

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem

Institut für Neuroanatomie
des Zentrums für experimentelle Medizin

Direktorin: Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Die Bedeutung der Aromatase für die Regulation der
Synapsendichte in der basolateralen Amygdala

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin im
Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Alexander Keller

geboren in Hannover, Niedersachsen

Hamburg 2020

Meinen Eltern,

Maria Keller-Pagiavli

und

Dr. med. Hans-Jürgen Keller

Meinen Liebsten,

Emma Sophia und Marie

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.02.2021**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Claus Hilgetag

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

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	6
1.1 HINTERGRUND DER ARBEIT	6
1.2 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER AMYGDALA	8
1.3 DIE ROLLE VON ÖSTROGENEN IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM.....	10
1.4 DIE BEDEUTUNG DER AROMATASE IN DER STEROIDHORMONBIOSYNTHESE	11
1.5 HEMMUNG DER AROMATASE DURCH LETROZOL	12
1.6 SYNAPSEN AUF DORNFORTSÄTZEN (= SPINE-SYNAPSEN)	14
1.7 ZIELE DER ARBEIT	14
2. MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 TIERE	16
2.2 DURCHFÜHRUNG DER <i>IN VIVO</i>-VERSUCHE	16
2.2.1 BEHANDLUNG DER TIERE IM <i>IN VIVO</i> -VERSUCH	16
2.2.2 FIXIERUNG DURCH TRANSKARDIALE PERFUSION.....	17
2.2.3 NACHFIXIERUNG, ENTWÄSSERUNG UND EINBETTUNG DER PRÄPARATE FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPIE	17
2.2.4 ANFERTIGUNG VON SEMI- UND ULTRADÜNNNSCHNITTEN	18
2.2.5 ANFERTIGUNG VON ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILDERN.....	18
2.2.6 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNOHISTOCHEMIE	19
2.3 DURCHFÜHRUNG DER <i>IN VITRO</i>-VERSUCHE	20
2.3.1 PRÄPARATION DER KORTIKO-AMYGDALÄREN GEWEBEKULTUREN	20
2.3.2 NACHWEIS EINER AROMATASE-FUNKTION IN DEN GEWEBEKULTUREN	21
2.3.3 FIXIERUNG DER GEWEBEKULTUREN	22
2.4. DATENAUSWERTUNG	22
2.4.1 AUSWERTUNG ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER BILDER.....	22
2.4.2 AUSWERTUNG IMMUNHISTOCHEMISCHER BILDER	23
2.4.3 STATISTIK	24
2.5 ARBEITSMATERIALIEN, GERÄTE UND SOFTWARE	25
2.5.1 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	26
2.5.2 VERWENDETE ANTIKÖRPER	27
2.5.2.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER	27
2.5.2.2 SEKUNDÄRANTI-KÖRPER	28
2.5.2.3 NACHWEIS-KITS.....	28
2.5.3 LÖSUNGEN	28
3. ERGEBNISSE	31
3.1 EXPRESSION VON AROMATASE IN DER BASOLATERALEN AMYGDALA (BLA) VON RATTEN.....	31
3.2 CHARAKTERISIERUNG VON AROMATASE-EXPRIMIERENDEN ZELLEN IM BASOLATERALEN KERN (BL) VON RATTEN	33

3.3 AROMATASE-INHIBITION REDUZIERT DIE DICHTEN VON SPINESYNAPTEN IM BL ADULTER MÄUSE GESCHLECHTSSPEZIFISCH IN VIVO.....	34
3.4 AROMATASE-INHIBITION REDUZIERT DIE DICHTEN VON SPINESYNAPTEN IN DER BLA GESCHLECHTSSPEZIFISCH IN VITRO (ORGANOTYPISCHE GEWEBEKULTUR)	36
4. DISKUSSION	41
4.1 GESCHLECHTSSPEZIFISCHE REGULATION DER SYNAPTENDICHTE IN DER BLA DURCH AROMATASE	41
4.2 REGULATION DER SYNAPTISCHEN PLASTIZITÄT IN DER BLA DURCH STEROIDHORMONE	42
4.3 DIE ROLLE DER AROMATASE BEI DER REGULATION DER SYNAPTISCHEN PLASTIZITÄT IN DER BLA	43
4.4 METHODISCHE ASPEKTE.....	45
4.5 KLINISCHE BEDEUTUNG.....	46
5. ZUSAMMENFASSUNG	49
6. SUMMARY	50
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	51
8. LITERATURVERZEICHNIS	54
9. DANKSAGUNG	62
10. TABELLARISCHER LEBENSLAUF	63
11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	64

1. Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

Die Funktion von Östrogenen beschränkt sich nicht nur auf die Steuerung des Reproduktionsverhaltens, sondern sie haben auch einen großen Einfluß auf kognitive Funktionen; insbesondere auf das Lernverhalten und die Gedächtnisbildung (Arevalo et al., 2015; Korol und Pisani, 2015). Auch stammen Östrogene, welche diesen Einfluß bewirken, nicht notwendigerweise aus peripheren Quellen (wie z.B. den Eierstöcken oder dem Fettgewebe), sondern können *de novo* von Neuronen hergestellt werden, da alle für die Sexualsteroidbiosynthese notwendigen Enzyme in Neuronen exprimiert werden (Prange-Kiel et al., 2003; Hojo et al., 2004; Fester et al., 2009). Eine besondere Rolle kommt dabei dem Enzym Cytochrom P-450-Aromatase (kurz: Aromatase bzw. AROM) zu, das als finales Enzym der Östrogen-Biosynthese die Umwandlung von Testosteron in 17 β -Estradiol (E2), das potenteste Östrogen, katalysiert. Aromatase wird im Gehirn besonders in diencephalen und limbischen Bereichen exprimiert (Naftolin und MacLusky 1982; Roselli und Resko, 1987).

Von den Hirnregionen mit hohem Aromatasegehalt wurde der Hippokampus bislang am intensivsten untersucht (Hojo et al., 2008; Fester et al., 2011). Dieses starke Interesse wurde durch klinische Beobachtungen ausgelöst, die darauf hinweisen, dass Frauen mit östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen nach Behandlung mit Aromataseinhibitoren unter Gedächtnisdefiziten leiden. Dies könnte an einer Störung der Aromatasefunktion im Hippokampus liegen (Shilling et al., 2003; Dowsett et al., 2005; Phillips et al., 2011; Bayer et al., 2015). Diese Hypothese wird durch Beobachtungen unterstützt, dass bei Nagetieren nach der Anwendung des Aromataseinhibitors Letrozol eine Beeinträchtigung sowohl der Synapsenbildung als auch der Langzeitpotenzierung (LTP) festzustellen ist (Kretz et al., 2004; Grassi et al., 2011; Vierk et al., 2012). Beides sind Prozesse, denen eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung zugeschrieben wird (Yuste und Bonhoeffer, 2001). Hinzu kommen Beobachtungen, dass Aromataseinhibitoren sich auf das Hippokampus-abhängige Verhalten auswirken und depressionsähnliche Symptome in

Tiermodellen auslösen können (Dalla et al., 2004; Barha und Galea 2010; Cornil und Charlier 2010; Fernandez und Russo 2010).

Neben dem Hippokampus ist die Amygdala eine für die Gedächtnisbildung wichtige Gehirnregion. Anatomisch umfasst die Amygdala etwa ein Dutzend separater Kerngebiete, die entwicklungsgeschichtlich aus pallialen und subpallialen Anteilen entstanden sind (Swanson und Petrovich, 1998; Puelles et al., 2000; LeDoux, 2007). In funktionaler Hinsicht wird die Amygdala als eine Kernkomponente neuronaler Schaltkreise angesehen, welche das „emotionale“ Gedächtnis verarbeiten, einschließlich der Festlegung angemessener Reaktionen auf emotionale Stimuli wie Furcht und Angst (Pape und Pare, 2010; Tovote et al., 2015). Daher erscheint es naheliegend, dass Veränderungen der Amygdala verantwortlich sein könnten, ursächlich an neuropsychiatrischen Störungen wie Depressionen oder posttraumatischen Belastungsstörungen beteiligt zu sein (Pape und Pare, 2010).

Aromataseexpression wurde auch in der Amygdala nachgewiesen (Balthazart et al., 1991; Sanghera et al., 1991; Shinoda et al., 1994; Wagner und Morrell, 1996; Horvath et al., 1997; Roselli et al., 1998; Zhao et al., 2007). Außerdem lässt das Auftreten depressionsartiger Symptome bei Frauen mit Mammakarzinomen nach einer Behandlung mit Aromataseinhibitoren die Vermutung zu, dass eine gestörte Aromatasefunktion in der Amygdala diese Nebenwirkungen verursachen könnte (Gallicchio et al., 2012).

Diese Hypothese ist der Hintergrund der vorliegenden Arbeit. In dieser wurde mithilfe immunhistochemischer Methoden und der Elektronenmikroskopie untersucht, welche Auswirkung die Gabe von Letrozol auf die Dichte von Synapsen an dendritischen Dornfortsätzen (sog. *Spine*-Synapsen) in der basolateralen Amygdala hat. Die basolaterale Amygdala wurde gewählt, weil sie als sensorische Eingangsstation der Amygdala (Pape et al., 2010), und wegen ihrer Hippokampus-ähnlichen zellulären Zusammensetzung (Tovote et al., 2015) und pallialen Abstammung (LeDoux, 2007), als funktionelles Analogon zum Hippokampus angesehen werden kann, und somit ähnliche Mechanismen der Informationsprozessierung vermutet werden dürfen.

Für die Studie wurden adulte Mäuse (nach systemischer Gabe von Letrozol) als *in vivo*- und organotypische Gewebekulturen der Amygdala als *in vitro*-Modell untersucht. Auswertungen wurden nach Geschlecht getrennt durchgeführt, um mögliche Geschlechtsunterschiede zu identifizieren, da hinsichtlich der Inzidenz von Angsterkrankungen in der Literatur ausgeprägte Unterschiede zwischen Männern und Frauen dokumentiert sind (Meang und Milad, 2015). Begleitend zu den von mir durchgeführten morphologischen Analysen wurden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt, um morphologische Veränderungen gegebenenfalls mit physiologischen Effekten korrelieren zu können (Bender et al., 2017).

1.2 Anatomie und Physiologie der Amygdala

Als Amygdala (griechisch: *amygdale* = Mandel) wird eine komplexe, aus über einem Dutzend Kerngebieten bestehende Struktur des limbischen Systems im anterioren Anteil des Temporallappens bezeichnet (Pape et al., 2010). Sie nimmt eine bedeutsame Rolle für das emotionale Gedächtnis ein und ist ebenso wie der mediale präfrontale Kortex (mPFC) und der Hippokampus ein maßgeblicher Teil neuronaler Netzwerke für das Furcht- und Angstverhalten von Säugetieren (Pape und Pare, 2010; Tovote et al., 2015). Dabei wurde beobachtet, dass es in akuten Angstsituationen und in Erwartung von bedrohlichen Zuständen zu erhöhten Sexualhormonwerten im basolateralen Kern (BLA) und im zentralen Kern (CeA) der Amygdala kommen kann (Tovote et al., 2015).

Unter den Kerngebieten, welche bei Furcht- und Angstreaktionen eine wesentliche Rolle spielen, lassen sich zwei Hauptkerngebiete kategorisieren: die basolaterale Amygdala (BLA) und die zentrale Amygdala (CeA). Die BLA kann noch weiter in ein laterales (La), basolaterales (BL) und basomediales (BM) Kerngebiet, die CeA in einen lateralen (CeAl) und einen medialen (CeAm) Anteil untergliedert werden. Strukturell ist die BLA eine Kortex-ähnliche Struktur, bestehend aus bis zu 80% glutamatergen Pyramidenzellen und etwa 20% GABAergen Interneuronen, während die CeA eher dem Striatum mit überwiegend GABAergen Neuronen ähnelt (Sah et al., 2003;

Tovote et al., 2015). Funktionell wird die BLA als sensorische Eingangsstation des im Dienste der Furcht- und Angstreaktion stehenden Netzwerkes in der Amygdala angesehen. Dazu erhält sie afferente Informationen unterschiedlichster Modalitäten (olfaktorisch, somatosensorisch, gustatorisch, viszeral, auditorisch und visuell) (Sah et al., 2003). Im Gegensatz dazu gilt die CeA als funktionelle Ausgangsstation bei der Furchtreaktion und bildet zu diesem Zweck Verbindungen mit zahlreichen Hirnregionen aus, die vegetative (z. B. zentrales Höhlengrau, Ncl. dorsalis n. vagi, Ncl. solitarius) und affektive Körperreaktionen (z. B. Ncl. n. facialis) steuern.

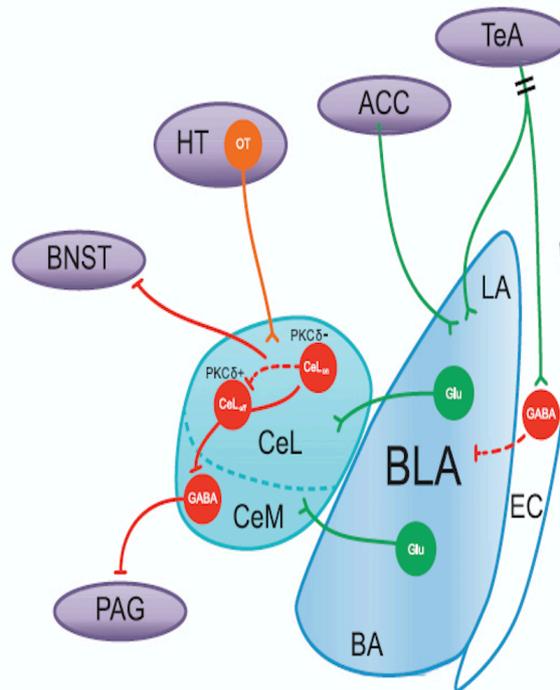


Abbildung 1. Verschaltungen der Amygdala im Furcht- und Angstkreislauf (Nieh et al., 2012). Durch ihre komplexe interne Mikroverschaltung und der Verbindung zu distal gelegenen Kortexarealen spielt die Amygdala eine große Rolle im Furcht- und Angstverhalten. Abkürzungen: **ACC**: anterior cingulate cortex, **BA**: basal amygdala, **BLA**: basolateral amygdala, **BNST**: bed nucleus of the stria terminalis, **CeL**: lateral division of the central amygdala, **CeM**: medial division of the central amygdala, **EC**: external capsule, **Glu**: glutamate, **HT**: hypothalamus, **LA**: lateral amygdala, **OT**: oxytocin, **PAG**: periaqueductal gray, **PKC- δ** : protein kinase C-delta, **TeA**: temporal association cortex.

1.3 Die Rolle von Östrogenen im zentralen Nervensystem

Das Steroidhormon 17 β -Estradiol (E2) ist das potenteste der Östrogene (Kuhl, 2005). Es beeinflusst zahlreiche Funktionen im zentralen Nervensystem (ZNS). So moduliert E2 beispielsweise die neuronale Plastizität, in dem es die Bildung von Synapsen reguliert (Woolley und McEwen, 1992; Kajta und Beyer, 2003; Saunders-Pullman, 2003) und den GABA-Stoffwechsel beeinflusst (Maggi und Perez, 1984; Allan, 1997). Exogen appliziert, verstärkt es das Ausmaß der LTP (Foy et al., 1999; Mukai et al., 2007), was vermutlich auf den durch E2 herbei geführten Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Dichte bewirkt wird (Srivastava et al., 2008). Zusätzlich steigert E2 die Expression von NMDA-Rezeptoren (Adams et al., 2004; Jelks et al., 2007). Die Synapsendichte sowie die LTP werden als strukturelle bzw. physiologische Korrelate der Merkfähigkeit und des Gedächtnisses angesehen (Yuste & Bonhoeffer, 2001). Neben Beiträgen zur Regulation der neuronalen Plastizität wurden für E2 auch neuroprotektive Wirkungen nach Hirnverletzungen nachgewiesen (Garcia-Segura et al., 2001).

Bemerkenswerterweise scheint die Wirkung von E2 im Gehirn jedoch nur marginal von den peripher gebildeten Hormonen abzuhängen. Zwar werden im Hippokampus weiblicher Versuchstiere proportional schwankende Synapsendichten in Zyklusstadien mit hoher (*Proestrus*) und niedriger (*Diestrus*) E2-Serumkonzentration beobachtet (Woolley et al., 1990; McEwen, 2002); Untersuchungen der Funktion des im Hippokampus selbst gebildeten E2 erbrachten jedoch die überraschenden Befunde, dass die lokale E2-Konzentration dort ca. 6x höher als im Serum ist (Hojo et al., 2004) und die Inhibition der hippokampalen Aromatase selbst eine massive Reduktion, sowohl der Synapsendichte, als auch der Fähigkeit zur LTP, bewirkt (Kretz et al., 2004; Vierk et al., 2012). Es wird daher inzwischen angenommen, dass während des Zyklus das Serum-E2 nicht über einen direkten Einfluss im Hippokampus, sondern über seine Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und die dadurch veränderte Freisetzung von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), das auf die Aromataseaktivität hemmend wirkt, für die zyklischen Schwankungen der hippokampalen Synapsendichte verantwortlich ist (Janssens et al. 2000; Prange-Kiel et al.,

2008). Hauptakteur bei dieser Regulation der neuronalen Plastizität bleibt hierbei jedoch das durch die hippokampale Aromatase gebildete E2 (Prange-Kiel, 2013; Fester und Rune, 2015).

1.4 Die Bedeutung der Aromatase in der Steroidhormonbiosynthese

Die Enzyme, die an der Östrogen-Synthese beteiligt sind, gehören zur Gruppe der Cytochrom P-450-Enzyme. Ihr Name bezieht sich darauf, dass sie bei photometrischen Untersuchungen das Licht bei 450 nm absorbieren. Ihr Molekulargewicht liegt bei ca. 50 kDa. Das finale Enzym der E2-Synthese, die Aromatase, ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Es katalysiert irreversibel und spezifisch die Konversion von Testosteron zu E2 (Abb. 2) und findet sich auch außerhalb der Gonaden in zahlreichen Körpergeweben wie z. B. der Mamma (sowohl in gesundem Gewebe als auch in Brustkrebszellen), der Plazenta, der Leber, im Fettgewebe, in Knochen und in der Niere (Fester et al. 2015, Hojo et al. 2004, Prange-Kiel et al. 2003, Santen et al. 1999), aber insbesondere auch in Neuronen des zentralen Nervensystems (Naftolin et al., 1982; Roselli et al., 1987, 1998).

Das von Neuronen synthetisierte E2 wirkt dabei nicht – wie im Rest des Körpers – als ein in den Blutkreislauf abgegebenes endokrines Hormon, sondern beeinflusst parakrin die Funktionen von Nachbarneuronen (Prange-Kiel et al., 2003). Seine Wirkung ähnelt somit der eines Neurotransmitters und es wird daher in diesem Zusammenhang als „Neurosteroid“ bezeichnet. Die Wirkungen von E2 als Neurosteroid sind – wie bereits beschrieben – vielseitig: es moduliert über verschiedene Mechanismen die synaptische Plastizität (Woolley und McEwen, 1992; Kajta und Beyer, 2003; Saunders-Pullman, 2003; Prange-Kiel et al., 2008; Tabatadze et al., 2015) und wirkt bei Schädigung neuroprotektiv (Garcia-Segura et al., 2001).

Interessanterweise wurden bei Untersuchungen von E2-Effekten im Hippokampus Geschlechtsunterschiede bei der Regulation der synaptischen Plastizität festgestellt. Dabei wurde gezeigt, dass die Inhibition der Aromatase besonders in weiblichen Versuchstieren die synaptische Plastizität beeinflusst.

In männlichen war die Inhibition wenig effektiv (Vierk et al., 2012). Dies lässt auf geschlechtsspezifische Regulationsmechanismen schließen.

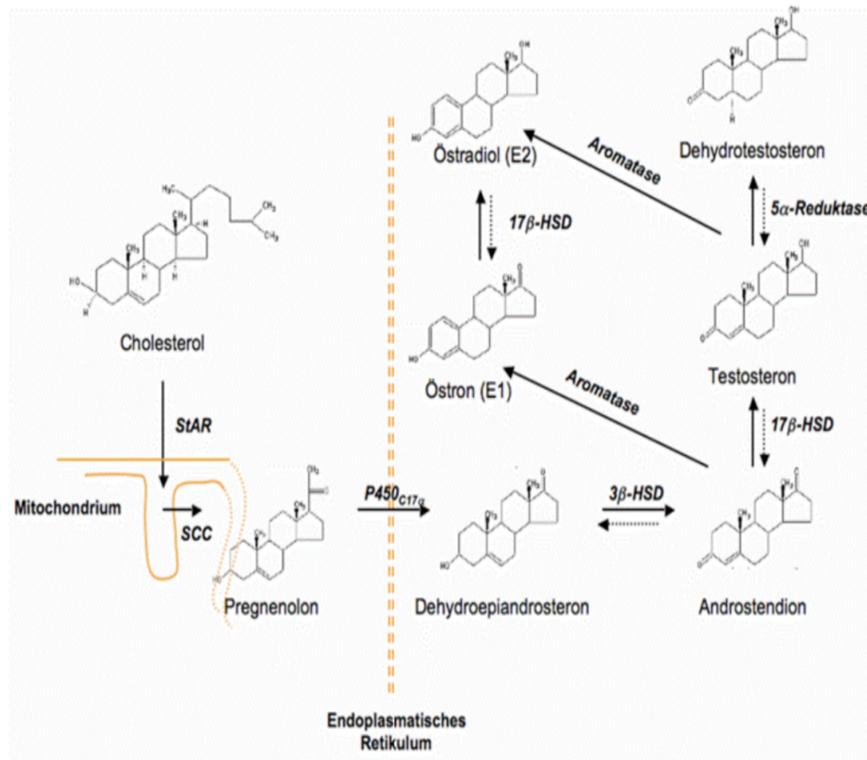


Abbildung 2. Die Östrogenbiosynthese im menschlichen Körper (L. Fester et al. 2007). Als Ausgangsverbindung für die Östrogenbiosynthese dient das Cholesterol. Durch das Enzym StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) wird es an die Innenmembran des Mitochondriums transportiert und durch das Cytochrom P-450_(SCC) (*sidechain cleavage-enzyme*) in Pregnenolon umgewandelt. Im endoplasmatischen Retikulum findet nun die Katalyse zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) durch die Cytochrom P-450_(C17) (Steroid-17 α -Hydrolase) statt. Durch die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) wird DHEA zu Androstendion und dieses über die 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (17 β -HSD) zu Testosteron katalysiert. Im finalen Schritt findet über die Cytochrom P-450_(Aromatase) (AROM) die Synthese von 17 β -Estradiol (E2) aus Testosteron statt.

1.5 Hemmung der Aromatase durch Letrozol

Derzeit existieren unterschiedliche nicht-steroidale, reversible Aromataseinhibitoren: Aminoglutethimid (Orimeten®), Anastrozol (Arimidex®) und Letrozol (Femara®). Diese binden mit ihrer hemmenden Domäne kompetitiv an die Aromatase und verhindern dadurch ihre katalytische

Wirkung. Durch die Hemmung der Aromatase wird die Umwandlung von Testosteron zu Estradiol verringert. Dabei erwies sich Letrozol in einer *in vivo*-Testreihe beim Vergleich verschiedener Aromataseinhibitoren als 10.000x potenter als Aminogluthetimid und 10x wirkungsvoller als Anastrozol (Smith, 1999).

Letrozol gehört zu der Gruppe der nicht-steroidalen Aromatasehemmer und wird derzeit hauptsächlich zur Therapie des Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms bei postmenopausalen Frauen sowie zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt. Die Wirkung basiert auf einer Bindung an das Häm der Cytochrom P-450-Untereinheit der Aromatase und führt zu einer kompetitiven, reversiblen Hemmung des Enzyms (Höffken, 1999). Dadurch wird die Östrogenbiosynthese in allen Geweben, in denen Aromatase vorkommt, gehemmt. Nach Absetzen des Letrozols nimmt die Aromatase ihre vollständige Funktion wieder auf und ist in der Lage erneut in vollem Umfang E2 zu produzieren. Klinisch klagen Patientinnen nach Letrozol-Gabe, ähnlich wie bei postmenopausalen Beschwerden, über Hitzewallungen, Kopfschmerzen, Libidoverlust und haben ein erhöhtes Osteoporose-Risiko.

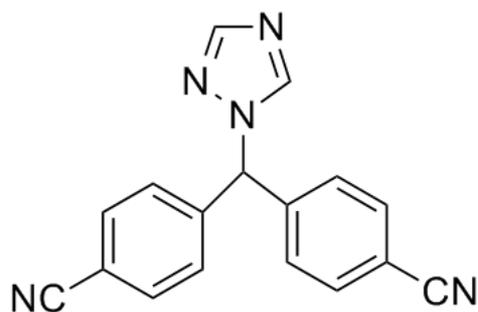


Abbildung 3. Chemische Strukturformel von Letrozol (Quelle:<https://82879-229730-raikfcquaxqncofqfm.stackpathdns.com/wp-content/uploads/2018/10/HY-14248-Letrozole.gif>, Stand 12.03.2020)

1.6 Synapsen auf Dornfortsätzen (= Spine-Synapsen)

Als Spineynapsen werden kleine Ausstülpungen von Dendriten bezeichnet, die der Vergrößerung der Dendritenoberfläche und somit der Interaktionsfläche mit anderen Nervenzellfortsätzen dienen. Äußerlich gleichen sie kleinen Dornfortsätzen (*spine* = Dorn) und bilden den postsynaptischen Anteil von Synapsen. Sie können in kurze (*stubby*), dünne (*thin*) und pilzförmige (*mushroom-shaped*) Synapsen unterteilt werden. Die Wirkung der Spinesynapsen ist meist exzitatorisch. *Mushroom-shaped Spines* gelten als funktionell ausgereifte, relativ stabile *Spines* und Synapsen mit ihrer Beteiligung werden daher auch als *Memory-* oder Gedächtnissynapsen bezeichnet. *Stubby* und *thin Spines* werden hingegen als sich noch entwickelnde *Spines* angesehen, deren Synapsenbeteiligung noch veränderbar ist (Peters und Kaiserman-Abramof, 1970; Harris et al, 1992; Nimchinsky et al., 2002; Rochefort und Konnerth, 2012). Eine ausgereifte Spinesynapse kann im elektronenmikroskopischen Bild an drei Kriterien erkannt werden:

1) einer ausgeprägten postsynaptischen Dichte, 2) einem präsynaptischen Bouton mit synaptischen Vesikeln, und 3) einem deutlichen synaptischen Spalt zwischen den prä- und postsynaptischen Anteilen. Anhand dieser Kriterien wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in dieser Studie beurteilt (siehe auch Abbildung 7D und E).

1.7 Ziele der Arbeit

Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von Hippokampus und BLA (beide sind entwicklungsgeschichtlich Kortexderivate) wurde die Hypothese aufgestellt, dass ähnliche Wirkungen von E2 auf die synaptische Plastizität, wie sie im Hippokampus beobachtet wurden, auch in der BLA eine Rolle spielen könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1) Es wurde mithilfe von Immunhistochemie untersucht, ob Aromatase in der BLA exprimiert wird, und wenn ja, in welcher Subregion und in welchen Zelltypen es vorkommt.

2) Es wurde untersucht, ob eine systemische Gabe des Aromataseinhibitors Letrozol die Dichte von Spinesynapsen – analog zu Befunden im Hippokampus (Vierk et al., 2012) – in der BLA verändert. Dazu wurde adulten weiblichen und männlichen Mäusen Letrozol über mehrere Tage 1x täglich intraperitoneal injiziert und das Gewebe anschließend elektronenmikroskopisch untersucht.

3) Auswirkungen von Letrozol auf die Synapsendichte wurden weiterhin in einem *in vitro*-Modell der Amygdala untersucht. Dazu wurden aus neonatalen Ratten stammende, organotypische Kulturen mit Amygdala-Anteil für eine Woche mit Letrozol inkubiert und danach die Synapsendichte elektronenmikroskopisch im Vergleich zu Kontrollkulturen untersucht.

Alle tierexperimentellen Anteile der Studie wurden, ebenso wie die Anlage und Pflege der Gewebekulturen, von Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt. Meine Aufgabe bestand in der immunhistochemischen Charakterisierung der Aromatase-Expression in der BLA, sowie in der Aufarbeitung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie und deren nachfolgender Analyse.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

Für diese Dissertation wurden sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*- Versuche durchgeführt. Insgesamt wurden 30 adulte Mäuse (C57BL/6; postnataler Tag 56 [P56]) für *in vivo*-Experimente eingesetzt. 24 dieser Mäuse (n = 6 pro experimenteller Gruppe und Geschlecht) erhielten täglich eine intraperitoneale Injektion von entweder Letrozol (0,4 µg/g Körpergewicht; Letrozolstammlösung: 160 µg/ml in einer Lösung von 4% DMSO und 0,9% NaCl) oder Kontrolllösung (4% DMSO in 0,9% NaCl), um die Wirkung einer AROM-Inhibition *in vivo* auf die Synapsendichte in der BLA zu untersuchen. Sechs Mäuse wurden für Immunohistochemie verwendet. Weiterhin wurden 60 neonatale Ratten (P3, *Rattus norvegicus*, Wistar) für *in vitro*-Experimente (Gewebeulturen), sowie 16 juvenile Ratten (P17-24; 8 Weibchen, 8 Männchen) für die Charakterisierung von AROM- exprimierenden Zellen in der BLA eingesetzt. Die Tiere wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) in kontrollierter Umgebung gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Alle Experimente wurden gemäß den gesetzlichen Richtlinien durchgeführt und von der Tierschutzbehörde der Stadt Hamburg genehmigt (Universität Hamburg, G15-054).

2.2 Durchführung der *in vivo*-Versuche

2.2.1 Behandlung der Tiere im *in vivo*-Versuch

Für die *in vivo*-Experimente wurden die Versuchstiere über eine Dauer von sieben Tagen mit Letrozol behandelt. Die Tiere erhielten dazu täglich gewichtsadaptiert eine intraperitoneale Injektion von entweder Letrozol (siehe oben) oder nur des Vehikels (4% DMSO in 0,9% NaCl) in der Kontrollgruppe. Für die Injektion wurden die Versuchstiere im Nacken fixiert und die Spritze in das Abdomen intraperitoneal appliziert. Diese Applikation wurde von tierexperimentell geschulten Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt.

2.2.2 Fixierung durch transkardiale Perfusion

Für die immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Gehirne der Tiere durch transkardiale Perfusion fixiert. Dafür wurden die verwendeten Tiere zunächst mittels einer intraperitoneal injizierten Ketamin-Xylazin-Mischung (siehe unten) in Vollnarkose versetzt. Daraufhin wurden sie auf einem Tisch fixiert und der Thorax eröffnet. Danach wurde der rechte Vorhof durch einen Schnitt eröffnet und gleichzeitig eine Kanüle in den linken Herzventrikel eingeführt, um durch einfließende physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) das Blut aus dem Kreislauf zu entfernen. Nachdem dies – erkennbar an der Aufhellung der Leber – geschehen war, wurde die physiologische Kochsalzlösung durch Fixierlösung ersetzt. Dabei handelte es sich für die Elektronenmikroskopie um Glutaraldehyd (2,5% in 0,05 M Phosphatpuffer, PB) und für die Immunhistochemie um Paraformaldehyd (PFA, 4% in Phosphat gepufferter Salzlösung, PBS). Das Gehirn wurde danach entnommen und für weitere Untersuchungen geeignet nachfixiert. Bis zu diesem Punkt wurden die Arbeitsschritte von Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt.

2.2.3 Nachfixierung, Entwässerung und Einbettung der Präparate für Elektronenmikroskopie

Die Nachfixierung erfolgte mit Osmiumtetroxid-Lösung (1% in 0,1 M PB mit 25% Saccharose). Anschließend wurde eine Entwässerung mit Ethanol in aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 96% und zweimal 100% Ethanol, jeweils für 10 Minuten), gefolgt von einer 15-minütigen Gabe von Propylenoxid durchgeführt. Danach erfolgte die Einbettung; zunächst mit einer Propylenoxid/Glycidether-Mischung im Verhältnis 1:1 für 60 Minuten, gefolgt von einem Verhältnis von 3:1 über Nacht. Dieser Behandlung folgte nun erneut über Nacht das Einlegen in einer Glycidether- Mischung (4 Teile Stammlösung A und 6 Teile der Stammlösung B; siehe Abschnitt 2.5.1: Lösungen). Als Beschleuniger wurde hier zusätzlich 2% 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol hinzugefügt.

2.2.4 Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten

Nach der Einbettung wurden die Blöcke so zugeschnitten („getrimmt“), dass sie vorrangig BLA enthielten, wobei die deutlich erkennbaren Faserbündel der *Capsulae externa* und *intermedia*, die die BLA umschliessen, zur Orientierung dienten (Olucha-Bordonau et al., 2014; siehe auch Abb. 7C). Danach wurden mithilfe eines Mikrotoms Semidünn-Schnitte (1 μm) angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt, um die Position der BLA unter mikroskopischer Sicht zu bestätigen. Daraufhin wurden mit einem Ultramikrotom Paare aufeinander folgender, serieller, Ultradünn-Schnitte (0,08-0,1 μm) angefertigt und auf Rastern gesammelt. Diese Abschnitte wurden zuerst mit 0,1% Uranylacetat für 30 Minuten und anschließend mit Bleizitrat für 5 Minuten angefärbt.

2.2.5 Anfertigung von elektronenmikroskopischen Bildern

Ziel war es, elektronenmikroskopische Bilder, die vornehmlich Ausschnitte der BLA enthalten, anzufertigen. Die Bilder wurden mit 6600-facher Vergrößerung erstellt. Bereiche in denen sich stark interferierende Strukturen befanden, wie große Dendriten oder Blutgefäße, wurden dabei vermieden. Es wurden jeweils 2 Ultradünnschnitte verwendet, die auch *in situ* nebeneinanderlagen und somit korrespondierende Ausschnitte gewählt, die 0,1 μm voneinander entfernt lagen. Die so dargestellten Abschnitte wurden abfotografiert und in digitaler Form abgespeichert, so dass die Fotos am Computer bzw. in gedruckter Form ausgewertet werden konnten. Da Faktoren wie die Orientierung und Größe von Synapsen die Quantifizierung entscheidend beeinflussen können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Disektortechnik nach Sterio (Sterio, 1984) angewendet. Als Spinesynapsen wurden dabei Synapsen definiert, bei denen eine präsynaptische Vesikelansammlung, eine prä- und postsynaptische Membran, die postsynaptische Verdichtung auf dendritischen Protrusionen und ein synaptischer Spalt klar erkennbar waren (Kahle und Frotscher, 2001; siehe Abbildung 7D und E). Es wurden nur solche Synapsen zur Auswertung markiert, die diesen Anforderungen entsprachen. Synapsen am Dendritenstamm wurden nicht berücksichtigt.

2.2.6 Durchführung der Immunohistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die Versuchstiere mit 4% PFA perfundiert und die Gehirne danach für 4 h in 4% PFA nachfixiert. Zum Gefrierschutz wurden die Gehirne für 48 h in einer 25% Saccharose-Lösung eingelegt und anschließend in -50°C Isopentan tiefgefroren. Die gefrorenen Hirne wurden auf einem Cryotom mit koronaler Schnittführung in 30 µm dicke Scheiben geschnitten und die Amygdala enthaltenden Schnitte in PBS gesammelt. Diese Schnitte wurden „frei schwimmend“ mit 3% normalem Ziegenserum (*normal goat serum*, NGS) in PBS plus 0,3% Triton X-100 für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach erfolgte eine 48-stündige Inkubation mit einem primären Antikörper bei 4°C in der obigen Lösung. Zwei verschiedene Primärantikörper wurden eingesetzt:

- ein polyklonaler Anti-AROM-Antikörper aus dem Kaninchen (1:1.200; gerichtet gegen die Aminosäuren 488-502 der Maus-Aromatase; Yague et al., 2006) und
- ein monoklonaler Anti-AROM-Antikörper aus der Maus (1:50; gerichtet gegen die Aminosäuren 376-390 der menschlichen Aromatase). Beide Antikörper zeigen vergleichbare Immunreaktivitätsmuster (Bender et al., 2010).

Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Schnitte zweimal für 15 min. in PBS gewaschen, bevor sie mit sekundären Antikörpern für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Für die lichtmikroskopische Darstellung wurden mit Biotin gekoppelte Zweitantikörper gegen Kaninchen-IgGs aus der Ziege, 1:250 verdünnt, verwendet. Die Schnitte wurden danach in einer Lösung inkubiert, die Avidin-Moleküle enthielt, an die das Enzym Peroxidase gekoppelt war (ABC-Kit). Avidin-Peroxidase bildet mit den Antikörper-gebundenen Biotin-Konjugaten Komplexe und erlaubt somit den enzymhistochemischen Nachweis der Bindung. Dieser erfolgte mithilfe einer Lösung aus 0,04% Diaminobenzidin, 0,01% H₂O₂ und 0,01% NiCl₂. Nach Beendigung der Färbereaktion (in Wasser) wurden die Schnitte auf Glasobjektträger aufgebracht, nach Antrocknung über eine zunehmende Ethanolreihe dehydriert, mit Kunstharz (Entellan) überschichtet und mit einem Deckglässchen abgedeckt.

Für die Immunfluoreszenz-Darstellung wurden Zweitantikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-IgGs aus der Ziege, kombiniert mit Alexa-Fluor 568- oder Alexa-Fluor 488-Chromophoren, 1:500 verdünnt, verwendet. Abschliessend wurden die Schnitte für eine Kerngegenfärbung für 1 Minute mit 4',6'-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) behandelt, danach ebenfalls auf gläserne Objektträger aufgebracht, mit einem fluoreszenzschonenden Eindeckmedium (Dako) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zur Kontrolle der Spezifität wurden Schnitte wie oben behandelt, aber unter Auslassung der primären Antikörper. Unter diesen Bedingungen war keine Immunreaktion zu beobachten.

2.3 Durchführung der *in vitro*-Versuche

2.3.1 Präparation der kortiko-amygdalären Gewebekulturen

Für die Präparation organotypischer kortiko-amygdalarer Gewebekulturen wurden neonatale Ratten (P3) unter semisterilen Bedingungen dekapitiert und die Kopfhaut von dorsal durchtrennt. Der Schädel wurde mit einer Schere eröffnet und das Gehirn mit einem Heidemannspatel aus der Schädelhöhle herauspräpariert. Nach Ablegen auf ein PBS-getränktes Schwämmchen erfolgte die Entfernung des Cerebellums. Die Hemisphären wurden voneinander getrennt und es wurden mithilfe eines Gewebehäckslers (*Tissue Chopper*) ca. 400 µm dicke Schnitte in koronarer Schnitfführung hergestellt. Diese wurden nun zunächst in einem auf 4°C gekühltes Präparationsmedium (*Minimal Essential Medium*, MEM und 2mM Glutamine) aufbewahrt. Es erfolgte nun die Begutachtung der Präparate unter der Stereolupe: Die Amygdala enthaltenden Schnitte wurden ausgewählt und deren dorsale Hälfte und das mediale Drittel entfernt, wodurch hauptsächlich amygdaläre und ventralkortikale Strukturen intakt zurückblieben (mit Teilen des Striatum und Hypothalamus = kortiko-amygdaläre Schnittkulturen). Die Schnitte wurden auf angefeuchteten, porösen (0,4 µm) Membranen platziert (30 mm Durchmesser), die dann in Plastikschalen mit sechs Öffnungen (= 6-well-Platte) eingesetzt wurden (mit 1 ml Medium pro Schnittkultur). Die Kultivierung der 6-well-Platten erfolgte in einer feuchten, mit CO₂ (5%) angereicherten Atmosphäre, im Brutschrank bei 37°C. Alle zwei Tage wurde ein Wechsel des

Kulturmediums durchgeführt. Ab dem 7. Tag wurde der AROM-Inhibitor Letrozol (10^{-7} M; 1 μ l/ml Medium aus einer 10^{-4} M Stammlösung, gelöst in DMSO) dem Medium der Experimentgruppe hinzugefügt, wogegen die Kontrollgruppe lediglich die äquivalente Menge DMSO erhielt (1 μ l/ml Medium).

Das Kulturmedium setzte sich aus Neurobasalmedium (ohne Phenylrot) mit 1% B27, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 0,5 mM L-Glutamin zusammen. Der pH-Wert des Inkubationsmediums wurde bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt. Zur Titration wurden 1 M NaOH beziehungsweise 1 M HCl verwendet. Zur Vermeidung einer Kontamination der Kulturmedien wurde besonders auf das Einhalten von sterilen Bedingungen geachtet. Das beschriebene Vorgehen orientierte sich an der Methodik von Stoppini (Stoppini et al., 1991).

2.3.2 Nachweis einer Aromatase-Funktion in den Gewebekulturen

Um die Anwesenheit einer funktionellen Aromatase in den Gewebekulturen zu verifizieren, wurde ein Nachweis der Letrozol-Wirkung *in vitro* im Institut für Neuroanatomie mithilfe eines kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay der Fa. DIA Source (E2-RIA-CT KIP062) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zu ausgewählten Kulturen Testosteron (10^{-7} M) zugegeben, um die Aromataseaktivität zu stimulieren, da sonst die Menge des gebildeten E2 für einen Nachweis zu gering gewesen wäre. Diese Behandlung wurde über 7 Tage durchgeführt und jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt bzw. gesammelt. Das Medium wurde danach unter Zuhilfenahme einer Vakuumpumpe über C18-Säulen der Fa. Macherey-Nagel konzentriert und davon 50 μ l für die E2-Bestimmung eingesetzt (siehe Bender et al., 2017 für weitere Details). Es wurden pro Geschlecht und Experimentiergruppe 4 Proben für die Analyse eingesetzt.

Die Präparation und Kultivierung der Gewebekulturen, sowie die Bestimmung der Aromatasefunktion, wurden von Mitarbeitern des Instituts für

Neuroanatomie durchgeführt. Meine Aufgabe bestand in der weiteren Bearbeitung der Kulturen für Elektronenmikroskopie und deren Auswertung.

2.3.3 Fixierung der Gewebekulturen

Am 14. Tag der Kultivierung wurden die Kulturen für Immunhistochemie oder Elektronenmikroskopie fixiert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit 0,1 M PB und einmal mit PBS gespült. Danach wurden die Kulturen entweder mit 2,5% Glutaraldehyd (für Elektronenmikroskopie) oder mit 4% PFA (für Immunhistochemie) für ca. 4 h inkubiert. Für Immunhistochemie erfolgte nun eine Kryoprotektion (für 2 h in 25% Saccharose/PBS), der anschließende Transport der Kulturen auf Glasplättchen und deren Einfrieren auf Trockeneis. Für die Elektronenmikroskopie wurden die Kulturen behandelt wie in 2.2.4 und 2.2.5 angegeben.

2.4. Datenauswertung

2.4.1 Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder

Für die Auswertung wurden die Bilder für den Untersucher verblindet und die korrespondierenden Abschnitte aus der BLA verglichen. Dabei wurden auf dem ersten Bild (Referenzbild) Synapsen markiert und mit dem nachfolgenden Bild (Vergleichsbild) verglichen. Es wurden nur die Synapsen gezählt, welche auf dem Referenzbild eindeutig als Synapse definiert wurden, auf dem Vergleichsbild jedoch nicht mehr den Anforderungskriterien entsprachen. Analog dazu wurden dann die erkennbaren Synapsen des Vergleichsbildes, die nicht im Referenzbild darzustellen waren, in die Auswertung aufgenommen. Durch Auflage einer Klarsichtfolie mit einem aufgezeichneten Quadrat von 16x16 cm wurde der Bereich mit den meisten Synapsen markiert und gezählt. Das Quadrat entsprach in der Vergrößerung einer Fläche von 64 μm^2 . Das Disektorvolumen wurde berechnet, indem die Einheitsfläche der Referenz mit dem Abstand (0,1 μm) zwischen Referenz- und Vergleichsbild multipliziert wurde. Das untersuchte Volumen betrug dementsprechend

6,4 μm^3 . Mindestens 10 Bildpaare wurden pro Gewebeprobe analysiert, und die Daten im Anschluss mittels *Student's t*-Test ausgewertet.

2.4.2 Auswertung immunhistochemischer Bilder

Um die ungefähre Dichte AROM- exprimierender Zellen in der BLA zu bestimmen, wurden in immunfluoreszenz-gefärbten Schnitten von juvenilen Ratten Ausschnitte aus dem basolateralen Kern (BL) und dem lateralen Kern (La) mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops zufällig ausgewählt und in 400x Vergrößerung fotografiert. Jeweils 2 repräsentative Aufnahmen aus BL und La wurden pro Tier ausgewertet, indem darin das Verhältnis von AROM- positiven Somata zu DAPI- positiven Nuklei bestimmt wurde (siehe Abb. 4). Dabei wurden nur Zellen mit einem Nukleus $\geq 5 \mu\text{m}$ als Neurone beurteilt. Aus den beiden Aufnahmen wurde ein repräsentativer Wert (% AROM-positiver Neuronen) pro Ratte ermittelt, und die Werte (n=4 pro Geschlecht) statistisch mit dem *Mann-Whitney U*-Test analysiert.

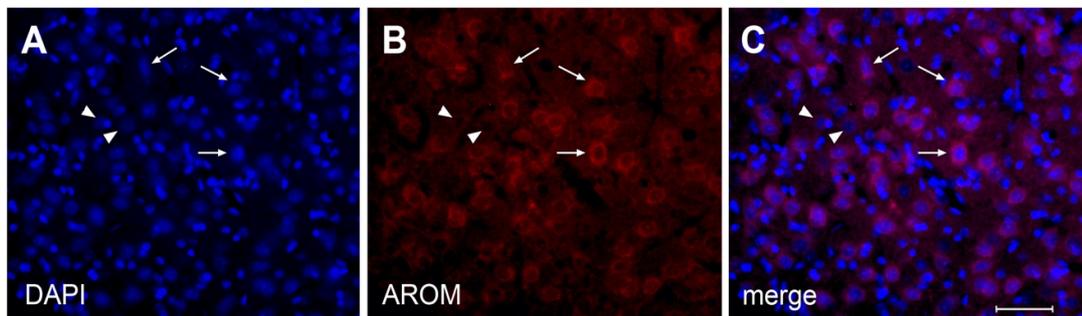


Abbildung 4. Illustration der Dichtebestimmung AROM-exprimierender Neurone in der BLA. Repräsentative Aufnahmen aus BL und La wurden wie folgt ausgewertet: zuerst wurde die Anzahl AROM-immunpositiver Zellen im Bildausschnitt bestimmt (**B**; exemplarische Zellen sind mit einem Pfeil markiert). Danach wurde in der DAPI-Färbung (**A**) die Anzahl der Neuron-typischen Zellkerne bestimmt, die durch ihre Größe ($\varnothing \geq 5 \mu\text{m}$) und Färbungsintensität (wenig intensiv) gut von den Zellkernen von Gliazellen ($\varnothing < 5 \mu\text{m}$, intensive DAPI-Färbung) zu unterscheiden waren. Abschließend wurde der prozentuale Anteil AROM-positiver Neurone (Pfeile) an der Gesamtneuronenzahl bestimmt und die Auswertung am überschichteten DAPI/AROM-Bild (**C**) überprüft. Nicht AROM-positiv Neurone sind exemplarisch mit Pfeilköpfen markiert. Skala: 20 μm .

2.4.3 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (*Standard Error of the Mean* = SEM) dargestellt. Ein p -Wert von $<0,05$ gilt als signifikant. Die statistische Analyse erfolgte durch *Student's t*-Tests für die Daten der Elektronenmikroskopie und der E2-Bestimmungen durch *Mann-Whitney U*-Tests für die Auswertung der Dichte AROM-exprimierender Zellen im BLA. Eine Prism Software (GraphPad) wurde für statistische Analysen eingesetzt.

2.5 Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Aluminiumfolie	LAGER UKE
Axiophot-Fluoreszenzmikroskop	LEICA
Brutschrank WTC	BINDER
Cutfix Surgical Disposable Scalpel	BRAUN
Chromabond C18ec	MACHEREY-NAGEL
Deckgläser 21x26 mm	MARIENFELD
Elektronenmikroskop MC-100	PHILIPS
Einmalkanülen	BRAUN
Einmalspritzen, verschiedene Größen	BRAUN
Einmalhandschuhe, verschiedene Größen	KIMBERLY-CLARK
EPON 820	SERVA
Gefrierschrank, -25°C	LIEBHERR
Heidemannspatel	AESCULAP
Instrumentenkasten	MERCK
Kosmetiktücher Samtess	WEPA
Kühlschrank, 4°C	BOSCH
Lampe	HANALUX
Lichtmikroskop Axiovert 25	ZEISS
Microsoft Word/Excel 2000 (Software)	MICROSOFT
Pinzette nach Dumont	MERCK
Pipetten 2,20,100 und 1000 µl	EPPENDORF AG
Pipettenspitzen	EPPENDORF AG
Plastikröhrchen (<i>Falcon-Tubes</i>)	EPPENDORF AG
Prism Software	GRAPHPAD
Radioimmunassay–Kit, (RIA)	E2-RIA-CT KIP0629, DIA SOURCE
Reaktionsgefäße, diverse Größen	EPPENDORF AG
Semidünnschnittgerät	LEICA
Sicherheitswerkbank Klasse 2	HERAEUS
Stereolupe	ZEISS

Tissue Chopper	H.SAUER
Ultramikrotom mit Diamantmesser	REICHERT JUNG
6-Wellplatte	NUNC BRAND
Zellstofftücher	WEPA

2.5.1 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien:

2% 2,4,6,- Tris(dimethylaminomethyl)phenol	SERVA
35-100% Ethanol	UKE HAMBURG
2,5-6% Glutardialdehyd in 0,05 M Phosphatpuffer (PB)	MERCK
1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit Saccharose	ROTH
4',6'-Diamino-2-Phenylindol- Dihydrochlorid, DAPI	SIGMA
Aqua dest.	BAXTER
B27 Supplement	THERMO-FISHER-SCIENTIFIC
Bleizitrat	MERCK
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA
L-Glutamin	SIGMA-ALDRICH
Glycidether 100	SERVA
HCl 1 M	MERCK
Letrozol	NOVARTIS
NaOH 1 M	MERCK
PBS (<i>Phosphat buffered saline</i>)	MERCK
PFA (Paraformaldehyd)	MERCK
Penicillin/Streptomycin	THERMO-FISHER-SCIENTIFIC
Propylenoxid	SERVA
Propylenoxid/Glycidether- Gebrauchslösung (Verhältnis 1:1/1:3)	SERVA

Saccharose	MERCK
Testosteron	MERCK
Toluidinblau	MERCK
Uranylacetat 0,1%	MERCK
Xylazin	BAYER

2.5.2 Verwendete Antikörper

2.5.2.1 Primärantikörper

Hase (rabbit) polyclonal Anti-Aromatase
1:1200; gerichtet gegen Aminosäuren 488 – 502 der Maus-Aromatase
(Yague et al., 2006) RRID:AB_2631184

Maus (mouse) monoclonal Anti-Aromatase
1:50; gerichtet gegen Aminosäuren 376 –390 der humanen Aromatase
Acris Antibodies GmbH, Cat# SM2222P, RRID: AB_973001

Maus (mouse) monoclonal Anti-Parvalbumin:
Parv; 1:7000
Swant, Marly, Switzerland, Cat# 235, RRID:AB_10000343

Hase (rabbit) polyclonal Anti-Calbindin D28K Antikörper
Calb; 1:2000
Merck Millipore, Billerica, MA, USA, Cat# AB1778, RRID:AB_2068336

Maus (mouse) monoclonal Anti-Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II
CaMKII; 1:1000
Abcam, Cambridge, UK, Cat# ab52476, RRID:AB_868641

Maus (mouse) Anti-Glial fibrillary acidic protein
GFAP, 1:700
Sigma-Aldrich, Cat# G3893, RRID:AB_477010

2.5.2.2 Sekundärantikörper

Ziegen (goat) Anti-rabbit-IgG, gekoppelt mit Biotin
1:250
Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, Cat# BA-1000, RRID:AB_2313606

Ziegen (goat) Anti-rabbit- IgG gekoppelt mit Alexa Fluor 568
1:500
Molecular Probes, Cat# A-11011, RRID:AB_143157

Ziegen (goat) Anti-mouse-IgG, gekoppelt mit Alexa Fluor 488
1:500
Molecular Probes, Cat# A-11029, RRID:AB_138404

2.5.2.3 Nachweis-Kits

Avidin	Biotin	Peroxidase Complex
ABC	Kit; Verdünnung nach Angaben des Herstellers	
Vector Laboratories, Cat# PK	7100, RRID:AB_2336827	

2.5.3 Lösungen

Glycidether-Mischung:
Stammlösung A:
77ml Glycidether
125ml 2-Dodecanylsuccinic acid anhydride
Stammlösung B:
100ml Glycidether
89ml Methylnadic anhydride

Gebrauchslösung:**4 Teile Lösung A + 6 Teile Lösung B****plus 2% 2,4,6- Tris(dimethylaminomethyl)phenol****Glutaraldehyd (2,5%):****2,5% Glutardialdehyd in 0,05M Phosphatpuffer (PB)****pH = 7,4 bei RT****Ketamin-Xylazin-Mischung:****Ketamin 12 mg/ml, Xylazin 0,16% in Saline****Kulturmedium für Schnittkulturen:****50 ml Neurobasal A Medium ohne Phenolrot****500 µl B27****125 µl L-Glutamin (200 mM)****500 µl Penicillin/ Streptomycin****pH=7,4 bei RT; zur Titration wurden 1 M NaOH beziehungsweise 1 M HCl verwendet****Paraformaldehyd (4%):****4 g Paraformaldehyd – Pulver in 100 ml PBS****pH = 7,4 bei RT****0,1 M Phosphatpuffer (PB):****23 ml 0,5 M Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)****77 ml 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)****mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen; pH = 7,4 bei RT**

Phosphat buffered saline (PBS):

0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)

0,2 g KCl

1 L Aqua dest.

1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

8 g NaCl

pH = 7,4 bei RT

Letrozolstammlösung:

160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4% DMSO in 0,9% NaCl

Kontrolllösung (Vehikel):

4% DMSO in 0,9% NaCl

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Aromatase in der basolateralen Amygdala (BLA) von Ratten

Die basolaterale Amygdala wird entwicklungsgeschichtlich als ein Abkömmling des Kortex angesehen (Swanson und Petrovich, 1998). Dies lässt die Annahme zu, dass Eigenschaften des Kortex, wie etwa eine substantielle AROM- Expression in Neuronen, auch in der BLA repräsentiert sein könnten. Um dies zu ermitteln, führte ich zuerst an fixierten Hirnschnitten von juvenilen Ratten (P20-24) eine immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen AROM durch. Dabei fand sich eine starke AROM-Immunreaktivität in der BLA und in der benachbarten CeA – hier insbesondere im lateralen Anteil (CeAl). Ein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Ratten war in diesem Versuch immunhistochemisch nicht zu erkennen (Abb. 5A und 5B).

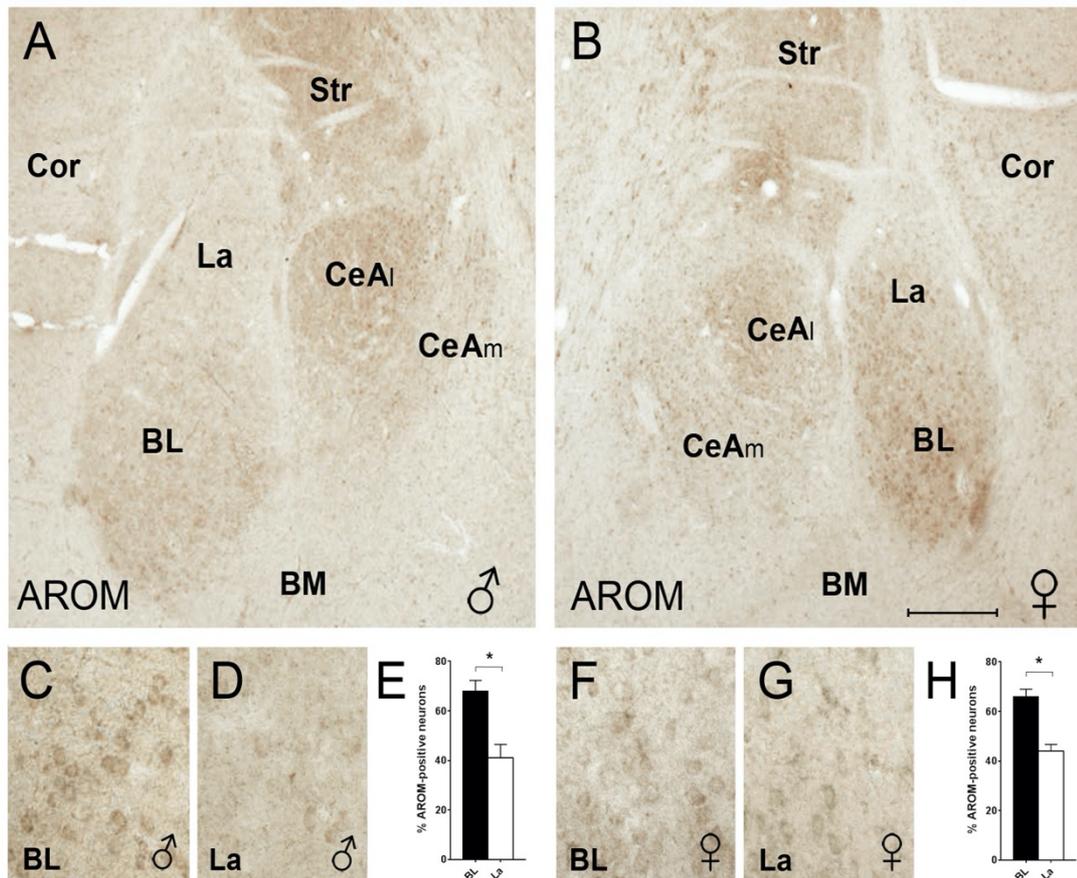


Abbildung 5. A-B, AROM-Expression in BLA und CeA von Ratten. **A, B,** AROM-Immunfärbungen von Schnitten einer juvenilen männlichen (**A**) und weiblichen (**B**) Ratte weisen eine besonders starke AROM-Expression in Teilbereichen der BLA und CeA auf, wobei die Immunreaktivität im basolateralen Kern der BLA (BL) und im lateralen Teil der CeA (CeAl) besonders intensiv erscheint.

C-H, Vergrößerte Ansichten der in Abbildung 5 A und B gezeigten Schnitte. Wurde die Dichte der AROM-exprimierenden Neurone nach der in 2.4.2 beschriebenen Methode bestimmt, so zeigte sich, dass innerhalb der BLA die Dichte an AROM-exprimierenden Zellen im BL (**C** und **F**) am höchsten ist ($68 \pm 4\%$ und $66 \pm 3\%$ aller Neurone in Männchen bzw. Weibchen). Sie war deutlich niedriger im La ($41 \pm 5\%$ bzw. $44 \pm 3\%$; **D** und **G**). Dabei waren keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen zu erkennen (vgl. **E** und **H**; $p=0,7$ und $p=0,6$ bei BL bzw. La). Abkürzungen: Cor: Kortex; Str: Striatum. Skala (in **B**): **A, B,** 200 μm ; **C-G,** 50 μm

Innerhalb der BLA war das AROM-Signal über die gesamte anterior-posteriore Ausdehnung zu beobachten, ohne eindeutige Unterschiede zwischen den vorderen und hinteren Teilbereichen. Allerdings exprimierten mehr Neuronen im BL als im La AROM (Männchen: $68 \pm 4\%$ in BL, $41 \pm 5\%$ in La; $p=0,02$; $n=4$; Abb. 5 C–E; Weibchen: $66 \pm 3\%$ in BL, $44 \pm 3\%$ in La; $p = 0,02$; $n = 4$; Abb. 5 F–H), wogegen praktisch gar keine Immunreaktion auf AROM im BM erkennbar war (Abb. 5 A, B).

3.2 Charakterisierung von Aromatase-exprimierenden Zellen im basolateralen Kern (BL) von Ratten

Um die AROM-exprimierenden Zellen im BL weiter zu charakterisieren, wurden bestimmte Zellpopulationen mit spezifischen Markern immunhistochemisch dargestellt: für glutamaterge Projektionsneurone wurde die für sie charakteristische Expression von Ca^{2+} -Calmodulin-abhängiger Kinase II (CaMKII; McDonald et al., 2002) zur Identifizierung benutzt. Eine wichtige Population GABAerger Interneurone (Korbzellen = *basket cells*) wurde mithilfe des Ca^{2+} -bindenden Proteins Parvalbumin (Parv) dargestellt, und für die Markierung von Astrozyten wurde ein saures Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) verwendet. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der CaMKII-immunpositiven Projektionsneurone (Abb. 6 A-C) AROM co-exprimierten. Daneben zeigten nahezu alle Parv-positiven Korbzellen (Abb. 6 D-F, Pfeile) eine positive Immunantwort. Keine oder nur eine sehr schwache AROM-Expression war hingegen in Astrozyten zu erkennen (Abb. 6 G-I).

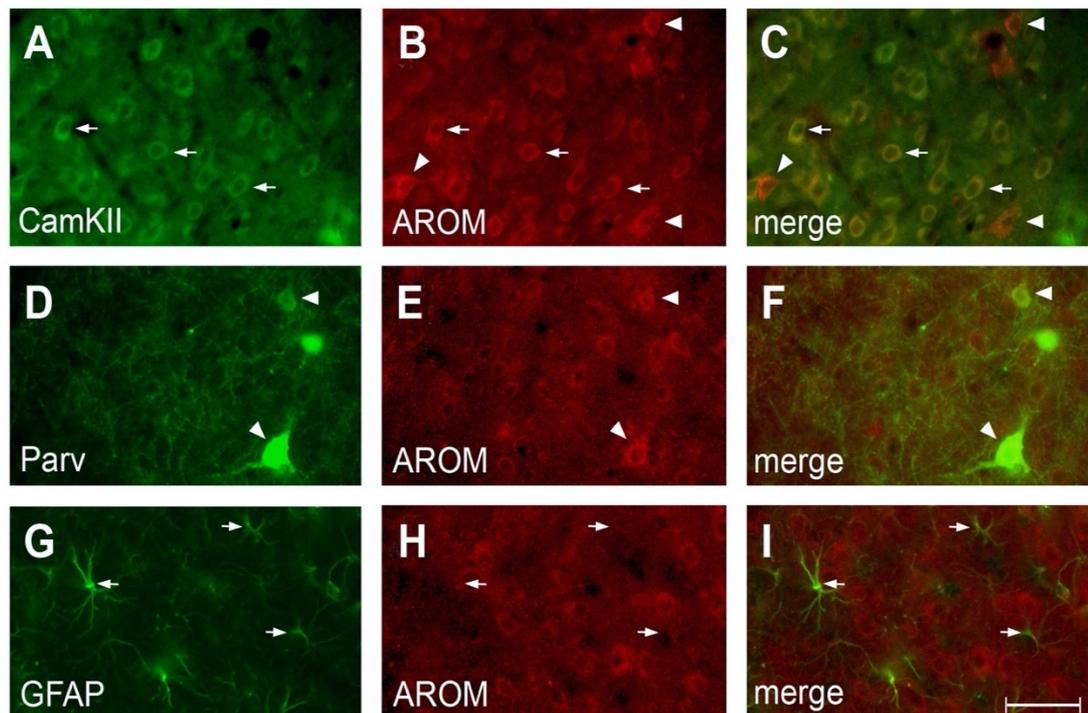


Abbildung 6. A-C, Doppel-Immunfärbung von AROM (rot) und CaMKII (grün) weist darauf hin, dass die AROM-Expression bei CaMKII-positiven Projektionsneuronen im BL (Pfeile) häufig auftritt. Allerdings lässt das Auftreten von Neuronen mit starker Immunreaktion auf AROM ohne CaMKII-Signal (Pfeile) darauf schließen, dass AROM-Expression auch in Interneuronen stattfindet. D-F, Diese Interneuronen beinhalten die Parv-exprimierende Population an Interneuronen, in denen AROM regelmäßig co-exprimiert wurde (Pfeile). G-I, Im Gegensatz dazu war kein oder nur ein schwaches AROM-Signal in GFAP-immunopositiven Astrogliazellen zu finden (Pfeile). Skala (in I): 25 µm.

3.3 Aromatase-Inhibition reduziert die Dichte von Spinesynapsen im BL adulter Mäuse geschlechtsspezifisch in vivo

Im Hippokampus wurde gezeigt, dass AROM-Aktivität geschlechtsspezifisch Einfluss auf die Dichte von exzitatorischen Synapsen auf dendritischen Dornfortsätzen (= *Spinesynapsen*) nimmt (Kretz et al., 2004; Hojo et al., 2008; Bender et al., 2010; Zhou et al., 2010; Vierk et al., 2012). Die BLA ist ebenfalls eine "kortikale" Struktur (Swanson und Petrovich, 1998), die, wie oben gezeigt, AROM stark exprimiert. Somit untersuchte ich im nächsten Schritt die Hypothese, dass das Enzym hier eine ähnliche Rolle wie im Hippokampus spielt.

Für diese Untersuchung wurde adulten Mäusen - nach Geschlecht getrennt - für sieben Tage der Aromataseinhibitor Letrozol intraperitoneal injiziert. Diese

systemische Gabe von Letrozol reduzierte den E2-Serumspiegel um ca. 30% (siehe dazu: Bender et al., 2017).

Zunächst wurde jedoch überprüft, ob das Expressionsmuster in adulten Mäusen dasselbe ist wie in juvenilen Ratten. Tatsächlich wurde in weiblichen und männlichen Mäusen - wie zuvor in den Ratten (Abb. 5) – eine starke Expression in der BLA (bevorzugt BL) und in der CeA (bevorzugt CeAI) gefunden (Abb. 7A und B). Mithilfe der anatomischen Landmarken „*Capsula externa*“ (e.c.) und „*Capsula intermedia*“ (i.c., Abb. 7C) wurde in Semidünnschnitten dann die Lage des BL identifiziert und dieser für eine elektronenmikroskopische Analyse der Spinesynapsendichte verwendet. Diese war nach Letrozolgabe in weiblichen Mäusen signifikant reduziert (Abb. 7D-F), nicht jedoch in männlichen Mäusen (Abb. 7F). Dies entspricht analogen Befunden im Hippokampus (Vierk et al., 2012) und bestätigt die oben formulierte Hypothese, dass AROM in der BLA eine vergleichbare Funktion wie in anderen Kortexarealen (z. B. dem Hippokampus) besitzt. Interessanterweise lag im BL männlicher Mäuse die Dichte der Spinesynapsen unter Kontrollbedingungen bereits auf dem Niveau von mit Letrozol behandelten Weibchen (Abb. 7F).

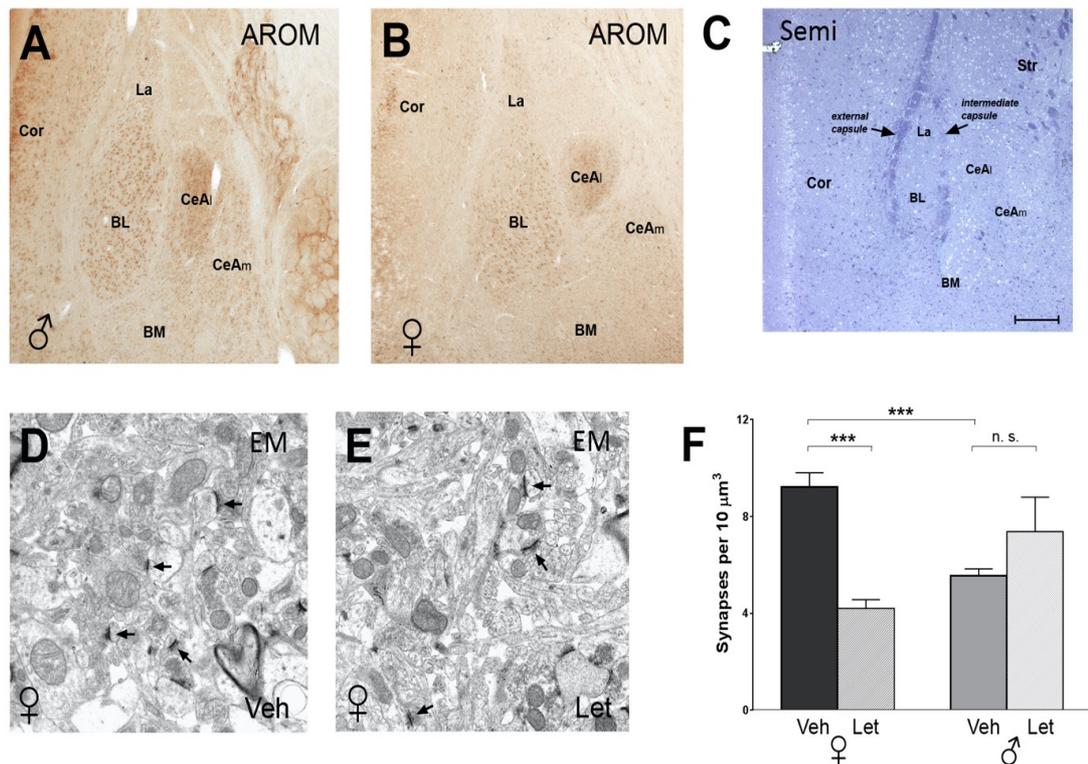


Abbildung 7. Verminderte Spinesynapsendichte im BL adulter Mäuse nach Letrozolbehandlung **A, B**, Koronale Schnitte durch die vordere Amygdala einer jungen adulten männlichen (**A**) und weiblichen (**B**) Maus zeigen, dass wie bei juvenilen Ratten die Expression von AROM in der BL stärker ausgeprägt ist als im La, wogegen sie in der BM praktisch nicht nachweisbar ist. Ähnlich ist die AROM-Immunreaktion im CeAl, aber nicht im CeAm der zentralen Amygdala extrem intensiv. **C**, Identifikation der BLA im Semidünnschnitt. Die deutlich erkennbaren Faserbündel der *Capsulae externa* und *intermedia* (durch Pfeile markiert), welche die BLA umschließen, dienen zur Orientierung für die Auswahl der Region für die Elektronenmikroskopie. **D, E**, Repräsentative Aufnahmen elektronenmikroskopischer Bilder aus dem BL einer mit Vehikel (Veh) (**D**) und mit Letrozol (Let) (**E**) behandelten weiblichen Maus. Man beachte, dass Spinesynapsen in beiden Bildern zur Darstellung kommen (Pfeile), die Dichte in den Schnitten der mit Letrozol behandelten Maus jedoch geringer ist. **F**, Quantitative Analyse von Spinesynapsen nach Behandlung mit Vehikel (Veh) oder Letrozol (Let). Letrozol verursachte einen erheblichen Rückgang der Spinesynapsendichte in weiblichen Mäusen (Veh, $9,2 \pm 0,6$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; Let, $4,2 \pm 0,4$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; $p=0,001$; $n=6$ jede Behandlung), jedoch nicht bei den Männchen (Veh, $5,6 \pm 0,3$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; Let, $7,4 \pm 1,4$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; $p=0,22$; $n=6$ jede Behandlung). Insbesondere war bei Männchen die Dichte der Spinesynapsen unter Kontrollbedingungen erheblich geringer als bei Weibchen ($p<0,001$). Cor: Kortex. Skala (in **C**): **A-C**, 200 μm ; **D, E**, 1 μm

3.4 Aromatase-Inhibition reduziert die Dichte von Spinesynapsen in der BLA geschlechtsspezifisch in vitro (organotypische Gewebekultur)

Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen eine geschlechtsspezifische Regulierung der Dichte von Spinesynapsen in der BLA durch AROM vermuten. Allerdings lässt eine systemische Anwendung von Letrozol keine

Unterscheidung zwischen den Auswirkungen einer peripheren (z.B. in Ovarien, Knochen, Fettgewebe) und einer lokalen (in Zellen der Amygdala erfolgten) Inhibition der Aromatase zu. Um diese Frage zu untersuchen, wurden BLA enthaltende organotypische Gewebekulturen verwendet, als Modell zur Untersuchung von Hirngewebe *in vitro*, in dem sich externe Faktoren streng kontrollieren lassen (Gähwiler 1981; Stoppini et al., 1991). Eine Kultivierung von Amygdala-Gewebe war zuvor jedoch noch nicht durchgeführt worden und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals unternommen. In den Vorversuchen zeigte sich, dass isoliertes Amygdalagewebe *in vitro* nicht lange am Leben gehalten werden kann, dass die Vitalität jedoch stark ansteigt, wenn benachbartes Kortex- und Striatumgewebe erhalten bleibt. Kombinierte kortiko-striatal-amygdaläre Kulturen konnten über den Zeitraum von bis zu 2 Wochen ohne größere Vitalitätseinbuße kultiviert werden.

Dazu musste jedoch die Anlage der Gewebekulturen bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (in der Regel am postnatalen Tag 3, P3) erfolgen. Zu Beginn der Untersuchung wurde auch hier mittels Immunhistochemie die Verwendbarkeit der Kulturen für die vorgesehenen Experimente überprüft. Dazu wurde untersucht, ob die für die Orientierung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen des BLA essentiellen anatomischen Landmarken „*Capsula externa*“ und „*Capsula intermedia*“ auch im Gewebeschnitt erkennbar waren. Dies war tatsächlich häufig der Fall, wie die Abbildungen 8 E-G zeigen (siehe im Vergleich dazu die Situation in einer altersäquivalenten Ratte in Abb. 8 I-K).

Weiterhin wurde durch den Einsatz eines Antikörpers gegen das Ca²⁺-bindende Protein Calbindin, das in der BLA charakteristisch exprimiert wird, der Entwicklungsstand der Gewebekultur im Vergleich zu einer altersäquivalenten Ratte untersucht. Hier wurde gefunden, dass Calbindin auch in der Gewebekultur in der BLA exprimiert wird (Abb. 8 E und F), jedoch deutlich schwächer als *in vivo* (Abb. 8 I und J). Dies lässt auf eine verzögerte Differenzierung der BLA in der Gewebekultur schließen. Dies wird auch durch den Befund unterstützt, dass die Dichte der elektronenmikroskopisch

bestimmten Spinesynapsen in der BLA nach 14 Tagen *in vitro* deutlich geringer war als in einer altersäquivalenten Ratte (P17) *in vivo* (vergleiche Abb. 8 C und D bzw. H und L).

Zum Nachweis der Verwendbarkeit der Gewebekulturen musste weiterhin gezeigt werden, dass Aromatase in den Kulturen aktiv ist. Dazu wurde bei einigen Kulturen das Medium Testosteron (10^{-7} M) zugesetzt, welches die AROM-Aktivität stimuliert. Durch E2-Messung im Medium der Kulturen wurde nachfolgend gezeigt, dass die Gabe von Letrozol den Testosteron-Umsatz zu E2 drastisch reduziert (Abb. 8B), was die Anwesenheit einer aktiven Aromatase im Gewebe belegt.

Auf dieser Grundlage wurde die Wirkung von Letrozol auf die Spinesynapsendichte in der BLA *in vitro* analysiert. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie *in vivo*. AROM-Inhibition führte zu einer signifikanten Abnahme der Spinesynapsen, wenn die Kulturen von weiblichen Ratten stammten, nicht jedoch, wenn sie von männlichen stammten (Abb. 8C). Interessanterweise war – wie *in vivo* – die Synapsendichte bereits im unbehandelten männlichen Gewebe im Vergleich zum weiblichen deutlich reduziert, und etwa auf dem Stand der Dichte in weiblichen Kulturen nach Letrozolgabe (Abb. 8C).

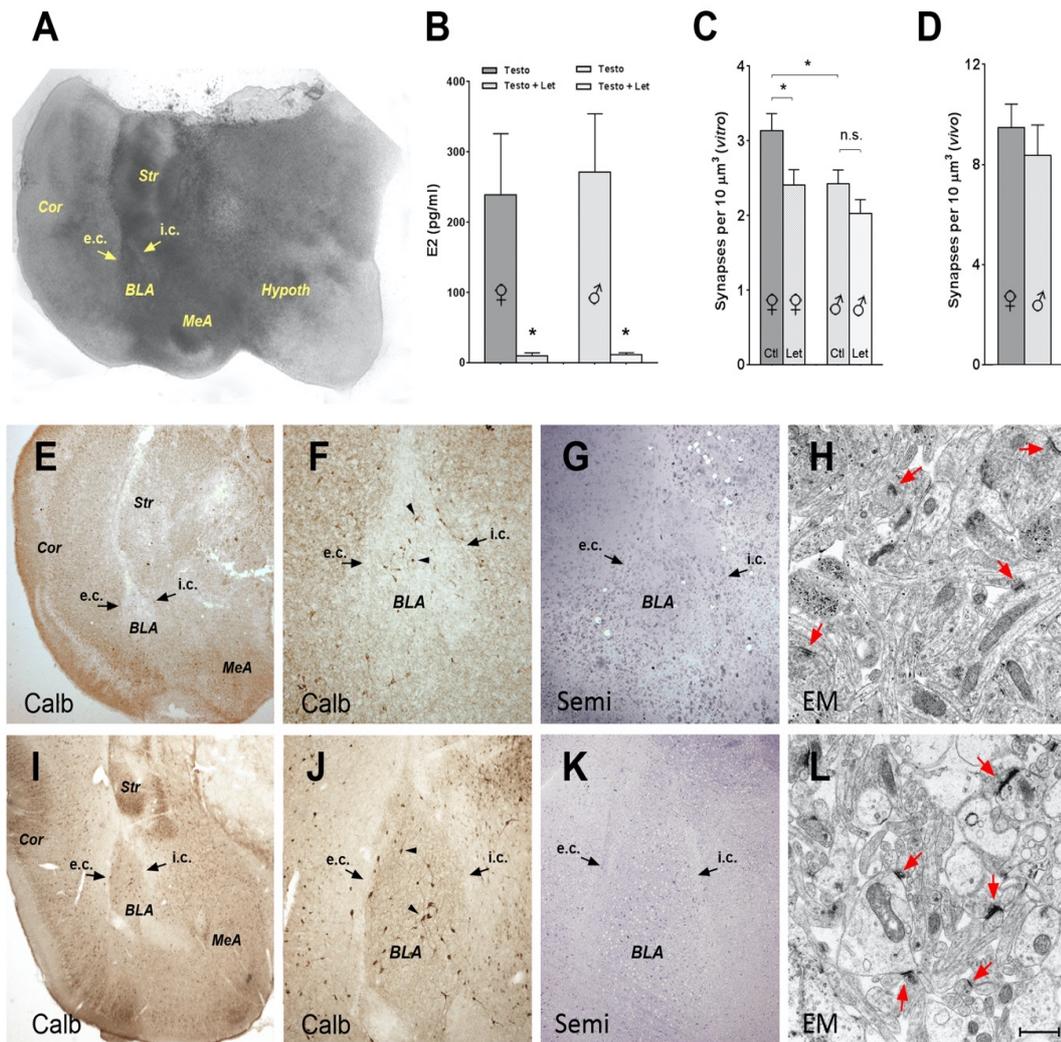


Abbildung 8. Verminderte Dichte der Spinesynapsen im BL kortiko-striatal-amygdalärer Schnittkulturen von neonatalen Ratten. **A**, Repräsentative organotypische, kortiko-striatal-amygdaläre Schnittkultur nach DIV14: die BLA, die eingebettet zwischen die Capsulae externa (e.c.) und intermedia (i.c.), ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Neben der Amygdala und dem Kortex (Cor) sind auch Teile des Striatum (Str) und des Hypothalamus (Hypothal) in der Kultur erkennbar. **B**, AROM ist *in vitro* aktiv, da dem Kulturmedium hinzugegebenes Testosteron (Testo; 10^{-7} M) sowohl in männlichen (271 ± 83 pg/ml) als auch in weiblichen (239 ± 87 pg/ml) Kulturen gleichermaßen in E2 umgewandelt wurde. Die gleichzeitige Gabe von Letrozol (Let; 10^{-7} M) resultierte in einem drastischen Rückgang der Konversion von Testosteron zu E2 in Kulturen beider Geschlechter, welches eine wirksame AROM-Inhibition demonstriert. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht feststellbar (Testo+Let, 10 ± 4 pg/ml in weiblichen Kulturen; $p=0,04$ im Vergleich zu Testo; 11 ± 3 pg/ml in männlichen Kulturen, $p=0,02$; $n=4$, pro experimenteller Behandlung und Geschlecht). **C-D**, Quantitative Analysen der Spinesynapsendichte in der BLA von P17-Ratten (**D**) und in DIV14 kortiko-striatal-amygdalären Kulturen (**C**), die 7 Tage lang (DIV7->DIV14) mit entweder Letrozol (Let, 10^{-7} M) oder Vehikel (Ctl) inkubiert wurden. Man beachte, dass wie bei adulten Mäusen durch Letrozol eine erhebliche Minderung der Spinesynapsendichte in der BLA von weiblichen Kulturen verursacht wurde (Ctl: $3,1 \pm 0,2$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; Let: $2,4 \pm 0,2$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; $p = 0,02$; $n = 15$ Kulturen in jeder Gruppe), aber nicht in männlichen Kulturen (Ctl: $2,4 \pm 0,2$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; Let: $2,0 \pm 0,2$ Synapsen/ $10 \mu\text{m}^3$; $p=0,14$; $n=11$ Kulturen in jeder Gruppe).

Ebenso war wie bei adulten Mäusen die Dichte der Spinesynapsen unter Kontrollbedingungen in der männlichen BLA erheblich niedriger als in der weiblichen. **E–L**, Vergleich der BLA einer kortiko-striatal-amygdalären (DIV14) Schnittkultur (*in vitro*, **E–H**) und in einer altersäquivalenten (P17) Ratte (*in vivo*, **I–L**): **E, F, I, J**, Das Expressionsmuster von Calbindin (Calb) *in vitro* (**E, F**) reproduziert das Muster *in vivo* (**I, J**). Allerdings ist die Anzahl Calb-exprimierender Neuronen in der BLA der Kulturen geringer, die Somata sind kleiner, und Neuriten erscheinen weniger entwickelt, was darauf hinweist, dass die Differenzierung innerhalb der Kulturen beeinträchtigt ist (**F und J** sind jeweils Vergrößerungen von **E und I**). **G, K**, Semidünne Schnitte zeigen, dass die BLA *in vitro* identifizierbar ist (**G**), da Überreste der *Capsula externa* (e.c.) und *intermedia* (i.c.) erhalten bleiben (**G, K**, Pfeile). **H, L**, Spinesynapsen (rote Pfeile) werden in der BLA *in vitro* gebildet (**H**), die Synapsendichte ist jedoch geringer als im Schnitt einer P17-Ratte. Skala (in **L**): **A, E, I** 500 µm; **F, G, J, K** 100 µm; **H, L**, 1 µm

4. Diskussion

4.1 Geschlechtsspezifische Regulation der Synapsendichte in der BLA durch Aromatase

In dieser Dissertation untersuchte ich die Folgen einer Inhibition des E2-synthetisierenden Enzyms Aromatase (AROM) auf die synaptische Plastizität in der Amygdala. Verwendet wurde ein *in vivo*- (systemische Injektion von Letrozol in Mäuse) und ein *in vitro*-Ansatz (Letrozolgabe zu organotypischen Gewebekulturen). Von mir untersucht wurde speziell der Effekt von Letrozol auf die Dichte von Spinesynapsen in der basolateralen Amygdala (BLA), der wichtigsten sensorischen Eingangsregion der Amygdala (Olucha-Bordonau et al., 2014), die als entwicklungsgeschichtlicher Abkömmling des Kortex angesehen wird (Swanson und Petrovich, 1998). Tatsächlich ähneln die Zytoarchitektur und die Synapsenorganisation der BLA stark der des Neokortex und des Hippokampus (McDonald, 1992; Smith et al., 1998; Kemppainen und Pitkänen, 2000) und die Neurone der BLA zeigen in vieler Hinsicht aus dem Kortex bekannte physiologische Eigenschaften (Pape und Pare, 2010). Ich untersuchte daher in dieser Arbeit die Hypothese, dass auch die Regulation der Spinesynapsendichte in der BLA durch Sexualhormone, bzw. durch endogen produzierte Sexualneurosteroiden, ähnlich sein könnte wie im Hippokampus. Dort wurde gezeigt, dass die Inhibition der Aromatase sowohl die Dichte von Spinesynapsen, als auch die LTP geschlechtsspezifisch beeinflusst (Vierk et al., 2012). Die hier vorgestellten Daten bestätigen die Hypothese und die wichtigsten Befunde sind hier nochmals zusammengefasst:

- 1) AROM wird im BL wie im Hippokampus (Bender et al., 2010; Fester et al., 2011) in glutamatergen Neuronen und in einigen Interneuronen exprimiert. Keine signifikante Expression findet sich unter nicht-pathologischen Bedingungen in Astroglia (Abb. 5 und 6).
- 2) nach systemischer Letrozolgabe war die Spinesynapsendichte in der BLA von adulten weiblichen, nicht jedoch in der von männlichen Mäusen signifikant reduziert (Abb. 7).

3) Analog dazu bewirkte eine Inkubation mit Letrozol eine Reduktion der Spinesynapsen in der BLA in Gewebekulturen von neonatalen Ratten, wenn diese von Weibchen stammten, nicht jedoch von Männchen (Abb. 8).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der neuronalen Aromatase in kortikalem Gewebe eine Funktion bei der Regulation der Synapsendichte zukommt, wobei jedoch offenbar ein Geschlechterdimorphismus gegeben zu sein scheint. Unterstützt werden diese Befunde durch die Ergebnisse einer begleitenden elektrophysiologischen Studie, die zeigte, dass nach Einwaschung von Letrozol in akuten Gewebeschnitten eine Langzeitpotenzierung (LTP) exzitatorischer Stimuli in der BLA massiv beeinträchtigt war, wenn die Schnitte von weiblichen Ratten stammten. Letrozol hatte jedoch keinen reduzierenden Effekt auf die LTP im BLA von Männchen (Bender et al., 2017).

4.2 Regulation der synaptischen Plastizität in der BLA durch Steroidhormone

Die Amygdala nimmt im Gehirn eine Schlüsselposition bei der Regulation unseres emotionalen Verhaltens und emotionalen Gedächtnisses ein. Ein wichtiger Teil davon ist die Furcht- und Angstreaktion (Le Deux, 2000). Bei dieser lebenswichtigen Funktion spielt die BLA als sensorische Eingangsstation, in der sensorische Wahrnehmungen aus allen Sinnesorganen kombiniert („assoziiert“) und auf potenzielle „Risiken“ überprüft werden, eine ganz wesentliche Rolle. Sie steht über verschiedene Efferenzen mit der „Ausgangsstation“, der CeA, in Verbindung, über die die Signale aus der BLA in adäquate vegetative und reflektorische Bewegungen umgesetzt werden. Außer mit den sensorischen Assoziationskortex steht die BLA auch noch mit dem präfrontalen Kortex und dem Hippokampus in enger Verbindung, über die das deklarative Kurz- und Langzeitgedächtnis auf die neuronale Informationsverarbeitung in der BLA Einfluss nehmen können.

Die neuronale Informationsverarbeitung in der BLA erfordert ausgeprägte Mechanismen der neuronalen Plastizität. In diesem Kontext ist es bemerkenswert, dass in der BLA ganz ähnliche Mechanismen aktiv sind, wie in Kortexarealen, d. h. Verknüpfungen von Sinnesreizen erfolgen nach der

Hebb'schen Regel („*Neurons that fire together, wire together*“; Hebb, 1949), u. a. unter Verwendung von NMDA-Rezeptor vermittelter LTP (Pape und Pare, 2010). Diese Mechanismen werden jedoch durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Dazu zählen insbesondere hormonelle Faktoren, wie beispielsweise Glukocorticoide bei Stress (Roozendaal et al., 2004), aber auch, wie hier gezeigt, Sexualhormone. Dies lässt darauf schließen, dass Reproduktionsphasen, wie der weibliche Zyklus, aber auch Altersveränderungen, wie die Abnahme des Östrogenspiegels nach der Menopause oder des Testosteronspiegels mit dem Alter, auf die Informationsverarbeitung in der BLA Einfluss nehmen können. Dies ist insbesondere unter dem Gesichtspunkt bemerkenswert, dass hinsichtlich der Inzidenz von Angsterkrankungen große Geschlechts- und Altersunterschiede auftreten (Milad et al., 2009; Zeidan et al., 2011; siehe auch 4. 5.).

4.3 Die Rolle der Aromatase bei der Regulation der synaptischen Plastizität in der BLA

Eine Besonderheit der hier untersuchten hormonellen Regulation besteht darin, dass es sich bei der Regulation durch die Aromatase nicht um einen peripheren Effekt handelt. Es ist schon länger bekannt, dass das E₂-synthetisierende Enzym AROM auch in Neuronen im Gehirn exprimiert wird (Naftolin und MacLusky, 1982). Besonders hohe AROM-Aktivitätswerte wurden in Gehirnregionen festgestellt, die mit reproduktiven, neuroendokrinen Funktionen assoziiert sind, wie im medialen basalen Hypothalamus, in Nuclei der Stria terminalis, oder in der medialen Amygdala (Roselli und Resko, 1987). Darüber hinaus wurde die Expression von AROM jedoch auch in Regionen beobachtet, die nicht direkt an der Regulierung des Fortpflanzungsverhaltens beteiligt sind, wie im Hippokampus (Wehrenberg et al., 2001; Hojo et al., 2004; Bender et al., 2010), im Neokortex (MacLusky et al., 1994; Yague et al., 2006, 2008), und, wie auch hier gezeigt, in der zentralen und basolateralen Amygdala (Sanghera et al., 1991; Wagner und Morrell, 1996; Horvath et al., 1997; Roselli et al., 1998; Zhao et al., 2007). Das deutet darauf hin, dass die Funktionen von AROM im Gehirn sich nicht auf die Fortpflanzung beschränken, sondern auch einen Einfluss auf die Gemütslage, das affektive Verhalten und die Gedächtnisbildung nehmen. Die Daten dieser

Arbeit unterstützen diese Sichtweise, indem sie zeigen, dass AROM wesentlich in Nuklei der Amygdala exprimiert wird, die unverzichtbar für diverse Formen von Emotion und emotionalem Gedächtnis sind (Beyeler et al., 2016), und zwar die basolateralen und zentralen Kerne der Amygdala. Wie frühere Untersuchungen nahelegen, wirkt das von AROM hier synthetisierte E2 lokal, über parakrine und autokrine Mechanismen (Prange-Kiel et al., 2003). Es kann somit nicht mehr als (endokrines) Hormon, sondern muss als lokal wirksames Neurosteroid angesehen werden.

Wofür könnte diese Regulation der synaptischen Plastizität durch lokal produziertes E2 von Bedeutung sein? Wie verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt haben, wird die neuronale Aromatase durch diverse externe Faktoren reguliert. Dazu zählen die peripheren Sexualhormone, die über den GnRH-Spiegel die Aktivität des Enzyms kontrollieren (Prange-Kiel et al., 2008). Dazu zählt aber auch neuronale Aktivität, die über Phosphorylierung der AROM die lokale Synthese von E2 hemmen oder steigern kann (Balthazart und Ball, 2006; Charlier et al., 2015; Fester et al., 2016). Die AROM stellt somit ein Enzym dar, an dem die an einem Neuron eintreffende Erregung und der hormonelle Status integriert werden. Über die darüber erfolgende Regulation der E2-Bildung können somit beide Faktoren Einfluss auf die synaptische Plastizität nehmen. Bemerkenswerterweise scheint dieser Mechanismus nur bei weiblichen Nagern eine Rolle zu spielen, da bei den Männchen die Inhibierung der AROM keinen entsprechenden Effekt hatte. Ähnliches wurde auch schon an anderer Stelle beobachtet. So wurde vor kurzem im Hippokampus eine Modulation des metabotropen Glutamaterezeptors (mGluR)- Signalwegs durch E2 beschrieben, die ebenfalls nur bei Weibchen zu beobachten war (Boulware et al., 2005; Huang und Woolley, 2012; Tabatadze et al., 2015). Es mehren sich jedoch Hinweise, dass bei Männchen andere Derivate des Sexualhormonstoffwechsels die Rolle des E2 übernehmen, z. B. Dihydrotestosteron (DHT; Harden und MacLusky, 2005; Simpson et al., 2005; Hajszan et al., 2008; Brandt et al., 2019). Es kann daher eine, vermutlich sehr früh in der Individualentwicklung auftretende, geschlechtsabhängige Prägung der Sexualhormon-Signalwege vermutet werden (McCarthy und Arnold, 2011; Chung und Auger, 2013; Meitzen et al., 2012, 2013).

4.4 Methodische Aspekte

Auch wenn die vorliegende Untersuchung klare Befunde erbrachte, müssen doch bei der Interpretation einige methodische Aspekte beachtet werden. So wurde der AROM-Inhibitor Letrozol systemisch und nicht lokal (d. h. in der Amygdala) appliziert, was eine Zuschreibung der beobachteten Effekte auf die Funktion der lokalen Aromatase erschwert. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde als zweiter Ansatz die organotypische Gewebekultur der Amygdala gewählt, da in diesem *in vitro*-Modell die Wirkung peripherer Hormone ausgeschlossen werden kann. Allerdings muss gesagt werden, dass organotypische Kulturen nur mit Gewebe aus frühen Entwicklungsstadien gelingen und die Interpretation dadurch auf diese Stadien eingeschränkt ist. Darüber hinaus lassen sich in organotypischen Gewebekulturen Differenzierungsdefizite nicht komplett vermeiden (Drakew et al., 1999). Dies ist insofern problematisch, da gerade die reifen Lebensstadien, z. B. nachdem bei Weibchen der Zyklus eingesetzt hat, für derartige Untersuchungen die interessantesten sind. In unseren Experimenten wurde der weibliche Zyklus nicht durch Ovariectomie unterbunden, da dadurch wiederum die Hypothalamus–Hypophysen-Achse de-reguliert würde, die ihrerseits essentiell die Aromatase-Aktivität beeinflusst (Prange-Kiel et al., 2008).

Weiterhin erschweren die potenziellen Auswirkungen des weiblichen Östruszyklus (Woolley und McEwen, 1992) einen Vergleich der AROM-Inhibition bei adulten Männchen und Weibchen *in vivo*, da der E2-Gehalt in weiblichem Hirngewebe im Verlauf des Östruszyklus schwankt (Kato et al., 2013) und durch GnRH reguliert wird (Prange-Kiel et al., 2008). Dagegen gab es in organotypischen Hippokampuskulturen männlicher und weiblicher Ratten keinen Unterschied in der E2-Synthese (Fester et al., 2011). Eine Lösung dieses Dilemmas bzw. eine weitere Bestätigung der erhobenen Befunde, könnte durch eine direkte Applikation des Inhibitors in die Amygdala erfolgen. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Studie aus technischen Gründen nicht verfolgt, ist aber Gegenstand für zukünftige Arbeiten. In diesem Zusammenhang sind auch analoge Experimente mit Inhibitoren der DHT-Synthese geplant, um zu untersuchen, ob dieses Hormon ähnliche Effekte wie E2 bei Männchen hervorruft.

4.5 Klinische Bedeutung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass AROM wesentlich in Teilen der Amygdala, insbesondere im basolateralen (BL) und zentralen (CeAl) Kern, exprimiert wird, welche unverzichtbar für diverse Formen von Emotion und emotionalem Gedächtnis sind (Beyeler et al., 2016). Es zeigte sich, dass AROM an der Regulierung der synaptischen Plastizität beteiligt ist, da die Spinesynapsendichte und die Synapseneigenschaften im BLA reduziert und verändert wurden, wenn die von AROM herbeigeführte E2-Produktion durch Letrozol gehemmt wurde. Allerdings waren die beobachteten Auswirkungen stark geschlechtsabhängig: wo in weiblichem BLA die Anwendung von Letrozol eine Reduktion der Spinesynapsen herbeiführte, blieben die Synapsen in männlichem BLA unverändert. Somit erscheint es notwendig, eine Untersuchung beider Geschlechter vorzunehmen, um die Mechanismen im Furcht- und Angstverhalten, sowie schwerer mentaler Erkrankungen wie Depression, Angststörungen, Schizophrenie und Demenz vollständig zu verstehen, da sich geschlechtsspezifische Unterschiede bei Hormonsignalen als geschlechtsspezifische Unterschiede bei assoziativem Lernen und emotionalen Reaktionen ausdrücken könnten. Substanzielle Belege für derartige Unterschiede existieren wie folgt: Die Inzidenz für o.g. Erkrankungen liegt bei Frauen signifikant höher als bei Männern (Weinstock, 1999; Zandi et al., 2002; Huber et al., 2004; Grigoriadis und Robinson, 2007; Frick et al., 2011), so treten beispielsweise Angstsyndrome bei Frauen doppelt so häufig auf (Kinrys und Wygant, 2005), und Männer und Frauen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, Angst auszublenden (Milad et al., 2009; Zeidan et al., 2011). Ebenso unterscheidet sich die klassische Konditionierung auf Stressstimuli zwischen männlichen und weiblichen Ratten, abhängig vom Östrogenspiegel (Wood und Shors, 1998).

Frühere Studien haben diese Unterschiede hauptsächlich schwankenden peripheren Hormonspiegeln zugeschrieben, insbesondere während des weiblichen Östruszyklus. Das Neue an den Ergebnissen dieser Arbeit ist, dass diese Unterschiede nicht von peripheren Hormonen verursacht sein müssen, sondern von Neurosteroiden gelenkt werden könnten, die immanent in der Amygdala synthetisiert werden, da AROM durch Neuronenaktivität reguliert

wird (Balthazart und Ball, 2006; Charlier et al., 2015; Fester et al., 2016) und endokriner Steuerung unterliegt (Prange-Kiel et al., 2008). Daher ist AROM geeignet, Signale aus neurendokrinem (hormonellen) und neuronalem (aktivitätsabhängigem) Umfeld zu integrieren und die Synapsenaktivität entsprechend zu modulieren. Dies könnte in der BLA besonders wichtig sein, welche die subkortikalen Eingangssignale (Asan et al., 2013) mit sensorischen Eingangssignalen aus dem Thalamus und somatosensorischen Kortex koordiniert (Pitkänen et al., 1997) und reziprok mit dem ventralen Hippokampus und medialen präfrontalen Kortex verbunden ist (Seidenbecher et al., 2003; Hoover und Vertes, 2007; Orsini et al., 2011; Felix-Ortiz et al., 2013).

Klinisch sind Aromatasehemmer wie Letrozol ein wesentlicher Bestandteil der adjuvanten endokrinen Therapie des östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinoms der postmenopausalen Frau. Die Therapiedauer beträgt hierbei mindestens fünf Jahre. Klinisch klagen Patientinnen über Hitzewallungen, Kopfschmerzen, Libidoverlust und haben ein erhöhtes Osteoporose-Risiko. Zusätzlich berichten betroffene Patientinnen dabei vermehrt über kognitive Dysfunktionen, wie Gedächtnis- oder Denkstörungen (Shilling und Jenkins, 2007). Diese kognitiven Beeinträchtigungen scheinen eine mögliche Nebenwirkung der endokrinen Therapie zu sein, da E2 einen Einfluss auf die Neuroprotektion, die Kognition und das Sozialverhalten haben kann (Galea et al., 2017).

Mit jährlich etwa 69.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das Mammakarzinom die mit Abstand häufigste maligne Erkrankung der Frau. Etwa 1% aller Neuerkrankungen betrifft Männer. Basierend auf den aktuellen Inzidenzraten erkrankt etwa jede achte Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Fast drei von zehn betroffenen Frauen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt (siehe dazu: Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut, 2017). Die prognostisch günstigen Effekte der endokrinen Therapie werden nur bei ausreichender Therapieadhärenz erreicht. Aufgrund der Nebenwirkungen führt jedoch nur etwa die Hälfte der betroffenen Frauen die Behandlung über die empfohlenen 5 Jahre durch. Dieser Mangel an Compliance ist mit einer signifikant erhöhten Mortalität verbunden (Hadji,

2010). Bei besserem Verständnis für spezifische Nebenwirkungen und auftretende Beschwerden könnte die Therapietreue gesteigert und die Mortalität beim Mammakarzinom gesenkt werden (siehe dazu: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms; Langversion 4.3 – Februar 2020 AWMF-Registernummer: 032-045OL).

5. Zusammenfassung

Die Funktion der Östrogene beschränkt sich nicht nur auf die Steuerung des Reproduktionsverhaltens, sie haben auch großen Einfluß auf die Kognition. Eine besondere Rolle kommt dabei dem Enzym Aromatase zu. Seine neuronale Funktion wurde im Hippokampus bislang am intensivsten untersucht, da es Hinweise gibt, dass Frauen mit östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen nach Behandlung mit Aromataseinhibitoren unter Gedächtnisdefiziten leiden. Im Tiermodell führt die Aromatase-Inhibition im Hippokampus geschlechtsspezifisch zu einer Beeinträchtigung der Synapsenbildung und der Langzeitpotenzierung. Neben dem Hippokampus ist die Amygdala eine für die Gedächtnisbildung wichtige Gehirnregion. Veränderungen der Amygdala können für Depressionen oder posttraumatischen Belastungsstörungen ursächlich sein.

In dieser Dissertation wurde untersucht, ob auch in der Amygdala die Synapsendichte durch Sexualhormone bzw. endogen produzierte Sexualneurosteroiden beeinflusst wird.

Mithilfe von Immunhistochemie wurde gezeigt, dass Aromatase in der basolateralen Amygdala (BLA) stark exprimiert wird. Daraufhin wurde elektronenmikroskopisch untersucht, ob die systemische Gabe des Aromataseinhibitors Letrozol die Dichte von Spinesynapsen in der BLA verändert. Dies war in weiblichen Mäusen der Fall, nicht jedoch in männlichen Mäusen. Einen vergleichbaren Befund ergaben nachfolgende Untersuchungen an aus neonatalen Ratten gewonnenen, organotypischen Gewebekulturen (*in vitro*) mit Amygdala-Anteil. Auch hier war die Dichte der Spinesynapsen nach Letrozolgabe im Vergleich zu den Kontrollen im BLA nur dann reduziert, wenn das Gewebe von weiblichen Tieren stammte.

Die Befunde dieser Arbeit deuten somit – analog zum Hippokampus – auf eine geschlechtsspezifische Regulierung der synaptischen Plastizität in der BLA durch die neuronale Aromatase hin. Diese Ergebnisse könnten für das Verständnis geschlechtsspezifischer Unterschiede bei affektiven Störungen, sowie der Nebenwirkungen für in der Brustkrebstherapie eingesetzte Aromatasehemmer bedeutsam sein.

6. Summary

The function of estrogen is not only limited to control of reproductive behaviour, but also has a significant influence on cognition. In this context, the enzyme aromatase plays a major role. Its neuronal function has so far been studied mainly with a focus on the hippocampus, as indicators exist suggesting that women with estrogen receptor-positive breast cancer suffer from memory deficits after treatment with aromatase inhibitors. Animal models show, aromatase inhibition in the hippocampus leading to gender-specific impairment of synapse formation and long-term potentiation. In addition to the hippocampus, the amygdala is a critical brain region for memory formation. Changes in the amygdala can be the cause of depression or post-traumatic stress disorders.

In this dissertation we investigated whether sex hormones or endogenously produced sexual neurosteroids influence the synapse density in the amygdala. The use of immunohistochemistry shows a strong expression of aromatase in the basolateral amygdala (BLA). On this basis followed an electron microscopic examination, to establish whether the systemic administration of the aromatase inhibitor letrozole alters the density of spine synapses in the BLA. Female mice indeed showed expected alterations, which their male counterparts did not show. Subsequent studies on organotypic tissue cultures (*in vitro*) obtained from neonatal rats with amygdala content yielded comparable results. Again, the density of spine synapses after letrozole administration was reduced compared to controls in the BLA only if the tissue was derived from female animals.

The findings of this dissertation thus indicate - analogous to the hippocampus - a gender-specific regulation of synaptic plasticity in the BLA by the neuronal aromatase. These results could be relevant for understanding gender-specific differences in affective disorders and the side effects of aromatase inhibitors used in breast cancer therapy.

7. Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
%	Prozent
®	registered trademark
Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AROM	Cytochrom P-450-Aromatase
BLA	basolateraler Kern der Amygdala
BL	basaler Kern der Amygdala
BM	basomedialer Kern der Amygdala
Ca ²⁺	Calcium
Calb	Calbindin
CamKII	<i>Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CeA	zentraler Kern der Amygdala
CeAl	zentraler lateraler Kern der Amygdala
CeAm	zentral medialer Kern der Amygdala
Ctl	Control (Vehikel)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cor	Kortex
DAPI	4',6'-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
d.h.	das heißt
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17 β -Estradiol
e.c.	Capsula externa
EM	elektronenmikroskopisch
et al.	et alii (und andere)
Fa.	Firma
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GA	Glutaraldehyd
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
GnRh	Gonadotropin- Releasing Hormon
h	<i>hour</i> (Stunde)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HCl	Hydrogenchlorid
Hypothal	Hypothalamus
i.c.	Capsula interna
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
La	lateraler Kern der Amygdala
Let	Letrozol
LTP	<i>long-term-potential</i> (Langzeitpotenzierung)
M	Molar
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
mGLUR	metabotroper Glutamatrezeptor
mg	Milligramm
min	Minute/ Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mol	Mol
mPFC	medialer präfrontaler Kortex
n	Anzahl
N.	nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NiCl ₂	Nickel(II)- Chlorid
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartam
Nucl.	Nucleus
o.g.	oben genannte
P3	neonatale Ratte, 3 Tage
Parv	Parvalbumin
PB	Phosphatpuffer
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>

PFA	Paraformaldehyd
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of mean</i>
Semi	Semidünnschnitt
Str	Striatum
Testo	Testosteron
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Veh	Vehikulum
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

Abe K, Chisaka O, van Roy F, Takeichi M (2004) Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by [alpha]N-catenin. *Nat Neurosci* 7, 357–363

Adams MM, Fink SE, Janssen WG, Shah RA and Morrison JH (2004). Estrogen modulates synaptic *N*-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *J Comp Neurol* 474, 419-426

Allan E (1997) Estrogen Regulation of GABA Transmission in Rat Preoptic Area. *Brain Research Bulletin* 44, 321–326

Arevalo MA, Azcoitia I, Gonzalez-Burgos I, Garcia-Segura LM (2015) Signaling mechanisms mediating the regulation of synaptic plasticity and memory by estradiol. *Horm Behav* 74 19 –27

Barha CK, Galea LAM (2010) Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. *Estrogen Actions Brain* 1800, 1056–1067

Balthazart J, Ball GF (2006) Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 29, 241–249

Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski JS, Paysen D, König A, Rune GM (2010) Estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex* 20, 2985–2995

Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13–26

Beyer, C. (1999) Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol* 199, 379

Beyeler A, Namburi P, Glober GF, Simonnet C, Calhoon GG, Conyers GF, Luck R, Wildes CP, Tye KM (2016) Divergent routing of positive and negative information from the amygdala during memory retrieval. *Neuron* 90, 348–361

Boulware MI, Weick JP, Becklund BR, Kuo SP, Groth RD, Mermelstein PG (2005) Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 25, 5066–5078

Charlier TD, Cornil CA, Patte-Mensah C, Meyer L, Mensah-Nyagan AG, Balthazart J (2015) Local modulation of steroid action: rapid control of enzymatic activity. *Front Neurosci* 9, 83

Chung WC, Auger AP (2013) Gender differences in neurodevelopment and epigenetics. *Pflugers Arch* 465, 573–584

Cornil CA, Charlier TD (2010) Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *J Neuroendocrinol* 22, 664–673

Dailey, ME and Smith, SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16, 2983–2994

- Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker, J (2004) Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit 'depressive-like' symptomatology. *European Journal of Neuroscience*, 20, 217-228
- Dent EW, Merriam EB, Hu X (2011) The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21, 175–181
- Drakew A, Frotscher M, Heimrich B (1999) Blockade of neuronal activity alters spine maturation of dentate granule cells but not their dendritic arborization. *Neuroscience* 94, 767–774
- McEwen BS, (1992) *Steroid Hormones: Effect on Brain Development and Function*. *Horm Res*; 37, 1–10
- Fernandez SV, Russo J (2010) Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicol Pathol* 38, 110–122
- Fester L, Prange-Kiel J, Rune GM (2007) Hippokampale Estrogensynthese und synaptische Plastizität. *Neuroforum*, 13, 127-134
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19, 692–705
- Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2011) Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell Tissue Res* 345, 285–294
- Fester L, Brandt N, Windhorst S, Pröls F, Bläute C, Rune GM (2016) Control of aromatase in hippocampal neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol* 160, 9 –14
- Fifková E, Delay RJ (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95, 345–350
- Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, T. W. Berger TW (1999) 17 β -Estradiol Enhances NMDA Receptor-Mediated EPSPs and Long-Term Potentiation. *Journal of Neurophysiology*, 81:2, 925-929
- Frick KM, Zhao Z, Fan L (2011) The epigenetics of estrogen: epigenetic regulation of hormone-induced memory enhancement. *Epigenetics* 6, 675– 680
- Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parduz A, Naftolin F (1994) Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: Cellular mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 44, 279–307
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Don Carlos LL. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Neurobiol.* 63, 29-60
- Gallicchio L, MacDonald R, Wood B, Rushovich E, Helzlsouer KJ (2012) Menopausal-type symptoms among breast cancer patients on aromatase inhibitor therapy. *Climacteric* 15, 339 –349
- Gähwiler BH (1981) Slice cultures of cerebellar, hippocampal and hypothalamic tissue. *Experientia* 40, 235-43
- Hadji P (2010) Improving compliance and persistence to adjuvant tamoxifen and aromatase inhibitor therapy. *Oncology/Hematology* 73, 156-166

Harden C, MacLusky NJ (2005) Aromatase inhibitors as add-on treatment for men with epilepsy. *Expert Rev Neurother* 5, 123–127

Huber TJ et al (2004) Psychotic disorders and gonadal function: evidence supporting the oestrogen hypothesis. *Acta Psychiatr Scand* 109, 269–274

Grigoriadis S, Robinson GE (2007) Gender issues in depression. *Ann Clin Psychiatry* 19, 247–255

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

Harris KM und Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17, 341–371

Hajszan T, MacLusky NJ, Leranth C (2008) Role of androgens and the androgen receptor in remodeling of spine synapses in limbic brain areas. *Horm Behav* 53, 638–646

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 865–870

Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, Kawato S (2008) Estrogen synthesis in the brain—role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol* 290, 31–43

Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719–729

Holcman D, Schuss Z, Korkotian E (2004) Calcium dynamics in dendritic spines and spine motility. *Biophys J* 87, 81–91

Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189, 619–629

Huang GZ, Woolley CS (2012) Estradiol acutely suppresses inhibition in the hippocampus through a sex-specific endocannabinoid and mGluR-dependent mechanism. *Neuron* 74, 801–808

Horvath TL, Roa-Pena L, Jakab RL, Simpson ER, Naftolin F (1997) Aromatase in axonal processes of early postnatal hypothalamic and limbic areas including the cingulate cortex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61, 349–357

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

Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms; Langversion 4.3 – Februar 2020 AWMF-Registernummer: 032-045OL

- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364–1368
- Janssens RM, Brus L, Cahill DJ, Huirne JA, Schoemaker J, Lambalk CB (2000) Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum Reprod Update* 6, 505–518
- Kahle W, Frotscher M (2001) Taschenatlas der Anatomie Bd. 3 Nervensystem und Sinnesorgane. 7. Aufl. Thieme, Stuttgart New York
- Kato A, Hojo Y, Higo S, Komatsuzaki Y, Murakami G, Yoshino H, Uebayashi M, Kawato S (2013) Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front Neural Circuits* 7, 149
- Kajta M und Beyer C (2003) Cellular Strategies of Estrogen-Mediated Neuroprotection During Brain Development. *Endocr* 21, 3
- Janssens RM, Brus L, Cahill DJ, Huirne JA, Schoemaker J, Lambalk CB (2000) Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists *Hum Reprod Update* 6, 505–518
- Jelks KB, Wylie R, Floyd CL, McAllister AK, Wise P (2007) Estradiol Targets Synaptic Proteins to Induce Glutamatergic Synapse Formation in Cultured Hippocampal Neurons: Critical Role of Estrogen Receptor- α . *Journal of Neuroscience*, 27 (26), 6903-6913
- Kemppainen S, Pitkänen A (2000) Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol* 426, 441– 467
- Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. 11. Ausgabe, Robert Koch-Institut, Berlin 2017
Krebs in Deutschland für 2013/2014, 72-75
- Kuhl H (2005) Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* 8, 3-63
- Kinrys G, Wygant LE (2005) Anticonvulsants in anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* 7, 258–267
- MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD (1994) Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Mol Cell Neurosci* 5, 691–698
- McCarthy MM, Arnold AP (2011) Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 14, 677–683
- McDonald AJ (1992) Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res Bull* 28, 179–185
- Maggi A und Perez J (1984) Progesterone and Estrogens in Rat Brain: Modulation of GABA (γ -Aminobutyric Acid) Receptor Activity. *European J. Pharmacol.* 103, 165-168

- Meitzen J, Grove DD, Mermelstein PG (2012) The organizational and aromatization hypotheses apply to rapid estradiol action in female hippocampal neurons. *Endocrinology* 153, 4616–4621
- Meitzen J, Perry AN, Westenbroek C, Hedges VL, Becker JB, Mermelstein PG (2013) Enhanced striatal β 1-adrenergic receptor expression following hormone loss in adulthood is programmed by both early sexual differentiation and puberty: a study of humans and rats. *Endocrinology* 154, 1820–1831
- Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, Zeidan MA, Handwerker K, Orr SP, Rauch SL (2009) Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 66, 1075–1082
- Morales M, Fifková E (1989) In situ localization of myosin and actin in dendritic spines with the immunogold technique. *J Comp Neurol* 279, 666–674
- Mukai, H, Tsurugizawa, T, Murakami, G, Kominami, S, Ishii, H, Ogiue-Ikeda, M, Takata, N, Tanabe, N, Furukawa, A, Hojo, Y, Ooishi, Y, Morrison, J. H, Janssen, W. G, Rose, J. A, Chambon, P, Kato, S, Izumi, S, Yamazaki, T, Kimoto, T, Kawato, S (2007) Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *Journal of Neurochemistry* 100, 950-967
- Naftolin F, MacLusky NJ (1982) Aromatase in the central nervous system. *Cancer Res* 42 [8 Suppl], 3274–3276
- Nieh, EH, Kimb SY, Namburia P, Tyea KM (2012) Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain Research*, 2-14
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64, 313–353
- Oertner TG, Matus A (2005) Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37, 477–482
- Olucha-Bordonau FE, Fortes-Marco L, Otero-Garcia M, Lanuza E, Martinez- Garcia F (2014) Amygdala: structure and function. In: *The rat nervous system*. Ed 4 (Paxinos G, ed), 441– 489. San Diego, CA: Academic
- Pape HC, Pare D (2010) Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev* 90, 419–463
- Peters A und Kaiserman-Abramof IR (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127, 321–355
- Phillips KA, Ribí K, Fisher R (2011) Do aromatase inhibitors have adverse effects on cognitive function? *Breast Cancer Res* 13, 203
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrineregulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13, 226–234
- Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008) Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180, 417–426

- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL (2000) Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424, 409–438
- Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL (1997) Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14048–14053
- Quervain de DJ, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B (2009) Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30, 358–370
- Richter-Levin G (2004) The amygdala, the hippocampus, and emotional modulation of memory. *Neuroscientist* 10, 31–39
- Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390, 604–607
- Rochefort NL, Konnerth A (2012) Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep*, 13, 699–708
- Roselli CE, Resko JA (1987) The distribution and regulation of aromatase activity in the central nervous system. *Steroids* 50, 495–508
- Roselli CE, Abdelgadir SE, Rønnekleiv OK, Klosterman SA (1998) Anatomic distribution of aromatase gene expression in the rat brain. *Biol Reprod* 58, 79–87
- Roozendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL (2002) Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor–cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci* 15, 553–560
- Roozendaal B, Hahn E, Nathan S, de Quervain D, McGaugh J (2004) Glucocorticoid Effects on Memory Retrieval Require Concurrent Noradrenergic Activity in the Hippocampus and Basolateral Amygdala. *The Journal of Neuroscience* 24, 8161–8169
- Roozendaal B, Hui GK, Hui IR, Berlau DJ, McGaugh JL (2006) Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 86, 249–255
- Roozendaal B, Okuda S, Van der Zee EA, McGaugh JL (2006) Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6741–6746
- Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10, 423–433
- Sah P, Faber ESL, de Armentia M, Power J (2003) The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol Rev* 83, 803–834
- Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED (1991) Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology* 129, 2834–2844
- Santen RJ and Harvey HA (1999) Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* 6, 75-92

- Sarabdjitsingh RA, Kofink D, Karst H, de Kloet ER, Joe`ls M (2012) Stress-Induced Enhancement of Mouse Amygdalar Synaptic Plasticity Depends on Glucocorticoid and β -Adrenergic Activity. *PLoS ONE* 7(8), e42143
- Saunders-Pullman R (2003) Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both? *Endocrine* 21(1), 81-7
- Segal M (2005) Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6, 277–284
- Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, Kovacic A, Zhou J, Clyne CD (2005) Estrogen-the good, the bad, and the unexpected. *Endocr Rev* 26, 322–330
- Smith IE (1999) Aromatase inhibitors: a dose-response effect. *Endocrine-Related Cancer*, 6, 245-249
- Smith Y, Pare JF, Pare D (1998) Cat intraamygdaloid inhibitory network: ultrastructural organization of parvalbumin-immunoreactive elements. *J Comp Neurol* 391, 164–179
- Srivastava DP, Woolfrey KM, Kelly A, Jones KA, Shum CY, LL, Swanson GT, Penzes P (2008) Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 14650-14655
- Sterio DC (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.*; 134(Pt 2), 127-36
- Strange BA, Dolan RJ (2004) Beta-adrenergic modulation of emotional memory-evoked human amygdala and hippocampal responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11454–11458
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173–182
- Swanson LW und Petrovich GD (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21, 323–331
- Tabatadze N, Huang G, May RM, Jain A, Woolley CS (2015) Sexdifferences in molecular signaling at inhibitory synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 35, 11252–11265
- Tovote P, Fadok JP, Lüthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16, 317–331
- Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM (2012) Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci*, 32, 8116–8126
- Wagner CK, Morrell JI (1996) Distribution and steroid hormone regulation of aromatase mRNA expression in the forebrain of adult male and female rats: a cellular-level analysis using in situ hybridization. *J Comp Neurol* 370, 71–84

- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76, 1879-1886
- Weinstock LS (1999) Gender differences in the presentation and management of social anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 60, 9–13
- Wood GE, Shors TJ (1998) Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4066–4071
- Woolley CS, McEwen BS (1992) Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapsedensity during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci.*,12(7), 2549-54
- Yague JG, Munoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2006) Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 138, 389–401
- Yague JG, Wang AC, Janssen WG, Hof PR, Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Morrison JH (2008) Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Res* 1209, 115–127
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071–1089
- Zandi PP et al (2002) Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 288, 2123–2129
- Zhao C, Fujinaga R, Tanaka M, Yanai A, Nakahama K, Shinoda K (2007) Region-specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain: immunohistochemical and in situ hybrid- ization analyses. *J Comp Neurol* 500, 557–573
- Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM (2010) Aromataseinhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology* 151, 1153–1160
- Zeidan MA, Igoe SA, Linnman C, Vitalo A, Levine JB, Klibanski A, Goldstein JM, Milad MR (2011) Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. *Biol Psychiatry* 70, 920–927

9. Danksagung

Zu guter letzt möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich beim Schreiben dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle und ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roland Bender für die ausgezeichnete und hervorragende Betreuung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit, seiner Geduld über die Jahre und der stetigen Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Dankeschön!

Ich bedanke mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Gabriele Rune für die Möglichkeit an ihrem Institut meine Dissertation schreiben zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lepu Zhou für seine Mitarbeit und die vielen Anregungen und Denkansätze während der Zeit im Labor.

Frau Brigitte Asmus und Frau Barbara Holstermann danke ich für die unzähligen Stunden voller Arbeit, tollen Gesprächen, der fürsorglichen Einarbeitung und Hilfe und den offenen Ohren für Probleme in allen Lebenslagen.

Bei Frau Herdis Hamann möchte ich mich stellvertretend für alle übrigen Mitarbeiter des Instituts für Neuroanatomie für ihre vorbildliche Arbeit und die Hilfe im Labor bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihre Ermutigungen und Zusprüche während der gesamten Zeit und dem fleißigen Korrekturlesen meines Bruders, Dr. med Martin Keller. Meiner geliebten Marie danke ich für Ihre Unterstützung, den Rückhalt und dem ganz besonderen Grund diese Arbeit vor dem Termin fertigzustellen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Freunden, Kollegen und den übrigen Doktoranden für Anregungen, Ideen und Gedanken jeglicher Art und Weise, sowie den Personen, welche ich nicht namentlich erwähnt habe.

10. Tabellarischer Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

11. Eidesstattliche Erklärung

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.

Hamburg, den

Alexander Keller