

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Klinik für Neuroanatomie
Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Geschlechtsspezifischer Einfluss von Steroidhormonen und Steroidhormonsynthesehemmern auf die Plastizität der Synapsen im Hippocampus

Dissertation

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

vorgelegt von:

Lukas Friedrich Heilmann
aus Nordenham

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.06.2019**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Volkmar Müller

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	7
1.1. Die Bedeutung des Hormonrezeptorstatus	7
1.2. Der Aromataseinhibitor Letrozol	9
1.3. Effekt der Steroidhormone auf synaptische Plastizität.....	11
1.4. Die Antiandrogen-Therapie beim Prostatakarzinom.....	13
1.5. Austausch von Informationen auf neuronaler Ebene	14
2. Zielsetzung	18
3. Materialien und Methoden.....	19
3.1. Materialien	19
3.1.1. Geräte.....	19
3.1.2. Chemikalien.....	20
3.1.3. Software	21
3.2. Methoden.....	23
3.2.1. Versuchstiere	23
3.2.2. Präparation der Hippocampi.....	23
3.2.3. Hippocampale Slice-Kulturen	23
3.2.4. Elektronenmikroskop (EM).....	26
3.2.5. Messung der Synapsendichte	27
3.3. Statistik.....	30
4. Ergebnisse	32
4.1. Vergleich männliche und weibliche hippocampale Synapsen in Slicekulturen.....	33
4.2. Östrogen hat keinen Einfluss auf Synapsendichte männlicher Tiere in Slicekulturen	34
4.3. Der Einfluss des Aromatasehemmers Letrozol auf die Synapsen in Slicekulturen.....	35
4.4. DHT erhöht hippocampale Synapsen männlicher Tiere in Slicekulturen.....	36
4.5. Trilostan hat keinen signifikanten Einfluss auf hippocampale Synapsen in Slicekulturen.....	37
4.6. Kombination DHT + Letrozol vermindert bzw. erhöht Synapsendichte in Slicekulturen	38
4.7. Keine Veränderung unter DHT + Trilostan in Slicekulturen.....	40
4.8. Elektronenmikroskopische Beispielbilder	41

5.	Zusammenfassung	43
5.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse (deutsch)	43
5.2.	Summary of results (English)	44
6.	Diskussion.....	45
6.1.	Der geschlechtsspezifische Dimorphismus.....	45
6.2.	Steroidhormone essentiell für Synapsen & klinische Translation	46
6.3.	Bedeutung des Testosterons in der Pathologie und Therapie des Prostata-Karzinoms	48
6.4.	Beurteilung der Stärken und Schwächen der Arbeit.....	49
7.	Literaturverzeichnis	52
8.	Danksagung	58
9.	Curriculum Vitae	59
10.	Eidesstattliche Versicherung	60

Abkürzungsverzeichnis

5 α -R	5 α -Reduktase
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ m ³	Kubikmikrometer
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgenrezeptor
Aro	Aromatase
Aufl.	Auflage
CA	Cornu ammonis
CA1	Cornu ammonis Region 1
CA2	Cornu ammonis Region 2
CA3	Cornu ammonis Region 3
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DG	Gyrus dentatus
DHT	Dihydrotestosteron
E ₂	17- β -Estradiol
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Estrogenrezeptor
et al.	et alii (und andere)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
h	Stunde (hora)
H ₂ O	Wasser
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
LTP	Long Term Potentiation (Langzeitpotenzierung)
M	Molar
männl.	männlich
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Ncl.	Nucleus
Nr.	Nummer
p	p-Wert (Signifikanzniveau)
Tab.	Tabelle
u.a.	Unter Anderem
v.a.	Vor allem
weibl.	Weiblich
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung des Hormonrezeptorstatus

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Mit einer Prävalenz von über 30% kommt dieses wesentlich öfter vor als etwa das Kolon- oder Bronchialkarzinom. (Siegel, Miller, & Jemal, 2016) Das Mammakarzinom ist nicht nur das häufigste Karzinom, sondern auch die zweithäufigste Krebstodesursache der Frau. Jede achte Frau erkrankt statistisch gesehen im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. (Hayat, Howlader, Reichman, & Edwards, 2007)

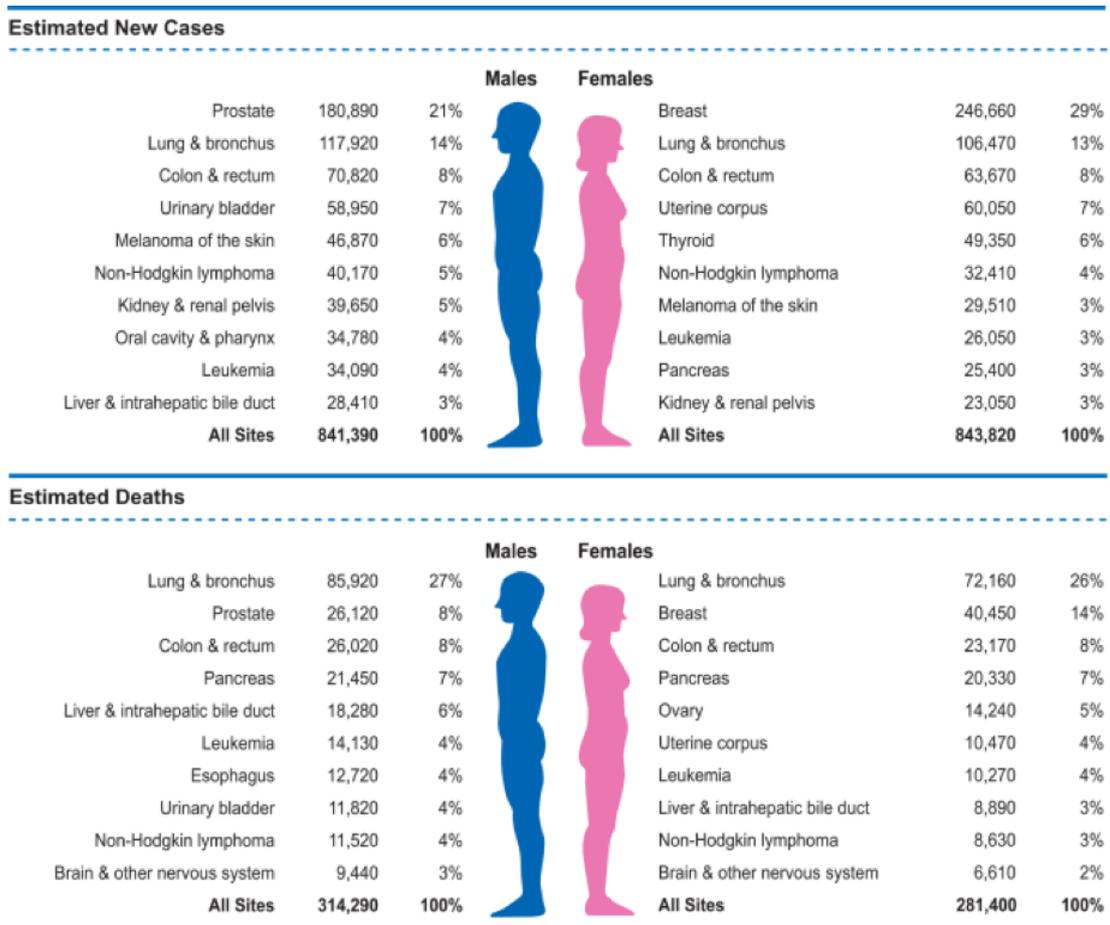


Abbildung 1.1.: Die zehn häufigsten Krebsarten bei Neudiagnosen und Todesfällen in den USA 2016 (Siegel et al., 2016)

In den letzten Jahrzehnten ist intensiv nach neuen Methoden für die Früherkennung des Mammakarzinoms gesucht worden. Durch diese Fortschritte in der Medizin kann der Brustkrebs oft im Frühstadium erkannt werden und wird somit immer besser therapierbar. In der Therapie hat die Exzision des Tumors noch immer die größte Relevanz. (Untch et al., 2015) Dies kann heutzutage bei günstiger Relation von Tumor- zu Brustgröße brusterhaltend geschehen. Wie auch bei anderen Tumoren ist neben der Tumorgöße für die weitere Therapiestrategie vor allem die Frage nach Lymph- und Fernmetastasen wichtig. Insbesondere Knochenmetastasen sind mit 41,1% die am häufigsten betroffene anatomische Struktur für Fernmetastasen beim Mammakarzinom. (Berman, Thukral, Hwang, Solin, & Vapiwala, 2013) Durch Beurteilung dieser Faktoren kann ein Therapieplan festgelegt werden mit der Frage nach Operation, Bestrahlung und/oder Chemotherapie. Ferner wird seit einigen Jahren auch untersucht, ob die Tumorzellen den Wachstumsfaktor HER2/neu exprimieren, und somit adjuvant eine Antikörpertherapie durchgeführt werden kann. (Hurvitz, Hu, O'Brien, & Finn, 2013; Joensuu, 2017) HER2/neu ist für die therapeutische Einschätzung wichtig und ist Gegenstand aktueller Forschungsgruppen. (Zardavas, Cameron, Krop, & Piccart, 2013) Bei der Behandlung des Mammakarzinoms kommt jedoch noch ein weiterer Aspekt hinzu: der Hormonrezeptorstatus.

Dies ist einer der bedeutendsten Faktoren bei der therapeutischen Fragestellung. Über 70% der Mammakarzinome sind Östrogenrezeptor-positiv (ER+).(Howlader et al., 2014) Dieser positive Hormonrezeptorstatus bedeutet, dass die Tumorzellen bei diesen Karzinomen Östrogenrezeptoren exprimieren und somit eine therapeutische Angriffsfläche bieten.(Lumachi, Brunello, Maruzzo, Basso, & Basso, 2013) Auch pathophysiologisch spielt der ER eine große Rolle beim Mammakarzinom. Die Interaktion des ER mit dem Östrogen wirkt stimulierend auf die Tumorzellen und führt somit zum Tumorprogress. Um diesen Wachstumsreiz zu unterbinden kann man eine adjuvante Hormontherapie (aHT) einleiten. Das Ziel dieser Therapie ist es entweder die Biosynthese von Östrogen zu minimieren oder die Interaktion des Östrogens mit dem

ER zu blockieren. Seit Jahrzehnten ist die aHT deshalb ein elementarer Baustein für die Standardtherapie des ER+-Mammakarzinoms geworden. (Lumachi et al., 2016) Zurzeit gibt es drei verschiedene Substanzklassen in der aHT:

- GnRH-Antagonisten
- Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs)
- Aromatase-Inhibitoren (AIs)

Im Anschluss an einen multifaktoriellen Entscheidungsprozess, wird eine Substanzklasse für die Behandlung ausgewählt. Die SERMs, e.g. Tamoxifen, sind Wirkstoffe, die selektiv Östrogenrezeptoren an der Brust blockieren und somit den durch Östrogen getriggerten Wachstum der Tumorzellen hemmen. (Fabian, 2007) Dieser Wirkstoff wird vorrangig bei prämenopausalen Frauen benutzt, da es einen spezifischen Angriffspunkt gibt und der hormonelle Körperkreislauf des Östrogens nicht unterbrochen wird.

1.2. Der Aromataseinhibitor Letrozol

Mit der Menopause beginnt ein Übergang von der reproduktiven Zeit des Ovars zum Erlöschen der ovariellen Funktion. Das Östrogen wird fortan hauptsächlich von dem Enzym Aromatase in den Fettzellen des Körpers gebildet. (Au, Furness, & Brown, 2016) Die Hemmung dieses Enzyms wird somit postmenopausal zu einem neuen Therapieziel. Aromatase-Inhibitoren (AIs) können die Östrogenproduktion systemisch unterbinden. (McNamara, Guestini, Sakurai, Kikuchi, & Sasano, 2016) Bei postmenopausalen Frauen war das krankheitsfreie Überleben signifikant höher, wenn der AI Letrozol eingesetzt wurde im Vergleich zur Therapie mit dem SERM Tamoxifen. (Dowsett et al., 2010; Gelber et al., 2011) Letrozol ist ein kompetitiver Inhibitor der Aromatase. Die Aromatase katalysiert als Enzym den finalen Schritt der Östrogensynthese. Dieser Schritt ist die Konversion von Testosteron zu Östrogen. (Tashjian & Armstrong, 2011)

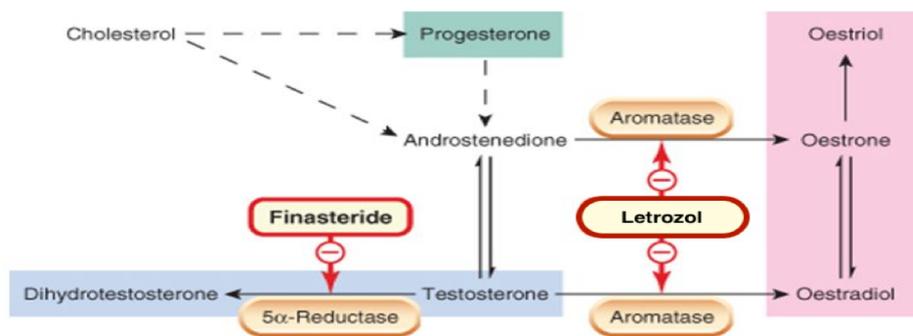


Abbildung 1.2.: Die Biosynthese von Androgenen und Östrogenen, mit Angriffspunkten von Wirkstoffen (Rang, Dale, & Ritter, 1995)

Letrozol blockiert diesen Schritt effektiv, ohne dass andere steroidale Signalwege beeinträchtigt werden. Hinzu kommt, dass Letrozol ein höheres Potential als andere AIs wie z.B. Anastrozol, Exemestan, Formestan und Aminoglutethimid hat. (Bhatnagar, 2007) Es erreicht eine nahezu vollständige Blockade der Aromatase. Dies erklärt, weshalb Letrozol ein wichtiger Bestandteil der Hormontherapie beim ER+-Mammakarzinom bei postmenopausalen Frauen geworden ist.

Nebenwirkungen in der Tumorthherapie sind keine Seltenheit und manifestieren sich vor allem bei Einsatz von Chemotherapeutika. (Curigliano, Criscitiello, Esposito, & Pruneri, 2017) Doch auch Substanzen, die in den Hormonhaushalt eingreifen, können beeinträchtigende Nebenwirkungen hervorrufen. Mehrere multizentrische Studien haben gezeigt, dass es unter AI-Therapie mit Letrozol zu Beeinträchtigungen der Gedächtnisfunktionen kommen kann. (Tuscher et al., 2016) Patienten leiden häufig unter Einschränkungen von verbalen, episodischen Gedächtnisfunktionen und unter Beeinträchtigungen beim Ausführen von Tätigkeiten. (Le Rhun et al., 2015)

1.3. Effekt der Steroidhormone auf synaptische Plastizität

Schon seit den 1950er Jahren ist bekannt, dass der Bereich des Hippocampus eine wichtige Schaltstelle bei diesen Gedächtnisvorgängen ist. (Scoville & Milner, 1957) Gerade deshalb steht der Hippocampus schon lange im Fokus vieler Forschungsgruppen. Als Teil des limbischen Systems ist der Hippocampus einer von vielen komplexen Strukturen des medialen Temporallappens. (Bird & Burgess, 2008) Der Hippocampus ist essentiell für anatomische Verbindungen, synaptische Plastizität, Wahrnehmung und Verhalten, sowie rechnerische Algorithmen. (Andersen, 2007)

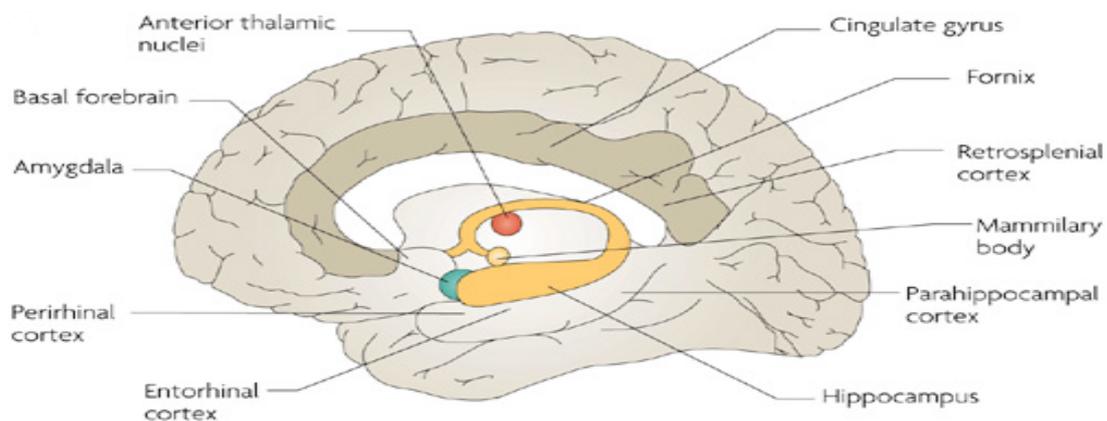


Abbildung 1.3.: Der Hippocampus und seine Verbindungen (Bird & Burgess, 2008)

Bereits in den frühen 1990er Jahren konnte beobachtet werden, dass Östrogene die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflussen. (Harris, 1994) Die Stabilität und Funktionalität von synaptischer Konnektivität der Neurone wird in über 90% durch die „dendritic spines“ gewährleistet. In frühen Experimenten führten Ovariectomien bei Ratten zu einem Verlust von postsynaptischen „dendritic spines“ an Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus. (Gould, Woolley, Frankfurt, & McEwen, 1990) Somit konnte die Vermutung geäußert werden, dass Östrogene die Anzahl der Neurone beeinflussen können. Die Bildung der Östrogene unterliegt einem komplexen Regelkreis zwischen dem Hypothalamus, dem Vorderlappen der Hypophyse (HVL) und den Ovarien. (Harris Clark, 2003) Die Sekretion von GnRH aus dem Hypothalamus

stimuliert die Freisetzung von LH/FSH aus dem HVL („Anterior pituitary“). LH und FSH bewirken das Wachstum ovarieller Follikel und das Ausbilden des Corpus luteum im Ovar. Von diesen Zellen wird dann Östrogen und Progesteron gebildet und ins Blut sezerniert. Durch positives und negatives „feedback“ wird dieser Kreis geregelt und balanciert. (Chen & Ward, 2014)

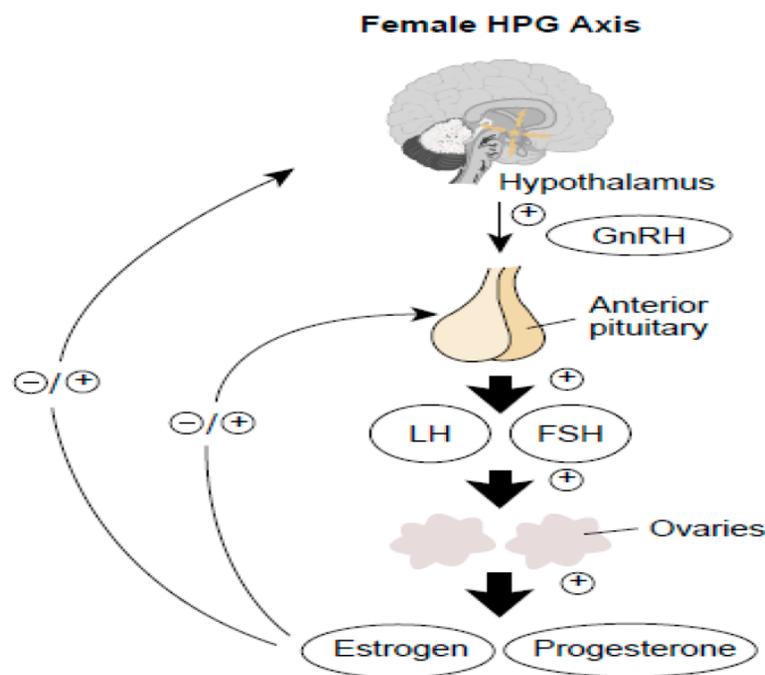


Abbildung 1.4.: Die weibliche Hypothalamus-Hypophysen-Ovarien-Achse (Kong et al., 2014)

Es konnte aber auch gezeigt werden, dass das Ovar nicht der einzige Ort der Östrogensynthese ist, sondern Neurone selbst im Hippocampus de novo Östrogen synthetisieren. (Hojo et al., 2004; Prange-Kiel, Fester, Zhou, Jarry, & Rune, 2009; Prange-Kiel, Wehrenberg, Jarry, & Rune, 2003) Die Inhibierung dieser hippocampalen Östrogensynthese hat einen negativen Einfluss auf die Neurone. (Fester, Prange-Kiel, Jarry, & Rune, 2011; Fester et al., 2006; Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2006) Wie bereits erwähnt, kann die Blockade der Östrogensynthese sehr effektiv mit Letrozol erreicht werden. Unsere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass die Blockade der Aromatase mit Letrozol einen negativen Einfluss auf die synaptische Plastizität bei weiblichen Ratten hat, bis hin zum Verlust von „spine“-Synapsen. (Zhou et al., 2010)

1.4. Die Antiandrogen-Therapie beim Prostatakarzinom

Der Effekt des Letrozols konnte nicht gleichermaßen bei den männlichen Ratten nachgewiesen werden, was auf einen sexuellen Dimorphismus hinweisen könnte. (Vierk et al., 2012) In Bezug auf synaptische Plastizität im Hippocampus ließen uns die Untersuchungen von Leranath (Leranath, 2003; Leranath, Hajszan, & MacLusky, 2004) spekulieren, dass Dihydrotestosteron (DHT) eine große Rolle bei den männlichen Tieren spielt. DHT ist der biologisch aktive Metabolit des Hormons Testosteron, welches durch das Enzym 5 α -Reduktase gebildet wird. (Martini, 1982) In vielen Organen ist DHT das eigentliche wirksame Androgen. Die Bedeutung des sexuellen Dimorphismus und die Rolle des DHT sind nicht nur für die biologische Grundlagenforschung interessant, sondern können auch klinische Implikationen zur Folge haben. Während bei den Frauen das Mammakarzinom die klinische Bedeutung des Steroidhormonhaushaltes verdeutlicht, gibt es auch bei Männern ein Karzinom, welches hormonsensibel sein kann und somit Ziel hormontherapeutischer Maßnahmen ist: das Prostatakarzinom.

Es ist die häufigste maligne Erkrankung und die zweithäufigste Krebstodesursache des Mannes. (Brawley, 2012) Während der Goldstandard in der Prostatakarzinom-Therapie noch immer die radikale operative Resektion des Tumors ist, werden insbesondere bei älteren Patienten oder bei hochdifferenzierten und langsam progredienten Tumoren auch konservative Konzepte angewandt. (Albertsen, Hanley, & Fine, 2005; Stangelberger, Waldert, & Djavan, 2008) Bei lokaler Lymphmetastasierung und vor allem bei klinisch fernmetastasierten Prostatakarzinomen ist die erste therapeutische Wahl die Androgendeprivation mit einer Hormontherapie. (Perlmutter & Lepor, 2007) Als Wirkstoffe gibt es - wie auch beim Mammakarzinom - die GnRH-Analoga. Hinzu kommen steroidale Antiandrogene, wie Cyproteronacetat und nichtsteroidale Antiandrogene, wie Flutamid. (Voegeli, Kurtz, Grimm, Effert, & Eckardt, 2005) Da durch die Antiandrogen-Therapie (ADT) die Steroidhormone vermindert werden, kommt es zu unerwünschten Nebenwirkungen. (Grossmann & Zajac,

2011) Das Frakturrisiko steigt durch einen beschleunigten Knochenabbau und viele Patienten erfahren Symptome wie Schwindel, sexuelle Dysfunktionen, Hitzewallungen und Anämie. (Asbell et al., 1996; Richard J Wassersug, Lauren Walker, & Robinson, 2014) Ferner konnte eine Herabsetzung zerebraler Funktionen beobachtet werden. In Bereichen wie Sprachvermögen, Kurzzeitgedächtnis, Anpassungsfähigkeit, sowie Impulskontrolle hatte die ADT negative Auswirkungen auf die Patienten. (Gunlusoy et al., 2017) Aus diesem Grund sollten die Nebenwirkungen einer ADT stets mit den Vorteilen der Therapie verglichen und mit dem Patienten besprochen werden. Die zahlreichen Nebenwirkungen einer ADT implizieren die wichtige Rolle des DHT, vor allem auf neuronaler Ebene.

1.5. Austausch von Informationen auf neuronaler Ebene

Bei den männlichen und weiblichen Patienten fällt auf, dass unter der jeweiligen geschlechtsspezifischen Steroidbiosynthesehemmung zerebrale Beeinträchtigungen auftreten. Die Hormone DHT und Östrogen scheinen folglich fundamental für die Konnektivität der Neurone zu sein. Um dieses Phänomen morphologisch genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden in dieser Arbeit die hippocampalen Neurone auf synaptischer Ebene untersucht. Eine Synapse ist die Verschaltung zwischen zwei oder mehreren Nervenzellen. (Pereda, 2014) Sie sind verantwortlich und notwendig für den Austausch von Informationen auf Zellebene und die Überleitung von Signalen. (Edelman, Gall, & Cowan, 1987) Ohne Synapsen wäre dies nicht möglich. Zu dem strukturellen Gerüst einer Synapse gehören drei Bestandteile:

1. Präsynapse
2. Synaptischer Spalt
3. Postsynapse

In der Präsynapse findet die Erregung der Reizweiterleitung statt. Diese Erregung wird von der Postsynapse empfangen. Der synaptische Spalt liegt zwischen diesen beiden Strukturen. Nach Art der Erregungsüberleitung kann man Synapsen in elektrische und chemische Synapsen unterteilen. Elektrische Synapsen zeichnen sich durch „gap junctions“ aus mit einem sehr kleinen synaptischen Spalt, welche z.B. beim Lidreflex vorkommen. Für unsere Untersuchungen sind jedoch chemische Synapsen interessant, die ihre Reizweiterleitung über Neurotransmitter gewährleisten. Diese Neurotransmitter können stimulierend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) sein. In der Präsynapse werden die Neurotransmitter in Vesikel verpackt und in den synaptischen Spalt abgegeben (Exozytose). Nach Diffusion durch den synaptischen Spalt binden die Neurotransmitter an entsprechende Rezeptoren der Postsynapse. Diese Bindung öffnet postsynaptische Ionenkanäle, welche ein Aktionspotential auslösen und somit die Erregung weiterleiten.

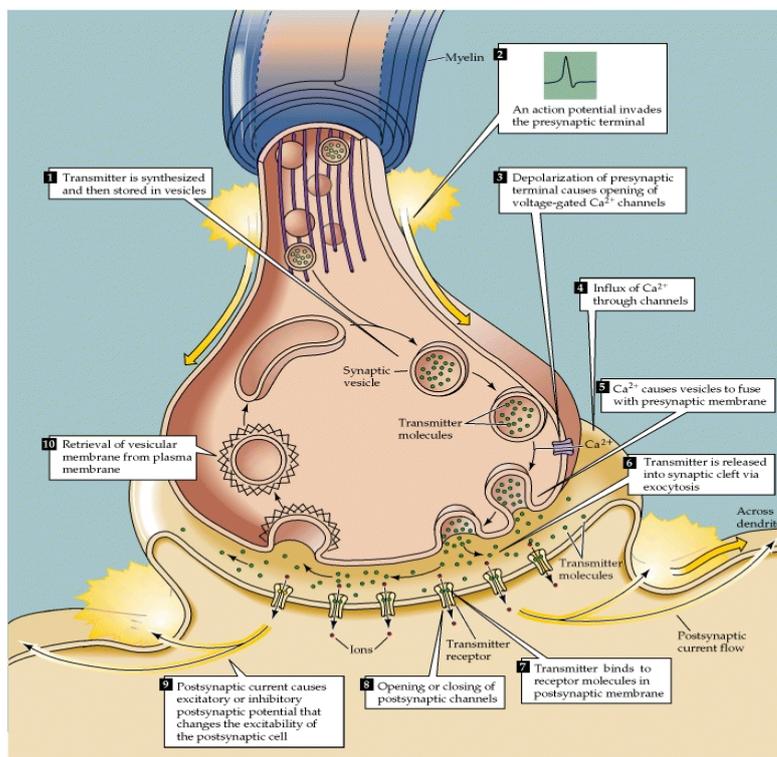


Abbildung 1.5.: Sequenz von Schritten bei Weiterleitung von neuronalen Signalen einer typischen chemischen Synapse. (Purves et al., 2001)

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Steroidhormonen sowie deren Entzug auf die Anzahl der Synapsen im Hippocampus untersucht. Weibliche und männliche Tiere wurden mit folgenden vier verschiedenen Substanzen behandelt, sowie relevanter Kombinationen verschiedener Substanzklassen:

1. Östrogen (Estradiol/E2)
2. Dihydrotestosteron (DHT)
3. Trilostan
4. Letrozol

Adrenal steroids and congenital adrenal hyperplasias

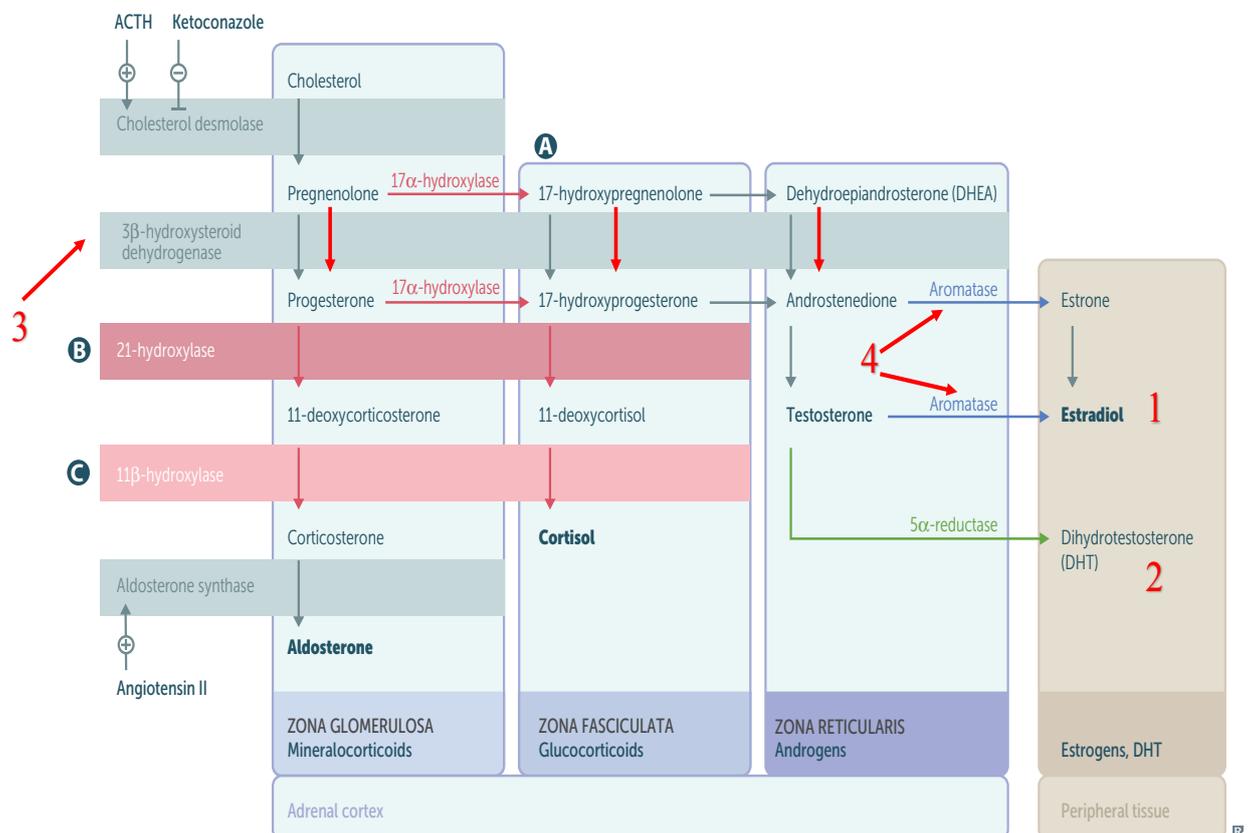


Abbildung 1.6.: Zuordnung von Substanzen in der Steroidbiosynthese. (Le, Bhushan, Sochat, Kalani, & Chavda, 2017)

Die vier Substanzen lassen sich alle als Schlüsselenzyme oder Substrate in die Steroidbiosynthese einordnen. Die Bedeutung des Östrogens, des

Testosterons und des Letrozols sind bereits verdeutlicht worden. Trilostan ist ein Steroidbiosynthesehemmer der im Vergleich zu Letrozol ein relativ unspezifischer Inhibitor ist. (Macfarlane, Parkin, & Ramsey, 2016) Durch seine Hemmung der 3- β -hydroxysteroid-Dehydrogenase greift es an mehreren Stellen hemmend ein. Wie in der Abbildung 1-6 zu sehen, hat dies nicht nur Auswirkungen auf die Synthese der Steroidhormone, sondern auch auf die Synthese von Glukokortikoiden und Mineralkortikoiden. Beim Menschen wird es nicht mehr als Therapeutikum eingesetzt. In der Veterinärmedizin macht man sich dieses Wirkprofil jedoch zu nutzen, indem man Trilostan zur Behandlung des Morbus Cushing einsetzt. (Nagata, Kojima, & Yuki, 2017)

2. Zielsetzung

In dieser Dissertationsarbeit gilt es primär zwei Hypothesen zu untersuchen. Zum einen stellt sich die Frage, ob Östrogene den gleichen Effekt auf die männliche hippocampale Synapsendichte haben wie auf die der weiblichen Tiere. Hier wurde der direkte Einfluss von Östrogenen untersucht, sowie, ob der Aromataseinhibitor Letrozol einen analogen Effekt auf männliche Tiere hat, wie der bereits gezeigte Effekt der down-regulation der Synapsen bei weiblichen Tieren. Auf dem Letrozol liegt ein besonderer Fokus, da dieses im klinischen Alltag bei der hormonsensitiven Brustkrebstherapie eingesetzt wird.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Gabe von Dihydrotestosteron einen positiven oder negativen Effekt auf die Synapsenplastizität der weiblichen und männlichen Tiere hat. Auch hier wurde in diesem Zusammenhang der Effekt von klinisch relevanten Steroidhormonbiosynthesehemmern wie Letrozol untersucht. Ein weiterer Steroidbiosynthesehemmer, der in den Experimenten bei weiblichen und männlichen Tieren Anwendung fand, ist das Trilostan, welches Anwendung in der Veterinärmedizin findet.

Da es bisher nur Hinweise auf die Rolle von DHT im Hippocampus gab, sollte die Bedeutung des DHT in Bezug auf einen sexuellen Dimorphismus näher beleuchtet werden. Die These ist, dass das DHT für hippocampale Neurone männlicher Tiere ebenso wichtig ist, wie das Östrogen für weibliche Tiere.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Brutschrank 37°C und 65°C	Memmert
CO ₂ Inkubator, 37°C	Heraeus
Culture Plate Insert	Millipore
Diamantmesser	Diatom
Drucker	Canon
Elektronenmikroskop CM 100	Phillips
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	Liebherr
Heidemannspatel	Aesculap DE
Kühlschrank, 4°C	Liebherr + Bosch
Lichtmikroskop	Olympus
pH-Meter	Radiometer Copenhagen
Pinzette	Merck
Pipetten	Eppendorf AG
Schere	Fine Science Tool
Semidünnschnittgerät RM 2065	Leica
Ultradünnschnittgerät Ultra Cut OmU3	Reichert

Waage	Mettler
-------	---------

3.1.2. Chemikalien

Aqua dest.	Baxter DE
DHT	Sigma Aldrich
Estradiol	E4389, Sigma Aldrich
Ethanol	Merck
Glutamin, 200 mM	Sigma
Glycidether 100 (Epon 820)	Serva
HBSS (Hanks Balanced Salts)	Gibco
HEPES	Sigma
Horse Serum (Pferdeserum)	Gibco
Letrozol	Tocris
Minimum Essential Medium	Gibco
NaCl	Merck
Na-Hydroxid (NaOH)	Merck
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Salzsäure (HCL)	Merck
Na-Bicarbonat-Lösung (NaHCO ₃), 7,5%	Sigma
Trilostan	Sanofi Winthrop

3.1.3. Software

Mac OS X 10.13.3	Apple
MS Excel 2016	Microsoft
MS Word 2016	Microsoft
Prism 7	GraphPad
Windows XP/7/10	Microsoft

Lösungen:

1% Osmiumtetroxid in 0,1M Natriumphosphatpuffer mit Saccharose :

- 2% Osmiumtetroxid in Aqua dest. lösen
- 5,52g Natriumhydrogenphosphat Monohydrat
- 42,88g Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat
- In 1000ml Aqua dest. lösen
- 6,846g Saccharose in 100 ml des Puffers lösen
- Osmiumlösung und Saccharose-Pufferlösung 1:1 mischen

HBSS

- 50ml 10x HBSS
- 5,04ml HEPES
- Bis auf 450ml H₂O
- pH-Wert auf 7,3 einstellen
- bis 500ml mit Aqua dest. auffüllen
- steril filtrieren

Kulturmedium für Slicekulturen (in u.g. Konzentration):

- Minimal Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert
- L-Glutamin 200mM, steril
- Natrium-Bikarbonat Lösung (NAOH3) (7,5%ig)
- Hanks Balanced Salts (HBSS)
- Pferdeserum, hitzeinaktiviert, steril
- Aqua dest.
- Zugabe von NaOH (1M), bzw. HCl (1M) (bis zum Erreichen Ziel-pH)

PBS (phosphate buffered saline):

- 8g NaCl
- 0,2g KCl
- 1,44g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2g Kaliumhydrogenphosphat
- Bei Raumtemperatur in 1l Aqua dest. mischen

4%iges PFA:

- 4g Paraformaldehyd in 100ml PBS lösen (bei ca. 55°C)
- Zugabe von NaOH (1M), o. HCl (1M) (bis zum Erreichen Ziel-pH: 7,4)

Präparationsmedium für Slice-Kulturen

- Minimal Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert
- L-Glutamin 200mM, steril
- Aqua dest.
- Zugabe von NaOH (1M), o. HCl (1M) (bis zum Erreichen Ziel-pH: 7,35)

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden 5-Tage alte adoleszente Ratten (P5-Ratten) des Stammes Wistar benutzt, die von der Tierhaltung des UKE zur Verfügung gestellt wurden. Sie wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten und ad libitum mit Nahrung und Wasser versorgt. Alle Experimente wurden entsprechend den geltenden gesetzlichen Bestimmungen der Behörde für Gesundheit und Wissenschaft durchgeführt.

3.2.2. Präparation der Hippocampi

Die adoleszenten Ratten wurden 5 Tage postnatal zunächst in tiefe Anästhesie mittels CO₂ versetzt, und im Anschluss dekaptiert. Der Kortex wurde entfernt und in eine künstliche Liquorflüssigkeit eingelegt. Die Präparation der Hippocampi erfolgte nach der folgenden von Stoppini beschriebenen Methode. (Stoppini et al., 1991) Nach Entfernung der Haut wurde das Schädeldach sagittal eröffnet. Unter vorsichtigem Präparieren mit einem Heidemannspatel konnte der Kortex nun herausgelöst werden. Cerebellum und Hirnstamm wurden mit dem Spatel abgelöst und die beiden kortikalen Hemisphären voneinander getrennt. Anschließend lag der Blick frei auf die Hippocampi, die herausgelöst wurden. Um eine möglichst kurze Ischämiezeit zu garantieren, wurden die Hippocampi umgehend in ein Kulturmedium (4° kaltes PBS (pH von 7,4)) transferiert und im Anschluss in Slice-Kulturen angelegt.

3.2.3. Hippocampale Slice-Kulturen

Nach Präparation der Hippocampi wurde das Gewebe anschließend unter Zuhilfenahme eines Gewebezerteilers senkrecht zu ihrer Längsachse in Scheiben geschnitten. Die Dicke der Scheiben betrug jeweils 400 µm. Diese wurden

in einen Inkubator gegeben, der in vitro bei 37°C, 95%/5% CO₂ betrieben wurde. Alle Zellkultur-Reagenzien wurden von der Firma Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA) bezogen.

Die Gewebeschnitte wurden kultiviert nach der Methode von Stoppini (Stoppini et al., 1991). Zunächst wurden diese für 10 Minuten bei 4°C gelagert in einem Lösungsgemisch aus MEM (Minimal Essential Medium) und 2mM Glutamin. Die Schnitte wurden anschließend auf angefeuchtete durchsichtige Membranen (0.4 µm Culture Plate Insert, 30 mm Durchmesser, Millicell-CM, Millipore) gelegt, welche in sechs „well-plates“ überführt wurden. Die Transparenz der Membranen sorgt dafür, dass die Kulturen regelmäßig durch Lichtmikroskopie beobachtet werden konnten. (Stoppini, Buchs et al. 1993) Jede „well-plate“ war gefüllt mit 1 ml Kulturmedium, welches sich zusammensetzt aus 50% MEM, 25% HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) und 25% Hitze-inaktiviertem Pferdeserum. Dieses hatte eine finale Konzentration von 2 mM Glutamin und 0.044% NaHCO₃. Der pH-Wert des Medium wurde reguliert auf 7.3, durch Zugabe von NaOH bzw. HCL. Die Kulturen wurden unter diesen Bedingungen für 8 Tage bei 37°C kultiviert in einer CO₂-angereicherten Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde drei Mal wöchentlich gewechselt, um eine ausreichende Versorgung der Zellen zu gewährleisten. An Tag 4 der Kultivierung in vitro (4 DIV) und an Tag 7 (7 DIV) wurden folgende Steroidhormone, bzw. Biosynthesehemmer, dem Nährmedium bei Mediumwechsel hinzugefügt.

1. Estradiol (E2) (10^{-7} M)
2. Letrozol (10^{-7} M)
3. Estradiol (E2) + Letrozol (10^{-7} M)
4. Dihydrotestosteron (DHT) (10^{-7} M)
5. Trilostan (10^{-7} M)
6. Dihydrotestosteron (DHT) + Letrozol (10^{-7} M)
7. Dihydrotestosteron (DHT) + Trilostan (10^{-7} M)

Das neue Kulturmedium nährte die Zellen in dieser Zusammensetzung für sieben Tage.

Zur Übersicht sind hier die angelegten Slice-Kulturen aufgeführt:

Kultur 317, weiblich:

- Kontrolle (4+7d)
- Letrozol (4+7d)
- DHT (4+7d)
- DHT + Letrozol (4+7d)
- Trilostan (4+7d)
- DHT + Trilostan (4+7d)

Kultur 317, männlich:

- Estradiol (4+7d)
- Estradiol + Letrozol (4+7d)
- Kontrolle (4+7d)
- DHT (4+7d)
- DHT + Letrozol (4+7d)
- Letrozol (4+7d)
- DHT + Trilostan (4+7d)
- Trilostan (4+7d)

Kultur 324, weiblich:

- Kontrolle (4+7d)
- Letrozol (4+7d)
- DHT (4+7d)
- DHT + Letrozol (4+7d)
- Trilostan (4+7d)
- DHT + Trilostan (4+7d)

Kultur 324, männlich:

- Kontrolle (4+7d)
- Letrozol (4+7d)
- DHT (4+7d)
- DHT + Letrozol (4+7d)
- Trilostan (4+7d)
- DHT + Trilostan (4+7d)

3.2.4. Elektronenmikroskop (EM)

Nach der siebentägigen Behandlung wurden die Kulturen fixiert, um die Slice-Kulturen elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Die Fixation erfolgte in einem Phosphat-Puffer (konstanter pH-Wert von 7.4) mit einer 2,5%igen Glutaraldehyd-Lösung (1,5-Pentandial) für drei Stunden bei 4°C. Als zweites Fixativum folgte die Einlage in 1%igem Osmiumtetroxid (OsO_4) für 30 min. Anschließend erfolgte für weitere 30 min. die Trocknung in einem Gemisch (70% verdünntes Ethanol mit 1%igem Uranylacetat). Die finale Einbettung erfolgte in Epon 820 (Serva). Epon 820 ist ein Glycidether 100-Gemisch aliphatischer Di- und Trioxide auf GlycidylGlycerin-Ether-Basis. Dieses Gemisch wird von den Slice-Kulturen aufgesogen. Sobald dies geschehen ist, sinkt das Gewebe zu Boden und kann auf eine Silikonplatte übertragen werden. Auf dieser Platte wurden die Kulturen über Nacht bebrütet bei 65°C und härten in einer Gelatinekapsel aus. Hieraus wurden nun Blöcke geschnitten. Diese Blöcke sollten nur das Stratum pyramidale und Stratum radiatum der hippocampalen CA1-Region enthalten. Dafür erfolgte die Überführung in Semidünnschnitte, welche mit dem Semidünnschnittgerät RM 2065 (Leica) auf 1µm angefertigt wurden. Die Semidünnschnitte wurden angefärbt mit einer 1%igen Toluidinblau-Lösung. Die gewünschten Strukturen des CA1-Areals konnten so identifiziert werden. Mit Hilfe eines Ultradünnschnittgerät Ultra Cut OmU3

(Reichert/Leica), konnten die Schnitte nun auf ca. 90nm zugeschnitten werden. Diese Ultradünnschnitte wurden zunächst für 30 min. angefärbt mit Uranylacetat. Zur Kontrastverstärkung wurde Bleicitrat für ca. 5 min. hinzugegeben. Diese Methode erfolgte wie von Reynolds beschrieben. (Reynolds, 1963) Mit der nun durchgeführten Behandlung der Kulturen konnten diese in das EM überführt werden.

3.2.5. Messung der Synapsendichte

Um die Synapsen zu untersuchen und dessen Dichte zu messen, wurde folgende stereologische Methode benutzt, wie von Kretz et al. beschrieben. (Kretz et al., 2004): Mit dem EM wurden das obere und mittlere Drittel des Stratum radiatum der CA1-Region aufgesucht. Es wurden Bilder mit einer 6600-fachen Vergrößerung gemacht. Im Sinne einer Blindstudie wusste der Untersuchende am EM nicht, welche Behandlungsgruppe untersucht wird. Beeinträchtigende Strukturen wie Blutgefäße, größere Dendriten oder Gliazellen wurden absichtlich durch den Untersucher gemieden, um diese Störfaktoren zu eliminieren. Ferner wurden sogenannte Schaft-Synapsen nicht gezählt. Dies sind Synapsen, die sich entlang eines langen Dendriten befinden. Um eine zu vergleichende Anzahl an Synapsen mit den Schnitten zu erlangen, wurde die Dissektor-Technik benutzt. (Sterio, 1984) Hierbei wurde mit Hilfe eines Planquadrats die Dichte der Spine-Synapsen der Pyramidenzellendriten berechnet. Es wurde ein Planquadrat berechnet, das den Rahmen für den relevanten Teil des EM Bildes definiert. Dieses Quadrat wurde auf das EM Bild aufgesetzt. Das Planquadrat hatte eine feste Abmessung, die auf den EM Bildern einem Quadrat von $0,8\mu\text{m} \times 0,8\mu\text{m}$, und einer Dicke von ca. $0,1\mu\text{m}$, entspricht. Das Planquadrat war somit konstant bei allen Untersuchungen.

Für das Zählen der Synapsen gab es einen festgelegten Standard. Zum Vergleich der Synapsen wurden immer nur diese Synapsen gezählt, die in einer Schicht (Referenzschicht) identifiziert werden konnten, aber nicht in der darauffolgenden Schicht, der Kontrollschicht. (Leranth, Shanabrough, & Horvath,

2000) Dies erfolgte mit Zuhilfenahme einer Klarsichtfolie. Hierauf wurden die Synapsen auf der Kontrollschicht identifiziert und mit einem gelben Textmarker markiert. Wurde diese Synapsen wieder als solche auf der Referenzschicht identifiziert, wurden diese auf der Klarsichtfolie grün markiert. Die Synapsen, die nur auf der Referenzschicht und nicht auf der Kontrollschicht auftauchten, wurden lila markiert und gezählt. Mit dieser Art und Weise der quantitativen Auswertung konnte gewährleistet werden, dass nur solche Synapsen gezählt wurden, die eindeutig in nur einem Abschnitt vorhanden waren. Um die Effizienz der Synapsen-Zählung zu steigern, wurde jede Referenzschicht wie eine Kontrollschicht behandelt und umgekehrt. (Woolley & McEwen, 1992) Es wurde ebenfalls im Vorfeld als Standard festgelegt, welche Strukturen als Synapsen gelten und somit gezählt wurden. Eine Synapse besteht aus fünf Anteilen, die vorgefunden werden mussten, um die Struktur als Synapse zu werten: (Purves et al., 2001)

1. Präsynaptischer Vesikel
2. Präsynaptische Membran
3. Synaptischer Spalt
4. Postsynaptische Membran
5. Postsynaptische Vesikel

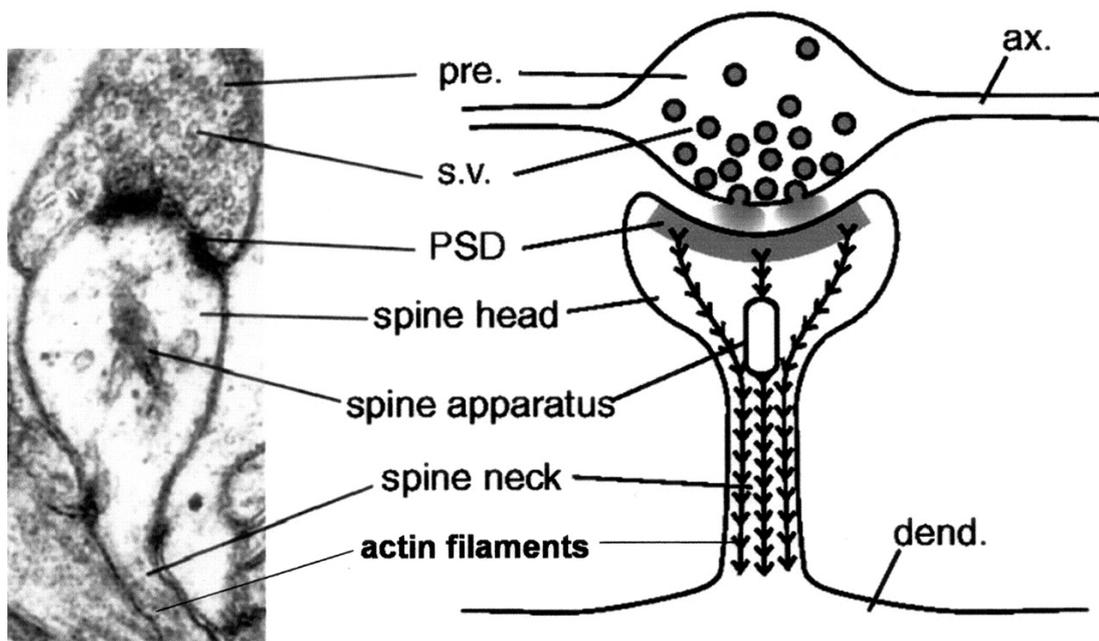


Abbildung 3.1.: EM-Bild und korrespondierende schematische Zeichnung einer einzelnen exzitatorischen Synapse. (Palmer, Cotton, & Henley, 2005)

Auf der Abbildung 3.1. ist links exemplarisch ein EM-Bild zu sehen, welches alle festgelegten Kriterien einer Synapse erfüllt und somit als solche gezählt werden würde. Der rechte Abschnitt zeigt eine schematische Zeichnung, repräsentativ zum EM-Bild.

Exemplarisch ist in der folgenden Abbildung dargestellt, wie mit Hilfe der oben erläuterten Technik die Synapsen identifiziert und gezählt werden konnten.

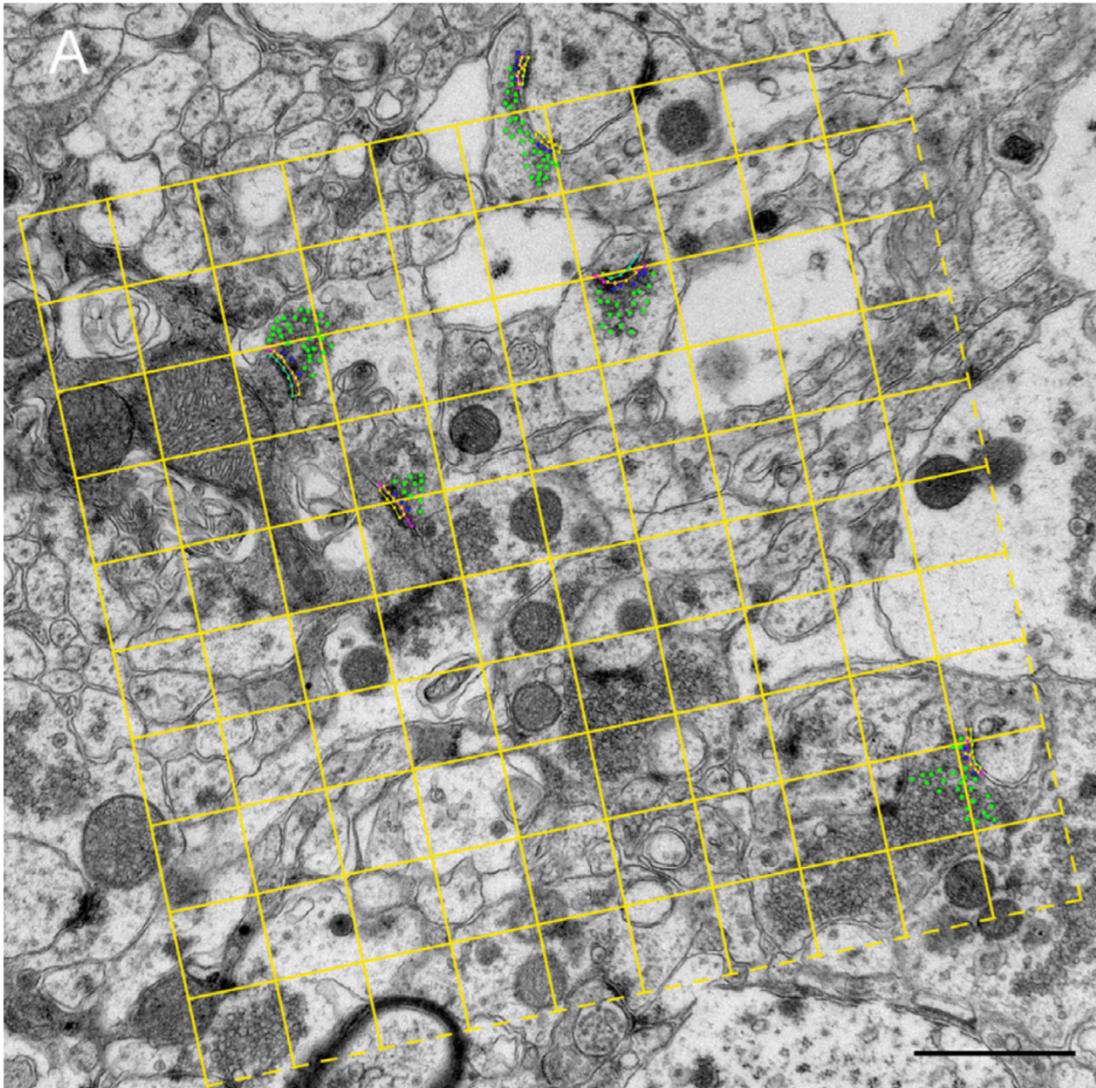


Abbildung 3.2.: Messung der Ultratrakturen mit einem überlagerten Planquadrat. (Reichmann et al., 2015)

Für jede Slice-Kultur wurde drei Blöcke angefertigt. Aus jedem Block entstanden für jeden Ultradünnschnitt acht Aufnahmen. Somit erhielt man aus jeder Behandlungsgruppe 24 EM-Bilder, von denen immer zwei Bilder ein Paar bildeten (Referenz- und Kontrollschicht).

3.3. Statistik

Alle Werte der Zählung von Synapsen und dessen Abbildungen in den Graphen präsentieren den Mittelwert \pm SEM (Standard Error of the Mean

(Standardabweichung)). Um die Synapsendichte zu vergleichen, wurden die Mittelwerte \pm SEM herangezogen. Ein Konfidenzintervall von $p \leq 0.05$ wurde angenommen, um von einem signifikanten Unterschied auszugehen. Um die verschiedenen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde eine „multi-way-ANOVA“ (analysis of variance) durchgeführt. Die Analyse der ANOVA wurde mit dem Programm Graphpad Prism 7 (GraphPad Software Inc., CA, USA) ausgeführt.

4. Ergebnisse

Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das Signifikanzniveau in den folgenden Graphen in folgender Weise mit Asterisken (*) gekennzeichnet:

* = $p < 0.05$

** = $p < 0.01$

*** = $p < 0.001$

**** = $p < 0.0001$

Der genaue p=Wert wird in dem Erläuterungstext angegeben. Die Bezeichnung in den Graphen „n.s.“ bedeutet, dass dieses Ergebnis nicht signifikant war.

4.1. Vergleich männliche und weibliche hippocampale Synapsen in Slicekulturen

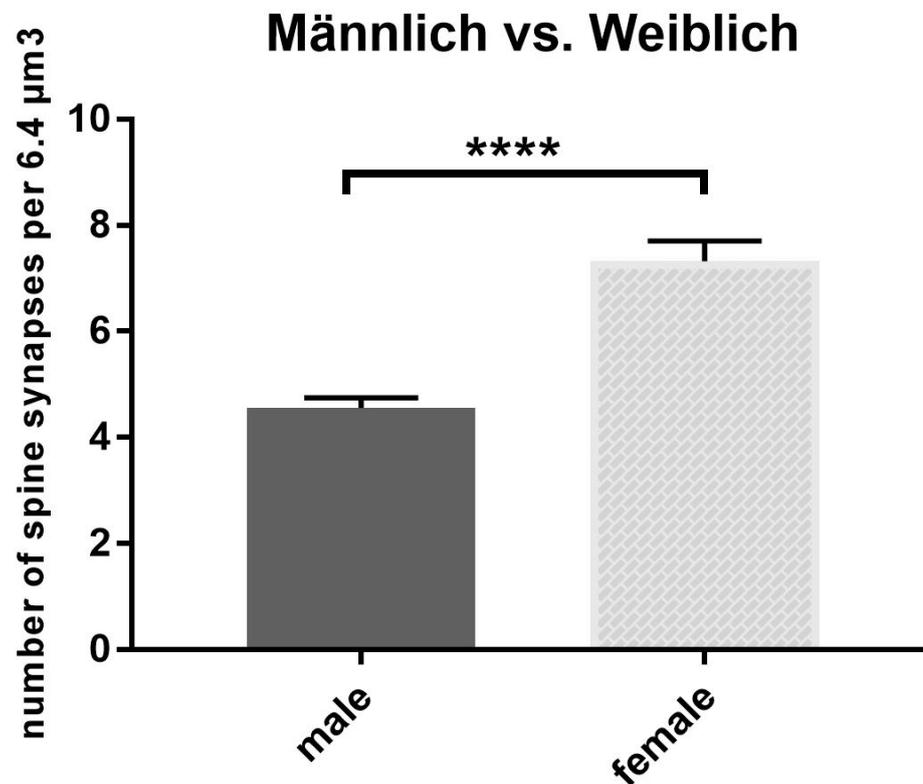


Abbildung 4.1.: Vergleich der Synapsenanzahl männlich und weiblich in hippocampalen Slicekulturen.

Das Balkendiagramm demonstriert den quantitativen Unterschied der Synapsenanzahl im Geschlechtervergleich. In der männlichen Kontrollgruppe, die nicht behandelt wurden, war die durchschnittliche Synapsenanzahl $4,56 \pm 0,19$ pro $6,4 \mu\text{m}^3$. Im Vergleich hierzu zeigte sich bei der weiblichen Kontrollkohorte als Ausgangswert eine Synapsenanzahl $7,32 \pm 0,39$ pro $6,4 \mu\text{m}^3$. Dieser geschlechtsvergleichende Unterschied zeigte sich stark signifikant ($p < 0,0001$).

4.2. Östrogen hat keinen Einfluss auf Synapsendichte männlicher Tiere in Slicekulturen

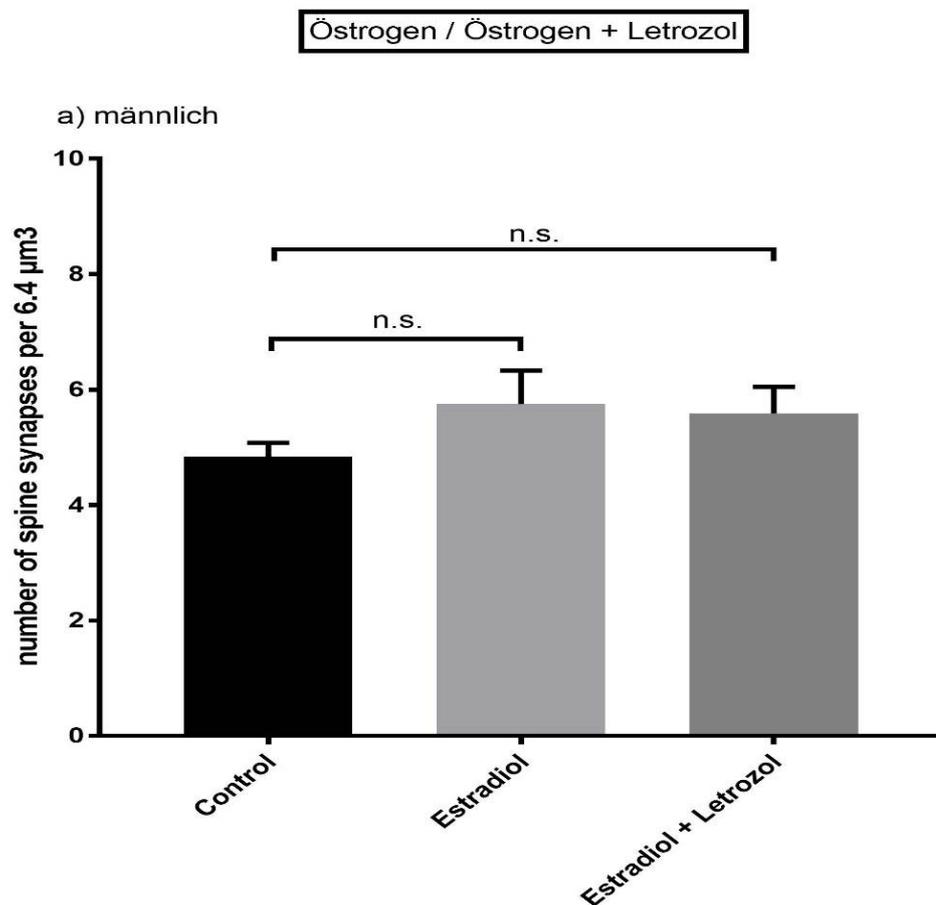


Abbildung 4.2.: Behandlung männlicher Tiere mit E2 / E2 + Letrozol in hippocampalen Slicekulturen.

In hippocampalen Slice-Kulturen konnte sich durch die Anwesenheit von Östrogen kein signifikanter Unterschied in der Synapsendichte bei männlichen Tieren festgestellt werden ($p=0.1726$). Auch die Behandlung der männlichen Slice-Kulturen mit Östrogen + dem Aromatasehemmer Letrozol führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Anzahl der Synapsen ($p=0.2936$).

4.3. Der Einfluss des Aromatasehemmers Letrozol auf die Synapsen in Slicekulturen

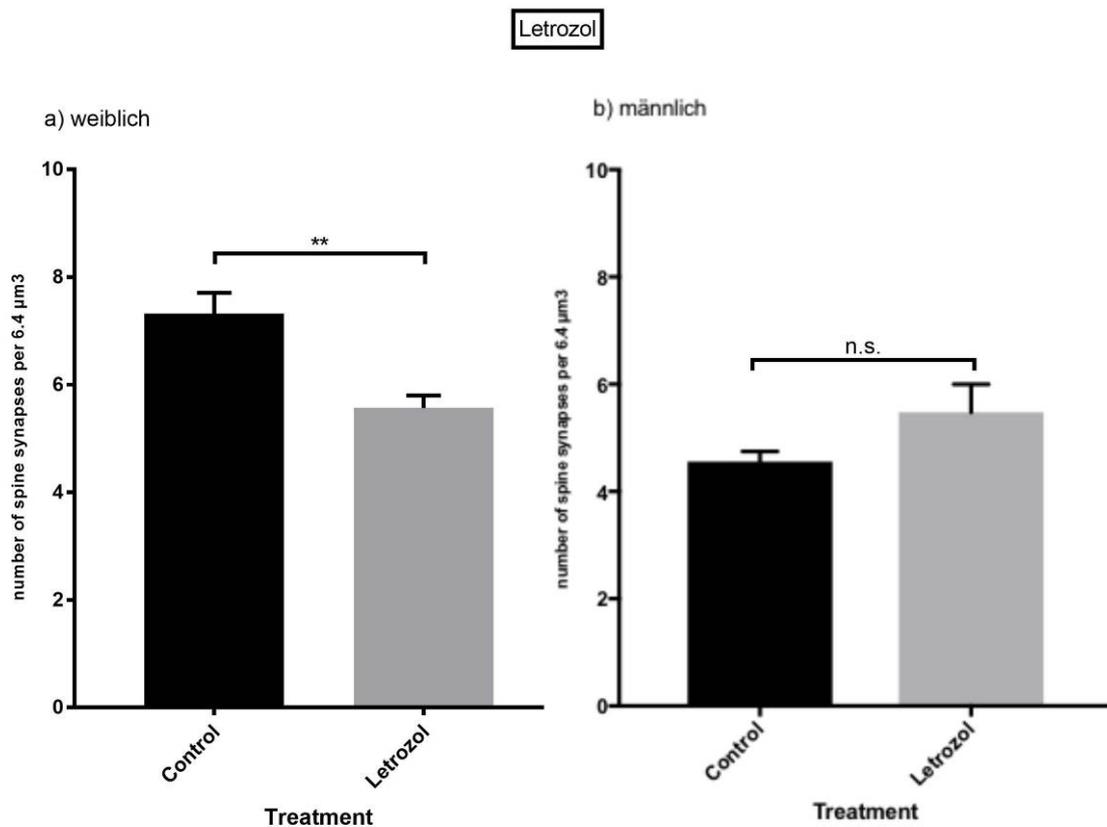


Abbildung 4.3.: Behandlung mit Letrozol in hippocampalen Slicekulturen.

Die Behandlung mit Letrozol führte bei den weiblichen Tieren zu einer signifikanten Verminderung der Synapsen ($p=0.0055$). Dieses Ergebnis ist analog zu den zuvor durchgeführten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Bei den männlichen Tieren führte die alleinige Behandlung mit Letrozol zwar tendenziell zu einer höheren Synapsendichte, dieser Unterschied zeigte sich jedoch nicht signifikant ($p=0.2439$).

4.4. DHT erhöht hippocampale Synapsen männlicher Tiere in Slicekulturen

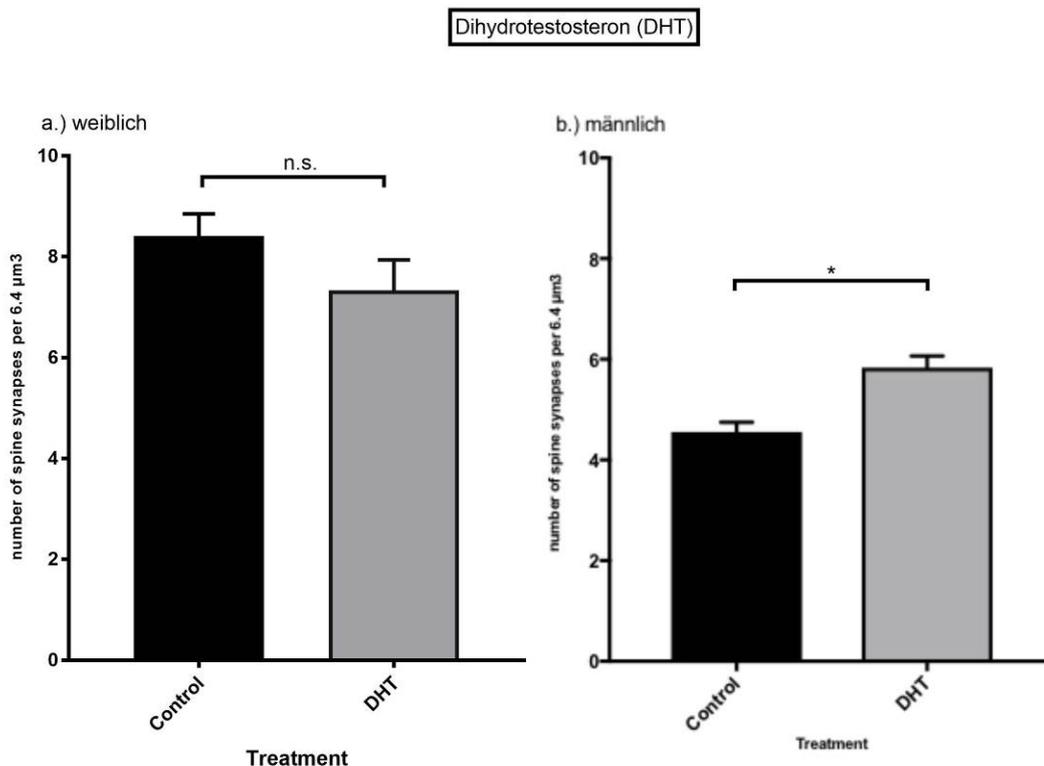


Abbildung 4.4.: Behandlung mit DHT in hippocampalen Slicekulturen.

Das Dihydrotestosteron ist das gemeinsame Substrat für die Enzyme Aromatase und 5 α -Reduktase. Durch Letrozol wird die Östrogensynthese unterbunden, was zu erhöhten Testosteron-Konzentrationen führt. (Harden & Maclusky, 2005) Die erhöhte Testosteron-Konzentration führt wiederum zur erhöhten Verfügbarkeit von DHT. Wenn den Zellen in den Slice-Kulturen DHT hinzugefügt wurde, konnte eine signifikante Erhöhung der Synapsendichte bei den männlichen Tieren nachgewiesen werden ($p=0.0359$). Wurde den Zellen der weiblichen Tiere DHT hinzugefügt, verringerte sich die Synapsen-Anzahl zwar, jedoch nicht im signifikanten Bereich ($p=0.6737$).

4.5. Trilostan hat keinen signifikanten Einfluss auf hippocampale Synapsen in Slicekulturen

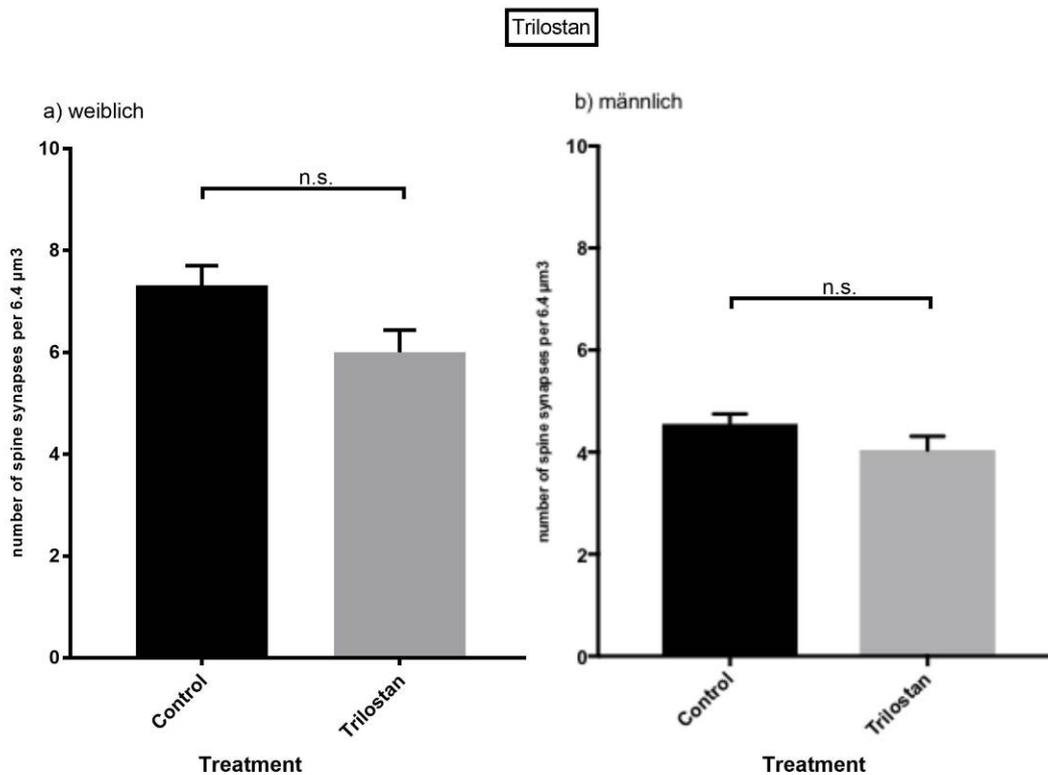


Abbildung 4.5.: Behandlung mit Trilostan in hippocampalen Slicekulturen.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist Trilostan durch die Hemmung der 3- β -hydroxysteroid-Dehydrogenase ein relativ unspezifischer Inhibitor der Biosynthese von Steroidhormonen, Glukokortikoiden und Mineralkortikoiden, da es an mehreren Stellen gleichzeitig in verschiedene Synthesewege eingreift. Ein signifikanter Unterschied auf die Synapsendichte konnte mit Trilostan weder bei den weiblichen ($p=0.0691$), noch bei den männlichen Tieren beobachtet werden ($p=0.8113$).

4.6. Kombination DHT + Letrozol vermindert bzw. erhöht Synapsendichte in Slicekulturen

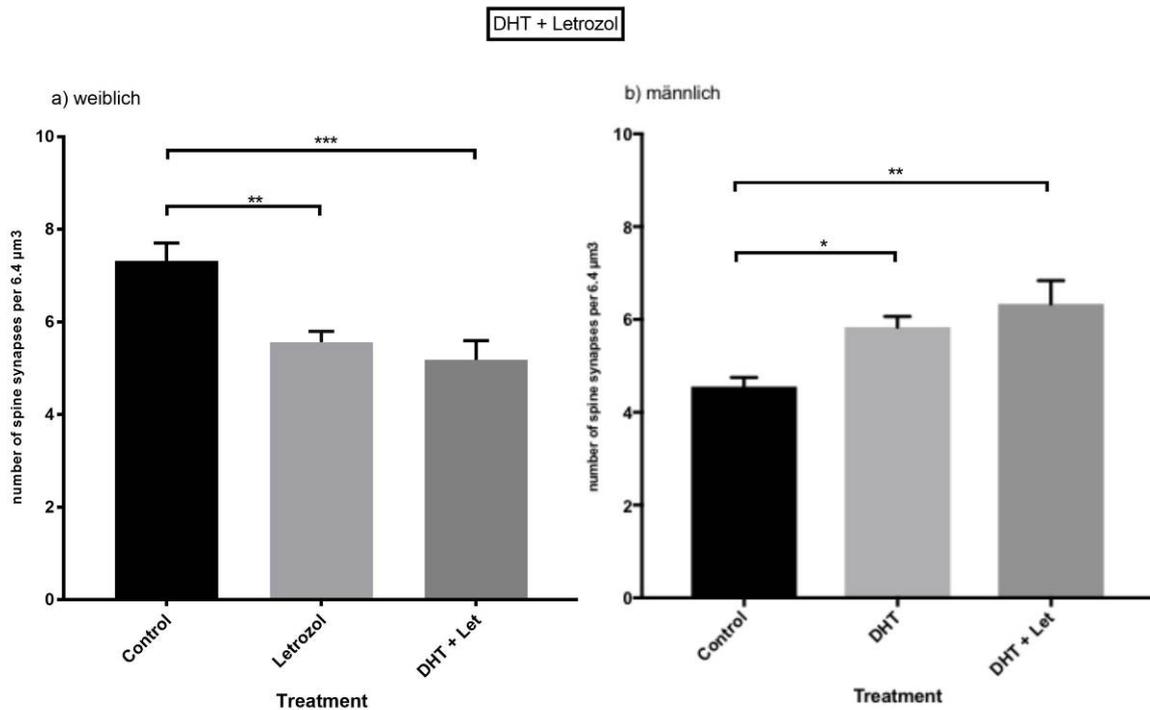


Abbildung 4.6.: Behandlung mit DHT + Letrozol in hippocampalen Slicekulturen.

Letrozol blockiert als Hemmstoff der Aromatase die Östrogensynthese. Der Mangel an Östrogen führt bei den weiblichen Tieren zu einer erniedrigten Anzahl an Synapsen ($p=0.0055$). Wenn Letrozol mit DHT kombiniert wird, vermindert sich die Anzahl der weiblichen Synapsen noch weiter ($p=0.0005$). Der gleiche Effekt in die entgegengesetzte Richtung ist bei den männlichen Tieren zu beobachten. Wie schon beschrieben, führte schon das DHT allein zu einer signifikanten Erhöhung der Synapsen-Dichte bei den männlichen Tieren ($p=0.0359$). Die experimentelle Kombination von DHT + Letrozol sollte den Neuronen eine noch höhere Konzentration an Testosteron zur Verfügung stellen. Durch das DHT wird die Testosteronkonzentration direkt erhöht. Letrozol blockiert die Aromatase und hemmt damit die Synthese von Östrogenen. Dadurch verschiebt sich die Balance zugunsten der Testosteronkonzentration.

In der Kombinationsbehandlung DHT + Letrozol steigt die Anzahl der männlichen Synapsen auf ein hoch signifikantes Level ($p=0.001$).

4.7. Keine Veränderung unter DHT + Trilostan in Slicekulturen

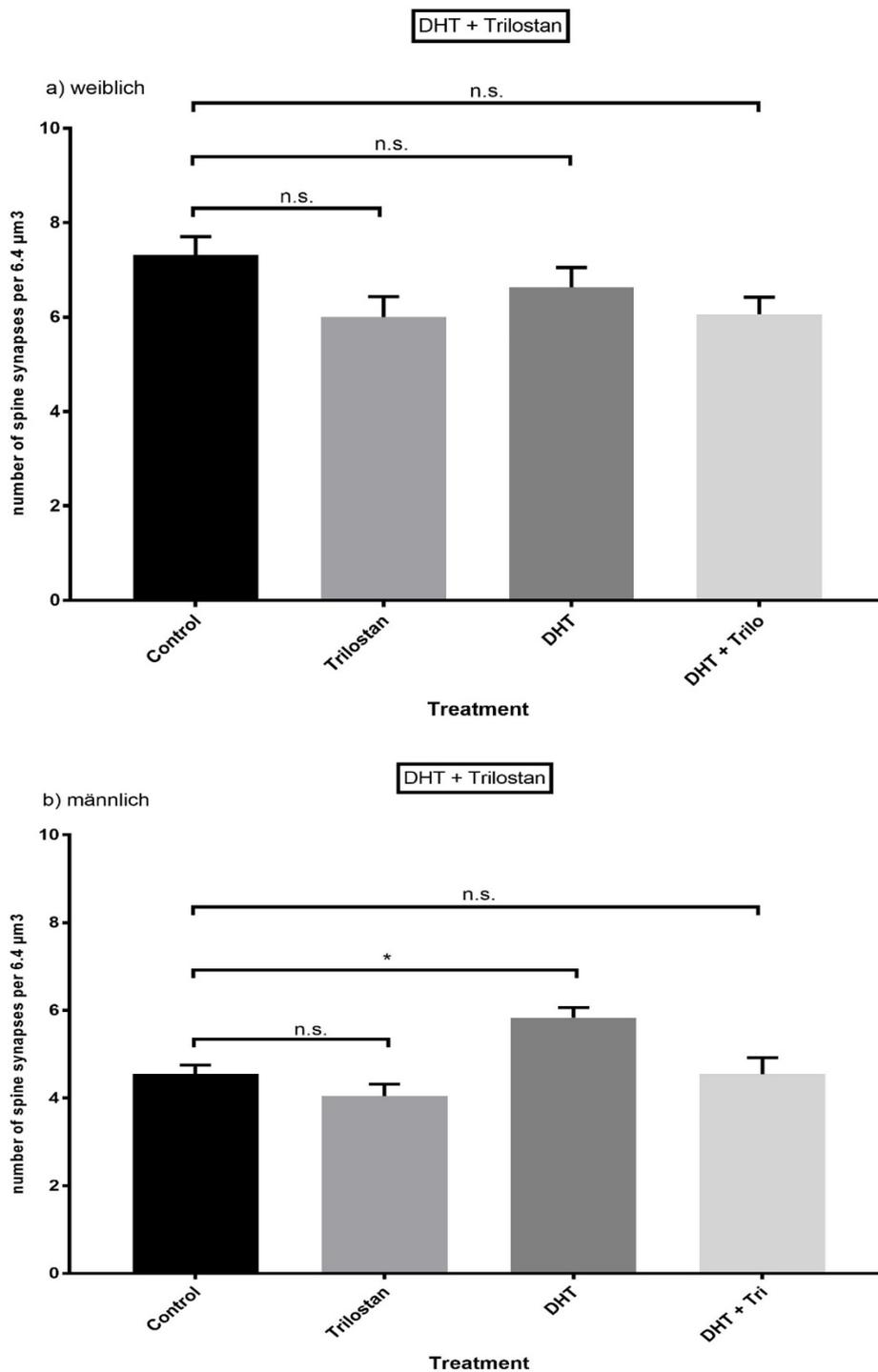


Abbildung 4.7.: Behandlung von DHT + Trilostan in hippocampalen Slicekulturen.

Ein additiver Effekt wie bei der Kombination DHT + Letrozol kann bei DHT + Trilostan nicht verzeichnet werden. Bei den männlichen Tieren wird die beobachtete signifikante Erhöhung der Synapsen unter DHT wieder auf das Normalniveau abgesenkt durch DHT + Trilostan, sodass kein Unterschied zur Kontrolle besteht ($p=1$). Auch bei den weiblichen Tieren kann kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle beobachtet werden ($p=0.148$).

4.8. Elektronenmikroskopische Beispielbilder

Die folgenden EM-Bilder zeigen beispielhaft die Ansicht der Spinesynapsen aus den oben genannten Slicekulturen. Es folgt eine Übersichtsaufnahme einer weiblichen Slicekultur und in der Folge zwei Vergrößerungen aus der Übersichtsaufnahme zur detaillierteren Ansicht. Farblich gekennzeichnete Pfeile zeigen die Spines, den synaptischen Spalt und die postsynaptischen Vesikel.

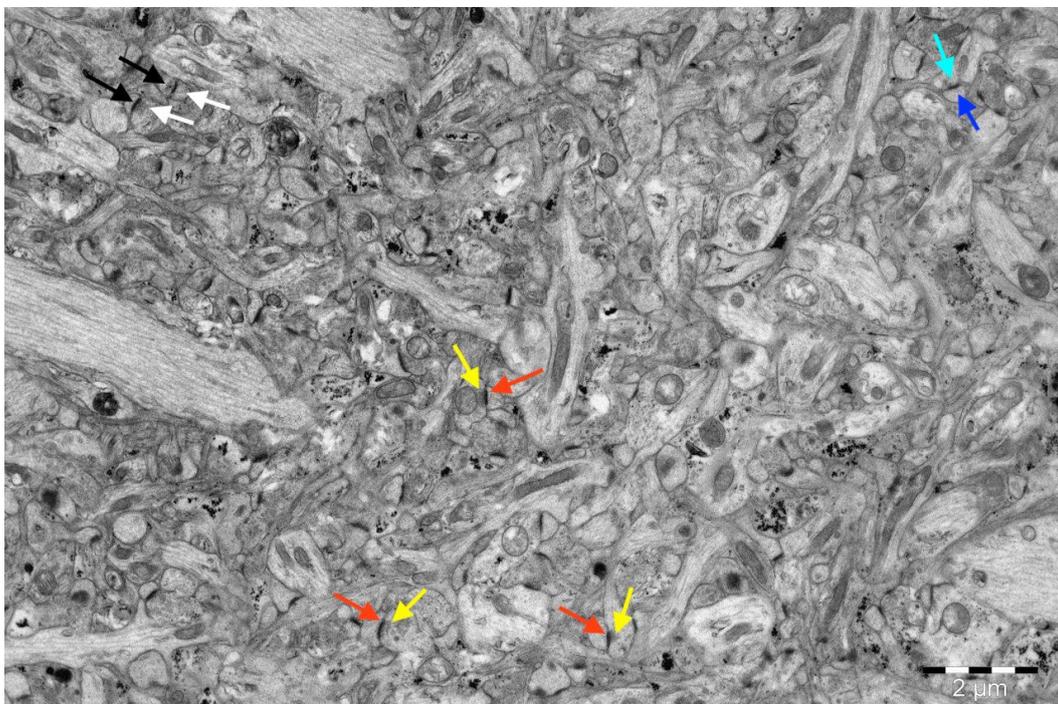


Abbildung 4.8.: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme einer weiblichen Slicekultur mit 2950-facher Vergrößerung; Schwarzer/roter/dunkelblauer Pfeil: Spine + synaptischer Spalt; weißer/gelber/hellblauer Pfeil: postsynaptische Vesikel

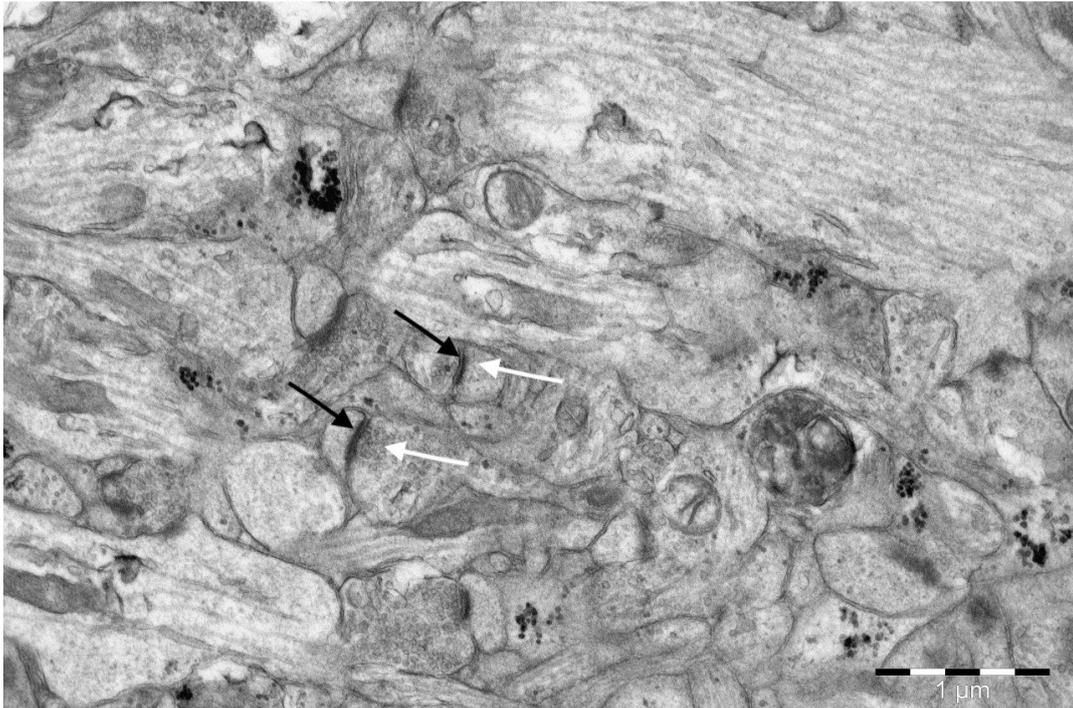


Abbildung 4.9.: Vergrößerung aus der Übersicht einer weiblichen Slicekultur, oben links; Schwarzer Pfeil: Spine + synaptischer Spalt; weißer Pfeil: postsynaptische Vesikel

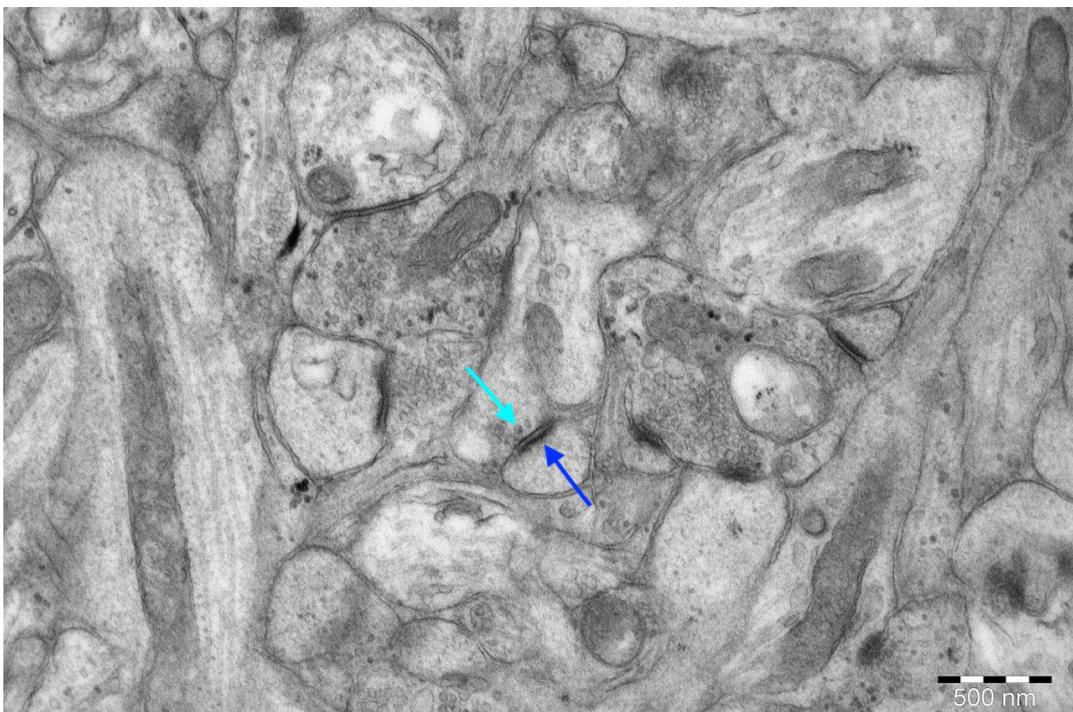


Abbildung 4.10.: Vergrößerung aus der Übersichtsaufnahme einer weiblichen Slicekultur, oben rechts; Dunkelblauer Pfeil: Spine + synaptischer Spalt; Hellblauer Pfeil: postsynaptische Vesikel

5. Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse (deutsch)

Steroidhormone haben einen großen Einfluss auf die Plastizität der Synapsen. Diese Arbeit konnte, wie auch oben zitierte Experimente unserer Forschungsgruppen, erneut belegen, dass das Hormon Östrogen essentiell für die Synapsen des Hippocampus weiblicher Tiere ist. Die Behandlung der weiblichen Neurone mit Letrozol führte zu einer signifikanten Verminderung von Synapsen. Ferner konnte diese Arbeit keinen signifikanten Einfluss von Östrogenen auf die männlichen Synapsen feststellen.

Analog dazu führte DHT bei den weiblichen Tieren zu keiner signifikanten Veränderung der Synapsendichte. Bei den männlichen Tieren hingegen führte die Behandlung der Neurone mit DHT zu einer signifikanten Erhöhung der Synapsenzahl.

Bei den weiblichen Tieren zeigte die Kombination von DHT + Letrozol eine noch stärkere Verminderung der Synapsendichte als schon unter der alleinigen Behandlung mit Letrozol. Bei den männlichen Tieren konnte ein adversativer Effekt beobachtet werden. Die erhöhte Anzahl an Synapsen unter DHT-Behandlung konnte noch weiter gesteigert werden. Unter der Behandlung DHT + Letrozol zeigte sich die höchste Anzahl an Synapsen bei den männlichen Tieren.

Der Hemmstoff Trilostan konnte weder bei den männlichen, noch bei den weiblichen Tieren einen signifikanten Einfluss auf synaptischer Ebene im Hippocampus bewirken. Auch in der Kombination mit DHT hatte Trilostan keine signifikante Wirkung auf die Synapsen.

5.2. Summary of results (English)

Steroid hormones have a significant influence on the plasticity of synapses. This dissertation was able to show that the hormone estrogen is essential for the synapses of the hippocampus in female specimens. Treating these synapses with letrozole lead to a significant decrease in synapse count. Furthermore, this dissertation found no difference in synapse count if male synapses of the hippocampus were treated with estrogen.

Treatment of female hippocampal synapses with DHT did not lead to a significant difference in synapse count. However, when male hippocampal synapses were treated with DHT, it led to a significant increase of synapses.

In female specimens, the combination treatment of DHT + letrozole decreased the synapse count even more than treatment with letrozole alone. In the male specimens, an opposite effect could be observed. The combination treatment of DHT + letrozole led to a further increase in synapse count. With this combination treatment, the highest synapse count was recorded.

The steroidogenesis inhibitor trilostane did not have a significant influence on the synapse count, either in male or female specimens. In addition, the combination of DHT + trilostane did not have a significant impact on male or female hippocampal synapses.

6. Diskussion

6.1. Der geschlechtsspezifische Dimorphismus

Zur Übersicht der Ergebnisse ist im Folgenden eine tabellarische Übersicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit aufgeführt.

Treatment	Synapse count in male hippocampi	Synapse count in female hippocampi
Estradiol	→	
DHT (Testosterone)	↑	→
Letrozole	→	↓
Trilostan	→	→
DHT + Letrozole	↑↑	↓↓
DHT + Trilostan	→	→

Abbildung 6.1.: Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Behandlungen im Geschlechtervergleich.

Die Konzentration der Sexualhormone Testosteron und Östrogen scheint in direkter Relation mit der Synapsendichte des Hippocampus zu stehen. Durch die Kombination von DHT + Letrozol kann experimentell eine starke Repression der Östrogenkonzentration erreicht werden, was zum stark signifikanten Abfall der Synapsendichte bei den weiblichen Tieren führt. Die Kombination von DHT + Letrozol bei den männlichen Tieren hingegen führt durch die Verminderung der Östrogenkonzentration im Gegenzug zu einer starken Erhöhung der Testosteron-Konzentration, was eine signifikante Erhöhung der

Synapsendichte zur Folge hat. Dies unterstreicht den geschlechtsspezifischen Dimorphismus.

6.2. Steroidhormone essentiell für Synapsen & klinische Translation

Östrogen ist ein wichtiges Steroidhormon für den menschlichen Organismus. Es konnte schon früh gezeigt werden, dass das ovarielle Östrogen Auswirkungen auf neuronale Strukturen hat. Dies konnte an ovariectomierten Mäusen beobachtet werden, die eine signifikante Minderung an spine-Synapsen aufwiesen. (Gould et al., 1990; Woolley, Gould, Frankfurt, & McEwen, 1990) In den kommenden Jahren wurde dann durch unsere Arbeitsgruppe festgestellt, dass auch das Gehirn Enzyme für die Östrogensynthese hat, und somit de novo Östrogen herstellen kann. (Fester et al., 2011; Hojo et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2009) Die Östrogensynthese in hippocampalen Neuronen ist wichtig für organisierende Funktionen und bietet eine Neuroprotektion. (Azcoitia, Garcia-Ovejero, Chowen, & Garcia-Segura, 2001; Fester et al., 2006; Schassen et al., 2006; Veiga, Azcoitia, & Garcia-Segura, 2005; Zhou et al., 2007) Das kann viele Implikationen für klinische, teils noch unverstandene Erkrankungen haben. So konnte beobachtet werden, dass bei Alzheimer-Patienten eine erhöhte Konzentration von Aromatase im Hippocampus gemessen wurde. Dies wurde interpretiert als Reaktion auf die Alzheimer-Erkrankung, um mehr Östrogen für die Neuroprotektion bereit zu stellen. (Prange-Kiel et al., 2016) Die neuroprotektiven Funktionen des Östrogens beginnen schon sehr früh in der neuronalen Entwicklung. Die neuronale Östrogensynthese ist auch entscheidend für die geschlechtsunterschiedliche neuronale Entwicklung. (Ruiz-Palmero et al., 2016) Während das ovarielle Östrogen primär regulierende Funktionen hat, scheint das neuronale Östrogen vor allem der Neuroprotektion zu dienen. Da Neuroprotektion eine wichtige Funktion ist, könnte der Östrogen-Stoffwechsel auf neuronaler Ebene viele klinische Einflüsse haben und so möglicherweise Krankheitsverläufe modulieren oder neue

Therapieansätze bilden. Wie diese Arbeit gezeigt hat, ist der neuronale Einfluss des Östrogens bei Männern und Frauen verschieden und weist somit auf einen geschlechtsspezifischen Dimorphismus hin. Auch neuronale Erkrankungen sind verschieden über die Geschlechter verteilt, sodass die Alzheimer-Erkrankung (AD) zum Beispiel häufiger bei Frauen als bei Männern auftritt.

Die AD ist die häufigste Form der Demenz und macht ungefähr 70% aller Fälle aus. (Waldemar & Burns, 2017) Bei der Alzheimer Erkrankung kommt es zu einer Degeneration von Neuronen und neuronalen Kontaktstrukturen, vor allem aber zu typischen Eiweißablagerungen, dem Amyloid-beta. (Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverría, & Monge-Bonilla, 2017) Auch wenn nach wie vor das Alter den Hauptrisikofaktor für die AD bildet, spielt das Geschlecht einen entscheidenden Faktor. (Schmidt et al., 2008) Oft wird versucht, dies mit dem demographischen Wandel zu erklären. Die höhere Inzidenz an AD bei Frauen sei darin begründet, dass Frauen ein höheres Lebensalter als Männer erreichten. Für die Altersklasse an über 90-Jährigen kann so durchaus argumentiert werden. In dem Lebensabschnitt zwischen 60 und 80 Jahren findet sich jedoch ein geschlechtsspezifischer Unterschied bei der AD-Inzidenz, der nicht allein durch die Demographie erklärt werden kann. Folglich kann hier von einem spezifischen pathogenetischem Mechanismus ausgegangen werden. (Viña & Lloret, 2010) Vina et al. gehen in ihrer Studie von einem protektiven Effekt des Östrogens aus, der sich durch eine Expression der Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase manifestiert. Diese Mechanismen hätten einen antioxidativen Effekt und vermitteln somit ihren neuroprotektiven Effekt auf Neurone. Es wird jedoch auch vermutet, dass Östrogen einen direkten Effekt auf Amyloid-beta hat und somit einen therapeutischen Angriffspunkt für AD bieten könnte.

Diese Arbeit weist auf einen sexuellen Dimorphismus hin. Östrogen hat bei weiblichen Tieren auf neuronaler Ebene einen anderen Effekt, als bei männlichen Tieren. Dihydrotestosteron hat positive Auswirkungen auf die Synapsendichte im Hippocampus bei männlichen Tieren und nicht bei den Weiblichen. Diese Studie lässt die Hypothese zu, dass das Testosteron eine ähnliche

Bedeutung für die männlichen Synapsen im Hippocampus hat, wie das Östrogen für die Synapsen der weiblichen Tiere.

6.3. Bedeutung des Testosterons in der Pathologie und Therapie des Prostata-Karzinoms

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist das Prostata-Karzinom das häufigste Karzinom des Mannes mit 21% an Tumorerkrankungen (Abbildung 1.1). Es konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von Testosteron in Patientenseren das Risiko erhöhen, an einem aggressiven Prostata-Karzinom zu erkranken. (Pierorazio et al., 2010) Testosteron wurde schon früh als Trigger für den Wachstum des Prostata-Karzinoms identifiziert und ist somit ein Hauptangriffspunkt in der Therapie. (Claps et al., 2018) Schon 1941 berichteten Huggins und Hodges, dass das dramatische Senken der Testosteron-Konzentration eine Möglichkeit bietet zur Therapie des Prostata-Karzinoms. (Huggins & Hodges, 1941) Dies wurde früher durch die Orchiectomie erreicht oder durch eine chemische Kastration mit Östrogenderivaten, wie etwa dem Diethylstilbestrol (DES), durchgeführt. (The Leuprolide Study Group, 1984) Im Verlauf wurde DES ersetzt durch GnRH-Agonisten, wie Leuprorelin oder Gosereelin, welche insbesondere in Bezug auf kardiovaskuläre Toxizität ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufwiesen. (Balaji, Rabbani, Tsai, Bastar, & Fair, 1999) Diese GnRH-Analoga werden auch heute noch als Mittel in der ADT des Prostatakarzinoms angewandt, um die Testosteron-Konzentration zu senken. Auf mögliche Nebenwirkungen einer ADT wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Zusammenfassend sind an einem Prostata-Karzinom erkrankte Männer unter ADT einem erhöhten Risiko ausgesetzt, eine Osteoporose, Anämie, Muskelschwund, Depressionen oder andere kognitive Defizite zu entwickeln. (Richard J Wassersug et al., 2014) Diese Arbeit zeigt den positiven Einfluss des Testosterons auf die Synapsendichte im Hippocampus der männlichen Tiere und unterstreicht somit die klinische Bedeutung des Testosterons auf

neuronaler Ebene. Vor diesem Hintergrund sollte eine androgendeprivierende Therapie stets mit den Nebenwirkungen abgewogen werden.

6.4. Beurteilung der Stärken und Schwächen der Arbeit

Unsere Forschungsgruppe konnte in der Vergangenheit bereits zeigen, dass bei weiblichen Tieren ein substantieller Verlust an hippocampalen Synapsen erfolgt, wenn die Aromatase inhibiert wird. (Vierk et al., 2012) Diesen Effekt konnte auch diese Arbeit unterstreichen und erneut belegen.

Die Untersuchungen von Leranth (2004 und 2003) führten zu Spekulationen, dass DHT das relevante neurosteroidale Hormon für die Plastizität der Synapsen bei den männlichen Tieren sein könnte. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Synapsendichte bei männlichen hippocampalen Slice-Kulturen zunimmt, wenn diese mit DHT stimuliert werden. Bei den weiblichen Kulturen hingegen zeigte sich kein Unterschied in der Synapsendichte nach Beimpfung mit DHT. Diese Studie belegt, dass die Neurosteroid Östrogen und DHT die synaptische Plastizität in männlichen und weiblichen Hippocampi geschlechtsspezifisch beeinflussen. Die Stabilität der Synapsendichte erfordert bei den weiblichen Tieren Östrogen und bei den männlichen Tieren DHT.

Trilostan konnte in keiner der durchgeführten Untersuchungsgruppen einen signifikanten Unterschied erbringen, weder in positiver noch in negativer Auswirkung auf die Synapsen des Hippocampus. Es kann vermutet werden, dass dies an der relativ unspezifischen Inhibitorenfunktion des Trilostan liegt, da dieses relativ früh in den Biosynthese-Kreislauf der Steroidhormone eingreift. (siehe Abbildung 1.6.) Trilostan greift nicht nur in die Synthese von Testosteron und Östrogen ein, sondern durch seine unspezifische Hemmung auch in die Kreisläufe der Mineral- und Glukokortikoide. Ferner ist der translationale Aspekt und somit die klinische Bedeutung beim Letrozol größer, da dieses therapeutisch beim Mammakarzinom Anwendung findet. Trilostan hingegen wird bei Menschen nicht mehr eingesetzt und findet nur noch in der Tiermedizin Anwendung.

In den in-vivo Experimenten konnte demonstriert werden, dass Testosteron, bzw. sein aktiver Metabolit DHT, eine zentrale Schlüsselfunktion für die Aufrechterhaltung synaptischer Verschaltungen im männlichen Hippocampus erfüllt. Als zu untersuchender Bereich des Hippocampus ist für diese Studie die CA1-Region gewählt worden. Vorige Studien konnten zeigen, dass es in diesem Bereich des Hippocampus zu einer erhöhten Androgenrezeptor-Immunreaktivität kommt, insbesondere, wenn die CA1-Region verglichen wird mit der CA3-Region und dem DG des Hippocampus. (Ishii, Tsurugizawa, Ogiuekeda, & Kawato, 2007) Um zu überprüfen, ob dieser Effekt des DHT lokal der CA1-Region zuzuordnen ist, sollten weitere Studien erfolgen, die einen Vergleich der DHT-Konzentrationen in den verschiedenen Hippocampus-Arealen anstellen.

Bei den Konzentrationen der genutzten Substanzen wurden definierte Konzentrationen konstant in o.g. Weise ausgewählt. Es ist jedoch schwierig diese Konzentrationen mit denen eines menschlichen Organismus zu vergleichen. Die Hormonkonzentrationen des menschlichen Organismus können stark variieren und haben viele Einflussfaktoren, wie Angst, Stress und zirkadiane Rhythmik, die im Versuchsaufbau schwierig abzubilden sind.

Vor dem Hintergrund der translationalen Medizin wäre es interessant, ähnliche Studien in einem Großtierversuch durchzuführen, um den nächsten Schritt zur klinischen Translation zu schaffen.

Diese Studie konnte zeigen, dass Testosteron einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Synapsen im Hippocampus hat. Wie schon oben diskutiert, stellt der Hippocampus eine entscheidende Schaltstelle in der Gedächtnisbildung dar. Somit kann postuliert werden, dass Testosteron einen (neuro-)protektiven Effekt auf die Gedächtnisbildung und den Gedächtnistransfer hat. Eine Abwesenheit dieses protektiven Hormons kann somit einen hemmenden Einfluss auf die Gedächtnisleistung haben, was bei vielen klinischen Krankheitsbildern und Therapieformen von Relevanz sein kann. Weiterhin können auf Basis dieser Studienergebnisse neue Therapeutika entwickelt werden gegen Nebenwirkungen von (Anti-)Hormontherapien oder auch Wirkstoffe, die

direkt einem Gedächtnisverlust entgegenwirken. Dies könnte bei der Therapie der oben erwähnten Alzheimer-Demenz klinische Anwendung finden.

7. Literaturverzeichnis

- Albertsen, P. C., Hanley, J. A., & Fine, J. (2005). 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *Jama*, 293(17), 2095–2101. <http://doi.org/10.1001/jama.293.17.2095>
- Andersen, P. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Asbell, S. O., Leon, S. A., Tester, W. J., Brereton, H. D., Ago, C. T., & Rotman, M. (1996). Development of anemia and recovery in prostate cancer patients treated with combined androgen blockade and radiotherapy. *The ...*, 29(4), 243–248. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(199610\)29:4<243::AID-PROS5>3.0.CO;2-C](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(199610)29:4<243::AID-PROS5>3.0.CO;2-C)
- Au, C. C., Furness, J. B., & Brown, K. A. (2016). Ghrelin and Breast Cancer: Emerging Roles in Obesity, Estrogen Regulation, and Cancer. *Frontiers in Oncology*, 6, 265. <http://doi.org/10.3389/fonc.2016.00265>
- Azcoitia, I., Garcia-Ovejero, D., Chowen, J. A., & Garcia-Segura, L. M. (2001). Astroglia play a key role in the neuroprotective actions of estrogen. *Progress in Brain Research*, 132, 469–478. [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(01\)32096-4](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(01)32096-4)
- Balaji, K. C., Rabhani, F., Tsai, H., Bastar, A., & Fair, W. R. (1999). Effect of neoadjuvant hormonal therapy on prostatic intraepithelial neoplasia and its prognostic significance. *The Journal of Urology*, 162(3 Pt 1), 753–757.
- Berman, A. T., Thukral, A. D., Hwang, W.-T., Solin, L. J., & Vapiwala, N. (2013). Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clinical Breast Cancer*, 13(2), 88–94. <http://doi.org/10.1016/j.clbc.2012.11.001>
- Bhatnagar, A. S. (2007). The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast Cancer Res Treat*, 105(1), 7–17. <http://doi.org/10.1007/s10549-007-9696-3>
- Bird, C. M., & Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci*, 9(3), 182–194. <http://doi.org/10.1038/nrn2335>
- Brawley, O. W. (2012). Prostate cancer epidemiology in the United States. *World Journal of Urology*, 30(2), 195–200. <http://doi.org/10.1007/s00345-012-0824-2>
- Chen, C. Y., & Ward, J. P. (2014). A mathematical model for the human menstrual cycle. *Mathematical Medicine and Biology : a Journal of the IMA*, 31(1), 65–86. <http://doi.org/10.1093/imammb/dqs048>
- Claps, M., Petrelli, F., Caffo, O., Amoroso, V., Roca, E., Mosca, A., et al. (2018). Testosterone Levels and Prostate Cancer Prognosis: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Genitourinary Cancer*, 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.01.005>
- Curigliano, G., Criscitiello, C., Esposito, A., & Pruneri, G. (2017). Over-using chemotherapy in the adjuvant setting. *Breast*, 31, 303–308. <http://doi.org/10.1016/j.breast.2016.11.011>

- Dowsett, M., Cuzick, J., Ingle, J., Coates, A., Forbes, J., Bliss, J., et al. (2010). Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(3), 509–518. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.1274>
- Edelman, G. M., Gall, W. E., & Cowan, W. M. (1987). *Synaptic Function*. John Wiley & Sons.
- Fabian, C. J. (2007). The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International Journal of Clinical Practice*, 61(12), 2051–2063. <http://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01587.x>
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Jarry, H., & Rune, G. M. (2011). Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell Tissue Res*, 345(3), 285–294. <http://doi.org/10.1007/s00441-011-1221-7>
- Fester, L., Ribeiro-Gouveia, V., Prange-Kiel, J., Schassen, von, C., Bottner, M., Jarry, H., & Rune, G. M. (2006). Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem*, 97(4), 1136–1144. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03809.x>
- Gelber, R. D., Thiirilmann, B., Giobbie-Hurder, A., Mauriac, L., Ejlertsen, B., Paridaens, R., et al. (2011). 5016 POSTER DISCUSSION BIG 1-98 Update: Evaluating Letrozole and Tamoxifen Alone and in Sequence at 8 Years Median Follow-up for Postmenopausal Women With Steroid Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *European Journal of Cancer*, 47, S334–S335. [http://doi.org/10.1016/S0959-8049\(11\)71458-7](http://doi.org/10.1016/S0959-8049(11)71458-7)
- Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*, 10(4), 1286–1291.
- Grossmann, M., & Zajac, J. D. (2011). Androgen deprivation therapy in men with prostate cancer: how should the side effects be monitored and treated? *Clinical Endocrinology*, 74(3), 289–293. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03939.x>
- Gunlusoy, B., Ceylan, Y., Koskderlioglu, A., Gedizlioglu, M., Degirmenci, T., Ortan, P., & Kozacioglu, Z. (2017). Cognitive Effects of Androgen Deprivation Therapy in Men with Advanced Prostate Cancer. *Urology*. <http://doi.org/10.1016/j.urology.2016.12.060>
- Harden, C., MacLusky, NJ (2005). Aromatase inhibitors as add-on treatment for men with epilepsy. *Expert review of Neurotherapeutics*. 5(1):123-7. <https://doi.org/10.1586/14737175.5.1.123>
- Harris Clark, L. (2003). Multiple Stable Periodic Solutions in a Model for Hormonal Control of the Menstrual Cycle. *Bulletin of Mathematical Biology*, 65(1), 157–173. <http://doi.org/10.1006/bulm.2002.0326>
- Harris, K. (1994). Dendritic Spines: Cellular Specializations Imparting Both Stability and Flexibility to Synaptic Function. *Annual Review of Neuroscience*, 17(1), 341–371. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.17.1.341>
- Hayat, M. J., Howlader, N., Reichman, M. E., & Edwards, B. K. (2007). Cancer Statistics, Trends, and Multiple Primary Cancer Analyses from the

- Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The Oncologist*, 12(1), 20–37. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.12-1-20>
- Hojo, Y., Hattori, T.-A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H.-T., et al. (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 865–870. <http://doi.org/10.1073/pnas.2630225100>
- Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G., & Cronin, K. A. (2014). US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *Journal of the ...*, 106(5), dju055–dju055. <http://doi.org/10.1093/jnci/dju055>
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (1941). The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate., 1–6.
- Hurvitz, S. A., Hu, Y., O'Brien, N., & Finn, R. S. (2013). Current approaches and future directions in the treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 39(3), 219–229. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.04.008>
- Ishii, H., Tsurugizawa, T., Ogiue-Ikeda, M., & Kawato, S. (2007). Local Production of Sex Hormones and Their Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity, 1–12. <http://doi.org/10.1177/1073858407301396>
- Joensuu, H. (2017). Escalating and de-escalating treatment in HER2-positive early breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 52, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.11.002>
- Kong, L., Tang, M., Zhang, T., Wang, D., Hu, K., Lu, W., et al. (2014). Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 21253–21269. <http://doi.org/10.3390/ijms151121253>
- Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., et al. (2004). Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci*, 24(26), 5913–5921. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5186-03.2004>
- Le Rhun, E., Delbeuck, X., Lefeuvre-Plesse, C., Kramar, A., Skrobala, E., Pasquier, F., & Bonnetterre, J. (2015). A phase III randomized multicenter trial evaluating cognition in post-menopausal breast cancer patients receiving adjuvant hormone therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 152(3), 569–580. <http://doi.org/10.1007/s10549-015-3493-1>
- Le, T., Bhushan, V., Sochat, M., Kalani, M., & Chavda, Y. (2017). First Aid for the Usmle Step 1: 2016.
- Leranth, C. (2003). Gonadal Hormones Affect Spine Synaptic Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Male Rats. *Journal of Neuroscience*.
- Leranth, C., Hajszan, T., & MacLusky, N. J. (2004). Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *J Neurosci*, 24(2), 495–499. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4516-03.2004>

- Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U., & Basso, S. M. M. (2013). Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(5), 596–604.
- Lumachi, F., Santeufemia, D. A., Fadda, G. M., Tozzoli, R., Chiara, G. B., & Basso, S. M. M. (2016). Adjuvant Hormonal Therapy in Women with Early-stage Breast Cancer. *Medicinal Chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))*, *12*(3), 261–267.
- Macfarlane, L., Parkin, T., & Ramsey, I. (2016). Pre-trilostane and three-hour post-trilostane cortisol to monitor trilostane therapy in dogs. *The Veterinary Record*, *179*(23), 597–597. <http://doi.org/10.1136/vr.103744>
- Martini, L. (1982). The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocrine Reviews*, *3*(1), 1–25. <http://doi.org/10.1210/edrv-3-1-1>
- McNamara, K. M., Guestini, F., Sakurai, M., Kikuchi, K., & Sasano, H. (2016). How far have we come in terms of estrogens in breast cancer? [Review]. *Endocrine Journal*, *63*(5), 413–424. <http://doi.org/10.1507/endocrj.EJ16-0022>
- Nagata, N., Kojima, K., & Yuki, M. (2017). Comparison of Survival Times for Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism in a Primary-Care Hospital: Treated with Trilostane versus Untreated. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *31*(1), 22–28. <http://doi.org/10.1111/jvim.14617>
- Palmer, C. L., Cotton, L., & Henley, J. M. (2005). The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacological Reviews*, *57*(2), 253–277. <http://doi.org/10.1124/pr.57.2.7>
- Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci*, *15*(4), 250–263. <http://doi.org/10.1038/nrn3708>
- Perlmutter, M. A., & Lepor, H. (2007). Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Reviews in Urology*.
- Pierorazio, P. M., Ferrucci, L., Kettermann, A., Longo, D. L., Metter, E. J., & Carter, H. B. (2010). Serum testosterone is associated with aggressive prostate cancer in older men: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *BJU International*, *105*(6), 824–829. <http://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08853.x>
- Prange-Kiel, J., Dudzinski, D. A., Pröls, F., Glatzel, M., Matschke, J., & Rune, G. M. (2016). Aromatase Expression in the Hippocampus of AD Patients and 5xFAD Mice. *Neural Plasticity*, *2016*(26), 9802086–11. <http://doi.org/10.1155/2016/9802086>
- Prange-Kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Jarry, H., & Rune, G. M. (2009). Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm*, *116*(11), 1417–1425. <http://doi.org/10.1007/s00702-009-0294-x>
- Prange-Kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Lauke, H., Carretero, J., & 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. <http://doi.org/10.1002/hipo.20173>

- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H., & Rune, G. M. (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, *13*(2), 226–234. <http://doi.org/10.1002/hipo.10075>
- Purves, D., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., Lamantia, A.-S., McNamara, J. O., Williams, S. M., & Augustine, G. J. (2001). Neuroscience.
- Rang, H. P., Dale, M. M., & Ritter, J. M. (1995). Pharmacology.
- Reichmann, F., Painsipp, E., Holzer, P., Kummer, D., Bock, E., & Leitinger, G. (2015). A novel unbiased counting method for the quantification of synapses in the mouse brain. *J Neurosci Methods*, *240*, 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.10.020>
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, *1963*, 1–5.
- Richard J Wassersug, P., Lauren Walker, P., & Robinson, J. W. (2014). Androgen Deprivation Therapy. Demos Medical Publishing.
- Ruiz-Palmero, I., Ortiz-Rodriguez, A., Melcangi, R. C., Caruso, D., Garcia-Segura, L. M., Rune, G. M., & Arevalo, M.-A. (2016). Oestradiol synthesized by female neurons generates sex differences in neurogenesis. *Scientific Reports*, *6*(1), 31891. <http://doi.org/10.1038/srep31891>
- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., & Monge-Bonilla, C. (2017). Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Annals of Neurosciences*, *24*(1), 46–54. <http://doi.org/10.1159/000464422>
- Schassen, von, C., Fester, L., Prange-Kiel, J., Lohse, C., Huber, C., Bottner, M., & Rune, G. M. (2006). Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol*, *18*(11), 847–856. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01484.x>
- Schmidt, R., Kienbacher, E., Benke, T., Dal-Bianco, P., Delazer, M., Ladurner, G., et al. (2008). [Sex differences in Alzheimer's disease]. *Neuropsychiatrie : Klinik, Diagnostik, Therapie Und Rehabilitation : Organ Der Gesellschaft Osterreichischer Nervenarzte Und Psychiater*, *22*(1), 1–15.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *20*(1), 11–21.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, *66*(1), 7–30. <http://doi.org/10.3322/caac.21332>
- Stangelberger, A., Waldert, M., & Djavan, B. (2008). Prostate cancer in elderly men. *Reviews in Urology*, *10*(2), 111–119.
- Tashjian, A. H., & Armstrong, E. J. (2011). Principles of Pharmacology. Lippincott Williams & Wilkins.
- The Leuprolide Study Group. (1984). Leuprolide versus Diethylstilbestrol for Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*, *311*(20), 1281–1286. <http://doi.org/10.1056/NEJM198411153112004>
- Tuscher, J. J., Szinte, J. S., Starrett, J. R., Krentzel, A. A., Fortress, A. M., Remage-Healey, L., & Frick, K. M. (2016). Inhibition of local estrogen synthesis in the hippocampus impairs hippocampal memory consolidation in ovariectomized female mice. *Hormones and Behavior*, *83*, 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.05.001>

- Untch, M., Harbeck, N., Huober, J., Minckwitz, von, G., Gerber, B., Kreipe, H.-H., et al. (2015). Primary Therapy of Patients with Early Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Opinions of German Specialists to the 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015 (Vienna 2015). *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, *75*(6), 556–565. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1546120>
- Veiga, S., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2005). Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *Neuroreport*, *16*(14), 1599–1603.
- Vierk, R., Glassmeier, G., Zhou, L., Brandt, N., Fester, L., Dudzinski, D., et al. (2012). Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci*, *32*(24), 8116–8126. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5319-11.2012>
- Viña, J., & Lloret, A. (2010). Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *20 Suppl 2*(s2), S527–33. <http://doi.org/10.3233/JAD-2010-100501>
- Voegeli, T.-A., Kurtz, A., Grimm, M. O., Effert, P., & Eckardt, K.-U. (2005). Anemia under androgen deprivation: influence of flutamide, cyproteroneacetate and orchiectomy on the erythropoietin system. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, *37*(2), 89–93. <http://doi.org/10.1055/s-2005-861172>
- Waldemar, G., & Burns, A. (2017). *Alzheimer's Disease*. Oxford University Press.
- Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, *10*(12), 4035–4039.
- Zardavas, D., Cameron, D., Krop, I., & Piccart, M. (2013). Beyond trastuzumab and lapatinib: new options for HER2-positive breast cancer . *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, *33*, e2–e11. http://doi.org/10.1200/Ed-Book_AM.2013.33.e2
- Zhou, L., Fester, L., Blittersdorff, von, B., Hassu, B., Nogens, H., Prange-Kiel, J., et al. (2010). Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology*, *151*(3), 1153–1160. <http://doi.org/10.1210/en.2009-0254>
- Zhou, L., Lehan, N., Wehrenberg, U., Disteldorf, E., Lossow, von, R., Mares, U., et al. (2007). Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. *Exp Neurol*, *203*(1), 72–81. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.020>

8. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir jederzeit mit Hilfe und Ratschlägen zur Seite standen. Ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune und meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Nicola Brandt, durch die meine Doktorarbeit erst ermöglicht wurde.

9. Curriculum Vitae

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: