu\text{m}$ messende Schablone aufgelegt, wobei versucht wurde, möglichst viele blaue und grüne Markierungen in die Schablone einzuschließen. Die Schablonenposition wurde auf der Folie eingezeichnet. Die grünen Markierungen wurden nun gezählt und als Anzahl der Spinesynapsen pro $6,4 \mu\text{m}^3$ für Bild 1 gewertet. Die blauen Markierungen innerhalb der Schablone wurden ebenfalls gezählt und als Spinesynapsenanzahl pro $6,4 \mu\text{m}^3$ für Bild 2 gewertet. Zuletzt wurden die Bildnummern auf der Folie eingetragen. Alle Messwerte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen.

Die Ergebnisse wurden schließlich mit PASW nach verallgemeinert linearem Modell als Post-Hoc-LSD ausgewertet.

3.2 Die Klonierung von ER- α -Knockout-Mäusen und deren Behandlung mit Östradiol

3.2.1 Die Klonierung von ER- α -Knockout-Mäusen

Die ER- α -KO-Mäuse wurden nach Lubahn (1993) geklont.
ES: E14TG2a, aus 129/J Mäusen, Hintergrund: C57Bl/6J.

3.2.2 Die Behandlung der ER- α -Knockout-Mäuse mit Östradiol

Die ER- α -KO-Mäuse wurden nach dem von Gould (1990) beschriebenen Behandlungsschema ovariectomiert und mit Östradiol behandelt.

3.2.3 Die Präparation der ER- α -Knockout-Mäuse

Die Präparation erfolgte in Göttingen. Die Mäuse wurden mit CO₂, freigesetzt aus Trockeneis, betäubt. Dazu wurde ein Behälter mit Wasser gefüllt und Trockeneis zugegeben. Eine Siebplatte wurde zur Trennung eingelegt. Die Maus wurde in den Behälter überführt und der Deckel verschlossen. Nach Betäubung wurde die Maus in Rückenlage fixiert. Die Bauchdecke wurde mit einer Schere bis zum Proc. xyphoideus eröffnet. Zwei Entlastungsschnitte in Höhe der Rippenbögen nach lateral wurden vollzogen. Der Thorax wurde sodann eröffnet. Der rechte Ventrikel wurde aufgeschnitten. Eine Kanüle wurde in den linken Ventrikel eingeführt. Zuerst wurde über diese Kanüle 50-100 ml NaCl 0,9% über einen Perfusor injiziert, um das Gefäßsystem zu spülen. Das Blut konnte über einen Einschnitt im rechten Vorhof entweichen. Nun wurde mit

50 ml 2,5% PFA der Körper der Maus für 10 Minuten über die Kanüle gespült und somit fixiert. Als nächstes wurde die Maus dekapitiert und die Schädelkalotte eröffnet, indem ein median-sagitaler Schnitt durchgeführt wurde. Man entnahm das Gehirn mit einem Heidemannspatel und fixierte es für 4h in 2,5% PFA. Zur weiteren Verarbeitung wurde es in 25%iger Saccharose-Lösung eingelegt.

Dann wurden die Hippocampi präpariert. Die Gehirne wurden zunächst mit einem Sagitalschnitt halbiert. Danach wurden sie bis zur Präparation in Glutaldehyd aufbewahrt. Zur Präparation des Hippocampus wurden das Kleinhirn und der Thalamus mit einer Pinzette entfernt. Die Fimbrien wurden durchtrennt und dann der Hippocampus herausgelöst. Der gewünschte Abschnitt wurde wieder in Glutaldehyd gelegt.

3.2.4 Die Herstellung von elektronenmikroskopischen Ultradünnschnittbildern und quantitative Auswertung der Spinesynapsen

Die Einbettung in Kunstharz erfolgte analog zu den Slicekulturen mit folgenden Änderungen:

Osmiumtetroxid ließ man statt 30 Minuten für 2 Stunden wirken. 100% Ethanol wurde statt 1 x 15 Minuten für 2 x 10-15 Minuten verwendet. Propylenoxid wurde statt 1 x 20 Minuten für 2 x 15 Minuten verwendet. Nach dem Propylenoxid wurde das Gewebe zunächst für 1 Stunde in Propylenoxid/Glycid 1:1 Verdünnung mit 2% Accelerator gegeben. Danach wurde das Gewebe statt 3 Stunden über Nacht in Propylenoxid/Glycidether (1:3) gegeben.

Die Anfertigung sowohl der Semidünnschnitte als auch der Ultradünnschnitte erfolgte analog zu den Slicekulturen. Auch die Aufnahme der Bilder und die stereologische Auswertung erfolgte analog zu den Slicekulturen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS nach verallgemeinert linearem Modell über Parameterschätzer.

3.3 Die Herstellung von siRNA gegen ER- α und ER- β , die Transfektion hergestellter Zelldispersionskulturen sowie die immuncytochemische Färbung von Dispersionskulturen mit Antikörpern gegen ER- α und ER- β

3.3.1 Die Herstellung von Zelldispersionskulturen

Die Präparation der Hippocampi für die Zellkultur erfolgte aus E18 Wistar Ratten.

Das Muttertier wurde zunächst mit CO² betäubt, analog zu den ER- α -KO-Mäusen. Dann wurde die Ratte mit einer Guillotine dekapitiert. Der Bauch wurde mit Ethanol 70% desinfiziert. Die Bauchdecke wurde mit einer Pinzette angehoben und von kaudal nach rostral median mit einer Schere aufgetrennt. Zwei Schnitte von medial nach lateral wurden am kaudalen Schnittrand gesetzt und die Bauchdecke nach lateral aufgeklappt. Die Bauchmuskulatur und das Peritoneum wurden in gleicher Weise entfernt. Die Embryonen im Uterus wurden mit einer Pinzette gelöst und in das Kulturmedium überführt. Auf semisterilem Untergrund wurden die Embryonen aus dem Uterus herausgelöst, indem plazentaseitig mit der Schere Uterus und Plazenta aufgeschnitten wurden. Der Kopf wurde mit einer Schere abgetrennt und in eine neue Petrischale mit Kulturmedium überführt. Mit zwei spitzen Pinzetten wurde von kaudal an der Dorsalseite die Kopfhaut aufgetrennt und nach lateral abgezogen, dann wurde die noch sehr weiche Schädeldecke auf dieselbe Weise entfernt. Das Gehirn wurde herausgelöst indem von rostral die Hirnnerven mit einem Spatel durchtrennt wurden. Das Gehirn wurde in eine neue Petrischale mit Kulturmedium überführt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Hemisphären getrennt und der Hippocampus abgelöst. Die Hippocampi wurden dann in ein Falcon mit HBSS überführt und unter der sterilen Bench weiterverarbeitet.

Anschließend erfolgte die Präparation der Dispersionskulturen. Zunächst wurde 1 x mit HBSS gespült und danach das Medium vollständig abgesaugt. Dann wurden 2 ml Trypsin/EDTA sowie 8 ml HBSS zugegeben. Es wurde für 15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und danach 4 x mit Neurobasal ohne Phenolrot gewaschen. Dabei ließ man das Gewebe jeweils ca. 2-5 Minuten absinken. Nach dem Spülen wurde ca. 1 ml Medium stehen gelassen und mit einer 1000 µl Pipettenspitze das Gewebe durch Auf- und Abpipettieren so lange zerkleinert, bis eine homogene Suspension entstanden war. Nun wurde mit Neurobasal-Medium auf 20 ml aufgefüllt und dann die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden 120.000-150.000 Zellen auf Plättchen in 24-Well Platten gegeben. Als Kulturplatten dienten mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen. Nach einer Stunde wurden die Plättchen umgesetzt und neues Medium (Neurobasal) und zusätzlich B27, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin zugegeben. Die Zellen kamen in einen Brutschrank und das Medium wurde regelmäßig gewechselt.

3.3.2 Die Auswahl der siRNA

Mittels NCBI Nucleotide wurde die kodierende Nukleotidsequenz der jeweiligen Östrogenrezeptor-mRNA in der Ratte ermittelt. Die Sequenz wurde ausgewählt und in den siRNA Target Finder eingefügt. Von den ermittelten siRNAs wurden jeweils zwei Targetsequenzen ausgewählt, wobei der GC-Gehalt berücksichtigt wurde. Der GC-Gehalt betrug zwischen 55-59%, wobei 50% als Optimum gilt. Mittels Blast wurde die Übereinstimmung der sense und antisense siRNA mit dem Östrogenrezeptor überprüft und eine Bindung an andere Abschnitte der DNA ausgeschlossen. Zusätzlich wurde die Position in der kodierenden Sequenz überprüft. Schließlich wurde auch auf die mögliche Ausbildung von Hairpins geachtet.

3.3.3 Die Herstellung der siRNA

Es wurden sowohl für den ER- α als auch für den ER- β zwei Oligonukleotidsequenzen verwendet (jeweils sense und antisense). Der Arbeitsplatz und die Handschuhe wurden mit Ethanol desinfiziert. Es wurde das Silencer[®] siRNA Construction Kit von ambion verwendet. Zunächst wurde T7 Promotor Primer am 5' Ende gebunden und dann die DNA zu dsDNA polymerisiert: Dazu wurden die Oligonukleotide auf 100 μ M mit nuklease-free water resuspensioniert. Dann wurden folgende Komponenten des Construction Kit aufgetaut: T7 Promotor Primer, 10x Klenow Reaction Buffer, 10x dNTP mix, nuclease-free water. In 8 Tubes wurden je 2 μ l T7 Promotor Primer, 6 μ l DNA Hyb Buffer und entweder 2 μ l sense oder antisense Oligonukleotide vorgelegt. 2 weitere Tubes wurden mit Ausnahme der Oligonukleotide mit den Komponenten befüllt und dienten als Kontrolle. Währenddessen wurden die Substanzen 10x Klenow Reaction Buffer (2 μ l), 10x dNTP Mix (2 μ l), nuclease-free water (4 μ l) und Exo-Klenow (2 μ l) gemischt (Polymerase-Mix). Die DNA mit dem Promotor wurde für 5 Minuten bei 70 °C erwärmt, damit der Promotor binden konnte und für fünf Minuten bei 20 °C belassen. Je 9,98 μ l des Polymerase-Mix wurde in jedes Tube dazugegeben und zentrifugiert. Für 30 Minuten wurde bei 37 °C inkubiert und die Tubes wurden bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde aus der dsDNA RNA transkribiert und die entstandene sense- und antisense-RNA zu dsRNA hybridisiert: Zunächst wurden 2x NTP Mix und 10x T7 Reaction Buffer aufgetaut, gevortext und zentrifugiert. Die Tubes mit der dsDNA wurden zentrifugiert. In neue Tubes wurden je 2 μ l der dsDNA gegeben und folgende Substanzen hinzugefügt: 4 μ l nuclease-free water, 10 μ l 2x NTP Mix, 2 μ l 10x T7 Reaction buffer, 2 μ l T7 Enzyme Mix. Die Tubes wurden gemischt und zentrifugiert. Danach wurde für 2 Stunden bei 37 °C im Mastercycler inkubiert. Es wurde gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag wurde das überhängende 5' Ende mit einer Einzelstrang-spezifischen RNase entfernt und die DNA mit einer DNase entfernt. Die siRNA wurde dann in nuklease-free water überführt: Der Digestion Buffer wurde aufgetaut, gevortext und zentrifugiert. Zur dsRNA wurden je 6 μ l Digestion Buffer, 48,5 μ l nuclease-free water, 3 μ l RNase und 2,5 μ l DNase

gegeben. Die Substanzen wurden gemischt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die folgenden Substanzen waren bereits wie folgt mit Ethanol 100% gemischt: Binding Buffer durch Zugabe von 5,3 ml Ethanol 100% und Wash Buffer durch Zugabe von 11 ml Ethanol 100%. 400 µl Binding Buffer wurden jeweils zur siRNA zugegeben und für 2-5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nuclease-free water wurde währenddessen auf 70 °C vorgeheizt. In 2 ml Tubes wurden die Filter Cartridges eingesetzt. 100 µl Wash Buffer wurden durch jeden Filter gegeben. Die siRNA wurde hinzugegeben und es wurde für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die gefilterte Substanz wurde verworfen. Es wurde noch 2x mit 500 µl Wash Buffer gewaschen und jeweils 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die filtrierte Substanz wurde jeweils verworfen. Der Filter wurde in ein neues Tube umgesetzt und 100 µl des 70 °C warmen nuclease-free water wurden durch den Filter gegeben, für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert und so die siRNA rausgelöst. Die gereinigte siRNA wurde bei -20 °C bis zur Transfektion aufbewahrt.

Zur Quantifizierung wurde 10 µl siRNA mit 250 µl TE gemischt und die Absorption in einem Photometer bei 260 nm gemessen. Folgende Menge an siRNA wurde gemessen:

| | |
|--------|--------------|
| ERα 1: | 0,6905 µg/µl |
| ERα 2: | 0,7525 µg/µl |
| ERβ 1: | 0,3875 µg/µl |
| ERβ 2: | 0,3990 µg/µl |

3.3.4 Die Transfektion der Zelldispersionskulturen mit siRNA

Die Transfektion erfolgte am 7. Tag *in-vitro*. Zu dieser Zeit wurden die Zellen nicht gefüttert. Die siRNA wurde mit GFP markiert. Die siRNA wurde jeweils mit 90 µl H₂O gemischt und 10 µl CaCl₂ (2.5M) zugegeben. Unter der sterilen Bench wurden 100 µl 2x BBS, pH 6,96, langsam zugegeben und gevortext. Die Mischung wurde für 20 Minuten stengelassen. Vor Zugabe wurde nochmals

gemischt. Ein Ansatz wurde auf 2 Nöpfe verteilt. Dann wurden die Zellen für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 4 x mit 1 ml vorgewärmter HBSS gewaschen. Schließlich wurde 1 ml vorgewärmtes Neurobasal A + B27 + GlutaMax hinzugefügt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank inkubiert.

3.3.5 *Der Nachweis von ER- α und ER- β in Zelldispersionskulturen*

Zum Nachweis wurde eine Immunocytochemie durchgeführt. Es wurden Zellen von E18 Mäusen in 4% PFA fixiert verwendet. Zunächst wurden die Zellen, welche sich in 24-Well Platten auf Deckgläschen als Plättchen befanden, 3 x 5 Minuten mit PBS gespült. Danach wurde mit BSA 3% für 30 Minuten blockiert, wobei je 300 μ l pro Plättchen verwendet wurden. Die Plättchen wurden herausgenommen, vorsichtig getrocknet und auf Objektträger in einer feuchten Kammer umgesetzt. 50 μ l des primären Antikörpers wurden auf die Plättchen gegeben. Die Antikörper wurden zuvor zentrifugiert. Der ER- α -Antikörper wurde in Konzentration 1:400 in PBS + 0,05% sodium acid verwendet, der ER- β -Antikörper 1:000 verdünnt in PBS + 1 mg/ml BSA + 0,05% sodium acid. Der polyklonale TAU-Antikörper wurde 1:500 verdünnt in Kombination mit dem ER- α -Antikörper gegeben, der monoklonale TAU-Antikörper wurde mit dem ER- β -Antikörper kombiniert gegeben. Als Kontrolle wurden die Antikörper zusätzlich einzeln auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden in der feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht belassen.

Am nächsten Tag wurde zunächst die 24-Well Platte 1 x mit PBS gespült. Die Plättchen wurden wieder eingesetzt, PBS wurde hinzugegeben und sofort wieder abgesaugt. Nun wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Plättchen wurden wieder in die feuchte Kammer auf Objektträger umgesetzt und der zweite Antikörper wurde hinzugegeben. Der ER- α -Antikörper wurde mit Cy3 goat-anti-mouse in Konzentration 1:350 markiert. Der ER- β -Antikörper wurde mit Cy3 goat-anti-rabbit in Konzentration 1:350 markiert. Für die Markierung der TAU-Antikörper wurde Alexa fluor 488 jeweils in Konzentration 1:500

verwendet. Für den polyklonalen TAU-Antikörper wurde Alexa fluor 488 goat-anti-rabbit, für den monoklonalen Antikörper wurde Alexa fluor 488 goat-anti-mouse verwendet. Man ließ den sekundären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln binden. Die weiteren Schritte erfolgten nun im abgedunkelten Raum. Als nächstes wurde die 24-Well Platte einmal mit PBS gespült. Die Plättchen wurden wieder eingesetzt, PBS hinzugegeben und sofort wieder abgesaugt. Anschließend wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. DAPI wurde in Konzentration 1:100.000 hinzugegeben und für 3 Minuten belassen. Erneut wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gespült. Schließlich wurden die Plättchen wieder auf Objektträger gesetzt und mit DAKO Mounting Medium eingedeckt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger in Objektträger-Mappen bei -4 °C aufbewahrt.

Anschließend wurden die immuncytochemisch gefärbten Zellen sowohl mit AxioVision unter Verwendung der AxioCam HR des Axioskop als auch mit dem LSM Axiovert 100 aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von Antagonisten gegen ER- α und ER- β auf Spinesynapsendichte

Um die Beteiligung der Östrogenrezeptor-Subtypen α und β zu erfassen, haben wir die kommerziell erhältlichen Antagonisten MPP und PHTPP in hippocampalen Schnittkulturen untersucht. Hippocampale Schnittkulturen bieten den Vorteil, dass die synaptische Konnektivität über sehr lange Zeit konserviert ist und jede extrazerebrale Quelle für Östrogen ausgeschlossen wird. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Rune konnte gezeigt werden, dass diese Schnittkulturen in nennenswertem Umfang Östrogene synthetisieren (Kretz et al., 2004). Für eine zuverlässige Messung der Östrogenwerte im Überstand der Kulturen hatte sich gezeigt, dass eine Kultivierungsdauer von 7 Tagen nötig ist, damit die Menge des gebildeten Östradiols ausreichend ist, um es in einem Radioimmunassay zuverlässig zu messen. Nach einer Präinkubationsdauer von 4 Tagen konnten die Schnittkulturen für 7 Tage mit den beiden Antagonisten gegen den Östrogenrezeptor α und β behandelt werden. Zu Kontrollzwecken wurde ebenfalls der Aromataseinhibitor Letrozol eingesetzt. Bei einer Konzentration von 100 nM Letrozol konnte gezeigt werden, dass die Menge des synthetisierten Östradiols um ca. 40% reduziert wird.

Nach der Inkubationsdauer von 7 Tagen wurden die hippocampalen Schnittkulturen eingebettet und Ultradünnschnitte für die Elektronen-Mikroskopie hergestellt. In Serienschnitten der CA1-Region des Hippocampus erfolgte die Auswertung der Spinesynapsendichte. Wie in Abb. 13 gezeigt, wurden nur solche Synapsen gezählt, die sich aus einem präsynaptischen Bouton, einem synaptischen Spalt, einer postsynaptischen Dichte und einer gegenüberliegenden Spine zusammensetzen.

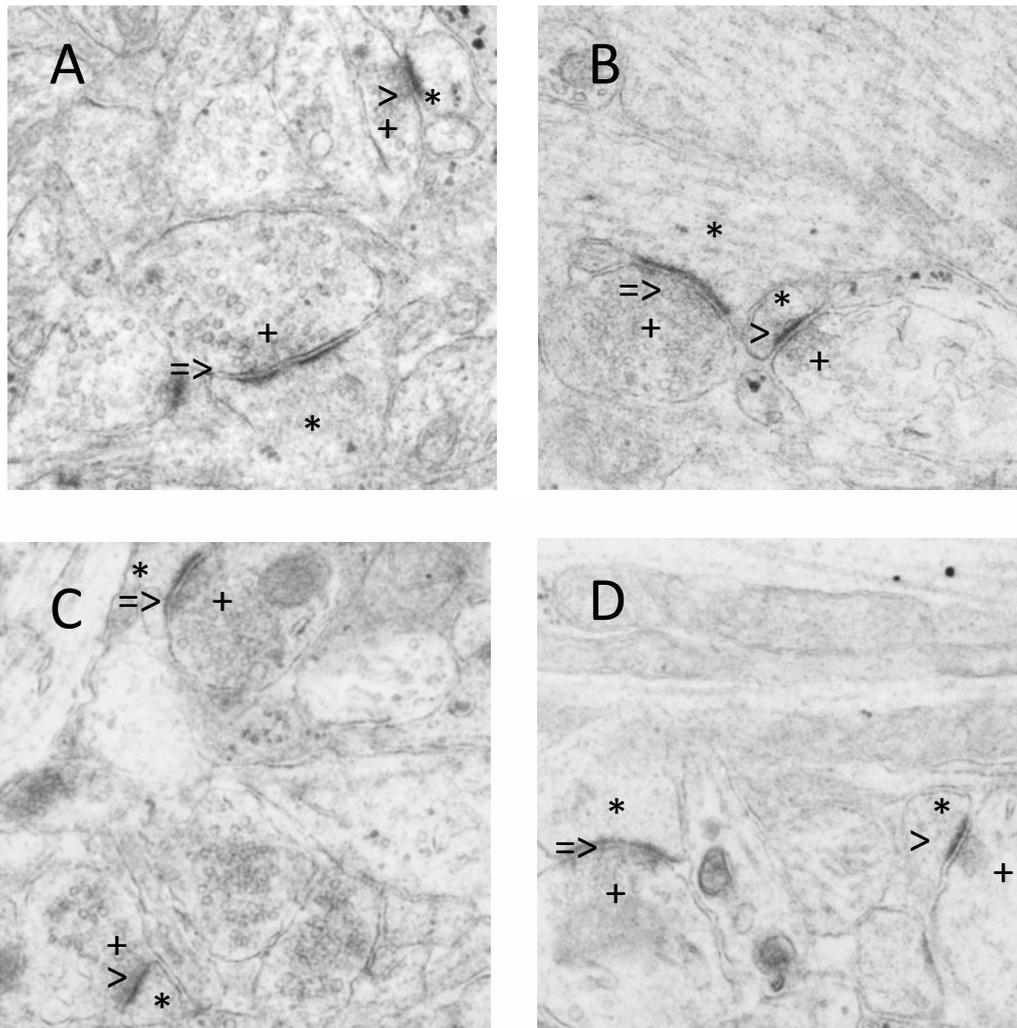


Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Region CA1 St. radiatum in Slicekulturen. A: Kontrolle. B: Letrozol. C: ER- α -Antagonist MPP. D: ER- β -Antagonist PHTPP. Spinesynapse (>), Schaftsynapse (=>), Präsynaptische Seite (+), Postsynaptische Seite (*). Strukturelle Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppen sind nicht zu erkennen.

Unsere stereologische Auswertung der Spinesynapsendichte, wie in Fig. 1 dargestellt, ergab eine deutliche Abnahme der Dichte nach den 3 durchgeführten Behandlungen mit Letrozol, MPP und PHTPP. Die Abnahme der Synapsendichte nach Behandlung mit Letrozol stimmte mit früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Rune überein und bestätigte, dass hippocampal-synthetisiertes Östradiol für die Erhaltung von Spinesynapsen essentiell ist. Zählungen der Spinesynapsen nach Gabe der Östrogen-Antagonisten zu den hippocampalen Schnittkulturen zeigten, dass sowohl die Blockade des ER- α als auch des ER- β eine Verminderung der Synapsen nach sich zieht. Dieser Befund ließ vermuten, dass sowohl ER- α als auch ER- β bei östrogenvermitteltem Synapsen-Erhalt eine Rolle spielen. Im Vergleich der beiden Antagonisten ließ sich zudem erkennen, dass offensichtlich der ER- β die prominentere Rolle spielt, da die Behandlung mit MPP gegenüber der Behandlung mit PHTPP einen signifikanten Unterschied auswies.

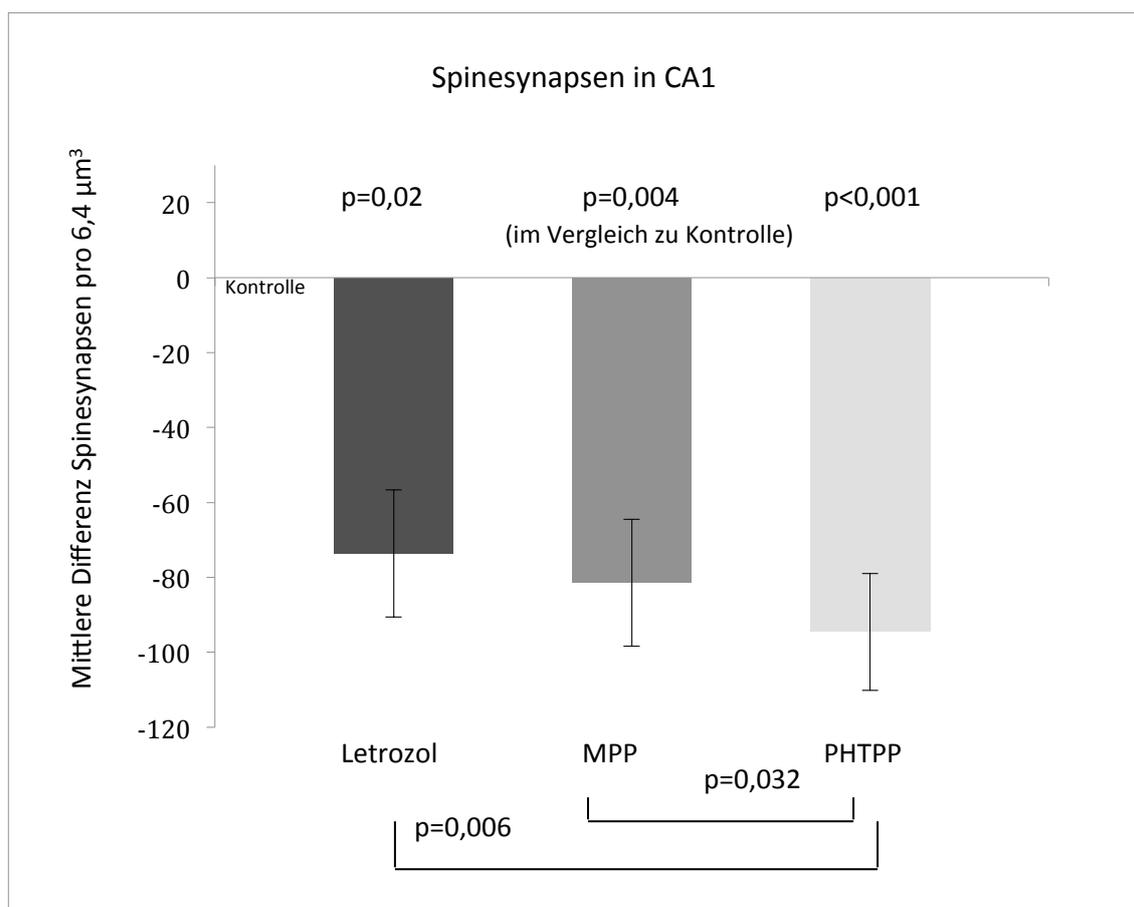


Fig. 1: Vergleich der Spinesynapsenzahl pro $6,4 \mu\text{m}^3$ im Bereich CA1 nach Langzeitbehandlung (7 Tage) mit dem spezifischen ER- α -Antagonisten MPP (10^6 M), dem spezifischen ER- β -Antagonisten PHTPP (10^6 M) und dem Aromataseinhibitor Letrozol (10^{-7} M). Auf der Y-Achse dargestellt sind die mittlere Differenz in Prozent bezogen auf die Kontrollgruppe und "standard error of mean" (SEM (+/-)). Die Gesamtzahl (N) der jeweiligen Slices pro Behandlungsgruppe wurde bei der Berechnung des SEM berücksichtigt.

4.2 Spinesynapsendichte in ovariectomierten ER- α -KO-Mäusen nach Östradiolbehandlung

In einer zeitgleich durchgeführten Dissertation von Xenia de Vrese in diesem Labor wurde die Spinesynapsendichte in ER- α - und ER- β -KO-Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich eine unveränderte Synapsendichte in der ER- α -Knockout-Maus und eine erhöhte Synapsendichte in der ER- β -Knockout-Maus. Dieser Befund schien zunächst unseren *in-vitro* Ergebnissen nach Behandlung von hippocampalen Schnittkulturen mit ER- α - und ER- β -Antagonisten zu widersprechen. Aus diesem Grund haben wir ER- α -KO-Mäuse (ER- β -KO-Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt leider nicht verfügbar) ovariectomiert und sie anschließend mit Östradiol behandelt.

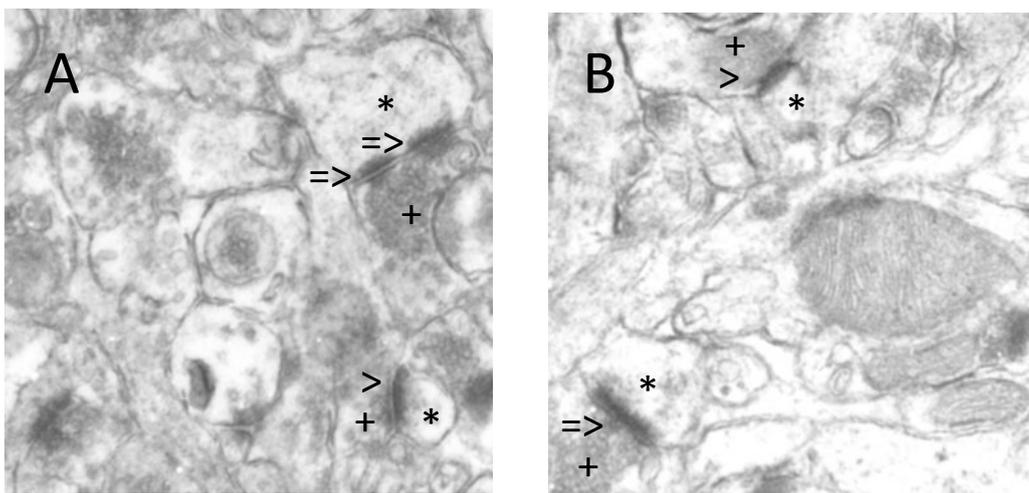


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Region CA1 St. radiatum in ovariectomierten ER- α -KO-Mäusen. A: Kontrolle. B: Östradiol. Spinesynapse (>), Schaftsynapse (=>), Präsynaptische Seite (+), Postsynaptische Seite (*). Strukturelle Unterschiede zwischen Kontrolle und Östradiolbehandlung sind nicht zu erkennen.

Frühere Untersuchungen zu östrogen-induzierter synaptischer Plastizität hatten gezeigt, dass eine Ovariectomie zu einer Abnahme der Synapsen im Hippocampus führt, die durch die Behandlung der Mäuse mit Östradiol wieder aufhebbar war (Gould et al., 1990). Nach dem von Gould beschriebenen Behandlungsschema wurden ovariectomierte ER- α -KO-Mäuse mit Östradiol behandelt.

Nach stereologischer Auszählung der Spinesynapsen in der hippocampalen Region CA1, zeigte sich zwischen beiden Gruppen kein Unterschied (Fig. II). Nach diesem Befund ist davon auszugehen, dass der Knockout des Östrogenrezeptor α Subtyps die Östradiolbehandlung der Mäuse unwirksam werden lässt und es lässt sich schlussfolgern, dass der ER- α bei östrogen-induzierter synaptischer Plastizität eine Rolle spielt. Zudem ist dieses Ergebnis konsistent mit unseren *in-vitro* Ergebnissen.

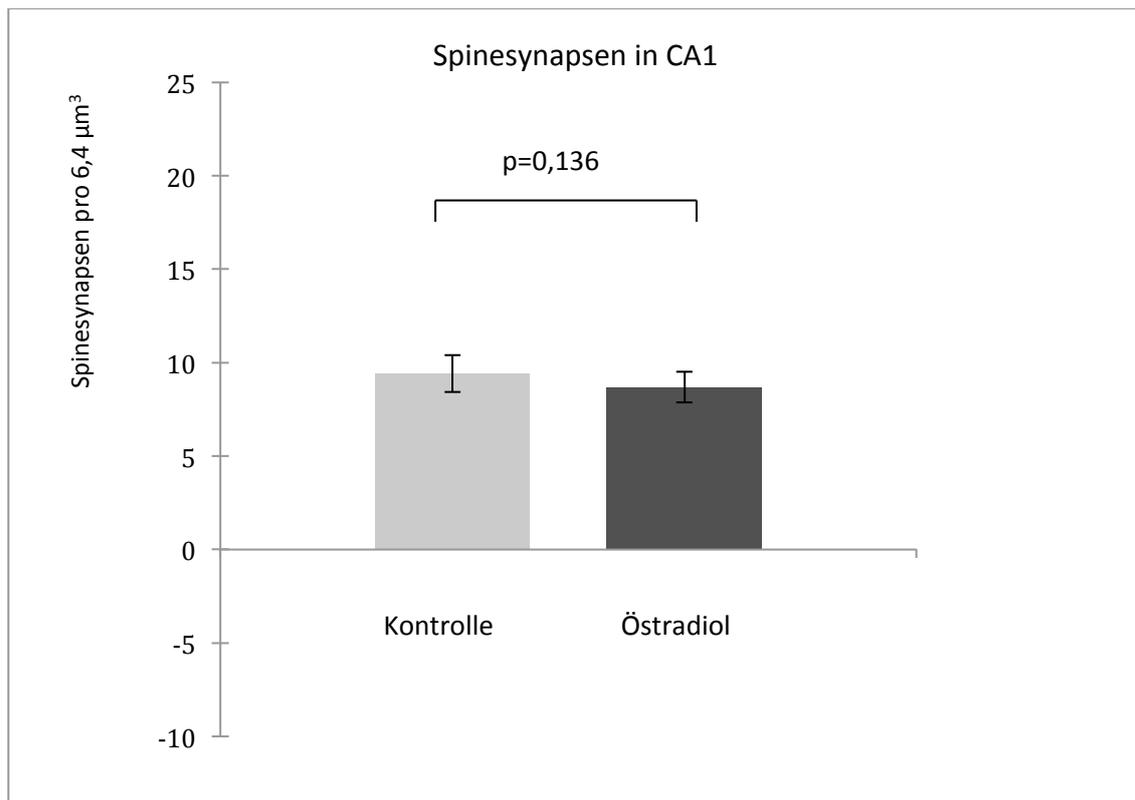


Fig. II: Vergleich der Spinesynapsenzahl pro $6,4 \mu\text{m}^3$ nach Behandlung mit Öl (Kontrolle) und nach Behandlung mit Östradiol. Auf der Y-Achse dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Spinesynapsenzahl und "standard error of mean" (SEM (+/-)). Die Gesamtzahl (N) der jeweiligen Slices pro Behandlungsgruppe wurde bei der Berechnung des SEM berücksichtigt.

Dieses Experiment haben wir auch vor dem Hintergrund durchgeführt, dass in neueren Studien postuliert wird, dass der ER- β der einzige Östrogenrezeptorsubtyp ist der für die Spine-Zunahme nach Östradiolbehandlung verantwortlich ist (Liu et al., 2008). Dieselben Autoren hatten bereits nachgewiesen, dass Östradiolbehandlung von ovariectomierten ER- β -Knockout-Mäusen zu keiner Vermehrung der Spinesynapsen führt.

4.3 Expression synaptischer Proteine

Um nicht nur die Struktur, sondern auch potentielle funktionelle Aspekte bei östrogen-induzierter synaptischer Plastizität zu erfassen, untersuchten wir neben der Spinesynapsendichte auch die Expression synaptischer Proteine. Für unsere Untersuchungen wählten wir den präsynaptischen Marker Synaptophysin und Synaptopodin als Marker für die Postsynapse. Synaptophysin ist ein Membranbestandteil von Transmetavesikeln, während Synaptopodin durch seine enge Assoziation an den Spineapparat als Marker der Postsynapse, aber auch insbesondere als Marker großer mushroom-spines gelten kann, die in besonders hohem Maße an plastischen Vorgängen im Hippocampus beteiligt sind. In vorausgegangen Untersuchungen konnte für beide Proteine eine Östrogensensitivität nachgewiesen werden. Beide Proteine werden in den Strata radiata der CA1-Region mit immunhistochemischen Färbungen erfasst. Bei beiden Proteinen kommt es beim immunhistochemischen Nachweis zu einer punktförmigen Färbung. Analog zu unseren Experimenten zur Spinesynapsendichte nach Stimulation der beiden Östrogenrezeptor-Subtypen α und β wurde bei diesen Experimenten die Proteinexpression nach selektiver Blockade des Östrogenrezeptors α bzw. des Östrogenrezeptors β erfasst. Die Inspektion der Kryostatschnitte von hippocampalen Schnittkulturen, die mit den Antagonisten bzw. Letrozol behandelt worden waren, ließ bereits die Responsivität auf die Stimulation erkennen. Nach Applikation von Letrozol war deutlich, dass die Färbeintensität beim Nachweis von Synaptophysin bzw. Synaptopodin verändert war: Synaptophysin zeigte eine Herabregulation, während die Färbeintensität beim Nachweis von Synaptopodin stärker war. Die im Anschluss daran durchgeführte Quantifizierung der Färbeintensität mittels Laser-Scanning Mikroskopie und anschließender Bildanalyse bestätigte diese Ergebnisse.

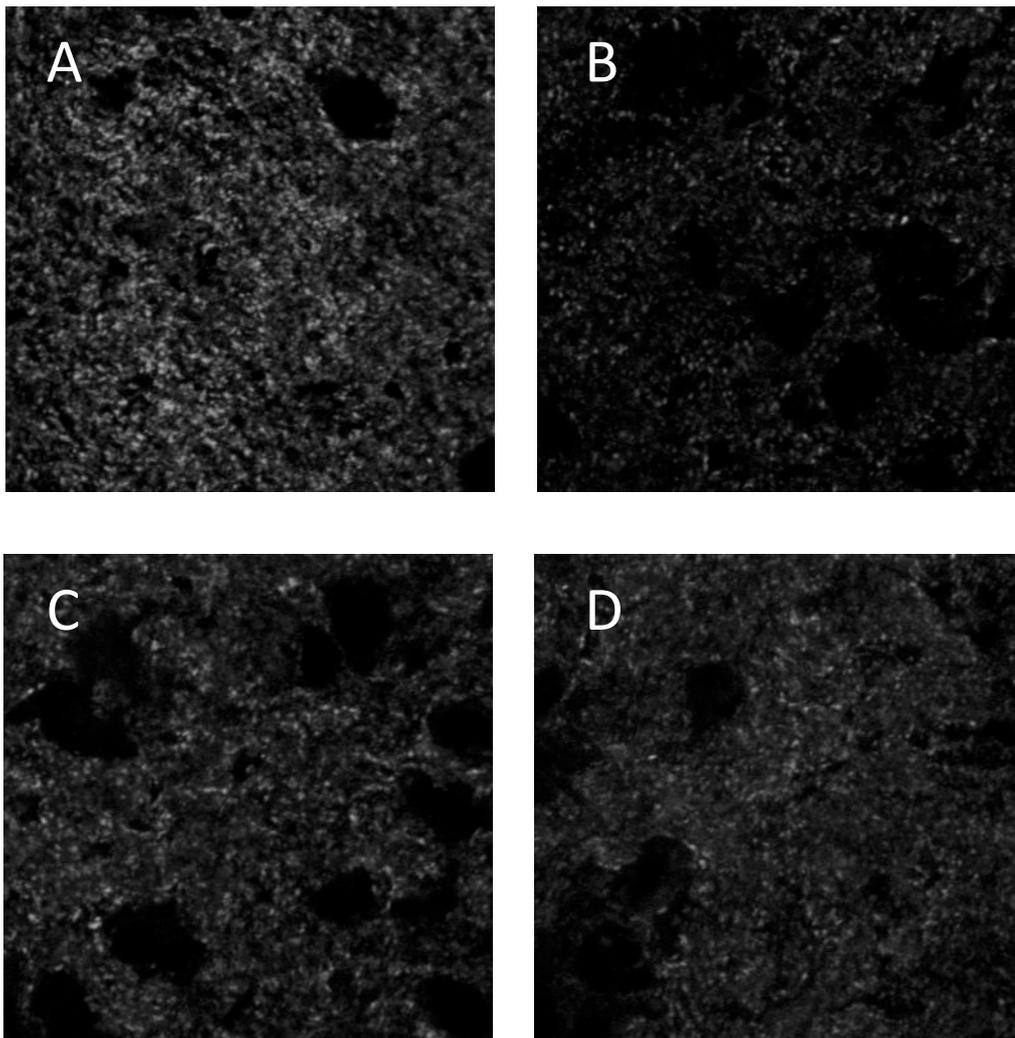


Abb. 15: Lasermikroskopische Aufnahme der Synaptophysinexpression in der Region CA1 St. radiatum. A: Kontrolle. B: Letrozol. C: ER- α -Antagonist MPP. D: ER- β -Antagonist PHTPP. Keine strukturellen Unterschiede der Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle. Die Immunreaktivität von Synaptophysin ist in allen Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrolle reduziert.

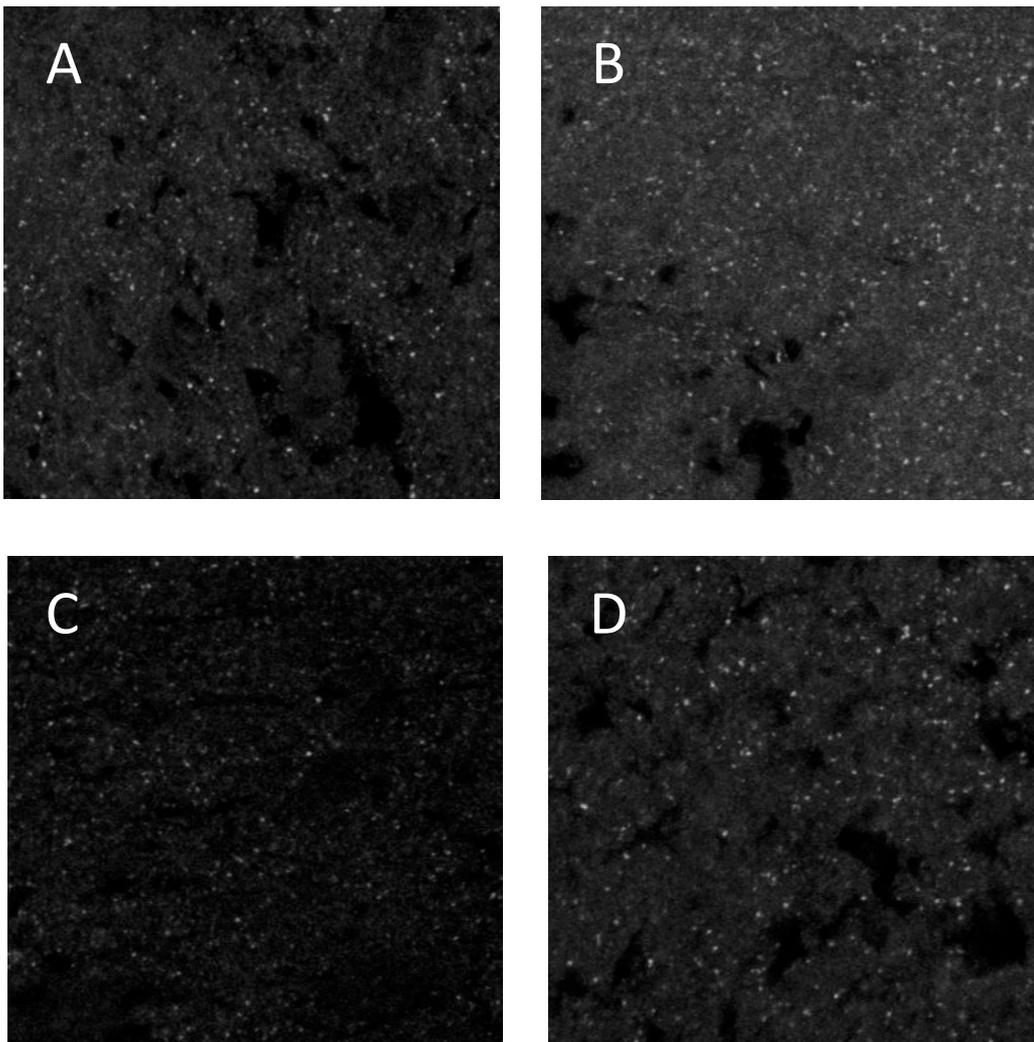


Abb. 16: Lasermikroskopische Aufnahme der Synaptopodinexpression in der Region CA1 St. radiatum. A: Kontrolle. B: Letrozol. C: ER- α -Antagonist MPP. D: ER- β -Antagonist PHTPP. Keine strukturellen Unterschiede der Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle. Die Immunreaktivität von Synaptopodin ist gegenüber der Kontrolle nach MPP reduziert und nach Letrozol verstärkt.

Nach Hemmung der Aromatase in hippocampalen Schnittkulturen zeigte sich ein genau entgegengesetztes Verhalten der Proteine: die Expression von Synaptophysin war signifikant herunterreguliert, während die Expression von Synaptopodin signifikant heraufreguliert war (Fig. III). In diesen Experimenten konnten wir die zuvor gezeigte Sensitivität beider Proteine auf eine Östradiolbehandlung bestätigen.

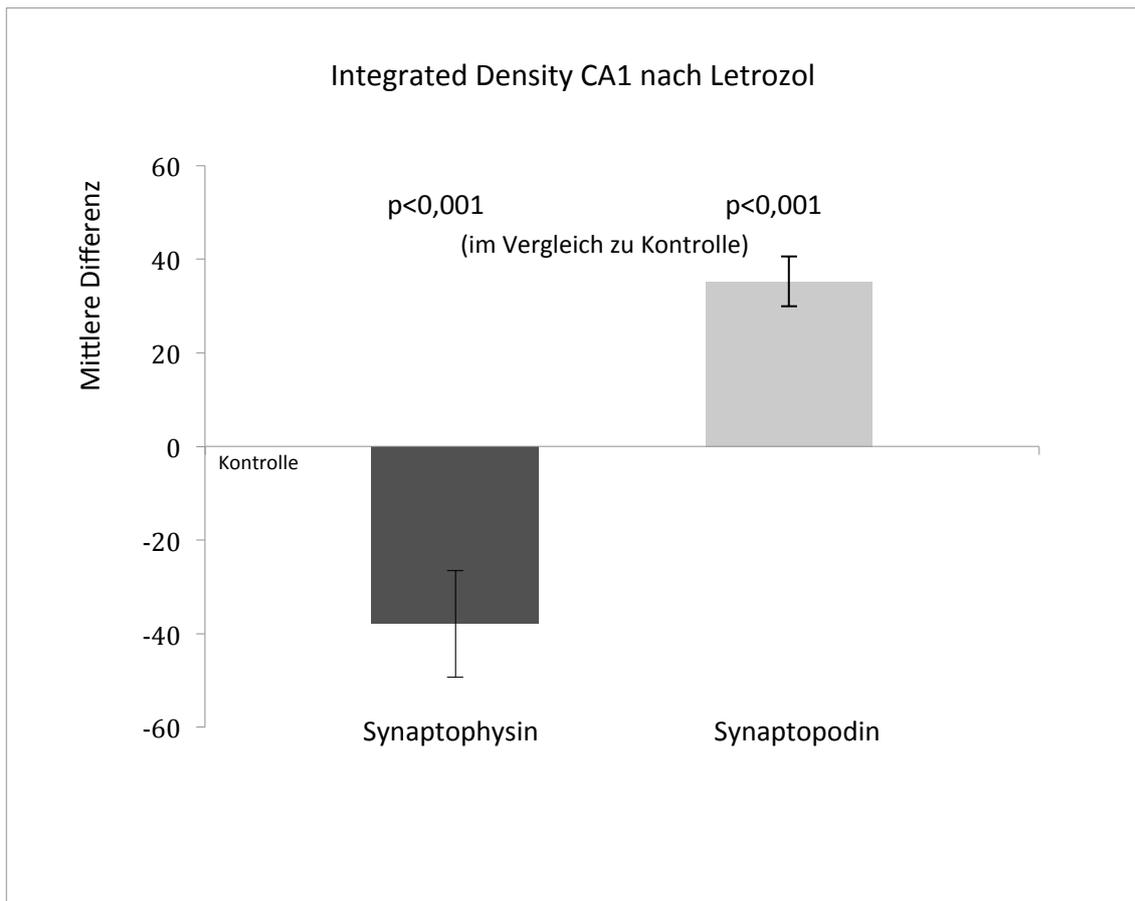


Fig. III: Vergleich der Integrated Density für markierte Synaptophysin- und Synaptopdin-Proteine im Bereich CA1 nach Langzeitbehandlung (7 Tage) mit dem Aromataseinhibitor Letrozol (10^{-7} M). Auf der Y-Achse dargestellt sind die mittlere Differenz in Prozent bezogen auf die Kontrollgruppe und "standard error of mean" (SEM (+/-)). Die Gesamtzahl (N) der jeweiligen Slices pro Behandlungsgruppe wurde bei der Berechnung des SEM berücksichtigt.

Zur Klärung der Beteiligung der beiden Östrogenrezeptor-Subtypen α und β bei der östrogen-induzierten Regulation synaptischer Proteine ergab die Behandlung der hippocampalen Schnittkulturen mit dem ER- α Antagonisten wie auch die Behandlung mit dem Antagonisten für den ER- β bei der Synaptophysin-Expression in beiden Fällen eine klare, signifikante Herunterregulation des Proteins. Dies ließ sich bereits bei der mikroskopischen Inspektion beobachten und wurde durch die Quantifizierung mittels Laser-Scanning Mikroskopie und anschließende Bildanalyse verifiziert (Fig. IV).

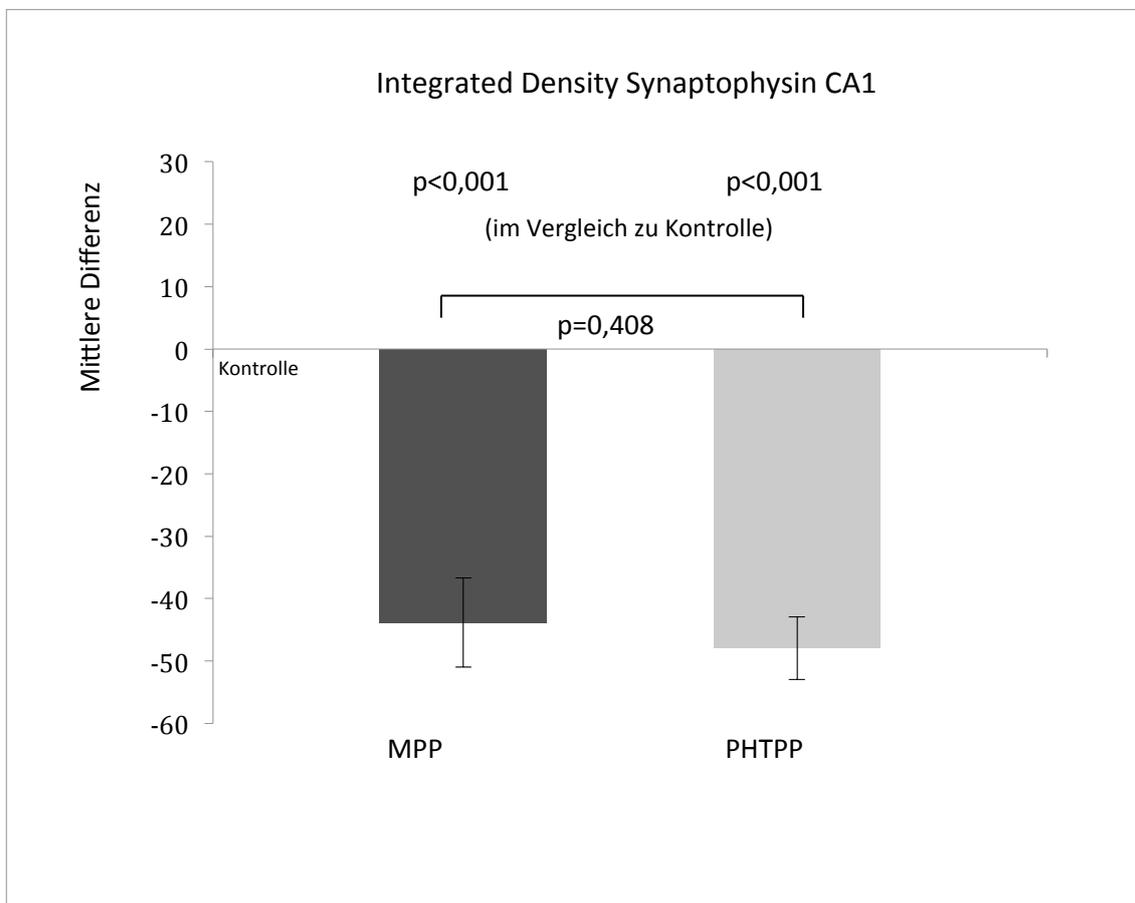


Fig. IV: Vergleich der Integrated Density für markierte Synaptophysin-Proteine im Bereich CA1 nach Langzeitbehandlung (7 Tage) mit dem spezifischen ER- α -Antagonisten MPP (10^{-6} M) und dem spezifischen ER- β -Antagonisten PHTPP (10^{-6} M). Auf der Y-Achse dargestellt sind die mittlere Differenz in Prozent bezogen auf die Kontrollgruppe und "standard error of mean" (SEM (+/-)). Die Gesamtzahl (N) der jeweiligen Slices pro Behandlungsgruppe wurde bei der Berechnung des SEM berücksichtigt.

Beim postsynaptischen Protein Synaptopodin dagegen zeigte sich, dass die beiden Östrogenrezeptor-Subtypen das Protein antagonistisch regulieren. Die Behandlung der hippocampalen Schnittkultur und sowohl die mikroskopische Inspektion als auch die anschließende Quantifizierung ergaben, dass die Blockade des ER- α mittels MPP zu einer Herunterregulation des Proteins führt. Genau entgegengesetzt resultierte die Blockade des Östrogenrezeptors β in hippocampalen Schnittkulturen in einer Heraufregulation des Proteins. Selbst wenn diese Heraufregulation signifikant zur Kontrolle war, so war sie doch hoch signifikant zu der Proteinexpression nach Blockade des Östrogenrezeptors α (Fig. V).

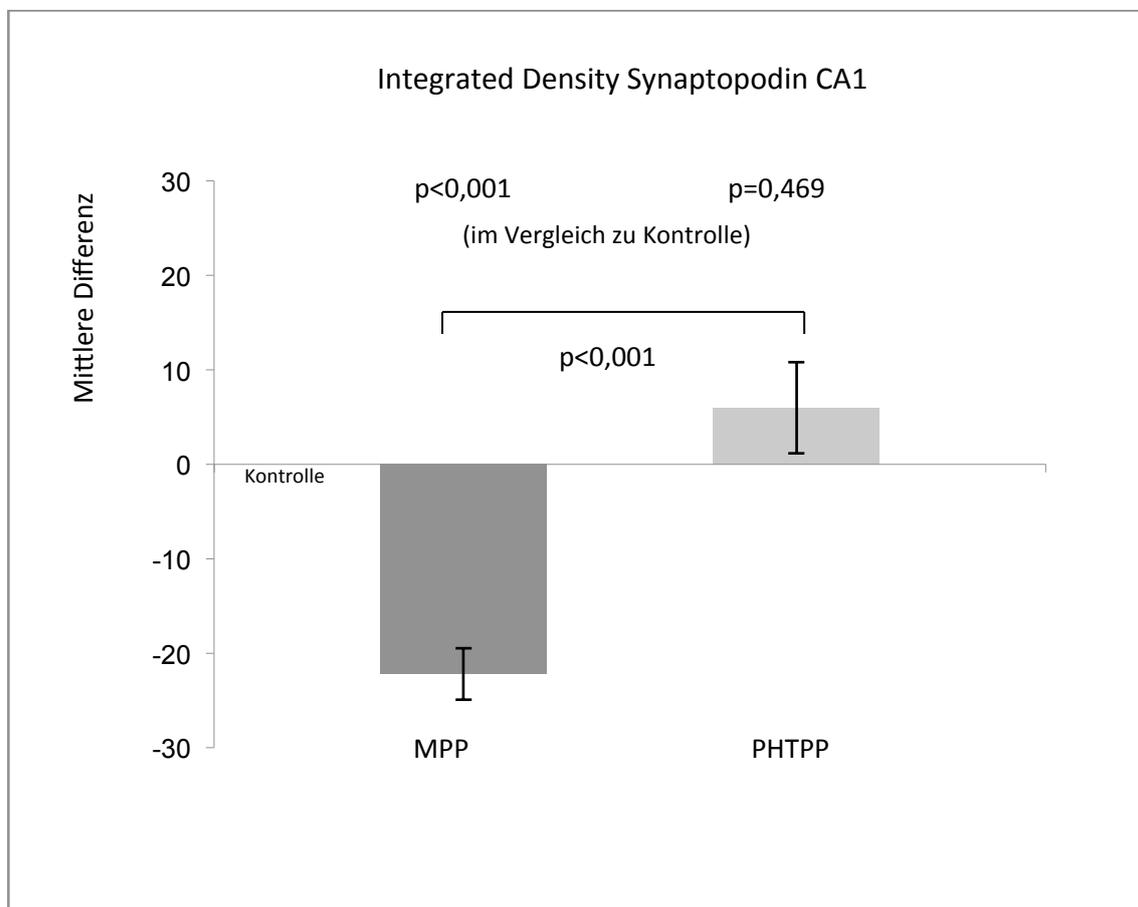


Fig. V: Vergleich der Integrated Density für markierte Synaptopodin-Proteine im Bereich CA1 nach Langzeitbehandlung (7 Tage) mit dem spezifischen ER- α -Antagonisten MPP (10^{-6} M) und dem spezifischen ER- β -Antagonisten PHTPP (10^{-6} M). Auf der Y-Achse dargestellt sind die mittlere Differenz in Prozent bezogen auf die Kontrollgruppe und "standard error of mean" (SEM (+/-)). Die Gesamtzahl (N) der jeweiligen Slices pro Behandlungsgruppe wurde bei der Berechnung des SEM berücksichtigt.

4.4 Weitere Untersuchungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Diese Untersuchungen führten jedoch zu keinen konsistenten Ergebnissen.

4.4.1 Der Einfluss von siRNA gegen ER- α und ER- β

Um den Einfluss der Östrogenrezeptoren auf synaptische Plastizität zu untersuchen wurde zusätzlich ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Es wurde siRNA gegen ER- α und ER- β hergestellt. Nach Ermittlung der kodierenden Nukleotidsequenz der Östrogenrezeptor-mRNA wurden geeignete Targetsequenzen für die siRNA ausgewählt. Mit zugehörigen *sense* und *antisense* Oligonukleotidsequenzen wurde zunächst dsDNA hergestellt. Aus dieser konnte dann *sense* und *antisense* Einzelstrang-RNA und schließlich erfolgreich die Doppelstrang siRNA gegen ER- α und ER- β synthetisiert werden. Da jeweils zwei Targetsequenzen verwendet wurden, erhielt man jeweils zwei passende siRNAs.

Photometrisch konnten folgende Konzentrationen ermittelt werden:

| | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| siRNA gegen ER- α Nr. 1 | 0,6905 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| siRNA gegen ER- α Nr. 2 | 0,7525 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| siRNA gegen ER- β Nr. 1 | 0,3875 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| siRNA gegen ER- β Nr. 2 | 0,3990 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |

Tab. I, siRNA-Konzentrationen

Vor Transfektion wurden zunächst in Zelldispersionskulturen die beiden Östrogenrezeptoren immunocytochemisch dargestellt. Sowohl ER- α als auch ER- β konnten eindeutig in Zelldispersionskulturen nachgewiesen werden.

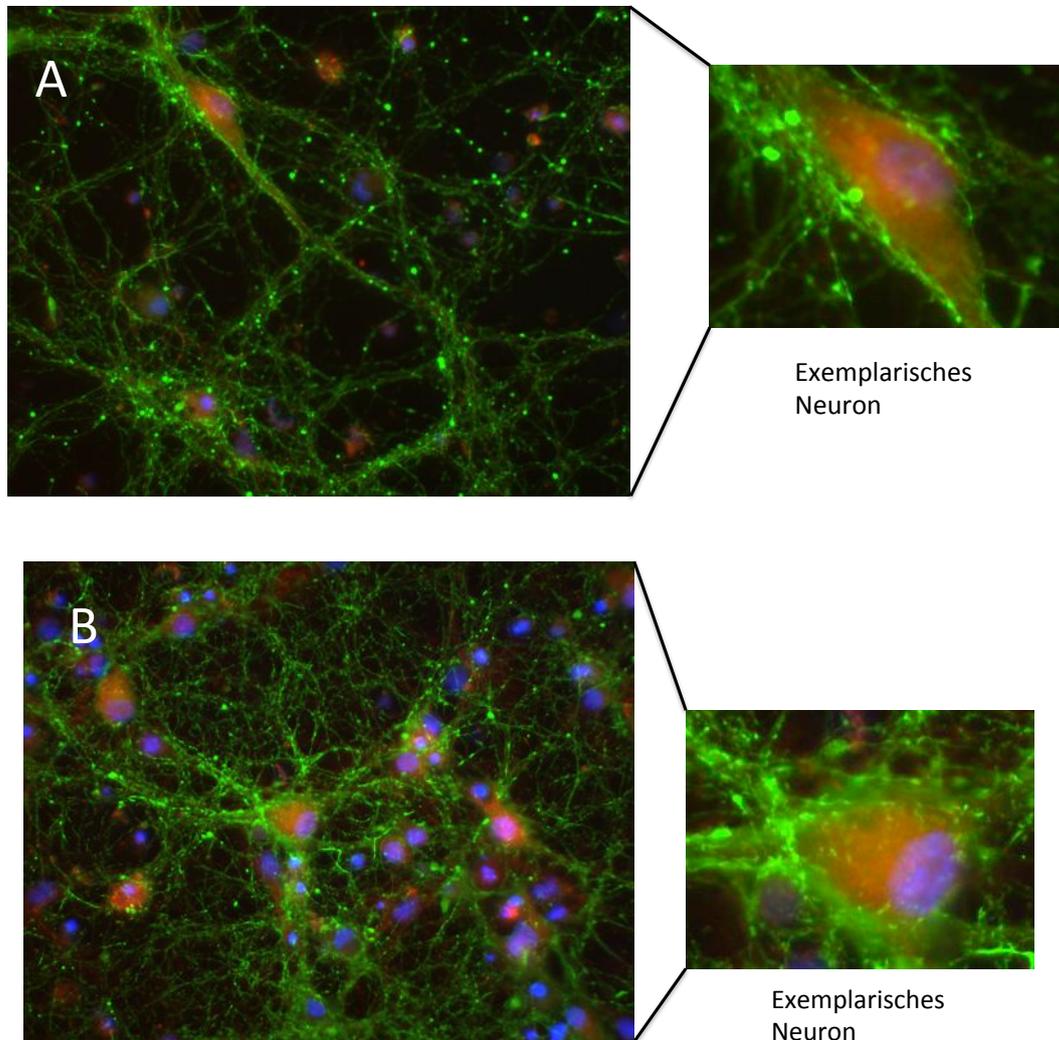


Abb. 17: Mikroskopische Aufnahme von hippocampalen Zelldispersionskulturen. A: Nachweis von ER- α . B: Nachweis von ER- β . **Rot:** Östrogenrezeptorproteine. **Blau:** Zellkerne. **Grün:** Tauproteine.

Es erfolgte die Transfektion von Zelldispersionskulturen. Als Markierung diente GFP, als Vektor diente Calciumphosphat. Nach erfolgreicher Transfektion sollte zunächst die Abnahme der Östrogenrezeptorexpression immunocytochemisch festgestellt werden. Daraufhin wäre die Auswirkung der Blockade der ER-mRNA auf synaptische Plastizität anhand der Proteinexpression von Synaptophysin und Synaptopodin darstellbar gewesen.

Die Transfektion selbst führte jedoch zum Untergang der bis dahin vitalen Zelldispersionskultur. Da vor Transfektion keine Auffälligkeiten der Zellkulturen bestanden, könnte dies wohlmöglich bedeuten, dass eine Manipulation auf mRNA-Ebene der Östrogenrezeptoren letal ist. Dabei würde bereits die Blockade eines der beiden Östrogenrezeptoren auf mRNA-Ebene ausreichen, um *in-vitro* zum Zelluntergang zu führen. Daraus ergäbe sich, dass das Vorhandensein beider Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β für hippocampale Nervenzellen essentiell ist. Weitere Versuche, zum Beispiel ein LDH-Assay zur Messung des Zelluntergangs nach Transfektion, wären sinnvoll.

4.4.2 Untersuchungen von Synaptophysin und Synaptopodin in der Region CA3

Die Expression von Synaptophysin wurde auch in CA3 untersucht. Bisherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten eine Abnahme der Synaptophysinexpression in CA3 nach Letrozol zeigen, die sogar noch ausgeprägter war als in CA1 (Prange-Kiel et al., 2006). Kontrolluntersuchungen mit Letrozol konnten erneut eine tendenzielle Abnahme der Synaptophysinexpression nach Letrozol in CA3 zeigen, diese war jedoch nicht signifikant. Eine Behandlung der Slicekulturen mit ER- α - und ER- β -Antagonisten führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Synaptophysinexpression sowohl für MPP als auch für PHTPP. Da jedoch eine eindeutige Sensibilität der Slicekulturen gegenüber *de-novo* Östrogenen anhand der Kontrolluntersuchungen nicht gezeigt werden konnte, wurden diese Ergebnisse nicht dargestellt.

Auch die Synaptopodinexpression wurde in CA3 untersucht. Erneut konnte zwar eine tendenzielle Zunahme der Expression in Kontrolluntersuchungen mit Letrozol auch in CA3 gezeigt werden. Diese war jedoch ebenfalls nicht signifikant. Die Behandlung mit MPP führte zu einer signifikanten Reduktion der Synaptopodinexpression auch in CA3, die Behandlung mit PHTPP führte zu keiner signifikanten Regulation. Die Ergebnisse wurden aufgrund fehlender Östrogensensibilität ebenfalls nicht gezeigt.

Die mRNA-Expression beider Östrogenrezeptoren ist im Vergleich zu CA1 in CA3 viel stärker ausgeprägt (Rune et al., 2002). Dies könnte die Experimente

beeinflusst haben. Eventuell ist in CA3 eine höhere Konzentration der Substanzen nötig, um konsistente Ergebnisse zu erhalten. Auch die Regulation der Spinesynapsen konnte bisher vor allem für CA1 gezeigt werden. Die Region CA3 könnte andere Regulationswege aufweisen, die bisher nicht ausreichend aufgeklärt sind.

4.4.3 Die Kombination der Antagonisten mit dem Aromataseinhibitor Letrozol

Die Antagonisten wurden auch in Kombination mit Letrozol gegeben. Hier ergaben sich ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. So ergab sich u.a. in CA3 eine Zunahme der Synaptophysinexpression nach Kombination von MPP und Letrozol, die nicht zu erklären ist. Noch größere Widersprüche ergaben sich in CA1. Hier ergaben sich entgegengesetzte Regulationen im Vergleich zu Einzelgaben. Auch für Synaptopodin ergaben sich bei gemeinsamer Gabe der Antagonisten mit Letrozol keine konsistenten Ergebnisse. Die gemeinsame Gabe des Aromataseinhibitors Letrozol mit spezifischen ER-Antagonisten scheint eine so unphysiologische Situation zu verursachen, dass eine Verwertung der Ergebnisse nicht sinnvoll erscheint. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen signifikante Regulationen nach Blockade sowohl der *de-novo* Östrogensynthese als auch der Östrogenrezeptoren. Bei Kombination beider Verfahren ist offenbar das Zusammenspiel von Nervenzellen im Hippocampus erheblich gestört.

5. Diskussion

In dieser Arbeit konnten vor allem drei wesentliche Ergebnisse gezeigt werden:

1. Spezifische ER-Antagonisten beeinflussen die Spinesynapsenanzahl in hippocampalen Slicekulturen in der Region CA1.
2. Spezifische ER-Antagonisten beeinflussen die synaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptopodin in hippocampalen Slicekulturen in der Region CA1.
3. Eine Östradiolgabe führt in ER- α -KO-Mäusen zu keiner signifikanten Änderung der Spinesynapsenanzahl in CA1.

Des Weiteren konnte die bekannte Herabregulation von Spinesynapsen in hippocampalen Slicekulturen in CA1 durch den Aromataseinhibitor Letrozol erneut gezeigt werden. Auch die bekannte Herabregulation von Synaptophysin nach Letrozolgabe konnte in CA1 abermals dargestellt werden. Zudem kam es zu einer signifikanten Heraufregulation von Synaptopodin nach Letrozolgabe in hippocampalen Slicekulturen in CA1.

5.1 Methodische Überlegungen

5.1.1 Untersuchungen zur Spinesynapsendichte in CA1

In dieser Arbeit wurden hippocampale Spinesynapsen in CA1 untersucht. Bei der stereologischen Bestimmung der Spinesynapsenzahl wurde die Dissector-Technik verwendet (Brændgaard und Gundersen, 1986) was verhinderte, dass Spinesynapsen doppelt gezählt werden. Neben Spinesynapsen lassen sich auch dendritische Spines selbst untersuchen. Mukai et al. (2007) fanden in hippocampalen Slices eine inhomogene Verteilung der unterschiedlichen Spinesubtypen. Einige Studien mit ER-Agonisten zeigten eine Zunahme der Spines nur bei bestimmten Spinesubtypen (Mukai et al., 2007; Liu et al., 2008). Bei einer Bestimmung der Spines wäre dies zu berücksichtigen gewesen.

Zudem sind die unterschiedlichen Spinesubtypen vermutlich nicht in gleichem Maße an der Bildung von Spinesynapsen beteiligt. Spinesynapsen hingegen beeinflussen synaptische Plastizität. Daher wurden Spinesynapsen untersucht und nicht Spines oder Spinesubtypen.

5.1.2 Untersuchungen von Slicekulturen

Hippocampale Slicekulturen sind organotypische Schnittkulturen des Nervengewebes (Förster et al., 2005). Die Zellstrukturen und dendritischen Schichten bleiben in Slices in ihrer Form erhalten (Frotscher und Heimrich, 1993). Ihre Untersuchung liefert somit nicht nur Informationen über einzelne Neuronen. Vielmehr kann der Gewebeverband mit der komplexen Interaktion der hippocampalen Neuronen untersucht werden und so können auch parakrine Regulationsmechanismen dargestellt werden. Gerade dies scheint bei der Wirkung von Östrogenen im Hippocampus eine besondere Rolle zu spielen. Zudem kann eine bestimmte Region des Hippocampus isoliert betrachtet werden, wie die in dieser Arbeit untersuchte Region CA1.

5.1.3 Untersuchung von synaptischen Proteinen

Die Untersuchung von Proteinen mittels quantitativer Immunhistochemie beinhaltet einige methodische Schwierigkeiten. Ungleiche Schichtdicken nach Schneiden der Slices mittels Kryostat beeinflussen eine lichtmikroskopische Auswertung. Mit dem verwendeten Lasermikroskop hingegen kann eine bestimmte Ebene unabhängig von der Schichtdicke gezielt ausgewählt werden. Während des Schneidens mit dem Kryostat wurden, eventuell bedingt durch verbleibende Saccharoselösung, teilweise Lücken im Zellverband entdeckt. Deshalb wurden bei der Auswertung der Immunhistochemie in ImageJ vier stets gleichgroße Bereiche der am besten erhaltenen Bereiche des Bildes ausgewählt und nur diese ausgewertet.

Entscheidend bei der Auswertung ist zudem die Festlegung eines geeigneten Thresholds (Schwellenwertes). Eine unspezifische Hintergrundfärbung der Slices kann die Auswertung beeinflussen. Anhand der Kontrollgruppe wurde ein geeigneter Threshold ausgewählt und dieser für sämtliche Bilder einheitlich festgelegt. Nur Signale innerhalb des Thresholds wurden verwertet. Unspezifische Hintergrundsignale wurden somit von der Auswertung ausgeschlossen. Anschließend konnte nun die immunhistochemische Proteinexpression quantitativ ausgewertet werden.

5.1.4 Untersuchungen von ER-KO-Mäusen

Die Entwicklung von ER-KO-Mäusen liefert einen wichtigen Einblick in die Rolle der ERs bei synaptischer Plastizität (Kim und Casadesus, 2010). Sie ermöglichen die gezielte Untersuchung der Funktion eines ERs durch Ausschaltung des anderen ERs. Durch *in-vivo* Behandlung von ER-KO-Mäusen kann der Effekt eines ERs gezielt dargestellt werden. Eine Wirkung über den anderen ER-Subtyp oder auch eine gegenseitige Beeinflussung der ERs kann bei diesem Studienmodell hingegen ausgeschlossen werden.

Bei Verwendung einer ER- α -KO Maus ist darauf zu achten, dass es tatsächlich zum gewünschten Knockout im Klon kommt. Bei der Methode nach Lubahn kann allerdings keine wildtyp-artige mRNA als Transkript eines ER- α -Gens nachgewiesen werden (Couse und Korach, 1999). Die verwendete ER- α -KO Maus wurde nach dieser Methode geklont und ist daher für Untersuchungen zum Einfluss der ERs geeignet.

Gegen den Einfluss von gonadalen Östrogenen wurde zudem eine Ovariectomie der Mäuse durchgeführt.

5.1.5 Die Verwendung von chemischen Substanzen

Die Verwendung von Letrozol und ER-Antagonisten birgt die Gefahr, dass die Substanzen selbst neurotoxisch sind. Für Letrozol konnte durch unsere Arbeitsgruppe eine Neurotoxizität ausgeschlossen werden (Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2006; Fester et al., 2006).

Betrachtungen der Zell- und Gewebestruktur sowohl im mikroskopischen als auch im elektronenmikroskopischen Bild lieferten zudem keine Hinweise auf eine Neurotoxizität der verwendeten ER-Antagonisten.

5.1.6 Die Spezifität der verwendeten Substanzen

Für Letrozol ist hinreichend bewiesen, dass es die Aromatase in hippocampalen Neuronen herunterreguliert. Bei postmenopausalen Frauen werden Letrozol und andere Aromatasehemmer für die endokrine Therapie mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren empfohlen (Burstein et al., 2010; Kreienberg et al., 2012). Letrozol ist unter dem Namen Femara[®] seit 1997 zugelassen. Letrozol ist hochselektiv, hat selbst keine östrogenähnliche Wirkung und blockiert die Östrogensynthese sehr effektiv sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* (Höffken, 1999; Thiantanawat et al., 2003). Die verwendete Dosis (100nM) führt signifikant zu der größten Reduktion der Östradiolsynthese in hippocampalen Sliceulturen (Kretz et al., 2004).

Auch die verwendeten Antagonisten sind hinreichend spezifisch. MPP und PHTPP sind mittlerweile zahlreich eingesetzte Antagonisten in der Forschung, insbesondere im Bereich der Neurowissenschaften (Zhong et al., 2010; Donzelli et al., 2010; Adams et al., 2010).

ER-spezifische Antagonisten heben die Wirkung von Östrogenen auf. Sie inhibieren die östrogen-induzierte Zunahme der Spinesynapsendichte (McEwen et al., 1999; Prange-Kiel et al., 2009). Östrogenrezeptor-spezifische Antagonisten führen auch zu einer Veränderung von synaptischen Proteinen, so kann die östradiol-induzierte Zunahme von Synaptophysin in hippocampalen

Zelldispersionskulturen durch Blockade mit dem ER-Antagonisten ICI 182 780 aufgehoben werden (Fester et al., 2009b). MPP bindet 220-fach stärker am ER- α als am ER- β . MPP blockiert die Wirkung Östradiols am ER- α in der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration. Dabei besitzt MPP selbst keine agonistische Aktivität an der DNA und an EREs (Sun et al., 2002; Harrington et al., 2003). PHTPP bindet 36-fach stärker am ER- β als am ER- α . PHTPP blockiert in der verwendeten Konzentration effektiv die Östradiolwirkung am ER- β und zeigt dabei keine signifikante Wirkung am ER- α (Compton et al., 2004).

5.1.7 Die Komplexität der ERs

Östrogene wirken nicht nur über ERs, ERs sind zudem ligandeninduzierbare Transkriptionsfaktoren. Östradiol sowie auch die Blockade der Östrogensynthese mit Letrozol beeinflussen die Expression der ERs in hippocampalen Zelldispersionskulturen (Prange-Kiel et al., 2003, siehe auch Einleitung).

Untersuchungen von Rissman et al. (2002) an ovariectomierten ER- β -KO Mäusen zeigten eine starke Herabregulation des ER- α nach subkutaner Implantation von Östradioldepots *in-vivo*. Dies steht im Widerspruch zu der von Prange-Kiel et al. (2003) beschriebenen Hochregulation des ER- α nach Östradiolstimulation *in-vitro*. Rissman et al. (2002) vermuteten, dass der ER- β den ER- α im Wildtyp vor einer Herabregulation durch Östradiol schützt. Östrogenrezeptoren bilden zudem nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere, für die ebenfalls eine Bindung an EREs gezeigt werden konnte (Cowley et al., 1997; Kuiper und Gustafsson, 1997; Pettersson et al., 1997, siehe auch Einleitung). Dies zeigt die Komplexität der Östrogenrezeptoren. Der ligandeninduzierten Transkription der ERs, der gegenseitigen Regulation der ERs sowie der Bildung von ER-Heterodimeren könnte eine entscheidende Funktion bei der Regulation von synaptischer Plastizität zukommen. Dabei könnten auch parakrine Interaktionen von hippocampalen Neuronen bei diesen Effekten eine wichtige Rolle spielen, was besonders bei Untersuchungen an Slicekulturen im Vergleich zu Zelldispersionskulturen zu berücksichtigen ist.

5.2 Der Einfluss von ER-Antagonisten auf die Spinesynapsendichte

Östrogene beeinflussen synaptische Plastizität. Neurone des Hippocampus synthetisieren *de-novo* Östradiol und dieses wirkt para- und autokrin auf die Spinesynapsendichte in CA1 (Rune und Frotscher, 2005, siehe auch Einleitung). Bisherige Studien legen eine Beteiligung der ERs nahe, erbrachten aber auch widersprüchliche Ergebnisse. Untersuchungen mit ER-Agonisten in dissoziierten hippocampalen Zellkulturen konnten eine Zunahme von Spinesynapsen nach Gabe eines ER- α -Agonisten zeigen (Jelks et al., 2007). In einer Studie, in der die Untergruppen von postsynaptischen Spines in hippocampalen Slices nach zweistündiger Gabe eines ER- α -Agonisten untersucht wurden, kam es zu einer signifikanten Zunahme von thin-spines und Filopodien. Dabei konnte durch Verwendung von Slicekulturen zudem dargestellt werden, dass diese Zunahme in einer bestimmten Region des Hippocampus, der Region CA1, stattfand (Mukai et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigte eine *in-vivo* Studie eine Spinezunahme bei mushroom-spines im Gyrus dentatus nach Behandlung von Mäusen mit einem ER- β -Agonisten (Liu et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ER-Antagonisten die Spinesynapsendichte in CA1 in hippocampalen Slicekulturen beeinflussen. Nach Gabe des ER- α -Antagonisten kommt es zu einer signifikanten Herabregulation von Spinesynapsen ($p=0,004$). Auch nach Gabe des ER- β -Antagonisten kommt es zu einer signifikanten Herabregulation ($p\leq 0,001$). Ein Vergleich der beiden ER-Antagonisten zeigt eine signifikant stärkere Zunahme nach Blockade des ER- β ($p=0,03$). Nach Gabe von Letrozol konnte die bereits gezeigte Abnahme der Spinesynapsen erneut signifikant dargestellt werden ($p=0,02$). Dies spricht für eine Sensibilität der Slicekultur gegenüber *de-novo* synthetisierten Östrogenen.

In unserer Arbeitsgruppe führte weder ein ER- α - noch ein ER- β -Agonist zu einer signifikanten Regulation der Spinesynapsendichte. In Kombination mit Letrozol konnte hingegen ein Effekt gezeigt werden (unveröffentlicht). Ebenfalls konnte in unserer Arbeitsgruppe keine Zunahme der Spinesynapsen nach Östradiolgabe in Slicekulturen gezeigt werden (Kretz et al, 2004). Die Blockade

der *de-novo* Östrogensynthese als auch der ERs scheint wohlmöglich *in-vitro* zuverlässigere Ergebnisse zu bieten als eine Stimulation mit Östradiol oder ER-Agonisten.

Durch Verwendung von ER-Antagonisten konnte so eine Beteiligung beider ERs bei der Regulation der Spinesynapsendichte durch *de-novo* Östrogene in CA1 nachgewiesen werden. Dabei führt der ER- β -Antagonist zu einer signifikant stärkeren Abnahme ($p=0,03$). Dies kann zum einen dadurch bedingt sein, dass der ER- β seine Funktion nach Blockade nicht mehr hinreichend ausüben kann. Zum anderen könnte das Gleichgewicht zu Gunsten einer Wirkung des ER- α verschoben sein. Somit könnte sowohl der ER- α eine Abnahme der Spinesynapsen bewirken als auch der ER- β eine Zunahme. Andererseits kommt es nach Blockade des ER- α ebenfalls zu einer Abnahme der Spinesynapsen. Dies spricht wiederum gegen eine Herabregulation der Spinesynapsen durch den ER- α . Außerdem könnten die ER-Antagonisten auch ER-Heterodimere beeinflussen, weshalb auch eine verminderte Wirkung von ER-Heterodimeren für die Abnahme der Spinesynapsen verantwortlich sein könnte. Zuletzt könnte auch die gegenseitige Beeinflussung der ERs durch die ER-Antagonisten gestört werden und die Abnahme der Spinesynapsen vermitteln.

5.3 Die Auswirkung des ER- α -Knockouts auf östradiol-induzierte synaptische Plastizität

Mithilfe spezifischer ER-KO-Mäuse kann die Wirkung eines ERs gezielt untersucht werden. Liu et al. (2008) zeigten, dass ER- β -Agonisten *in-vivo* eine Zunahme von synaptischen Proteinen und mushroom-spines im gyrus dentatus bewirken. Die Zunahme der synaptischen Proteine durch ER- β -Agonisten blieb in ER- β -KO-Mäusen aus. Zudem kam es nach Gabe von Östradiol bei Wildtyp-Mäusen *in-vivo* zu einer Verbesserung der räumlichen Gedächtnisleistung. Diese konnte auch nach Östradiolgabe in ER- α -KO-Mäusen erzielt werden, nicht jedoch in ER- β -KO-Mäusen. Liu et al. (2008) postulierten, dass der ER- β

sowohl die Kognition als auch synaptische Plastizität reguliert. Um diese These zu überprüfen, wurde eine ER- α -KO Maus verwendet. Eine vermehrte Spinesynapsendichte nach Östradiolgabe konnte *in-vivo* für CA1 nachgewiesen werden (Woolley und McEwen, 1992). Würde die synaptische Plastizität in Form einer vermehrten Spinesynapsendichte über den ER- β reguliert werden, müsste sie auch in ER- α -KO-Mäusen zu sehen sein. Daher wurden die ER- α -KO-Mäusen *in-vivo* mit Östradiol behandelt. Es konnte jedoch keine signifikante Zunahme der Spinesynapsen nach Östradiolgabe festgestellt werden ($p=0,136$). Eine alleinige Regulation der Spinesynapsen über den ER- β konnte somit widerlegt werden. Wie wird die Spinesynapsendichte somit reguliert? Der ER- β wird nach Östradiolgabe *in-vitro* herunterreguliert, während der ER- α hochreguliert wird (Prange-Kiel et al., 2003). Nach ER- β -Knockout konnte hingegen eine Abnahme des ER- α nach Östradiolgabe *in-vivo* gezeigt werden (Rissman et al., 2002). Ein ER-Knockout scheint somit die östradiol-induzierte ER-Regulation zu verändern. Rissman et al. (2002) vermuteten, dass der ER- α im Wildtyp bei der Östradiolregulation durch den ER- β beeinflusst wird. Es wäre möglich, dass sich der ER- α -Knockout wiederum auf die Regulation des ER- β nach Östradiolgabe auswirkt. Während im Wildtyp also eine Zunahme der Spinesynapsendichte nach Östradiolgabe über eine Herunterregulation des ER- β vermittelt sein könnte, könnte es in ER- α -KO-Mäusen hingegen zu einer Hochregulation des ER- β kommen und so eine Zunahme der Spinesynapsen verhindert werden. Der ER- α könnte somit zum einen an einer östradiol-induzierten Herabregulation des ER- β beteiligt sein und so eine Spinesynapsenzunahme bewirken. Zum anderen könnte der ER- α selbst im Wildtyp die Zunahme der Spinesynapsen bewirken, die somit in der ER- α -KO-Maus ausbleibt. Untersuchungen der ER- β -Expression in ER- α -KO-Mäusen nach Östradiolgabe wären hier sinnvoll. Möglich wäre aber auch, dass beide Rezeptoren für eine signifikante Regulation essentiell sind. Dafür sprechen die Ergebnisse nach Stimulation mit den ER-Antagonisten. Auch ER-Heterodimere könnten eine Regulation der Spinesynapsen bewirken. In der ER- α -KO-Maus könnten diese nicht mehr zustande kommen, was ebenfalls die fehlende Zunahme der Spinesynapsen nach Östradiolgabe erklären würde. Die alleinige Stimulation des ER- β ist jedenfalls nicht ausreichend. Die Ergebnisse sprechen gegen eine ausschließliche Regulation der Spinesynapsen über den ER- β .

5.4 Der Einfluss von Letrozol und ER-Antagonisten auf synaptische Proteine

Östrogene erhöhen die Synaptophysinexpression während Letrozol zu einer Abnahme von Synaptophysin in hippocampalen Zelldispersions- und Slicekulturen führt (Rune et al., 2002; Kretz et al., 2004; J. Prange-Kiel et al., 2006; Fester et al., 2009a; Fester et al., 2009b). Zudem konnte auch eine Abnahme der Synaptophysinexpression nach Letrozolgabe *in-vivo* gezeigt werden (Zhou et al., 2010). Die Herabregulation von Synaptophysin nach Letrozolgabe konnte in dieser Arbeit erneut *in-vitro* für hippocampale Slicekulturen signifikant nachgewiesen werden ($p \leq 0,001$).

Sowohl nach Gabe des ER- α -Antagonisten als auch nach der Gabe des ER- β -Antagonisten kommt es zu einer signifikanten Herabregulation der Synaptophysinexpression in CA1 ($p \leq 0,001$). Dies spricht für eine Regulation der Synaptophysinexpression über beide ERs, entweder jeweils durch verminderte Aktivität des blockierten ERs oder durch Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des nicht-blockierten ERs. Auch Heterodimere könnten dabei beteiligt sein. Eine signifikant stärkere Regulation eines ERs konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,408$).

Synaptopodin beeinflusst synaptische Plastizität. Nach Östradiolgabe kommt es zu einer Reduktion von Synaptopodin in Zelldispensionskulturen. Dies ist begleitet von einer Herabregulation von Spinesynapsen, die einen Spineapparat beinhalten (Fester et al., 2009b). In welcher Weise diese Herabregulation synaptische Plastizität beeinflusst, ist unklar. Die Gabe von Letrozol sollte diese Regulation weiter untersuchen.

Die Stimulation mit Letrozol führt in CA1 zu einer signifikanten Zunahme der Synaptopodinexpression ($p \leq 0,001$). Diese Regulation ist gegensätzlich zur Synaptophysinregulation nach Letrozolgabe.

Die Heraufregulation von Synaptopodin passt zu der entgegengesetzten Herabregulation nach Östradiolgabe, da Letrozol die Östradiolkonzentration vermindert.

Nach Blockade des ER- α kommt es zu einer signifikanten Herabregulation der Synaptopodinexpression in CA1 ($p \leq 0,001$). Die Stimulation mit dem ER- β -Antagonisten führt zu einer entgegengesetzten Heraufregulation. Zwar ist diese Regulation nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,469$), jedoch signifikant gegenüber dem ER- α -Antagonisten ($p \leq 0,001$).

Somit findet sich eine entgegengesetzte Regulation der ERs. Eine gegensätzliche Wirkung der ERs konnte bereits für die Regulation von synaptischer Potenzierung nach elektrophysiologischer Stimulation gezeigt werden. Mukai et al. (2007) zeigten in Slicekulturen bei Induktion einer synaptischen Langzeitdepression (LTD) durch Gabe von NMDA eine Verstärkung der Langzeitdepression durch vorherige Gabe von Östradiol. Während ein ER- α -Agonist ebenfalls zu einer Verstärkung der Langzeitdepression führte, kam es nach Gabe eines ER- β -Agonisten zu einer Verminderung der synaptischen Langzeitdepression (Mukai et al., 2007).

Experimente mit ER-Agonisten in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der ER- β -Agonist die Synaptopodinexpression herunterreguliert. Der ER- α -Agonist zeigte keine signifikante Wirkung (Fester et al., 2013). Möglich wäre, dass Östradiol vermehrt am ER- β bindet, wenn der ER- α blockiert wird. Die Abnahme der Synaptopodinexpression nach Blockade mit dem ER- α -Antagonisten käme so über eine vermehrte Bindung von Östradiol am ER- β zustande. Diese Abnahme entspricht folglich der Herunterregulation nach Gabe des ER- β -Agonisten. Die Blockade des ER- β führt logischerweise zu einer entgegengesetzten Regulation. Die Wirkung des ER- β -Antagonisten ist tatsächlich signifikant entgegengesetzt der Wirkung des ER- β -Agonisten (Fester et al., 2013). Die Ergebnisse sprechen für eine Regulation von Synaptopodin über den ER- β , wobei der ER- α eine wichtige regulatorische Funktion einzunehmen scheint. Da es nach Gabe von Letrozol zu einer Zunahme des ER- β kommt, müsste folglich die Herabregulation verstärkt sein. Fester et al. (2013) stellten in hippocampalen Zellkulturen eine Herabregulation von Synaptopodin nach Letrozolgabe fest. Zudem zeigten sie einen additiven Effekt der Regulation bei gemeinsamer Gabe von Letrozol und Östradiol. Außerdem kam es in Aromatase-KO-Mäusen zu einer Abnahme der Synaptopodinexpression im Vergleich zum Wildtyp (Fester et al., 2013). Dies steht im Widerspruch zu der hier gezeigten Heraufregulation von Synaptopodin

nach Letrozolgabe. Dieser Widerspruch könnte durch die unterschiedlichen methodischen Ansätze begründet sein. Im Gegensatz zu Zelldispersionskulturen sind in Slicekulturen die Zellkontakte und der Gewebeverband erhalten. In Slicekulturen könnte vielmehr eine Reduktion der *de-novo* Östradiolsynthese zum Tragen kommen. So könnte die Abnahme von Synaptopodin durch eine vermehrte Expression von ER- β verhindert werden, wenn die Östradiolkonzentration in der Slicekultur stark vermindert ist. Stattdessen könnte es zu einer entgegengesetzten Regulation von Synaptopodin kommen. Eine parakrine Regulation durch Östrogene könnte hier eine besondere Rolle bei der Regulation von Synaptopodin spielen, während in Zelldispersionskulturen eher autokrine Vorgänge dominierten. Zudem war die Behandlungsdauer in den Versuchen unserer Arbeitsgruppe kürzer. Während zunächst durch eine Veränderung der ER-Expression Letrozol zu einer Abnahme über den ER- β führt, könnte bei längerer Unterdrückung der *de-novo* Östradiolsynthese die Wirkung des ER- β ausbleiben und so ein Anstieg der Synaptopodinexpression entstehen. Tatsächlich hat die Dauer der Stimulation mit Letrozol einen bedeutsamen Einfluss. Versuche mit Letrozol an ovariectomierten Mäusen *in-vivo* zeigten eine Abnahme von Synaptophysin nach 7-tägiger Letrozolbehandlung. Nach 4-wöchiger Behandlung kam es hingegen zu einer entgegengesetzten Zunahme der Synaptophysinexpression in CA1. Das gleiche Phänomen konnte auch bei der Untersuchung eines weiteren synaptischen Proteins namens Spinophilin festgestellt werden (Zhou et al., 2010). Auch für Synaptopodin könnte die Stimulationsdauer eine wichtige Variable darstellen. Während die Regulation der Synaptopodinexpression nach Letrozolgabe also weitere Fragen aufwirft, konnten für die Beteiligung der ERs neue Erkenntnisse gewonnen werden. So erfolgt eine Regulation der Synaptopodinexpression vermutlich über den ER- β , während der ER- α eine wichtige regulatorische Funktion zu besitzen scheint. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für die Beteiligung beider ERs beim Einfluss von *de-novo* Östrogenen auf die Synaptophysin- und Synaptopodinexpression.

5.5 siRNA gegen ER- α und ER- β führt *in-vitro* zum Zelltod von hippocampalen Zelldispersionskulturen

Um die Wirkung von ERs *in-vitro* weiter untersuchen zu können, wurde siRNA gegen ER- α und ER- β hergestellt. Short interfering RNA (siRNA, auch silencer RNA) gehört zu der Gruppe von small RNA und blockiert die Synthese auf mRNA-Ebene, indem sie Ziel-RNA durch Slicing herunterreguliert (Jinek und Doudna, 2009). siRNA kann in Kulturzellen von Säugetieren induziert werden, um Gene auszuschalten (Elbashir et al., 2001). Zudem konnte siRNA sogar *in-vivo* in Organe verbracht werden (Lewis et al., 2002).

Die siRNA konnte für beide ERs erfolgreich hergestellt werden. Die Transfektion führte jedoch zum Untergang der Zelldispersionskultur. Während sowohl ER- α -KO- als auch ER- β -KO-Mäuse lebensfähig sind, könnte *in-vitro* bei Verwendung von Zelldispersionskulturen eine Ausschaltung eines der ER-Subtypen bereits verheerend sein. Sollte die Regulation der ERs auf mRNA-Ebene tatsächlich wiederholt einen Zelltod induzieren, so würde dies bedeuten, dass sowohl der ER- α als auch der ER- β nicht nur für synaptische Plastizität, sondern auch für das Fortbestehen von hippocampalen Neuronen *in-vitro* essentiell ist. So könnten die ERs wichtige Regulationsfunktionen beispielweise bei Apoptosevorgängen übernehmen. Tatsächlich sind Östrogene neuroprotektiv. So konnten neuroprotektive Funktionen von Östrogenen u.a. bei Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Schlaganfällen festgestellt werden. Dabei sind sie auch an Apoptosemechanismen beteiligt. Für beide ERs konnte eine Beteiligung bei Neuroprotektivität gezeigt werden (Azcoitia et al., 2011). Das im Rahmen dieser Arbeit aufgetretene Phänomen könnte von großer Bedeutung sein. Es sollte in weiteren Experimenten bestätigt und weiter untersucht werden.

5.6 ER-Heterodimere

Die Tatsache, dass ERs neben ER-Homodimeren auch ER-Heterodimere bilden und diese ebenfalls an ERE binden, sollte bei der Regulation synaptischer Plastizität berücksichtigt werden. ER-Heterodimere würden in ER- α -KO-Mäusen nicht mehr zustande kommen. Während ER-Antagonisten vermutlich auch Heterodimere beeinflussen würden, ist zu vermuten, dass ER-Agonisten auf ER-Heterodimere keinen signifikanten Einfluss besitzen, da sie nur einen der an Heterodimerbildung beteiligten ERs stimulieren würden. Dies würde die signifikante Wirkung der ER-Antagonisten auf die Spinesynapsendichte gegenüber einer insignifikanten Wirkung von ER-Agonisten erklären. Die Möglichkeit einer Beteiligung von ER-Heterodimeren bei östrogen-induzierter synaptischer Plastizität ist somit möglich. Ein Studiendesign zum Beweis oder Ausschluss einer Beteiligung von ER-Heterodimeren wäre hier sinnvoll.

5.7 Cytosolische Signalkaskaden und membrangebundene ERs

Neben den klassischen ERs gibt es membrangebundene ERs. Im Gehirn konnte eine Wirkung von Östrogenen über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren gezeigt werden (Becker, 1999). Der G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR30 konnte immunhistochemisch im Hippocampus nachgewiesen werden und scheint die intrazelluläre Calciumkonzentration zu beeinflussen (Brailoiu et al., 2007). Somit könnte auch der GPR30 als membrangebundener ER synaptische Plastizität beeinflussen. Eine schnelle Wirkung von Östrogenen auf MAP-Kinasen wird zudem im Brustgewebe über den GPR30 vermittelt (Filardo et al., 2000). Auf Spines konnte jedoch unter Verwendung eines GPR30-Agonisten keine Auswirkung des GPR30 gezeigt werden (Mukai et al., 2007).

Bei der Östrogenwirkung auf synaptische Plastizität muss zwischen schnellen und langsamen Effekten unterschieden werden. Nach Östradiolgabe ist eine Veränderung synaptischer Ströme bereits nach drei Minuten messbar. Dies ist nicht nur im Wildtyp sondern auch in ER- α -KO-Mäusen festzustellen. Die gleichzeitige Antagonisierung beider ERs zeigte dabei keinen Einfluss (Gu et al., 1999). Es könnten also schnelle, nicht-genomische Effekte durch Östrogene unabhängig von ERs stattfinden. Bezüglich Spines sind die an synaptischer Plastizität beteiligten Rho-GTPasen von Interesse. Rho-GTPasen sind intrazelluläre Signalmoleküle und werden von Calcium über Tyrosinkinasen beeinflusst. Rho-GTPasen sind bei der Regulierung des Aktin-Cytoskeletts beteiligt. Sie hemmen die Aktindepolymerisierung dabei über Cofilin (Lamprecht und LeDoux, 2004). Letrozol hat wiederum Auswirkungen auf die Phosphorylierung von Cofilin (Vierk et al., 2012). Somit könnten auch schnelle Prozesse Spines beeinflussen.

Ist eine Beteiligung der ERs bei dieser schnellen Regulation auszuschließen? Zwar spricht eine schnelle Regulation der Signalkaskaden gegen eine Regulation über die ERs, jedoch gibt es Hinweise, dass ERs wie der ER- α auch nicht-genomische Effekte beeinflussen (Fugger et al., 2001). Zudem bilden ERs Komplexe mit Signalproteinen (Singh et al., 1999). Der ER- α phosphoryliert MAP-Kinasen und könnte darüber auch Spines beeinflussen (Hojo et al., 2011). Tatsächlich verändern auch ERs synaptische Übertragung rasant, wie eine Studie mit ER-Agonisten zeigte. Dabei konnte für ER- α - und ER- β -Agonisten ein entgegengesetzter Effekt festgestellt werden (Mukai et al., 2007). Neben der Wirkung von ERs an EREs gibt es somit Hinweise für eine schnelle Wirkung der ERs. Diese Effekte könnten auch ohne Dimerisierung der ERs zustande kommen. Eine Blockade der Dimerisierung der ERs durch den ER-Antagonisten ICI hatte keine Auswirkung auf diese schnelle Modulation durch Östradiol. Hingegen wirkt sich die Blockade der ER-Dimerisierung durch ICI auf Spines und Spinesynapsen aus (Mukai et al., 2007; Fester et al., 2009a). Auch auf Synaptophysin hat ICI Auswirkungen. Zudem ist die veränderte Synaptophysinexpression sowie eine Änderung der Synaptopodinexpression nach Östradiolgabe erst nach 24 Stunden sichtbar, was für einen genomischen Effekt spricht (Fester et al., 2009b).

Es scheinen also zum einen schnelle Effekte der Östrogene auf intrazelluläre Signalkaskaden und synaptische Potenzierung über klassische ERs zu existieren, eventuell auch über membrangebundene ERs. Zum anderen gibt es langsame Effekte über die genomische Wirkung der ERs auf die Synthese von synaptischen Proteinen, auf Spines und auf die Spinesynapsendichte. In dieser Arbeit wurden diese langsamen Auswirkungen untersucht. Allerdings würden ER-Antagonisten vermutlich auch Effekte nicht-dimerisierter ERs beeinflussen. Daher ist nicht auszuschließen, dass auch die schnellen Effekte einen Einfluss auf die Ergebnisse besitzen. Die Wirkung von ERs auf intrazelluläre Signalkaskaden sollte weiter untersucht werden um einen Einfluss auch auf Spinesynapsen und synaptische Proteine zu zeigen oder zu widerlegen.

5.8 Sowohl der ER- α als auch der ER- β sind bei synaptischer Plastizität beteiligt

Beide ERs sind bei der Beeinflussung synaptischer Plastizität durch Östrogene beteiligt. Auch wenn einige Studien eine stärkere Beteiligung eines ERs vermuten lassen, so sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine essentielle Beteiligung beider Rezeptoren. In einer neueren Studie mit ER- α -KO- und ER- β -KO-Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass Östradiol wichtige Signalpfade bei synaptischer Plastizität über beide ERs beeinflusst (Spencer-Segal et al., 2012).

Für die in dieser Arbeit gewählten Parameter synaptischer Plastizität konnte durch die vorliegenden Ergebnisse eine Beteiligung beider ERs gezeigt werden. Während die Spinesynapsendichte und die Synaptophysinexpression von beiden ERs gleichermaßen reguliert werden, wirken die ERs bei der Regulation der Synaptopodinexpression entgegengesetzt.

6. Zusammenfassung

Vorausgegangene Untersuchungen des Instituts für Neuroanatomie haben gezeigt, dass die lokale Östrogensynthese im Hippocampus für die Aufrechterhaltung der Synapsendichte eine essentielle Rolle spielt. In der vorliegenden Dissertation sollte geklärt werden, welche Östrogenrezeptor-Subtypen, die beide ubiquitär im Hippocampus exprimiert werden, für die Synapsenbildung verantwortlich sind. Im ersten Versuch sollte nach Knockdown der beiden Östrogenrezeptor-Subtypen ER- α und ER- β mittels siRNA die Beeinflussung des Knockdowns auf synaptische Proteine hin untersucht werden. Dieses Experiment gelang nicht, weil die Zellen nach der Transfektion nach kurzer Zeit starben.

Daraufhin kamen spezifische Antagonisten für den ER- α und ER- β zum Einsatz. Nach Behandlung hippocampaler Schnittkulturen mit dem Antagonisten gegen den ER- α (MPP) oder den Antagonisten gegen den ER- β (PHTPP), wurde die Spinesynapsendichte bestimmt. Die stereologische Auszählung der Spinesynapsen ergab nach Behandlung in beiden Fällen eine Herunterregulation. Dieser Befund ließ den Schluss zu, dass offensichtlich beide Östrogenrezeptor-Subtypen bei östrogen-induzierter synaptischer Plastizität eine Rolle spielen. Bei der Untersuchung synaptischer Proteine war im Falle des präsynaptischen Markers Synaptophysin ebenfalls bei beiden Antagonisten eine Herunterregulation festzustellen. Dagegen zeigte sich bei der Untersuchung des postsynaptischen Proteins Synaptopodin nach Blockade des ER- α durch MPP eine Herunterregulation, während nach Blockade des ER- β eine tendenzielle Heraufregulation zu beobachten war.

Vor dem Hintergrund einer rezent postulierten alleinigen Rolle des ER- β bei östrogen-induzierter Synapsenbildung wurden ovariectomierten ER- α -Knock-out-Mäuse mit Östradiol behandelt. Bei alleiniger Beteiligung des ER- β bei östrogen-induzierter Synapsenzunahme, wie in der Literatur beschrieben, sollte man in der ER- α -Knockout-Maus eine unveränderte Spinezunahme erwarten. Es kam jedoch nicht zu einer Zunahme der Spinesynapsendichte, sodass auch nach diesem Experiment davon auszugehen ist, dass beide Östrogenrezeptor-Subtypen bei östrogenvermittelter Regulation der Synapsendichte im Hippocampus eine Rolle spielen.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| AF | Aktivierungsfunktion |
| al. | alii, aliae alia |
| Ar | Aromatase |
| AR | Androgen-Rezeptor |
| ATPase | Adenosintriphosphatase |
| BBS | BES-buffered solution |
| BES | N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid |
| Best.-Nr. | Bestellnummer |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| C | Cytosin |
| CA | Cornu ammonis |
| cAMP | zyklisches Adenosin-Monophosphat |
| Cy3 | Fluoreszenzfarbstoff |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride |
| DDSA | 2-Dodecanylsuccinic acid anhydride |
| dest. | destillata |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNAse | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| DPN | Diarylpropionitrile |
| dsDNA | Doppelstrang-DNA |
| E 18 | Embryonenstadium 18 |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EM | Elektronenmikroskop(isch) |
| ER(s) | Östrogenrezeptor(en) |
| ERE | Östrogen-Rezeptor-Response-Element |
| ES | Embryonale Stammzelle |
| F-Aktin | polymerisiertes Aktin |
| F(ab) ² | Fragment antigen binding |
| FSH | Follikel-stimulierendes Hormon |
| G | Guanin |
| G- | Guaninnucleotid-bindendes |
| GABA | Gamma-amino-Butter-Säure |
| GC | Guanin-Cytosin Content |
| Glu | Glutamat |
| GnRH | Gonadotropin Releasing Hormon |
| GPR30 | G protein-coupled receptor 30 |
| GFP | grün-fluoreszierendes Protein |

| | |
|-----------|--|
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GTPase | Guanosintriphosphatase |
| HBSS | Hank's Balanced Salt Solution |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt |
| HPSF | High-purity-salt-free |
| HSD | Hydroxysteroiddehydrogenase |
| Hyb | hybridization |
| ICI | 7 α ,17 β -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol |
| Int. | integrated |
| Ig | Immunglobulin |
| IPSP | Inhibitorisch-Post-Synaptisches-Potential |
| KO | Knockout |
| LH | lutinisierendes Hormon |
| LSD | Least Significant Difference |
| LSM | Laser-scanning-microscope |
| LTD | Langzeitdepression |
| LTP | Langzeitpotenzierung |
| MAPK | Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase |
| Max. | maximal, maximum |
| MEM | Minimum Essential Media |
| MNA | Methanylnadic anhydride |
| Min. | minimal, minimum |
| MPP | 1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinyloxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride |
| mRNA | messenger RNA |
| MW | molecular weight |
| N | Größe der Stichprobe |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NGS | Normal goat serum |
| NMDA | N-methyl-D-aspartat |
| No. / Nr. | Nummer |
| NR | NMDA-Rezeptor Untereinheit |
| OD | optische Dichte |
| p | p-Wert (probability value) |
| p450 | Pigment 450 |
| PASW | Predictive analysis software (ehemals SPSS) |
| PBS | Phosphat buffered saline |
| PC-12 | Zelllinie (von pheochromocytoma) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| PPT | 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol |
| PSD | postsynaptische Verdichtung |

| | |
|----------------|---|
| PHTPP | 4-[2-Phenyl-5,7- <i>bis</i> (trifluoromethyl) pyrazolo [1,5- <i>a</i>]pyrimidin-3-yl]phenol |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | Ribonuklease |
| RPM | rounds per minute |
| scc | side-chain-cleavage |
| SEM | Standard error of the mean |
| siRNA | short interfering RNA |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences |
| St. | stratum |
| StAR | Steroidogenic Acute Regulatory Protein |
| T | Thymin |
| T7 | T7 bacteriophage |
| TE | Tris-EDTA |
| T _m | Temperatur |
| UV | ultraviolett |
| u.a. | unter anderem |
| v.a. | vor allen / vor allem |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

8. Literaturverzeichnis

Abdelgadir S E, Resko J A, Ojeda S R, Lephart E D, McPhaul M J, Roselli, C E (1994) Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 135:395–401.

Adams S M, Aksenova M V, Aksenov M Y, Mactutus C F, Booze R M (2010) ER- β mediates 17 β -estradiol attenuation of HIV-1 Tat-induced apoptotic signaling. *Synapse* 64:829-838.

Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, Reiser J, Mundel P (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. *The Journal of Clinical Investigation* 115:1188–1198.

Azcoitia I, Arevalo M-A, De Nicola A F, Garcia-Segura L M (2011) Neuroprotective actions of estradiol revisited. *Trends in endocrinology and metabolism* 22:467-473.

Baulieu, E E, Robel P (1990) Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Molec Biol* 37:395–403.

Bear M F, Connors B W, Paradiso M A, Engel A (Herausgeber) (2009) *Neurowissenschaften*. Heidelberg: Springer

Becker J B (1999) Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 64:803–812.

Benninghoff & Drenckhahn (2004) *Anatomie, Band 2*. München: Elsevier

Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson D L, Huntley G W (2000) Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-Cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 28:245–259.

Brændgaard H, Gundersen H J G (1986) The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* 18:39-78.

Brailoiu E, Dun S L, Brailoiu, G C, Mizuo K, Sklar L A, Oprea T I, Prossnitz ER, Dun N J (2007) Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *Journal of Endocrinology* 193:311–321.

Burstein H J, Prestrud A A, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz T A, Davidson N E, Gelmon K E, Giordano S H, Hudis C A, Malin J, Mamounas E P, Rowden D, Solky A J, Sowers M R, Stearns V, Winer E P, Somerfield M R, Griggs J J (2010) American society of clinical oncology clinical practice guideline : update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor–positive breast cancer. *J Clin Oncol* 28:3784-3796.

Compton D R, Sheng S, Carlson K E, Rebacz N A, Lee I Y, Katzenellenbogen B S, Katzenellenbogen J A (2004) Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor β antagonist activity. *J Med Chem* 47:5872-5893.

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

Corpéchet C, Synguelakis M, Talha S Axelson M, Sjövall J, Vihko R, Baulieu E E, Robel P (1983) Pregnenolone and its Sulfate Ester in the Rat Brain. *Brain research* 270:119–125.

Couse J F, Korach K S (1999) Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine reviews* 20:358-417.

Cowley S M, Hoare S, Mosselman S, Parker M G (1997) Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 272:19858 –19862.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua S A, Jordan V C, Katzenellenbogen J A, Korach K S, Maggi A, Muramatsu M, Parker M G, Gustafsson J A (2006) International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological Reviews* 58:773–781.

Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson J A (2000) Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors α and β . *Molecular Pharmacology* 58:584–590.

Deller T, Merten T, Roth S U, Mundel P, Frotscher M (2000) Actin-Associated Protein Synaptopodin in the Rat Hippocampal Formation: Localization in the Spine Neck and Close Association With the Spine Apparatus of Principal Neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 181:164 –181.

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

Donzelli A, Braida D, Finardi A, Capurro V, Valsecchi A E, Colleoni M, Sala M (2010) Neuro-protective effects of genistein in mongolian gerbils: estrogen receptor- β involvement. *J Pharmacol Sci* 114:158-167

Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.

Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang Y H, Franz S, Delfgaauw J, Chang J R, Choi H Y, Campbell K, Kim K, Reiser J, Mundel P (2008) The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nature Medicine* 14:931–938.

Fester L, Ribiero-Guiveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M Jarry H, Rune G M (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *Journal of neurochemistry* 97:1136–1144.

Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune G M (2009a) 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 G M (2009b) The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology* 34S: S123–S129.

Fester L, Labitzke J, Hinz R, Behem C, Horling K, Bernhard T, Bader M, Vollmer G, Rune G M (2013) Estradiol responsiveness of synaptopodin in hippocampal neurons is mediated by estrogen receptor β . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 138:455-461.

Fifková E, Markham J A, Delay, R J (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Research* 266:163–168.

Filardo E J, Quinn J A, Bland K I, Frackelton Jr A R (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the g protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via *trans*-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endo* 14:1649-1660.

Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847–854.

Förster E, Bartos M, Zhao S (2005) Hippocampal slice cultures. In: *New methods for culturing cells from nervous tissues* (Poindron P, Piguet P, Förster E, eds), pp 1-11 Basel: Karger.

Frotscher M, Heimrich B (1993) Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10400-10430.

Fugger H N, Kumar A, Lubahn D B, Korach K S, Foster T C (2001) Examination of estradiol effects on the rapid estradiol mediated increase in hippocampal synaptic transmission in estrogen receptor α knockout mice. *Neuroscience letters* 309:207-209.

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-450_{scc} (CYP XIA1), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 71:2231–2238.

Gould E, Woolley C S, Frankfurt M., McEwen BS (1990) Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *The Journal of Neuroscience* 10: 1286–1291.

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

Gu Q, Korach K S, Moss R L (1999) Rapid action of 17 β -estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology* 140:660-666.

Harrington W R, Sheng S, Barnett D H, Petz L N, Katzenellenbogen J A, Katzenellenbogen B S (2003) Activities of estrogen receptor α - and β -selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 206:13-22.

Harris M, Jensen F E, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience* 12:2685–2705.

Harris K M (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology* 9:343–348.

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

Hösli E, Hösli L (1999) Cellular localization of estrogen receptors on neurones in various regions of cultured rat CNS: coexistence with cholinergic and galanin receptors. *Int J Devl Neuroscience* 17:317–30.

Hojo Y, Hattori T A, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H T, Mukai H, Morrison J H, Janssen W G M, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *PNAS* 101:865–870.

Hojo Y, Higo S, Kawato S, Hatanaka Y, Ooishii Y, Murakami G, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Muaki H, Kimoto T (2011) Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity. *Frontiers in Endocrinology* 2:1–17.

Janz R, Südhof T C, Hammer R E, Unni V, Siegelbaum S A, Bolshakov V Y (1999). Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24:687–700.

Jelks K B, Wylie R, Floyd C L, McAllister A K, Wise P (2007) Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor α . *The Journal of Neuroscience* 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. *Psycho-Oncology* 13:61–66.

Jinek M, Doudna J A (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery RNA interference. *Nature* 457:405-412.

Jones EG, Powell T P S (1969) Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J Cell Sci* 5:509–529.

Kalita K, Szymczak S, Kaczmarek L (2005) Non-nuclear estrogen receptor α and β in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus* 15:404–412.

Kelly M J, Lagrange A H, Wagner E J, Rønnekleiv O K (1999) Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids* 64:64–75.

Kim H J, Casadesus G (2010) Estrogen-mediated effects on cognition and synaptic plasticity: What do estrogen receptor knockout models tell us? *Biochimica et Biophysica Acta* 1800:1090-1093.

Kreienberg R et al. (2012) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 3.0. Aktualisierung 2012. AWMF-Register-Nummer 032-045OL.

Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune G M (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 5913–5921.

Kronenberg (2011) *Williams Textbook of Endocrinology*, Philadelphia, PA: Elsevier

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

Kuiper G G J M, Gustafsson J A (1997) The novel estrogen receptor- β subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Letters* 410: 87–90.

Lagrange A H, Rønnekleiv O K, Kelly M J (1997) Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Molecular Pharmacology* 51:605–612.

Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience* 5:45–54.

Lewis D L, Hagstrom J E, Loomis A G, Wolff J A, Herweijer H (2002) Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nature genetics* 32:107-108.

Liu F, Day M, Muñiz L C, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis R F, Navarra R, Hirst W D, Reinhart P H, Marquis K L, Moss S J, Pangalos M N, Brandon N J (2008) Activation of estrogen receptor- β regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nature neuroscience* 11:334–343.

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

Lubahn D B, Moyer J S, Golding T S, Couse J F, Korach K S, Smithies O (1993) Alterations of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11162-11166.

McEwen B S, Tanapat P, Weiland N G (1999) Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. *Endocrinology* 140:1044-1047.

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

Mullany P, Lynch M A (1997) Changes in protein synthesis and synthesis of the synaptic vesicle protein, synaptophysin, in entorhinal cortex following induction of long-term potentiation in dentate gyrus: an age-related study in the rat. *Neuropharmacology* 36:973–980.

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

Murata T, Narita K, Honda K, Higuchi T (2003) Changes of receptor mRNAs for oxytocin and estrogen during the estrous cycle in rat uterus. *J Vet Med Sci* 65:707–712.

Naftolin F, Ryan K J, Petro Z (1971) Aromatization of androstenedione by limbic tissue from human fetuses. *J Endocr* 51:795–796.

Österlund M K, Hurd Y L (2001) Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders. *Progress in Neurobiology* 64:251–267.

Okubo-Suzuki R, Okada D, Sekiguchi M, Inokuchi K (2008) Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosc* 38:266–276.

Peters A, Kaiserman-Abramof I R (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127:321–356.

Pettersson K., Grandien K, Kuiper G G J M, Gustafsson J A (1997). Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Mol Endo* 11:1486–1496.

Pillai S B, Jones J M, Koos R D (2002) Treatment of rats with 17β -estradiol or relaxin rapidly inhibits uterine estrogen receptor β 1 and β 2 messenger ribonucleic acid levels. *Biology of Reproduction* 67:1919–1926.

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune G M (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13:226–234.

Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune G M (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16:464–471.

Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune G M (2008) Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *The Journal of cell biology* 180:417–26.

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

Ramon y Cajal S R (1899). *Texture of the nervous system of man and the vertebrates* Vol. I-III. New York, Springer

Ramon y Cajal S R (1909). *Histologie du Système nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Paris, Maloine

Rissman E F, Heck A L, Leonard J E, Shupnik M A, Gustafsson J-Å (2002) Disruption of estrogen receptor β gene impairs spatial learning in female mice. *PNAS* 99:3996-4001.

Rune G M, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M (2002) Estrogen up-regulates estrogen receptor α and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113:167–175.

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

Sanghera M K, Simpson E R, McPhaul M J, Kozlowski G, Conley A J, Lephart E D (1991) Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology* 129:2834–44.

Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube R E (2009) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162:234–43.

Schwartz L B, Krey L, Demopoulos R, Goldstein S R, Nachtigall L E, Mittal K (1997) Alterations in steroid hormone receptors in the tamoxifen-treated endometrium. *Am J Obstet and Gynecol* 176:129–137.

Shughrue P J, Merchenthaler I (2000) Estrogen is more than just a “sex hormone”: novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21:95–101.

Singer C A, Figueroa-Masot X A, Batchelor R H, Dorsa D M (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 19:2455–2463.

Singh M, Sétáló Jr G, Guan X, Warren M, Toran-Allerand C D (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *The Journal of Neuroscience* 19:1179–1188.

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

Spencer-Segal J L, Tsuda M C, Mattei L, Waters E M, Romeo R D, Milner T A, McEwen B S, Ogawa S (2012) Estradiol acts via estrogen receptors α and β on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience* 202:131–46.

Südhof T C, Jahn R (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6:665–677.

Sun J, Huang Y R, Harrington W R, Sheng S, Katzenellenbogen J A, Katzenellenbogen B S (2002) Antagonists selective for estrogen receptor α . *Endocrinology* 143:941-947.

Thiantanawat A, Long B J, Brodie A M (2003) Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 63:8037-8050.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays* 26:445–53.

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

Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune G M (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of neurochemistry* 76:1879–1886.

Woolley C S, Gould E, Frankfurt M., McEwen B S (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* 10:4035–4039.

Woolley C S, McEwen B S (1992) Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *The Journal of Neuroscience* 12:2549–2554.

Xiao C W, Goff A K (1998) Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 115:101–109.

Yamazaki M, Matsuo R, Fukazawa Y, Ozawa, F, Inokuchi K (2001) Regulated expression of an actin-associated protein, synaptopodin, during long-term potentiation. *Journal of Neurochemistry* 79:192–199.

Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24:1071–1089.

Zhong Y-Q, Li K-C, Zhang X (2010) Potentiation of excitatory transmission in substantia gelatinosa neurons of rat spinal cord by inhibition of estrogen receptor α . *Molecular Pain* 6:1-5.

Zhou L, Lehan N, Wehrenberg U, Disteldorf E, von Lossow R, Mares U, Jarry H, Rune G M (2007) Neuroprotection by estradiol: A role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA_A receptors. *Experimental neurology* 203:72–81.

Zhou L, Fester L, von Blittersdorf B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegschneider K, Rune G M (2010) Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology* 151:1153–60.

9. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Professor Rune für die Möglichkeit bedanken, ein so spannendes Thema bearbeiten zu dürfen. Vielen Dank für Ihre Unterstützung und die herzliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt weiter meinen Betreuern Lars Fester und Lepu Zhou, die mich stets unterstützt haben und mir sowohl in theoretischen als auch in praktischen Belangen mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen Dank für die vielen Gespräche.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Bettina Kruck, Helga Herbort und Brigitte Asmus bedanken, die mich stets in technischer Hinsicht beraten und unterstützt haben. Bettina Kruck danke ich zudem für die vielen herzlichen Ratschläge.

Mein Dank gilt zudem dem gesamten Team des Instituts für Anatomie I. Ich habe mich immer willkommen gefühlt und durch das angenehme Arbeitsklima hatte ich eine sehr schöne Zeit im Institut.

Auch möchte ich Herrn Beck-Bornholdt danken, der durch seine Seminare und Vorträge viele Doktoranden unterstützt.

Bei Armin Meyer zur Capellen möchte ich mich für sein offenes Ohr bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern für Ihre Unterstützung, Katharina Behem für Ihre Hilfe bei der Korrektur, Bolko Rachow für die rechtliche Beratung und natürlich meiner Freundin Alena Rachow für die Begleitung durch diese Zeit.

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift:

Christoph R. Behem