

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Neuroanatomie

Leiterin: Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

GnRH-induzierte Synapsenbildung im Hippocampus

Dissertation

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

vorgelegt von:

Amelie Elisabeth Worst
aus Siegburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.07.2015**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Christian Hagel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Einführung.....	5
1.2. Der Hippocampus.....	7
1.3. Synapsen und synaptische Plastizität	10
1.4. GnRH und sein Rezeptor	12
1.5. Synthese und Wirkung der Androgene und Estrogene	15
1.5.1. Estrogen im Hippocampus	17
1.5.2. Testosteron im Hippocampus.....	19
1.6. Trilostan und Letrozol.....	20
1.7. Arbeitshypothese und Fragestellung	22
2. Material	24
2.1. Geräte	24
2.2. Software	25
2.3. Chemikalien	25
2.4. Lösungen	26
3. Methoden	28
3.1. Eingesetzte Tiere	28
3.2. Präparation der Hippocampi und Inkubation der Gewebekulturen	28
3.3. Fixierung der Slicekulturen für die Elektronenmikroskopie.....	30
3.4. Elektronenmikroskopie und Bildanalyse.....	31
4. Ergebnisse	33
4.1. Quantitative Bestimmung der Spinesynapsendichte	33
4.2. Männliche Ratten	34
4.3. Weibliche Ratten	37
4.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse im Geschlechtervergleich.....	40

5. Diskussion.....	41
5.1. Bedeutung der Androgen- und Estrogenrezeptoren im Hippocampus	42
5.2. Vergleich zwischen hippocampal und gonadal gebildetem Estradiol und Testosteron	46
5.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede in Bezug auf GnRH- Responsivität	49
5.4. Einfluss der Sexualhormone auf Gedächtnis und Bedeutung des NMDA-Rezeptors	52
5.5. Kritische Beurteilung des experimentellen Modells	53
5.6. Klinische Bedeutung und Testosteronmangel beim Menschen	55
6. Zusammenfassung	57
7. Abkürzungsverzeichnis.....	58
8. Literaturverzeichnis.....	60
9. Danksagung	69
10. Lebenslauf.....	70
11. Eidesstattliche Erklärung.....	70

1. Einleitung

1.1. Einführung

Die Sexualhormone Estrogen (bzw. 17β -Estradiol, E2) und Testosteron (T) dienen in erster Linie der Ausbildung von primären und sekundären Geschlechtsmerkmalen sowie der Fortpflanzung. Dabei stellt das Androgen Testosteron eine Vorstufe von Estrogen dar. Anfang der 1970er Jahre konnte von Naftolin und Mitarbeitern nachgewiesen werden, dass durch das Enzym Aromatase aus Testosteron Estradiol in verschiedenen Gehirnarealen (Diencephalon, Hypothalamus und limbisches System) synthetisiert werden kann (Naftolin et al. 1971, Flores et al. 1973, Naftolin und Ryan 1975). So stellt sich die interessante Frage, inwieweit die Sexualhormone nicht nur in der Peripherie sondern auch im zentralen Nervensystem (ZNS) ihre Wirkung entfalten und das ZNS und beispielhaft Synapsen beeinflussen können.

Im Hippocampus spielt die fortwährende Veränderung der Synapsen, die sog. „synaptische Plastizität“ eine wichtige Rolle. Zwischen Neuronen können neue Kontakte gebildet, verstärkt oder abgeschwächt werden. Dies zeigt sich vor allem bei Lernvorgängen oder bei der Bildung von Gedächtnisinhalten. Vor dem Hintergrund der Erforschung der Sexualhormone konnten Gould et al. vor ca. 25 Jahren nachweisen, dass die synaptische Plastizität durch Estrogen beeinflusst wird (Gould et al. 1990). Nach Entfernung der Gonaden wurde ein Synapsenverlust bei den Versuchstieren festgestellt, welcher durch die Zufuhr von Estrogen aufgehoben werden konnte. Es konnte danach mehrfach bestätigt werden, dass die synaptische Plastizität im Hippocampus durch die Sexualhormone beeinflusst wird (Garcia-Segura et al. 2001, Rune et al. 2002, Hajszan et al. 2008). Vor etwa 10 Jahren konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass eine *de novo* Estrogensynthese in hippocampalen Schnittkulturen stattfindet, die unabhängig von der gonadalen Hormonsynthese ist (Prange-Kiel et al. 2003). Lange Zeit wurden jedoch mögliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern vernachlässigt. In jüngeren Experimenten konnten Differenzen

zwischen männlichen und weiblichen Tieren hinsichtlich der sexualhormoninduzierten synaptischen Plastizität nachgewiesen werden (Leranth et al. 2004, Fester et al. 2012, Vierk et al. 2012).

Den Sexualhormonen werden auch neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben, deren Mangel sich im klinischen Alltag in verschiedenen Krankheitsbildern zeigt (Pike et al. 2009, Garcia-Segura et al. 2001). Beispielsweise können bei Frauen postmenopausal verringerte Estrogenkonzentrationen zu Konzentrationsschwierigkeiten und Gedächtnisverlust führen (McEwen 2002). Ein weiterer klinischer Bezug lässt sich auch bei Morbus Alzheimer darstellen; geringere Konzentrationen von Androgenen und Estrogenen im Alter können eine Ursache für diese neuropsychiatrische Erkrankung sein (Alvarez-de-la-Rosa et al. 2005, Cherrier 2009, Pike et al. 2009, Filová et al. 2013, Li et al. 2013). Auch die Inzidenz von zerebralen Schlaganfällen kann durch niedrige Konzentrationen von Androgenen bzw. Estrogenen beeinflusst werden. Bei Frauen treten Schlaganfälle z. B. häufiger postmenopausal auf und bei Männern scheinen hohe Testosteronspiegel einen protektiven Effekt zu haben (Garcia-Segura et al. 2001, Persky et al. 2013). Interessanterweise ist also bei diesen neurologischen Krankheitsbildern insgesamt eine höhere Inzidenz und Prävalenz bei Frauen als bei Männern zu beobachten (Hammond et al. 2001, Brandt et al. 2014).

Die Estrogenkonzentration im Serum kann auch ein wichtiger Faktor bei Mammakarzinomen sein. Es ist bekannt, dass Estrogen das Wachstum hormonsensitiver Tumoren positiv beeinflusst. Deswegen ist bei solchen Tumoren die Gabe von Aromatasehemmern (z. B. Letrozol), die die Umwandlung von Testosteron zu Estrogen hemmen, eine übliche Therapieoption. Dabei wurde nachgewiesen, dass unter einer Aromatasehemmertherapie als unerwünschte Arzneimittelwirkung die kognitiven Fähigkeiten der Patientin abnehmen können (Shilling et al. 2003, Buwalda und Schagen 2013).

Da die Ursachen und genauen Mechanismen des sexuellen Dimorphismus weiterhin ungeklärt erscheinen - sich dadurch aber wichtige Konsequenzen für den klinischen Alltag und mögliche Therapien ergeben können - werden in der vorliegenden Arbeit sexspezifische Unterschiede der hormoninduzierten Synaptogenese im Rattenhippocampus (CA1-Region) anhand von Schnittkulturen *in vitro* untersucht. Dabei wird ein besonderer Fokus auf die Bedeutung der Sexualhormone Testosteron und Estrogen gelegt und die Rolle des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) untersucht.

1.2. Der Hippocampus

Der Hippocampus (von *hippokamos* (griechisch): Seepferdchen) befindet sich als zentraler Teil des limbischen Systems im Temporallappen des Großhirns. Er grenzt an das Unterhorn des Seitenventrikels und ist paarig angelegt; folglich gibt es einen Hippocampus pro Hemisphäre. Der Hippocampus gehört zu den entwicklungsgeschichtlich ältesten Strukturen des Gehirns (Allokortex, bzw. genauer Archikortex). Im Vergleich zum menschlichen Gehirn ist der Hippocampus bei der Ratte weiter kranial, dicht unter der Großhirnrinde lokalisiert.

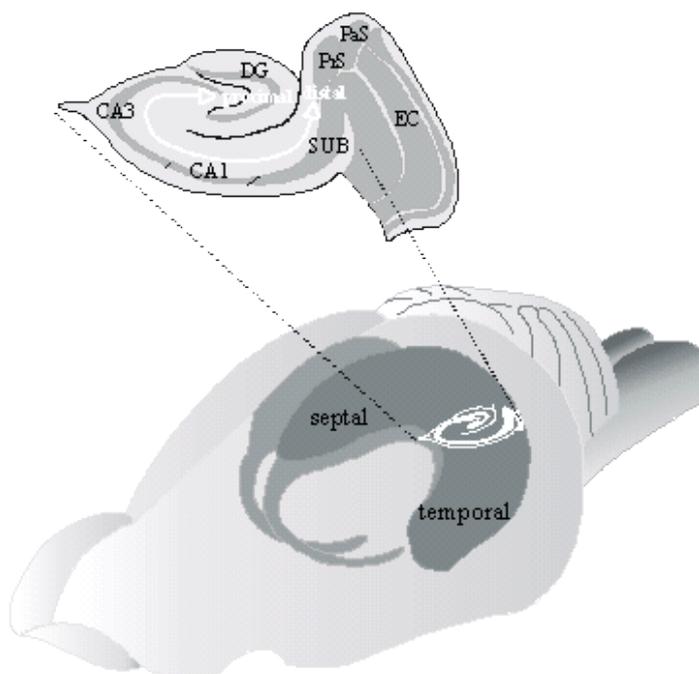


Abbildung 1: Ansicht des Rattenhirns mit eingezeichnetem, C-förmigen Hippocampus. Der Ausschnitt zeigt die Unterteilungen des Hippocampus. Abkürzungen: CA, Cornu ammonis; DG, Gyrus dentatus; EC, entorhinaler Cortex; PaS, Parasubiculum; PrS, Präsubiculum; SUB, Subiculum (Quelle: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/iserhot-claudia-et.al.2001-05-02/HTML/chapter1.html>).

Zum Hippocampus werden drei Unterstrukturen gezählt: Gyrus dentatus (DG), Cornu ammonis (CA) und Subiculum (mit Präsubiculum und Parasubiculum). Dabei sind dem Subiculum zwei sich umgreifende, C-förmig gebogene Zellbänder angelagert. Dies ist zum einen der kranial gelegene Gyrus dentatus und zum anderen das Ammonshorn (Abb. 1).

Die kranialen Teile des Hippocampus reichen bis an den Balken (Corpus callosum) des Gehirns heran und kaudal lagert er sich als tatzenförmiges „pes hippocampi“ jeweils an beide Seitenventrikel an. Der Hippocampus dient als Schaltzentrum zahlreicher efferenter und afferenter Nervenfasern. Ein neuronaler Kreislauf („Papez-Neuronenkreis“) zieht vom Hippocampus über den Fornix zu den Corpora mammillaria. Von dort ziehen die Fasern über den Fasciculus mammillothalamicus zum Thalamus und weiter zum Gyrus cinguli. Über den Gyrus parahippocampalis gelangen die Fasern zur Area entorhinalis weiter über den Tractus perforans zurück zum Hippocampus (Trepel et al. 2008, Abb. 2).

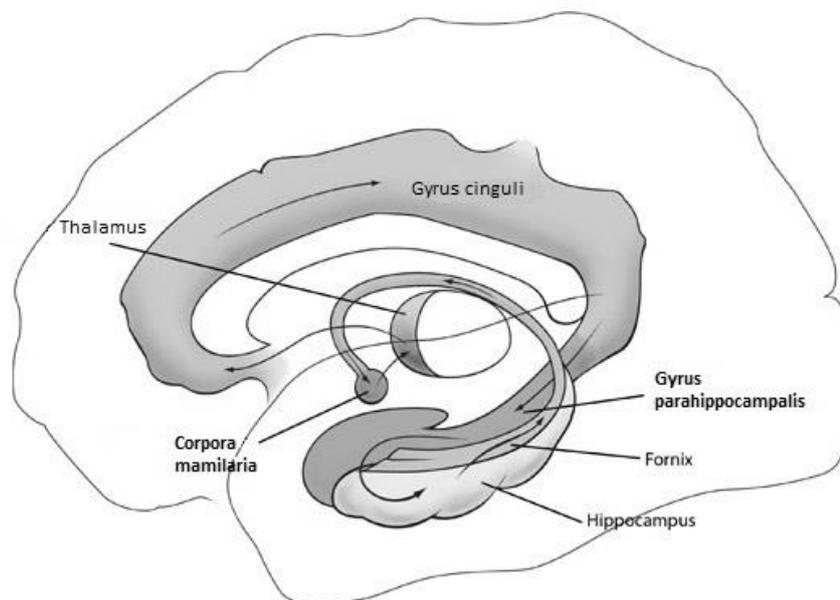


Abbildung 2: Darstellung des Papez-Neuronenkreises (modifiziert nach: <http://montgomeryillustration.com/wp-content/uploads/et.al.2013/04/Papez.jpg>).

Der Gyrus dentatus erhält die meisten afferenten Nervenfasern; diese stammen zum größten Teil aus dem entorhinalen Kortex. Das Subiculum ist die wichtigste Struktur des efferenten Systems. Vereinfacht kann man sagen, dass die meisten Informationen innerhalb des Hippocampus vom DG über CA und Subiculum zum Fornix übertragen werden. Somit ist der Hippocampus ein wichtiges Schaltzentrum für visuelle, olfaktorische, auditorische, somatosensible und motorische Informationen (Papez 1958).

Im Frontalschnitt des Hippocampus kann man seine typisch S-förmig eingerollte, dreischichtige Archikortexstruktur erkennen. Der mittlere Teil, das Ammonshorn, kann in vier Regionen eingeteilt werden (CA1 bis 4); dabei sind vorwiegend die Regionen CA1 und CA3 bei der neuronalen Verschaltung beteiligt. Histologisch lassen sich mehrere Nervenzelltypen unterscheiden: die CA1-Region ist besonders reich an kleinen Pyramidenzellen, die CA2-Region enthält dicht gelagerte große Pyramidenzellen, die Regionen CA3 und CA4 bestehen aus locker gelagerten großen Pyramidenzellen.

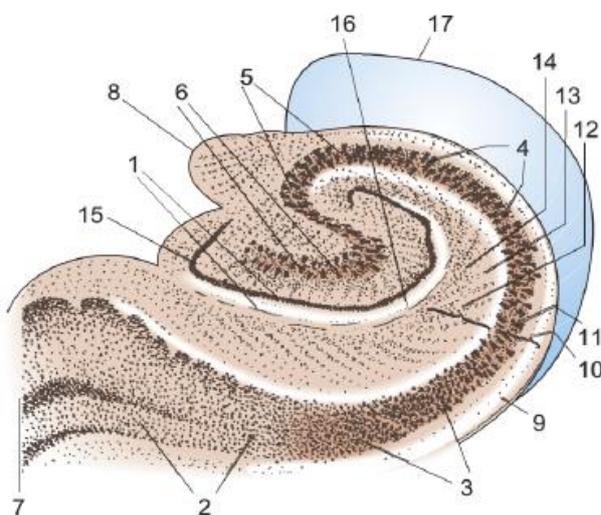


Abbildung 3: mikroskopischer Frontalschnitt durch den Hippocampus (aus Trepel: Neuroanatomie, 4. Aufl., S.236).

- 1 - Gyrus dentatus, 2 - Subiculum,
- 3 - Feld CA1 (kleine Pyramidenzellen),
- 4 - Feld CA2 (große Pyramidenzellen),
- 5 - Feld CA3 (lockere große Pyramidenzellen), 6 - Feld CA4 (besonders aufgelockerte Struktur),
- 7 – sechsschichtiger entorhinaler Kortex des Gyrus parahippocampalis, 8 - Fimbria hippocampi (Beginn des Fornix), 9 - Alveus (enthält die afferenten und efferenten Fasern zum und vom Hippocampus), 10 - Stratum oriens, 11 - Stratum pyramidale, 12 - Stratum moleculare, 13 - (Sub-)Stratum radiatum, 14 - (Sub-)Stratum lacunosum, 15 - Neurone des Stratum granulosum (äquivalent zum Stratum pyramidale des Hippocampus), 16 - Stratum moleculare (Gyrus dentatus), 17 - Umriss des Unterhorns des Seitenventrikels

Mikroskopisch lassen sich jeweils drei Schichten bestimmen: Stratum oriens (basale Dendriten der Pyramidenzellen), Stratum pyramidale (glutamaterge Pyramidenzellen) und Stratum radiatum (apikale Dendriten der Pyramidenzellen). Zusätzlich gibt es in allen Schichten GABA-erge Interneurone (Korbzellen). Im DG sind außerdem Körnerzellen vorhanden; dort wird zusätzlich ein Stratum granulosum beschrieben. Das Subiculum ist die Übergangsstelle vom dreischichtigen Allokortex zum sechsschichtigen Neokortex, wo der Cortex entorhinalis bzw. Gyrus parahippocampalis beginnt (Abb. 3).

Funktionell gesehen spielt der Hippocampus eine bedeutende Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung, d. h. der Übertragung von Informationen aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis. Somit ist er die zentrale Hirnregion für Kognition, Konzentration und Lernen. Außerdem findet unter anderem im Hippocampus die Regulation von Emotionen und Verhalten statt. Erwähnenswert ist, dass die Morphologie des Hippocampus durch äußere und innere Einflüsse verändert werden kann. So lässt sich z. B. bei an unipolarer Depression Erkrankten eine Volumenreduktion der Hippocampus-Struktur erkennen (Videbech und Ravnkilde 2004). Speziell die CA1-Region des Hippocampus reagiert auf hormonelle Einflüsse und die synaptische Plastizität ist dort besonders groß (Woolley et al. 1990, Pozzo-Miller et al. 1999, Leranth et al. 2004).

1.3. Synapsen und synaptische Plastizität

Als Synapsen werden im Allgemeinen Kontaktstellen zwischen den Nervenzellen bezeichnet; sie dienen zum Informationsaustausch von Neuron zu Neuron. Werden diese Strukturen morphologisch oder physiologisch verändert, spricht man von synaptischer Plastizität. Das Gehirn besitzt die Fähigkeit, ein Leben lang neuronale Kontakte neu zu bilden oder zu verändern, abhängig von inneren und äußeren Einflüssen wie z. B. hormonellen Veränderungen oder durch Lernprozesse.

Eine Signalübertragung kommt bei einer chemischen Synapse durch Übertragung eines Botenstoffes (sog. Neurotransmitter, z. B. Glutamat) zu Stande. Dieser wird in Vesikeln von der präsynaptischen Membran (auch als Bouton bezeichnet) abgeschnürt und in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. An der postsynaptischen Membran befinden sich Rezeptoren, die das chemische Signal aufnehmen und weiterverarbeiten. Der postsynaptische Teil befindet sich in den meisten Fällen an einem Dendriten; dieser wölbt sich zur Synapse hin und wird auch als Dornfortsatz („spine“) bezeichnet (Abb. 4).

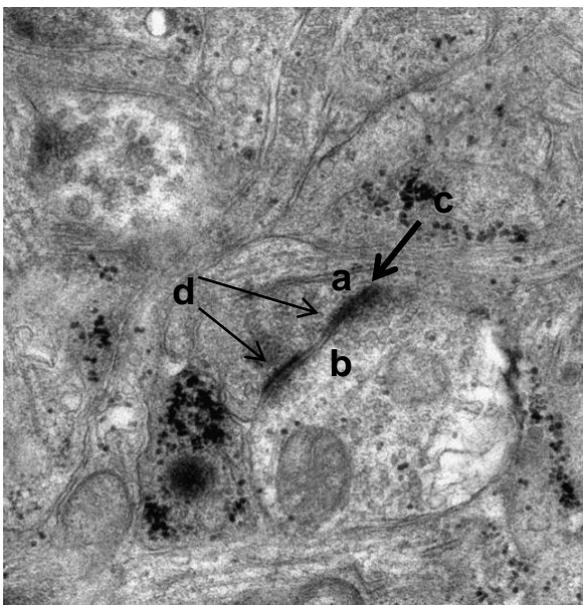


Abbildung 4: elektronenmikroskopische Darstellung einer Synapse.

Dargestellt sind:

- (a) prä- und
- (b) postsynaptische Membran,
- (c) synaptischer Spalt und
- (d) Vesikel.

Je nach Morphologie können diese Spines noch genauer in „thin“ (dünn), „stubby“ (kurze) oder „mushroom shaped“ (pilzförmig) eingeteilt werden. Bei den Spinesynapsen handelt es sich um erregende „exzitatorische“ Synapsen. Eine andere davon zu unterscheidende Form ist die Schaftsynapse, die glatt am Dendritenschaft anliegt. Schaftsynapsen führen in der Regel zu einer Hemmung der Signalübertragung.

Zum laborchemischen Nachweis von Synapsen lassen sich folgende synaptische Proteine immunhistochemisch darstellen: Synaptophysin, Spinophilin, Synaptopodin und der NMDA-Rezeptor NR1 (Fester et al. 2009b, Zhou et al.

2010). Synaptophysin ist Bestandteil der Transmitter-Vesikelmembran und gehört somit zur präsynaptischen Membran. Das Protein Spinophilin ist in Spines angereichert und bündelt dort Aktinfilamente, es ist ein zuverlässiger Marker für den postsynaptischen Anteil einer Synapse. (Feng et al. 2000). Spinophilin und Synaptophysin sind im männlichen und weiblichen Rattenhippocampus im gleichen Ausmaß vorhanden und zeigen ähnliche Immunoreaktivität (Fester et al. 2012, Kretz et al. 2004). Synaptopodin lässt sich als Markerprotein bei reifen „mushroom shaped“ Spines nachweisen (Fester et al. 2009b). Der NMDA-Rezeptor spielt eine besondere Rolle in Bezug auf synaptische Plastizität, die durch Estradiol induziert wird. Es lässt sich z. B. eine verminderte Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 nach systemischer Hemmung der Estrogensynthese bei weiblichen Tieren nachweisen (Zhou et al. 2010).

Als elektrophysiologischer Parameter der synaptischen Plastizität kann dazu die Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) betrachtet werden. Es ist bekannt, dass der Veränderung der LTP eine Veränderung der Spinesynapsendichte vorausgeht (Brandt et al. 2013). In unserem Labor wurde von Vierk und Mitarbeitern festgestellt, dass nach Letrozolbehandlung bei weiblichen Tieren eine Verringerung der LTP stattfindet (Vierk et al. 2012). Neben den laborchemischen und elektrophysiologischen Nachweismethoden können Synapsen auch zuverlässig elektronenmikroskopisch nach speziell definierten Kriterien dargestellt werden (s.u.); diese Methode findet in vorliegender Arbeit Anwendung.

1.4. GnRH und sein Rezeptor

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) gilt als Schlüsselhormon für den hypothalamo-hypophysären-gonadalen-Hormonkreislauf (HHG-Achse). GnRH wird pulsatil ca. alle 90 - 120 Minuten im Hypothalamus ausgeschüttet und gelangt wie alle Hormone über den Blutweg zu den Erfolgsorganen (Knobil 1988). Dies ist zunächst die Adenohypophyse, wo konsekutiv die Ausschüttung

von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH) erfolgt (Gonadotropine). Diese Hormone stimulieren wiederum über den Blutweg die Sexualhormonbildung in den Gonaden; bei Frauen vor allem die Estrogenbildung in den Granulosazellen der Ovarien, sowie bei Männern die Testosteronbildung in den Leydig-Zellen der Hoden (Prange-Kiel et al. 2013). Außerdem wird durch LH und FSH auch die Follikulogenese, Ovulation und Spermatogenese (Sertoli-Zellen) gesteuert (Klinke et al. 2005).

Die Regulation der HHG-Achse erfolgt über Feedback-Mechanismen, die auf Hypophyse und Hypothalamus wirken. So wird bei ausreichender Sexualhormonproduktion die Ausschüttung von GnRH inhibiert, damit eine Homöostase der Steroidhormone erreicht wird. Dies geschieht auch durch das in den Gonaden produzierte Hormon Inhibin. Bei der Frau findet durch die zyklischen Hormonschwankungen durch Estrogen vor der Ovulation auch ein positives, also stimulierendes Feedback statt, wobei die GnRH-Produktion im Hypothalamus stark zunimmt (Radovick et al. 2012, Abb. 5).

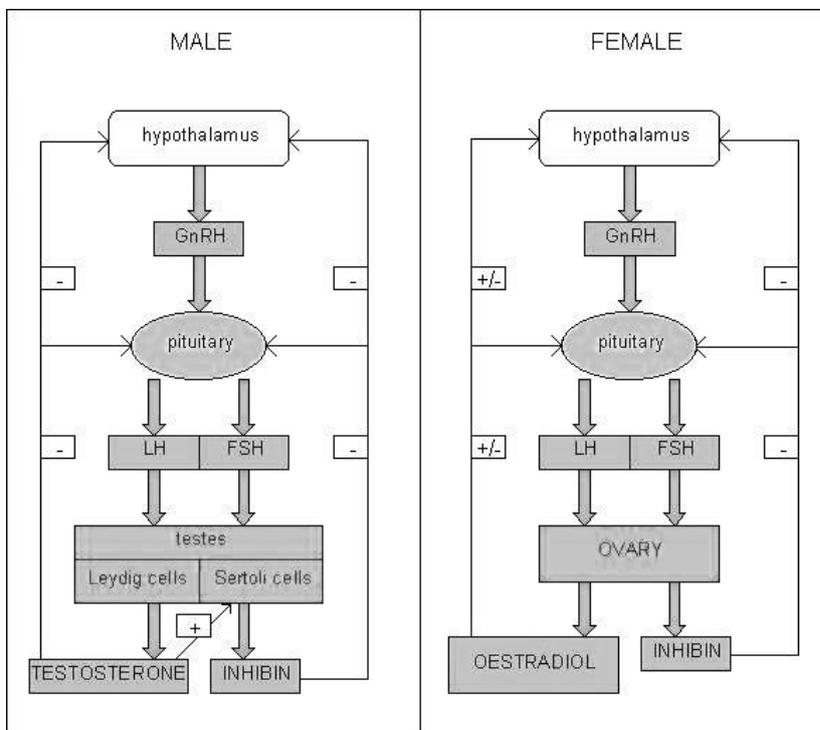


Abbildung 5:
geschlechtsspezifische
Unterschiede der HHG-
Achse
(„pituitary“ = Hypophyse)
(Quelle: http://fce-study.netdna-ssl.com/images/upload-flashcards/915892/596508_m.jpg).

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass GnRH auch direkt über einen Rezeptor die Testosteron- und Estrogensynthese stimulieren kann, sowohl in den Gonaden als auch in anderen Organen (Janssens et al. 2000, Prange-Kiel et al. 2008, Schang et al. 2011). Bei dem GnRH-Rezeptor handelt es sich um einen aus sieben Transmembrandomänen bestehenden Peptidhormonrezeptor. Er gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und verfügt über viele „second-messenger“-Systeme.

In unserem Labor untersuchten Prange-Kiel und Mitarbeiter den Einfluss von GnRH auf die estrogeninduzierte synaptische Plastizität im weiblichen Rattenhippocampus. Sie konnten zeigen, dass die Wirkung von GnRH bzw. Estrogen im Hippocampus sowohl durch GnRH-Rezeptorantagonisten (Antide) als auch durch Aromataseinhibitoren (Letrozol) reduziert werden kann (Prange-Kiel et al. 2008). Die Expression der GnRH-Rezeptoren im Hippocampus scheint bei weiblichen Versuchstieren zyklusabhängig zu erfolgen und wird durch das Vorhandensein von Estradiol im Hippocampus reguliert. Lokal synthetisiertes Estradiol induziert wiederum auch die Synaptogenese. Besonders im Proöstrus, also kurz vor der Ovulation bei hohen Estradiolkonzentrationen nimmt die Spinesynapsendichte zu. So ist davon auszugehen, dass GnRH dabei sowohl einen indirekten als auch einen direkten neuromodulatorischen Effekt hat (Prange-Kiel et al. 2008). Es muss betont werden, dass diese Befunde nur für weibliche Individuen gelten. Ob GnRH auch primär die Androgensynthese über lokale Rezeptoren im Hippocampus reguliert und welche Folgen dies für die synaptische Plastizität männlicher und weiblicher Tiere hat, ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.5. Synthese und Wirkung der Androgene und Estrogene

Die Sexualhormone Testosteron und Estrogen gehören zu der Gruppe der Steroidhormone und lassen sich somit von Cholesterol ableiten (Fester et al. 2011). Androgene sind eine Vorstufe der Estrogene. Beim Menschen findet die Synthese dieser Hormone zum größten Teil in den Gonaden (Eierstöcke bzw. Hoden) statt, aber auch in der Nebennierenrinde, sowie in Muskel- und Fettzellen. Auch in verschiedenen Hirnregionen kann die Synthese der Sexualhormone stattfinden (Flores et al. 1973, Wehrenberg et al. 2001, Tabatadze et al. 2014).

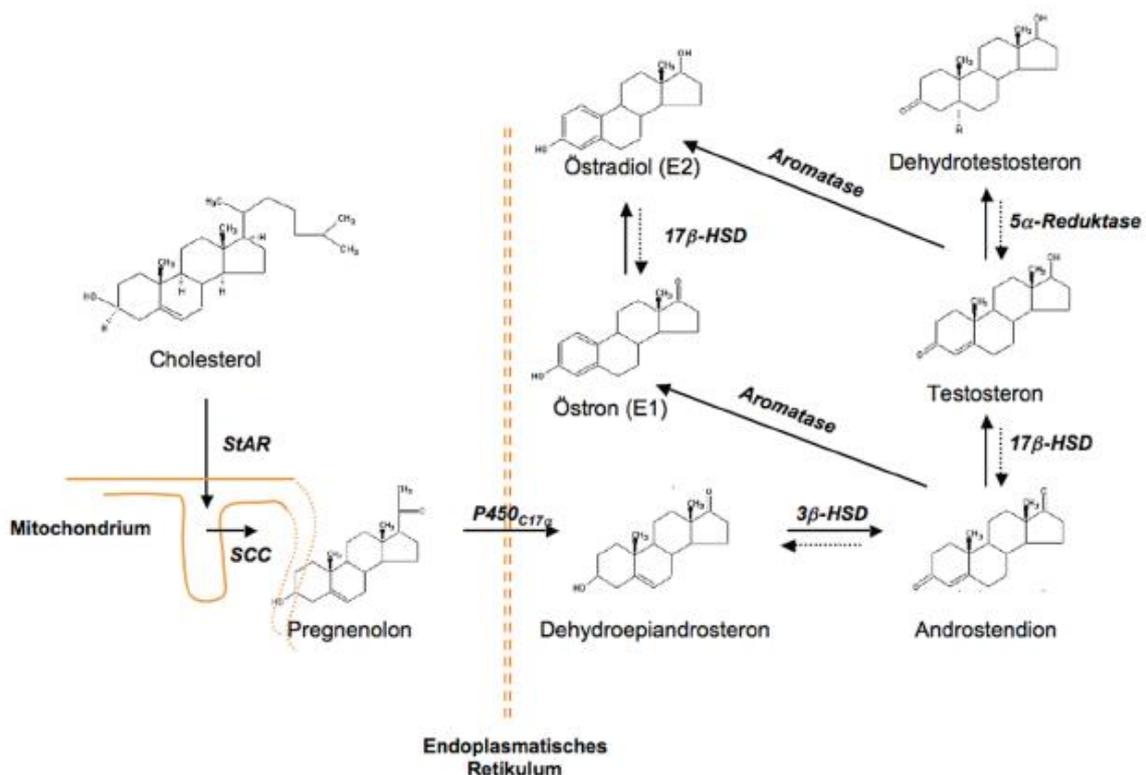


Abbildung 6: Schematische Abbildung der Testosteron- und Estrogensynthese. Cholesterol wird mittels StAR durch die mitochondriale Membran transportiert, die nächsten Schritte finden im Mitochondrium bzw. Endoplasmatischen Retikulum statt (Quelle: Fester et al. 2007, Neuroforum 4/07).

Ausgangssubstanz zur Testosteron- bzw. Estrogensynthese ist wie zuvor erwähnt immer Cholesterol, ein polyzyklischer Alkohol, der ein Sterangerüst besitzt. Die Hormonsynthese findet intrazellulär im Mitochondrium und im endoplasmatischen Retikulum statt. Das Mitochondrium verfügt über ein membranständiges Protein: *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR). Dieses transportiert Cholesterol vom Zytosol in das Mitochondrium und verfügt somit über eine wichtige regulierende Funktion (Filová et al. 2013). Im Mitochondrium wird aus Cholesterol Pregnenolon gebildet, das zu Progesteron oxidiert wird. Die folgenden Schritte finden im endoplasmatischen Retikulum statt. Aus Progesteron entsteht über Zwischenschritte, u. a. durch die Lyase 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD) aus Dehydroepiandrosteron (DHEA) Androstendion, welches zu Testosteron reduziert wird. Aus Testosteron kann mit Hilfe des Enzyms Aromatase (CYP19A1 oder Cytochrom P450 aro) 17 β -Estradiol (E2) gebildet werden. Ebenso katalysiert die Aromatase die Bildung von Estron aus Androstendion. Aus Testosteron wird die biologisch aktive Form Dihydrotestosteron (DHT) mit Hilfe der 5 α -Reduktase gebildet (Fester et al. 2009a, Prange-Kiel et al. 2013, Abb. 6)

Eine Arbeitsgruppe unseres Instituts um Wehrenberg konnte vor etwa 10 Jahren nachweisen, dass sowohl StAR-mRNA als auch Aromatase-mRNA in hippocampalen Neuronen und Gliazellen der Ratte vorhanden sind (Wehrenberg et al. 2001). Dieser Befund ließ wahrscheinlich erscheinen, dass auch im Hippocampus eine unabhängige Sexualhormonsynthese stattfinden kann. Das Vorhandensein von Aromatase beeinflusst dabei im Wesentlichen das Ausmaß der Estrogensynthese (Rune und Frotscher 2005, Mukai et al. 2006, Prange-Kiel et al. 2009, Fester et al. 2012). In dem Zusammenhang muss der Begriff „Neurosteroid“ erläutert werden: dies sind Steroide, die im Gehirn gebildet werden und dort ihre Wirkung entfalten. Dazu können Testosteron und Estrogen gezählt werden. Sie verfügen über Eigenschaften von Hormonen und Neuromodulatoren bzw. -transmittern (Robel et al. 1995, Compagnone und Mellon 2000, Balthazart und Ball 2006).

Für die Entwicklung und Differenzierung des Gehirns, insbesondere des Hippocampus, spielen T und E2 eine wichtige Rolle (McCarthy et al. 2008, Bowers et al. 2010, Candemir et al. 2013). Auch im Erwachsenenalter beeinflusst das Vorhandensein von Estrogenen und Androgenen direkt die synaptische Plastizität im Hippocampus (Gould et al. 1990, MacLusky et al. 2006, Filová et al. 2013).

1.5.1. Estrogen im Hippocampus

Das Hormon Estrogen kann im Organismus in drei Unterformen auftreten; die wichtigste und biologisch aktivste Form ist 17 β -Estradiol (E2), daneben existieren Estron (E1) und Estriol (E3). Gould et al. zeigten 1990, dass ovariectomierte weibliche Mäuse unter Synapsenverlust im Hippocampus leiden. Applizierte man diesen Tieren systemisch Estradiol, konnte dieser Effekt aufgehoben werden (Gould et al. 1990). Außerdem zeigte die Forschergruppe, dass die zyklischen Veränderungen des Estrogenspiegels im Körper sich auch auf die synaptische Plastizität auswirken (Woolley et al. 1990). Dieser zyklusabhängige Effekt, konnte nur für den Hippocampus nachgewiesen werden, nicht aber für den Neokortex oder das Cerebellum (Woolley et al. 1990, Prange-Kiel et al. 2008). Es wurde dementsprechend lange Zeit angenommen, dass sich die im gesamten Körper vorhandene Menge an gonadalem Estradiol auf die synaptische Plastizität im ZNS auswirkt. Jedoch wurden in den letzten Jahren Beobachtungen gemacht, wonach sich die Synapsenanzahl auch unabhängig von systemisch vorhandenem E2 verändern kann.

Messungen der E2-Konzentration im Medium von Hippocampus-Sliceulturen bestätigen, dass nach *in vitro* Behandlung mit dem Aromatasehemmer Letrozol die Estradiolsekretion abnimmt (Prange-Kiel et al. 2003). Dies führt auch zu einer Abnahme der Spinesynapsendichte und verminderten Bildung der synaptischen Proteine in hippocampalen Sliceulturen. Durch die zusätzliche Gabe von E2 kann dieser Effekt aufgehoben werden (sog. Rescue-Effekt) (Zhou et al. 2007). Durch die alleinige Zugabe von Estradiol kann bei *in vitro*-

Experimenten jedoch keine Zunahme der Spinesynapsendichte beobachtet werden, dies gilt für beide Geschlechter. Das zusammen spricht dafür, dass endogenes (d. h. im Hippocampus gebildetes) Estradiol die Synaptogenese induziert (Prange-Kiel und Rune 2006, Zhou et al. 2010, Fester et al. 2012). Denn, wie schon erwähnt, können Estrogene im Hippocampus *de novo* synthetisiert werden; in den Neuronen sind sowohl die benötigten Substrate (z. B. Cholesterol) als auch Enzyme (insbesondere die Aromatase) vorhanden (Kretz et al. 2004, Rune und Frotscher 2005, von Schassen et al. 2006, Fester et al. 2009a, Prange-Kiel et al. 2009). Dieser scheinbare Widerspruch zwischen gonadalem und hippocampalem E2 lässt sich schlüssig über die Bedeutung von GnRH erklären, welches zyklisch die Sexualhormonsynthese sowohl in den Gonaden als auch im Hippocampus steuern kann (s. o.). So stellt sich eine auto-/parakrine Regulation der Hormoneffekte dar (Prange-Kiel et al. 2003).

Zum Verständnis des Einflusses von Estradiol auf die Synapsenbildung muss man die Estrogenrezeptoren (ER) genauer betrachten. ER liegen zytosolisch und wirken nach Aktivierung als Transkriptionsfaktoren. Sie können somit die Morphologie von Synapsen beeinflussen (Garcia-Segura et al. 2001). Es handelt sich um intrazelluläre Steroidrezeptoren, wobei zwei Subtypen beschrieben sind: ER- α und ER- β . Beide spielen im Hippocampus eine bedeutende Rolle und verfügen über unterschiedliche Regulationsmechanismen (McEwen 2002, Prange-Kiel et al. 2003). Dabei ist vor allem der ER- α bedeutend für die Induktion der Synaptogenese (Mukai et al. 2006). Neueste Forschungsergebnisse aus unserem Labor konnten bestätigen, dass der ER- α die Information zum Synapsenwachstum empfängt. Der ER- β scheint vielmehr nach der Ovulation die Synapsenzahl zu reduzieren (Zhou et al. 2014). Wie im Speziellen durch Estradiol die Synapsenbildung angeregt wird, ist noch nicht abschließend geklärt und dazu gibt es verschiedene Hypothesen. Es werden genomische (langfristige Veränderung der Genexpression) sowie nicht-genomische (kurzfristige biochemische Veränderungen) Wege in Betracht gezogen. Durch eine veränderte Genexpression, kann es über eine vermehrte Spinophilin- und Aktinbildung zu einer Zunahme der Spinesynapsen kommen.

Durch Estradiol kann eine Phosphorylierung des Cofilin beobachtet werden, was zu einer Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts führt und die synaptische Plastizität aufrechterhält (Kramár et al. 2009). Zum anderen wird die Bedeutung von biochemischen Prozessen diskutiert, wie ein vermehrter Ca^{2+} -Influx bei hohen Estrogenkonzentrationen, wodurch sich über Zwischenschritte die synaptische Plastizität verändert (McEwen 2002, Hojo et al. 2004).

1.5.2. Testosteron im Hippocampus

Die metabolisch aktive Form von Testosteron ist Dihydrotestosteron (DHT), welche durch das Enzym 5 α -Reduktase gebildet wird. DHT kann im Gegensatz zu Testosteron nicht durch Aromatase zu Estradiol umgewandelt werden. Bei Betrachtung der Wirkung der Sexualhormone auf Hirnstrukturen und -funktion muss also differenziert werden, ob T, DHT oder E2 die entscheidende Rolle spielt. Testosteron kann theoretisch via Androgen- und Estrogenrezeptoren im Zytosol als Transkriptionsfaktor agieren, da Testosteron als DHT wirkt oder durch die Aromatase zu E2 umgewandelt werden kann. Die Testosteronsynthese, als notwendiger erster Schritt der Estrogensynthese, kann auch in Arealen des Gehirns, insbesondere im Hippocampus stattfinden. Alle dafür benötigten Enzyme und Substrate konnten dort nachgewiesen werden (Hojo et al. 2004, Filová et al. 2013). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass auch Testosteron einen wichtigen Einfluss auf die Synaptogenese im Hippocampus von männlichen und weiblichen Ratten haben muss und somit die Gehirnfunktion beeinflusst (Okamoto et al. 2012, Filová et al. 2013).

Vor etwa 10 Jahren wurde von Leranth und Mitarbeitern festgestellt, dass nach Gonadektomie in der CA1-Region des Hippocampus bei männlichen und weiblichen Ratten ein Verlust der Synapsendichte auftritt. Wurde bei orchietomierten männlichen Tieren systemisch Testosteron appliziert, stieg die Synapsenzahl wieder an. Da dieser Effekt bei männlichen Versuchstieren nicht mit Estradiol zu erreichen war, wird angenommen, dass Androgenrezeptoren (AR) im Hippocampus für diese Auswirkungen verantwortlich sind (Leranth et

al. 2003). Bei ovariectomierten weiblichen Versuchstieren konnte sowohl nach E2 als auch nach T und DHT-Behandlung ein Anstieg der Synapsendichte beobachtet werden (Leranth et al. 2004). Spritzer und Galea konnten 2007 zeigen, dass Testosteron und Dihydrotestosteron das Zellüberleben im Gyrus dentatus von männlichen Ratten positiv beeinflussten, was durch Estrogen nicht erzielt werden konnte (Spritzer und Galea, 2007). Experimente aus unserem Institut von Fester et al. bestätigten diese Ergebnisse; *in vitro* konnte die Synaptogenese im männlichen Rattenhippocampus durch Testosteron und DHT induziert werden, jedoch nicht durch Estradiol alleine. Dabei wurde auch gezeigt, dass die Behandlung mit Trilostan, ein Hemmer der Testosteronsynthese, die Synapsendichte im Hippocampus verringert (Fester et al. 2009a).

Jedoch bestehen noch Unklarheiten über den genauen Einfluss und Wirkmechanismus von Testosteron auf die hippocampale Synapsenbildung. Welche Rolle spielt GnRH dabei? Und wie unterscheiden sich männliche und weibliche Versuchstiere? Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung dieser Fragen beitragen.

1.6. Trilostan und Letrozol

Bei Trilostan und Letrozol handelt es sich um Substanzen, die gezielt auf die Steroidhormonsynthese einwirken können. Trilostan (Abb. 7) ist ein synthetisch hergestellter kompetitiver Hemmstoff, der früh in die Testosteronsynthese eingreift.

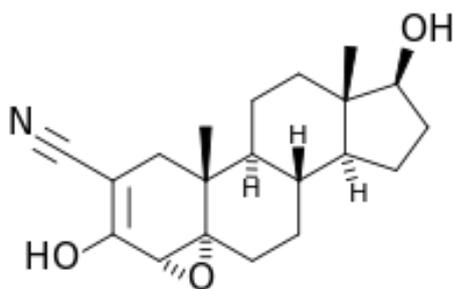


Abbildung 7: Strukturformel Trilostan
(Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/31/Trilostan.svg/200px-Trilostan.svg.png>).

Es hemmt die 3 β -HSD, welche DHEA zu Androstendion umwandelt. Dadurch wird die Bildung von Steroiden, d. h. Glucocorticoiden, Mineralcorticoiden und Androgenen gehemmt. Trilostan an sich ist nicht hormonell aktiv (Potts et al. 1978, Christiansen et al. 1984). Es wird klinisch vor allem in der Veterinärmedizin zur Behandlung des Cushing-Syndroms bei Pferden und Hunden eingesetzt (Sieber-Ruckstuhl et al. 2006). In der Humanmedizin wird Trilostan zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt: es wirkt sich hemmend auf das Tumorwachstum aus (Puddefoot et al. 2002), da durch die Hemmung der Testosteronsynthese letztendlich auch kein Estrogen gebildet werden kann.

Letrozol (Abb. 8) ist ein nicht-steroidaler Hemmstoff des Enzyms Aromatase, welche irreversibel zum einen die Bildung von Estrogen aus Testosteron und zum anderen die Bildung von Estron aus Androstendion katalysiert (Kretz et al. 2004, Abb. 6). In der Humanmedizin findet Letrozol vor allem bei der Therapie von hormonsensitiven Mammakarzinomen Anwendung, wodurch die Prognose der Erkrankung verbessert werden kann (Buwalda et al. 2013). Letrozol bindet an das Häm des Cytochrom-P450 der Aromatase und hemmt diese kompetitiv. Dadurch kann das Arzneimittel die Estrogenbiosynthese in der Peripherie und somit das estrogenbedingte Tumorwachstum unterdrücken. In zahlreichen wissenschaftlichen Experimenten wurde Letrozol als potenter Aromatasehemmer genutzt, z. B. zur Behandlung von hippocampalen Slicekulturen und senkt dabei nachweislich die Estradiolkonzentration (Zhou et al. 2010).

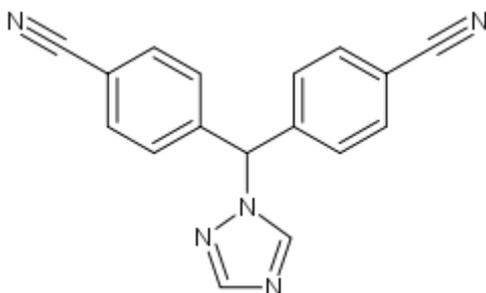


Abbildung 8: Strukturformel Letrozol

(Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/56/Letrozole.svg/250px-Letrozole.svg.png>).

1.7. Arbeitshypothese und Fragestellung

Untersuchungen in unserem Labor haben gezeigt, dass es bei GnRH-induzierter Synapsenbildung geschlechtsabhängige Unterschiede gibt. GnRH stimuliert in „weiblichen“ hippocampalen Schnittkulturen dosisabhängig die Estradiolsynthese und davon abhängig wird auch die Synapsendichte im Hippocampus hochreguliert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt durch eine stimulierende Wirkung von GnRH auf die Aromatase zustande kommt. In „männlichen“ Schnittkulturen zeigte sich zwar auch eine Erhöhung der Synapsendichte nach GnRH-Stimulation; diese ging jedoch nicht mit einer Stimulation der Estradiolsynthese einher, so dass nach diesem Ergebnis davon auszugehen ist, dass in „männlichen“ hippocampalen Schnittkulturen GnRH-induzierte Synaptogenese Aromatase-unabhängig stattfindet (Prange-Kiel et al. 2008).

Leranth und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Behandlung von gonadektomierten Tieren mit Androgenen sowohl im männlichen als auch im weiblichen Organismus eine Zunahme der Spinesynapsendichte nach sich zieht. Mit Estradiol ließ sich dieser Effekt nur im weiblichen Tier, nicht jedoch im männlichen Tier nachweisen (Leranth et al. 2004). Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit an „männlichen“ und „weiblichen“ hippocampalen Schnittkulturen der CA1-Region *in vitro* untersucht werden, ob Testosteron bei GnRH-induzierter synaptischer Plastizität im männlichen Tier eine ähnliche Bedeutung zukommt wie Estrogen im weiblichen. Es wird zum einen jeweils eine Hemmung der Testosteron- sowie Estrogensynthese (Trilostan bzw. Letrozol) und zum anderen eine Stimulation mit GnRH durchgeführt. Dazu werden, jeweils nach Geschlechtern getrennt, fünf unterschiedliche Behandlungen an CA1-Schnittkulturen durchgeführt (GnRH, Trilostan, Letrozol, GnRH+Trilostan, GnRH+Letrozol) und anschließend die Spinesynapsendichte anhand von Elektronenmikroskopie (EM) stereologisch ausgewertet.

Die Ergebnisse könnten in Zusammenschau mit anderen Untersuchungen u. a. zum besseren Verständnis der geschlechtsspezifischen Unterschiede neuropsychiatrischer Erkrankungen beitragen und eventuelle neue Behandlungsoptionen wie Hormontherapien rechtfertigen.

2. Material

2.1. Geräte

Brutschrank, 65 °C	MEMMERT
CO ₂ -Inkubator (37 °C)	HERAEUS
Deckgläser, 20 x 46 mm	MARIENFELD
Desinfektionsmittel	BODE
Diamantmesser	DIATOM
Einmalskalpell	BRAUN
Elektronenmikroskop MC 100	PHILIPS
Elektronenmikroskop, digital	OMEGA
Falcon Multiwell Cell Culture Plate, 6 wells	BECTON DICKINSON LAB.
Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml	GREINER BIO-ONE
Fotopapier Nr. 3, 24 x 30,5 cm	TETENAL
Gelatinekapseln	PLANO
Gildergrids	PLANO
Handschuhe, verschiedene Größen	ANSELL
Heidemannspatel	AESFULAP DE
Kopierfolien	LYRECO
Kosmetiktücher „tissue facials“	WEPA
Kühlschrank, 4 °C	LIEBHERR
Laserdrucker	CANON
Lichtmikroskop	ZEISS
Mikrotom (tissue chopper)	REICHERT JUNG
Mikrotom-Sicherheitsklinge	PROCTER-GAMBLE
Millicell-CM	MILLIPORE
Objektträger	HECHT-ASSISTENT
Petrischalen	BECTON DICKINSON LAB.
Pipetten	EPPENDORF AG
Pipettenspitzen	EPPENDORF AG
Präparationsbesteck	AESFULAP DE

Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Ultramikrotom	REICHERT-JUNG

2.2. Software

Adobe Photoshop 7.0	ADOBE
Citavi 3.4.0	SWISS ACADEMIC SOFTWARE
Excel 2010	MICROSOFT
iTEM	OLYMPUS SIS
Windows 7 Home Premium	MICROSOFT
Word 2010	MICROSOFT
SPSS Statistics 20.0	IBM

2.3. Chemikalien

2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	SERVA
Aqua dest.	ROTH
Blei-II-Citrat	MERCK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK
Ethanol 35 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %	MERCK
Eukobrom SW Papierentwickler	TETENAL
Fixierbad Superfix	TETENAL
Fixierbad-Prüfer	MERCK
Glucose	BRAUN
Glutamin	SIGMA
Glutaraldehyd, 2,5 %	MERCK
Glycidether	SERVA
Gonadotropin Releasing Hormone, L7134	SIGMA
Hanks Balanced Salts (HBSS)	GIBCO
HCl	MERCK

Horse Serum	GIBCO
Letrozol	TOCRIS
Minimum Essential Medium (MEM)	GIBCO
NaCl	BRAUN
Natriumhydrogenphosphat	MERCK
NaOH	MERCK
Negativentwickler KODAK D19	KODAK
Osmiumtetroxid	ROTH
PBS-Tabletten	GIBCO
Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Propylenoxid	SERVA
Saccharose	MERCK
Sodiumbicarbonat	SIGMA
Toluidinblau	CHROM
Trilostan	SRICI
Uranylacetat	MERCK

2.4. Lösungen

Präparationsmedium Slicekulturen:

- 50 ml MEM, 2-fach konzentriert
- 1 ml L-Glutamin, 200 mM
- 49 ml Aqua dest. Titration bis pH 7,35 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)
- Lagerung bei 4 °C

Inkubationsmedium Slicekulturen:

- 25 ml Minimal Essential Medium (MEM), 2-fach konzentriert
- 1 ml L-Glutamin 200 mM
- 580 µl 7,5 % Sodiumbicarbonat
- 25 ml HBSS
- 25 ml Horse Serum

- 1 ml Penicillin/Streptomycin Lösung
- 1560 µl Glucose 40 %
- 19 ml Aqua dest. (auf 100 ml auffüllen)
- Titration bis pH 7,25 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

PBS-Lösung:

- 1 Tablette (5 g) in 500 ml Aqua dest. lösen
- Titration bis pH 7,4 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

Phosphatpuffer 0,1 M:

- 1 ml 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat
- 1 ml 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat
- Mit Aqua dest. auf 10 ml auffüllen (pH 7,4)

Letrozolmischung:

- 10^{-4} M Letrozol-Stammlösung mit DMSO 1:1000 auf 10^{-7} M verdünnen

Trilostanmischung:

- 10^{-4} M Trilostan-Stammlösung mit DMSO 1:1000 auf 10^{-7} M verdünnen

GnRH-Mischung:

- 10^{-4} M GnRH-Stammlösung mit Aqua dest. 1:1000 auf 10^{-7} M verdünnen

3. Methoden

3.1. Eingesetzte Tiere

Alle Experimente dieser Versuchsreihe wurden an Hippocampus-Slicekulturen von männlichen sowie weiblichen Ratten *in vitro* durchgeführt. Die Versuche fanden unter Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben statt.

Die Gewebeproben entnahmen wir unter semisterilen Bedingungen von p4- bzw. p5-Ratten, d. h. die Tiere waren bei der Tötung vier bzw. fünf Tage alt. Die Ratten des Zuchtstammes Wistar (bereitgestellt durch die zentrale Tierhaltung des UKE) wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten und ihnen standen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Es wurden insgesamt acht männliche und sieben weibliche Tiere eingesetzt.

3.2. Präparation der Hippocampi und Inkubation der Gewebekulturen

Die Herstellung der hippocampalen Slicekulturen erfolgte in Anlehnung an die Methoden von Heimrich und Frotscher sowie Stoppini (Stoppini et al. 1991, Heimrich und Frotscher, 1993). Durch die Verwendung solcher Schnittkulturen wird der Einfluss von systemischen Prozessen und peripheren Organen auf das Versuchsergebnis weitestgehend minimiert.

Zur Entnahme des Gehirns wurde das Versuchstier enthauptet. Dann wurde durch einen Hautschnitt der knöcherne Schädel freigelegt und mit Hilfe einer feinen Schere durch einen median sagittalen Schnitt sowie zwei laterale Schnitte eröffnet. Nun konnten wir das Gehirn mit Hilfe eines Heidemannspatels herausnehmen. Die weitere Präparation erfolgte auf einem mit PBS getränkten Schwamm. Das Kleinhirn und der Hirnstamm wurden abpräpariert und die beiden Hemisphären wurden durch einen Mittelschnitt getrennt. Nun wurden die Hippocampi beidseits vorsichtig herauspräpariert und schnellstmöglich weiter-

verarbeitet. Wir legten die entnommenen Hippocampi in ein auf 4 °C gekühltes Präparationsmedium.

Um die Hippocampus-Schnitte zu erstellen, wurde das Gewebe mit einem „Tissue Chopper“ in jeweils 375 µm dicke Scheiben geschnitten. Dabei entstanden ca. 30 Slices pro Tier. Unter dem Lichtmikroskop trennten wir die Scheiben voneinander und prüften sie auf Vollständigkeit. Dabei wurde die korrekte Entnahme der CA1- und CA3-Region kontrolliert. Die Slices wurden einzeln auf eine durchlässige Biomembran (Millicell) gegeben, worunter sich ein Nährmedium mit Zucker und Salzen befand. Eine Membran wurde mit jeweils ca. 5 Slices belegt; dabei wurde auf eine geschlechtsspezifische Trennung geachtet. Anschließend übertrugen wir die Membranen auf 6-Well-Platten, in die wir pro Well 1 ml Inkubationsmedium vorlegten (pH 7,25). Überschüssiges Medium wurde mit einer Pipette von der Membran abgesaugt, so dass die Gewebeschnitte mit der Außenluft in Kontakt kamen. Die Wells wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Wir erneuerten das Inkubationsmedium alle 2 Tage, dabei wurde auf die richtige Einstellung des pH-Wertes geachtet. Nach einer viertägigen Vorkultur setzten wir die Stimulation ein. Die Gewebekulturen wurden in jeweils sechs männliche und sechs weibliche Gruppen unterteilt und wie folgt behandelt:

1. Kontrolle
2. GnRH 10⁻⁷ M (100 nM)
3. GnRH 10⁻⁷ M + Letrozol 10⁻⁷ M
4. GnRH 10⁻⁷ M + Trilostan 10⁻⁷ M
5. Letrozol 10⁻⁷ M
6. Trilostan 10⁻⁷ M

Dazu wurde jeden zweiten Tag die entsprechende Behandlungslösung zu den Gewebekulturen pro Well gegeben. Insgesamt behandelten wir die Schnitte viermal, die Stimulation erfolgte also über sieben Tage. Eine Gruppe, die nur mit einer DMSO-Lösung behandelt wurde, diente als Kontrolle.

Die verwendeten Konzentrationen und die Behandlungsdauer hatten sich in früheren Studien als geeignet herausgestellt (Prange-Kiel et al. 2008, Rune et al. 2006), so dass mit aussagekräftigen und vergleichbaren Effekten gerechnet werden konnte. Nach viertägiger Vorkultur und siebentägiger Stimulation erfolgte nach insgesamt 12 bzw. 13 Tagen die Fixierung und Einbettung der Gewebekulturen zur weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchung.

3.3. Fixierung der Slicekulturen für die Elektronenmikroskopie

Zur Fixierung der Hippocampus-Schnittkulturen mussten zunächst mehrere Spülungen in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) erfolgen. Das Inkubationsmedium wurde zunächst abgesaugt und verworfen, die Slicekulturen wurden zweimal in 37 °C warmem PB und einmal in 4 °C kaltem PB gespült. Danach folgte eine dreistündige Fixierung bei 4 °C mit 2,5 % Glutardialdehyd-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer. Der Vorgang wurde mit einer letzten Spülung in PB bei 4 °C terminiert. Zur Nachfixierung behandelten wir das Gewebe für eine halbe Stunde mit 1%igem Osmiumtetroxid in 0,05 M Phosphatpuffer mit Saccharose. Es folgte eine Dehydrierung mit Alkohol; dazu verwendeten wir jeweils für 15 Minuten unvergälltes Ethanol verdünnt mit Aqua dest. in aufsteigender Konzentration: 35 %, 50 %, 70 %, 96 % und abschließend 15 Minuten 100 % Ethanol unvergällt. Danach erfolgte die Behandlung mit Propylenoxid, jeweils zweimal für 15 Minuten, um Restwasser zu entziehen. Die nächsten 3 Stunden applizierten wir eine Propylenoxid/Glycidether-Gebrauchslösung (1:3), die einen Accelerator von 2 % 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol enthält.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte über Nacht zum Aushärten in einem auf 65 °C temperierten Brutschrank gelagert, nachdem wir sie in einen Tropfen Glycidether auf eine Silikonplatte gelegt und mit Folie abgedeckt hatten. Am nächsten Morgen wurden die Slicekulturen mitsamt der Folie herausgelöst und mit einer mit Glycidether gefüllten Gelatine kapsel versehen. Diese Schnittblöcke ließen wir eine weitere Nacht im Brutschrank aushärten.

Dann wurden die ausgehärteten Gewebelöcke geschnitten. Wir fertigten Semidünnschnitte von 1 μm Dicke mit Hilfe eines Mikrotoms mit Diamantmesser an. Diese Schnitte wurden frei schwimmend in Toluidinblau angefärbt. Dann wurde mit Hilfe einer Lupe gezielt die CA1-Region identifiziert. Davon fertigten wir mit einem Ultramikrotom Ultradünnschnitte von ca. 0,08 μm bis 0,1 μm Schnittdicke an. Um die Strukturen für die Elektronenmikroskopie sichtbar zu machen, wurden die Schnitte zunächst für 30 Minuten mit Uranylacetat und anschließend für 5 Minuten mit Bleicitrat kontrastiert. Diese Methode wurde erstmals von Reynolds beschrieben (Reynolds 1963).

3.4. Elektronenmikroskopie und Bildanalyse

Von den Hippocampus-Ultradünnschnitten wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt, an Hand derer wir die Veränderungen der synaptischen Plastizität auswerten konnten. Die Abbildungen wurden aus dem Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus entnommen, bei der Darstellung ergab sich eine Vergrößerung um den Faktor 6600. Es wurden Bildpaare angefertigt, sodass ein Schnitt „von oben“ und „von unten“ betrachtet werden konnte. In einem ersten Versuchsdurchlauf wurden die Bilder auf Negativen abgebildet, die anschließend im Fotolabor entwickelt wurden. Die Negative wurden auf 24 cm x 30 cm großes Fotopapier belichtet. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war der Rahmen der auszuwertenden Fläche immer 16,4 cm x 16,4 cm groß, was reellen 8 μm x 8 μm entsprach. Dies war die größtmögliche Rahmengröße mit möglichst kleinem Informationsverlust. Dadurch, dass zwei Bildpaare ein Volumen mit der Tiefe von 0,1 μm abbilden, entsprach ein Schnitt 6,4 μm^3 (8 μm x 8 μm x 0,1 μm).

In einem zweiten Versuchsdurchlauf wurden die Bilder mit einer digitalen Kamera aufgenommen. Diese Bilder wurden mittels der Software iTEM auf unserem Server gespeichert und mit einem Laserdrucker auf DIN-A4-Papier ausgedruckt. Bei dieser Vergrößerung ergab sich, entsprechend den o. g. 6,4 μm^3 , eine auszumessende Fläche von 12,1 cm x 12,1 cm.

Zur Auswertung wurde der Bereich mit der größtmöglichen Synapsendichte gewählt. Es wurden nur EM-Bilder zur Auszählung der Spinesynapsen verwendet, bei denen keine morphologischen Unregelmäßigkeiten oder störende Strukturen, wie große Dendriten oder Blutgefäße, auftraten. Bei der Auszählung, für die der Untersucher verblindet wurde, wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Bilder („reference“ und „look-up“) nach einem standardisierten Verfahren miteinander verglichen (Dissectortechnik) (Sterio 1984, Leranth et al. 2000). Dabei zählten wir diejenigen Synapsen, die auf den paarigen Bildern nur einmal zu sehen waren. Konnte man dieselbe Synapse auf beiden Bildern wiederfinden, wurde sie nicht mitgezählt. Als Spinesynapse galten Strukturen, die

1. über eine präsynaptische Membran verfügten,
2. einen synaptischen Spalt aufwiesen,
3. über eine postsynaptische Membran verfügten,
4. elektronische Verdichtungen postsynaptisch zeigten und
5. Vesikelformationen präsynaptisch zeigten.

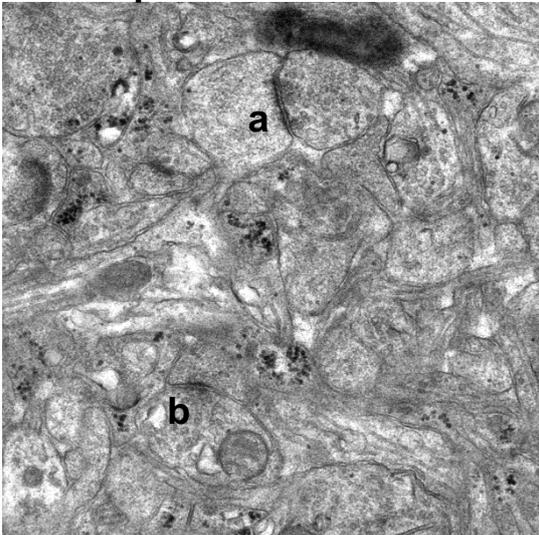
Konnten drei der fünf oben genannten Kriterien nachgewiesen werden, wurde die Struktur als Synapse gewertet. Es handelte sich um asymmetrische, neu gebildete, exzitatorische Spinesynapsen. Schaftsynapsen wurden nicht gezählt. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung mittels ANOVA.

4. Ergebnisse

4.1. Quantitative Bestimmung der Spinesynapsendichte

Ein Hippocampus-Slice entsprach $n = 1$. Die n -Zahl variierte je nach Gruppe zwischen sechs und 12. Ein Slice setzte sich aus vier Bildpaaren zusammen, die wie oben beschrieben ausgezählt wurden. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Synapsenanzahl pro $6,4 \mu\text{m}^3$ berechnet. Abbildung 9 zeigt beispielhaft eine mögliche Synapsenpaarung.

Look-up



Reference

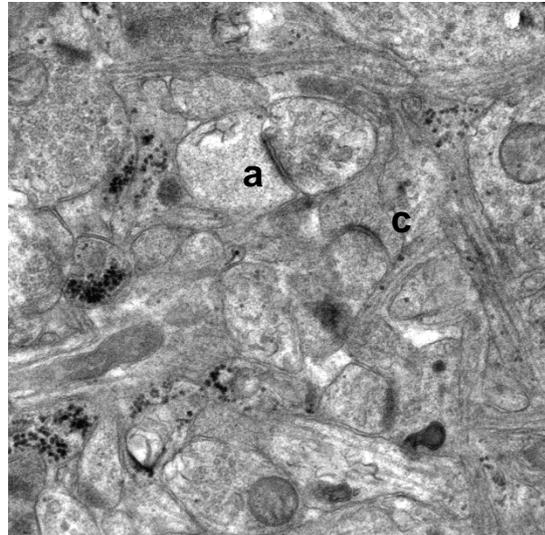


Abbildung 9: Ausschnitt einer elektronenmikroskopischen Darstellung von Spinesynapsen der männlichen Kontrollgruppe. In diesem Bildausschnitt wurden 2 Synapsen (b und c) gezählt; Synapse a wird nicht gezählt, da sie in „look-up“ und „reference“ zu sehen ist.

Bei allen Gruppen wurden keine morphologischen Veränderungen durch die chemischen Behandlungen festgestellt; es wurden in allen Gruppen intakte Spinesynapsen gefunden. Um Mittelwertunterschiede auf ihre statistische Varianz hin zu prüfen, wurde mit Hilfe von SPSS - nach Überprüfung der Normalverteilung der Ergebnisse mittels Histogramm - eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Anschließend wurden die Gruppen post-hoc mit Fisher's LSD-Test auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte überprüft. Der Grenzwert lag dabei bei $p < 0,05$.

4.2. Männliche Ratten

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der männlichen Schnittkulturen in einer Übersicht dargestellt; es sind die Gruppe, n-Zahl sowie der ermittelte Mittelwert mit Standardfehler aufgezeigt.

Tabelle 1: Übersicht der Ergebnisse (männlich, auf zwei Dezimalstellen gerundet).

Gruppe	n	Mittelwert (\pmSEM) Synapsenanzahl/6,4 μm^3
Kontrolle	12	6,63 (\pm 0,32)
GnRH	9	7,89 (\pm 0,27)
GnRH + Trilostan	9	5,42 (\pm 0,24)
GnRH + Letrozol	9	7,08 (\pm 0,66)
Trilostan	9	5,42 (\pm 0,36)
Letrozol	9	6,53 (\pm 0,46)

Abbildung 10 zeigt die Veränderungen der Synapsenanzahl in der CA1-Region des Hippocampus nach den unterschiedlichen Behandlungen der Slicekulturen. Auf der Y-Achse ist der Mittelwert der Spinesynapsenanzahl pro Bildpaar (entspricht 6,4 μm^3) dargestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungsgruppen aufgezeigt.

Es konnte ein signifikanter Zuwachs der Synapsendichte nach Behandlung mit GnRH im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden ($p = 0,04$). Bei Behandlung mit GnRH und Trilostan trat ein signifikanter Synapsenverlust ($p = 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle auf. Im Vergleich zu GnRH bestand dabei ein höchst signifikanter Unterschied ($p = 0,0003$). Die Behandlung mit GnRH und Letrozol ließ keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle oder GnRH-Gruppe feststellen. Der Unterschied zwischen der GnRH+Letrozol und

GnRH+Trilostan Gruppe war signifikant ($p = 0,01$). Die alleinige Behandlung mit Trilostan führte zu einer signifikanten Abnahme ($p = 0,05$) der Synapsenanzahl gegenüber der Kontrolle. Durch eine Behandlung mit Letrozol konnte bei männlichen Versuchstieren keine signifikante Veränderung der Synapsenanzahl gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Vergleicht man die mit GnRH behandelten Slices mit den mit nur Trilostan oder Letrozol behandelten Gruppen, so konnte hier auch jeweils eine signifikante Abnahme der Synapsenanzahl beobachtet werden ($p = 0,0003$ (Trilostan) bzw. $p = 0,04$ (Letrozol)).

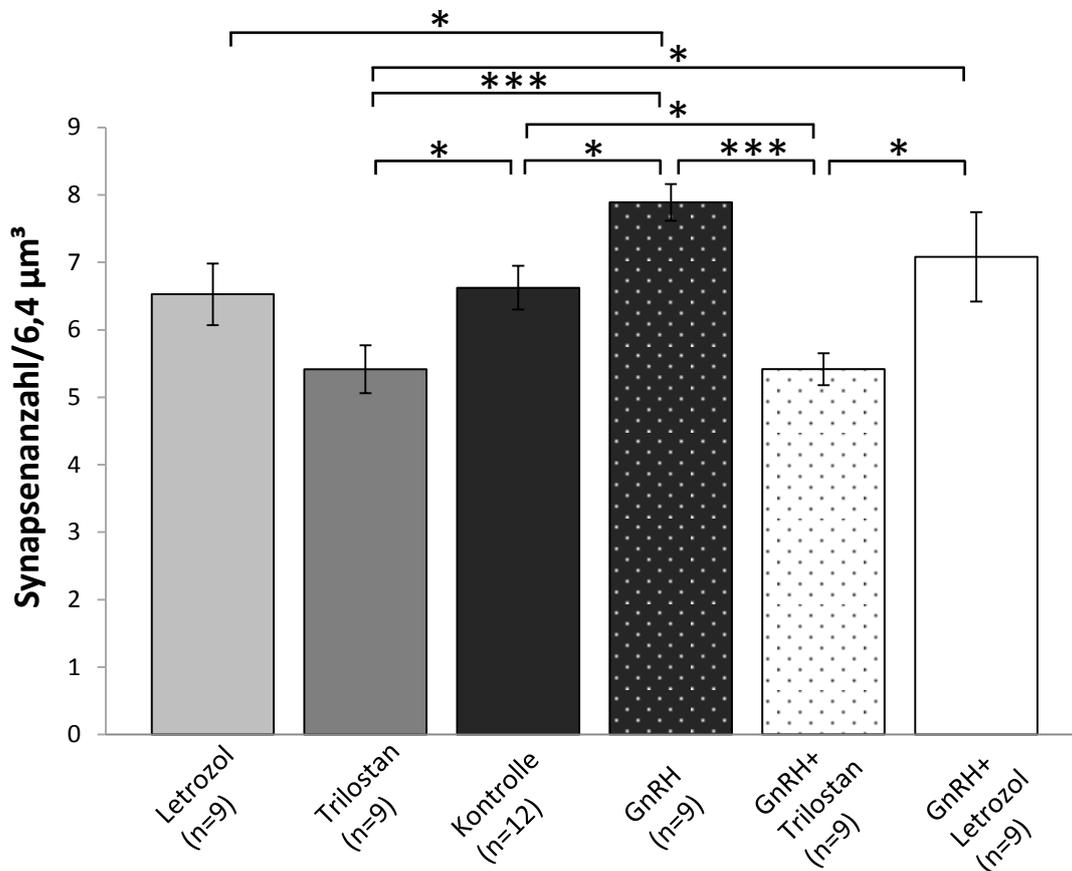


Abbildung 10: männliche Ratten, Veränderungen in der Synapsenanzahl nach unterschiedlichen Behandlungen, CA1-Region des Hippocampus, dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Betrachtet man die durch GnRH hervorgerufenen Effekte genauer, so kann festgestellt werden, dass durch die Behandlung mit GnRH ein Synapsenzuwachs von 19 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht wurde (nicht dargestellt).

Wurde zusätzlich zu GnRH der Testosteronsynthesehemmer Trilostan hinzugegeben, nahm die Synapsenanzahl im Vergleich zu GnRH um 31 % ab; dies war signifikant. Bei Letrozol waren es 10 %, was nicht signifikant war (Abb. 11).

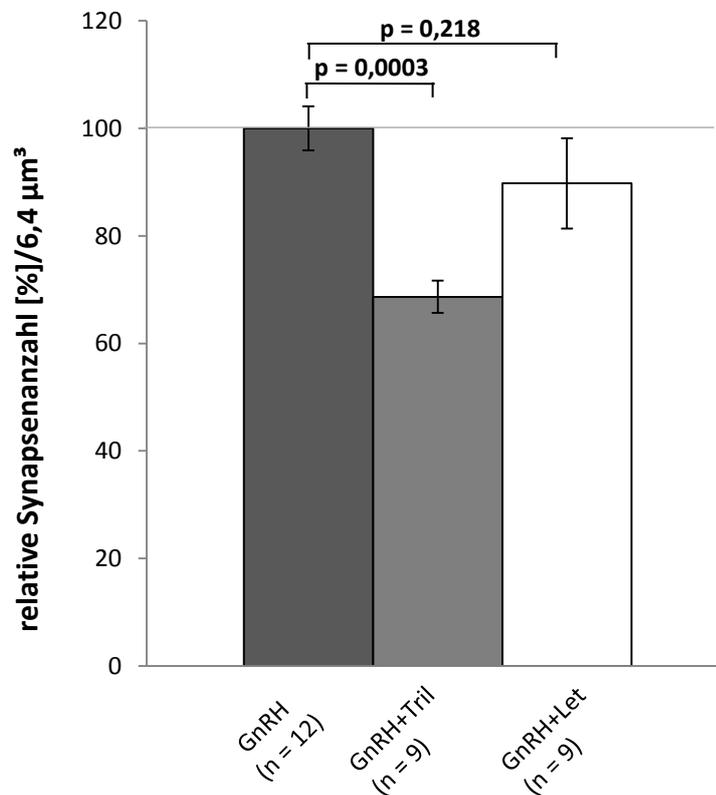


Abbildung 11: relative Anzahl der Spinesynapsen hippocampaler Sliceulturen männlicher Ratten nach Behandlung mit GnRH ± Trilostan bzw. ± Letrozol, Kontrolle nicht dargestellt; GnRH entspricht 100 %. Es sind die prozentualen Veränderungen der Mittelwerte ± SEM und p-Werte dargestellt.

4.3. Weibliche Ratten

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die weiblichen Gruppen, n-Zahl und ermittelten Mittelwert sowie den dazugehörigen Standardfehler.

Tabelle 2: Übersicht der Ergebnisse (weiblich, auf zwei Dezimalstellen gerundet).

Gruppe	n	Mittelwert (\pmSEM) Synapsenanzahl/6,4 μm^3
Kontrolle	9	7,39 (\pm 0,58)
GnRH	6	8,63 (\pm 0,7)
GnRH + Trilostan	6	6,08 (\pm 0,84)
GnRH + Letrozol	6	6,67 (\pm 0,22)
Trilostan	6	5,88 (\pm 0,59)
Letrozol	6	5,54 (\pm 0,55)

Abbildung 12 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der weiblichen Versuchstiere, der Diagrammaufbau ist entsprechend dem der männlichen Tiere (s. o.).

Es zeigte sich nach Behandlung mit GnRH tendenziell eine Zunahme der Synapsenanzahl gegenüber der Kontrollgruppe; dies stellte sich hier jedoch nicht signifikant dar. Wurden die Slices zusätzlich zu GnRH mit Letrozol behandelt, kam es zu einem Abfall der Synapsenanzahl, der im Vergleich zu GnRH signifikant war ($p = 0,02$). Dasselbe gilt für die zusätzliche Zugabe von Trilostan ($p = 0,002$); hier war der Effekt sehr signifikant. Die alleinige Behandlung mit dem Aromatasehemmer Letrozol bewirkte einen signifikanten Synapsenverlust im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,01$). Trilostan erzielte einen ähnlichen Effekt ($p = 0,04$). Im Vergleich zu der GnRH-Gruppe waren diese

Unterschiede höchst signifikant ($p = 0,0009$ (Trilostan) bzw. $p = 0,002$ (Letrozol)).

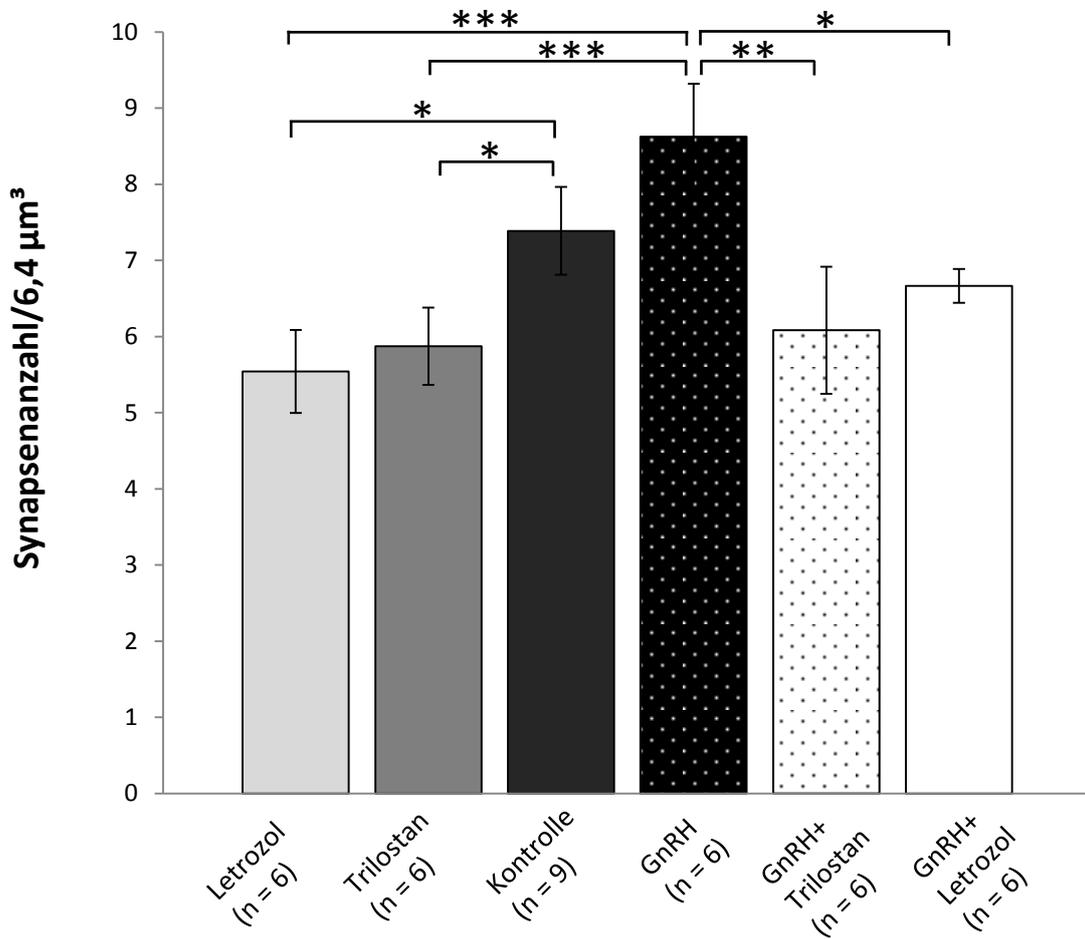


Abbildung 12: Weibliche Ratten, Veränderungen in der Synapsenzahl nach unterschiedlichen Behandlungen, CA1-Region des Hippocampus, dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Betrachtet man bei den weiblichen Versuchstieren die prozentualen Veränderungen nach der Behandlung mit GnRH, so ließ sich im Vergleich zur Kontrolle ein Zuwachs von 17 % feststellen (nicht dargestellt).

Die zusätzliche Behandlung mit Letrozol führte zu einer Abnahme der Synapsenanzahl um 23 % im Vergleich zu der GnRH-Gruppe. Bei GnRH in Kombination mit Trilostan betrug die Differenz 29 % im Vergleich zu GnRH alleine. So wurde bei den weiblichen Tieren bei den mit GnRH behandelten Slices sowohl durch Trilostan als auch durch Letrozol ein signifikanter Synapsenverlust erzielt (Abb. 13).

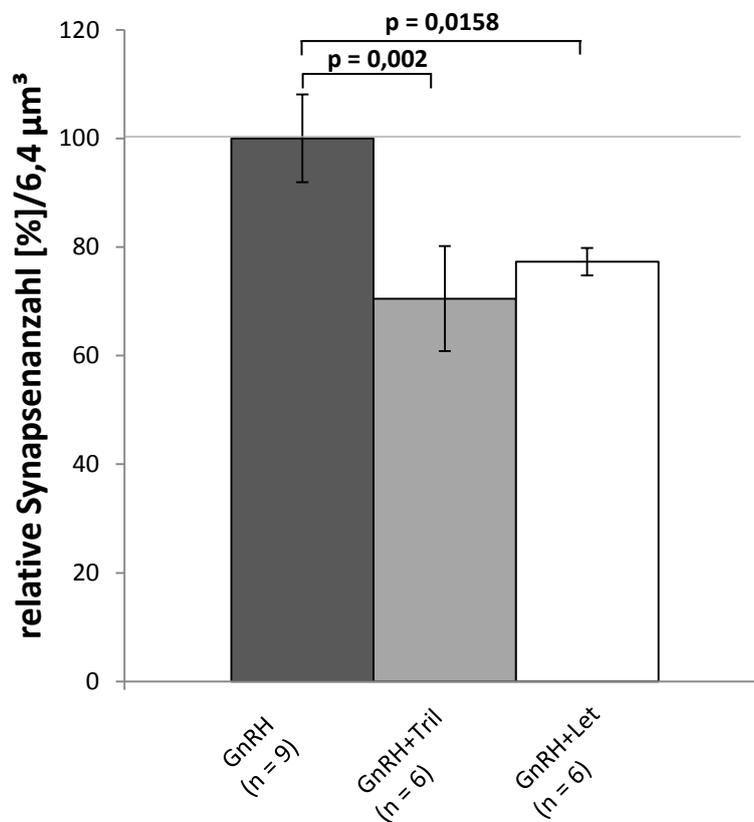


Abbildung 13: relative Anzahl der Spinesynapsen hippocampaler Sliceulturen weiblicher Ratten nach Behandlung mit GnRH ±Trilostan bzw. ±Letrozol, Kontrolle nicht dargestellt. GnRH entspricht 100 %. Es sind die prozentualen Veränderungen der Mittelwerte ± SEM und p-Werte dargestellt.

4.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse im Geschlechtervergleich

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse im Hinblick auf geschlechtsspezifische Unterschiede gegenüberstellen: bei weiblichen Tieren konnte die Synapsenzahl durch Aromatasehemmung mit Letrozol signifikant reduziert werden; dies war bei männlichen Tieren nicht der Fall. Betrachtet man die mit GnRH behandelten Slicekulturen, so ließ sich auch hier ein sexspezifischer Unterschied erkennen: bei weiblichen Tieren konnte die Synapsenzahl durch die Zugabe von Trilostan und Letrozol signifikant reduziert werden, bei männlichen Tieren gelang dies nur durch Trilostan. Bei den männlichen Slicekulturen ist außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen der GnRH+Trilostan- und GnRH+Letrozol-Gruppe zu erkennen (Abb. 14).

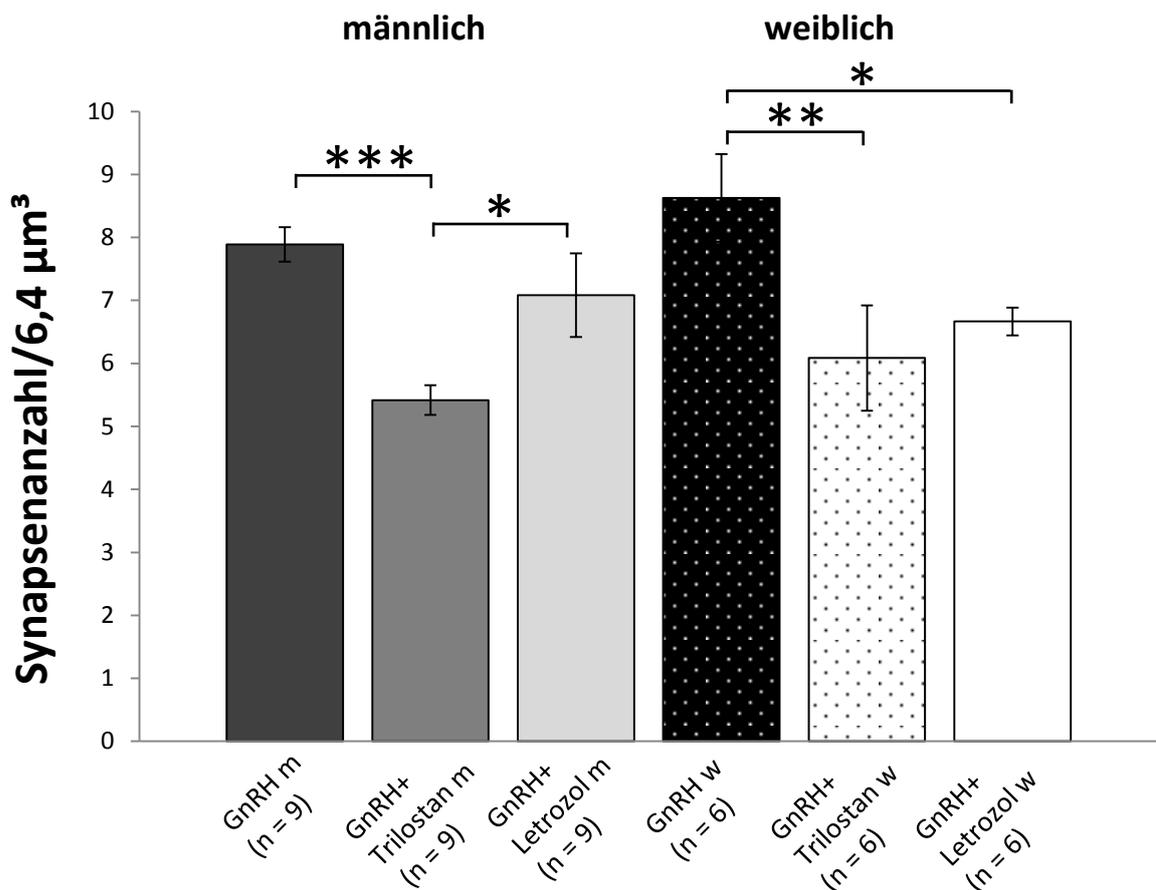


Abbildung 14: Veränderungen der Synapsenzahl nach GnRH-Behandlungen (\pm Letrozol \pm Trilostan) im Geschlechtervergleich; CA1-Region des Hippocampus, dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, geschlechtsspezifische Unterschiede bei der sexualhormoninduzierten Synaptogenese zu untersuchen. Zur Interpretation der Ergebnisse muss der Ablauf der Sexualhormonsynthese und die Bedeutung der darin agierenden Enzyme betrachtet werden: Testosteron wird aus Cholesterol über mehrere Zwischenschritte mit Hilfe des Enzyms 3β -HSD gebildet, welches durch Trilostan gehemmt werden kann. Aus Testosteron kann einerseits mit Hilfe des Enzyms Aromatase (hemmbar durch Letrozol) 17β -Estradiol gebildet werden, andererseits ist durch die 5α -Reduktase eine Umwandlung zum nicht aromatisierbaren DHT möglich. GnRH ist darüber hinaus im Vorfeld wichtig, es wird im Hypothalamus gebildet und stimuliert die Steroidhormonsynthese (Prange-Kiel et al. 2013).

Es zeigte sich bei unseren Versuchen, dass bei männlichen Ratten durch Hemmung der Aromatase die Spinesynapsenbildung in der CA1-Region des Hippocampus nicht auf dieselbe Art und Weise reduziert wurde wie bei weiblichen Versuchstieren. Wir konnten bestätigen, dass die Behandlung der Schnittkulturen mit Letrozol zu einem signifikanten Synapsenverlust bei weiblichen Tieren führt, jedoch nicht bei männlichen Tieren. Außerdem wurde bestätigt, dass es bei beiden Geschlechtern durch Trilostanbehandlung zu einem signifikanten Synapsenverlust kommt. Ein Zuwachs der Synapsenanzahl nach der Behandlung mit GnRH kann bei beiden Geschlechtern festgestellt werden; dieser war jedoch nur bei den männlichen Schnittkulturen signifikant.

Neue Erkenntnisse ergaben sich durch die gemeinsame Behandlung mit GnRH und Letrozol bzw. Trilostan. Es ließ sich bei beiden Geschlechtern der GnRH-induzierte Synapsenzuwachs durch Trilostan signifikant reduzieren. Mit Letrozol konnte dies nur bei weiblichen Tieren erreicht werden; bei den männlichen Tieren hatte die Hemmung der Aromatase keinen signifikanten Effekt auf den GnRH-induzierten Synapsenanstieg.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass Testosteron im männlichen Tier aromatasenunabhängig, d. h. ohne die Umwandlung zu Estradiol, die Synapsenbildung induzieren kann. Dabei drängen sich folgende Fragen auf, die ich im Folgenden diskutieren möchte:

- Wie kommen die Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu Stande? Welche Rolle spielen dabei die Estrogen- und Androgenrezeptoren?
- Welche Rückschlüsse lassen sich auf die Bedeutung von GnRH in Bezug auf die synaptische Plastizität ziehen?
- Wie wird das Gedächtnis und Lernen (bzw. die LTP) von den Sexualhormonen beeinflusst? Wie sieht ein möglicher Wirkmechanismus aus und welche Bedeutung hat der NMDA-Rezeptor dabei?
- Was bedeuten die Ergebnisse im klinischen Kontext und für den medizinischen Alltag?

5.1. Bedeutung der Androgen- und Estrogenrezeptoren im Hippocampus

Vor etwa 10 Jahren beobachteten Leranth und Mitarbeiter erstmals sexabhängige Unterschiede der estrogeninduzierten synaptischen Plastizität. Sie untersuchten in einer ersten Versuchsreihe die CA1-Region des Hippocampus von männlichen orchietomierten Tieren. Diese wurden *in vivo* entweder mit Testosteronpropionat (TP, welches zu Estradiol aromatisiert werden kann) oder DHT (ein nicht aromatisierbares Androgen) oder E2 behandelt. Hippocampus-Sliceulturen dieser Tiere wurden dann hinsichtlich einer Veränderung der Synapsenanzahl untersucht. Dabei konnte der durch Gonadektomie ausgelöste signifikante Synapsenverlust im Vergleich zum Kontrolltier durch die Zugabe von TP und DHT wieder aufgehoben werden. Bei der Zugabe von E2 blieb es bei einer signifikant erniedrigten Synapsenanzahl im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15). Dies erlaubte die Schlussfolgerung, dass bei männlichen Tieren ein Aufrechterhalten der synaptischen Plastizität durch Testosteron bzw. DHT und nicht durch Estradiol stattfindet (Leranth et al. 2003).

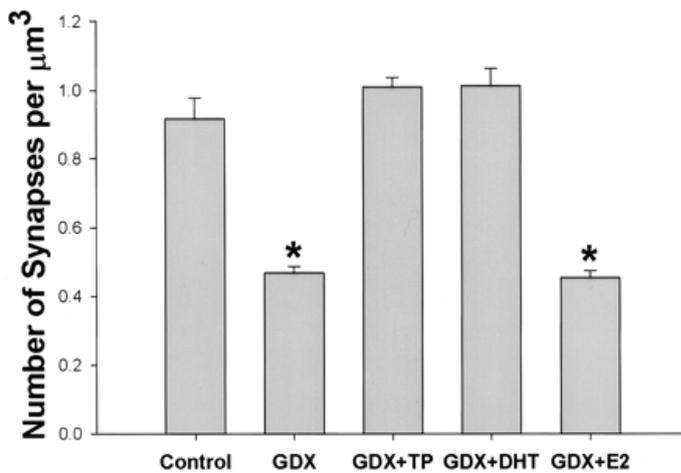


Abbildung 15:

Spinesynapsendichte CA1-Region des Hippocampus männlicher Ratten. Nach Gonadektomie blieb durch E2-Behandlung ein signifikanter Synapsenverlust bestehen. Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,05$ (Leranth et al. 2003).

In einem folgenden Experiment wurde die synaptische Plastizität in der CA1-Region des Hippocampus bei weiblichen ovariectomierten (OVX) Versuchstieren untersucht. Nach der Entfernung der Ovarien kommt es bekanntermaßen zu einem Verlust von Spinesynapsen, welcher durch die Gabe von E2 aufgehoben werden kann (Woolley und McEwen 1994, Leranth et al. 2000). Wurden die OVX-Ratten *in vivo* mit TP oder DHT behandelt, konnte in den Schnittkulturen jeweils wieder eine Zunahme der Synapsenanzahl beobachtet werden. Wurde außerdem der Aromatasehemmer Letrozol hinzugefügt, blieb die Spinesynapsenanzahl bei der mit TP behandelten Gruppe auf dem Niveau der ovariectomierten Kontrollgruppe, die Spinesynapsenanzahl der mit DHT und Letrozol behandelten Tiere blieb signifikant erhöht (Leranth et al. 2004, Abb. 16).

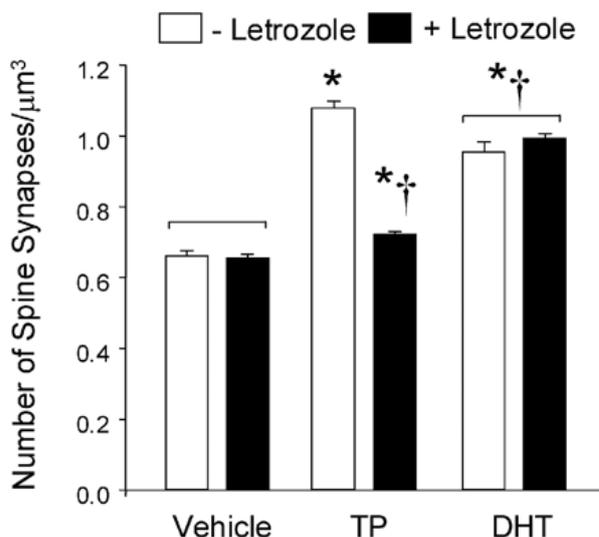


Abbildung 16: Spinesynapsendichte CA1-Region der weiblichen Ratte. Mittelwert \pm SEM

* signifikanter Unterschied zu OVX-Vehicle-Gruppe

† signifikanter Unterschied zu OVX-TP-Gruppe

Klammern: keine signifikanten

Unterschiede (Leranth et al. 2004).

Zusammen lassen diese Ergebnisse schlussfolgern, dass Androgene die synaptische Plastizität bei männlichen und weiblichen Tieren sowohl durch Aromatase-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen induzieren können. Bei männlichen Tieren scheint die Synaptogenese unabhängig von Estradiol zu erfolgen. Dies ist mit unseren Ergebnissen vereinbar, da hier nur bei den weiblichen Schnittkulturen eine Blockade der E2-Synthese zu einer signifikant reduzierten Synapsenanzahl (im Vergleich zur Kontrolle bzw. im Vergleich zur GnRH-Behandlung) geführt hat.

Aufgrund dieser Ergebnisse muss die Rolle des Androgenrezeptors näher betrachtet werden. MacLusky et al. publizierten 2006 eine Studie, die die Bedeutung von AR anhand von männlichen „testicular feminization“ (*tfm*) - Ratten untersuchte. Diese Ratten besitzen durch einen veränderten Genotyp einen defekten AR mit verminderter Bindungskapazität; die phänotypisch männlichen Geschlechtsmerkmale fehlen (MacLusky et al. 2006). Dabei zeigte sich ein zunächst erstaunliches Ergebnis: sowohl die *in vivo* mit DHT als auch die mit Hydroxyflutamid (Antiandrogen) behandelten Gruppen zeigten einen signifikanten Synapsenzuwachs in der CA1-Region des Hippocampus. Es gab keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem *tfm*-Typ. Bei beiden Gruppen konnte durch Estradiolbenzoat (EB) kein Synapsenzuwachs beobachtet werden. Doch warum führt DHT auch bei *tfm*-Ratten zu einem Synapsenzuwachs und was bedeutet das für die Rolle der AR? Es könnte bedeuten, dass sich die Androgenrezeptoren im Hippocampus von denen im restlichen Körper unterscheiden oder Liganden, die den Rezeptor ko-aktivieren, spielen eine Rolle. Es könnte auch ein ganz von AR unabhängiger Mechanismus bestehen, der die synaptische Plastizität kontrolliert. Zum Beispiel wäre möglich, dass DHT mit Hilfe GABA-erger Neurotransmitter die Synaptogenese reguliert (MacLusky et al. 2006, Hajszan et al. 2008).

Jedoch gibt es hinsichtlich der Rolle von Androgenrezeptoren im Hippocampus und anderen Gehirnarealen auch andere, konträre Ergebnisse. Das Vorhandensein von AR im Hippocampus konnte mehrfach nachgewiesen

werden. Xiao und Jordan (2002) wiesen AR anhand von Immunoreaktivität nach und beobachteten eine ähnliche Responsivität auf Androgene bei männlichen und weiblichen Versuchstieren (Xiao und Jordan, 2002). Hamson et al. untersuchten die Expression von AR im Gyrus dentatus des Hippocampus nach Hormonbehandlungen, auch an *tfm*-Ratten. Sie konnten nachweisen, dass DHT die synaptische Plastizität im DG männlicher Ratten reguliert, jedoch konnten keine AR im DG nachgewiesen werden. So muss davon ausgegangen werden, dass diese in anderen Hippocampus-Regionen wie CA1 oder CA3 liegen (Hamson et al. 2013). Es wird deutlich, dass hier besonders viele Unklarheiten bestehen und die Bedeutung von Androgenrezeptoren im Hippocampus weiter untersucht werden muss.

Die Rolle der Estrogenrezeptoren für die synaptische Plastizität wurde hingegen in der Vergangenheit schon mehrfach überprüft und erscheint verständlicher als die Rolle der AR. Wie schon eingangs erwähnt konnte in unserem Institut nachgewiesen werden, dass über den ER- α die Synapsendichte im Hippocampus weiblicher Tiere reguliert wird. Durch Bindung von Estradiol an diesen Rezeptor kommt es zu einer Induktion der Genexpression und Synapsen werden neu gebildet (Zhou et al. 2014). Dieser Signalweg kann entweder nicht-genomisch, also kurzfristig, oder genomisch (längerfristig) erfolgen (McEwen 2002). Der ER- β hat eher eine gegensätzliche Rolle, da durch Agonisten dieses Rezeptors die Synapsendichte herunterreguliert wird. Dies ergibt einen Erklärungsansatz für die zyklischen Veränderungen der Spinesynapsenanzahl bei weiblichen Tieren: nach der Ovulation nimmt die Synapsendichte ab, dies kann demzufolge durch ER- β reguliert werden (Zhou et al. 2014).

5.2. Vergleich zwischen hippocampal und gonadal gebildetem Estradiol und Testosteron

Von Kretz und Mitarbeitern wurde vor etwa 10 Jahren die Bedeutung der exogenen (d. h. gonadalen) bzw. endogenen (d. h. hippocampalen) Estrogensynthese für die synaptische Plastizität an hippocampalen Slice- und Dispersionskulturen *in vitro* untersucht. Sie stellten fest, dass durch die Inhibition der Aromatase durch Letrozol eine Reduzierung der Spinesynapsenanzahl sowie der Proteine Spinophilin und Synaptophysin stattfand. Durch Zugabe von E2 konnte jedoch keine Zunahme der Synapsendichte beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass im Hippocampus *de novo* gebildetes Estradiol für die synaptische Plastizität entscheidend ist (Kretz et al. 2004).

Die Arbeit von Fester et al. (2012) fasst zusammen, dass es bezüglich der Estrogensynthese im Hippocampus geschlechtsspezifische Unterschiede gibt. *In vitro* war kein Unterschied hinsichtlich der Estrogensyntheseleistung im Medium von Hippocampus-Slice-Kulturen festzustellen. Beide reagierten ähnlich auf Inhibition der Aromatase und die Effekte konnten durch die zusätzliche Gabe von E2 aufgehoben werden. Jedoch konnte nach *in vivo*-Behandlung mit Letrozol ein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen festgestellt werden; im männlichen Hippocampus-Gewebe konnte kein E2 detektiert werden, bei weiblichen Gewebe wurden bedeutsame Estrogenkonzentrationen festgestellt. Die Erklärung für diese Ergebnisse kann auf der Bedeutung des GnRH (s. u.) basieren (Fester et al. 2012).

Es ist außerdem wichtig, die unterschiedlichen Konzentrationen von Estradiol und Testosteron im Serum und im Hippocampus zu betrachten, wenn Rückschlüsse auf die hormoninduzierte Synaptogenese gezogen werden. Bei geringer Estrogensynthese muss konsequenterweise davon ausgegangen werden, dass die DHT-Konzentration ansteigt, da das anfallende Testosteron nun ausschließlich zu DHT umgewandelt werden kann (Abb. 17).

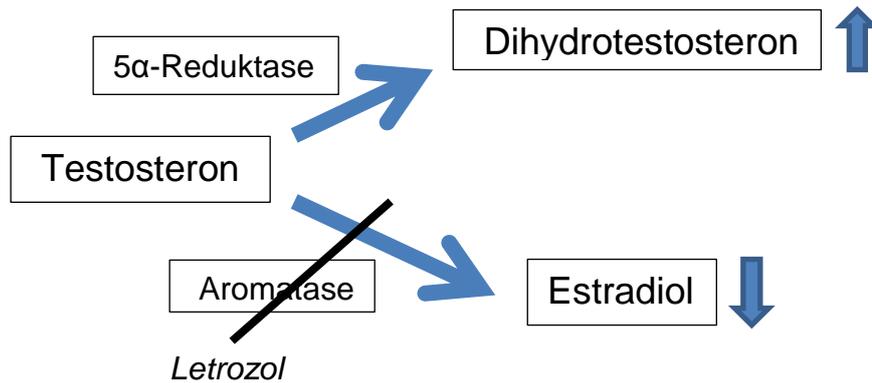


Abbildung 17: Durch Hemmung der Aromatase durch Letrozol kommt es zu einem vermehrten Substrataufkommen von Testosteron, das zu DHT umgewandelt wird.

Die in Experimenten verwendeten Hormonkonzentrationen unterscheiden sich häufig von den physiologisch vorhandenen (Brandt et al. 2013). Die Hormonkonzentrationen (von E2, T, DHT, PREG, DHEA etc.) können z. B. mittels RIA im Kulturmedium von hippocampalen Slicekulturen gemessen werden. Dabei zeigt sich z. B. nach Gonadektomie eine verringerte Menge an T im Hippocampus männlicher Ratten und in der Peripherie ist fast kein T mehr nachweisbar (Hojo et al. 2004). Auch konnten im Hippocampus generell höhere Hormonkonzentrationen gemessen werden als im Plasma (Fester et al. 2011). Diese Ergebnisse machen wiederum die Bedeutung von endogenem E2 bzw. T für die Synaptogenese deutlich.

Diese Beobachtungen - zusammen betrachtet - ergeben vermeintlich eine Diskrepanz, da zum einen die Synapsenanzahl bei weiblichen Tieren zyklischen Veränderungen unterliegt (Gould et al. 1990) aber zum anderen exogenes Estradiol keinen Einfluss auf die Synapsenanzahl zu haben scheint. Eine Erklärung dafür kann wie eingangs erwähnt bei GnRH liegen, das zyklisch sowohl in den Gonaden als auch im Gehirn die Sexualhormonsynthese reguliert (Zhou et al. 2010, Brandt et al. 2013). Diese Hypothese wird durch die hier vorliegenden Ergebnisse bekräftigt, da hier *in vitro* durch GnRH-Behandlung die Spinesynapsendichte in den Hippocampus-Schnittkulturen ansteigt. Durch eine lokale Hemmung der Testosteron- bzw. Estradiolsynthese trat - abhängig vom

Geschlecht - dieser Wachstumseffekt nicht ein. Bei weiblichen Tieren scheint Testosteron (ohne die Umwandlung zu Estradiol) keine Auswirkungen auf die Spinogenese zu haben; bei unseren Experimenten stieg durch die Zugabe von Letrozol (zusätzlich zu GnRH) die Synapsendichte im Vergleich zur Kontrolle nicht an. Die zusätzliche Zugabe des Testosteronsynthesehemmers Trilostan konnte die GnRH-induzierte Synaptogenese bei beiden Geschlechtern aufheben, was die Bedeutung von endogen gebildetem T bzw. E2 deutlich macht. Dies zeigt, dass GnRH lokal im Hippocampus auf die Synapsenanzahl einwirkt und dieser Effekt wahrscheinlich über eine Stimulierung der hippocampalen Testosteron- und folglich der Estrogensynthese eintritt. Ferner muss die Rolle von Cholesterol, der Ausgangssubstanz für die Sexualhormonsynthese, bedacht werden. Ist kein Cholesterol vorhanden, so kann weder Testosteron noch Estradiol gebildet werden. Es muss in diesem Zusammenhang also auch eine Cholesterol-induzierte Synaptogenese diskutiert werden.

Um die Herkunft von hippocampalen Estrogenen genauer zu verstehen, untersuchte die Arbeitsgruppe um Leranth die Bedeutung von subkortikalen Verbindungen auf die estrogeninduzierte Synapsenbildung. Es wurde eine Durchtrennung der Fimbria (Teil des Hippocampus)/Fornix (Teil des Großhirns) – Bahnen durchgeführt und die Auswirkungen untersucht (Leranth et al. 2000, Kovacs et al. 2003). Sie konnten feststellen, dass bei weiblichen Ratten eine Fimbria/Fornix-Durchtrennung an sich keinen Spinesynapsenverlust in der CA1-Region auslöst. Bei einer unilateralen Durchtrennung kann nach *in vivo* Estrogenbehandlung kontralateral ein Anstieg der Synapsenanzahl festgestellt werden, jedoch nicht auf der manipulierten Seite. Somit scheinen auch Nervenbahnen außerhalb des Hippocampus die Spinogenese zu beeinflussen (Leranth et al. 2000). Für männliche Ratten konnte nachgewiesen werden, dass nach Gonadektomie und unilateraler Fimbria/Fornix-Durchtrennung sowie Behandlung mit Testosteron ein Synapsenverlust kontralateral besteht. Das spricht für eine teilweise subkortikale Beeinflussung der testosteroninduzierten Synaptogenese (Kovacs et al. 2003).

5.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede in Bezug auf GnRH-Responsivität

Wie bereits dargestellt wird angenommen, dass GnRH ein wichtiger Faktor für die Induktion der hippocampalen Synaptogenese ist. In unserem Labor konnten Prange-Kiel et al. 2008 *in vitro* nachweisen, dass GnRH durch Bindung an einen Rezeptor die Estrogensynthese im weiblichen Hippocampus (CA1) steigert und dort die Synapsendichte beeinflusst. GnRH-Rezeptoren und -mRNA sind in dieser Region reichlich vorhanden (Prange-Kiel et al. 2008). Die GnRH-Rezeptorendichte wird durch hippocampal gebildetes Estrogen reguliert, wobei ein negativer Feedback-Mechanismus vermutet wird (Janssens et al. 2000). Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass vor allem im Hippocampus (also nicht gonadal) gebildetes E2 die synaptische Plastizität reguliert. Darauf kann jedoch auch das zyklisch abgegebene GnRH aus dem Hypothalamus einwirken, dessen Zielorgane sowohl die Ovarien als auch der Hippocampus sind.

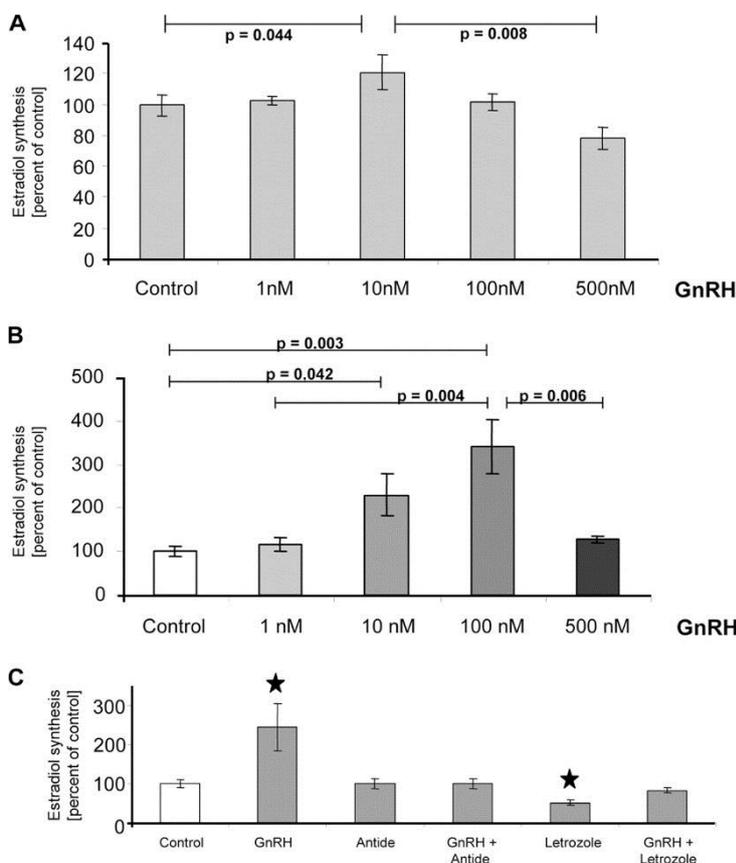


Abbildung 18:

Hippocampale E2-Synthese wird durch GnRH reguliert, Versuche an weiblichen Ratten. (A) RIA-Messung von E2 an hippocampalen Slicekulturen, nach 8-tägiger GnRH – Behandlung (B) Dispersionskulturen hippocampaler Neurone ergaben ähnliche Ergebnisse (C) Einfluss von GnRH auf E2-Synthese in Dispersionskulturen, durch Letrozol wird die Synthese signifikant vermindert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; * = p < 0,05. (Prange-Kiel et al. 2008).

Die o. g. Arbeitsgruppe konnte feststellen, dass der Effekt von GnRH auf die Synaptogenese im Hippocampus auch konzentrationsabhängig ist; so können zu hohe Konzentrationen von GnRH sogar neurotoxisch wirken. Bei geringen Konzentrationen von GnRH (100 nM) kommt es zu einem Anstieg von Estradiol, Spinophilin und der Spinesynapsendichte, bei höheren Konzentrationen von GnRH (500 nM) kommt es zu einem Abfall (Abb. 18, Prange-Kiel et al. 2008).

Wir verwendeten bei unseren Versuchen Konzentrationen von 100 nM, womit sich erfahrungsgemäß ein deutlicher Effekt zeigt. Bei unseren Experimenten ließ sich durch GnRH-Behandlung jeweils ein Anstieg der Synapsenanzahl erkennen, der bei den weiblichen Schnittkulturen, im Gegensatz zu den männlichen, jedoch nicht signifikant war. Auch in anderen Arbeiten fiel eine quantitativ stärkere Stimulation der Synapsenbildung durch GnRH bei männlichen Tieren auf (Julia Böhm 2011, med. Dissertation). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Synaptogenese bei männlichen Tieren sowohl durch Estradiol als auch durch Testosteron stimuliert werden kann und sich somit quantitativ höher darstellt. Zusätzlich ist vorstellbar, dass eine direkte GnRH-induzierte Synaptogenese stattfinden kann, da das Hormon über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor auch direkt im Hippocampus wirken kann (Janssens et al. 2000).

Auch Meethal et al. (2009) stellten einen regulierenden Feedback-Mechanismus von erstens in den Gonaden produzierten Sexualhormonen und zweitens den hypophysären Gonadotropinen und GnRH auf die hippocampale Steroidhormonsynthese fest. Sie konnten dabei verschiedene Neurosteroid Feedback-Achsen darlegen. Die Mechanismen sind abhängig von z. B. Estrogen- und GnRH-Rezeptoren, sowie den Hormonkonzentrationen im Organismus (Meethal et al. 2009, Abb. 19).

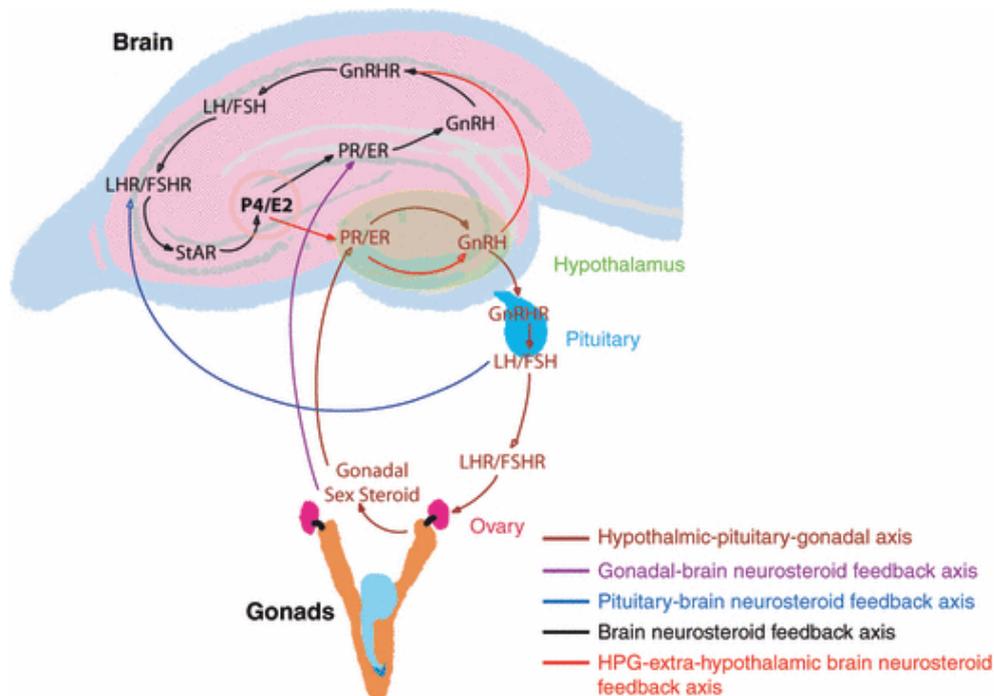


Abbildung 19: Modelldarstellung möglicher auto-/parakriner Regulationsmechanismen der Neurosteroidsynthese. Dargestellt: 1. HPG-Achse, 2. gonadale-ZNS Neurosteroid Feedback-Achse, 3. hypophysäre-ZNS Neurosteroid Feedback-Achse, 4. ZNS Neurosteroid Feedback-Achse. 5. HPG-extrahypothalamische-ZNS Neurosteroid Feedback-Achse (Quelle: Meethal et al. 2009).

Es bleibt ungeklärt, auf welchem exakten Weg GnRH physiologischerweise zum Hippocampus gelangt. GnRH wurde im Liquor nachgewiesen, dorthin kann es möglicherweise entweder über Faserverbindungen oder den Blutfluss gelangen (Caraty und Skinner 2008). So könnte GnRH aus dem Liquor zum Hippocampus diffundieren. Prange-Kiel und Mitarbeiter konnten beobachten, dass es bei Injektion von GnRH in den lateralen Ventrikel bzw. direkt in den Hippocampus von OVX-Ratten zu einem Anstieg der Synapsenanzahl im Hippocampus kommt, der auf die behandelte Seite beschränkt ist (Prange-Kiel et al. 2013).

5.4. Einfluss der Sexualhormone auf Gedächtnis und Bedeutung des NMDA-Rezeptors

Auch bei der Langzeitpotenzierung (LTP), die Gedächtnis und Lernprozesse im Hippocampus steuert, lässt sich ein sexueller Dimorphismus erkennen. Die LTP ist das funktionelle, elektrophysiologisch messbare Korrelat zum Spinesynapsenwachstum. Durch Estrogenzufuhr kommt es zur LTP und Phosphorylierung von Cofilin (Aktin-bindendes Protein in Zellen), welches schließlich zum Synapsenwachstum führt (Kramár et al. 2009). Eine weitere wichtige Rolle scheint dabei der NMDA-Rezeptor zu spielen. Schon vor 20 Jahren konnten Woolley und McEwen nachweisen, dass das estrogeninduzierte Synapsenwachstum durch Antagonisierung des NMDA-Rezeptors aufgehoben werden kann, wohingegen Antagonisten der AMPA- oder muskarinen Rezeptoren keinen Einfluss zeigten (Woolley und McEwen 1994).

In unserem Institut wurde nachgewiesen, dass durch Hemmung der Aromatase die Dichte der NMDA-Rezeptoren im Hippocampus abnimmt, ähnlich wie die Konzentration synaptischer Proteine (Zhou et al. 2010, Vierk et al. 2012). Bei weiblichen Versuchstieren wird die LTP durch Aromatasehemmung mit Letrozol beeinflusst: 6 Stunden nach Applikation von Letrozol zu einer Hippocampus-Slicekultur konnte sie um 50 % vermindert gemessen werden, nach 7 Tagen ist LTP nicht mehr induzierbar. Bei männlichen Tieren ließen sich keine signifikanten Veränderungen nachweisen. Es ist außerdem aufgefallen, dass nach Letrozolbehandlung abhängig vom Geschlecht unterschiedliche Synapsentypen vermindert gebildet werden. Bei Weibchen wurden vor allem die Anzahl an „mushroom spines“ reduziert, bei Männchen fast nur die der „thin spines“. Die Entfernung der Ovarien beeinflusste die LTP nicht, so dass vor allem hippocampal gebildetes E2 eine Rolle zu spielen scheint. Dies wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass *in vitro* Slicekulturen die zusätzlich zu Letrozol mit E2 behandelt wurden, keinen Verlust der LTP aufwiesen (Vierk et al. 2012).

Auch die Arbeitsgruppe um Hojo untersuchte die Effekte von Hormonen auf die LTP bzw. *long term depression* (LTD) im Hippocampus. Sie konnten nachweisen, dass im weiblichen Hippocampus durch Estradiol die NMDA-Rezeptordichte und in Folge dessen bzw. parallel die LTP und Synaptogenese ansteigt. Als weiterer wichtiger Faktor sei hier Kalzium zu nennen: eine Stimulierung des NMDA-Rezeptors, führt zu einem Ca^{2+} -Influx, der wiederum die endogene E2-Synthese stimuliert und das Synapsenwachstum anregt (Hojo et al. 2004, Mukai et al. 2007).

5.5. Kritische Beurteilung des experimentellen Modells

Zunächst muss bedacht werden, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um *in vitro* Experimente handelte, die nicht zwangsläufig die *in vivo*-Situation widerspiegeln und deshalb kritisch betrachtet werden müssen. Die Unterscheidung zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten ist wichtig. *In vivo* lassen sich systemische Effekte realitätsnah darstellen; es kann aber auch durch unbekannte Faktoren zu einer unerwünschten Beeinflussung der Versuchsergebnisse kommen. Durch die Verwendung von *in vitro* Hippocampus-Schnittkulturen ist eine gezielte Untersuchung der CA1-Region möglich, ohne dass peripher (z. B. gonadal oder adrenal) gebildete Sexualhormone den Prozess beeinflussen.

Als Untersuchungsmethode der Wahl wurde hier die Elektronenmikroskopie mit anschließender Auszählung der Synapsen gewählt. Dabei handelt es sich um eine zuverlässige, jahrelang erprobte Methode. Jedoch ist diese auch nicht frei von Fehlern, z. B. kann es durch die manuelle Auszählung zu nicht hundertprozentig reproduzierbaren Ergebnissen kommen. Dies wurde jedoch durch ein mehrmaliges Wiederholen der Auszählungen und Überprüfung weitestgehend ausgeschlossen. Außerdem muss bei der vorliegenden Methode bedacht werden, dass die Synapsenanzahl pro Hippocampusvolumen betrachtet wurde. Es kann jedoch geschehen, dass sich das gesamte Volumen durch eine

Behandlung vergrößert oder verkleinert und so nicht ohne weiteres mit der Kontrollgruppe zu vergleichen ist.

Bei den hier durchgeführten Experimenten handelt es sich um einen Bruchteil an Untersuchungen, die in ein großes Gesamtergebnis eingefügt werden müssen. Um valide Aussagen treffen zu können, müssen in einem ähnlichen Versuchsaufbau weitere Faktoren untersucht werden, wie z. B. die Expression verschiedener synaptischer Proteine oder Hormonkonzentrationen. Zusätzlich müssen die Konzentrationen der verwendeten Chemikalien beachtet werden: befinden sich diese im physiologischen Rahmen oder musste eine höhere oder niedrigere Konzentration gewählt werden, um einen Effekt zu erzielen (Brandt et al. 2013)?

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen nach Geschlechtern getrennt durchgeführt. In der Vergangenheit wurden schon viele Experimente zur hormoninduzierten synaptischen Plastizität durchgeführt, jedoch wurde dabei nicht immer zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren unterschieden. So kamen häufig weibliche OVX-Tiere zum Einsatz (Gould et al. 1990, Prange-Kiel et al. 2008) oder es wurden Slicekulturen von weiblichen und männlichen Tieren vermischt (Kretz et al. 2004). Dadurch können Versuchsergebnisse der Vergangenheit ein falsches Bild darstellen, da ggf. geschlechtsabhängige Unterschiede nicht dargestellt wurden. In Zukunft muss bei solchen Experimenten klar definiert werden, ob es sich um männliche oder weibliche Versuchstiere handelt; die Ergebnisse müssen getrennt nach Geschlechtern interpretiert werden. Bei weiblichen Tieren muss vor allem auch darauf geachtet werden, dass sich die Situation je nach Zyklusphase anders darstellen kann.

Ferner kann der Transfer von den in Tierversuchen mit Nagern erzielten Ergebnissen nicht immer problemlos auf die Situation beim Menschen erfolgen. Es muss bedacht werden, dass z. B. Ratten über 4-tägigen Zyklus verfügen im Gegensatz zum menschlichen 28-tägigen Zyklus. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Hirnstrukturen, -physiologie und -funktion von Ratten

ähnlich der von Primaten sind und die CA1-Region des Hippocampus ähnlich auf Estradiol- und Androgeneinflüsse reagiert (Hajszan et al. 2008).

5.6. Klinische Bedeutung und Testosteronmangel beim Menschen

Ein wichtiger Aspekt medizinischer Forschungsergebnisse ist selbstverständlich deren Relevanz für den klinischen Alltag. Es gibt verschiedene Anhaltspunkte dafür, dass bei bestimmten neuropsychiatrischen Krankheitsbildern eine Hormonsubstitution therapeutisch sinnvoll ist. Morbus Alzheimer stellt eine solche Krankheit dar, da erniedrigte Androgen- und Estrogenkonzentrationen im Patientenserum gemessen werden konnten (McAllister et al. 2010). Ein wichtiger Aspekt dieser Erkrankung ist die Anlagerung von β -Amyloid-Plaques, bei deren Entstehung der Mangel an Sexualhormonen eine wichtige Rolle spielt. Es lassen sich auch Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachten: Bei Frauen steigt postmenopausal, wenn der Estrogenspiegel im weiblichen Körper fällt, das Risiko an Alzheimer zu erkranken. Insgesamt wird bei Frauen eine höhere Inzidenz der Krankheit festgestellt als bei Männern. Auch Männer weisen erniedrigte Konzentrationen der Sexualhormone im Alter auf und es konnte dabei ein Zusammenhang mit degenerativen Prozessen im Gehirn festgestellt werden. Es entsteht dabei Apolipoprotein E, welches das Risiko an M. Alzheimer zu erkranken erhöht (Pike et al. 2009).

Hammond et al. (2001) untersuchten den möglichen therapeutischen Nutzen von Testosteron bei M. Alzheimer. Sie überprüften, ob Androgene einen ähnlichen neuroprotektiven Effekt wie 17β -Estradiol haben und kamen zu dem Ergebnis, dass durch Androgenrezeptoren im ZNS das Überleben von Neuronen gesichert wird. Im Alter nimmt die AR-Dichte ab, wodurch degenerative Erkrankungen begünstigt werden können. In diesem Zusammenhang ist es also wichtig, eine mögliche Hormontherapie möglichst früh zu beginnen, solange die AR vorhanden sind (Hammond et al. 2001). Li et al. konnten zeigen, dass Androgensubstitution einem Synapsenverlust der CA1-

Region des Hippocampus entgegenwirken kann. Dies konnte in einem Mausmodell für M. Alzheimer nachgewiesen werden (Li et al. 2013).

Bei Männern gibt es zu keinem Zeitpunkt einen so drastischen Hormonumschwung wie in der weiblichen Menopause, jedoch nimmt die Testosteronkonzentration im Alter langsam, aber stetig ab (Leder et al. 2004). Klinische Untersuchungen mit Patienten zeigten, dass die Wirkung von Estradiol und Testosteron von der Gehirnregion und dem Kognitionsbereich (z. B. verbaler Ausdruck oder räumliches Denken) abhängig zu sein scheint. Es können dabei geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden. Bei Männern scheint Testosteronverlust im Alter v. a. die Gedächtniskonsolidierung im Hippocampus negativ zu beeinflussen (Janowsky et al. 2006).

Insgesamt lässt sich also ein großes Potential im therapeutischen Nutzen von Androgenen erkennen. Viele neuropsychiatrische Erkrankungen wie M. Alzheimer, Schizophrenie oder Depressionen gehen wie erwähnt mit erniedrigten Estrogen- und Testosteronkonzentrationen einher, so dass hormonelle Behandlungen in Betracht gezogen werden müssen. Insbesondere DHEA kann seine Wirkung lokal im Hippocampus entfalten, ohne systemische Nebenwirkungen zu haben. Es wäre so als Therapeutikum bei Estrogen- bzw. Testosteronmangelinduzierten Erkrankungen im Alter bei Männern und Frauen denkbar (Hajszan et al. 2008). Bei solchen Therapien muss in Anbetracht unserer Ergebnisse unbedingt das Geschlecht des Patienten beachtet werden, da sich die Hormone geschlechtsspezifisch unterschiedlich verhalten. Durch weitere Forschung auf diesem Gebiet könnte es möglich werden, individualisierte, geschlechtsspezifische Therapieoptionen zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

Durch die synaptische Plastizität im Hippocampus ist ein lebenslanger Umbau der Synapsen und somit eine Verbesserung oder Verschlechterung der Gehirnfunktion möglich. Diese Umbauvorgänge werden durch die Steroidhormone Estrogen und Testosteron beeinflusst. Dabei ist bisher der Einfluss von Estrogen (bzw. Estradiol) ausführlicher untersucht worden als der von Testosteron. Auch geschlechtsspezifische Unterschiede bleiben nach wie vor teilweise unklar. Jedoch stellt dieses Gebiet u. a. einen wichtigen Therapieansatz für viele neuropsychiatrische Erkrankungen dar, die mit einer Veränderung der Hormonkonzentration, z. B. physiologisch im Alter oder iatrogen durch eine Hormon-Replacement-Therapie, einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Estrogen, Testosteron und GnRH auf die Synapsenbildung geschlechtsspezifisch geprüft. Wir untersuchten *in vitro* Hippocampussliceulturen der CA1-Region weiblicher und männlicher p5-Ratten nach siebentägiger Stimulation mit Letrozol (Estrogensynthesehemmer), Trilostan (Testosteronsynthesehemmer), GnRH, GnRH+Trilostan und GnRH+Letrozol. Nach Fixierung und Färbung wurden die Ultradünnschnitte elektronenmikroskopisch quantitativ ausgewertet indem die Spinesynapsenanzahl pro Slice ausgezählt wurde.

Nach statistischer Auswertung konnten Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen Versuchstieren festgestellt werden. Bei den weiblichen Tieren wurde sowohl durch Letrozol als auch durch Trilostan die Synapsenanzahl im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Bei männlichen Tieren konnte dies nur durch Trilostan erreicht werden. Das GnRH-induzierte Synapsenwachstum ließ sich bei den weiblichen Tieren ebenfalls durch Letrozol und Trilostan signifikant senken, die männlichen Slices zeigten nur bei Trilostan einen signifikanten Unterschied zur GnRH-Gruppe. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass bei männlichen Tieren die Synapsenbildung v. a. durch Testosteron induziert werden kann und aromataseunabhängig stattfinden kann.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ³	Kubikmikrometer
3β-HSD	3β-Hydroxysteroiddehydrogenase
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
AR	Androgenrezeptor
CA1-4	<i>Cornu Ammonis</i> Region 1-4
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP	Cytochrom P
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EB	Estradiolbenzoat
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Estrogenrezeptor
ER-α	Estrogenrezeptor <i>alpha</i>
ER-β	Estrogenrezeptor <i>beta</i>
et al.	<i>et alii</i>
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GABA	Gammaaminobuttersäure
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
HBSS	<i>Hanks Balanced Salts</i>
HCl	Salzsäure
HHG	hypothalamo-hypophysär-gonadal
LH	luteinisierendes Hormon

LSD	<i>least significant difference</i>
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
M	Molar
med.	medizinisch
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Mol, 1 mol = $6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR1	NMDA-Rezeptor 1
OVX	ovarektomiert
p	Signifikanzniveau
p4	postnataler Tag 4
p5	postnataler Tag 5
PB	Phosphatpuffer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
RIA	Radioimmunoassay
SEM	<i>standard error of the mean</i>
StAR	<i>steroidogenic regulatory protein</i>
T	Testosteron
Tab.	Tabelle
tfm	<i>testicular feminization</i>
TP	Testosteronpropionat
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

- Alvarez-de-la-Rosa M, Silva I, Nilsen JO, Pérez M. M., García-Segura LM, Ávila J, Naftolin F (2005)** Estradiol prevents neural Tau hyperphosphorylation characteristic of Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 1052(1):210–224.
- Balthazart J, Ball GF (2006)** Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 29(5):241–249.
- Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM (2010)** A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biol sex dif* 1(1):8.
- Brandt N, Vierk R, Rune GM (2013)** Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus. *Int J Dev Biol* 57(5):351–356.
- Brandt N, Vierk R, Fester L, Zhou L, Imholz P, Rune GM (2014)** Geschlecht und Effekte von Steroidhormonen im Zentralnervensystem (ZNS). *Bundesgesundheitsblatt* 57(9):1054–1060.
- Buwalda B, Schagen S (2013)** Is basic research providing answers if adjuvant anti-estrogen treatment of breast cancer can induce cognitive impairment? *Life Sci* (93):581–588.
- Candemir M, Semiz S, Yonguc GN, Ozdemir MB, Abban-Mete G, Adiguzel E (2013)** Effect of testosterone propionate on hippocampal pyramidal neuron number in female rats. *Singapore Med J* 54(6):315–320.
- Caraty A, Skinner DC (2008)** Gonadotropin-Releasing Hormone in third ventricular cerebrospinal fluid: endogenous distribution and exogenous uptake. *Endocrinology* 149(10):5227–5234.
- Cherrier M (2009)** Testosterone effects on cognition in health and disease. *Front Horm Res* 37:150–162.
- Christiansen RG, Neumann HC, Salvador UJ, Bell MR, Schane HP, Creange JE, Potts GO, Anzalone AJ (1984)** Steroidogenesis inhibitors. 1. Adrenal inhibitory and interceptive activity of trilostane and related compounds. *J Med Chem* 27(7):928–931.
- Compagnone NA, Mellon SH (2000)** Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21(1):1–56.
- Espallergues J, Tamsamani J, Laruelle C, Urani A, Maurice T (2011)** The antidepressant-like effect of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor

trilostane involves a regulation of β -type estrogen receptors. *Psychopharmacology* 214(2):455–463.

Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(16):9287–9292.

Fester L, Prange-Kiel J, Rune GM (2007) Hippocampale Estrogensynthese und synaptische Plastizität. *Neuroforum* 4:127-134

Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, Lossow R von, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009a) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19(8):692–705.

Fester L, Zhou L, Voets C, Ossig C, Disteldorf E, Peters C, Bläute F, Prange-Kiel J, Dudzinski D, Jarry H, Rune GM (2009b) The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology* 34:123–129.

Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2011) Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell Tissue Res.* 345(3):285–294.

Fester L, Prange-Kiel J, Zhou L, Blittersdorf BV, Böhm J, Jarry H, Schumacher M, Rune GM (2012) Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: Sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *J Steroid Biochem mol Biol* 131(1-2):24–29.

Filová B, Ostatníková D, Celec P, Hodosy J (2013) The Effect of Testosterone on the Formation of Brain Structures. *Cells Tissues Organs* 197(3):169–177.

Flores F, Naftolin F, Ryan KJ (1973) Aromatization of Androstendione and Testosterone by Rhesus Monkey Hypothalamus and Limbic System. *Neuroendocrinology* (11):177–182.

Foy MR, Baudry M, Akopian GK, Thompson RF (2010) Regulation of Hippocampal Synaptic Plasticity by Estrogen and Progesterone. *Vitam Horm* 82:219–239.

Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL (2006) Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus* 16(3):225–232.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63(1):29–60.

- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS (1990)** Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10(4):1286–1291.
- 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(5):638–646.
- Hammond J, Le Q, Goodyer C, Gelfand M, Trifiro M, LeBlanc A (2001)** Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J Neurochem* 77:1319-1326.
- Hamson DK, Wainwright SR, Taylor JR, Jones BA, Watson NV, Galea LAM (2013)** Androgens Increase Survival of Adult-Born Neurons in the Dentate Gyrus by an Androgen Receptor-Dependent Mechanism in Male Rats. *Neuroendocrinology* 154(9):3294-3304.
- Hao J, Janssen WG, Tang Y, Roberts JA, McKay H, Lasley B, Allen PB, Greengard P, Rapp PR, Kordower JH, Hof PR, Morrison JH (2003)** Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 465(4):540–550.
- Hatanaka Y, Mukai H, Mitsuhashi K, Hojo Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Sato R, Kawato S (2009)** Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 381(4):728–732.
- Heimrich B, Frotscher M (1993)** Slice cultures as a model to study entorhinal-hippocampal interaction. *Hippocampus* 3:11–17.
- Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H, Mukai H, Morrison JH, Janssen WGM, 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 USA* 101(3):865–870.
- Hojo Y, Higo S, Kawato S, Hatanaka Y, Oishi Y, Murakami G, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Kimoto T (2011)** Hippocampal Synthesis of Sex Steroids and Corticosteroids: Essential for Modulation of Synaptic Plasticity. *Front Endocrin* 2(43):1-17.
- Klinke R, Pape H, Silbernagl S (2005)** Physiologie, 5. Auflage. Thieme; Stuttgart. S. 562-566.
- Janowsky JS (2006)** The role of androgens in cognition and brain aging in men. *Neuroscience* 138(3):1015–1020.

- 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(5):505–518.
- Knobil E (1988)** The neuroendocrine control of ovulation. *Hum Reprod* 3(4):469–472.
- Kovacs EG, MacLusky NJ, Leranth C (2003)** Effects of testosterone on hippocampal CA1 spine synaptic density in the male rat are inhibited by fimbria/fornix transection. *Neuroscience* 122(3):807–810.
- Kramar EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall cm, Lynch G (2009)** Cytoskeletal Changes Underlie Estrogen's Acute Effects on Synaptic Transmission and Plasticity. *J Neurosci* 29(41):12982–12993.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004)** Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24(26):5913–5921.
- Leder BZ, Rohrer JL, Rubin SD, Gallo J, Longcope C (2004)** Effects of Aromatase Inhibition in Elderly Men with Low or Borderline-Low Serum Testosterone Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3):1174–1180.
- Leranth C, Shanabrough M, Horvath TL (2000)** Hormonal regulation of hippocampal spine synapse density involves subcortical mediation. *Neuroscience* 101(2):349-356.
- Leranth C, Petnehazy O, Maclusky NJ (2003)** Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci* 23(5):1588–1592.
- Leranth C, Hajszan T, Maclusky NJ (2004)** Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *J Neurosci*. 24(2):495–499.
- Li S, Kang L, Zhang C, Xie G, Li N, Zhang Y, Du J, Cui H (2013)** Effects of dihydrotestosterone on synaptic plasticity of hippocampus in male SAMP8 mice. *Exp Gerontol* 48(8):778–785.
- Lindzey J, Wetsel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach K (1998)** Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 139(10):4092–4101.

- MacLusky NJ (2006)** Androgen Effects on Hippocampal CA1 Spine Synapse Numbers Are Retained in Tfm Male Rats with Defective Androgen Receptors. *Endocrinology* 147(5):2392–2398.
- MacLusky N, Hajszan T, Prange-Kiel J, Leranth C (2006)** Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* 138(3):957–965.
- McAllister C, Long J, Bowers A, Walker A, Cao P, Honda SI, Harada N, Staufenbiel M, Shen Y, Li R (2010)** Genetic Targeting Aromatase in Male Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Down-Regulates β -Secretase (BACE1) and Prevents Alzheimer-Like Pathology and Cognitive Impairment. *J Neurosci* 30(21):7326–7334.
- McCarthy M. M. (2008)** Estradiol and the Developing Brain. *Physiol Rev* 88(1):91–134.
- McEwen B (2002)** Estrogen Action Throughout the Brain. *Recent Prog Horm Res* 57:357-384.
- Meethal SV, Liu T, Chan HW, Ginsburg E, Wilson AC, Gray DN, Bowen RL, Vonderhaar BK, Atwood CS (2009)** Identification of a regulatory loop for the synthesis of neurosteroids: a steroidogenic acute regulatory protein-dependent mechanism involving hypothalamic-pituitary-gonadal axis receptors. *J Neurochem* 110(3):1014–1027.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Ishii H, Kimoto T, Kawato S (2006)** Local Neurosteroid Production in the Hippocampus: Influence on Synaptic Plasticity of Memory. *Neuroendocrinology* 84(4):255–263.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WGM, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007)** Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100(4):950–967.
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z (1971)** Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab* 33(2):368–370.
- Naftolin F, Ryan KJ (1975)** The metabolism of androgens in central neuroendocrine tissues. *J Steroid Biochem* 6(6): 993-997.
- Okamoto M, Hojo Y, Inoue K, Matsui T, Kawato S, McEwen BS, Soya H (2012)** Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(32):13100–13105.

- Papez JW (1958)** Visceral Brain, its component parts and their connections. *J Nerv Ment Dis* 126(1):40-56.
- Persky RW, Liu F, Xu Y, Weston G, Levy S, Roselli CE, McCullough LD (2013)** Neonatal Testosterone Exposure Protects Adult Male Rats from Stroke. *Neuroendocrinology* 97(3):271–282.
- Pettorossi VE, Di Mauro M, Scarduzio M, Panichi R, Tozzi A, Calabresi P, Grassi S (2013)** Modulatory role of androgenic and estrogenic neurosteroids in determining the direction of synaptic plasticity in the CA1 hippocampal region of male rats. *Physiol Rep* 1(7):1-12.
- Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM (2009)** Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* 30(2):239–258.
- Potts GO, Creange JE, Hardomg HR, Schane HP (1978)** Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids* 32(2):257–267.
- Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD (1999)** Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca^{2+} transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* 81(3):1404–1411.
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003)** Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13(2):226–234.
- Prange-Kiel J, Rune GM, Leranath C (2004)** Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats. *Eur J Neurosci* 19(2):309–317.
- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune GM (2006)** Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16(5):464–471.
- Prange-Kiel J, Rune GM (2006)** Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138(3):765–772.
- Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008)** Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180(2):417–426.
- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Jarry H, Rune GM (2009)** Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm* 116(11):1417–1425.

- Prange-Kiel J, Schmutterer T, Fester L, Zhou L, Imholz P, Brandt N, Vierk R, Jarry H, Rune GM (2013)** Endocrine regulation of estrogen synthesis in the hippocampus? *Prog Histochem Cytochem* 48(2):49–64.
- Puddefoot JR, Barker S, Glover HR, Malouitre SD, Vinson GP (2002)** Non-competitive steroid inhibition of oestrogen receptor functions. *Int J Cancer* 101(1):17–22.
- Radovick S, Levine JE, Wolfe A (2012)** Estrogenic Regulation of the GnRH Neuron. *Front Endocrin* 3(52):1-11.
- Reynolds E (1963)** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208–212.
- Robel P, Young J, Corpéchet C, Mayo W, Perché F, Haug M, Simon H, Baulieu EE (1995)** Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *J Steroid Biochem mol Biol* 53(1-6):355–360.
- Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelmann G, Frotscher M (2002)** Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 113(1):167–175.
- Rune GM, Frotscher M (2005)** Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 136(3):833–842.
- Rune GM, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M (2006)** Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res* 31(2):145–155.
- Schang A, Ngo-Muller V, Bleux C, Granger A, Chenut M, Loudes C, Magre S, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverriere J (2011)** GnRH Receptor Gene Expression in the Developing Rat Hippocampus: Transcriptional Regulation and Potential Roles in Neuronal Plasticity. *Endocrinology* 152(2):568–580.
- Schassen C von, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006)** Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18(11):847–856.
- Schulz K, Korz V (2010)** Hippocampal Testosterone Relates to Reference Memory Performance and Synaptic Plasticity in Male Rats. *Front Behav Neurosci* 4(187):1-12.
- Shilling V, Jenkins V, Fallowfield L, Howell T (2003)** The effects of hormone therapy on cognition in breast cancer. *J Steroid Biochem mol Biol* 86(3-5):405–412.

- Sieber-Ruckstuhl NS, Boretti FS, Wenger M, Maser-Gluth C, Reusch CE (2006)** Cortisol, aldosterone, cortisol precursor, androgen and endogenous ACTH concentrations in dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Domest Anim Endocrinol* 31(1):63–75.
- Spencer-Segal JL, Tsuda MC, Mattei L, Waters EM, Romeo RD, Milner TA, McEwen BS, Ogawa S (2012)** Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience* 202:131–146.
- Spritzer MD, Galea LA (2007)** Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. *Devel Neurobio* 67(10):1321–1333.
- Sterio DC (1984)** The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134(2):127–136.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991)** A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37(2):173–182.
- Tabatadze N, Sato SM, Woolley CS, Wolfe A (2014)** Quantitative Analysis of Long-Form Aromatase mRNA in the Male and Female Rat Brain. *PLoS One* 9(7):1-9.
- Trepel M (2008)** Neuroanatomie: Struktur und Funktion, 4. Auflage. Urban & Fischer; München, Jena. S 233-238.
- Videbech P, Ravnkilde B (2004)** Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161:1957-1966.
- 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(24):8116–8126.
- 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(6):1879–1886.
- Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS (1990)** Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 10(12):4035–4039.
- Woolley CS, McEwen BS (1994)** Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci* 14(12):7680–7687.

- Xiao L, Jordan CL (2002)** Sex Differences, Laterality, and Hormonal Regulation of Androgen Receptor Immunoreactivity in Rat Hippocampus. *Horm Behav* 42:327-336.
- Xu X, Coats JK, Yang CF, Wang A, Ahmed OM, Alvarado M, Izumi T, Shah NM (2012)** Modular genetic control of sexually dimorphic behaviors. *Cell* 148(3):596–607.
- Zhang J, Konkle A, Zup SL, McCarthy mm (2008)** Impact of sex and hormones on new cells in the developing rat hippocampus: a novel source of sex dimorphism? *Eur J Neurosci* 27:791-800.
- Zhou L, Lehan N, Wehrenberg U, Disteldorf E, Lossow R von, Mares U, Jarry H, Rune GM (2007)** Neuroprotection by estradiol: A role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABAA receptors. *Exp Neurol* 203(1):72–81.
- Zhou L, Fester L, Blittersdorff B von, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM (2010)** Aromatase Inhibitors Induce Spine Synapse Loss in the Hippocampus of Ovariectomized Mice. *Endocrinology* 151(3):1153–1160.
- Zhou L, Fester L, Haghshenas S, Vrese X de, Hacht R von, Gloger S, Brandt N, Bader M, Vollmer G, Rune GM (2014)** Oestradiol-Induced Synapse Formation in the Female Hippocampus: Roles of Oestrogen Receptor Subtypes. *J Neuroendocrinol* 26(7):439–447.

9. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune für die Vergabe dieser Arbeit und die damit verbundene Möglichkeit einen Einblick in die medizinische Forschung zu bekommen. Ihre wertvollen Ratschläge und konstruktiven Gespräche haben mich immer wieder motiviert.

Ich möchte meinem Betreuer Herrn Dr. med. Lepu Zhou danken; er war stets für mich erreichbar bei Fragen zu Durchführung und Auswertung meiner Arbeit. Seine geduldige und hilfsbereite Art schätze ich sehr. Herrn Dr. rer. nat. Lars Fester danke ich für die Hilfe bei technischen Fragestellungen. Ebenso geht mein Dank an die technischen Mitarbeiterinnen des Instituts: Brigitte Asmus, Helga Herbort und Bettina Kruck. Sie trugen einen entscheidenden Teil zum Gelingen der Experimente sowie der Elektronenmikroskopie bei.

Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre aufmunternden Worte und fortwährende Unterstützung danken. Mit lieben Menschen an der Seite wird vieles einfacher.

Danke.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: