

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin

Aus dem Institut für Neuroanatomie

Institutsdirektorin: Frau Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

**Die Beteiligung der Östrogenrezeptor
Untereinheiten Alpha und Beta bei
östrogeninduzierter Synaptogenese im
Hippocampus**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Xenia de Vrese

Hamburg, 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.09.2015**

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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in folgender

Publikation: Journal of Neuroendocrinology, 2014, 26, 439–447, L.

Zhou, L. Fester, S. Haghshenas, **X. de Vrese** et al.,

Oestradiol-Induced Synapse Formation in the Female Hippocampus:
Roles of Oestrogen Receptor Subtypes

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

Vertreten durch PD Dr. rer. nat. Lars Feste

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter/in: Prof. Dr. Volkmar Müller

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Markus Glatzel

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Östrogene	2
1.1.1 Struktur	2
1.1.2 Biosynthese	3
1.1.3 Aromatase - Aromatasehemmer	3
1.1.4 Bedeutung von Östrogenen	6
1.1.5 Östrogenbildung im Gehirn	6
1.2 Östrogenrezeptoren (ER)	8
1.2.1 Bau und Funktion von ER α und ER β	8
1.2.2 Subzelluläre Lokalisierung und Shuttle von Östrogenrezeptoren	11
1.2.3 Mechanismen der rezeptorvermittelten Östrogenwirkung	12
1.3 Tiermodelle zur Untersuchung von Östrogenen und Östrogenrezeptoren	14
1.4 Östrogenrezeptor-Antagonisten	14
1.5 Der Hippocampus	16
1.5.1 Struktur und Lage	16
1.5.2 Funktionalität des Hippocampus	19
1.5.3 Östrogene und synaptische Plastizität	21
1.5.4 Lokalisierung	23
1.6 Fragestellung	24

2	Material und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Materialien und Geräte	25
2.1.2	Chemikalien	27
2.1.3	Software	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Herstellung von Lösungen	29
2.2.2	Versuchslösungen für Slicekulturen (<i>in vitro</i> -Experimente)	29
2.2.3	Medien (Gewebekulturen / Slicekulturen)	31
2.2.4	Gewebefixierung	33
2.2.5	Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie	34
2.2.6	Eingesetzte Tiere	36
2.2.7	Präparation der Hippocampi	37
2.2.8	Gewinnung der Hippocampi von KO-und Wildtypmäusen	38
2.2.9	Gewinnung der Rattenhippocampi und das Anlegen einer hippocampalen Slicekultur mit anschließender <i>in vitro</i> Fixierung	39
2.2.10	Elektromikroskopische Untersuchung der Hippocampusgewebe und Anfertigung von Bildern zur Analyse der synaptischen Plastizität	42
2.2.11	Synapsenzählung und Auswertung	43
3	Ergebnisse	50
3.1	Auswertung der <i>in vivo</i> Versuche an knockout Mäusen	50
3.2	Auswertung der <i>in vitro</i> Versuche mit Slicekulturen von Rattenhippocampi	52
4	Diskussion	62
4.1	Fragestellung und wichtigste Ergebnisse	62
4.2	Methodenkritik	63
4.3	Ergebnisdiskussion	65
4.3.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen an ER α und ER β -KOMäuse	65
4.3.2	<i>In vitro</i> Versuche mit hippocampalen Slicekulturen aus den Gehirnen neonataler weiblichen Ratten	70
5	Zusammenfassung	79

Literaturverzeichnis	81
Lebenslauf	99

Abbildungsverzeichnis

1.1	Östran und davon abgeleitete natürliche Östrogene	3
1.2	Östrogen-Biosynthese	4
1.3	Steroidale und nicht-steroidale Aromatasehemmer	6
1.4	Östrogenrezeptor Dimerisierung	9
1.5	Funktionelle Domänen der Östrogenrezeptoren	9
1.6	Mechanismen zur Regulation der Transkription von Genen durch Östrogenrezeptoren	13
1.7	Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Östro- genantagonisten	15
1.8	Vergleich eines menschlichen Hippocampus mit einem Seepferdchen	16
1.9	Lage und Architektur des Hippocampus	17
1.10	Schema Hippocampus mit Gyrus dentatus	19
1.11	Lage des Hippocampus im menschlichen Gehirn	20
2.1	Synapsenaufbau	44
2.2	Auswertung von EM Bildern	45
2.3	Bestimmung der Synapsendichte	47
3.1	Balkengrafik Synapsendichte Knockout Mäuse	53
3.2	Grafik Synapsendichte Slicekultur	57
3.3	Graphik Synapsendichte Slicekultur	59
3.4	Graphik Synapsendichte Slicekultur	59

Tabellenverzeichnis

1.1	Vorkommen der Östrogenrezeptor Untereinheiten α und β im Hippocampus bei adulten ovariectomierten Mäusen	10
2.1	Behandlung der Slicekulturen	40
3.1	Vergleich der Synapsendichten in der CA1-Region von rechtem und linkem Hippocampus aller untersuchten Kontroll-, ER α -KO- und ER β -KO-Mäuse	51
3.2	Anova & Kruskal der ER-KO-Mäuse	52
3.3	Slicekulturbehandlung mit dem Östrogenrezeptor Antagonisten ICI 182,780, Aromatasehemmer und Substratzugabe	56
3.4	Slicekulturbehandlung mit den Östrogenrezeptor Antagonisten MPP (α) und PHTPP (β), Aromatasehemmer und Substratzugabe	58
3.5	Anova & Kruskal der Rattenslicekulturen	60
3.6	Slicekultur mit ER β Antagonist (PHTPP) und Aromatasehemmer (Letrozol)	61
4.1	Entgegengesetzte Effekte von ER α und ER β im Hippocampus in den <i>in vivo</i> Versuchen	66
4.2	Einfluss von ICI 182,780 und Letrozol auf die Synaptogenese	73

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
AP1	Activator Protein 1
AR	Androgenrezeptor
3β-HSD	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
bzw.	Beziehungsweise
C19	Kohlenstoff-atom-19
CA	Cornu ammonis
CA1-4	Cornu Ammonis Region1-4
CYP	Cytochrom P
CYP19A1	Östrogensynth(et)ase, Aromatase, E.C.1.14.14.1
DBD	DNA-Bindungsdomäne
d.h.	Das heißt
DG	Gyrus dentatus
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMP30	2,4,6 Tris-(dimethylaminomethyl) phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Östron (Estron, amerikanisch Estrone)
E2	17 β -Östradiol (Estradiol)
E3	Östriol (Estriol)
EM	Elektronenmikroskopie, elektronenmikroskop(isch)
ER	Östrogenrezeptor (Estrogenrezeptor)
ERα	Östrogenrezeptor alpha
ERβ	Östrogenrezeptor beta
ERE	Östrogen-Responselemente

ER-K.O.-Maus	Östrogenrezeptor Knockout Maus
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FMN	Flavin mononucleotide, or riboflavin-5'-phosphate
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GABA	Gamma-aminobutyric acid, Gamma-Aminobuttersäure
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HBD	Hormon Bindungsdomäne
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution/ Salzlösung
HCl	Salzsäure
HHG-Achse	Hypothalamo-hypophysäre-gonadale Achse
HSP	Hitzeschockproteinen
ICI	ICI 182,780, 7 α , 17 β -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl) sulfinyl]nonyl] estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol
<i>in vivo</i>	Synonym: im lebenden Organismus
<i>in vitro</i>	Synonym: im Reagenzglas
KCl	Kaliumchlorid
KO	Knockout
ArKO	Aromatase knockout Mäuse
LH	Luteinisierendes Hormon
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation, Langzeitpotenzierung
LSD	Least Significant Difference
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein-Kinase
MEM	Minimal Essential Medium
MG	Massengewicht, Molekulargewicht
MPP	1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2 piperidinylethoxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phospha
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, ein spezifischer Transkriptionsfaktor

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ovx	Ovariectomiert
p	Signifikanzniveau
p	Propability value, p-Wert
p4	Vierter postnataler Tag
p5	Fünfter postnataler Tag
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PHTPP	4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl) pyrazolo [1,5-a]pyrimidin-3-yl] phenol
POR	P450-Oxidoreduktase
O2	Sauerstoff
o.g.	Oben genannte
RIA	Radioimmunoassay
®	Registered
Sec.	Section, Absatz
SEM	Standard error of the mean
SERMs	Selektive Östrogenrezeptor Modulatoren
SP1	Specificity protein 1
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
Tab.	Tabelle
Tfm	Testicular feminization
u.a.	Unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
tw.	Teilweise
v.a.	Vor allen / vor allem
ZNS	Zentrales Nervensystem, Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die östrogeninduzierte Synaptogenese setzt voraus, dass es im Hippocampus auch Östrogenrezeptoren (ER) gibt. Man unterscheidet zwischen den Östrogenrezeptoruntereinheiten Alpha und Beta (α und β). Um die Wirkung der *de novo* Östrogensynthese auf die Synapsenbildung zu verstehen, muss auch die Rolle der hippocampalen Östrogenrezeptoren verstanden werden.

Durch zahlreiche Untersuchungen ist belegt, dass Östrogen die Bildung postsynaptischer Spines fördert. In der Arbeitsgruppe Rune konnte gezeigt werden, dass hierbei das lokal, im Hippocampus synthetisierte Östrogen, die entscheidende Rolle spielt. Nach Hemmung der Aromatase, einem Enzym das den letzten Schritt der Östrogensynthese katalysiert, kommt es bei weiblichen Mäusen zu einem Synapsenverlust, einer Dephosphorylierung von Cofilin und einer Reduktion der Langzeitpotenzierung. Diese Phänomene konnten in der männlichen Maus nicht beobachtet werden. Dagegen konnte bei männlichen Tieren in einer rezenter Studie gezeigt werden, dass der Östrogenrezeptor β östrogeninduzierte Plastizität im männlichen Tier vermittelt, wobei vorausgegangene Untersuchungen am weiblichen Tier ergeben hatten, dass sehr wahrscheinlich beide Östrogenrezeptor Untereinheiten (α und β) an diesem Prozess beteiligt sind. Durch das Institut konnte gezeigt werden, dass nach vorausgehender Inhibition der Östrogensynthese, in hippocampalen Schnittkulturen, der Agonist für den Östrogenrezeptor α die Synaptogenese fördert und der Agonist für den Östrogenrezeptor β die Synaptogenese hemmt.

Vor diesem Hintergrund soll die Signalübertragung des Östrogens durch die Östrogenrezeptoren untersucht und herausgefunden werden, welche Bedeutung die Aktivität der Aromatase für die Östrogenrezeptor vermittelte Synapsenbildung hat. Die Stimulation der Aromataseaktivität soll dafür durch ein erhöhtes Substratangebot in hippocampalen Sliceukturen durch Behandlung mit Cholesterol erfolgen. Außerdem sollen an mit und ohne Cholesterol behandelten Sliceukturen

die beiden Antagonisten MPP und PHTPP für den Östrogenrezeptoren α und β sowie der Antagonist für beide, das ICI 182,780, zum Einsatz kommen. Des Weiteren sollen die entsprechenden Östrogenrezeptor α - und β -knockout (KO)-Mäuse auf ihre Synapsendichte im Hippocampus untersucht werden.

Vorausgegangene und parallel durchgeführte Untersuchungen am Institut für Neuroanatomie des UKE Hamburg haben gezeigt, dass die lokale Östrogensynthese im Hippocampus bei der Spino- und Synaptogenese eine essentielle Rolle spielt. Um die Wirkung des *de novo* synthetisierten Östrogens auf die Synapsenbildung zu verstehen, muss auch die Rolle der hippocampalen Östrogenrezeptoruntereinheiten Alpha und Beta (α und β) besser verstanden werden. Vor diesem Hintergrund soll von Knockout-Mäuse-Modellen und Slicekulturen die Signalübertragung des Östrogens durch die Östrogenrezeptoren anhand der Wirkung auf die Synapsenzahl in der Ca1 Region des Hippocampus untersucht werden.

1.1 Östrogene

1.1.1 Struktur

Östrogene (vom Griechischen *oíströs*: Stachel, Leidenschaft) sind die primären weiblichen Sexualhormone. Chemisch gesehen handelt es sich bei den natürlichen Östrogenen um Steroidhormone mit Östran (13 β -Methyl-gonan) als Grundgerüst. (Abb. 1.1a). Die wichtigsten natürlichen Östrogene sind das Östron, Östradiol und Östriol (Abb. 1.1b-d). Beim Östriol bzw. Östradiol besitzt der Pentan-(D-) Ring des Östrans eine oder zwei OH- Gruppen, beim Östron eine Ketogruppe. Nur Östradiol besitzt die volle Östrogenwirkung, während Östriol und Östron erst in dieses umgewandelt werden müssen.

1.1.2 Biosynthese

Ausgangssubstanz für die Synthese aller Steroidhormone und somit auch der (natürlichen) Östrogene ist das Cholesterol. Dieses wird über verschiedene Progestagene (21 C-Atome) und Androgene (19 C-Atome) in Androstendion und Testosteron überführt, welche schliesslich durch Umwandlung von Ring A des Östrans in eine Aromatenstruktur („Aromatisierung“) zu Östron bzw. Östradiol umgesetzt werden (Abb. 1.2).

Dieser letzte Schritt wird durch ein Enzym mit dem Namen Aromatase katalysiert. Ihre Aktivität in den Gonaden wird u.a. durch das Follikelstimulierende Hormon (FSH) induziert, so dass die Östrogenproduktion insgesamt zyklusabhängig erfolgt. Dagegen wird die Aromatase des Fettgewebes nicht durch das FSH induziert, und die extraovarielle Östrogensynthese verläuft kontinuierlich und unabhängig vom Menstruationszyklus. Die Synapsendichte im Hippocampus hängt ebenfalls von der lokalen Aromataseaktivität ab und wechselt im Verlauf des Menstruationszyklus. Diese Zyklusabhängigkeit resultiert wahrscheinlich aus der zyklischen GnRH Freisetzung [PRANGE-KIEL et al. (2008)]. Dabei spricht die fehlende Expression von GnRH-Rezeptor-mRNA für einen direkten Effekt von GnRH auf die Östrogensynthese.

1.1.3 Aromatase - Aromatasehemmer

Aromatase (Östrogensynthetase=Östrogensynthase; CYP19A1; siehe auch Abkürzungsverzeichnis; E.C. 1.14.14.1) ist ein zur Gruppe der Monooxygenasen

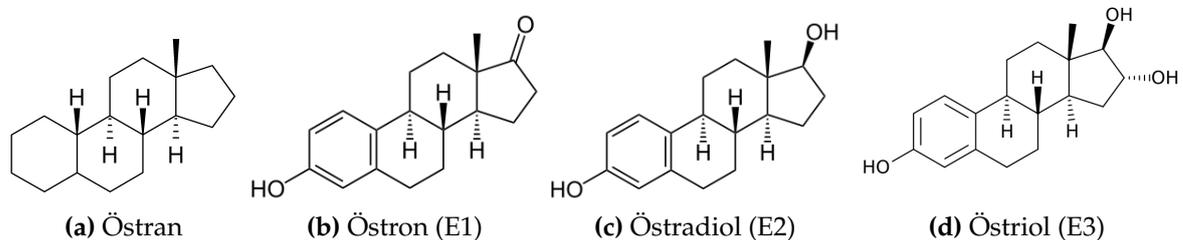


Abbildung 1.1 Östran und davon abgeleitete natürliche Östrogene.

Bildquelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Estrogene>

kodierenden und dem nicht-kodierenden Exon 1. Letzteres ist für die Regulation der verschiedenen Expressionsorte zuständig, indem gewebsspezifische Zytokine und Hormone an den entsprechenden Promotor auf Exon 1 binden und auf diese Weise die Expression der Aromatase in genau diesem Gewebe induzieren.

Expressionsorte sind vor allem die Ovarien von prämenopausalen Frauen, wo man die größte Aromatase-Aktivität und damit die höchste Östrogen-Produktion überhaupt findet, sowie Fettgewebs-, Leber-, Haut- und Brustzellen, die Nebennieren und das Gehirn [MARTEL et al. (1994); SIMPSON et al. (2002)]. Mäuse mit ausgeschaltetem Aromatase-(CYP19-A1-)Gen (Aromatase bzw. CYP19-A1-Gen knockout (ArKO) Mäuse) und somit fehlender Aromatase- und Östrogenproduktion sind ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Östrogenen an verschiedenen Expressionsorten. So werden weibliche Aromatase-KOMäuse zwar normal geboren, entwickeln dann aber einen männlichen Habitus und sind in der Regel unfruchtbar [FISHER et al. (1998)]. Weitere Folgen des ArKO sind Gehirndefekte, Gedächtnisstörungen, Autoimmunität mit Lymphozyten-Vermehrung, Verkleinerung des Thymus mit geringerer Zelldichte, Insulin-Resistenz, mit dem Altern ansteigende Adipositas, erhöhte Cholesteroll-, Blutlipoprotein- und Triglycerid-Werte, abnehmende Knochenlänge und -dichte, verringerte Aggression gegen männliche Störenfriede, aber verstärkte Aggressivität gegen paarungsbereite Weibchen [JONES et al. (2006)]. Dagegen werden Substanzen, die die Aktivität der Aromatase hemmen und dadurch die Bildung von Östrogenen im Muskel- und Fettgewebe blockieren (sogenannte Aromatasehemmer), bei postmenopausalen Frauen (oder Frauen mit operativ entfernten Eierstöcken) zur Therapie von hormonempfindlichem Brustkrebs eingesetzt. Bei Frauen vor den Wechseljahren wären die heute eingesetzten Aromatasehemmer wirkungslos, da die ovarielle Östrogenproduktion von ihnen nicht gehemmt wird. Bei den Aromatasehemmern unterscheidet man steroidale Inhibitoren und solche mit nicht-steroidaler Molekülgestalt. Steroidale Aromatasehemmer, von denen heute nur Exemestan® eingesetzt wird, wirken als kompetitive Substratanaloga, die vom Enzym aber nicht umgesetzt werden. Die nicht-steroidalen Aromataseinhibitoren (Letrozol®, Anastrozol®; Abb. 1.3) können mit einem basischen Stickstoffatom koordinativ an das Häm-Eisen der Aromatase binden und dadurch die Sauerstoffübertragung blockieren.

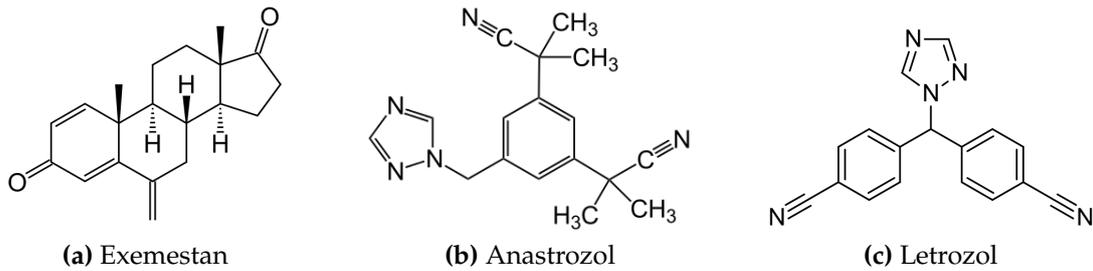


Abbildung 1.3 Steroidale (a) und nicht-steroidale (b, c) Aromatasehemmer.
 Bildquelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Exemestan>, Anastrozole, und Letrozol

1.1.4 Bedeutung von Östrogenen

Die klassischen Funktionen der Östrogene werden in erster Linie in Hinblick auf die weibliche Reproduktion definiert: Östrogene und speziell 17β -Östradiol, sind essentiell für die weibliche Fertilität, d.h. für Reifung und Funktion der weiblichen Reproduktionsorgane, für die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale und den weiblichen Zyklus, für Vorbereitung und Erhalt der Schwangerschaft sowie für die embryonale und fetale Entwicklung. Auch die Wirkungen von Östrogenen auf Thymus, Hypophyse, Haut, Leber, kardiovaskuläres System und Immunsystem sowie die meisten anderen ihrer physiologischen Effekte wie beschleunigter Stoffwechsel, Zunahme des Fettgewebes, Auffüllung der Calciumspeicher und Erhalt der Integrität des Skelettsystems (durch Steigerung der Kalziumabsorption und Verringerung der Kalziumausscheidung) dienen zumindest indirekt als Vorbereitung der Reproduktion. Darüberhinaus beeinflussen Östrogene die Stimmungslage im Menschen und das Fortpflanzungsverhalten von Labortieren.

1.1.5 Östrogenbildung im Gehirn

Östrogene findet man, zum Teil mit gänzlich anderen Funktionen, auch in anderen Organen, vor allem im Gehirn und speziell im Hippocampus. Dort sind sie in die Regulation der Synaptogenese involviert. Weitere Effekte üben Östrogene bei der prä- und postnatalen Hirnentwicklung aus und wirken, vermittelt durch direkte Effekte (Beeinflussung von Wachstumsfaktorsystemen, vaskulärer Funktionen, intrazellulärer Phosphorylierungsprozesse, antiapoptotischer Stoffwechselwege

und des Metabolismus freier Radikale, sowie Hemmung der Lipidperoxidation und der Sekretion Morbus Alzheimer-assoziiertes Proteine) oder über genomische Regulationsvorgänge, insgesamt neuroprotektiv. Dadurch, so wird spekuliert, könnten sie möglicherweise Entwicklung und Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen wie Demenz und Alzheimerkrankheit [STOPPE und VEDDER (2000)] ebenso wie die Prognose bei Epilepsie oder nach einem Schlaganfall [GARCIA-SEGURA und BALTHAZART (2009)] positiv beeinflussen. Die Beobachtung, dass die Östrogenkonzentration im Nervengewebe [BAULIEU und ROBEL (1990)] bzw. Hippocampus [HOJO et al. (2011)] um bis zum 6fachen höhere Werte erreichen kann als im Serum, der fehlende Abfall der Östrogenkonzentration im Gehirn nach Adrenektomie und Gonadektomie [CORPÉCHOT et al. (1983, 1981)] und Hinweise auf eine Östrogensynthese aus Cholesterol im Gehirn von Ratten [BAULIEU und ROBEL (1990)] legten den Schluss einer von endokrinen Organen unabhängigen Steroidsynthese im Nervengewebe nahe („Neurosteroid“). Inzwischen konnten auf mRNA- und/oder Proteinebene alle in die Östrogensynthese involvierten Enzymsysteme nachgewiesen werden wie StAR ; Cytochrom p450_{scc}, Cytochrom p450_{c17}, 17 β -HSD-I, 3 β -HSD-II und Aromatase (Baulieu und Robel 1990; Sanghera et al. 1991; Abdelgadir et al. 1994; Furukawa et al. 1998; Stoffel-Wagner 2001; Wehrenberg et al. 2001; Hojo et al. 2004). Der endgültige Nachweis der Aromatase-Aktivität im Hippocampus gelang PRANGE-KIEL et al. (2003)]. Sie konnten in dissoziierten Zellkulturen, aus hippocampalen Rattenzellen (95% Neuronen und 5% Oligodendrozyten), sowohl die neuronale Östrogensynthese als auch deren Hemmung durch einen Aromatasehemmer (Letrozol) zeigen. Auch im intakten Nervenzellverband (hippocampale Slicekulturen) wurde eine durch Letrozol hemmbare Östrogensynthese beobachtet [KRETZ et al. (2004)], während die Reduktion der Östrogensynthese nach Knockdown von StAR direkt die hippocampale de novo Östrogensynthese aus Cholesterol belegt [BENDER et al. (2010); FESTER et al. (2006)].

1.2 Östrogenrezeptoren (ER)

1.2.1 Bau und Funktion von ER α und ER β

Östrogene spielen bei vielen physiologischen Vorgängen und in den verschiedensten Organen und Geweben eine wichtige Rolle. In der Regel wirken sie dabei durch Bindung an spezifische Östrogenrezeptoren (estrogenreceptors; ER). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da es sich bei Östrogenen wie auch bei den anderen Steroidhormonen um relativ kleine, lipophile Moleküle handelt, die in praktisch jede Zelle diffundieren können. Ob Östrogene in einem bestimmten Zielorgan eine Wirkung ausüben, hängt somit vor allem davon ab, ob dessen Zellen Östrogenrezeptoren besitzen und welche [MORISSETTE et al. (2008)]. Von diesen Östrogenrezeptoren konnten bislang zwei Formen kloniert werden, nämlich die Östrogenrezeptoren α und β (ER α und ER β). Dabei beziehen sich die α und β auf die Reihenfolge der Entdeckung: ER α wurde 1986 [GREENE et al. (1986)], der ER β 1996 kloniert [KUIPER et al. (1996)]. Weitere ER wurden postuliert. Dabei unterscheiden sich ER α und ER β durchaus in ihrer Wirkung, wie z.B. die unterschiedlichen Phänotypen von ER α - und ER β -KO-Mäusen zeigen. Östrogenrezeptoren gehören als Steroidhormonrezeptoren zur Familie der nukleären Rezeptoren. Diese binden nach ligandenabhängiger Aktivierung direkt an spezifische DNA-Abschnitte im Bereich der Startsequenzen für die Transkription von Genen, üben also als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren eine genregulierende Funktion aus [BEATO et al. (1996)].

ER α und ER β liegen in der Zielzelle als Monomere vor, wo sie zusammen mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinen (intrazellulären Peptidyl-Prolyl-Isomerasen) einen Multiproteinkomplex bilden (Abb. 1.4). Sie besitzen jeweils sechs funktionelle Domänen A-F (Abb. 1.5). Die A-B-Domäne entspricht der hormonunabhängigen Transkriptions-Aktivierungsfunktion(AF)1. In der E-Domäne befindet sich die Transkriptions-Aktivierungsfunktion(AF)2, welche durch Östrogene (E2) oder synthetische Agonisten die Transkription der jeweiligen Zielgene aktivieren kann. Die C-Domäne korrespondiert mit der DNA-Bindungsdomäne (DBD), welche für die Bindung des Rezeptors an die ERE im Promoter der Zielgene verantwortlich ist. Die E-Domäne fungiert als Hormonbindungsstelle (HBD).

ER α und ER β stellen keine Splicing-Varianten sondern unabhängige Rezeptoren

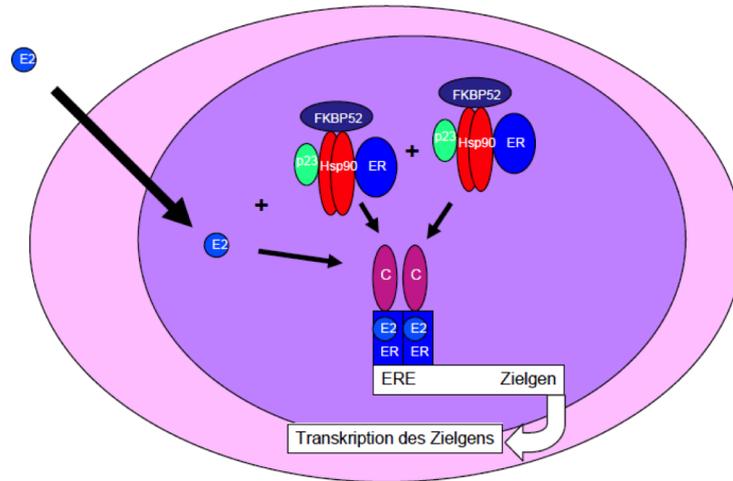


Abbildung 1.4 Klassisches Modell der Östrogenwirkung. Durch Ligandenbindung (E2) dissoziiert der Multiproteinkomplex. Die Östrogenrezeptoren (ER) bilden Dimere und aktivieren nach Bindung von Co-Faktoren (C) die Transkription.

Bildquelle: (Pfeiffer 2011 Fig.2)

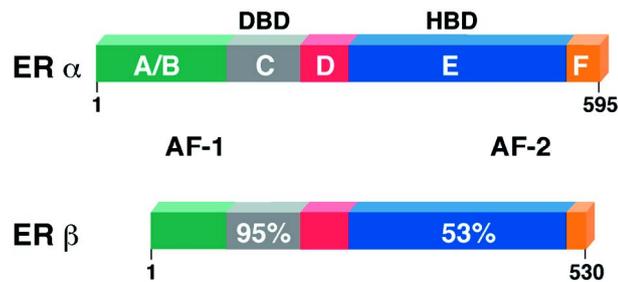


Abbildung 1.5 Funktionelle Domänen der ERs mit der DNA- Bindungsdomäne (DBD) und der Hormonbindungsdomäne (HBD).

Bildquelle: OSBORNE et al. (2000)

dar, die auf unterschiedlichen Genen lokalisiert sind. Sie weisen im Bereich der DNA-bindenden Domäne C beträchtliche Ähnlichkeiten auf: beim Menschen beträgt die Homologie 96%. Sie unterscheiden sich aber im Bereich der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und der C-terminalen Liganden-bindenden Domäne A (58%ige Homologie beim Menschen) [MOSELMAN et al. (1996)]. Osborne ([OSBORNE et al. (2000)]) nennt eine 95% und 53% Übereinstimmung. Wegen der wenig ausgeprägten Affinität des ER für Östrogene führen die Unterschiede in der A-Domäne nicht zu entsprechenden Unterschiede im Ligandenbindungsvermögen, d.h. ER α und ER β binden 17 β -Östradiol mit vergleichbarer Affinität [KUIPER et al. (1997)]. Die Verteilung bzw. relative Konzentration der beiden ER ist spezies-

	ER α	ER β
<u>Hippocampusformation–dorsal</u>		
CA1	+	Fibers
CA2	-/+	-
CA3	+	-/+
Stratum lucidum	+	Fibers
Gyrus dentatus (Hilus)	+	-/+
Subiculum	-	+
<u>Hippocampusformation–ventral</u>		
CA1–CA3	++	-+
Entorhinaler Cortex	-/+	+

Tabelle 1.1 Vorkommen der Östrogenrezeptor Untereinheiten α und β im Hippocampus adulter ovariectomierter Mäuse.

Bildquelle: Nach [MITRA et al. (2003)]

geschlechts- und gewebeabhängig. Bei der Ratte nimmt die Expression von ER α - bzw. ER β in folgender Reihenfolge ab [KUIPER et al. (1997)]:

ER α : Nebennieren > Niere > Eierstöcke > Hirnanhangdrüse > Hoden > Uterus,
ER β : Hoden > Uterus > Gehirn > Blase > Lunge > Eierstöcke > Prostata.

Bei der Maus [MITRA et al. (2003)] maßen Couse und Korach [COUSE et al. (1997)] die höchste Dichte an ER α in den Ovarien und der Prostata, signifikante Konzentrationen auch in der Brustdrüse, in verschiedenen Hirnregionen, im Knochen, dem kardiovaskulären System sowie in Lunge und Hypothalamus. Die höchsten ER β -Konzentrationen fanden die Autoren ebenfalls in den Ovarien, in der Prostata und im Uterus. Auch in Lunge und Hypothalamus ließ sich eine signifikante ER β -Expression nachweisen, während Brustgewebe und Hoden ER β -negativ waren. Die Verteilung von ER α und ER β in verschiedenen Regionen des Mäusehippocampus zeigt Tab. 1.1. Insgesamt erscheinen die Befunde zur Verteilung von ER α und ER β in einzelnen Geweben verschiedener Spezies noch zu wenig abgesichert.

1.2.2 Subzelluläre Lokalisierung und Shuttle von Östrogenrezeptoren

Östrogenrezeptoren sind in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert und können inner- oder außerhalb des Zellkerns, membrangebunden oder frei im Cytosol vorkommen. Dabei ging man ursprünglich davon aus, dass Steroidhormone ausschließlich über nukleäre Rezeptoren wirken [JENSEN und JACOBSON (1962)] und im Falle der Östrogene cytosolische ER nach Bindung ihrer Liganden (vor allem 17β -Östradiol) und der dadurch induzierten Dimerisierung in den Zellkern gelangen und dort die Transkription der Zielgene bewirken. Durch immunhistochemische Untersuchungen, Monitoring des Proteintransfers zwischen verschiedenen Kernen in Heterokaryons und Messung der subzellulären Verteilung von Rezeptormutanten wurde in späteren Studien die Existenz verschiedener ER-Pools und ein beständiger Shuttle der ER zwischen Zellkern und Cytoplasma belegt [LEVIN (2001); DAUVOIS et al. (1993); KING und GREENE (1984)]. Da der Wiedereintritt der ER in den Zellkern durch Oligomycin hemmbar ist, liegt es nahe, dass dieser Prozess energieabhängig ist [GUIOCHON-MANTEL et al. (1991)]. Die subzelluläre Lokalisierung und steady state-Verteilung der Östrogenrezeptoren hängt u.a. von der Spezies, dem Zell- und Gewebstyp sowie von zugesetzten oder natürlichen Liganden ab. Bei Mäusen ließen sich ER bei Abwesenheit von Hormonliganden vorwiegend im Kern nachweisen. Die Zugabe von Östradiol aber auch des partiellen Östrogenantagonisten 4-Hydroxytamoxifen steigerte den Anteil an nukleärem ER noch einmal geringfügig, während eine Behandlung mit den reinen Östrogenantagonisten ICI 182,780 oder ICI 164,384 zu einer ER-Akkumulation im Zytoplasma führte, wo ER dann in 80% der Zellen nachweisbar waren [DAUVOIS et al. (1993); CREASMAN et al. (1985)]. Reine Antiöstrogene hemmen möglicherweise den Wiedereintritt der ER in den Zellkern und unterbrechen damit den Shuttle, indem sie die Dephosphorylierung der ER stören [DAUVOIS et al. (1993)]. Dieser Prozess erfolgt verhältnismäßig rasch und ist dosisabhängig: in den Experimenten von DAUVOIS et al. (1993) waren ER ab einer Dosis von 1 nM ICI 182,780 oder 10nM ICI 164,384 innerhalb von 15 min im Zytoplasma nachweisbar. Beim Menschen erfordert eine entsprechende Unterbrechung des ER-Shuttles ca. 10fach höhere ICI 164,384-Konzentrationen [YLIKOMI et al. (1992)]. Insgesamt

ergibt sich durch unterschiedliche transkriptionelle Aktivitäten und die zelltypabhängige Verteilung der Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ ein gewebsspezifisches Genexpressionsmuster.

1.2.3 Mechanismen der rezeptorvermittelten Östrogenwirkung

Ohne Liganden bilden die (nukleären) Östrogenrezeptoren einen Komplex mit Hitzeschockproteinen (HSP), die die Wirkung der ER hemmen. Nach Bindung des Östrogenliganden ändert die Liganden-bindende Domäne ihre Konformation und die HSP spalten ab, was wiederum die Bindung von Kofaktoren erleichtert, die als Koaktivatoren oder Korepressoren die Interaktion der Rezeptoren mit ihren Zielgenen erleichtern bzw. hemmen. ER können ihre Wirkung über unterschiedliche Mechanismen ausüben: über genomische (d.h. durch Beeinflussung der Genexpression) und nicht-genomische Mechanismen, sowie nach Bindung eines Liganden wie Östradiol oder ligandenunabhängig [LEVIN (2005); KUIPER et al. (1997); COUSE et al. (1997); PARKER (1995); MURDOCH und GORSKI (1991)]. Beim direkten, ligandenabhängigen genomischen (oder „klassischen“) Signaltransduktionsweg dimerisieren die ER nach Bindung des Liganden und Abspaltung der HSP zu Homo- ($ER\alpha:ER\alpha$, $ER\beta:ER\beta$) oder Heterodimeren ($ER\alpha:ER\beta$). Dabei hängen die Anteile der verschiedenen Dimere auch von der relativen Häufigkeit, d.h. der Verteilung, von $ER\alpha$ und $ER\beta$ im Gewebe ab. Die Dimere binden direkt an DNA-Zielgene mittels spezifischer Östrogen-Responselemente (ERE; Abb. 1.6a). Diese EREs stellen Pallindrome dar, Nukleinsäureketten, die mit ihren Komplementärsträngen identisch sind, wenn man beide Stränge in der gleichen Richtung liest (z.B. von 5' nach 3'). Perfekte Pallindrome fungieren häufig als Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme. In Proteinbindungsstellen findet man häufig Pallindrome, bei denen beide Stränge nicht 100%ig übereinstimmen. Der $ER\alpha$ fungiert beim klassischen Mechanismus überwiegend als Aktivator, während der $ER\beta$ den $ER\alpha$ durch Bildung von Heterodimeren zu hemmen vermag. Bei den in Abb. 1.6 b-d dargestellten indirekten, ligandenabhängigen genomischen Signaltransduktionswegen kommt es nach Bindung eines Liganden an den ER zu keiner Dimerisierung, und die monomeren Liganden-ER-Komplexe binden nicht direkt an die Ziel-DNA sondern an andere DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren

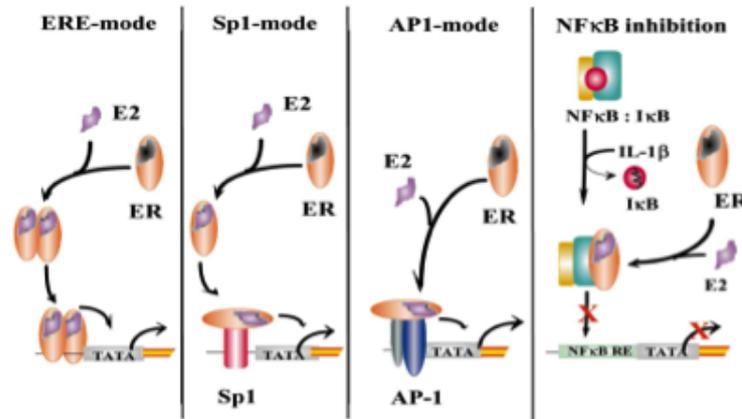


Abbildung 1.6 Verschiedene Mechanismen zur Regulation der Transkription von Genen durch Östrogenrezeptoren (ER). Während der erste Bildteil (Abb. 2.5a) den „klassischen“ Mechanismus mit direkter Bindung der ER(-Dimere) an die Ziel-DNA über EREs repräsentiert, zeigen die folgenden Bildabschnitte (Abb. 2.5 b, c und d) indirekte genomische Mechanismen, bei denen monomere ER-Ligandenkomplexe nicht an die Ziel-DNA sondern an andere DNA-bindende Transkriptionsfaktoren (AP1, SP1 oder NF- κ B) binden.

Bildquelle: NILSSON et al. (2001)

wie AP1 (activator protein 1), SP1 (specificity protein 1) oder NF- κ B ([GUIOCHON-MANTEL et al. (1991)]). Weiterhin existieren intrazelluläre Signalwege wie der MAP (= mitogen-activated protein)-Kinase Signalweg, über die ER ohne vorherige Ligandenbindung über die Regulation ER-gebundener Kofaktoren wirken oder durch Phosphorylierung der ER mittels Proteinkinasen [WEIGEL und ZHANG (1998)].

Das komplexe Zusammenspiel von Transkription und anschließender Proteinsynthese böte auch eine Erklärung dafür, dass sich die Östrogenwirkung häufig langsam einstellt, d.h. eher nach Stunden als nach Minuten. Als Erklärung für die Beobachtung schneller, direkter Östrogeneffekte werden daher neben dem geschilderten Mechanismus weitere Signalwege diskutiert (Fernandez et al. 2008). So existiert eine zunehmende Evidenz dafür, dass neben ihrer allgemein akzeptierten hormonellen, d.h. ER-vermittelten genomischen Wirkungsweise Östrogene wie 17β -Östradiol ihre Wirkung auch direkt ausüben können und beispielsweise Hirnfunktionen mittels direkter Effekte auf neuronale Membranen zu beeinflussen vermögen. So ließ sich durch experimentell erzeugte schnelle Änderungen der Östradiolbioverfügbarkeit im Gehirn männliches Sexualverhalten innerhalb von Minuten verändern, was sicherlich zu rasch für konventionelle genetische Mechanismen ist [BALTHAZART und BALL (2006); LEVIN (2005)].

1.3 Tiermodelle zur Untersuchung von Östrogenen und Östrogenrezeptoren

Zur Erforschung der verschiedenen Funktionen von Östrogenen und Östrogenrezeptoren und ihrer Wirkmechanismen wurden Mausmodelle mit funktioneller Inaktivierung eines Östrogenrezeptor-Gens entwickelt. Es sind seit 1992 Östrogenrezeptor- α knockout (ER α -KO-) Mäuse und seit 1998 Östrogenrezeptor- β knockout (ER β -KO-) Mäuse verfügbar. Es existieren noch weitere Mausmodelle, die aber in der vorliegenden Untersuchung nicht eingesetzt wurden: 1. infertile $\alpha\beta$ -KO-Mäuse, in denen beide ERs ausgeschaltet sind, und 2. Aromatase-knockout(ArKO) Mäuse, die keine Aromatase exprimieren und daher kein 17 β -Östradiol zu synthetisieren vermögen, einen männlichen Habitus entwickeln und ebenfalls infertil sind.

1.4 Östrogenrezeptor-Antagonisten

Zum selben Zweck lassen sich auch Östrogenrezeptor-Antagonisten („Antiöstrogene“) ebenso wie geeignete selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) einsetzen, die vor allem zur Behandlung hormonabhängiger Brusttumore, weiblicher Unfruchtbarkeit, Endometriose sowie Osteoporose entwickelt worden waren. Bei SERMs handelt es sich um unterschiedliche, nicht-steroidale Substanzen, deren Tertiärstruktur eine Bindung an ERs ermöglicht [RIGGS und HARTMANN (2003); OSBORNE et al. (2000)]. Im Gegensatz zu Östrogenen, die stets agonistisch wirken und den spezifischen ER-Antagonisten („Antiöstrogenen“), die stets antagonistisch wirken, können SERMs selektiv - d.h. abhängig von der Spezies (Mensch, Ratte, Maus), vom Rezeptortyp (ER α oder ER β), vom Zielgewebe der Östrogenwirkung und somit vom Verteilungsmuster der ER-agonistische oder antagonistische Effekte ausüben.

MPP und PHTPP (Abb. 1.7 a, b) sind erfolgreiche Versuche, SERMs zu entwickeln, die im Gegensatz zu „klassischen“ Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen® sich entweder wie reine ER α - oder reine ER β -Antagonisten verhalten

und dazu keine agonistische Aktivität aufweisen. Bei der Entwicklung von ER α -Antagonisten wurden basische Seitenketten, die typischerweise in nichtsteroidalen Antiöstrogenen gefunden werden, an Pyrazolverbindungen geknüpft, die eine sehr viel höhere Affinität zu ER α als zu ER β aufweisen. Als im gewünschten Sinne besonders effektiv erwies sich die Verknüpfung von Methylpiperidin mit dem in Abb. 1.7 a gezeigten, mit drei Phenolgruppen substituierten Pyrazolring zum MethylPiperidinoPyrazol (MPP; [SUN et al. (2002)]).

Zur Darstellung selektiver ER β -Antagonisten wurden Pyrazolo[1,5- α]Pyrimidine, heterozyklische bizyklische Verbindungen ohne Östrogenaktivität gegenüber beiden ER, aber mit erhöhter Selektivität für ER β , systematisch derivatisiert. Das herausragendste Derivat, 2-Phenyl-3-(4-Hydroxyphenyl)-5,7-bis(Trifluoromethyl)-Pyrazolo[1,5- α]Pyrimidin, besitzt eine 36fach höhere Selektivität für ER β im Vergleich zu ER α und wirkte im Transkriptionsassay als effektiver ER β -Antagonist ohne signifikante Aktivität gegenüber ER α [COMPTON et al. (2004)].

ICI 182,780 (Handelsname Faslodex®) besitzt ein Östradiolgerüst und eine hydrophobe Seitenkette in 7- α -Position (Abb. 1.7 c). Nach Bindung an den Östrogenrezeptor blockiert er diesen an beiden Transkriptions-Aktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2 und verhindert die Dimerisierung des ER und seine Bindung an das ERE. Statt dessen wird der ER beschleunigt degradiert und sein Gehalt im Zytosol sinkt [OSBORNE et al. (2004)]. Weiterhin hemmt ICI (182,780) reversibel die ER-Aufnahme in den Kern und/oder fördert den Übertritt von ERs in andere Zellkompartimente, während der ER-Efflux aus dem Zellkern durch das Antiöstrogen nicht beeinflusst wird. ICI gilt im allgemeinen als reiner ER-Antagonist, es konnte jedoch auch eine agonistische Wirkung über nicht klassische Rezeptoren

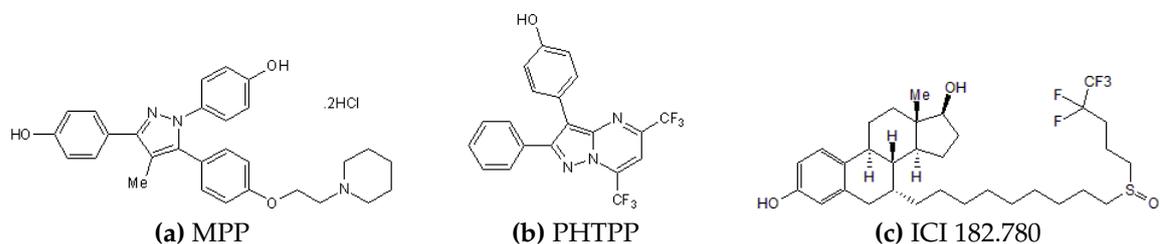


Abbildung 1.7 Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Östrogenantagonisten.

Bildquelle: <http://www.tocris.com/>

nachgewiesen werden [FILARDO und THOMAS (2005); WEHLING et al. (2006)]. Seine Spezifität hängt von der Spezies und dem Gewebe ab. Beispielsweise hemmt es die Expression von $ER\alpha$ in den Ductuli efferentes der Ratte, hat aber keine Wirkung auf den $ER\beta$ [OLIVEIRA et al. (2003)].

1.5 Der Hippocampus

1.5.1 Struktur und Lage

Der zum Archi-(bzw. Allo-)cortex zählende Hippocampus (besser wäre „die Hippocampi“, da es in jeder Hirnhemisphäre einen Hippocampus gibt) ist eine zentrale Schaltstruktur des limbischen Systems und das anatomische Korrelat für Lern- und Gedächtnisvorgänge oder allgemein für die Entstehung von Gedächtnisinhalten. Sein Name rührt zum einen von der Ähnlichkeit menschlicher Hippocampuspräparate mit einem Seepferdchen (Abb.1.8) her. Zum anderen war die Namensgebung inspiriert durch den Hippocamp einem wurmartigen Meeresungeheuer aus der griechischen Mythologie. Das lateinische Wort "ἵππόκαμπος" (Hippocampus) bedeutet wörtlich „Pferd“ (ἵππος) und „Monster“ (κάμπος).

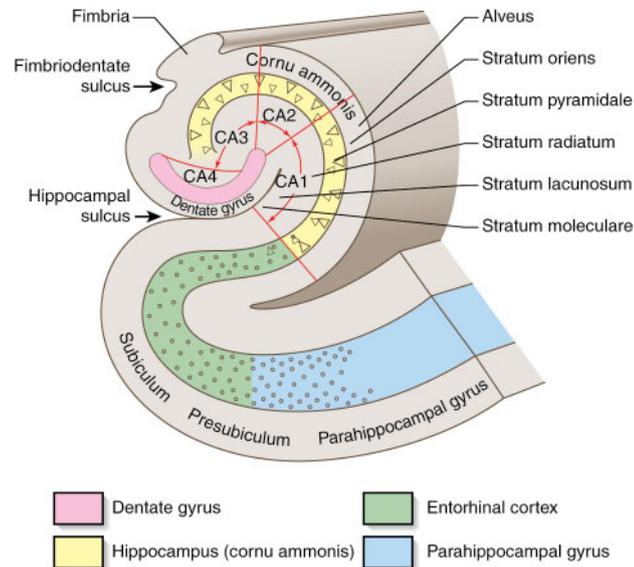
Der Hippocampus hat eine C-förmige, im Frontalschnitt eine S-förmige Gestalt



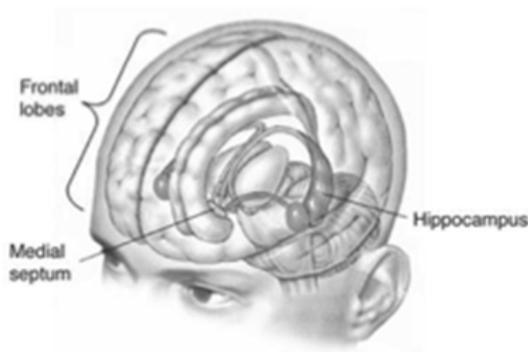
Abbildung 1.8 Präparat des ungarischen Neurowissenschaftlers László Seress (1980): Vergleich eines menschlichen Hippocampus inkl. Fornix mit einem Seepferdchen. Bildquelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Hippocampus>

(Abb. 1.9a). Beim Menschen befindet er sich an der medialen Fläche der Temporal-
lappen, während die Hippocampi bei der Ratte weiter kranial liegen, unmittelbar
unter dem Kortex (Abb. 1.9b-c).

Die gesamte hippocampale Formation lässt sich bei allen Säugetieren in drei Teile



(a) Schematischer Frontalschnitt durch den Hippocampus



(b) Menschlicher Hippocampus



(c) Hippocampus einer Ratte

Abbildung 1.9 Lage und Architektur des Hippocampus.

Bildquellen: a) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/39/Hippocampus_%28brain%29.jpg

b) <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/57/Hippolobes.gif>

c) http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/iserhot-claudia-2001-05-02/HTML/Iserhot_html_m1ada4215.gif

untergliedern: Gyrus dentatus (Fascia dentata), Ammonshorn (Cornu Ammonis), Subicularkomplex (Präsubiculum, Parasubiculum). Das Ammonshorn bildet den eigentlichen Hippocampus (Hippocampus proprius) und wird tangential in die Regionen C1 bis C4 unterteilt (Abb. 1.9a), von denen aber nur C1 und C3 funktionell von Bedeutung sind und der intermediäre Bereich der CA2-Region heute von vielen Autoren der CA1-Region zugerechnet wird. Die Abgrenzungen der einzelnen Regionen des Ammonshorns im histologischen Präparat sind unterschiedlich gut zu erkennen. Im Gegensatz zum Menschen lassen sich beim Nagetier die C2/3-Region anhand der unterschiedlichen Zellgröße gut von der CA1-Region unterscheiden. Die Abgrenzungen des Gyrus dentatus zur CA3-Region ist bei allen Säugern gleich gut.

Die Anzahl pyramidalen Neuronen im Hippocampus (genauer: CA1-3-Region) liegt in der Ratte in der Größenordnung von 2×10^6 ([AKDOGAN et al. (2011)]). Zum Vergleich: das menschliche Gehirn besteht aus schätzungsweise 100 Milliarden (10^{11}) Nervenzellen, vergleichbar mit der Anzahl von Sternen in einer Galaxie. Jede Nervenzelle steht über synaptische Verbindungen mit anderen Nervenzellen in Kontakt. Information empfangende Elemente einer Nervenzelle sind die Dendriten, die wie das Wurzelwerk eines Baumes weit verzweigt sind. Die bis zu 1m langen Axone einer Nervenzelle leiten die Informationen weiter. Auch sie haben meist an ihren Enden mehrere Ausläufer. Dendriten wiederum besitzen zahlreiche Spines (Membranausstülpungen), bestehend aus einem Hals und einem Kopf der den postsynaptischen Anteil einer synaptischen Verknüpfung bildet. Diese dornenartigen Fortsätze, formieren sich vor allem zu exzitatorischen (=erregende) Spinesynapsen. Der präsynaptische Anteil wird meist durch Axonausläufer anderer Nervenzellen gebildet.

Der Gyrus dentatus (GD) und die CA-Regionen unterscheiden sich in ihrer Feinstruktur. Der GD bildet die Eingangsstruktur des Hippocampus. Er ist dreischichtig aufgebaut und besteht aus einer mittleren Schicht, dem Stratum granulare (Körnerschicht), welchem apikal (=zur Spitze des Gyrus dentatus gerichtet) das Stratum moleculare aufliegt, während die innerhalb des Bogens der Körnerzellschicht liegende Schicht als Hilum bezeichnet wird.

Die Hauptzellen des Gyrus dentatus sind erregende, glutamaterge Körnerzellen. Diese senden Dendriten nach außen in das Stratum moleculare und Axone (sog. „Moosfasern“, welche aber nichts mit dem Moosfasersystem des Kleinhirns zu

tun haben) durch das Hilum zu den Zellen der CA3- und CA4-Region des Ammonshorns. Das Ammonshorn ist ebenfalls dreischichtig aufgebaut. Bei seinen Hauptzellen handelt es sich um glutamaterge Pyramidenzellen. Sie bilden ein Band, das Stratum pyramidale, welches apikal an das breite Stratum radiatum und das schmalere Stratum lacunosum-moleculare grenzt. Basal grenzt es an das Stratum oriens. Die Pyramidenzellen senden apikal Dendriten in das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare, basal bis in das Stratum oriens. Ihre Axone reichen in den Fornix oder projizieren als sog. Schaffer-Kollateralen von der CA3- in die CA1-Region (Abb. 1.10). Das Stratum oriens enthält die Zellkörper der hemmenden Korbzellen, deren interneurale Verschaltung mit den Pyramidenzellen über das Stratum lacunosum moleculare läuft. Zum Hinterhaupt hin geht der Hippocampus in den Fornix über, welcher die meisten Fasersysteme bündelt, über die der Hippocampus mit anderen Hirngebieten in Verbindung steht.(Abb. 1.11).

1.5.2 Funktionalität des Hippocampus

Während ältere Hypothesen zur Funktion des Hippocampus (fälschlich) direkte Afferenzen aus dem Bulbus olfactorius und daher die Involvierung des Hippocampus in den Riechprozess postulierten [WINKELMANN (1981)], sieht man heute die Rolle des Hippocampus

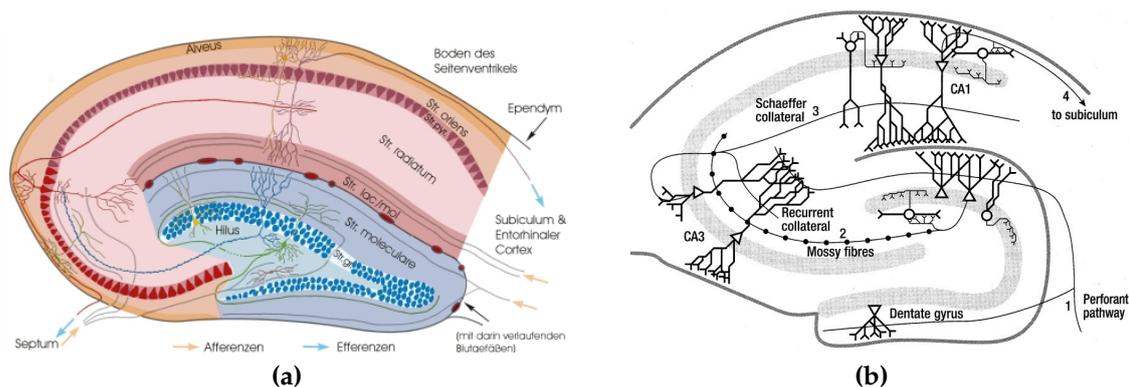


Abbildung 1.10 Schema Hippocampus mit Gyrus dentatus.

Bildquellen: a) <http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus-farbig.jpg>; b) http://www.mbdefault.org/6_memory/6_7.JPG

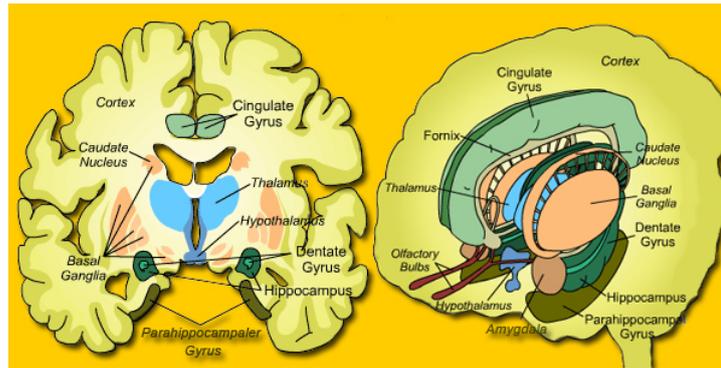


Abbildung 1.11 Der Hippocampus als Teil des limbischen Systems steht in Verbindung mit anderen Hirnstrukturen wie der Amygdala, dem Gyrus parahippocampalis, dem Gyrus cinguli und weiteren Strukturen wie dem Hypothalamus.

Bildquelle: <http://www.gehirn-atlas.de/limbisches-system.html>

- in der Zusammenführung und Verarbeitung von Informationen aus verschiedenen sensorischen Systemen und ihrer Rücksendung zum Neocortex, im Zusammenfügen von Sinneseindrücken und anderen Gedächtnisinhalten, die an verschiedenen Orten und zu verschiedenen Zeiten gewonnen wurden, zu einem „Ganzen“,
- in der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten, d.h. ihrer Überführung aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis[WANG und MORRIS (2010)]
- und in der Generierung von Erinnerungen, die dann anderswo in der Großhirnrinde gespeichert werden.
- Nicht zuletzt ist der Hippocampus auch wesentlich an emotionalen Prozessen beteiligt. So führten dauerhafter emotionaler Stress und emotionale Traumata im Tiermodell aber auch bei Menschen (Kriegsveteranen) zum Absterben hippocampaler Neurone und zu hippocampaler Atrophie, und bei Personen mit unipolarer Depression war das Hippocampusvolumen ebenfalls reduziert ([MAGARINOS und MCEWEN (1995); VIDEBECH und RAVNKILDE (2004); WARNER-SCHMIDT und DUMAN (2006)]
- Bei Tieren spielt nach bisheriger Auffassung die durch NMDA-Rezeptoren vermittelte hippocampale Plastizität eine entscheidende Rolle bei der räumlichen Orientierung und dem räumlichen Lernen[LEUTGEB et al. (2005)]. Allerdings besaßen in einer aktuellen Untersuchung genetisch veränderte Mäuse ohne funktionierende NMDA-Rezeptoren im Gyrus Dentatus (GD) und der CA1-Region ihrer Hippocampi ein normales räumliches Gedächtnis,

waren aber unfähig, bei räumlichen Orientierungsaufgaben Entscheidungen zu treffen[BANNERMAN et al. (2012)].

1.5.3 Östrogene und synaptische Plastizität

1.5.3.1 Neuronale und synaptische Plastizität

Eine der Voraussetzungen, die den Hippocampus zur Bewältigung dieser Aufgaben befähigen, ist seine ausgeprägte neuronale Plastizität. Unter neuronaler Plastizität versteht man den Umbau und/oder eine Leistungsanpassung neuronaler Strukturen in Abhängigkeit von ihrer Belastung. So ist der Gyrus dentatus neben dem Bulbus olfactorius, eine der beiden Strukturen des Säugetiergehirns, die zur lebenslangen Neurogenese befähigt sind [MING und SONG (2005)]. Die hippocampale Neurogenese glutamaterger Körnerzellen wurde 1965 in Ratten entdeckt [ALTMAN und DAS (1965)] und 1998 auch im Menschen gefunden [ERIKSSON et al. (1998)]. In die östrogeninduzierte Synaptogenese sind NMDA-Rezeptoren involviert, da sie durch Liganden von NMDA-Rezeptoren (Aminosäuren) gesteigert und durch NMDA-Rezeptorantagonisten blockiert werden kann (Woolley and McEwen 1994; Woolley et al. 1997). NMDA-Rezeptoren sind ebenfalls in die Unterdrückung der Neurogenese im Gyrus dentatus involviert, wie die Steigerung der Neurogenese im Gyrus dentatus nach Behandlung mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten zeigt [CAMERON et al. (1995)]. Seit den 1990er Jahren wurden zahlreiche Faktoren entdeckt, die die Neurogenese beeinflussen wie Stress, Sport (Laufen), Umweltreize oder Lernen, Neurotransmitter, Aktivatoren des NMDA-Rezeptors, Wachstumsfaktoren, Arzneistoffe oder Drogen. Eine weitere Form der neuronalen Plastizität ist neben der Neurogenese die synaptische Plastizität, d.h. die aktivitätsabhängige Änderung (im Folgenden wird meist die Steigerung betrachtet) der synaptischen Übertragung. Letztere kann sowohl durch eine (langandauernde) Verstärkung der synaptischen Übertragung (long-term potentiation, LTP) als auch durch die Neubildung von Synapsen erfolgen.

1.5.3.2 Östrogenabhängige Synaptogenese

Östradiol ist ein essentieller Faktor für die synaptische Plastizität im Hippocampus, wo es an der Regulation

- a) der Synapsendichte
- b) der synaptischen Aktivität [SMITH und MCMAHON (2005)]
- c) der Expression synaptischer Proteine (Mellon et al. 2001; [MATTSON MP (1998); STOFFEL-WAGNER (2001); WEHRENBURG et al. (2001); PRANGE-KIEL und RUNE (2006); FESTER et al. (2009b)])
- d) der Neurogenese beteiligt ist [CAMBIASSO et al. (2000); TANAPAT et al. (2001); FESTER et al. (2006)].

Dabei blieb die Herkunft des Östradiols lange Zeit unklar. Denn obwohl bereits zu Beginn der 1980er Jahre Corpéchet et al. postulierten, dass die Wirkung von Steroidhormonen im Gehirn gonadenunabhängig sei [CORPÉCHOT et al. (1981, 1983)], wurden die Effekte von Östrogenen im Gehirn zunächst auf aus den Gonaden stammende, zirkulierende Östrogene zurückgeführt [WOOLLEY und MCEWEN (1992)]. Dafür hatten vor allem zwei Beobachtungen gesprochen, nämlich

- dass Ovariectomie bei weiblichen Ratten zur Herunterregulation der (östrogeninduzierten) Synapsenbildung im Hippocampus führt [GOULD et al. (1990a)]
- und dass die Änderung der Synapsendichte parallel zu den sich zyklisch verändernden Östrogenspiegeln im Plasma verläuft, so dass die maximale Synapsendichte zu Zeiten maximaler Östrogenspiegel im Plasma beobachtet wurde [WOOLLEY et al. (1990)].

Allerdings ist diese Argumentation nicht zwingend, und die Erklärung dafür, dass die hippocampalen Effekte von Östrogenen zyklusabhängig sind, wird heute darin gesehen, dass die hippocampale Östrogenproduktion genau wie die gonadale der zyklischen Regulierung durch GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) unterliegt [PRANGE-KIEL et al. (2008, 2009)] und somit von der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse abhängt [MEETHAL et al. (2009)].

Vor diesem Hintergrund und angesichts der in Abschnitt näher ausgeführten Tatsache, dass hippocampale Neuronen zur Expression aller steroidogenen Enzyme

und somit zur lokalen Östrogensynthese befähigt sind und zudem beide Östrogenrezeptoren exprimieren, muss die Frage nach der Herkunft des im Hippocampus wirksamen 17β -Östradiols neu beantwortet werden. Vor allem zwei auf den ersten Blick widersprüchliche Befunde [KRETZ et al. (2004)], nämlich

- dass die Hemmung der Östrogensynthese im Hippocampus durch den Aromatase-Inhibitor Letrozol [SMITH (1999)] die Synapsendichte im Hippocampus ganz erheblich herabreguliert [KRETZ et al. (2004)],
- während die Behandlung hippocampaler Schnittkulturen mit Östrogen zu keiner Erhöhung der Synapsenzahl führt [FESTER et al. (2009b)] lassen sich am ehesten mit der Vorstellung vereinen, dass nicht das gonadale sondern das im Hippocampus selbst synthetisierte 17β -Östradiol den entscheidenden Einfluss auf dessen synaptische Plastizität hat [HOJO et al. (2009, 2008); RUNE et al. (2006); PRANGE-KIEL et al. (2004)] , wobei nicht das Östrogen per se die Synaptogenese stimuliert [KRETZ et al. (2004)], sondern speziell die de novo Östrogensynthese im Hippocampus dieses tut [PRANGE-KIEL et al. (2008)], d.h. als neuronaler Modulator im Hippocampus aktiv ist.

1.5.4 Lokalisierung

Eine weitere Frage ist, ob östrogenabhängige Synaptogenese im gesamten Hippocampus stattfindet, oder nur in der CA1-Region. Dazu liegen eine Reihe von Beobachtungen vor:

1. Die östrogeninduzierte Heraufregulation der Synapsendichte wurde nur an Pyramidenzellen der CA1-Region beobachtet, aber nicht an der CA3-Region [PRANGE-KIEL et al. (2006)].
2. Die östrogeninduzierte Heraufregulation von Markerproteinen für das Synapsenwachstum wurde (nur) im Stratum Radiatum der CA1-Region beobachtet.
3. In den Pyramidenneuronen der CA1-Region des Hippocampus findet die östrogeninduzierte Synaptogenese an dendritischen Spines statt, aber nicht an den Ästen oder am Schaft. Dies ist spezifisch für die CA1-Region und findet sich so nicht in der CA3-Region oder am Gyrus dentatus [WOOLLEY et al. (1990)].

4. Auf der anderen Seite zeigen neuere Arbeiten, dass Östrogenrezeptoren und östrogenabhängige Effekte nicht nur in der CA1-Region des Hippocampus, sondern auch in der CA3-Region [OGIUE-IKEDA et al. (2008); SHUGHRUE et al. (2000)](Mehra et al. 2005) und in den Cajal Retzius-Zellen des Gyrus dentatus [BENDER et al. (2010); FESTER et al. (2006)] beobachtet werden können.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte an den Modellen der adulten, ER α bzw. ER β -KO-Maus und hippocampalen Slicekulturen aus neonatalen weiblichen Ratten eine Reihe von Fragen zur Rolle der Östrogenrezeptoren ER α und ER β bei der östrogeninduzierten hippocampalen Synaptogenese untersucht werden:

1. Sind ER α und ER β qualitativ und quantitativ in gleicher Weise an der Regulation der östrogeninduzierten Synapsenbildung in der CA1-Region im Hippocampus beteiligt und in welchem Ausmaß?
2. Sind Östrogenangebot und ER-Aktivität bzw.–Hemmung von gleichem Einfluss auf den Effekt?
3. Korrelieren die akuten Effekte einer Steigerung oder Reduktion von Östrogenangebot und ER-Aktivität mit dem lebenslangen Vorhandensein oder Fehlen von ER α und ER β ?
4. Könnten neben dem direkten, ligandenabhängigen (klassischen) genomischen Mechanismus auch andere, indirekte und/oder nichtgenomische Mechanismen an der Östrogenwirkung beteiligt sein?
5. Bestehen bezüglich der Synaptogenese Unterschiede zwischen linkem und rechtem Hippocampus?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien und Geräte

Aesculap Rasierer	BRAUN
Aluminiumfolie	LAGER UKE
Brutschrank 65 °C	MEMMERT
Chirurgisches Besteck	F.S.T. (Fine Science Tools)
CO ₂ -Inkubator (37°C)	HERAEUS
Deckgläser, 24x46 mm	MARIENFELD
Desinfektionsmittel (Sterillium)	BODE
Diamantmesser (1µm für LM)	DIATOM
Dokumentenfolie	LEITZ
Einbettungsformen	PLANO
Einmalhandschuhe	KIMBERLY-CLARK/ HARTMANN
Einmalkanüle	BRAUN
Einmalskalpell	BRAUN
Einmalspritzen 1 ml	BRAUN
Elektronenmikroskop CM 100	PHILIPS
Falcon Kulturplatten (6 well)	BECTON DICKINSON
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BECTON DICKINSON
Fotopapier Nr. 3, DIN A 4 (24 × 30,5cm)	TETENAL
Gefrierschrank, -25°C	LIEBHERR
Gelatinekapseln (über Slices in Block gestülpt)	PLANO
Gewebeschnneider (Tissue Chopper, Mikrotom)	H. SAUR, REICHERT JUNG

Gilder Grids (Kupferschlitzträger)	PLANO
Heidemannspatel	AESCLAP DE
Inkubator 37°C (Brutschrank bei 37°C)	MEMMERT
Konfokales Mikroskop	
Kosmetiktücher	WEPA, TAPIRA
Kühlschrank, 4°C	LIEBHERR
Lichtmikroskop	OLYMPUS, ZEISS
Löschpapier	
Lupe	ZEISS
Lymphbecken	
Millicell-CM (Biomembran)	MILLIPORE
Millicell-CM, Sterilized Culture Plate Insert	MILLIPORE (DE)
Negativentwickler	KODAK
Parafilm	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
Pasteurpipetten	ASSISTENT
Perfusionspumpe Masterflex®	COLE PARMER
Pinzette nach Dumont	MERCK
Pipetten, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Pipettenspitzen verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Reaktionsgefäße verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Rollrandschnappgläser	WINDAUS
Rotlichtlampe	HANAULUX
Schere	FINE SCIENCE TOOLS
Serologische Pipetten	FALCON
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
Stericup Filter	MILLIPORE
Tissue Tek	SAKURA
Trockeneis	
Ultramicrotom (kleiner 100nm für EM)	REICHERT JUNG
Vergößerungsgerät DURST	
Waage	METTLER

2.1.2 Chemikalien

17- β - östradiol (wasserlöslich)	SIGMA
Dodecanylsuccinic acid anhydride (DDSA)	SERVA
2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN)	TOCRIS BIOSCIENCE (UK)
2% Accelerator (2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol)	SERVA
Aqua ad iniectabilia	BAXTER
Aqua dest.	IONENAUSTAUSCHER/UCHE
Blei-II-citrat	MERCK
Bleicitrat	MERCK
Carprofen (Rimadyl®)	PFIZER
Cholesterol, Water Soluble	SIGMA
Desinfektionsmittel	BODE
Dihydrogenphosphat	MERCK
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	MERCK
Dodecanylsuccinic anhydride (DDSA)	SERVA
Entwickler	KODAK D19
Eukobrom SW Papierentwickler	TETENAL
Ethanol, unvergällt (100 %, 95 %)	MERCK
Femara (Letrozol)	NOVARTIS (CH)
Glutamin	SIGMA
Glutardialdehyd	MERCK
Glycidether 100	SERVA
Hank's Balanced Salzlösung (Hanks Balanced Salts, HBSS)	GIBCO
ICI 182,780	TOCRIS
Ketamin	GRäUB
Methyl Nadic Anhydrid (MNA)	SERVA
Minimum Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert	GIBCO
MPP	TOCRIS
Natriumchlorid	MERCK
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	MERCK
Natriumhydrogencarbonat I	NVITROGEN
Natriumhydroxid	MERCK
Natriumtetraborat	MERCK

Osmiumtetroxid OSO_4	ROTH
Paraformaldehyd	MERCK
PBS Tablets	GIBCO
Penicillin	GIBCO
Pferdeserum (Horse Serum)	GIBCO
PHTPP	TOCRIS
Propylenoxid	SERVA
Saccharose	MERCK
Streptomycin	GIBCO
Toluidinblau	CHROMA
Trinatriumcitrat Dihydrat	MERCK
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	SERVA
Uranylacetat	MERCK
Xylazin (Rompun®)	BAYER

2.1.3 Software

Texmaker(Latex)	GNU General Public License
JabRef	GNU General Public License
Excel 2013	MICROSOFT
Word 2013	MICROSOFT
Powerpoint presentation	MICROSOFT

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Lösungen

2.2.2 Versuchslösungen für Slicekulturen (*in vitro*-Experimente)

2.2.2.1 Cholesterol: Vorstufe des Östrogens

Zur Herstellung der Cholesterollösung wurden:

- 30mg "wasserlösliches"Cholesterolpulver (Gehalt: 1,2mg Cholesterol (MW 386,7) in
- 3ml Aqua dest gelöst und mit
- 27ml Inkubationsmedium verdünnt.

Endkonzentration von $10^{-7}M$

2.2.2.2 Letrozol: Aromatase Inhibitor

Zur Herstellung der Lösung wurden:

- 2,85mg Letrozol (MW 289,8) in
- 1ml 96% Ethanol gelöst (10^2M) und mit
- 99ml Aqua dest. verdünnt (Arbeitskonzentration $10^{-4}M$).

Anschließend wurde diese Lösung 1:1 mit Inkubationsmedium verdünnt um eine Endkonzentration von $10^{-7}M$ zu erreichen.

2.2.2.3 ICI 182,780: Estrogenrezeptor Inhibitor

Zur Herstellung der ICI Lösung wurden:

- 10mg ICI (MG 606,77) mit
- 1,648ml Ethanol versetzt und mit
- Aqua dest 1:10 verdünnt.

Endkonzentration von $10^{-7}M$

2.2.2.4 MPP: Estrogenrezeptor α Antagonist

Zur Herstellung der MPP Lösung wurden:

- 10mg MPP (MW 556,01) mit
- 1,798ml Ethanol versetzt und mit
- Aqua dest 1:10 verdünnt.

Endkonzentration von $10^{-6}M$

2.2.2.5 PHTPP: Estrogenrezeptor β Antagonist

Zur Herstellung der PHTPP Lösung wurden:

- 10mg PHTPP (MW 423,31) in
- 2,362ml Ethanol gelöst und mit
- Aqua dest 1:10 verdünnt.

Endkonzentration von $10^{-6}M$

2.2.2.6 Kontrollmedium: Siehe Herstellung des Inkubationsmediums

2.2.3 Medien (Gewebeulturen / Sliceulturen)

2.2.3.1 Präparationsmedium

Zur Herstellung von 100ml Präparationsmedium wurden:

- 50ml Minimum Essential Medium, 2-fach konzentriert
- 1ml Glutamin (200mM) und
- 49ml aqua ad iniectabilia steril gemischt.

Titration des pH auf 7,35 mit Natronlauge (1M NaOH) oder Salzsäure (1M HCL).

2.2.3.2 Inkubationsmedium

Zur Herstellung von 100ml Inkubationsmedium wurden:

- 25ml Minimum Essential Medium
- 1ml Glutamin, 200mM, steril
- 0,58ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (7,5%), steril
- 25ml Hanks Balanced Salzlösung (HBSS)
- 25ml Pferdeserum, steril
- 1ml Penicillin (104 Units)/Streptomycin (104 μ g) und
- 1560 μ l Glukose (40%) in
- 19ml Aqua ad iniectabilia steril gemischt.

Titration des pH auf 7,25 mit Natronlauge (1M NaOH) oder Salzsäure (1M HCL).

2.2.3.3 Anästhesie-Injektionslösung

Zur Herstellung von 10ml Anästhesie-Injektionslösung wurden:

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

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

2.2.4 Gewebefixierung

2.2.4.1 Phosphatgepufferte Salzlösung

Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS)

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

- 9g Natriumchlorid (NaCl)
- $0,795\text{g}$ Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4+7\text{H}_2\text{O}$)
- $0,144\text{g}$ Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

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

2.2.4.2 Phosphatpuffer (PB)

Zur Herstellung einer $0,1\text{M}$ PB Lösung wurden

- $5,52\text{g}$ Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4+\text{H}_2\text{O}$) und
- $42,88\text{g}$ Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4+7\text{H}_2\text{O}$)
in
- 800ml Aqua dest. gelöst

Anschließend wurde die Pufferlösung mit NaOH (2M) auf einen pH von $7,4$ eingestellt und mit Aqua dest. auf 1.000ml aufgefüllt.

2.2.4.3 2,5% Glutardialdehyd (GA)

Zur Herstellung einer transkardialen Perfusionslösung wurden:

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

2.2.5 Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie

2.2.5.1 Nachfixierung

Die Nachfixierung erfolgte mit 1% Osmiumtetroxid in saccharosehaltigem, 0,1M Natriumphosphatpuffer bei 4°C für 30 Minuten. Dazu wurden:

Stammlösung A:

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

Stammlösung B:

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

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

2.2.5.2 Dehydrierung

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

2.2.5.3 Polymerisierung

Stammlösung A:

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

Stammlösung B:

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

Die gebrauchsfertige Lösung bestand aus 4 Teilen Lösungen A, 6 Teilen Lösung B und 2 % Accelerator (= 2,4,4-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol).

2.2.5.4 Färbung

Zur Herstellung der Lösung wurde:

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

2.2.5.5 Kontrastierung

Zur Herstellung der Kontrastierungslösung wurden:

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

Zur Herstellung der Bleicitrat-Arbeitslösung nach Reynolds wurden:

- 1,33g Blei-II-Nitrat und
- 1,76g Tri-Natriumcitrat Dihydrat zunächst in
- 30ml Aqua dest. gelöst, mit NaOH (1M) klar titriert und auf
- 50ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

2.2.6 Eingesetzte Tiere

In den *in vivo* Versuchen wurden insgesamt 10 Mäuse eingesetzt, nämlich:
4 weibliche, 12 Wochen alte, ER α KO Mäuse (Stamm B6.129P2-Esr1^{tmKsk}/J)
3 weibliche, 12 Wochen alte, ER β KO Mäuse (Stamm B6,129 P2-Esr2^{tm1Unc}/J)
3 weibliche, 12 Wochen alte Wildtyp-Mäuse als Kontrollen

Diese stammten aus den (lizensierten) Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland und waren dort mit phytoöstrogenfreiem Futter aufgezogen worden.

Die für die *in vitro* Versuche genutzten Gewebeschnitte stammten von insgesamt 4 Wistar-Ratten, nämlich:

3 weiblichen, vier Tage alten Ratten; Versuch A

1 weibliche, fünf Tage alte Ratte; Versuch B

Die Tiere waren registriert und stammten aus der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg - Eppendorf. Alle Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen (12/12 h Licht-Dunkel-Zyklus, rel. Luftfeuchtigkeit 50-60 %, 20 ± 1 °C) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (sniff® R/M-H Extrudat, Alleinfutter für die Ratten- und Mäusehaltung; sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gehalten. Die Haltung der Tiere und die Durchführung der Versuche erfolgte unter Beachtung aller gängigen Rechtsvorschriften und war von der zuständigen Behörde für Umwelt und Gesundheit in Hamburg, Referat Tierschutz, genehmigt worden.

2.2.7 Präparation der Hippocampi

Die *in vivo* und *in vitro* Versuche unterschieden sich hinsichtlich der gewählten Methoden zur Gewinnung und Verarbeitung der Hippocampi. Für die *in vivo* Untersuchungen an ER α - und ER β -KO-Mäusen wurden, um die Verhältnisse in den Hippocampi lebender Tiere möglichst zeitnah zu erfassen, die Hippocampi durch transabdominale und transkardiale Perfusion der tief narkotisierten Tiere mit Puffer und Fixationslösung bereits *in situ* fixiert, bevor sie operativ entnommen wurden. Für die *in vitro* Untersuchungen an Rattenhippocampi wurden aus 375 μm großen hippocampalen Schnitten Slicekulturen angelegt und mit den interessierenden Substanzen 11 Tage lang kultiviert. Die weitere Verarbeitung der in den *in vivo* und *in vitro* Versuchen gewonnenen Präparate folgte dem üblichen Schema [ROBINSON et al. (2013)]:

- 1 Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid zur Stabilisierung von Proteinstrukturen bzw. Membranen.
- 2 Entwässerung
- 3 Einbettung in (Epoxidharz-basiertes) Kunstharz mittels einem Glycidethergemisch (früher Epon 820). Dies ermöglicht nicht nur die Anfertigung der

Schnitte, sondern die Imprägnierung stabilisiert auch zelluläre Strukturen, die sonst im Vakuum des Elektronenmikroskops kollabieren würden.

- 4 Schneiden des in Kunstharz eingeschlossenen Materials: Benötigt wird ein Ultramikrotom mit Diamantmesser, mit dem Schnittdicken von 15-100 *nm* erzielt werden können.
- 5 überführung der Schnitte auf einen Objektträger (Schlitzträger) aus nicht beschichteten Kupfernetzchen.
- 6 Kontrastierung durch "Färbung" der Präparate mit Schwermetallionen (Uranylacetat-, Bleicitratlösung). Dabei absorbieren unterschiedliche Gewebestrukturen die Metallsalzlösung unterschiedlich stark ("positive staining")

2.2.8 Gewinnung der Hippocampi von KO- und Wildtypmäusen

Nach einer 1-wöchigen Akklimationierungsphase wurden am Explantationstag die insgesamt 12 Wochen alte KO- oder Wildtyp-Mäuse durch eine intramuskuläre Ketamin-Xylazin-Injektion in tiefe Narkose versetzt. Dann wurden sie auf einer Unterlage auf dem Rücken liegend fixiert, um die Herzspitze freizulegen. Dazu musste die Bauchdecke rasiert, eröffnet und Peritoneum und Diaphragma durchtrennt werden. In die linke Herzkammer wurde eine Kanüle eingebracht. Über diese Kanüle, die an einem Perfusor angeschlossen war, wurde das Blut durch eine Phosphatpufferlösung (PBS) Lösung aus den Kreislauf des Tieres heraus gewaschen und in einem weiteren Schritt durch eine spezielle Perfusionslösung (200ml 2,5% Glytaraldehyd (GA) ausgetauscht. So war das Gehirn nach ca. 15 Min. vorfixiert. Um die Hippocampi zu gewinnen, trennte man mit einer Schere den Kopf vom Rumpf der Tiere und eröffnete durch einen median angesetzten sagittalen Schnitt mit einer Schere am Nacken beginnen schichtweise erst die Kopfhaut, dann das Schädeldach. Nun konnte man den Schädel entlang der Sagittalnaht nach lateral aufklappen, um das Gehirn vorsichtig mit einem Heidemannspatel heraus zu hebeln. Auf einer weichen, mit PBS getränkten Unterlage wurde das Stammhirn und das Kleinhirn mit Hilfe eines Skalpell scharf abgetrennt und dann das relativ weiche Gehirngewebe durch den Heidemannspatel in seine zwei Hemisphären aufgetrennt, um den rechten und linken Hippocampus zu entnehmen. Vor allem um ein vollständiges Eindringen der Lösungen in das Gewebe zu gewährleisten wurden Letztere noch einmal in einen dorsalen (lat. dorsum = Rücken) und einen

ventralen (lat. venter = Bauch), bzw. apikalen und temporalen (Abb. 1.9c)) Anteil geteilt und bis zur weiteren Bearbeitung in 2,5 % GA (in 0,1 M PB, pH 7,4) in einem Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt. Zur Nachfixierung wurden die Hippocampusgewebe für 2 h in mit 1 %ig Osmiumtetroxid (in 0,1M PB) befüllte Rollschnappgläsern gelegt. Den Präparaten wurde dann in einer aufsteigende Alkoholreihe das Wasser entzogen. Dazu wurden sie nacheinander für jeweils 10 Minuten in 35 %, 50 %, 70 %, 95 %ige Ethanollösung und dann zweimal für 15 Minuten in 100%iges Ethanol überführt. Zur vollständigen Entwässerung wurden sie anschließend noch für zweimal 15 Minuten in Propylenoxid eingelegt. Um die Gewebe später für die elektronenmikroskopische Untersuchungen schneiden zu können, erfolgte eine Einbettung mit Glycidether (früher Epon 820) in Anlehnung an das Verfahren nach Luft [LUFT (1961)]. Dazu wurden die für 30 Minuten mit Propylenoxid behandelten Gewebestücke zuerst für 2 h in ein 1:1, dann in ein 1 : 3 Gemisch aus Propylenoxid und Glycidether plus 2 % 2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30, Epoxyaccelerator) gegeben und in Einbettungsformen aus Silikon überführt und über Nacht in einem Brutschrank bei 68 °C zur Aushärtung gebracht. Für die elektromikroskopische Untersuchung wurden die entstandenen Gewebelöcke wie unter Abschnitt 2.2.10 beschrieben weiter bearbeitet.

2.2.9 Gewinnung der Rattenhippocampi und das Anlegen einer hippocampalen Slicekultur mit anschließender *in vitro* Fixierung

Für *in vitro* Untersuchungen wurden Slicekulturen nach der Methodik von Stoppini [STOPPINI et al. (1991)] angelegt. Dafür wurden die Hippocampi von insgesamt vier Wistar-Ratten verwendet. Es wurden in einem Versuch eine fünf Tage alte weibliche Ratte verwendet und in einem weiteren Versuch drei weibliche, vier Tage alte Tiere (siehe Tabelle 2.1). Auf einem speziellem Mikrotom wurden unter semisterilen Bedingungen Schnittpräparate (Slices) aus den Rattenhippocamie mit einer Schnittdicke von 375 μm angefertigt. Ihre 11 tägige Kultivierung mit Inkubations- und verschiedenen Versuchslösungen erfolgte auf speziellen Membranen in Flakon 6 - Well Kulturplatten. Gelagert wurden die Platten in einem Inkubator bei 37 °C und einem Gasgemisch von 5 % CO₂ und 95 % O₂. Diese Methode ermöglicht

	Konzentration/Behandlung	Funktion
Versuch A		
Gruppe 1	Inkubationsmedium	Kontrolle
	$10^{-7} M$ Cholesterol	Substrat für Östrogensynthese
	$10^{-7} M$ ICI	ER α plus β - Antagonist
	$10^{-7} M$ Cholesterol+ $10^{-6} M$ ICI	Substrat + ER α/β - Antagonist
	$10^{-7} M$ Letrozol	Aromatase-Inhibitor
	$10^{-7} M$ Letrozol+ $10^{-7} M$ ICI	Aromatase- + ER-Hemmung
Gruppe 2	Inkubationsmedium	Kontrolle
	$10^{-6} M$ MPP	ER α - Antagonist
	$10^{-6} M$ PHTPP	ER β - Antagonist
	$10^{-6} M$ MPP + $10^{-6} M$ PHTPP	ER α/β - Antagonist
	$10^{-7} M$ Cholesterol + $10^{-6} M$ MPP + $10^{-6} M$ PHTPP	Substrat + ER α/β - Antagonist
	$10^{-7} M$ Letrozol + $10^{-6} M$ MPP + $10^{-6} M$ PHTPP	Aromatase- + ER-Hemmung
Versuch B		
	Inkubationsmedium	Kontrolle
	$10^{-6} M$ PHTPP	ER β - Antagonist
	$10^{-7} M$ PHTPP + $10^{-7} M$ Letrozol	ER β - Antagonist + Aromatase-Inhibitor

Tabelle 2.1 Behandlung der Slicekulturen. Die beiden Versuchsreihen A und B unterscheiden sich nur hinsichtlich des Alters der eingesetzten Ratte(n):

Versuch A; 3 weibliche, vier Tage alte Wistar-Ratten

Versuch B; 1 weibliche, fünf Tage alte Wistar-Ratte

es, gewebetypische Zellorganisationen *in vitro* über einen längeren Zeitraum zu erhalten, um sie manipulieren und untersuchen zu können. Die gewählte Schnitt- bzw. Slicedicke richtet sich nach Alter, Art und Verwendungszweck des Tieres am Explantationstag. Durch physiologische Ausdünnung in Kultur gehaltener Slices, flachen die verschiedenen Zellschichten im Verlauf der Kultivierung ab (hier anfangs $375 \mu m$ dicke Slices auf $200-300 \mu m$ zum Zeitpunkt der Einbettung).

Am Tag Null des Versuches wurden die Ratten durch eine schnelle Rückenmarksdurchtrennung mit Hilfe einer Schere getötet und dekapitiert. Kopfhaut und Schädeldach wurden vom Nacken her beginnend mit einem medianen Sagittalschnitt eröffnet und das Gehirn mit Hilfe eines Heidemannspatels herausgeholt. Dann

wurde das Gehirn auf einer kleinen, mit PBS getränkten Unterlage abgelegt, mit einem Skalpell vom Stamm- und Kleinhirn befreit und mit einem Heidenmanspatel in seine zwei Gehirnhälften aufgetrennt, um die Hippocampi herauszulösen. Durch die Verwendung eines Heidemannspatels anstelle eines schneidenden Skalpells lassen sich bei der Isolierung des relativ weichen Hippocampusgewebes die zusammengehörenden Gehirnstrukturen leichter unversehrt auseinander drücken. Die so gewonnenen Hippocampi wurden auf dem Gewebeschnaider (Tissue Chopper) des Institutes entlang der longitudinalen Achse in $375\ \mu\text{m}$ dünne Slices geschnitten. Diese wurden in mit Präparationsmedium gefüllten Petrischalen gesammelt und mit Hilfe einer Lupe auf Unversehrtheit, besonders der Ammonshornregion hin untersucht. Anschliessend wurden sie sofort unter einer Bench randomisiert auf Biomembranen aufgebracht und in die Näpfe (Wells) von 6-Well-Kulturplatten verteilt, in denen sich jeweils 1 ml des Inkubationsmediums befand. Der pH Wert war in Abhängigkeit des Explantationsalters der Slices auf pH 7,25 eingestellt. Pro Rattenhippocampi erhielt man ca. 20 Slices. Pro Membran und Well konnten 3-5 Slices aufgenommen werden. Die speziellen Membranen waren steril und porös. Sie hatten den Zweck, ein Übereinanderlagern der Slices zu verhindern und eine ausreichende Versorgung der Slices mit Medium und Sauerstoff zu gewährleisten, indem sie diese an der Oberfläche fixierten. Während der 11 tägigen Inkubation wurde an jedem zweitem Tag (Tag 1, 3, 5, 7, 9 und 11 des Versuches) das Inkubationsmedium erneuert. Während der ersten fünf Versuchstagen (Tag 0 - 5) hatten die Slices Zeit, sich fest an die Membran anzuheften. An den Tagen 5, 7, 9 und 11 wurden die Wells zusätzlich mit jeweils 1ml einer der in Tabelle 2.1 beschriebenen Versuchslösung beimpft. Die nur mit Inkubationsmedium gefüllten Wells diente als Kontrolle. Für Versuch A wurden 4 Kulturplatten mit je sechs Wells angelegt. Für den Versuch B wurde eine Kulturplatte mit je sechs Wells angelegt. Jeweils zwei Wells wurden identisch behandelt. Bei den gewählten Behandlungsbedingungen und Konzentrationen handelte es sich um in der Literatur beschriebene und sich in vorherigen Versuchen des Institutes als am geeignetsten erwiesene Angaben ([RUNE et al. (2006)]). An Tag 12 wurden die Gewebe unter einer Bench zweimal bei $37\ ^\circ\text{C}$, einmal bei $4\ ^\circ\text{C}$ mit 0,1 M Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, pH 7,4) und einmal bei $4\ ^\circ\text{C}$ in Phosphatpuffer (PB; pH 7,4) gewaschen. Anschliessend erfolgte eine drei stündige Fixierung mit 2,5% GA in 0,1 M PB bei $4\ ^\circ\text{C}$. Zuletzt erfolgte für mindestens dreißig Minuten eine nachfixiert in einer 1 %igen Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1M PB plus Saccharose bei $4\ ^\circ\text{C}$ wurden.

Durch Dehydrierung in einer aufsteigende Alkoholreihe wurde den Präparaten das Wasser entzogen. Dazu wurden die Wells nacheinander für jeweils 10 Minuten mit 35%, 50% und 70%iges Ethanol gefüllt. Dann wurden die Slices mechanisch von den Membranen gelöst und in Rollschnappgläser überführt, um einmal 10 Minuten mit 95%iges und für einmal 15 Minuten in 100 %igem Ethanol getränkt zu werden. Zur vollständigen Entwässerung wurden sie anschließend noch einmal für mindestens 15 Minuten in Propylenoxid eingelegt. Um die Slices am Mikrotom Schneiden zu können, erfolgte eine Einbettung mit Glycidether (früher Epon 820) in Gelatinekapseln in Ahnlehnung an das von Luft [LUFT (1961)] verbesserte Verfahren. Dazu wurden die für 30 Minuten mit Propylenoxid behandelten Gewebestücke, für 3 Stunden in ein 1 : 3 Gemisch aus Propylenoxid und Glycidether plus 2 % 2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30, Epoxyaccelerator) gegeben, anschliessend durch einen dünnen Film Glycidether auf einer Silikonplatte fixiert, durch eine mit Blei beschwerter Alufolie abgedeckt und über Nacht in einem Brutschrank bei ca. 68 °C ausgehärtet. Die so entstandenen gehärteten Slicesblöcke wurden zur Anfertigung von Schnitten für die Elektronenmikroskopie mit Glycidether gefüllte Gelatinekapselhälfte überstülpt und erneut über Nacht zum Aushärten gebracht. Für die elektromikroskopische Untersuchung wurden die Blöcke wie unter Abschnitt 2.2.10 beschrieben weiter bearbeitet.

2.2.10 Elektromikroskopische Untersuchung der Hippocampusgewebe und Anfertigung von Bildern zur Analyse der synaptischen Plastizität

Für die elektromikroskopische Untersuchung mussten $0,1\mu\text{m}$ feine Ultradünnschnittpaare von der CA1-Region (mit Stratum pyramidale und Stratum radiale) der Hippocampi angefertigt werden. Dafür mußten die aus den *in vivo* und *in vitro* Versuchen stammenden und in Kunstharz eingebetteten Präparate weiter bearbeitet werden.

Zuerst mußte unter stereomikroskopischer Kontrolle, mittels einer scharfen Klinge das Gewebe grob wieder aus dem oberen Teil des Kunstharzblockes befreit werden. So konnte der untere Teil eingespannt werden und von Gewebe Schnitte gewonnen werden. Um sich an die gesuchte Regionen (oberen und mittleren Drittel der CA1

Region) heran zu tasten, wurden zur Übersicht an einem Mikrotom ein $1\mu m$ dicker Semidünnschnitte angefertigt werden, der in einer Toluidinblaulösung frei schwimmend bei $80\text{ }^{\circ}C$ gefärbt, auf einen Objektträger gezogen, mit DePex eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet wurde. Die Semidünnschnitte dienten zuerst der Orientierung beim Herauspräparieren der gewünschten Geweberegion. Hatte man die geeignete Stelle gefunden und aus dem Kunstharzblock getrimmt, wurden $0,1\mu m$ feine Ultradünnschnitte für die elektromikroskopische Betrachtung angefertigt und ein weiterer Semidünnschnitt als Orientierungshilfe beim später Mikroskopieren der Ultradünnschnitte am Elektronenmikroskop angefertigt. Am Ultramikrotom (Reichert - Jung OmU3) wurden Serien von $0,1\mu m$ feinen Ultradünnschnitten angefertigt. Jeweils zwei aufeinander folgende Ultradünnschnitte bildeten ein Paar und wurden mit Hilfe einer Platindrahtöse nebeneinander und in gleicher Ausrichtung auf einen Schlitzträger überführt. Bei diesen Schlitzträgern handelte es sich um runde ($\emptyset 3mm$), Kupfernetzchen (Grid) mit einem Gitterabstand von 200 mesh.

Die Kontrastierung der Ultradünnschnitte für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Bleicitrat und anschliessend mit Uranylacetat (nach der Methode von Reynolds 1993[REYNOLDS (1963)]).

Daraufhin wurden mit einem Elektronenmikroskop (Philipps CM 100, PW 6021; Vergrößerung $6,6 \times 10^3$) von allen Schnittpaaren Aufnahmen von verschiedenen Regionen gemacht, wobei auf beiden Schnitten eines Paares möglichst exakt dieselben Stellen fotografiert wurde. Dabei wurden, um das Risiko von Fehlern beim späteren Auszählen der Synapsen zu minimieren, Regionen ausgespart, die viele störende Elemente wie Blutgefäße und große Dendriten enthielten. Als Orientierungshilfe wurde parallel der zugehörige Semidünnschnitt im Lichtmikroskop betrachtet.

Da die so erhaltenen Negative der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei der Anfertigung von Positiven auf DIN A4 messendem Fotopapier noch um den Faktor 3 vergrößert wurden, betrug die Gesamtvergrößerung $19,8 \times 10^3$, d.h. $1cm$ auf den Positiven entsprach $0,5\mu m$ im Dünnschnitt.

2.2.11 Synapsenzählung und Auswertung

Die Auszählung der Synapsen erfolgte unter Beachtung folgender Prinzipien:



Abbildung 2.1 Synapsenaufbau. Die Spinesynapsen wurden u.a. anhand von synaptischen Vesikeln in den Axonausläufern (präsynaptische Membran) und der postsynaptischen elektronendichte der denditischen Spinemembranen und einem synaptischen Spalt (Pfeil) eindeutig identifiziert.

- 1 Die Gewinnung der Hippocampi und die Präparation der Ultradünnschnitte erfolgte durch das Technische Personal des Institutes die mit der Studie nichts zu tun hatten. Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen (EM Positive), die Zählung der Synapsen und Auswertung der Ergebnisse erfolgte verblindet, d.h. der Untersucher wusste nicht, aus welcher Gruppe die Präparate stammten.
- 2 Es wurden nur exzitatorische, asymmetrische Spine-, keine Schaftsynapsen gezählt.
- 3 Als Spinesynapsen wurden nur Strukturen identifiziert, die einen gut einsehbaren synaptischen Spalt, präsynaptische Vesikel im Axonende bzw. Dendriten, sowie die postsynaptische elektronische Verdichtung erkennen ließen (siehe Abb. 2.1) [NIMCHINSKY et al. (2002); GUILLERY (2000); WESTRUM und BLACKSTAD (1962)].
- 4 Es wurden nur die Bereiche maximaler Synapsendichte ausgezählt, um das Risiko übermäßiger prozentualer Abweichungen von der tatsächlichen Synapsendichte zu minimieren.

Die Dichte der Spinsynapsen im untersuchten Gewebe wurde ohne weitere Volumenkorrektur gemäß dem Institutsprotokoll (kurz beschrieben in [PRANGE-KIEL et al. (2008); ZHOU et al. (2014)]) ermittelt, wobei aber ein systematischer Zählfehler ("bias") auf Grund von Schwankungen der Synapsengröße durch Verwendung der "disector"-Technik [STERIO (1984)] korrigiert wurde [LERANTH et al. (2004, 2000)]. Dazu wurden zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen (EM Bildpaare also EM

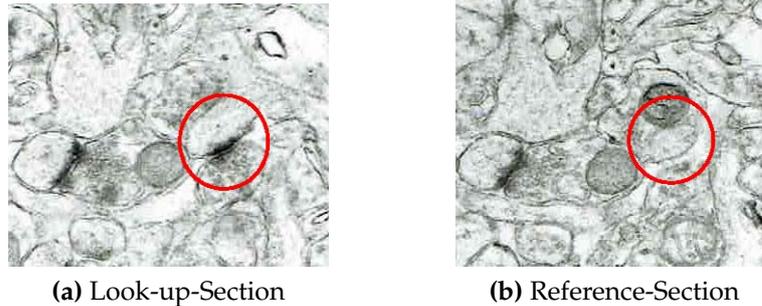


Abbildung 2.2 Auswertung von EM Bildern.

Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen von dem Stratum radiatum der CA1-Region zweier aufeinander folgender Bildpaare. Es wurden nur die Synapsen gezählt, die vollständig auf einem Bild, nicht aber mehr in dem anderen Bild eines Paares zu sehen waren (roter Kreis).

Positive) zweier aufeinander folgender, (möglichst) identisch positionierter Ultra-dünnschnittaufnahmen (EM Negative) ausgewertet, wobei ausschließlich jene Spinesynapsen gezählt wurden, die nur auf dem einen Bild ("reference section") oder auf dem anderen Bild ("look-up section") gesehen wurden, nicht aber auf beiden (siehe Abb. 2.2).

Praktisch ging man dabei so vor, dass zunächst von den (kodierten) Negativen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen Positive im Format DIN A4 angefertigt wurden. Dann wurden alle Spinesynapsen, die auf der "look-up section" des interessierenden Schnittpaares eindeutig identifiziert werden konnten, auf einer darüber gelegten transparenten Folie farbig markiert, ebenso einige charakteristische Bildmerkmale wie myelinisierte Fasern, große Dendrite oder Blutgefäße. Anschließend wurde die Folie auf das Positiv der "reference section" gelegt, und mit Hilfe der erwähnten charakteristischen Bildmerkmale so ausgerichtet, dass identische Bildausschnitte von look-up- und reference-section möglichst deckungsgleich übereinander lagen. Dazu musste die Folie zwischendurch immer wieder leicht verschoben werden. So konnten nun die Synapsen andersfarbig auf der Folie markiert werden die vorher schon auf der "look-up section" zu sehen waren. Mit einer dritten Farbe makierte man zuletzt noch Synapsen, die nur auf der "reference-" nicht aber auf der "look-up section" vorhanden waren. Schließlich wurden die Markierungen gezählt, die nur auf einer Ebene gesehen wurden. Dazu wurde ein Zählquadrat der Größe $16,4 \times 16,4$ cm so auf die Folie aufgelegt, dass ein Bereich maximaler Synapsendichte erfasst wurde. Bei einer

Gesamtvergrößerung von 2×10^4 entsprach dies einem Zählvolumen im Hippocampusgewebe von $8\mu\text{m} \times 8\mu\text{m} \times 0,1\mu\text{m} = 6,4\mu\text{m}^3$. Die weitere Auswertung basierte auf der Annahme, dass die Verteilung der Synapsen ausreichend homogen und die insgesamt ausgezählte Fläche so groß sei, dass, bezogen auf die gleiche Zählfläche, in allen Schnittebenen die Anzahl der "intrasektionalen" Synapsen, die also nur die betrachtete Referenzschnittebene, aber weder die vorhergehende noch die folgende ("look up") Schnittebene durchstoßen, gleich ist und die Anzahl der "intersektionalen" Synapsen, die zwei Schnittebenen (d.h. die Referenzschnittebene und die vorhergehende bzw. nachfolgende ("look up") Schnittebene) gleichzeitig durchstoßen, ebenfalls gleich, aber nicht notwendigerweise identisch mit der Dichte intrasektionaler Synapsen ist. Weiterhin muss bedacht werden, dass für die Berechnung der Synapsendichte in einer Schnittebene (hier: Referenzschnittebene) die intersektionalen Synapsen mit dem Zährefaktor 0,5 zu versehen sind, da sie gleichzeitig zwei Schnittebenen angehören. Nur die intrasektionalen Synapsen werden voll gewertet. Allerdings kann im Bild eines Schnittes nicht zwischen intra- und intersektionalen Spinesynapsen unterschieden werden. Daher wurde zusätzlich zur Referenzschnittebene (A) auch die "look up"-Schnittebene (B) mit in die Auswertung einbezogen (siehe Abb. 2.3).

Vorausgesetzt, dass in einer Reihe konsekutiver Schnitte die Synapsendichte zwischen allen Schnittpaaren gleich ist, kann die Formel (I) für die (flächenbezogene) Synapsendichte $D_f(R)$, in der die Anzahl intersektionaler Synapsen zwischen Referenz- und vorheriger („preceding“) Schnittebene (P) nicht bekannt ist, durch die Formel II) ersetzt werden, in der alle Parameter gezählt werden können:

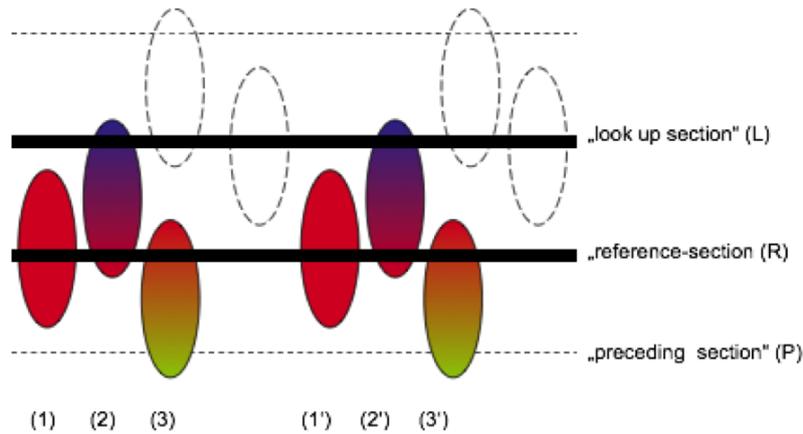


Abbildung 2.3 Bestimmung der Synapsendichte (stark vereinfachtes Beispiel). Im dargestellten Zählbereich des Referenzschnittes ("reference section") (R) werden insgesamt 6 Synapsen gezählt, zwei intrasektionale Synapsen 1 und 1', sowie vier intersektionale Synapsen 2, 2', 3 und 3'. Da die intersektionalen Synapsen, da sie jeweils zwei Schnittebenen angehören, nur halb zuzählen sind, beträgt die tatsächliche Synapsenzahl im Zählbereich von (R) nur $N=2+4/2=4$. Den selben Wert erhält man auch, wenn man von den insgesamt gezählten sechs Synapsen die Anzahl der Synapsen (2 und 2') abzieht, die man sowohl in der Referenz- als auch in der look-up-Schnittfläche wiederfindet: $N=6-2=4$.

$$D_f(R) = \frac{[n_s(R) + 0,5n_s(R - L) + 0,5n_s(R - P)]}{A} \quad (2.1)$$

($n_s(R - P)$ ist nicht bekannt)

$$D_f(R) = \frac{[N_s(R) - n_s(R - L)]}{A} \quad (2.2)$$

- $D_f(R)$ = flächenbezogene Synapsendichte in der Referenzschnittebene
- A = fausgezählte Fläche
- $N_s(R)$ = im Referenzschnitt innerhalb der Zählfläche gezählte Synapsenzahl
- $n_s(R - L)$ = Anzahl intersektionaler Synapsen zwischen Referenz- und look-up-Schnittebene (L)
- $n_s(R - P)$ = Anzahl intersektionaler Synapsen zwischen Referenz- und vorheriger Schnittebene (P)

Um Fehler auf Grund einer ungleichen Verteilung von Synapsendichte und -größe zu kompensieren, wurde die gesamte Prozedur unter Vertauschung von Referenz-

und „look-up“-Schnittebene wiederholt. Aus den Zählwerten beider Durchgänge wurde der Mittelwert gebildet, der dann in die weitere Auswertung einfließt.

2.2.11.1 Auswertung

Die Anzahl der bei den *in vitro* Versuchen ausgezählten und ausgewerteten elektronenmikroskopischen Bildpaare ergab sich wie folgt:

***In vitro* Rattenversuch**

Von jeweils drei Slices eines Wells wurden Serien von Ultradünnschnitten angefertigt, von denen jeweils ein Paar aufeinanderfolgender Ultradünnschnitte als „reference section“ und „look up-section“ für die Auszählung verwertet wurde. Von diesen Paaren wurden unter dem Elektronenmikroskop Aufnahmen von 4 verschiedenen, auf beiden Schnitten (möglichst) identischen Regionen angefertigt. So entstanden 4 auszuwertende Bildpaare pro Slice, also 12 pro Versuchsbehandlung. Diese wurden dann nach dem Disector-Verfahren ausgezählt.

***in vivo* Mäuseversuch**

Von insgesamt 10 Mäusen (vier ER α -KO-, drei ER β -KO-, und drei Wildtyp-Mäuse) wurden die Hippocampi isoliert und pro eingebettetes Hippocampusgewebe eine Serie von Ultradünnschnitten angefertigt, von denen jeweils ein Paar aufeinanderfolgender Ultradünnschnitte als „reference section“ und „look up-section“ für die Auszählung verwertet wurde. Von diesen Paaren wurden unter dem Elektronenmikroskop Aufnahmen von 10 verschiedenen, auf beiden Schnitten (möglichst) identischen Regionen angefertigt. Diese 10 Bildpaare pro Ultradünnschnittpaar wurden dann nach dem Disector-Verfahren ausgezählt.

Statistik

Aus diesen Ergebnissen wurden zunächst statistische Kenndaten (Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes (SEM), Median, 25/75 % Quartile und Skewness ermittelt. Obwohl die Werte für die standardisierte Skewness (in den meisten Fällen) keine Hinweise auf starke Abweichungen von der Normalität lieferte (d.h., die Werte lagen nicht außerhalb des Bereichs von -2 bis $+2$), erfolgte dann wegen der geringen Versuchsgruppenstärke die Prüfung auf Signifikanz nicht nur mittels t-Test und ANOVA, sondern zusätzlich auch mit Hilfe eines parameterfreier Tests (Mann-Whitney U-Test). Der Mann-Whitney U-Test wird für den Vergleich zweier Gruppen herangezogen. Der Kruskal-Wallis-Test dieht dem Vergleich mehrerer Gruppen. Ein $p < 0,05$ galt als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der *in vivo* Versuche an knockout Mäusen

In den Untersuchungen an knockout (KO) Mäusen wurden die Effekte des lebenslangen Fehlens des Östrogenrezeptors alpha ($ER\alpha$) oder des Östrogenrezeptors beta ($ER\beta$) auf die hippocampale Synapsenbildung untersucht. Als Kontrolle dienten Wildtypmäuse, die beide Östrogenrezeptoren besitzen.

In einem Vorversuch wurde geschaut, ob es hinsichtlich der rechten und linken Hippocampi Unterschiede in der Synapsenanzahl gibt. Die Tabelle 3.1 zeigt die Ergebnisse des Zweistichprobenvergleichs der Gruppen "Links" und "Rechts" (Synapsenbildung in der linken oder rechten Hippocampushälfte aller untersuchten $ER\alpha$ -KO-, $ER\beta$ -KO- und Wildtypmäuse) mittels abhängigem t-Test und (wegen der geringen n-Zahl) Mann-Whitney-Rangtest. Die geringen Unterschiede zwischen den Mittelwerten und Medianen beider Gruppen und einem p-Wert von 0,71 (t-Test) bzw. 0,97 (Mann-Whitney-Test) zeigen, dass kein Unterschied zwischen dem linken und dem rechten Hippocampus hinsichtlich der Synapsendichte besteht.

Daher erfolgte die weitere Auswertung der *in vivo* Mäusedaten mittels einfaktorieller ANOVA mit dem Faktor "Gruppe" sowie - wegen der geringen Probenzahl und der unterschiedlichen Standardabweichungen beider Gruppen - einem Kruskal-Wallis-Test. Dabei wurden die Synapsenzahlen der Slices aus den linken und rechten Hippocampus vereinigt.

Die Tabelle 3.2 zeigt die Summenstatistik und die Ergebnisse von ANOVA und Kruskal-Wallis-Test hinsichtlich des Vergleichs von $ER\alpha$ -KO-, $ER\beta$ -KO- und Wildtypmäusen. Die ANOVA belegt dabei einen hoch signifikanten Einfluss des Faktors

Gruppe	Links	Rechts
n	10,00	10,00
Mittelwert	12,77	12,18
Median	11,35	12,15
Standardabweichung	4,09	2,76
25% Pctl.	9,80	10,50
75% Pctl	16,60	12,50
Std. skewness	1,08	1,43
$P_{(t\text{-Test})}$	0,710	
$P_{(Mann\text{-Whitney})}$	0,970	

Tabelle 3.1 Vergleich der Synapsendichten ($n/6,4\mu m^3$) in der CA1-Region von rechtem und linkem Hippocampus aller untersuchten Kontroll-, $ER\alpha$ -KO- und $ER\beta$ -KO-Mäuse. Da auf Grund der Datenlage Normalverteilung nicht abgelehnt werden kann, die Standardabweichungen einzelner Versuchsgruppen sich z.T. aber erheblich unterscheiden können (>Faktor 3), erfolgte die statistische Versuchsauswertung sowohl nach parametrischen als auch nach nicht-parametrischen Verfahren. Daher sind in der Tabelle neben der Summenstatistik die Ergebnisse des ungepaarten t-Tests und des Mann-Whitney U-Tests angegeben. Dabei bedeutet ein $p < 0,05$ „Signifikanz“.

“Gruppe” auf die Synapsendichte (globaler p-Wert = 0,001), der durch einen Kruskal-Wallis-Test bestätigt wurde ($p = 0,0181$). Die Ergebnisse der Summenstatistik und der multiplen Vergleiche der drei Faktorstufen von “Gruppe” ($ER\alpha$, $ER\beta$ und Kontrolle) ist in Abb. 3.1 als Balkendiagramm dargestellt. Darin bedeuten gleiche Buchstaben über den Balken “keine Ablehnung” der Nullhypothese (“keine Signifikanz”). Diese Balkengrafik zeigt keinen Effekt (des Fehlens) vom $ER\alpha$ auf die Synapsendichte *in vivo* während das Fehlen des $ER\beta$ die Synapsendichte in den Mäusehippocampi sogar signifikant erhöhte.

a) Synapsendichte (n/6,4 μm^3)						
Gruppe	n	Mittelwert	Standard Abweichung	Standard Skewness	P _(ANOVA)	multiple Vergleich(LSD)
Kontrollen	3	19,6	0,44	1,15	0,001	a
ER α -KO-Mäuse	4	22,63	1,67	-0,84		a
ER β -KO-Mäuse	3	33,4	4,04	-1,06		b
b) Synapsendichte (n/6,4 μm^3)						
Gruppe	n	Median	25% Pct.	75% Pct.	P _(Kruskal-wallis)	
Kontrollen	3	19,4	19,30	20,10	0,018	
ER α -KO-Mäuse	4	22,95	21,45	23,80		
ER β -KO-Mäuse	3	35,00	28,80	36,40		

Tabelle 3.2 Vergleich der Synapsendichten in der CA1-Region der Hippocampi von Wildtyp- (Kontroll-), ER α -KO- und ER β -KO-Mäusen. Die Synapsendichte wurde anhand von EM-Bildern (Zählvolumen 6,4 μm^3) ausgezählt (siehe Materialien und Methoden). Da auf Grund der Datenlage Normalverteilung nicht abgelehnt werden kann, die Standardabweichungen einzelner Versuchsgruppen sich z.T. aber erheblich unterscheiden können (>Faktor 3), erfolgte die statistische Versuchsauswertung sowohl nach parametrischen als auch nach nicht-parametrischen Verfahren. Daher sind in der Tabelle neben der Summenstatistik die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA und des Kruskal-Wallis-Test angegeben. Ein p-Werte <0,05 bedeutet hier „globale Signifikanz“, zwischen Versuchsgruppen, die in der Spalte „multiple Vergleiche“ einen oder mehrere Buchstaben gemeinsam haben, bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.2 Auswertung der *in vitro* Versuche mit Slicekulturen von Rattenhippocampi

In den Slicekulturexperimenten (Tabelle 2.1, Versuch A) wurde die Bedeutung des Substratangebotes (Östrogenangebot) und der Östrogenrezeptoraktivität untersucht. Dabei wurde das Östrogenangebot durch Substratzugabe (Cholesterin) erhöht bzw. erniedrigt durch Hemmung der Synthese mittels des Aromatasehemmers Letrozol. Der Effekt der Östrogenrezeptoren wurde durch Blockierung mittels des ER-Antagonisten ICI (182,780) erfasst.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse mittels ANOVA (Tabelle 3.3a) zeigt einen signifikanten globalen Einfluss der Behandlung auf die Synapsendichte ($p = 0,0146$), das heißt, die Synaptogenese läßt sich durch Veränderungen von Östrogensynthese und/oder Östrogenrezeptoraktivität beeinflussen. Allerdings wird die Bedeutung dieser Aussage durch die geringe Fallzahl des Versuches eingeschränkt. Außerdem

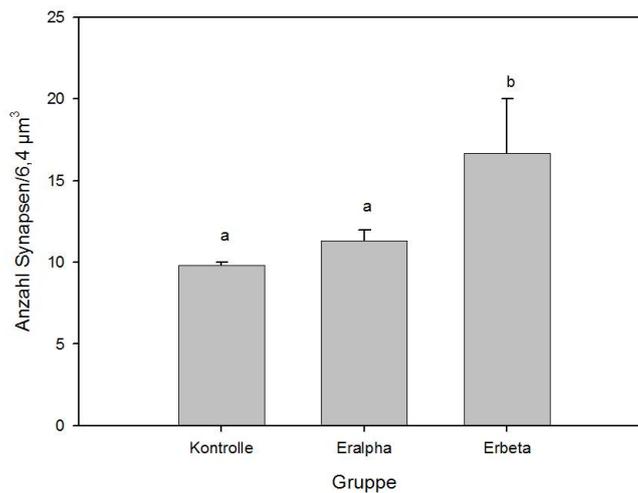


Abbildung 3.1 Die Abbildung zeigt die Synapsendichte in der CA1 Region der Hippocampi weiblicher, 12 Wochen alter Knockout (KO-)Mäuse. Angegeben sind hier die Mittelwerte von jeweils 3 Kontroll und $ER\beta$ -KO- bzw. 4 $ER\alpha$ -KO-Mäusen. Die Synapsendichte wurde anhand von EM-Bildern (Zählvolumen $6,4\mu m^3$) ausgezählt.

lassen sich die Werte der Skewness zwar mit einer Normalverteilung der Daten vereinbaren, doch ist das Verhältnis von kleinster und größter Standardabweichung (>3) für eine ANOVA (die annähernde Varianzgleichheit voraussetzt) zu groß, so dass die globale Signifikanz zusätzlich mit einem Kurskal-Wallis bestätigt wurde ($p = 0,0322$; Tabelle 3.3b).

Die Auswertungsergebnisse sind, zusammen mit den Ergebnissen der multiplen Vergleiche in Abb. 3.2 als Balkengrafik wiedergegeben. Darin bedeuten gleiche Buchstaben über den Balken "keine Ablehnung" der Nullhypothese ("keine Signifikanz").

Erwartungsgemäß führte die Erhöhung des Substratangebotes durch Cholesterolzugabe zu einer relevanten (+39%), wenn auch nicht signifikanten Erhöhung der Synapsendichte.

Der positive Effekt von Cholesterol auf die Synapsenbildung wird durch die gleichzeitige Hemmung der Östrogenrezeptoren durch ICI nur unvollständig aufgehoben, so dass die gleichzeitige Inkubation mit Cholesterol und ICI immer noch eine um 23% höhere Synapsenbildung im Vergleich zur Kontrolle bewirkt (nicht signifikant).

Dagegen reduziert die Hemmung der Östradiolsynthese mit dem Aromatasehemmer Letrozol die Synapsendichte um -32% (nicht signifikant), während die

Hemmung der Östrogenrezeptoren mit ICI die Synapsendichte nur um -16% reduziert (nicht signifikant).

Sowohl Letrozol als auch Letrozol plus ICI bewirken im Vergleich zur Kontrolle einen deutlichen (-29%) wenn auch nicht signifikanten Abfall der Synapsendichte. Dies zeigt, dass auch in der Kontrollgruppe während der Inkubation eine Östrogensynthese aus Cholesterol und die dazu gehörende Synapsenbildung stattgefunden haben muss. Diese hängt stärker vom Substratangebot bzw. der Östrogensynthese ab als von der Rezeptoraktivität, wie der fehlende Effekt des zusätzlichen ICI (Letrozol + ICI) zeigt.

Auch die Beobachtung, dass die Zugabe von ICI einen geringeren Abfall der Synapsendichte bewirkt als Letrozol (-16% versus -29%) belegt - unter der Voraussetzung, dass ICI und Letrozol in einer Konzentration gegeben wurde, die maximale Hemmung bewirkt (Sättigungskonzentration) - den geringeren Effekt der Rezeptorblockierung.

In einer weiteren Reihe von Experimenten (Tabelle 2.1, Versuch A) wurden unterschiedliche Inhibitoren für die Östrogenrezeptoren α (MPP) und β (PHTPP) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse mittels ANOVA (Tabelle 3.4a) zeigt wieder einen signifikanten globalen Einfluss der Behandlung auf die Synapsendichte ($p = 0,001$), das heißt, die Synaptogenese läßt sich über die Östrogenrezeptor α und/oder β -Aktivität und oder über das Substratangebot beeinflussen. Wiederum ist die Bedeutung dieser Aussage durch die geringe Fallzahl des Versuches eingeschränkt. Außerdem lassen sich die zwischen -2 und +2 liegenden Werte der Skewness zwar mit einer Normalverteilung der Daten vereinbaren, doch war das Verhältnis von kleinster zu größter Standardabweichung wiederum >3 , so dass die globale Signifikanz zusätzlich mit einem Kurskal-Wallis-Test bestätigt wurde ($p = 0,049$; Tabelle 3.4b). Die Auswertungsergebnisse sind zusammen mit den Ergebnissen der multiplen Vergleiche in Abb. 3.3 als Balkengrafik wiedergegeben. Darin bedeuten gleiche Buchstaben über den Balken "keine Ablehnung" der Nullhypothese ("keine Signifikanz").

Der Mittelwert der Synapsendichte in den Kontrollgruppen der Slicekulturen aus Versuch A, war mit den Kontrollslicekulturen aus Gruppe 2 (8,33 Synapsen/ $6,4\mu\text{m}^3$) etwas höher als in den Kontrollen aus Gruppe 1 (7,33 Synapsen/ $6,4\mu\text{m}^3$), doch war

der Unterschied nicht signifikant und lag in der Größenordnung der Standardabweichung. Durch Hemmung des Östrogenrezeptors α (MPP) bzw. β (PHTPP) wurde die Synapsendichte um 27% bzw. 37% reduziert. Bei gleichzeitiger Inkubation mit MPP und PHTPP betrug die Reduktion sogar 54%. Postuliert man, dass 1. sich die Blockierung des Östrogenrezeptors α durch MPP und des Östrogenrezeptor β durch PHTPP additiv verhalten und 2. die Beeinflussung der Synaptogenese durch MPP einer durch das PHTPP um 37% verringerten Synaptogenese "aufsitzt", so muss man zur Berechnung der Hemmung durch MPP + PHTPP zunächst die Hemmung durch MPP allein um 9% ($=100\% \times 27\% \times 37\%$) auf 18% verringern. Durch Addition der Hemmung durch PHTPP ergibt sich eine Gesamthemmung von $-(18\% + 37\%) = -55\%$, ein Wert, der dem experimentell bestimmten Wert (-54%) ziemlich nahe kommt. Bei Erhöhung der Östrogenkonzentration durch Zugabe von Cholesterol plus MPP+PHTPP lies sich, obwohl beide Östrogenrezeptoren gehemmt waren, die Synapsendichte im Vergleich zu den nur mit MPP+PHTPP behandelten Slices um 74% erhöhen. Dieser Wert ist 22% niedriger als die Synapsendichte in den Kontrollslices.

Überraschenderweise führte die Hemmung der endogenen Cholesterolsynthese durch Letrozol ohne zusätzliche Inkubation mit Cholesterol in mit MPP+PHTPP behandelten Slices zu keiner Reduktion der Synapsendichte im Vergleich zur Cholesterol+MPP+PHTPP-Gruppe, aber zu einer Erhöhung gegenüber der mit MPP+PHTPP behandelten Gruppe. Dieses Ergebnis ist umso verwunderlicher, als dass im vorigen Versuch die Inkubation ICI behandelter Slices mit Letrozol (vergleichbar mit den MPP+PHTPP- und den Letrozol+PMM+PHTPP- behandelten Slices) zu einer signifikanten Reduktion der Synapsendichte geführt hatte.

Die Mittelwerte der Synapsendichte in den Sliceulturen der Kontrollgruppen war in Versuch 2 mit $8,4 \text{ Synapsen}/6,3 \mu\text{m}^3$ etwas höher als bei den Kontrollen aus Versuch 1 ($7,33 \text{ Synapsen}/6,33 \mu\text{m}^3$), doch war der Unterschied nicht signifikant und lag in der Größenordnung der Standardabweichung. Daher wurden zur Erhöhung der n-Zahl der Kontrollgruppe die beiden Versuche gemeinsam mittels ANOVA und Kruskal-Wallis-Test (3.5) statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse deckten sich insgesamt mit denen aus den Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4. Die Synapsenzahl wurde in jeweils 4 EM-Bildpaaren von der Ober- und Unterseite ultradünner Schnitte (Zählvolumen $6,4 \mu\text{m}^3$) nach der Methode von Leranth et al. (2000) gezählt. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 12 Bildpaaren, bei den Kontrollen 24 Bildpaare). Behandlungen mit ausschließlich unterschiedlichen Indizes a,b,c

unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$; ANOVA mit nachgeschalteten multiplen (LSD-)Vergleichen). Im Slicekulturexperimenten (Tabelle 2.1, Versuch Y) wurde die Bedeutung von PHTPP und PHTPP+Letrozol untersucht.

a) Synapsendichte ($n/6,4\mu m^3$)						
Gruppe	n	Mittelwert	Standard Abweichung	Standard Skewness	$P_{(ANOVA)}$	multiple Vergleich(LSD)
Kontrollen	3	7,33	1,01	1,24	0,015	a, b, c
+Cholesterol	3	10,17	2,88	-0,09		c
+Cholesterol+ICI	3	8,92	1,38	1,18		b, c
+ICI	3	6,17	0,76	0,66		a, b
+Letrozol	3	5,08	0,58	1,22		a
+ICI+Letrozol	3	5,25	2,14	-0,37		a
b) Synapsendichte ($n/6,4\mu m^3$)						
Gruppe	n	Median	25% Pct.	75% Pct.	$P_{(Kruskal-wallis)}$	
Kontrollen	3	6,75	6,75	8,50	0,034	
+Cholesterol	3	10,25	7,25	13,00		
+Cholesterol+ICI	3	8,25	8,00	10,50		
+ICI	3	6,00	5,50	7,00		
+Letrozol	3	4,75	4,75	5,75		
+ICI+Letrozol	3	5,50	3,00	7,25		

Tabelle 3.3 Einfluss von Substrat (Cholesterol) und Inhibitoren der Östrogensynthese (Letrozol) bzw. beider Östrogenrezeptoren (ICI) auf die östrogeninduzierte hippocampale Synaptogenese. Gemessen wurde die Synapsendichte in Slicekulturen von Hippocampi (CA1-Region) aus neonatalen weiblichen Ratten (hinsichtlich der eingesetzten Substanzen und weiterer Einzelheiten der Behandlung siehe Material und Methoden). Da auf Grund der Datenlage Normalverteilung nicht abgelehnt werden kann, die Standardabweichungen einzelner Versuchsgruppen sich z.T. aber erheblich unterscheiden können ($> \text{Faktor } 3$), erfolgte die statistische Versuchsauswertung sowohl nach parametrischen als auch nach nicht-parametrischen Verfahren. Daher sind in der Tabelle neben der Summenstatistik die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA und des Kruskal-Wallis-Test angegeben. Ein p -Werte $< 0,05$ bedeutet hier „globale Signifikanz“, zwischen Versuchsgruppen, die in der Spalte „multiple Vergleiche“ einen oder mehrere Buchstaben gemeinsam haben, bestehen keine signifikanten Unterschiede.

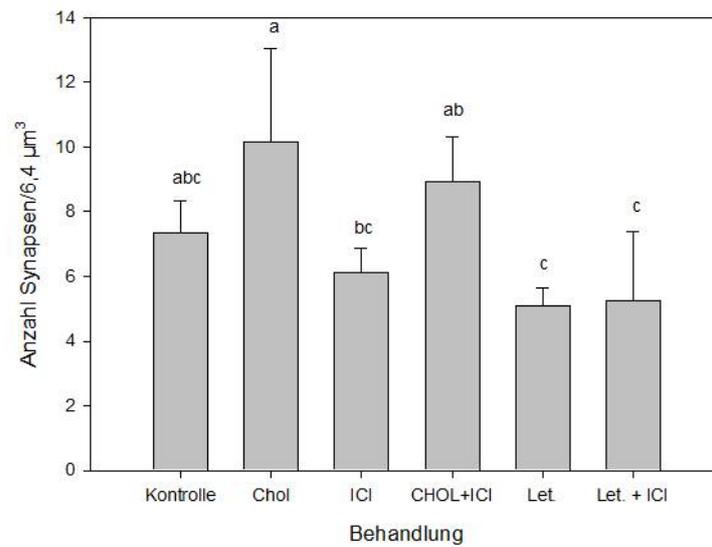


Abbildung 3.2 Die Grafik zeigt die Synapsendichte in der CA1 Region der Hippocampi weiblicher, 4 Tage alter Wistar-Ratten (hinsichtlich der eingesetzten Substanzen und weiterer Einzelheiten der Behandlung siehe Material und Methoden). Angegeben sind hier die Mittelwerte von je 12 Bildpaaren. Behandlungen mit ausschließlich unterschiedlichen Indizes a,b,c unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0.05$; ANOVA mit nachgeschalteten multiplen (LSD-) Vergleichen).

a) Synapsendichte (n/6,4µm ³)						
Gruppe	n	Mittelwert	Standard Abweichung	Standard Skewness	P _(ANOVA)	multiple Vergleich(LSD)
Kontrollen	3	8,33	2,13	0,12	0,032	a
+MPP	3	6,00	1,81	0,81		a, b, c
+PHTPP	3	5,25	0,75	0,00		b, c
+MPP+PHTPP	3	3,83	0,58	1,22		c
+Chol+MPP+PHTPP	3	6,50	1,00	0,00		a, b
+Letr+MPP+PHTPP	3	6,83	1,38	0,19		a, b
b) Synapsendichte (n/6,4µm ³)						
Gruppe	n	Median	25% Pct.	75% Pct.	P _(Kruskal-wallis)	
Kontrollen	3	8,25	6,25	10,50	0,049	
+MPP	3	5,50	4,50	8,00		
+PHTPP	3	5,25	4,50	6,00		
+MPP+PHTPP	3	3,50	3,50	4,50		
+Chol+MPP+PHTPP	3	6,50	5,50	7,50		
+Letr+MPP+PHTPP	3	6,75	5,50	8,25		

Tabelle 3.4 Einfluss von Inhibitoren der Östrogenrezeptoren ER α (MPP) und ER β (PHTPP) auf die östrogeninduzierte hippocampale Synaptogenese bei unbeeinflusstem, erhöhten (+Cholesterol) oder erniedrigtem (+Letrozol) Östrogenangebot. Gemessen wurde die Synapsendichte in Slicekulturen von Hippocampi (CA1-Region) aus neonatalen weiblichen Ratten (hinsichtlich der eingesetzten Substanzen und weiterer Einzelheiten der Behandlung siehe Material und Methoden). Da auf Grund der Datenlage Normalverteilung nicht abgelehnt werden kann, die Standardabweichungen einzelner Versuchsgruppen sich z.T. aber erheblich unterscheiden können (>Faktor 3), erfolgte die statistische Versuchsauswertung sowohl nach parametrischen als auch nach nicht-parametrischen Verfahren. Daher sind in der Tabelle neben der Summenstatistik die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA und des Kruskal-Wallis-Test angegeben. Ein p-Werte <0,05 bedeutet hier „globale Signifikanz“, zwischen Versuchsgruppen, die in der Spalte „multiple Vergleiche“ einen oder mehrere Buchstaben gemeinsam haben, bestehen keine signifikanten Unterschiede.

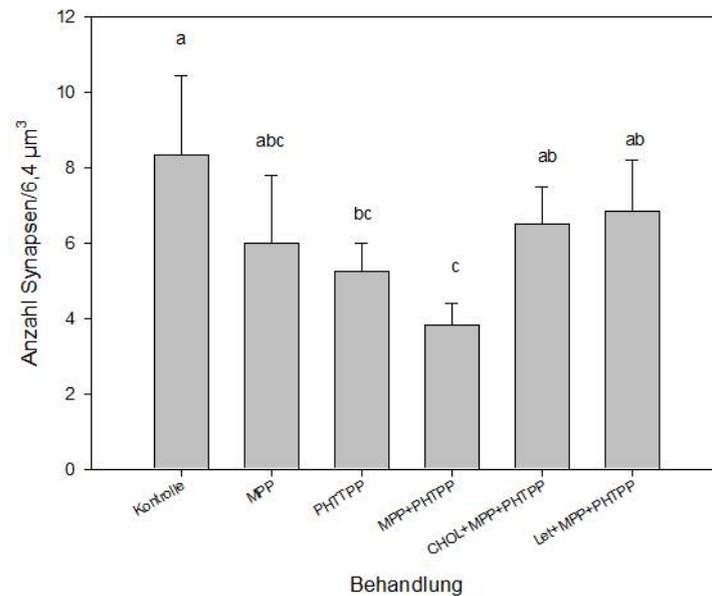


Abbildung 3.3 Synapsendichte in unterschiedlich behandelten Schnitten der CA1 Region von Hippocampi weiblicher, 4 Tage alter Wistar-Ratten (hinsichtlich der eingesetzten Substanzen und weiterer Einzelheiten der Behandlung siehe Material und Methoden). Angegeben sind hier die Mittelwerte von je 12 Bildpaaren. Behandlungen mit ausschließlich unterschiedlichen Indizes a,b,c unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0.05$; ANOVA mit nachgeschalteten multiplen (LSD-) Vergleichen).

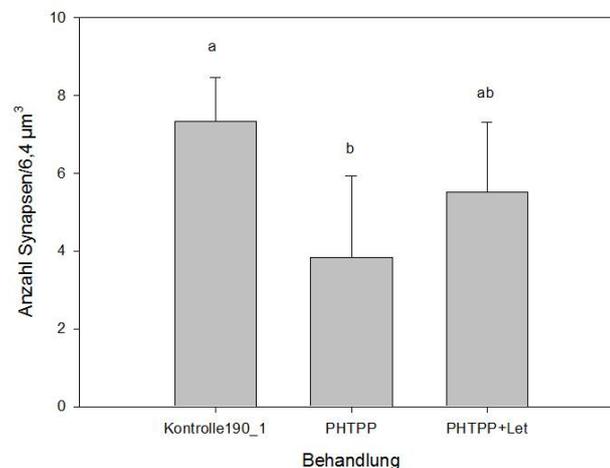


Abbildung 3.4 Synapsendichte in unterschiedlich behandelten Schnitten der CA1 Region der Hippocampi einer weiblichen, 5 Tage alten Wistar-Ratte. Angegeben sind hier die Mittelwerte von je 12 Bildpaaren. Behandlungen mit ausschließlich unterschiedlichen Indizes a,b,c unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0.05$; ANOVA mit nachgeschalteten multiplen (LSD-) Vergleichen).

a) Synapsendichte (n/6,4µm ³)						
Gruppe	n	Mittelwert	Standard Abweichung	Standard Skewness	P _(ANOVA)	multiple Vergleich(LSD)
Kontrollen	6	7,83	1,59	0,96	0,001	c, d
+Cholesterol	3	10,17	2,88	-0,09		e
+Cholesterol+ICI	3	8,92	1,38	1,18		d, e
+ICI	3	6,17	0,76	0,66		a, b, c
+Letrozol	3	5,08	0,58	1,22		a, b
+ICI+Letrozol	3	5,25	2,14	-0,37		a, b
+MPP	3	6,00	1,81	0,81		a, b, c
+PHTPP	3	5,25	0,75	0,00		a, b
+MPP+PHTPP	3	3,83	0,58	1,22		a
+Chol+MPP+PHTPP	3	6,50	1,00	0,00		b, c, d
+Letr+MPP+PHTPP	3	6,83	1,38	0,19		b, c, d
b) Synapsendichte (n/6,4µm ³)						
Gruppe	n	Median	25% Pct.	75% Pct.	P _(Kruskal-wallis)	
Kontrollen	6	7,50	7,75	8,50	0,049	
+Cholesterol	3	10,25	7,25	13,00		
+Cholesterol+ICI	3	8,25	8,00	10,50		
+ICI	3	6,00	5,50	7,00		
+Letrozol	3	4,75	4,75	5,75		
+ICI+Letrozol	3	5,50	3,00	7,25		
+MPP	3	5,50	4,50	8,00		
+PHTPP	3	5,25	4,50	6,00		
+MPP+PHTPP	3	3,50	3,50	4,50		
+Chol+MPP+PHTPP	3	6,50	5,50	7,50		
+Letr+MPP+PHTPP	3	6,75	5,50	8,25		

Tabelle 3.5 Synapsendichte in unterschiedlich vorbehandeltem Schnitten der CA1 Region der Hippocampi weiblicher, 4 Tage alter Wistar-Ratten (hinsichtlich der eingesetzten Substanzen und weiterer Einzelheiten der Behandlung siehe Material und Methoden). Da auf Grund der Datenlage Normalverteilung nicht abgelehnt werden kann, die Standardabweichungen einzelner Versuchsgruppen sich z.T. aber erheblich unterscheiden können (>Faktor 3), erfolgte die statistische Versuchsauswertung sowohl nach parametrischen als auch nach nicht-parametrischen Verfahren. Daher sind in der Tabelle neben der Summenstatistik die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA und des Kruskal-Wallis-Test angegeben. Ein p-Werte <0,05 bedeutet hier „globale Signifikanz“, zwischen Versuchsgruppen, die in der Spalte „multiple Vergleiche“ einen oder mehrere Buchstaben gemeinsam haben, bestehen keine signifikanten Unterschiede.

a) Synapsendichte (n/6,4µm ³)						
Gruppe	n	Mittelwert	Standard Abweichung	Standard Skewness	P _(ANOVA)	multiple Vergleich(LSD)
Kontrolle	3	7,33	1,13	0,23	0,119	a
+PHTPP	3	3,83	2,10	1,21		b
+PHTPP+Letr.	3	5,50	1,80	0,81		a, b
b) Synapsendichte (n/6,4µm ³)						
Gruppe	n	Median	25% Pct.	75% Pct.	P _(Kruskal-wallis)	
Kontrolle	3	7,25	6,25	8,50	0,0151	
+PHTPP	3	2,75	2,50	6,25		
+PHTPP+Letr	3	5,00	4,00	7,50		

Tabelle 3.6 Einfluss auf die östrogeninduzierte hippocampale Synaptogenese durch den ER β Antagonist (PHTPP) und dem Aromatasehemmer Letrozol. Gemessen wurde die Synapsendichte in Slicekulturen von Hippocampi (CA1-Region) aus einer neonatalen weiblichen Ratten (hinsichtlich der eingesetzten Substanzen und weiterer Einzelheiten der Behandlung siehe Material und Methoden). Da auf Grund der Datenlage Normalverteilung nicht abgelehnt werden kann, die Standardabweichungen einzelner Versuchsgruppen sich z.T. aber erheblich unterscheiden können (>Faktor 3), erfolgte die statistische Versuchsauswertung sowohl nach parametrischen als auch nach nicht-parametrischen Verfahren. Daher sind in der Tabelle neben der Summenstatistik die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA und des Kruskal-Wallis-Test angegeben. Ein p-Werte <0,05 bedeutet hier „globale Signifikanz“, zwischen Versuchsgruppen, die in der Spalte „multiple Vergleiche“ einen oder mehrere Buchstaben gemeinsam haben, bestehen keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung und wichtigste Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde an den Modellen der adulten, ER α bzw. ER β -KO-Maus und hippocampaler Slicekulturen aus neonatalen weiblichen Ratten folgende Fragen untersucht oder zumindest mit berücksichtigt:

1. Sind ER α und ER β qualitativ und quantitativ in gleicher Weise an der Regulation der östrogeninduzierten Synapsenbildung im Hippocampus beteiligt und in welchem Ausmaß? Gibt es dabei Wechselwirkungen zwischen den beiden Östrogenrezeptoren und sind Östrogenangebot und ER-Aktivität bzw. -hemmung von gleichen Einfluss auf den Effekt?
2. Korrelieren die akuten Effekte einer Steigerung oder Reduktion von Östrogenangebot und ER-Aktivität mit dem lebenslangen Vorhandensein oder Fehlen von ER α und ER β oder mit anderen Worten, in welchem Umfang und/oder auf welche Weise sind an der Regulation der (östrogeninduzierten) Synaptogenese im Hippocampus extrahippocampale Prozesse beteiligt?

Die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchung waren:

1. In den α - oder ER β -KO-Mäusen hatte der Ausfall des ER α keinen signifikanten Einfluss auf die Synaptogenese, während das lebenslange Fehlen von ER β sogar die hippocampale Synapsendichte steigerte.
Die Untersuchungen an Slicekulturen aus den Hippocampi neonataler Ratten zeigten dagegen:

2. Die Blockierung von ER α - oder /und ER β durch MPP, PHTPP, MPP+PHTPP oder ICI reduzierte die hippocampale Synapsendichte, wobei die Hemmung von ER β zu einer stärkeren Reduktion der Synaptogenese führte und die Effekte von MPP und PHTPP sich annähernd additiv verhielten.
3. Cholesterolzugabe zum Kulturmedium steigerte die Synapsendichte. Bei gleichzeitiger Hemmung von ER α und ER β (durch MPP + PHTPP) führten sowohl ein Cholesterolzusatz zum Kulturmedium als auch die Hemmung der Östrogeneigensynthese durch Letrozol zu einer vergleichbaren Steigerung der Synapsendichte .

4.2 Methodenkritik

Da einige Versuchsergebnisse anders ausgefallen waren als vorher erwartet, soll der eigentlichen Diskussion der Ergebnisse eine kritische Methodenevaluation vorausgehen.

Eine wesentliche Schwäche der Arbeit besteht darin, dass nur 3 oder 4 Mäuse pro Versuchsgruppe bzw. 6 Schnittpräparate pro Behandlung ausgewertet werden konnten. Dass trotz dieser geringen Fallzahl „signifikante Ergebnisse“ erzielt wurden, die zudem zu einem großen Teil mit den Ergebnissen unserer und anderer Forschergruppen in Einklang stehen, spricht dafür, dass die dem zu Grunde liegenden Effekte und Mechanismen fundamental sind und nicht so sehr von der individuellen Merkmalsausprägung der Versuchstiere abhängen. Kleinere Schwächen der vorliegenden Arbeit, die aber die Interpretation der Ergebnisse erschweren, sind das Fehlen von Dosis-Wirkungsuntersuchungen und die Tatsache, dass zwar die Hemmung der ER untersucht wurde, aber nicht deren Stimulation durch ER-Agonisten.

Darüber hinaus bestehen zwischen den *in vivo*-Versuchen an ER α - und ER β -KO-Mäusen und den *in vitro*-Inkubationsexperimenten mit hippocampalen Slicekulturen fundamentale Unterschiede, die bei der Interpretation der Versuchsergebnisse und eventueller (scheinbarer) Unstimmigkeiten berücksichtigt werden müssen. So wurde in den *in vitro*-Experimenten mit hippocampalen Slicekulturen ausschließlich die akute Regulation der hippocampalen Synaptogenese und – bei Verwendung eines „reinen“ Inkubationsmediums – die Bedeutung des zugesetzten

Substrates oder von Inhibitoren der Östrogensynthese bzw. der ER-Aktivität erfasst. Dagegen stellt die hippocampale Synapsendichte in den *in vivo*-Untersuchungen an den Mäusen das Ergebnis eines 12-wöchigen „lebenslangen“ Prozesses dar, in welchem die Synapsendichte im Hippocampus nicht nur durch den Metabolismus des Hippocampus reguliert wird, sondern zusätzlich durch extrahippocampale Östrogenquellen und letztlich die Physiologie des gesamten Organismus. Auch wegen des Einsatzes adulter Mäuse in den *in vivo*- und neonataler Ratten in den Slicekulturuntersuchungen lassen sich beide nicht 1:1 miteinander vergleichen, was bei der Diskussion der Ergebnisse ebenfalls berücksichtigt werden muss. So bestehen beispielsweise Unterschiede hinsichtlich der Verteilung und Aktivität der ER zwischen Maus und Ratte: im Rattenhippocampus ist ER β der vorherrschende Rezeptor ([SHUGHRUE et al. (1997); MILNER et al. (2001)]), während es im Mäusehippocampus ER α ist ([MITRA et al. (2003)]). Beides mag damit zusammenhängen, dass Östradiol in Ratten die Spinogenese induziert, in Mäusen lediglich die Genese großer Spines ([GOULD et al. (1990b); LI et al. (2004); XU und ZHANG (2006)]) Die ER-Expression zeigt zudem eine signifikante Altersabhängigkeit (Abnahme mit zunehmendem Alter) ([WATERS et al. (2009); THAKUR und SHARMA (2007); SHARMA und THAKUR (2006)]), ebenso die Wirksamkeit einer Östradiolzufuhr bei Östrogenmangel ([FOSTER (2012); WITTY et al. (2012); BOHACEK und DANIEL (2009); DANIEL et al. (2006); SAVONENKO und MARKOWSKA (2003); GIBBS (2000)]). Diese Altersabhängigkeit mag, zusammen mit den bereits erwähnten fundamentalen Unterschieden zwischen den *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten, mit dazu beitragen, dass die in den Slicekulturen gemessenen Synapsendichten nicht vollständig mit der Situation in adulten Mäusen korrelieren.

4.3 Ergebnisdiskussion

4.3.1 *In vivo* Untersuchungen an ER α und ER β -KOMäuse

4.3.1.1 Entgegengerichtete Effekte von ER α - und ER β

Der positive Einfluss von Östrogenen und Östrogenrezeptoren auf die hippocampale Synaptogenese und synaptische Plastizität sowie auf basierende Wahrnehmungs- und Gedächtnisfunktionen gilt, wie schon in der Einleitung ausgeführt, als gesichert ([GOULD et al. (1990b); WOOLLEY et al. (1990); SPENCER et al. (2008); MCCARTHY (2011); DANIEL (2013); FRICK (2013)]). Dagegen wird die Rolle, die beide Östrogenrezeptor-Subtypen dabei spielen, in der Literatur kontrovers diskutiert. Die von Qu et al. 2013 ([QU et al. (2013)]) beobachtete Reduktion Ovariectomie-induzierter Neuronen- und Synapsenverluste in den Hippocampi junger Ratten durch den ER α -Agonisten PPT (4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazol-1,3,5-triyl)trisphenol) gilt als Beleg für ein Primat von ER α bei der Östrogen-induzierten Förderung von Spino- und Synaptogenese im Hippocampus von Nagern. Dagegen fanden Waters et al. ([WATERS et al. (2009)]), dass ER α - und ER β in gleicher Weise die Expression des synaptischen Proteins und Spinogenesemarkers PSD95 (postsynaptic density protein 95) im Rattenhippocampus heraufregulieren, während bei Spencer-Segal et al. ([SPENCER-SEGAL et al. (2012)]) Östradiol in den Hippocampi von ER α -KO-Mäusen die PSD95-Expression steigerte und in ER β -KO-Mäusen herabsetzte. In mehreren Untersuchungen ließ sich durch ER β -Agonisten die synaptische Plastizität und die Bildung dendritischer Spines im Hippocampus heraufregulieren ([SRIVASTAVA et al. (2010); KRAMÁR et al. (2009); LIU et al. (2008)]), während in anderen Studien ER β die Zahl dendritischer Spines reduzierte ([TAN et al. (2012)]). Unter der Voraussetzung, dass die Östrogen-induzierte Heraufregulation von Spinogenese und synaptischer Plastizität im Hippocampus vor allem durch rezeptorabhängige genomische Mechanismen vermittelt wird, hätte man auf Grund der Literaturdaten erwarten können, dass zumindest bei einem der beiden ER ein knockout zu einer Reduktion der hippocampalen Synapsendichte führen würde. Insofern stimmten die in 12 Wochen alten ER α -KO -, ER β -KO- oder Wildtypmäusen gemessenen Spinesynapsendichten *in summa* nicht mit den erwarteten Ergebnissen überein, zumindest nicht bezüglich der ER α -KO-Mäuse.

Weder das "lebenslange" Fehlen des ER α oder des ER β bewirkte in den adulten Mäusen eine Reduktion der Synapsendichte im Hippocampus. Während zwischen den Wildtyp- und den ER α -KO-Mäusen diesbezüglich kein Unterschied bestand (bzw. der ER α -knockout sogar zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung der Synapsendichte führte), war in den ER β -KO-Mäusen die hippocampale Synapsendichte signifikant erhöht. Die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchung in der vorliegenden Studie demonstrieren zunächst einmal entgegengerichtete Effekte von ER α und ER β auf den Erhalt der Spinesynapsendichte in den Hippocampi weiblicher Mäuse. Dies wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben, wobei die Stimulation von ER α generell die hippocampale Spino- bzw. Synaptogenese förderte, während ER β einen negativen Effekt auf die Spinesynapsendichte und die synaptische Plastizität in den Hippocampi von Mäusen und Ratten ausübte (Tabelle 4.1). Als Grund für die entgegengerichteten Effekte von ER α und ER β wird vor allem eine hemmende Wirkung von ER β auf ER α angesehen, wie sie von verschiedenen Autoren bei verschiedenen Spezies und in unterschiedlichen Organen einschließlich des Hippocampus beschrieben worden ist (Tabelle 4.1). So fanden beispielsweise Hall et al. (1999) ([HALL und MCDONNELL (1999)])

Modell	Behandlung	Zielparameter	Effekt von		Autoren
			ER α	ER β	
<u>a) ERα-/ERβ-Effekte</u>					
Maus (H)	+Östradiol	PSD95 Expression	↑	↓	SPENCER-SEGAL et al. (2012)
Maus (H)	+ER β -Ligand	Dendritische Spines		↓	TAN et al. (2012)
Ratte (H)	+Östradiol	NMDA-Rezeptoren	↑	↓	TANAKA und SOKABE (2013)
Ratte (H)	ER α -Agonist (PPT)	Reduktion ovx-induzierter Spineverluste	↑		QU et al. (2013)
ovx-Maus (H)	+ER α /β-Agonist ()	Spinogenese im Stratum l.m.	↑	↓	PHAN et al. (2011)
Maus (H)	ER β -Überexpression	Spinogenese		↓	(SZYMCZAK et al., 2006)
<u>b) ERα-/ERβ-Interaktionen</u>					
Mensch	+Östradiol/Tamoxifen	ER α -regulierte Gentranskription		↓	HALL und MCDONNELL (1999)
Maus (K, L)	+ Östrogen	ER α -regulierte Gentranskription		↓	LINDBERG et al. (2003)
ovxER β KO-Maus	„+ER β “, (+Östrogen)	Anzahl immunreaktiver ER α -Zellen		↑	RISSMAN et al. (2002)

H=Hippocampus, K=Knochen, L=Leber

Tabelle 4.1 Entgegengesetzte Effekte von ER α und ER β im Hippocampus in den *in vivo* Versuchen.

und Lindberg et al. (2003) ([LINDBERG et al. (2003)]) eine Hemmung der ER α -regulierte Gentranskription durch ER β bei mit Östrogenen oder dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen® behandelten Menschen bzw. Mäusen. Grund für diese Hemmung könnte die Bildung von ER α -/ER β -Heterodimeren sein ([HALL und MCDONNELL (1999)]), so dass dieser Effekt u.a. von Häufigkeit und Verteilung der ER im betrachteten Kompartiment abhinge. Allerdings wurde eine Hemmung von ER α durch ER β nicht von allen Autoren beobachtet. Rissman et al. [RISSMAN et al. (2002)] beispielsweise fanden in den Hippocampi von ovariektomierten Wildtypmäusen im Vergleich zu östrogenbehandelten, ovx-ER β -KO-Mäusen eine höhere Anzahl immunreaktiver ER α -Zellen. Alles in allem lässt sich aber die in der vorliegenden Dissertation beobachtete erhöhte hippocampale Spinesynapsendichte in den ER β -KO-Mäusen ausreichend mit dem Fortfall der in den Wildtypmäusen wirksamen Hemmung des ER α durch den ER β erklären.

4.3.1.2 Kein negativer Effekt des ER α -knockout

Auf den ersten Blick schwieriger ist die Interpretation der ebenfalls in der vorliegenden Dissertation gemachten Beobachtung, dass die Spinesynapsendichte in den Hippocampi adulter weiblicher ER α -KO-Mäuse nicht reduziert, sondern sogar geringfügig aber nicht signifikant gegenüber WT-Mäusen erhöht war. Positive Effekte des ER α auf Spino- bzw. Synaptogenese und synaptische Plastizität sind in der Literatur vielfach beschrieben worden (Tabelle 4.1), sein Ausfall hätte eigentlich zu einer geringeren Synapsendichte führen sollen. Um den fehlenden negativen Effekt des ER α -Knockouts auf die Synapsendichte zu erklären, soll hier postuliert werden, dass der ER β neben der (durch Heterodimerenbildung verursachten) Hemmung des ER α auch eine durch den „klassischen“ genomischen Mechanismus vermittelte Förderwirkung auf die Synapsenbildung bzw. die synaptische Plastizität hat. Letztere wäre dann durch eine Östrogen-induzierte ER α /ER β - Heterodimerenbildung und somit durch den ER α ebenfalls hemmbar. Mit anderen Worten, Heterodimerisierung kann im Rahmen des „klassischen“ Mechanismus der Östrogenwirkung nicht nur zur Hemmung des ER α durch ER β , sondern umgekehrt auch von ER β durch ER α führen. Welche Auswirkung diese entgegengesetzten Effekte letztlich haben, hängt u.a. von der Verteilung von ER α und ER β im betrachteten Gewebe ab (d.h. davon, ob beide Rezeptoren aktuell im gleichen Kompartiment vorhanden

sind und in welcher Menge), von der Östrogenkonzentration, der Anwesenheit weiterer ER-Agonisten und/oder Antagonisten, sowie davon, in wieweit neben dem „klassischen“ genomischen Weg noch weitere Mechanismen wirksam sind. Mit den drei Postulaten

1. einer durch Heterodimerisierung verursachten gegenseitigen Hemmung von ER α und ER β ,
2. einer höheren ER α -Dichte in der (untersuchten) CA1-Region des Maushippocampus und
3. einer in den untersuchten Mäusen überwiegend auf dem „klassischen“ Mechanismus basierenden Beeinflussung der hippocampalen Synapsendichte durch Östrogene lassen sich die Beobachtungen an den ER α -KO-Mäusen wie folgt qualitativ deuten: Bei den Wildtypmäusen wird die östrogeninduzierte Synaptogenese in der CA1-Region des Hippocampus wegen der dortigen höheren ER α -Dichte vor allem durch die additiven Effekte einer mäßigen Hemmung des ER α durch ER β und der stärkeren bis vollständigen Hemmung des ER β durch ER α beeinflusst. In den entfällt zwar der in WT-Mäusen ohnehin schwache Effekt des ER β , doch ist wegen des Fortfalls der Hemmung durch ER β die positive Wirkung des ER α auf die Synaptogenese signifikant stärker, woraus sich die höhere hippocampale Synapsendichte in diesen Mäusen erklärt. Bei den ER α -KO-Mäusen entfällt zwar die Stimulation der Synaptogenese durch den (in den WT-Mäusen gehemmten) ER α , dafür kann der ER β seinen positiven Effekt ungehemmt ausüben, wobei sich beide Effekte in etwa aufheben dürften. Dass im Vergleich zu WT-Mäusen in ER α -KO-Mäusen sogar leicht (aber nicht signifikant) erhöhte hippocampale Spinesynapsendichten beobachtet werden, ist möglicherweise eine Folge der in ER α -KO-Mäusen vorhandenen höheren Östrogenspiegel ([COUSE und KORACH (2001); COUSE et al. (1995)]).

4.3.1.3 Zusätzlicher Einfluss von Östrogenen

Daher soll der Einfluss von Östrogenen noch genauer betrachtet werden. So konnte vielfach gezeigt werden, dass Östradiol im wachsenden oder im adulten Organismus die Spinebildung induziert und die synaptische Plastizität reguliert ([GOULD et al. (1990b); WOOLLEY et al. (1990); SPENCER et al. (2008); MCCARTHY

(2011); DANIEL (2013); FRICK (2013)]. Auch durch eine vorübergehende Unterdrückung der Wirkung von GABA und die daraus resultierende Aufhebung der Hemmung einer Vielzahl von CA1-Neuronen kann Östradiol die Bildung neuer Spines auslösen ([MENDOZA-GARCÉS et al. (2011)]) während die Hemmung der hippocampalen Östrogensynthese durch Aromataseinhibitoren die Expression synaptischer Proteine in hippocampalen Neuronen herunterreguliert ([PRANGE-KIEL et al. (2006)]) und in ovariektomierten Mäusen zu Synapsenverlusten führt ([ZHOU et al. (2010)]). Auch in weiblichen Aromatase-KO-(ArKO-)Mäusen ist die hippocampale Spinesynapsendichte reduziert, während die Spinesynapsendichte in den Hippocampi männlicher Mäuse oder in anderen Hirnregionen (Neocortex, Cerebellum) gegenüber den entsprechenden Wildtypmäusen unverändert ist ([ZHOU et al. (2014); WALF et al. (2008)]). Dabei unterscheiden sich die Östradiolspiegel in Wildtyp- und $ER\beta$ -KO-Mäusen nicht voneinander ([WALF et al. (2008)]), während 10fach höhere Östradiolkonzentrationen $ER\alpha$ -KO-Mäusen gemessen wurden ([COUSE und KORACH (2001); COUSE et al. (1995)]). Die Frage, ob die im Hippocampus messbaren Östrogenspiegel für signifikante Effekte auf die Synapsenbildung überhaupt ausreichend sind, wurde u.a. von ([OOISHI et al. (2012)]) eindeutig mit „ja“ beantwortet. Nach diesen Autoren findet man z.B. in weiblichen und männlichen Rattenhippocampi Östradiolkonzentrationen von 0,5-2 bzw. 5 nM, was deutlich höher ist als in der Zirkulation. In den vorliegenden in vivo Versuchen könnte daher das Fehlen der $ER\alpha$ -Wirkung auch durch die erhöhten Östrogenspiegel in den $ER\alpha$ -KO-Mäusen kompensiert worden sein. Ob dabei die östrogeninduzierte Modulation der synaptischen Plastizität (allein) über den langsamen genomischen („klassischen“) Signalweg erfolgte oder ob rasche, östrogengetriggerte Signalwege via synaptische Östrogenrezeptoren ebenfalls eine Rolle gespielt haben, kann nicht entschieden werden, da wir es hier mit dem Ergebnis langfristiger Prozesse zu tun haben.

4.3.2 *In vitro* Versuche mit hippocampalen Slicekulturen aus den Gehirnen neonataler weiblichen Ratten

4.3.2.1 Die Stimulation der Östrogensynthese durch Cholesterol steigert die Synapsendichte

In der vorliegenden Untersuchung erhöhte die Zugabe von Cholesterol die Spinesynapsendichte in den hippocampalen Slicekulturen um rund 50%. Dieser Befund erscheint plausibel, da die hippocampale Synthese von Östrogenen aus Cholesterol durch zahllose Untersuchungen belegt ist (siehe Abschnitt 1.1.5), ebenso wie die Cholesterol- ([MAUCH et al. (2001)]) bzw. Östrogen-induzierte Synaptogenese in den Hippocampi von Ratten und Mäusen (siehe Abschnitt 1.5.3.2) sowie [RUNE et al. (2002)]). Allerdings förderte Östradiol in anderen Studien die Spino- und Synaptogenese in hippocampalen Slicekulturen nur bei niedriger Östrogenkonzentration, beispielsweise nach Austausch des Kulturmediums gegen ein östrogenfreies Medium ([MENDEZ et al. (2011)]). Ebenso ließ sich in früheren Untersuchungen unseres Arbeitskreises ([KRETZ et al. (2004); ZHOU et al. (2014)]) die Spinesynapsendichte in Slicekulturen von Rattenhippocampi weder durch Zusatz von Östradiol zum Kulturmedium noch durch die ER α - und ER β -Agonisten (PPT (4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol) und DPN (2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitril)) steigern, solange die hippocampale Östrogensynthese nicht durch den Aromataseinhibitor Letrozol gehemmt wurde. Diese Befunde wurden von den Autoren zur Aussage verallgemeinert, dass in Slicekulturen mit komplettem, funktionierendem steroidogenen Apparat Östradiol die Synaptogenese nicht steigert ([ZHOU et al. (2014)]). Diese Literaturbefunde lassen sich am ehesten mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung in Einklang bringen, wenn man annimmt, dass nicht so sehr (extern zugeführtes) Östradiol per se die Synaptogenese in hippocampalen Slicekulturen stimuliert, sondern dass die lokale Östrogensynthese, also der Prozess der Konversion von Cholesterol in Östradiol, die erhöhte Synapsendichte nach Cholesterolzufuhr induziert. Dies war bereits von Fester et al. (2009) postuliert worden ([FESTER et al. (2009a)]). Diese Autoren hatten die Möglichkeit, dass die Synaptogenese durch das Cholesterolmolekül selbst stimuliert wird, untersucht (und sie verworfen), indem sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Steroidsynthese durch

knock-down von STAR (steroidogenic acute regulatory protein) blockierten ([FESTER et al. (2009a)]).

4.3.2.2 Die Hemmung beider ER durch ICI 182,780 oder der Östrogensynthese durch Letrozol reduziert die Synapsendichte in hippocampalen Slicekulturen

Die gleichzeitige Hemmung von ER α und ER β durch ($10^{-4}mM$) ICI (182,780) reduzierte erwartungsgemäß die Spinesynapsendichte in den Slicekulturen. Das Ausmaß der Reduktion betrug rund. 15% im Vergleich zu den Kontrollen, was deutlich weniger war, als die Hemmung beider ERs durch MPP+PHTPP bewirkt hatte (siehe Abschnitt 4.3.2.4). Ein Zusatz von $10^{-4}mM$ Cholesterol zu den mit ICI behandelten Slicekulturen erhöhte signifikant die Synapsendichte auf einen Wert, der noch höher war als in den Kontrollen. Dies unterscheidet sich etwas von den Befunden von Fester et al. 2009 ([FESTER et al. (2009a)]), wonach in hippocampalen Slicekulturen die Hemmung der Östrogenrezeptoren durch ICI die Cholesterol-induzierte Synapsenbildung ausschaltete. Für eine Erklärung dieser Diskrepanz sowie der hier gemessenen relativ geringen Hemmwirkung von ICI ist die Datenlage nicht ausreichend. Es ließe sich allenfalls darüber spekulieren, ob in der vorliegenden Untersuchung eine hohe Cholesterolkonzentrationen im nativen Gewebe oder nach Cholesterolzufuhr zu einer gesteigerten Östradioleigensynthese in den Hippocampuschnitten geführt und das (im Verhältnis zu ICI) in hoher Konzentration vorliegende Östrogen einen Teil des ICI aus seinen ER-Bindungsplätzen verdrängt habe. Angesichts der Tatsache, dass die Hemmwirkung von ICI auf einer Hemmung der Dimerisierung der ER beruht, liegt auch die Vermutung nahe, dass in den vorliegenden Slicekulturexperimenten die Beeinflussung der synaptischen Plastizität durch Cholesterol (bzw. Östrogene) nicht nur auf dem langsamen „klassischen“ genomischen, die Dimerisierung des ER-Ligandenkomplexes erfordernden Signaltransduktionsweg erfolgt sei. Allerdings sind derartige nicht-klassische, über membranständige Rezeptoren laufende Signalwege eher in rasche Östrogeneffekte involviert. So wurde zwar die Östradiol-induzierte ($10^{-5}mM$ - $10^{-2}mM$ Östradiol) rasche Modulation verschiedener elektrophysiologischer Eigenschaften, wie z.B. Kainat-induzierte Ströme in dissoziierten hippocampalen CA1 Neuronen ([GU und MOSS (1996)]), nicht von ICI inhibiert ([OHMACHI et al.

(2005)], andererseits ließ sich aber, analog zur Studie von Fester et al. 2009 ([FESTER et al. (2009a)]), die Östrogen-induzierte Spinogenese durch ICI komplett hemmen ([MUKAI et al. (2007)]). Darüber hinaus ließ sich die Östradiol-induzierte Erhöhung der Spinedichte in Slices von Rattenhippocampi (*Stratum oriens* und *Stratum lacunosum-moleculare*) außer durch ER-Antagonisten auch durch Inhibitoren der Erk/MAP Kinase (ERK/mitogen-activated protein kinase) blockieren, woraus der Schluss gezogen wurde, dass die rasche Östrogen-induzierte Erhöhung der CA1 Spinedichte durch Aktivierung der MAP Kinase via ER α erfolgt.

4.3.2.3 Letrozol erniedrigt die Synapsendichte genauso stark wie Letrozol + ICI 182,780

Die Hemmung der Östrogensynthese in den Slicekulturen durch Letrozol erniedrigte wie erwartet in der vorliegenden Studie die Spinesynapsendichte um rund 30%, was unwesentlich stärker war als der Effekt von ICI (182,780). Warum die gleichzeitige Zugabe von ICI und Letrozol zu keiner stärkeren Hemmung führte als beide Substanzen allein, lässt sich aus den vorliegenden Studienergebnissen nicht zwingend ableiten. Auf Grund der Tatsache, dass ICI und Letrozol in Abhängigkeit von den lokalen Konzentrationen von $ER\alpha$, $ER\beta$, Östradiol und dem Inhibitor die Synaptogenese in den Slicekulturen unterschiedlich beeinflussen können (Tabelle 4.2), kann man darüber spekulieren, ob sich unter den vorliegenden Versuchsbedingungen sich die positiven und negativen Effekte von ICI, Letrozol oder beiden soweit gegenseitig aufgehoben haben, dass daraus in allen drei Fällen ungefähr die gleiche Erniedrigung der Synapsendichte resultierte.

1. ICI	⇒	$ER\alpha \downarrow$	⇒	Synaptogenese ↓
2. ICI	⇒	$ER\beta \downarrow$	⇒	$ER\alpha$ -Hemmung ↓ ⇒ Synaptogenese ↑
3. Letrozol	⇒	Östradiol ↓	⇒	Synaptogenese ↓
4. Letrozol	⇒	Östradiol ↓	⇒	$ER\alpha \uparrow$ ⇒ Synaptogenese ↑

Tabelle 4.2 Einfluss von ICI (182,780) und Letrozol auf Östrogenrezeptoren und Östrogene und daraus resultierende Effekte auf Synaptogenese und Synapsendichte in Slicekulturen von Rattenhippocampi

4.3.2.4 Die Hemmung von ER α und/oder ER β durch MPP und PHTPP erniedrigt additiv die Spinesynapsendichte in hippocampalen Slicekulturen

Beide, der ER α -Antagonist MPP und der ER β -Antagonist PHTPP, erniedrigten in den hippocampalen Slicekulturen die Spinesynapsendichte. Die gleichzeitige Gabe von MPP und PHTPP führte zu einer zusätzlichen Reduktion der Synapsendichte, wobei sich die Effekte der einzelnen Antagonisten addierten. Auf den ersten Blick stehen diese Befunde in Widerspruch zu den Ergebnisse der *in vivo* Versuche mit ER α - und ER β -KO-Mäusen, in denen der knock-out des ER β die hippocampale Synapsendichte erhöhte und auch der ER α -KO nicht zu einer Reduktion der Synapsendichte führte (siehe Abschnitt 4.3.1.1 und 4.3.1.2). Auch in der Literatur werden entgegengerichtete Effekte von ER α - und ER β berichtet, wobei ER α die Synaptogenese fördernde Effekte vermittelte, während ER β durch Hemmung des ER α einen eher hemmenden Effekt auf die Synaptogenese ausübt (siehe Tabelle 4.1)).

Da die Hemmung des ER α durch ER β (und vielleicht auch eine Hemmung von ER β durch ER α) möglicherweise ganz oder zum Teil auf der Bildung von Heterodimeren zwischen den östradiolgebundenen ER α und ER β im Rahmen des klassischen Mechanismus der Östrogen-induzierten Synaptogenese beruht ([HALL und MC-DONNELL (1999)]), liegt der Schluss nahe, dass die Hemmung beider ER durch MPP und PHTPP unabhängig von der Heterodimerisierung ist und/oder dass hier noch andere, rasche Signalwege involviert sind als der klassische Mechanismus. Auch dass erhöhte Östrogenspiegel, wie sie in ER α -KO-Mäusen beobachtet werden ([COUSE und KORACH (2001); COUSE et al. (1995)]) und daraus resultierende positive Effekte auf die Synaptogenese, bei den Slicekulturexperimenten keine Rolle gespielt haben, mag mit zu den unterschiedlichen Ergebnissen der *in vivo* und *in vitro* Versuche beigetragen haben (siehe auch Abschnitte 4.3.1.2 und 4.3.1.3). Alles in allem sind die Experimente mit MPP und PHTPP ein starkes Indiz dafür, dass unter den Bedingungen der untersuchten Slicekulturen beide Östrogenrezeptoren einen fördernden Effekt auf die Östrogen-induzierte Synaptogenese im Hippocampus ausüben. Dies stimmt auch mit parallel durchgeführten Untersuchungen von Behem (2014) an ovariectomierten ER α -KO-Mäusen überein. Während die

Ovariectomie-induzierte Abnahme der hippocampalen Synapsendichte in ovx-Wildtypmäusen durch Östrogenzufuhr kompensiert werden kann ([GOULD et al. (1990b)]), sowie [MACLUSKY et al. (2005); WOOLLEY und MCEWEN (1992); WOOLLEY et al. (1990)] , wurde dieser Effekt in ER α -KO-Mäusen nicht beobachtet, was dafür spricht, dass der ER α bei der Östrogen-induzierten hippocampalen Synaptogenese eine Rolle spielt (ER β -KO-Mäuse standen für eine Untersuchung nicht zur Verfügung) (Behem 2014). Demgegenüber war auf Grund der Beobachtung, dass die Östradiolbehandlung ovariectomierter ER β -KO-Mäuse zu keiner Erhöhung der Spinesynapsendichte führte, in älteren Untersuchungen postuliert worden, dass einzig der ER β an der Östrogen-induzierten hippocampalen Synaptogenese beteiligt ist ([LIU et al. (2008)]).

4.3.2.5 Substrat und Inhibitor der Östrogensynthese steigern in gleicher Weise die durch Hemmung von ER α und ER β reduzierte Spinesynapsendichte

In den in vivo Untersuchungen von Qu et al. ([QU et al. (2013)]) an ovx-Ratten kam es, ebenso wie in den parallel zur vorliegenden Doktorarbeit von Zhou et al. ([ZHOU et al. (2014)]) durchgeführten in vitro Experimenten mit Slicekulturen von Rattenhippocampi, nur bei niedrigen Östrogenspiegeln (durch Ovariectomie [QU et al. (2013)]) bzw. nach Zugabe des Aromataseinhibitors Letrozol ([ZHOU et al. (2014)]) zu einem ER α -vermittelten Anstieg der hippocampalen Spine- bzw. Spinesynapsendichte. Dabei ließ sich in den Experimenten von Zhou et al. ([ZHOU et al. (2014)]) die Spinesynapsendichte nur durch den gleichzeitigen Zusatz von Letrozol und den ER α -Agonisten PPT erhöhen, aber nicht durch Letrozol plus den ER β -Agonisten DPN oder durch Östradiol, PPT oder DPN ohne Letrozolzusatz. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen älterer Untersuchungen, wonach niedrige Östradiolkonzentrationen nachhaltig die Aktivierung des ER α induzieren ([SEGAL und MURPHY (2001); KUIPER et al. (1997); TREMBLAY et al. (1997)]).

Diese Befunde böten auch einen Erklärungsansatz für die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass in den hippocampalen Slicekulturen, in denen beide ER durch MPP und PHTPP gehemmt worden waren, sowohl das Substrat (Cholesterol) als auch der Inhibitor der Östrogensynthese (Letrozol) die östrogeninduzierte Synaptogenese in gleicher Weise auf ca. 75% des Wertes in

den Kontrollslices steigerten. Auch wenn nur der ER β durch PHTPP gehemmt wurde, ließ sich durch Letrozol (Cholesterol war in diesem Fall nicht untersucht worden) die Synapsendichte auf ca. 75% des Kontrollwertes steigern, was die gleiche Interpretation nahelegt wie zuvor.

4.3.2.6 Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Versuchsergebnisse

Beide ER zeigen – in Abhängigkeit sowohl von der lokalen Verteilung und Konzentration der an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten, als auch vom Versuchsmodell – fördernde und hemmende Effekte auf die Synaptische Plastizität.

In den *in vivo* Untersuchungen an Mäusen führte das Fehlen der ER α und ER β in den entsprechenden KO-Mäusen zu einer schwachen, nicht-signifikanten bzw. einer deutlichen, signifikanten Erhöhung der Spinesynapsendichte. Dagegen bewirkte in den Experimenten an Schnittkulturen von Rattenhippocampi (CA1-Region) die Hemmung von ER α , ER β oder beider ER durch MPP, PHTPP, MPP+PHTPP oder ICI eine signifikante Erniedrigung der Synapsendichte. Vergleiche mit Literaturdaten und insbesondere Untersuchungen mit ER-Agonisten zeigten teils zu den vorliegenden Ergebnissen passende und teils ihnen widersprechende Befunde und waren insgesamt in sich widersprüchlich. So führte die Behandlung mit ER α -Agonisten in dissoziierten hippocampalen Zellkulturen zur Zunahme von Spinesynapsen ([JELKS et al. (2007)]) und in hippocampalen Slicekulturen zur Zunahme von „thin spines“ und Filopodien in der CA1-Region ([MUKAI et al. (2007)]). Der Einsatz eines ER β -Agonisten führte dagegen (im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit) bei Mäusen zur Zunahme von „mushroom“-Spines im Gyrus dentatus ([LIU et al. (2008)]). In Untersuchungen des Arbeitskreises um Rune et al. führten in hippocampalen Schnittkulturen weder eine Behandlung mit ER α - und ER β -Agonisten (ohne gleichzeitige Hemmung der Östrogensynthese durch Letrozol) noch die Zufuhr von Östradiol zu einer (positiven) Regulation der Synaptogenese ([KRETZ et al. (2004)]) Zur Erklärung der (scheinbar) gegensätzlichen Befunde in der vorliegenden Dissertation wurde folgendes postuliert: Beide ER wirken als ligandeninduzierbare Transkriptionsfaktoren und stimulieren nach Bindung des Östrogenliganden und Dimerisierung („klassischer Mechanismus“)

die Östrogen-induzierte Synaptogenese und beeinflussen somit die synaptische Plastizität ([PRANGE-KIEL et al. (2003)]). Daneben können ER α und ER β einander auch wechselseitig hemmen auf Grund der Bildung von Heterodimeren ([HALL und MCDONNELL (1999); COWLEY et al. (1997)]). Es ist einsichtig, dass dabei der in höherer Konzentration vorliegende ER zu einem geringeren Prozentsatz gehemmt wird als der in niedrigerer Konzentration vorliegende Rezeptor, bei dem die Hemmung bis zu 100% betragen kann. Gemäß der Verteilung der ER im Gewebe - in Mäusehippocampi ist der ER α der vorherrschende Rezeptor, in den Schnitten von Rattenhippocampi ist es der ER β - ist dabei die Hemmung von ER α durch ER β stärker als umgekehrt, so dass in den ER β -KO-Mäusen der Fortfall der ER α -Hemmung den signifikanten Anstieg der Synapsendichte erklärt, während aus dem ER α -knockout nur ein geringer Effekt resultiert. Neben der langfristigen Häufigkeitsverteilung von ER α und ER β in verschiedenen Spezies und Geweben könnten auch kurzfristige Effekte eine Rolle spielen wie die Regulation der ER-Expression durch Östrogene. Dazu liegen in der Literatur allerdings widersprüchliche Befunde vor. Beispielsweise beobachteten [RISSMAN et al. (2002)] bei ovx ER β -KO-Mäusen eine Herabregulation des ER α durch Östradiol, während [PRANGE-KIEL et al. (2003)] eine Hochregulation des ER α durch Östradiol *in vitro* beschrieben haben. Umgekehrt sind 10fach höhere Östrogenspiegel in ER α -KO-Mäusen beschrieben worden, was im vorliegenden *in vivo* Versuch einen stärkeren positiven Effekt des ER β auf die Östrogen-induzierte Synaptogenese und damit eine mehr oder weniger starke Kompensation des fehlenden ER α bedeuten würde. In den Slicekulturexperimenten im Rahmen der vorliegenden Dissertation führte die Hemmung der ER durch MPP, PHTPP oder ICI anders als ein ER-KO in allen Fällen zu einer Reduktion der Synapsendichte. MPP bzw. PHTPP binden bei den in der Arbeit gewählten Konzentrationen wirkungsvoll und spezifisch an den ER α bzw. ER β und verhindern dadurch nicht nur die Bildung von Homo- oder Heterodimeren aus den ER α /ER β -Komplexen mit den Östrogenliganden, sondern verhindern auch jegliche transkriptionelle Aktivität an der DNA bzw. den EREs ([SUN et al. (2002); COMPTON et al. (2004)]). Auch ICI als Inhibitor von ER α und ER β verhindert sowohl die Dimerisierung der ERs als auch ihre transkriptionellen Aktivitäten. Daher führte die Hemmung der ERs durch MPP, PHTPP, MPP+PHTPP oder ICI in allen Fällen zu einer Reduktion der Synapsendichte. Ein weiterer Grund für die (scheinbaren) Widersprüche zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen und Literaturdaten ist die Tatsache, dass neben dem bislang

diskutierten direkten genomischen „klassischen“ Signalweg die Östrogenwirkung im Gehirn auch über andere, genomische und nicht-genomische „rasche“ Mechanismen vermittelt sein kann, die anders reguliert sind und nicht über die Bildung von Homo- und Heterodimeren laufen. So binden bei den indirekten genomischen Mechanismen monomere ER-Ligandenkomplexe nicht direkt an EREs bzw. die Ziel-DNA sondern an andere DNA-bindende Transkriptionsfaktoren wie AP1, SP1 oder NF- κ B ([NILSSON et al. (2001)]). Seit langem sind nicht-nukleäre, membrangebundene (synaptische) ERs auch in verschiedenen Hirnregionen einschließlich des Hippocampus nachgewiesen worden ([BECKER (1999)]). Ein Beispiel ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 30 (GPR30), der sich u.a. im Vorderhirn (Cortex, Hypothalamus, Hippocampus) von Mäusen und Ratten nachweisen lässt, zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zählt und mittlerweile als Östrogenrezeptor identifiziert worden ist ([BRAILOIU et al. (2007)]). GPR30 bindet spezifisch und hochaffin an Östradiol und bewirkt rasche, nicht-genomische Effekte auf Neuronen, Neuropeptidsysteme und auf die Peripherie ([HAZELL et al. (2009)]). GPR30 induziert u.a. die Mobilisierung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und reguliert die rasche Wirkung von Östrogenen auf MAP-Kinasen ([FILARDO et al. (2000)]); direkte Effekte auf Spines oder die synaptische Plastizität konnten aber nicht gezeigt werden ([MUKAI et al. (2007)]). Wie in Abschnitt 1.2.3 ausgeführt, können Östrogene nicht nur über ER-vermittelte genomische Mechanismen wirken, sondern auch direkte Effekte ausüben. So ließen sich beispielsweise Hirnfunktionen durch direkte Effekte auf neuronale Membranen beeinflussen und Veränderungen des männlichen Sexualverhalten innerhalb von Minuten durch experimentell erzeugte Änderungen der Östradiolbioverfügbarkeit im Gehirn auslösen ([BALTHAZART und BALL (2006); LEVIN (2005)]). Auch die innerhalb von Minuten erfolgende Änderung synaptischer Ströme nach Östradiolgabe wird weder durch ER α -KO noch durch ER α - und ER β -Antagonisten beeinflusst ([GU et al. (1999)]). In anderen Untersuchungen war allerdings ein Einfluss des ER α -KO auf den Östradiol-induzierten raschen Anstieg der synaptischen Transmission in Mäusehippocampi nachweisbar ([FUGGER et al. (2001)]).

Alle diese Mechanismen könnten einen Einfluss auf die Östrogen-induzierte Synaptogenese haben zusätzlich zu den Effekten des ER α - und ER β -KOs, der zugesetzten ER α - und ER β -Antagonisten und der Steigerung oder Hemmung der Östrogensynthese in den Slicekulturen.

5 Zusammenfassung

Vorausgegangene und parallel durchgeführte Untersuchungen am Institut für Neuroanatomie des UKE Hamburg haben gezeigt, dass die lokale Östrogensynthese Östrogenrezeptor (ER) vermittelt im Hippocampus bei der Spino- und Synaptogenese eine essentielle Rolle spielt. In der vorliegenden Dissertation wurde untersucht werden sollen, ob beide ubiquitär im Hippocampus exprimierten Östrogenrezeptor-Subtypen Alpha und Beta (α und β) für die Synapsenbildung verantwortlich seien. Dazu waren sowohl

- a) 12 Wochen alte weibliche ER α - und ER β -KO-Mäuse untersucht und mit Wildtypmäusen verglichen als auch
- b) Slicekulturen aus den Hippocampi neonataler Ratten mit Cholesterol und/oder spezifischen Inhibitoren der Östrogensynthese (Letrozol), des ER- α (MPP), des ER- β (PHTPP) oder von beiden (ICI 182,780) behandelt worden.

Der Zielparameter „Synaptische Plastizität“ wurde an Hand der Spinesynapsendichte im untersuchten Gewebe gemessen. Als primäres Ergebnis und als Antwort auf die zentrale Frage der vorliegenden Dissertation zeigte sich, dass beide ERs in unterschiedlichem Ausmaß in die Regulation der Östrogen-induzierten Synaptogenese und damit der synaptischen Plastizität involviert sind. Dies steht im Gegensatz zu anderen Publikationen, wonach der ER β allein diese Funktion ausübt. Während in den Untersuchungen an ER-KO-Mäusen der Ausfall des ER α zu einem geringen und nicht signifikanten Anstieg und das Fehlen des ER β sogar zu einem 75%igen signifikanten Anstieg der Spinesynapsendichte führte, reduzierte in den Schnittkulturexperimenten die Hemmung von ER α , ER β oder beider ER durch MPP, PHTPP, MPP+PHTPP oder ICI die Spinesynapsendichte relevant und signifikant, wobei sich die Effekte von MPP und PHTPP annähernd additiv verhielten. Der Effekt von ICI war schwächer als der von MPP und/oder PHTPP. Als Erklärung

hierfür wurde postuliert, dass ER α und ER β nicht nur die hippocampale Synapsenbildung via des „klassischen“ genomischen Signaltransduktionsweg und andere Mechanismen regulieren, sondern einander auch wechselseitig auf Grund der Bildung von Heterodimeren hemmen können. Gemäß der Verteilung der ER in den Hippocampi ist dabei die Hemmung von ER α durch ER β stärker als umgekehrt, so dass in den ER β -KO-Mäusen der Fortfall der ER α -Hemmung den signifikanten Anstieg der Synapsendichte erklärt, während aus dem ER α -KO nur ein ganz geringer Effekt resultiert. Bei der Hemmung der ER durch MPP, PHTPP oder ICI sind Ligandenbindung, Dimerisierung und/oder die Aktivität des Liganden-Rezeptor-Komplexes an der DNA bzw. den ERs gestört, so dass die wechselseitige Hemmung beider ERs durch Heterodimerisierung und ihre Aufhebung durch KO keine Rolle spielen. Daher führt die Hemmung der ERs in allen Fällen zu einer Reduktion der Synapsendichte. Außer über den „klassischen“ genomischen Mechanismus könnten Östrogene die hippocampale Synaptogenese über weitere, i.d.R. raschere Signaltransduktionswege beeinflussen. Dazu zählen genomische Mechanismen, die ohne Dimerisierung und Bindung an EREs ablaufen, ebenso wie Signalwege, bei denen Östrogene an membranständige Rezeptoren binden oder ihre Wirkung ganz ohne Bindung an Rezeptoren ausüben. Daraus ergeben sich weitere Interpretationsmöglichkeiten für die beobachteten Effekte. Nicht zuletzt könnten Versuchsmodell und -dauer, der Effekt von extrahippocampalem Östrogen in den Mäuseversuchen, die Östrogenkonzentration (z.B. 10fach höhere Östrogenspiegel in ER α -KO-Mäusen) und der Einfluss der Östrogenkonzentration auf die Rezeptorexpression zu den beobachteten (scheinbaren) Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Experimenten beigetragen haben.

Alles zusammen genommen zeigt die vorliegende Dissertation, dass an der Regulation der Östrogen-induzierten Synaptogenese beide Östrogenrezeptoren beteiligt sind, wobei beide ER fördernde und hemmende Effekte auf die synaptische Plastizität ausüben können und die resultierende Wirkung sowohl von der lokalen Verteilung und Konzentration der an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten als auch vom Versuchsmodell abhängt.

Literaturverzeichnis

- AKDOGAN I., UNAL N. und ADIGUZEL E. (2011) *Estimation of the number of neurons in the hippocampus of rats with penicillin induced epilepsy*. *Image Analysis & Stereology* **21**(2): 117–120.
- ALTMAN J. und DAS G.D. (1965) *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. *Journal of Comparative Neurology* **124**(3): 319–335.
- BALTHAZART J. und BALL G.F. (2006) *Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter?*. *Trends in Neurosciences* **29**(5): 241 – 249.
- BANNERMAN D.M., BUS T., TAYLOR A., SANDERSON D.J., SCHWARZ I., JENSEN V., HVALBY Ø., RAWLINS J.N.P., SEEBURG P.H. und SPRENGEL R. (2012) *Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion*. *Nature neuroscience* **15**(8): 1153–1159.
- BAULIEU E.E. und ROBEL P. (1990) *Neurosteroids: A new brain function?*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **37**(3): 395 – 403.
- BEATO M., CHAVEZ S. und TRUSS M. (1996) *Transcriptional regulation by steroid hormones*. *Steroids* **61**(4): 240 – 251.
- BECKER J.B. (1999) *Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **64**(4): 803–812.
- BENDER R.A., ZHOU L., WILKARS W., FESTER L., LANOWSKI J.S., PAYSAN D., KÖNIG A. und RUNE G.M. (2010) *Roles of 17 β -estradiol involve regulation of reelin*

- expression and synaptogenesis in the dentate gyrus.* Cerebral Cortex **20**(12): 2985–2995.
- BOHACEK J. und DANIEL J. (2009) *The ability of oestradiol administration to regulate protein levels of oestrogen receptor alpha in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats is altered following long-term ovarian hormone deprivation.* Journal of neuroendocrinology **21**(7): 640–647.
- BOTELLA-LLUSIA J. (1953) *Nebenniere und genitale.* Archiv für Gynäkologie **183**(1): 73–130.
- BRAILOIU E., DUN S.L., BRAILOIU G.C., MIZUO K., SKLAR L.A., OPREA T.I., PROSSNITZ E.R. und 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**(2): 311–321.
- CAMBIASSO M.J., COLOMBO J.A. und CARRER H.F. (2000) *Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains.* European Journal of Neuroscience **12**(7): 2291–2298.
- CAMERON H.A., MCEWEN B.S. und GOULD E. (1995) *Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus.* The Journal of neuroscience **15**(6): 4687–4692.
- COMPTON D.R., SHENG S., CARLSON K.E., REBACZ N.A., LEE I.Y., KATZENELLENBOGEN B.S. und KATZENELLENBOGEN J.A. (2004) *Pyrazolo [1, 5-a] pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor β antagonist activity.* Journal of medicinal chemistry **47**(24): 5872–5893.
- CORPÉCHOT C., ROBEL P., AXELSON M., SJÖVALL J. und BAULIEU E.E. (1981) *Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain.* Proceedings of the National Academy of Sciences **78**(8): 4704–4707.
- CORPÉCHOT C., SYNGUELAKIS M., TALHA S., AXELSON M., SJÖVALL J., VIHKO R., BAULIEU E.E. und ROBEL P. (1983) *Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain.* Brain research **270**(1): 119–125.

- COUSE J., CURTIS S., WASHBURN T., EDDY E., SCHOMBERG D. und KORACH K. (1995) *Disruption of the mouse oestrogen receptor gene: resulting phenotypes and experimental findings*. *Biochemical Society Transactions* **23**(4): 929–935.
- COUSE J.F. und KORACH K.S. (2001) *Contrasting phenotypes in reproductive tissues of female estrogen receptor null mice*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **948**(1): 1–8.
- COUSE J.F., LINDZEY J., GRANDIEN K., GUSTAFSSON J. und KORACH K.S. (1997) *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse*. *Endocrinology* **138**(11): 4613–4621.
- COWLEY S.M., HOARE S., MOSSELMAN S. und PARKER M.G. (1997) *Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA*. *Journal of Biological Chemistry* **272**(32): 19858–19862.
- CREASMAN W.T., SOPER J.T., MCCARTY JR K.S., MCCARTY SR K.S., HINSHAW W. und CLARKE-PEARSON D.L. (1985) *Influence of cytoplasmic steroid receptor content on prognosis of early stage endometrial carcinoma*. *American journal of obstetrics and gynecology* **151**(7): 922–932.
- DANIEL J.M. (2013) *Estrogens, estrogen receptors, and female cognitive aging: the impact of timing*. *Hormones and behavior* **63**(2): 231–237.
- DANIEL J.M., SULZER J.K. und HULST J.L. (2006) *Estrogen increases the sensitivity of ovariectomized rats to the disruptive effects produced by antagonism of D 2 but not D 1 dopamine receptors during performance of a response learning task*. *Hormones and Behavior* **49**(1): 38 – 44.
- DAUVOIS S., WHITE R. und PARKER M.G. (1993) *The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling*. *Journal of Cell Science* **106**(4): 1377–1388.
- ERIKSSON P.S., PERFILIEVA E., BJÖRK-ERIKSSON T., ALBORN A.M., NORDBORG C., PETERSON D.A. und GAGE F.H. (1998) *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. *Nature medicine* **4**(11): 1313–1317.

- FESTER L., RIBEIRO-GOUVEIA V., PRANGE-KIEL J., VON SCHASSEN C., BÖTTNER M., JARRY H. und RUNE G.M. (2006) *Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis*. *Journal of Neurochemistry* **97**(4): 1136–1144.
- FESTER L., ZHOU L., BÜTOW A., HUBER C., VON LOSSOW R., PRANGE-KIEL J., JARRY H. und RUNE G.M. (2009a) *Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus*. *Hippocampus* **19**(8): 692–705.
- FESTER L., ZHOU L., VOETS C., OSSIG C., DISTELDORF E., PETERS C., BLÄUTE F., PRANGE-KIEL J., DUDZINSKI D., JARRY H. und RUNE G.M. (2009b) *The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures*. *Psychoneuroendocrinology* **34**, **Supplement 1**(0): S123 – S129.
- FILARDO E.J., QUINN J.A., BLAND K.I. und 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*. *Molecular endocrinology* **14**(10): 1649–1660.
- FILARDO E.J. und THOMAS P. (2005) *GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **16**(8): 362–367.
- FISHER C.R., GRAVES K.H., PARLOW A.F. und SIMPSON E.R. (1998) *Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(12): 6965–6970.
- FOSTER T.C. (2012) *Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging*. *Hippocampus* **22**(4): 656–669.
- FRICK K.M. (2013) *Epigenetics, oestradiol and hippocampal memory consolidation*. *Journal of neuroendocrinology* **25**(11): 1151–1162.
- FUGGER H.N., KUMAR A., LUBAHN D.B., KORACH K.S. und 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**(3): 207–209.
- GARCIA-SEGURA L.M. und BALTHAZART J. (2009) *Steroids and neuroprotection: new advances*. *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**(2): 5 – 9.
- GIBBS R. (2000) *Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats*. *Neurobiology of aging* **21**(1): 107.
- GOULD E., WOOLLEY C. und MCEWEN B. (1990a) *Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus*. *Neuroscience* **37**(2): 367 – 375.
- GOULD E., WOOLLEY C.S., FRANKFURT M. und MCEWEN B.S. (1990b) *Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood*. *The Journal of Neuroscience* **10**(4): 1286–1291.
- GREENE G.L., GILNA P., WATERFIELD M., BAKER A., HORT Y. und SHINE J. (1986) *Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA*. *Science* **231**(4742): 1150–1154.
- GU Q., KORACH K.S. und MOSS R.L. (1999) *Rapid action of 17β -estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors 1*. *Endocrinology* **140**(2): 660–666.
- GU Q. und MOSS R.L. (1996) *17β -Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade*. *The Journal of neuroscience* **16**(11): 3620–3629.
- GUILLERY R. (2000) *Early electron microscopic observations of synaptic structures in the cerebral cortex: a view of the contributions made by George Gray (1924–1999)*. *Trends in neurosciences* **23**(12): 594–598.
- GUIOCHON-MANTEL A., LESCOP P., CHRISTIN-MAITRE S., LOOSFELT H., PERROT-APPLANAT M. und MILGROM E. (1991) *Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor*. *The EMBO journal* **10**(12): 3851.

- HALL J.M. und McDONNELL D.P. (1999) *The estrogen receptor β -Isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens 1*. *Endocrinology* **140**(12): 5566–5578.
- HAZELL G.G., YAO S.T., ROPER J.A., PROSSNITZ E.R., O'CARROLL A.M. und LOLAIT S.J. (2009) *Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues*. *Journal of Endocrinology* **202**(2): 223–236.
- HOJO Y., HIGO S., ISHII H., OOISHI Y., MUKAI H., MURAKAMI G., KOMINAMI T., KIMOTO T., HONMA S. und POIRIER D. (2009) *Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus*. *Endocrinology* **150**(11): 5106–5112.
- HOJO Y., HIGO S., KAWATO S., HATANAKA Y., OOISHI Y., MURAKAMI G., ISHII H., KOMATSUZAKI Y., OGIUE-IKEDA M. und MUKAI H. (2011) *Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity*. *Frontiers in Endocrinology* **2**: 43.
- HOJO Y., MURAKAMI G., MUKAI H., HIGO S., HATANAKA Y., OGIUE-IKEDA M., ISHII H., KIMOTO T. und KAWATO S. (2008) *Estrogen synthesis in the brain role in synaptic plasticity and memory*. *Molecular and cellular endocrinology* **290**(1): 31–43.
- JELKS K.B., WYLIE R., FLOYD C.L., MCALLISTER A.K. und 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**(26): 6903–6913.
- JENSEN E.V. und JACOBSON H.I. (1962) *Basic guides to the mechanism of estrogen action*. *Recent Progr Hormone Res* **18**: 387–414.
- JONES M.E., BOON W.C., PROIETTO J. und SIMPSON E.R. (2006) *Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **17**(2): 55 – 64.

- KING W. und GREENE G. (1984) *Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells*. *Nature* **307**: 745–747.
- KRAMÁR E.A., CHEN L.Y., BRANDON N.J., REX C.S., LIU F., GALL C.M. und LYNCH G. (2009) *Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity*. *The Journal of Neuroscience* **29**(41): 12982–12993.
- KRETZ O., FESTER L., WEHRENBURG U., ZHOU L., BRAUCKMANN S., ZHAO S., PRANGE-KIEL J., NAUMANN T., JARRY H. und FROTSCHER M. (2004) *Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis*. *The Journal of neuroscience* **24**(26): 5913–5921.
- KUIPER G., ENMARK E., PELTO-HUIKKO M., NILSSON S. und GUSTAFSSON J.A. (1996) *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(12): 5925–5930.
- KUIPER G.G., CARLSSON B., GRANDIEN K., ENMARK E., HAGGBLAD J., NILSSON S. und GUSTAFSSON J.A. (1997) *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β* . *Endocrinology* **138**(3): 863–870.
- LERANTH C., HAJSZAN T. und MACLUSKY N.J. (2004) *Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats*. *The Journal of neuroscience* **24**(2): 495–499.
- LERANTH C., SHANABROUGH M. und HORVATH T. (2000) *Hormonal regulation of hippocampal spine synapse density involves subcortical mediation*. *Neuroscience* **101**(2): 349–356.
- LEUTGEB J., FREY J. und BEHNISCH T. (2005) *Single cell analysis of activity-dependent cyclic AMP-responsive element-binding protein phosphorylation during long-lasting long-term potentiation in area CA1 of mature rat hippocampal-organotypic cultures*. *Neuroscience* **131**(3): 601–610.
- LEVIN E.R. (2001) *Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors*. *Journal of Applied Physiology* **91**(4): 1860–1867.

- LEVIN E.R. (2005) *Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen*. *Molecular Endocrinology* **19**(8): 1951–1959.
- LI C., BRAKE W.G., ROMEO R.D., DUNLOP J.C., GORDON M., BUZESCU R., MAGARINOS A.M., ALLEN P.B., GREENGARD P. und LUINE V. (2004) *Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(7): 2185–2190.
- LINDBERG M., MOVÉRARE S., SKRTIC S., GAO H., DAHLMAN-WRIGHT K., GUSTAFSSON J. und OHLSSON C. (2003) *Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice*. *Molecular endocrinology* **17**(2): 203–208.
- LIU F., DAY M., MUNIZ L.C., BITRAN D., ARIAS R., REVILLA-SANCHEZ R., GRAUER S., ZHANG G., KELLEY C. und PULITO V. (2008) *Activation of estrogen receptor- β regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory*. *Nature neuroscience* **11**(3): 334–343.
- LUFT J.H. (1961) *Improvements in epoxy resin embedding methods*. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **9**(2): 409–414.
- MACLUSKY N.J., LUINE V.N., HAJSZAN T. und LERANTH C. (2005) *The 17 α and 17 β isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats*. *Endocrinology* **146**(1): 287–293.
- MAGARINOS A. und MCEWEN B. (1995) *Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Comparison of stressors*. *Neuroscience* **69**(1): 83 – 88.
- MARTEL C., MEINER M.H., GAGNÉ D., SIMARDA J. und LABRIE F. (1994) *Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase (3 β -HSD), 17 β -HSD5 α -reductase and aromatase activities in the rhesus monkey*. *Molecular and cellular endocrinology* **104**(1): 103–111.
- MATTSON MP F.K. (1998) *Signaling events regulating the neurodevelopmental triad. Glutamate and secreted forms of beta-amyloid precursor protein as examples*. *Perspect Dev Neurobiol* **5**(4): 337–52.

- MAUCH D.H., NÄGLER K., SCHUMACHER S., GÖRITZ C., MÜLLER E.C., OTTO A. und PFRIEGER F.W. (2001) *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. *Science* **294**(5545): 1354–1357.
- MCCARTHY M.M. (2011) *A lumpers versus splitters approach to sexual differentiation of the brain*. *Frontiers in neuroendocrinology* **32**(2): 114–123.
- MEETHAL S.V., LIU T., CHAN H.W., GINSBURG E., WILSON A.C., GRAY D.N., BOWEN R.L., VONDERHAAR B.K. und ATWOOD C.S. (2009) *Identification of a regulatory loop for the synthesis of neurosteroids: a steroidogenic acute regulatory protein-dependent mechanism involving hypothalamic-pituitary-gonadal axis receptors*. *Journal of neurochemistry* **110**(3): 1014–1027.
- MENDEZ P., GARCIA-SEGURA L.M. und MULLER D. (2011) *Estradiol promotes spine growth and synapse formation without affecting pre-established networks*. *Hippocampus* **21**(12): 1263–1267.
- MENDOZA-GARCÉS L., MENDOZA-RODRÍGUEZ C.A., JIMÉNEZ-TREJO F., PICAZO O. und CERBÓN M. (2011) *Differential expression of estrogen receptors in two hippocampal regions during the estrous cycle of the rat*. *The Anatomical Record* **294**(11): 1913–1919.
- MILNER T.A., MCEWEN B.S., HAYASHI S., LI C.J., REAGAN L.P. und ALVES S.E. (2001) *Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites*. *Journal of Comparative Neurology* **429**(3): 355–371.
- MING G.L. und SONG H. (2005) *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. *Annu Rev Neurosci* **28**: 223–250.
- MITRA S.W., HOSKIN E., YUDKOVITZ J., PEAR L., WILKINSON H.A., HAYASHI S., PFAFF D.W., OGAWA S., ROHRER S.P. und SCHAEFFER J.M. (2003) *Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α* . *Endocrinology* **144**(5): 2055–2067.
- MORISSETTE M., LE SAUX M., D ASTOUS M., JOURDAIN S., AL SWEIDI S., MORIN N., ESTRADA-CAMARENA E., MENDEZ P., GARCIA-SEGURA L.M. und DI PAOLO T. (2008) *Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of*

- estradiol in the brain*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **108**(3): 327–338.
- MOSSELMAN S., POLMAN J. und DIJKEMA R. (1996) *ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS letters **392**(1): 49–53.
- MUKAI H., TSURUGIZAWA T., MURAKAMI G., KOMINAMI S., ISHII H., OGIUE-IKEDA M., TAKATA N., TANABE N., FURUKAWA A. und HOJO Y. (2007) *Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons*. Journal of neurochemistry **100**(4): 950–967.
- MURDOCH F.E. und GORSKI J. (1991) *The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression*. Molecular and Cellular Endocrinology **78**(3): C103 – C108.
- NILSSON S., MÄKELÄ S., TREUTER E., TUJAGUE M., THOMSEN J., ANDERSSON G., ENMARK E., PETTERSSON K., WARNER M. und GUSTAFSSON J.Å. (2001) *Mechanisms of estrogen action*. Physiological reviews **81**(4): 1535–1565.
- NIMCHINSKY E.A., SABATINI B.L. und SVOBODA K. (2002) *Structure and function of dendritic spines*. Annual review of physiology **64**(1): 313–353.
- OGIUE-IKEDA M., TANABE N., MUKAI H., HOJO Y., MURAKAMI G., TSURUGIZAWA T., TAKATA N., KIMOTO T. und KAWATO S. (2008) *Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons*. Brain Research Reviews **57**(2): 363 – 375.
- OHMICHU M., TASAKA K., KURACHI H. und MURATA Y. (2005) *Molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulator in target tissues*. Endocrine journal **52**(2): 161–167.
- OLIVEIRA C., NIE R., CARNES K., FRANCA L., PRINS G., SAUNDERS P. und HESS R. (2003) *The antiestrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor-alpha but has no effect on estrogen receptor-beta and androgen receptor in rat efferent ductules*. Reproductive biology and endocrinology **1**: 75–75.
- OISHI Y., KAWATO S., HOJO Y., HATANAKA Y., HIGO S., MURAKAMI G., KOMATSUZAKI Y., OGIUE-IKEDA M., KIMOTO T. und MUKAI H. (2012) *Modulation of*

- synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen.* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **131**(1): 37–51.
- OSBORNE C., WAKELING A. und NICHOLSON R. (2004) *Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action.* British journal of cancer **90**: 2–6.
- OSBORNE C.K., ZHAO H.H. und FUQUA S.A. (2000) *Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use.* Journal of Clinical Oncology **18**(17): 3172–3186.
- PARKER M. (1995) *Structure and function of estrogen receptors.* Vitamins & Hormones **51**: 267–287.
- PHAN A., LANCASTER K.E., ARMSTRONG J.N., MACLUSKY N.J. und CHOLERIS E. (2011) *Rapid effects of estrogen receptor α and β selective agonists on learning and dendritic spines in female mice.* Endocrinology **152**(4): 1492–1502.
- PRANGE-KIEL J., FESTER L., ZHOU L., JARRY H. und RUNE G.M. (2009) *Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms.* Journal of neural transmission **116**(11): 1417–1425.
- PRANGE-KIEL J., FESTER L., ZHOU L., LAUKE H., CARRETERO J. und RUNE G.M. (2006) *Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons.* Hippocampus **16**(5): 464–471.
- PRANGE-KIEL J., JARRY H., SCHOEN M., KOHLMANN P., LOHSE C., ZHOU L. und RUNE G.M. (2008) *Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis.* The Journal of cell biology **180**(2): 417–426.
- PRANGE-KIEL J. und RUNE G. (2006) *Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus.* Neuroscience **138**(3): 765–772.
- PRANGE-KIEL J., RUNE G.M. und LERANTH C. (2004) *Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats.* European Journal of Neuroscience

- 19(2): 309–317.
- PRANGE-KIEL J., WEHRENBURG U., JARRY H. und RUNE G.M. (2003) *Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons*. *Hippocampus* **13**(2): 226–234.
- QU N., WANG L., LIU Z.C., TIAN Q. und ZHANG Q. (2013) *Oestrogen receptor α agonist improved long-term ovariectomy-induced spatial cognition deficit in young rats*. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* **16**(05): 1071–1082.
- REYNOLDS E.S. (1963) *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*. *The Journal of cell biology* **17**(1): 208–212.
- RIGGS B.L. und HARTMANN L.C. (2003) *Selective estrogen-receptor modulators - mechanisms of action and application to clinical practice*. *New England Journal of Medicine* **348**(7): 618–629.
- RISSMAN E.F., HECK A.L., LEONARD J.E., SHUPNIK M.A. und GUSTAFSSON J.Å. (2002) *Disruption of estrogen receptor β gene impairs spatial learning in female mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(6): 3996–4001.
- ROBINSON D.G., EHLERS U., HERKEN R., HERRMANN B., MAYER F. und SCHÜR-MANN F.W. (2013) *Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie: eine Einführung für Biologen und Mediziner*. Springer-Verlag.
- RUNE G., LOHSE C., PRANGE-KIEL J., FESTER L. und FROTSCHER M. (2006) *Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus?*. *Neurochemical research* **31**(2): 145–155.
- RUNE G., WEHRENBURG U., PRANGE-KIEL J., ZHOU L., ADELMANN G. und FROTSCHER M. (2002) *Estrogen up-regulates estrogen receptor α and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus*. *Neuroscience* **113**(1): 167–175.
- SANTEN R., BRODIE H., SIMPSON E., SIITERI P. und BRODIE A. (2009) *History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target*. *Endocrine reviews* **30**(4): 343–375.

- SAVONENKO A. und MARKOWSKA A. (2003) *The cognitive effects of ovariectomy and estrogen replacement are modulated by aging*. *Neuroscience* **119**(3): 821–830.
- SEGAL M. und MURPHY D. (2001) *Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates*. *Hormones and Behavior* **40**(2): 156 – 159.
- SHARMA P. und THAKUR M. (2006) *Expression of estrogen receptor (ER) α and β in mouse cerebral cortex: effect of age, sex and gonadal steroids*. *Neurobiology of aging* **27**(6): 880–887.
- SHUGHRUE P., SCRIMO P. und MERCHENTHALER I. (2000) *Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER α and ER β) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain*. *Neuroscience* **96**(1): 41–49.
- SHUGHRUE P.J., LANE M.V. und MERCHENTHALER I. (1997) *Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system*. *The Journal of Comparative Neurology* **388**(4): 507–525.
- SIMPSON E.R., CLYNE C., RUBIN G., BOON W.C., ROBERTSON K., BRITT K., SPEED C. und JONES M. (2002) *Aromatase—a brief overview*. *Annual review of physiology* **64**(1): 93–127.
- SMITH C.C. und MCMAHON L.L. (2005) *Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased*. *The Journal of neuroscience* **25**(34): 7780–7791.
- SMITH I. (1999) *Aromatase inhibitors: a dose-response effect?*. *Endocrine-related cancer* **6**(2): 245–249.
- SPENCER J.L., WATERS E.M., ROMEO R.D., WOOD G.E., MILNER T.A. und MCEWEN B.S. (2008) *Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function*. *Frontiers in neuroendocrinology* **29**(2): 219–237.
- SPENCER-SEGAL J.L., TSUDA M.C., MATTEI L., WATERS E.M., ROMEO R.D., MILNER T.A., MCEWEN B.S. und OGAWA S. (2012) *Estradiol acts via estrogen*

- receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation.* Neuroscience **202**: 131–146.
- SRIVASTAVA D.P., WOOLFREY K.M., LIU F., BRANDON N.J. und PENZES P. (2010) *Estrogen receptor β activity modulates synaptic signaling and structure.* The Journal of neuroscience **30**(40): 13454–13460.
- STERIO D. (1984) *The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector.* Journal of microscopy **134**(2): 127–136.
- STOFFEL-WAGNER B. (2001) *Neurosteroid metabolism in the human brain.* European Journal of Endocrinology **145**(6): 669–679.
- STOPPE G. und VEDDER H. (2000) *Die Rolle der Östrogene in der Prävention und Therapie von Demenzen.* Reproduktionsmedizin **16**(5): 310–318.
- STOPPINI L., BUCHS P.A. und MULLER D. (1991) *A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.* Journal of neuroscience methods **37**(2): 173–182.
- SUN J., HUANG Y.R., HARRINGTON W.R., SHENG S., KATZENELLENBOGEN J.A. und KATZENELLENBOGEN B.S. (2002) *Antagonists selective for estrogen receptor α .* Endocrinology **143**(3): 941–947.
- SZYMCZAK S., KALITA K., JAWORSKI J., MIODUSZEWSKA B., SAVONENKO A., MARKOWSKA A., MERCHENTHALER I. und KACZMAREK L. (2006) *Increased estrogen receptor β expression correlates with decreased spine formation in the rat hippocampus.* Hippocampus **16**(5): 453–463.
- TAN X.J., DAI Y.B., WU W.F., KIM H.J., BARROS R.P., RICHARDSON T.I., YADEN B.C., WARNER M., MCKINZIE D.L. und KRISHNAN V. (2012) *Reduction of dendritic spines and elevation of GABAergic signaling in the brains of mice treated with an estrogen receptor β ligand.* Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(5): 1708–1712.
- TANAKA M. und SOKABE M. (2013) *Bidirectional modulatory effect of 17 β -estradiol on NMDA receptors via ER α and ER β in the dentate gyrus of juvenile male rats.* Neuropharmacology **75**(0): 262 – 273.

- TANAPAT P., HASTINGS N.B., RYDEL T.A., GALEA L.A. und GOULD E. (2001) *Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism.* *Journal of Comparative Neurology* **437**(4): 496–504.
- THAKUR M. und SHARMA P. (2007) *Transcription of estrogen receptor α and β in mouse cerebral cortex: effect of age, sex, 17β -estradiol and testosterone.* *Neurochemistry international* **50**(2): 314–321.
- TREMBLAY G., TREMBLAY A., COPELAND N., GILBERT D., JENKINS N., LABRIE F. und GIGUÈRE V. (1997) *Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta.* *Molecular endocrinology* **11**(3): 353–365.
- VIDEBECH P. und RAVNKILDE B. (2004) *Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies.* *American Journal of Psychiatry* **161**(11): 1957–1966.
- WALF A.A., KOONCE C.J. und FRYE C.A. (2008) *Estradiol or diarylpropionitrile administration to wild type, but not estrogen receptor beta knockout, mice enhances performance in the object recognition and object placement tasks.* *Neurobiology of learning and memory* **89**(4): 513–521.
- WANG S.H. und MORRIS R.G. (2010) *Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation.* *Annual Review of Psychology* **61**: 49–79.
- WARNER-SCHMIDT J.L. und DUMAN R.S. (2006) *Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment.* *Hippocampus* **16**(3): 239–249.
- WATERS E.M., MITTERLING K., SPENCER J.L., MAZID S., MCEWEN B.S. und MILNER T.A. (2009) *Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus.* *Brain research* **1290**: 1–11.
- WEHLING M., SCHULTZ A. und LÖSEL R. (2006) *Nongenomic actions of estrogens: exciting opportunities for pharmacology.* *Maturitas* **54**(4): 321–326.
- WEHRENBURG U., PRANGE-KIEL J. und RUNE G.M. (2001) *Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase.*

- Journal of Neurochemistry **76**(6): 1879–1886.
- WEIGEL N.L. und ZHANG Y. (1998) *Ligand-independent activation of steroid hormone receptors*. Journal of Molecular Medicine **76**(7): 469–479.
- WESTRUM L.E. und BLACKSTAD T.W. (1962) *An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior, CA 1) with particular emphasis on synaptology*. Journal of Comparative Neurology **119**(3): 281–309.
- WINKELMANN E. (1981) *Principles of synaptic organization in the central nervous system of vertebrates. Regional structural differences with special reference to the visual system*. Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung **96**(5): 755–774.
- WITTY C.F., GARDELLA L.P., PEREZ M.C. und DANIEL J.M. (2012) *Short-term estradiol administration in aging ovariectomized rats provides lasting benefits for memory and the hippocampus: a role for insulin-like growth factor-I*. Endocrinology **154**(2): 842–852.
- WOOLLEY C.S., GOULD E., FRANKFURT M. und MCEWEN B.S. (1990) *Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons*. The Journal of neuroscience **10**(12): 4035–4039.
- WOOLLEY C.S. und MCEWEN B.S. (1992) *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat*. The Journal of Neuroscience **12**(7): 2549–2554.
- XU X. und ZHANG Z. (2006) *Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice*. Life sciences **79**(16): 1553–1560.
- YLIKOMI T., BOCQUEL M., BERRY M., GRONEMEYER H. und CHAMBON P. (1992) *Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors*. The EMBO journal **11**(10): 3681.
- ZHOU L., FESTER L., VON BLITTERSDORFF B., HASSU B., NOGENS H., PRANGE-KIEL J., JARRY H., WEGSCHEIDER K. und RUNE G.M. (2010) *Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice*. Endocrinology **151**(3): 1153–1160.

ZHOU L., FESTER L., HAGSHENAS S., DE VRESE X., VON HACHT R., GLOGER S., BRANDT N., BADER M., VOLLMER G. und RUNE G.M. (2014) *Oestradiol-Induced Synapse Formation in the Female Hippocampus: Roles of Oestrogen Receptor Subtypes*. *Journal of Neuroendocrinology* **26**(7): 439–447.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Professor Rune für die Überlassen meines Themas und Ihre Unterstützung bei der Verfassung der Doktorarbeit. Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Lepu Zhou für seine wissenschaftliche Betreuung. Ich danke allen Institutsmitarbeitern, ganz besonders Frau Brigitte Asmus und Bettina Kruck für Ihre rat- und tatkräftige Unterstützung. Ferner bedanke ich mich bei meiner Familie für das Korrekturlesen und bei meinem Mann, der mich geduldig in das verwendete Schreibprogramm eingearbeitet hat.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

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: (Xenia de Vrese)