

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Anatomie I:

Zelluläre Neurobiologie

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

**Geschlechtsspezifische GnRH-Responsivität und synaptische  
Plastizität im Hippocampus**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von**

**Julia Maria Böhm  
aus Potsdam, Brandenburg**

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 6.12.2011 \_\_\_\_\_

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. K. Wiedemann \_\_\_\_\_

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. F. Proels \_\_\_\_\_

## Inhaltsverzeichnis

|  |          |
|--|----------|
| <b>1. Abkürzungsverzeichnis.....</b>                               | <b>6</b> |
| <b>2. Einleitung</b>   |          |
| 2.1 Einführung.....  | 8        |
| 2.2 Der Hippocampus.....   | 10       |
| 2.3 Synapse/ Spinesynapse.....                                     | 12       |
| 2.4 Spinedichte im Zyklus.....                                     | 14       |
| 2.5 GnRH und sein Rezeptor.....                                    | 14       |
| 2.6 Estrogene werden <i>de novo</i> im Hippocampus produziert..... | 17       |
| 2.7 Arbeitshypothese und Fragestellung.....                        | 18       |
| <b>3. Material</b>   |          |
| 3.1 Arbeitsmaterialien, Geräte.....                                | 20       |
| 3.2 Software.....  | 21       |
| 3.3 Chemikalien.....   | 21       |
| 3.4 Antikörper.....  | 22       |
| 3.5 Lösungen.....  | 22       |
| <b>4. Methoden</b>   |          |
| 4.1 Eingesetzte Tiere.....   | 25       |
| 4.2 Präparation der Hippocampi.....                                | 25       |
| 4.3 Hippocampale Gewebekulturen.....                               | 25       |
| 4.4 Hippocampale Dispersionskulturen.....                          | 26       |
| 4.5 Stimulation und Inhibition.....                                | 27       |
| 4.6 Fixierung der hippocampalen Slicekulturen                      |          |
| 4.6.1 Immunhistochemische Fixierung.....                           | 28       |
| 4.6.2 Elektronenmikroskopische Fixierung.....                      | 29       |
| 4.7 Zuschnitt und Immunhistochemie der Gewebekulturen.....         | 30       |
| 4.8 Bildanalyse  |          |
| 4.8.1 Bildanalyse der Immunhistochemie.....                        | 31       |
| 4.8.2 Bildanalyse der Elektronenmikroskopie.....                   | 32       |

---

|                                     |   |    |
|-------------------------------------|---|----|
| 4.9                                 | Quantitative Estrogenbestimmung mittels Radioimmunoassay.....                                   | 32 |
| <b>5. Ergebnisse</b>                |   |    |
| 5.1                                 | Immunhistochemie.....   | 35 |
| 5.1.1                               | Spinophilinmenge nach Stimulation mit 100 nM GnRH.....  | 37 |
| 5.1.2                               | Spinophilinmenge nach Stimulation mit 500 nM GnRH.....  | 41 |
| 5.1.3                               | Zusammenfassende Darstellung der Immunhistochemie.....  | 44 |
| 5.2                                 | Elektronenmikroskopie.....  | 45 |
| 5.2.1                               | Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach<br>Stimulation mit 100 nM GnRH.....              | 47 |
| 5.2.2                               | Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach<br>Stimulation mit 500 nM GnRH.....              | 49 |
| 5.2.3                               | Zusammenfassende Darstellung der Elektronenmikroskopie.....                                     | 51 |
| 5.3                                 | Immunhistochemische Darstellung des GnRH-Rezeptors bei<br>männlichen und weiblichen Tieren..... | 52 |
| 5.4                                 | Quantitative Estrogenbestimmung im Medium nach GnRH-Stimulation                                 |    |
| 5.4.1                               | Quantitative Estrogenbestimmung nach Stimulation<br>mit 100 nM GnRH.....                        | 55 |
| 5.4.2                               | Quantitative Estrogenbestimmung nach Stimulation mit<br>mit 500 nM GnRH.....                    | 57 |
| 5.4.3                               | Zusammenfassende Darstellung der Estrogenfreisetzung ins<br>Medium.....                         | 58 |
| <b>6. Diskussion.....</b>           |   |    |
| 6.1                                 | Regionale und dosisabhängige GnRH-Responsivität im Hippocampus...                               | 61 |
| 6.2                                 | Geschlechtsspezifische GnRH-Responsivität im Hippocampus.....                                   | 62 |
| 6.3                                 | Geschlechtsspezifische Darstellung des GnRH-Rezeptors.....                                      | 67 |
| 6.4                                 | Geschlechtsspezifische Estrogensynthese.....  | 70 |
| 6.5                                 | Kritische Beurteilung des experimentellen Modells.....  | 72 |
| <b>7. Zusammenfassung.....</b>      |   |    |
| <b>8. Literaturverzeichnis.....</b> |   |    |
|                                     |   | 78 |

**9. Danksagung**..... 92

**10. Lebenslauf**..... 94

**11. Eidesstattliche Versicherung**..... 96

## 1. Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| °C               | Grad Celsius  |
| µl               | Mikroliter  |
| µm               | Mikrometer  |
| µm <sup>3</sup>  | Kubikmikrometer                                     |
| Abb.             | Abbildung   |
| ANOVA            | <i>analysis of variance</i>                         |
| Aqua dest.       | <i>aqua destillata</i>                              |
| AVPV             | Anteroventral Periventricular Nucleus               |
| biol.            | biologisch  |
| BSA              | bovines Serum Albumin                               |
| CA               | Cornu ammonis                                       |
| CA1              | Cornu ammonis Region 1                              |
| CA3              | Cornu ammonis Region 3                              |
| cAMP             | Cyclisches Adenosinmonophosphat                     |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlendioxid  |
| CPM              | <i>counts per minute</i>                            |
| CREB             | <i>cAMP response element-binding protein</i>        |
| Cy3              | Indocarbocyanin 3                                   |
| DAG              | Diacylglycerol                                      |
| DABKO            | 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan                        |
| DAPI             | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                        |
| DG               | Gyrus dentatus                                      |
| E2               | 17-β-Estradiol                                      |
| EM               | Elektronenmikroskopie                               |
| EPSP             | Exzitatorisches postsynaptisches Potential          |
| ER               | Estrogenrezeptor                                    |
| ER-β             | Estrogenrezeptor Beta                               |
| ER-α             | Estrogenrezeptor Alpha                              |
| et al.           | <i>et alii</i> (und andere)                         |
| FSH              | Follikelstimulierendes Hormon                       |
| GABA             | γ-Aminobuttersäure                                  |
| GnRH             | <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>               |
| G-Protein        | G für Guanylnukleotid                               |
| H <sub>2</sub> O | Wasser  |
| HBSS             | <i>Hanks Balanced Salts</i>                         |
| HCl              | Chlorwasserstoff, bildet in Wasser gelöst Salzsäure |
| HHS              | Hypothalamus-Hypophysen-System                      |
| IgG              | Immunglobulin G                                     |
| IP3              | Inositol-1,4,5-trisphosphat                         |
| KCl              | Kaliumchlorid                                       |
| l                | Liter   |
| LH               | Luteinisierendes Hormon                             |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| LH-RH                            | LH <i>releasing hormone</i>                     |
| LSM                              | <i>laser scanning microscope</i>                |
| M                                | Molar   |
| männl.                           | männlich  |
| MAP                              | <i>mitogen-activated protein</i>                |
| med.                             | medizinisch                                     |
| MEM                              | Minimum Essential Medium                        |
| mf                               | Moosfasern                                      |
| min                              | Minute  |
| ml                               | Milliliter                                      |
| mm                               | Millimeter                                      |
| mM                               | Millimolar                                      |
| mol                              | Mol (1 mol = 6,023 x 10 <sup>23</sup> Moleküle) |
| mRNA                             | <i>messenger RNA</i>                            |
| n                                | Anzahl  |
| NaCl                             | Natriumchlorid                                  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Natriumdihydrogenphosphat                       |
| NaOH                             | Natriumhydroxid                                 |
| nm                               | Nanometer                                       |
| nM                               | Nanomolar, 10 <sup>-9</sup> Mol                 |
| p                                | Signifikanzniveau                               |
| P0                               | Postnataler Tag 0                               |
| P5                               | Postnataler Tag 5                               |
| PBS                              | <i>phosphate buffered saline</i>                |
| PCR                              | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                |
| PFA                              | Paraformaldehyd                                 |
| pg                               | Picogramm                                       |
| pH                               | <i>pondus Hydrogenii</i>                        |
| PIP <sub>2</sub>                 | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonat          |
| PKA                              | Proteinkinase A                                 |
| PLC                              | Phospholipase C                                 |
| pp                               | Tractus perforans                               |
| PP1                              | Protein-Phosphatase 1                           |
| RIA                              | Radioimmunoassay                                |
| sc                               | Schaffer-Kollateralen                           |
| SEM                              | <i>standard error of the mean</i>               |
| StAR                             | <i>steroidogenic acute regulatory protein</i>   |
| Tab.                             | Tabelle   |
| UKE                              | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf          |
| weibl.                           | weiblich  |

## **2. Einleitung**

### **2.1 Einführung**

Hormone sind biochemische Botenstoffe, die von spezialisierten Zellen des Körpers gebildet werden. Sie werden mit dem Blutstrom transportiert und übermitteln so ihre Informationen zu den Erfolgsorganen. Dabei ist das Hypothalamus-Hypophysen-System (HHS) das wohl wichtigste Steuerzentrum, welches aus verschiedenen, fein aufeinander abgestimmten Regelkreisen besteht. Insbesondere der Hypothalamus empfängt viele Signale aus der Umwelt, dem Körperinneren sowie dem Gehirn selber, für deren Vermittlung im Körper produzierte Hormone eine grundlegende Rolle spielen. Auf diese Weise stellt er ein wichtiges integratives Zentrum der Informationsverarbeitung und eine Brücke zwischen neuronalem und endokrinem System dar.

Im Hinblick auf eine Vielzahl von Studien ist aber auch der Hippocampus als ein wichtiges Zielorgan der im Körper produzierten Hormone bekannt. Diese Erkenntnis ist von besonderem Interesse, wenn man betrachtet, dass der Hippocampus eng mit Lernen und Gedächtnis assoziiert ist. So beschrieb William Scoville schon 1957, dass die Resektion des Temporallappens zu Störungen der Gedächtnis- und Lernfunktion führt (Scoville und Milner, 1957). Nach Entfernung der hippocampalen Formation konnten die Patienten neue Informationen des Kurzzeitgedächtnisses nicht ins Langzeitgedächtnis überführen. Außerdem zeigten sie Probleme, sich räumlich zu orientieren beziehungsweise sich an räumliche Gegebenheiten zu erinnern. Nach viralen Encephalitiden des Temporallappens, dem Verschluss der Arteria cerebralis posterior oder anderweitig bedingten hypoxischen Temporalischämien zeigten sich dieselben Gedächtnisstörungen (Zola-Morgan et al., 1986).

Die Forschung der letzten Jahre richtete ein besonderes Augenmerk auf die Wirkung von Steroidhormonen in hippocampalem Gewebe. Hier zeigte sich in der Vergangenheit, dass Estrogenwirkung im Hippocampus morphologische Veränderungen, wie z.B. in der Synapto- und Spinogenese, herbeiführt (Gould et al., 1990; Woolley et al., 1990; Segal und Murphy, 2001; McEwen, 2001; Li et al., 2004).



Versuche an Ratten zeigten ein verbessertes Lernverhalten weiblicher Tiere nach Estrogengabe (Daniel et al., 1997; Packard et al., 1998).

Klinische Studien zeigten auch bei Frauen ein verbessertes Gedächtnis durch Estrogene. Anfang der neunziger Jahre beobachteten Phillips et al., dass es bei postmenopausalen Frauen die eine Estrogensubstitutionstherapie erhielten, zu einer verbesserten Leistung in der Durchführung verbaler Merktests kam (Phillips und Sherwin, 1992).

In anderen Studien zeigte auch der weibliche Zyklus einen Einfluss auf das verbale Gedächtnis, wobei hohe Serum-Estrogenspiegel, die sich typischerweise in der ersten Zyklushälfte finden, zu einer verbesserten Merkfähigkeit führten (Hampson, 1990; Sherwin, 2003).

In diesem Zusammenhang könnte von klinischer Relevanz sein, dass Patientinnen, die im Rahmen eines Estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinoms mit Aromatasehemmern therapiert wurden, deutlich schlechter in Merkfähigkeitstests abschnitten (Shilling et al., 2003; Jenkins et al., 2004; Bender et al. 2006)

Weiterhin weisen immer mehr Arbeiten auf die positive Wirkung von Estrogenen bei multiplen neuronalen Erkrankungen hin. So bieten sie zum einen durch Interaktion mit neurotrophen Faktoren und der Beeinflussung verschiedener Neurotransmittersysteme (Ryan et al., 2008), zum anderen auch durch ihre antioxidativen Eigenschaften einen Therapieansatz für Morbus Alzheimer, bei dem oxidativer Zelltod ein Charakteristikum ist (Behl und Holsboer, 1999; McEwen und Alves, 1999; Behl und Manthey, 2000; Garcia-Segura et al., 2001; McCullough und Hurn 2003). Auch bei Epilepsie, Schizophrenie, Insulten und anderen zerebralen Erkrankungen besitzen die durch 17- $\beta$ -Estradiol ausgelösten neurotrophen Effekte einen fördernden Einfluss auf regenerative Vorgänge. Estrogeninduziertes Neuritenwachstum ist hier als ein Beispiel zu nennen (Zhao et al., 2005; von Schassen et al., 2006; Singh et al., 2008).

Nicht zuletzt sind Estrogene ein wichtiger Differenzierungsfaktor für die Entwicklung des Nervensystems (Beyer, 1999; Ivanova und Beyer, 2000).

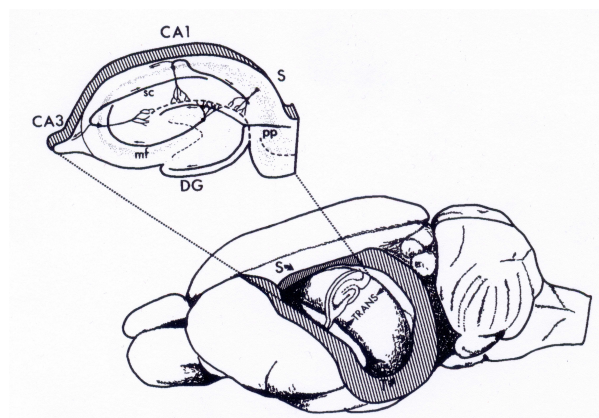
Das große Spektrum neuronaler Estrogenwirkungen gibt fortwährend Anlass für weitere wissenschaftliche Forschungen. Betrachtet man zusätzlich, dass Männer und Frauen naturgegeben über einen unterschiedlichen Hormonbesatz verfügen, eröffnet sich ein neues und spannendes Feld mit der Frage nach geschlechtsspezifischen Wirkungen, die in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollen.

## 2.2 Der Hippocampus

Der Hippocampus gilt in seiner Gesamtheit als die zentrale Struktur des limbischen Systems und spielt eine bedeutende Rolle bei Lern- und Gedächtnisvorgängen. Als Ganzes betrachtet formiert es sich nicht aus einem geschlossenen Bahnsystem, sondern bildet vielmehr eine Funktionseinheit eng miteinander verbundener Kern- und Rindengebiete. Dabei ist es stark in den Prozess der Steuerung von Verhalten und Emotionen, sowie bei Lern- und Gedächtnisprozessen eingebunden.

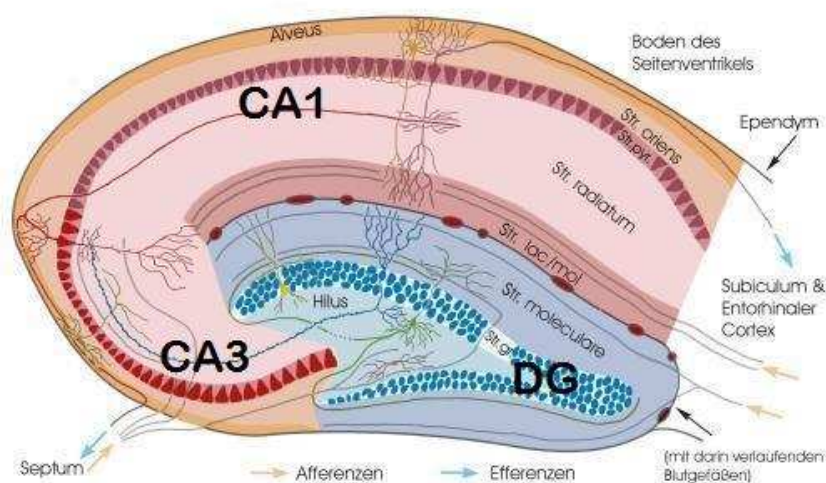
Im menschlichen Gehirn befindet sich der Hippocampus an der medialen Fläche der Temporallappen und bildet sich dort am Boden der Seitenventrikel. Nach hinten oben reicht er bis zum kaudalen Ende des Balkens und setzt sich an dieser Stelle in die Struktur des Fornix fort. Im Gegensatz dazu liegt der Hippocampus der Ratte weiter kranial. Bei ihr befindet er sich unmittelbar unter dem Kortex und durchzieht beide Hemisphären von rostral nach kaudal entlang einer C-förmigen Achse (Amaral und Witter, 1989; Abb. 1).

Zugeordnet wird der Hippocampus dem entwicklungs geschichtlich älteren Allokortex und weist im Gegensatz zum phylogenetisch jüngeren, sechsschichtigen Isokortex einen annähernd dreischichtigen Aufbau auf. In seiner Formation setzt sich der Hippocampus aus folgenden Regionen zusammen, die bei der Ratte und beim Menschen eine große Homologie aufweisen: Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Ammonshorn), Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum (Zilles K., 1998).



**Abb. 1:** Lage und Struktur des Rattenhippocampus, dargestellt sind der Gyrus dentatus (DG), das Ammonshorn (CA) mit den Regionen CA1 und CA3, die Moosfasern (mf), der Tractus perforans (pp), sowie die Schaffer-Kollateralen (sc); Quelle: Amaral und Witter, 1989.

Die Organisation der hippocampalen Neurone erfolgt in zwei sich umgreifenden, C-förmigen Zellbändern, welche sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammensetzen. Eines der Zellbänder besteht aus dicht gepackten kleinen Körnerzellen, den Hauptzellen des Gyrus dentatus. Ein weiteres Zellband formiert sich aus Pyramidenzellen, welches die Prinzipalzellen des Cornu ammonis darstellen (Abb. 2). Dieses Band lässt sich sowohl makroskopisch als auch funktionell in eine CA1- und eine CA3-Region unterteilen. Der intermediäre Bereich der CA2-Region wird heute von vielen Autoren der CA1-Region zugerechnet. Gesäumt wird dieses Zellband auf der einen Seite vom Stratum oriens, in dem sich die basalen Dendriten verzweigen. Der Apikaldendrit zieht gegenüberliegend durch das Stratum radiatum und reicht mit seinen Ausläufern bis in das Stratum lacunosum-moleculare (Zilles K., 1998; Kahle W., 2001). Zusätzlich findet sich in beiden Richtungen ein Dendritenbaum, an dessen reichten Dornenbesatz überwiegend exzitatorische Synapsen Eingang finden. Weiterhin finden sich Gliazellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia als funktionell bedeutsame, zelluläre Bestandteile. Mit der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke sowie einer kontinuierlichen Nährstoffversorgung fallen ihnen wichtige Aufgaben im neuronalen Zusammenspiel zu. So schützen sie vor toxischen Substanzen und unterstützen die Energiebereitstellung.



**Abb. 2:** Faserverbindungen des Hippocampus. DG: Gyrus Dentatus, CA: Cornu ammonis (Ammonshorn). Dabei erfolgt die Unterteilung in 3 Regionen CA1-3.

Quelle: <http://www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus/hippocampus.html>

Die hippocampalen Hauptafferenzen zur integrativen Verarbeitung stammen aus dem entorhinalen Kortex. Als Tractus perforans enden diese Fasern an den Körnerzellen des Gyrus dentatus und bilden dort die erste Synapse des trisynaptischen Hauptverschaltungsweges innerhalb des Hippocampus. Die als Moosfasern bezeichneten Axone der Körnerzellen ziehen anschließend zu den CA3-Pyramidenzellen (zweite Synapse), von denen aus sie nach erneuter Verschaltung über die Schaffer-Kollaterale die CA1-Pyramidenzellen erreichen (dritte Synapse). Von hier aus erfolgt die Projektion zum Subiculum, welches den Übergang vom dreischichtigen Allo- zum sechsschichtigen Isokortex bildet. Gleichzeitig sammeln sich hier die Fasern, um im Fornix, der Hauptafferenz des Hippocampus, zum Corpus mamillare zu ziehen. Der Hippocampus zeichnet sich im Gegensatz zu vielen anderen Hirnarealen dadurch aus, dass die Funktion der Neurogenese im Gyrus dentatus nicht sistiert. Mit der Fähigkeit, ein Leben lang neue Verbindungen zwischen bestehenden Nervenzellen zu generieren, diese zu verändern, aber auch neue Neurone zu schaffen, bildet der Hippocampus die Basis für die Akquisition neuen Wissens. Grundlegende Bedeutung in diesem Zusammenhang haben Synapsen und die Änderung der Effektivität der synaptischen Übertragung, die synaptische Plastizität.

### **2.3 Synapse / Spinesynapse**

Synapsen sind neuronale Kontaktstellen, die spezialisiert dem Informationsaustausch dienen. Durch Änderung der synaptischen Übertragungsstärke, infolge einer sich verändernden Physiologie oder Morphologie der Synapse, stellen sie die Grundlage der synaptischen Plastizität dar.

Nach allgemeingültiger Definition setzt sich ihr Aufbau aus den Strukturen: präsynaptischer Teil (Bouton) mit der präsynaptischen Membran, synaptischer Spalt und postsynaptischer Teil mit der postsynaptischen Membran zusammen. Weiterhin lassen sie sich nach der Lokalisation der Boutons in Untergruppen klassifizieren. Hierbei unterscheidet man axo-somatische Synapsen (Boutons liegen am Perikaryon), axo-axonale Synapsen (Boutons liegen am Initialsegment des Axons), axo-dendritische Synapsen (Boutons liegen an Dendriten der Empfängerneurone) und Spinesynapsen (Boutons kontaktieren Spines als postsynaptischen Partner) (Kahle W., 2001).

Die als Spines bezeichneten Dornfortsätze stellen sich hierbei als membranöse Protrusionen dar, deren Ursprung überwiegend auf neuronalen Dendriten gelegen ist (Nimchinsky et al., 2002). Im hippocampalen Gewebe bilden sie hauptsächlich das postsynaptische Element exzitatorischer Synapsen, welche sich zu über 90 % an ihnen formieren (Gray, 1959; Harris und Kater, 1994; Nimchinsky et al., 2002). Die klassische Struktur stellt sich bei allen Spines grundsätzlich ähnlich dar. So verfügen sie über einen ovalen Bulbus, welcher über einen gestielten Halsteil mit dem Dendritenschaft in Verbindung steht. Die heute noch fortwährend verwendete strukturelle Differenzierung führten Peters und Kaiserman-Abramof 1970 ein. In dieser erfolgt die morphologische Unterteilung in pilzförmige (mushroom shaped), kurze (stubby) und dünne (thin) Spines, deren Distribution eine Charakteristik für verschiedene Entwicklungs- und Funktionszustände in den Gehirnregionen aufweist. An reifen Dendriten finden sich bis zu zehn Spines pro Mikrometer lokalisiert, wodurch sie die für neuronale Vorgänge zur Verfügung stehende Oberfläche erheblich vergrößern (Sorra und Harris, 2000). In ihrer Architektur stellen sie primär biochemische Kompartimente dar, die über ein reiches Repertoire an Calcium-vermittelten Signalwegen verfügen (Bloodgood und Sabatini, 2007). Resultierend aus dieser Kompartimentierung werden Moleküle nahe der Synapsen gespeichert und ihre Abdiffusion verhindert.

Für die Bildung und Funktion der Spines besitzt neben Aktin das Gerüstprotein Spinophilin eine bedeutende Rolle (Feng et al., 2000; Hao et al., 2003; Muly et al., 2004; Sarrouilhe et al. 2006). Charakteristischerweise ist es fast ausschließlich in den Dornen der Dendriten angereichert (Allen et al., 1997) und dient daher als zuverlässiger postsynaptischer Marker (Tang et al., 2004). Spinophilin besitzt die Fähigkeit, Aktinfilamente zu bündeln und die Aggregation von F-Aktin zu regulieren (Feng et al., 2000). Durch seine Interaktion mit Protein-Phosphatase 1 (PP1) ist es weiterhin in der Lage, dynamische Zellprozesse zu unterstützen.

In 1998 von Fischer durchgeführten Experimenten wurde deutlich, dass diese Zell-Protrusionen in der Lage sind, ihre Morphologie binnen Sekunden zu verändern (Fischer et al., 1998). Dies weist auf die bedeutende Rolle von Größen- und Formveränderung für die Effektivität der synaptischen Übertragung hin.

So gelten Spinewachstum und morphologische Varianz als eng verknüpft mit synaptischer Plastizität (Yuste und Bonhoeffer, 2001), welche wiederum als Voraussetzung für Lernprozesse angesehen wird (Moser et al., 1994).

## **2.4 Spinedichte im Zyklus**

Anfang der neunziger Jahre wiesen Gould und ihre Arbeitsgruppe erstmals einen Zusammenhang zwischen der Estrogensynthese und hippocampaler Spinezahl nach. Sie zeigten, dass Ovariectomie in einer verminderten hippocampalen Spinezahl resultiert und konsekutive Estrogensubstitution diesen Effekt wieder aufhebt (Gould et al., 1990).

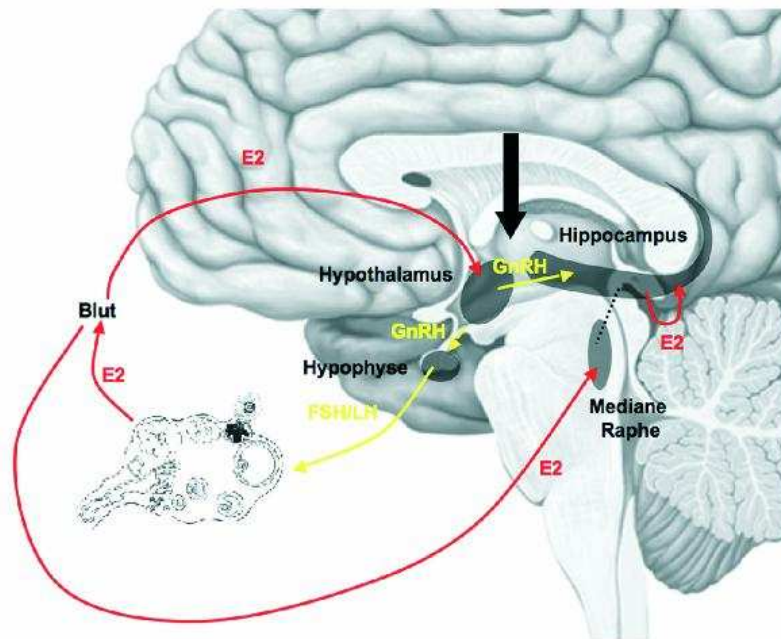
Eine weitere interessante und neuartige Form der physiologischen synaptischen Plastizität konnten Woolley et al. 1990 nachweisen, indem sie in ihren Versuchen demonstrierten, dass die Spinedichte sich mit den zyklisch fluktuierenden Estrogenplasmaspiegeln ändert (Woolley et al., 1990). Im zeitlichen Verlauf zeigte diese während des Proestrus, der Zeit erhöhter Estrogenplasmakonzentrationen, ein Maximum und fiel nachfolgend annähernd auf das Ausgangsniveau zurück.

Aufgrund dieser Ergebnisse entwickelte sich nachfolgend die weitläufig akzeptierte Auffassung, dass gonadales Estrogen die hippocampale Synaptogenese modifiziert (Gould et al., 1990). Unberücksichtigt blieb aber der Aspekt, dass die hippocampale Synaptogenese der Regulation durch GnRH unterliegt (Prange-Kiel et al., 2008). Es stellte sich nun die interessante Frage, wie regulative Mechanismen bei männlichen Individuen erfolgen, die naturgegeben weitaus niedrigere Estrogenkonzentrationen aufweisen.

## **2.5 GnRH und sein Rezeptor**

Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) besitzt eine zentrale Bedeutung im komplexen System der Steuerung reproduktiver Funktionen. So ist es wesentlich an der Regulation von Androgen- und Estrogenkonzentrationen im Organismus beteiligt. Diese Wirkung wird hauptsächlich über die Freisetzung der hypophysären Gonadotropine LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) vermittelt.

Nach seiner Bindung an spezifische Rezeptoren wird die Sekretion der Gonadoliberine FSH und LH in der Hypophyse stimuliert (Knobil, 1988), welche über den Blutweg ihre Zielstrukturen erreichen und dort die Synthese von Estrogen bzw. Testosteron induzieren. Diese wirken wiederum in einer Rückkopplungsschleife auf den Hypothalamus und sind damit in der Lage seine Aktivität zu beeinflussen.



**Abb. 3:** Physiologische GnRH-Wirkungen und hormoneller Regelkreis der Estrogenfreisetzung. Quelle: <http://mars.glia.mdc-berlin.de>

Zahlreiche frühere Arbeiten legten bereits dar, dass GnRH indirekt über in der Hypophyse gebildetes FSH und LH einen Effekt auf die Estrogensynthese in den Gonaden ausübt (Parinaud et al., 1988; Janssens et al., 2000; Abb. 3). GnRH aus dem Hypothalamus kann aber auch direkt in den Gonaden die Hormonfreisetzung stimulieren. Dabei steigern niedrige Dosen GnRH die Estrogensynthese in ovariellen Granulosazellen, wohingegen hohe Dosen hemmende Einflüsse aufweisen (Janssens et al., 2000).

Neuere Studien der letzten Jahre belegen zudem, dass dieser Mechanismus der Signalvermittlung auch in neuronalem Gewebe eine Rolle spielt. So weiß man, dass GnRH auf diese Art in der Lage ist, die Estradiolsynthese im Hippocampus zu regulieren (Prange-Kiel et al., 2008; Abb. 3). Die genauen Prinzipien der Signalvermittlung sind derzeit jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Seine Wirkungen vermittelt GnRH über einen membranständigen Rezeptor. Der humane GnRH-Rezeptor ist ein aus sieben Transmembrandomänen bestehender Peptidhormonrezeptor. Neben seiner zentralen Rolle in reproduktiven Organen ist seine Existenz auch in extrahypophysären Geweben nachgewiesen. So wird er zudem in Granulosazellen des Ovars, in Leydig-Zellen des Hodens und neuronal im lateralen Septum, den Nuclei ventromediales und arcuatus, der Amygdala, dem Parasubiculum und insbesondere auf hippocampalen Neuronen exprimiert (Jennes und Conn, 1994; Kakar und Jennes, 1995). In Experimenten von Jennes und Woolums gelang 1994 mittels *in situ* Hybridisierung der spezifische Nachweis von GnRH-Rezeptor mRNA in Pyramidenzellen dieser Region. Einen Nachweis auf Proteinebene führte Patrick Kohlmann 2008 durch, wobei er zusätzlich Bindungsstellen auf Astrozyten und Mikroglia detektierte. Überdies ergaben quantitative Analysen, dass die hippocampale Konzentration gegenüber der hypothalamischen um ein dreifaches, dem Neokortex gegenüber sogar um ein fünffaches, erhöht ist (Prange-Kiel et al., 2008).

Aus Studien an Ovarien ist bekannt, dass der humane GnRH-Rezeptor zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählt und über ein reiches Spektrum an *second messenger* Systemen verfügt. Hierzu gehören unter anderem Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonat (PIP<sub>2</sub>), Calcium, Diacylglycerol (DAG), MAP-Kinase, Proteinkinase A (PKA), cAMP und cAMP *response element-binding protein* (CREB) (Stanislaus et al., 1998). Insbesondere CREB zeichnet sich durch regulatorische Aufgaben bei Transkriptionsvorgängen aus und ist essentiell an der Vermittlung neurotropher Effekte beteiligt (Zhao et al., 2005).

Im Jahr 1971 gelang erstmals die chemische Identifizierung des neben GnRH auch als LH-RH (LH *releasing hormone*) bezeichneten Botenstoffes (Matsuo et al., 1971). In seinem strukturellen Aufbau handelt es sich um ein aus zehn Aminosäuren zusammengesetztes Dekapeptid, welches von einer kleinen Anzahl Zellen synthetisiert und sezerniert wird. Diese sogenannten Neuroaxone finden sich im medialen Septum, dem rostralen Hypothalamus und der präoptischen Region (Jennes und Conn, 1994; Herbison, 1998). Die Hauptprojektionen der GnRH bildenden Neurone verlaufen zu der am Hypophysenstiel gelegenen Eminentia mediana, wo die Hormone das Portalsystem der Adenohypophyse durchfließen.

Die GnRH-Freisetzung erfolgt in einem pulsatilen Sekretionsmodus in Intervallen von 90-120 Minuten und ist durch einen intrinsischen Impulsgeber determiniert (Knobil,



1988; Gore A., 2002). Insbesondere die Sexualhormone Testosteron und Estradiol besitzen die Fähigkeit, diesen konstanten Rhythmus und damit die GnRH-Freisetzung zu modifizieren (Gore A., 2002).

## 2.6 Estrogene werden *de novo* im Hippocampus produziert

Untersuchungen der letzten Jahre erbrachten richtungweisende Ergebnisse auf dem Gebiet der neuroendokrinen Forschung. Entscheidend war hierbei der Nachweis, dass alle steroidogenen Enzyme in hippocampalen Neuronen exprimiert werden und diese zur lokalen Estrogensynthese befähigt sind (Furukawa et al., 1998; Stoffel-Wagner, 2001; Wehrenberg et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2003).

Im Jahr 2004 zeigten Kretz et al., dass die Inkubation hippocampaler Schnittkulturen mit dem Aromataseinhibitor Letrozol zu einer signifikant verminderten Spinezahl führt (Kretz et al., 2004). Erstaunlicherweise resultierte jedoch die Estrogenbehandlung der Schnitte in keiner Zunahme der Spinezahl (Kretz et al., 2004). Diese Ergebnisse standen nun im Widerspruch zu den oben aufgeführten *in vivo* Ergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass erhöhte Estrogenplasmaspiegel im Rahmen des Zyklus zu einer Zunahme der hippocampalen Spinedichte führen. Die bisher gültige These, dass gonadales Estrogen die hippocampale Spinogenese vermittelt, war damit in Frage gestellt.

Aus den Ergebnissen von Kretz et al. (2004) und der Tatsache, dass die hippocampale Estrogenkonzentration der Serumkonzentration gegenüber um ein Vielfaches erhöht ist (Hojo et al., 2004), leitete sich die gegenwärtige Auffassung ab, dass nicht das gonadale, sondern vielmehr hippocampal *de novo* synthetisiertes Estrogen für die Synaptogenese verantwortlich ist.

Diese These gelang es 2008 experimentell zu bestätigen. So belegten Prange-Kiel et al., dass die durch Estrogen vermittelte Modifizierung der Spinedichte auf einer lokalen, hippocampalen Hormonsynthese beruht (Prange-Kiel et al., 2008). Es stellte sich nun die Frage, wie zyklische Veränderungen der Spinedichten entstehen, wenn nicht die Schwankungen des gonadalen Estrogens die Ursache darstellen.

Diese Frage konnte ebenfalls durch Prange-Kiel et al. (2008) beantwortet werden, indem sie herausfanden, dass auch die hippocampale Estrogensynthese der direkten

Regulation durch GnRH unterliegt und dieses in seiner Wirkung eine Synchronisation der peripheren und hippocampalen Estrogensynthese vermittelt (Prange-Kiel et al., 2008). Sie wiesen weiterhin nach, dass diese Regulation aromataservermittelt ist. Durch Applikation des Aromataseinhibitors Letrozol wurde die GnRH-induzierte Spinogenese aufgehoben (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004).

Heute wird davon ausgegangen, dass hippocampale und gonadale Estrogensynthese gleichartig ablaufen. Dabei ist 17- $\beta$ -Estradiol (E2) das Wichtigste der aus Androgenen produzierten Estrogene.

Die Forschung der vergangenen Jahrzehnte hat das anfängliche Bild von Estrogen als einfachem weiblichen Sexualhormon grundlegend gewandelt. In seinen Wirkungen wird es heute allgemein nicht nur als neuroaktives Steroid, sondern vielmehr als Neuromodulator anerkannt (Balthazart und Ball, 2006).

Gerade hier stellt die aktuelle Forschung mit ständig neuen Erkenntnissen viel Diskussionsmaterial bereit. Obwohl wir wissen, dass Testosteron hauptsächlich über die Umwandlung in Estrogen seine Wirkung ausübt (Fester et al., 2009), ergaben kürzlich durchgeführte Versuche in unserem Labor einen Hinweis darauf, dass auch Testosteron selber unabdinglich für die Aufrechterhaltung der Spinesynapsen sein könnte (Breda von Blittersdorf 2011, med. Dissertation). Aus diesem Grund soll diese Arbeit dazu beitragen, geschlechtsdimorphe Unterschiede besser verstehen zu können.

## **2.7 Arbeitshypothese und Fragestellung**

Estrogene werden nicht nur im weiblichen Organismus synthetisiert. Beide Geschlechter sind in der Lage, Estrogen aus Androgenen zu produzieren (Behl und Manthey, 2000). Was sie dennoch voneinander unterscheidet, sind unterschiedliche Konzentrationen der Sexualhormone im Blut. In unserem Labor wurde kürzlich demonstriert, dass die Stimulation mit GnRH zu einer veränderten Spinedichte im Hippocampus führt, wobei dieser Effekt durch eine Estrogen *de novo* Synthese vermittelt wird (Prange-Kiel et al., 2008).

Vor dem Hintergrund, dass sich die GnRH-Sekretion bei männlichen und weiblichen Individuen physiologisch unterscheidet, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob geschlechtsspezifische Effekte von GnRH auf Spinedichte und synaptische

Plastizität vorhanden sind. Anhand hippocampaler Schnittkulturen soll geklärt werden, ob

- die Stimulation mit niedrigen und hohen Dosen GnRH eine geschlechtsspezifische Auswirkung auf die Spinophilinmenge, als Korrelat der synaptischen Plastizität, besitzt.
- sich die Neubildung dendritischer Spinesynapsen nach GnRH-Stimulation bei männlichen und weiblichen Tieren signifikant voneinander unterscheidet.
- sich Unterschiede in der GnRH-Rezeptorverteilung zeigen.
- die durch GnRH induzierte Estradiolsynthese bei männlichen und weiblichen Individuen Unterschiede aufweist.

### 3. Material

#### 3.1 Arbeitsmaterialien, Geräte

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| Brutschrank, 37 °C und 65 °C                              | MEMMERT                       |
| CO <sub>2</sub> Inkubator, 37 °C                          | HERAEUS                       |
| Cutfix Surgical Disposable Scalpel                        | BRAUN                         |
| Deckgläser, 20 x 46 mm                                    | MARIENFELD                    |
| Desinfektionsmittel                                       | BODE                          |
| Diamantmesser   | DIATOM                        |
| Dokumentenfolie   | LEITZ                         |
| Einbettungsformen   | PLANO                         |
| ep T.I.P.S. Standard, verschiedene Größen                 | EPPENDORF AG                  |
| Falcon Multiwell Cell Culture Plate, 6 well               | BECTON DICKINSON LAB.         |
| Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml                             | GREINER BIO-ONE               |
| Färbekästen nach Hellendahl (Küvetten)                    | ROTH                          |
| Feuchtkammer  | EIGENBAU UKE                  |
| Fotopapier  | TETENAL                       |
| Gefrierschrank, -25 °C und -80 °C                         | LIEBHERR                      |
| Gelatinekapseln   | PLANO                         |
| Gildergrids   | PLANO                         |
| Handschuhe, verschiedene Größen                           | KIMBERLY-CLARK                |
| Heidemannspatel   | AESCULAP DE                   |
| Heizplatte  | W. PFENNING                   |
| Kosmetiktücher Samtess                                    | WEPA                          |
| Kühlschrank, 4 °C   | BOSCH/ LIEBHERR               |
| Lichtmikroskop  | OLYMPUS/ ZEISS                |
| LSM Mikroskop   | ZEISS                         |
| Microm HM 560   | MICROM                        |
| Microtom  | REICHERT-JUNG                 |
| Microtome Blade S35                                       | FEATHER                       |
| Mikroskop Axiovert 200M                                   | ZEISS                         |
| Millicell-CM  | MILLIPORE                     |
| Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup> | BRAND GERMANY                 |
| Objektträger SuperFrost/ Plus                             | ASSISTENT                     |
| Parafilm M  | PECHINEY PLASTIC<br>PACKAGING |
| Pasteurpipetten   | ASSISTENT                     |
| Pinsel  | DA VINCI/ PELIKAN             |
| Pinzette  | MERCK                         |
| Pipetten 100 und 2500 ml                                  | EPPENDORF AG                  |
| Pipetten 2, 20, 100, 200 und 1000 µl                      | GILSON                        |
| Pipettenspitzen für Pipetus 5, 10 und 25 ml               | BECTON DICKINSON LAB.         |

|                             |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| Pipetus Akku                | HIRSCHMANN LABORGER.  |
| Reagiergefäße 1,5 und 2 ml  | EPPENDORF AG          |
| Rüttler                     | EDMUND BÜHLER         |
| Schere                      | FINE SCIENCE TOOLS    |
| Serologische Pipetten       | FALCON                |
| Sicherheitswerkbank Stufe 2 | HERAEUS               |
| Stericup Filter Units       | MILLIPORE             |
| Tissue Chopper              | H. SAUR               |
| Ultramicrotom               | REICHERT-JUNG         |
| USB-Stick „PNY“ 4 GB        | PNY                   |
| Vortex Genie 2              | SCIENRIFIC INDUSTRIES |
| Waage                       | METTLER               |
| Zentrifuge Universal 32R    | HETTICH               |

### 3.2 Software

|                                   |                         |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Excel 2000 (Software)             | MICROSOFT               |
| PC/Macintosh-Systeme              | VERSCHIEDENE HERSTELLER |
| Programm Openlab 3.1.5 (Software) | IMPROVISION             |
| SAS                               | CARY, NORTH CAROLINA    |
| Windows 2000 (Software)           | MICROSOFT               |
| Windows XP (Software)             | MICROSOFT               |
| Word 2000 (Software)              | MICROSOFT               |

### 3.3 Chemikalien

|   |                    |
|---|--------------------|
| 2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol, 2 % | SERVA              |
| Aceton                                      | BAKER              |
| Albumine, Bovine, BSA Nr. A7906             | SIGMA              |
| Aqua ad iniectabilia, 1 Liter               | BAXTER DEUTSCHLAND |
| B 27 Supplement                             | GIBCO              |
| Bleicitrat                                  | MERCK              |
| Borsäure                                    | MERCK              |
| DAKO  | DAKO CYTOMATION    |
| DAPI  | SIGMA              |
| Dinatriumhydrogenphosphat                   | MERCK              |
| Ethanol, absolut                            | MERCK              |
| Glucose, 50 %                               | FRESENIUS KABI     |
| Glutaraldehydlösung, 25 %                   | MERCK              |
| Glycidether                                 | SERVA              |
| Gonadotropin releasing hormone, L7134       | SIGMA              |
| Hanks Balanced Salts (HBSS)                 | GIBCO              |

|                                     |                      |
|-------------------------------------|----------------------|
| HBSS                                | GIBCO                |
| HEPES                               | SIGMA                |
| Horse Serum                         | GIBCO                |
| Kaliumhydrogenphosphat              | MERCK                |
| L-Glutamin, 200 mM                  | SIGMA                |
| Minimum Essential Medium            | GIBCO                |
| Natriumdihydrogenphosphat           | MERCK                |
| Natriumhydroxid                     | MERCK                |
| Neurobasalmedium A (ohne Phenolrot) | GIBCO                |
| Osmiumtetroxid, 1 %                 | ROTH                 |
| Papain                              | SIGMA                |
| Paraformaldehyd                     | MERCK                |
| PBS Tabletten                       | GIBCO                |
| Penicillin/ Streptomycin            | GIBCO                |
| Penicillin-Streptomycin Lösung      | GIBCO                |
| Poly-L-Lysin                        | SIGMA                |
| Propylenoxid                        | SERVA                |
| Saccharose                          | MERCK                |
| Salzsäure                           | MERCK                |
| Sodium Bicarbonate Solution, 7,5 %  | SIGMA                |
| Tissue Tek                          | SAKURA               |
| Toluidinblau                        | MERCK                |
| Trockeneis                          | HUMANGENETIK DES UKE |
| Uranylacetat                        | MERCK                |

### 3.4 Antikörper

|                                      |                      |
|--------------------------------------|----------------------|
| Neurabin II, monoclonal, 612166      | BD TRANSDUCTION LAB. |
| Cy3, monoklonal, Goat Anti-Mouse IgG | JACKSON IMMUNO RES.  |

### 3.5 Lösungen

#### BSA 3 % (bovine serum albumin)

- 3 g bovines Albumin in 100 ml PBS lösen

#### HBSS

- 50 ml 10x HBSS
- 5,04 ml HEPES
- ad 450 ml H<sub>2</sub>O
- pH auf 7,3 einstellen
- ad 500 ml mit Aqua dest. auffüllen
- steril filtrieren

**Inkubationsmedium Sliceulturen**

- 25 ml Minimum Essential Medium (MEM), 2-fach konzentriert
- 1 ml L-Glutamin, 200 mM
- 580 µl Sodium Bicarbonate Solution, 7,5 %
- 25 ml Hanks Balanced Salts (HBSS)
- 25 ml Horse Serum
- 1 ml Penicillin-Streptomycin Lösung
- 1250 µl Glucose, 50 %
- 19 ml Aqua dest.
- Titration bis pH 7,25 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

**Neurobasalmedium**

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

**PBS (phosphate buffered saline)**

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
- in 1 L Aqua dest. (pH 7,4) bei Raumtemperatur lösen

alternativ:

- 500 ml Aqua dest. (pH 7,4)
- 1 PBS Tablette
- Titration bis pH = 7,4 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

**PFA 4 %**

- 4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS lösen

**Phosphatpuffer 0,1 M**

- 1 ml 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 1 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- Aqua dest.

**Poly-L-Lysin**

- 6.183 g Borsäure in 800 ml  $\text{H}_2\text{O}$  lösen
- pH auf 8,5 einstellen und ad 1000 ml auffüllen
- steril filtrieren
- 100 mg Poly-L-Lysin darin lösen, aliquotieren und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  einfrieren

**Präparationsmedium Slicekulturen**

- 50 ml Minimum Essential Medium (MEM), 2-fach konzentriert
- 1 ml L-Glutamin, 200 mM
- 48 ml Aqua dest.
- Titration bis pH 7,35 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)



## **4. Methoden**

### **4.1 Eingesetzte Tiere**

Wir verwendeten für unsere Experimente fünf Tage alte Ratten (P5) und Ratten am Tag der Geburt (P0) des Zuchtstammes WISTAR, bereitgestellt durch die zentrale Tierhaltung des UKE. Die Haltung erfolgte unter kontrollierten Bedingungen, Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen der Behörde für Gesundheit und Wissenschaft durchgeführt.

### **4.2 Präparation der Hippocampi**

Die Präparation der Hippocampi wurde unter semisterilen Bedingungen realisiert. Zunächst dekaptierten wir die Ratten und resizierten die Haut über der Schädelkalotte. Mit einer geraden Schere eröffneten wir median sagittal das Schädeldach. Um eine Verletzung der cerebralen Strukturen zu vermeiden, setzten wir zwei weitere Entlastungsschnitte lateral. Die anschließende Entfernung des Gehirns wurde mit einem Heidemannspatel vorgenommen. Nach erfolgter Resektion überführten wir dieses auf einen mit PBS getränkten Schwamm. Es schloss sich zunächst die Entfernung von Hirnstamm und Kleinhirn mittels Skalpell an. Darauffolgend trennten wir unter Zuhilfenahme des Heidemannspatels die beiden Hemisphären voneinander, sodass sich der freie Blick auf den Hippocampus darbot. Abschließend „schälten“ wir die Hippocampi aus den Hemisphären und nahmen sogleich die Anlage der Kulturen vor, um ischämischen Schäden weitestgehend vorzubeugen.

Unser Vorgehen erfolgte hierbei nach der Methode von Stoppini (Stoppini et al., 1991).

### **4.3 Hippocampale Gewebekulturen**

Aus den wie unter 4.2 beschrieben präparierten Hippocampi fertigten wir unter Verwendung des *Tissue Choppers* 375 µm dünne Gewebsschnitte an. Anschließend wurden diese mittels Heidemannspatel in eine mit Präparationsmedium (pH 7,35, 4 °C)

befüllte Glasschale überführt, um unter lichtmikroskopischer Kontrolle die Separation vornehmen zu können. Wir sicherten auf diese Weise die vollständige Entnahme der CA1- und CA3-Region. Geschlechtsspezifisch getrennt gaben wir benachbarte Gewebeschnitte auf mit Präparationsmedium vorbereitete, 0,4 µm dünne Biomembranen. Unter sterilen Bedingungen befüllten wir Zellkulturplatten mit sechs Kavitäten. Dazu pipettierten wir 1 ml Inkubationsmedium (pH 7,25) pro *well*. In die bereits vorbereiteten *wells* ließen wir nun die Membranen ein und saugten überschüssiges Medium mit einer sterilen, gebogenen Glaspipette ab. Nachfolgend wurden die Kulturen für elf Tage inkubiert. Bei einer Temperatur von 37 °C, sowie in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre simulierten wir *in vitro* Bedingungen. Um einer Malnutrition vorzubeugen, erfolgte Tag eins post praeparationem unter sterilen Bedingungen der erste Austausch des Kulturmediums. Die anschließenden Wechsel erfolgten im zweitägigen Abstand, wobei wir jeweils mindestens 8 ml zur quantitativen Estradiolbestimmung im Medium aufbewahrten. Weiterhin erfolgte die Realisation der Versuche in Unkenntnis der Kulturbehandlung, um Manipulation auszuschließen und Objektivität zu gewährleisten. Jedoch achteten wir in allen Arbeitsschritten streng auf die systematische Anordnung der Gewebeschnitte, um zu jedem Zeitpunkt die sichere Identifikation der paarigen Zusammengehörigkeit zu ermöglichen.

#### **4.4 Hippocampale Dispersionskulturen**

Die Herstellung hippocampaler Zellkulturen erfolgte nach der Methode von G. J. Brewer (Brewer, 1997), jedoch modifizierten wir das Schema nach Prange-Kiel (Prange-Kiel et al., 2003).

Einen Tag vor Beginn der Präparation befüllten wir jede Kavität einer 24 *well* Zellkulturplatte mit Glasplättchen. Anschließend pipettierten wir 500 µl Poly-L-Lysin hinzu und inkubierten die Platten für 4 Stunden. Nach Abschluss der Inkubation entfernten wir das Poly-L-Lysin und ersetzten es mit 1 ml sterilem Wasser pro *well*. Auf diese Art verblieben die Zellkulturplatten bis zum nächsten Morgen in einer Sicherheitswerkbank.

Am Präparationstag entnahmen wir die Hippocampi und überführten sie sogleich in größere Petrischalen, welche mit HBSS befüllt waren. Nach Abschluss der Entnahme gaben wir die Hippocampi, nach Geschlechtern getrennt, in 15 ml Falconröhrchen. In diesen spülten wir das Gewebe nochmals mit HBSS und gaben nach dem Spülvorgang erneut 5 ml HBSS, sowie 2 ml Papain zum Verdauen hinzu. In diesem Zustand inkubierten wir das Gewebe für 20 Minuten im Brutschrank. Nach Abschluss der Inkubation schlossen sich vier weitere Spülgänge mit HBSS an, die mit der Zugabe von 2 ml Neurobasal A Medium endeten. Vor dem Hintergrund von Untersuchungen die darauf hindeuten, dass Phenolrot über eine estradiolähnliche Wirkung verfügt, verwendeten wir in unseren Versuchen Phenolrotfreies Neurobasal A Medium (Berthois et al., 1986). Für den nächsten Schritt, das Erstellen der Zellsuspension, benutzten wir feuerpolierte Pasteurpipetten. Hierbei zerkleinerten wir das durch Papain angedaute Gewebe mittels auf- und abpipettieren, bis eine homogene Suspension entstand. Um unverdaute Bestandteile zu entfernen, filterten wir diese durch ein 40 µm Zellsieb und füllten das Falconröhrchen mit dem Filtrat auf 5 ml auf.

Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Nach entsprechender Auffüllung der Suspension stellten wir eine Zelldichte von 100 000 Zellen/ml ein und füllten jedes *well*, mit den darin gelegenen Poly-L-Lysin Platten, mit 1 ml auf. Um nun optimale Bedingungen für das Anheften und Überleben der Neurone zu schaffen, gaben wir die Kulturplatten für eine Stunde bei 37 °C und mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre in den Brutschrank. Im Anschluss daran führten wir einen Mediumwechsel durch, wobei wir altes durch frisches Neurobasal A Medium ersetzen. In der vorerst abschließenden mikroskopischen Vitalitätskontrolle zeigten erste Zellen bereits neu gebildete Fortsätze und wiesen damit auf einen funktionellen *in vitro* Zellverband hin.

#### **4.5 Stimulation und Inhibition**

Nach vier Tagen Vorkultur fuhren wir mit der Behandlung fort, es erfolgte die erste Stimulation beziehungsweise Inhibition. Alle weiteren erfolgten zeitgleich im Rahmen des Mediumwechsels zweitägig. Unbehandelte Kulturen, die wir unter identischen Versuchsbedingungen mitführten, dienten bei allen Experimenten als Kontrolle. Wie in

der Einleitung erwähnt, stimulierten wir mit Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), wobei wir bei Slicekulturen mit Konzentrationen von 100 nM und 500 nM arbeiteten, in Dispersionskulturen hingegen verwendeten wir 10 nM und 500 nM. In bereits publizierten Untersuchungen zeigte sich bei GnRH-Konzentrationen von 10 nM und 100 nM ein signifikanter Anstieg in der Estradiolsynthese, wohingegen bei 500 nM eine signifikante Reduktion beobachtet wurde (Prange-Kiel et al., 2008). Die maximalen Effekte in Dispersionskulturen wurden hierbei mit einer Stimulationskonzentration von 10 nM GnRH erreicht, in Slicekulturen hingegen zeigte die Stimulation mit 100 nM GnRH deutlichere Effekte. Aus diesem Grund verwendeten wir in den jeweiligen Versuchen unterschiedliche Konzentrationen. Um resultierende Effekte der GnRH-Stimulation auf den Spineturnover geschlechtsspezifisch darstellen zu können, stimulierten wir sowohl die weiblichen als auch die männlichen Hippocampi separat mit den oben angeführten Konzentrationen. Die Stimulation wurde nach sieben Tagen mit der Fixierung der Zellen beendet.

## **4.6 Fixierung der hippocampalen Slicekulturen**

### **4.6.1 Immunhistochemische Fixierung**

Nach viertägiger Vorkultur und anschließender siebentägiger Behandlung wurde unter sterilen Bedingungen die Fixierung mit 4 % PFA durchgeführt. Dazu verwarfen wir das verbliebene Nährmedium und spülten die entnommenen Hippocampi initial zweimal mit 37 °C warmen PBS. Anschließend benutzen wir für zwei weitere Spülvorgänge aus dem Kühlschrank entnommenes, auf 4 °C gekühltes PBS. Es folgte eine Fixierung über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 4 %iger PFA Lösung. Wiederum spülten wir im Anschluss dreimal mit auf 4 °C temperiertem PBS, um einen größtmöglichen Anteil des PFA auszuwaschen. Pro *well* wurden anschließend 2 ml 25 %iger Saccharose hinzugefügt, die dort sechs Stunden verblieben. Anschließend entnahmen wir die Gewebeschnitte aus den Kavitäten und ordneten die Paarigen gleichgerichtet auf einem Deckgläschen an. Um Gewebedestruktionen durch Einfrieren möglichst auszuschließen, entfernten wir mittels *Tissues* verbliebene Restflüssigkeit. Erst hiernach überzogen wir die Hippocampuspräparate mit Tissue-Tek ® und überführten sie zum Schnellfrost in eine mit flüssigem Stickstoff gefüllte Isolierbox.

#### 4.6.2 Elektronenmikroskopische Fixierung

Für ein vergleichendes Experiment fixierten wir einen Teil der Kulturen speziell für elektronenmikroskopische Untersuchungen. Wir verwarfen hier ebenfalls das verbliebene Nährmedium. Wiederum spülten wir initial zweimal mit 37 °C warmen, sowie einmal mit 4 °C kaltem PBS und schlossen unmittelbar einen weiteren Spülvorgang mit 4 °C kaltem 0,1 M Phosphatpuffer an. Im Folgenden nahmen wir für drei Stunden bei 4 °C die Fixierung vor. Hierzu verwendeten wir Glutaraldehydlösung 2,5 % in 0,1 M Phosphatpuffer und terminierten nachfolgend den Vorgang mit einem letzten Spülvorgang in 4 °C kaltem 0,1 M Phosphatpuffer.

Anschließend setzten wir für eine halbe Stunde 1 %iges Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer mit Saccharose zur Nachfixierung zu. Weiterhin wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, um spätere Gewebedestruktionen zu minimieren. Hierfür verwendeten wir jeweils zehn Minuten unvergällten Ethanol, verdünnt mit Aqua dest. in aufsteigenden Konzentrationen von 35 %, 50 %, 70 %, 96 %, terminiert mit zwei Durchgängen 100 %igem Ethanol. Abschließend versetzten wir die Schnitte zweimal 15 Minuten mit Propylenoxid, um Restwasser gesichert zu entziehen. Für die folgenden drei Stunden applizierten wir ein Intermedium bestehend aus Propylenoxid und Glycidether im Verhältnis 1:3 sowie einen als Accelerator fungierenden Zusatz von 2 % 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol. Die paarigen Gewebeschnitte legten wir in auf Silikonplatten vorbereitete Tropfen Glycidether und bedeckten diese mit Dokumentenfolie. In dieser Weise vorbereitet übertrugen wir sie für den Zeitraum einer Nacht zum Aushärten in einen auf 65 °C temperierten Brutschrank. Am nächsten Morgen lösten wir die Folie einschließlich der ihr anhaftenden Schnitte. Zunächst wurden mit Identifikationsnummer versehene Gelatine kapseln mit Glycidether befüllt. Diese stülpten wir nachfolgend über die Gewebekulturen. So gefertigte Schnittblöcke wurden abermals eine Nacht im Brutschrank ausgehärtet.

Der Zuschnitt erfolgte am Microtom mittels Diamantmesser, anschließend färbten wir die Präparate frei schwimmend in Toluidinblau. Für die Lichtmikroskopie verwendeten wir 1 µm Schnittdicke, mit der hier standardmäßig gearbeitet wurde. Nach eingestellter Übersicht entnahmen wir die indizierten Areale der CA1-Region und schnitten diese gezielt am Ultramicrotom (Scheibendicke <100 nm) zu. Zur folgenden Übertragung auf einen Kupferschlitzträger verwendeten wir eine Wimper. Nach abgeschlossener

Applikation erfolgte die EM-Färbung. Hierfür setzten wir initial für 30 Minuten Uranylacetat zu. Im Anschluss an einen Waschgang wurde dieses über weitere fünf Minuten durch Bleicitrat ersetzt und abschließend die Färbung durch einen letzten Spülvorgang beendet. Unser Vorgehen erfolgte dabei nach der Methode von Reynolds (Reynolds, 1963).

#### **4.7           Zuschnitt und Immunhistochemie der Gewebekulturen**

Das *Reslicing* der bei -80 °C gelagerten Kulturen erfolgte ohne Unterbrechung der Kühlkette im Kryostaten. Wir verwendeten eine Schnittdicke von 20 µm um optimale Bedingungen für die Antikörperbindung zu schaffen. Mit einem Spatel erfolgte die Überführung in raumtemperiertes PBS, wobei wir zur anschließenden Applikation auf Objektträger die Gewebeschnitte mit einem Pinsel entnahmen. Nach abgeschlossener Übertragung verblieben die Objektträger bei 25 °C auf einer Heizplatte. Mit eisgekühltem Aceton fixierten wir diese abschließend für 15 Minuten. Die Asservation der Schnitte erfolgte in Gefrierboxen bei -25 °C.

Die sich anschließende Immunhistochemie führten wir unter semisterilen Bedingungen durch. Initial wurden die auf den Objektträgern fixierten Hippocampuspräparate zweimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Bei diesem, sowie allen folgenden Waschgängen, befanden sich die Küvetten in fortwährender Bewegung, um ein möglichst artefaktfreies Ergebnis zu erzielen. Darauf folgend blockierten wir die Kulturen bei Raumtemperatur mit 3 %igem BSA in PBS für 30 Minuten, um unspezifische Immunreaktionen zu verhindern. Um eine permanente Flüssigkeitsbenetzung der Gewebeschnitte zu gewährleisten, erfolgten sämtliche Inkubationen in der Feuchtkammer. Nach Ablauf der vorgesehenen Zeit wurde die BSA-Lösung durch die Primärantikörperlösung ersetzt. Hierzu benutzten wir einen monoklonalen Spinophilin-Antikörper (Anti-Neurabin II) in der Verdünnung 1:250 in PBS. Dieser verblieb bei einer Temperatur von 37 °C und unter Abwesenheit von Licht für zwei Stunden auf den Objektträgern. Anschließend wurden die Kulturen je einmal fünf und einmal zehn Minuten mit PBS gespült. Nun folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers, wobei wir einen monoklonalen Cy3-markierten Antikörper in der Verdünnung 1:350 verwendeten. Die Kulturen wurden so eine Stunde bei 37 °C unter

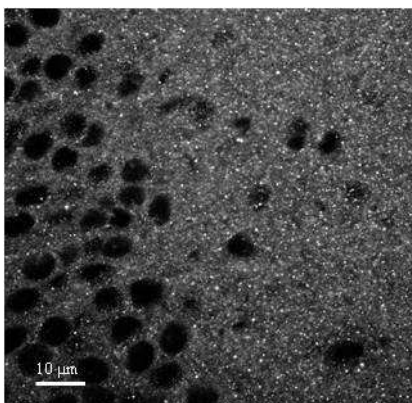
Lichtausschluss inkubiert. Es folgte erneut ein zehnmütiger Spülvorgang mit PBS, woraufhin wir die Kernfärbung mit DAPI (Verdünnung 1:1000 in PBS) für eine Minute pro Objektträger durchführten. Nach einem abschließenden Spülgang von zweimal fünf Minuten in PBS entfernten wir mit einem *Tissue* die überschüssige Flüssigkeit. Sogleich versahen wir die Präparate mit einem Tropfen DAKO und deckten sie mit einem Deckglas ein. Um die Fluoreszenz sicher auf Anti-Neurabin II-Bindungen zurückzuführen, führten wir jeweils zwei Objektträger als Negativkontrolle mit. Bei diesen wurde die 3 %ige BSA-Lösung nicht durch den Primärantikörper ersetzt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten jedoch unter identischen Versuchsbedingungen. Das eben beschriebene Vorgehen gilt als grundlegender Standard der gesamten Arbeit.

## 4.8 Bildanalyse

### 4.8.1 Bildanalyse der Immunhistochemie

Die Intensitätsmessung nach immunhistochemischer Behandlung wurde mit Hilfe des *Laser Scanning Microscopes* durchgeführt. Eingangs definierten wir optimale Messeinstellungen als Standard, sodass die Fluorchrommarkierten Antikörper bei gleicher Wellenlänge – d.h. 370 nm für DAPI und 546 nm für Cy3 – und Intensität des Lasers gemessen wurden. Diese für das Scannen der Gewebeschnitte optimierten Parameter wurden im weiteren Verlauf nicht mehr verändert, sodass in allen Versuchsgruppen gleiche Bedingungen sichergestellt waren.

Zunächst stellten wir bei 200-facher Vergrößerung das Stratum pyramidale der CA1- und CA3-Region ein, um anschließend bei 400-facher Vergrößerung signalstarke Bilder im angrenzenden Stratum radiatum aufzunehmen.



**Abb. 4:** Pyramidenzellschicht (links) und Stratum radiatum (rechts) der CA1-Region.

Die Aufnahmen erfolgten digital und wurden ohne Kenntnis der vorangegangenen Kulturbehandlung gespeichert, um möglichst hohe Objektivität zu gewährleisten. Entsprechend des Versuchsaufbaus behielten wir jedoch die paarige Zuordnung bei. Die semiquantitative Auswertung der Spinophilinsignale erfolgte mit Hilfe von Openlap 3.1.5. (Improvision) auf einem Macintosh-PC (OS 9.1.).

Hierzu markierten wir fünf Areale definierter Größe, um anschließend im Stratum radiatum die Messung durchzuführen. Zur Auswertung wurde nachfolgend die Fläche jedes Spinophilinsignals mit der entsprechenden Intensität multipliziert, sodass sich hieraus der *staining index* (Färbungsintensität) ergab. Pro Gewebeschnitt erhielten wir auf diese Weise mehrere Indizes, aus denen wir mit Hilfe des Programms Excel die Mittelwerte berechneten. Diese verwendeten wir für die nachfolgenden Auswertungen.

#### **4.8.2 Bildanalyse der Elektronenmikroskopie**

Um möglichst hohe Objektivität bei der Auswertung zu gewährleisten, definierten wir zu Beginn ein Standardvorgehen. Dazu werteten wir nur Strukturen, die dem definierten Aufbau einer Synapse mit folgenden strukturellen Maßstäben folgten:

präsynaptische Membran,

präsynaptische Vesikel,

synaptischer Spalt,

postsynaptische elektronische Dichtung (Kahle W., 2001).

Wir verglichen dazu jeweils zwei Aufnahmen, die den Schnitt abgebildet von beiden Seiten, wiedergaben. In diesem Prozess nahmen wir ausschließlich jene auf, welche eindeutig nur in einem Anschnitt zu identifizieren waren. Auf einer quadratischen,  $6,4 \mu\text{m}^2$  messenden Fläche ( $16,8 \times 16,8 \text{ cm}$ ) erfolgte die quantitative Auswertung. Als Zählausschnitt wählten wir generell den Bereich größter Synapsendichte.

#### **4.9 Quantitative Estrogenbestimmung mittels Radioimmunoassay**

Der Radioimmunoassay zeichnet sich durch hohe Sensitivität und Spezifität sowie der Nachweismöglichkeit geringer Konzentrationen bis  $10^{-18} \text{ M/l}$  aus. Daher erweist er sich



als etabliertes Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Estrogengehaltes im Kulturmedium.

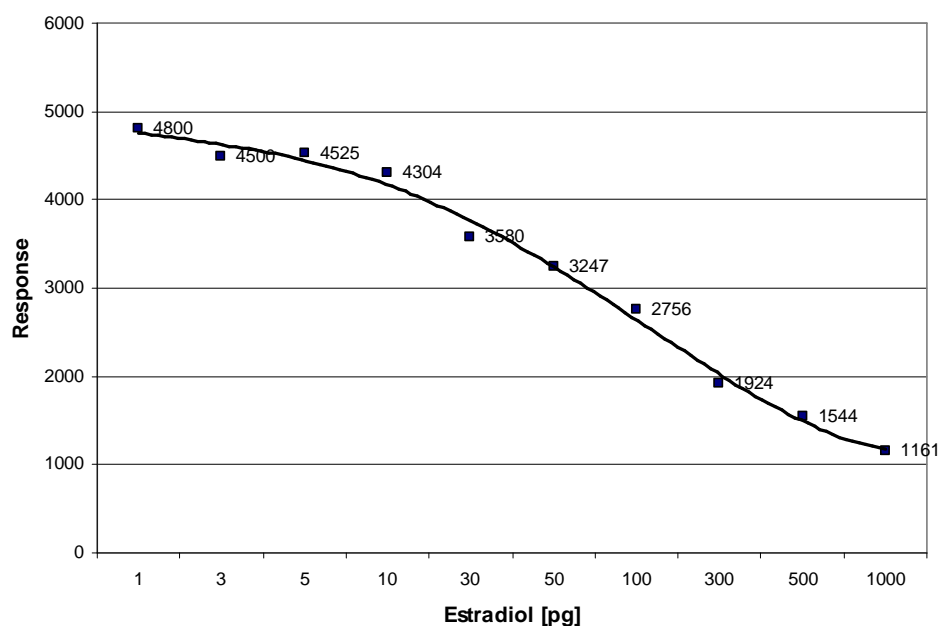
Nach viertägiger Vorkultur erfolgte Tag fünf vor der initialen GnRH-Applikation von 100 bzw. 500 nM die erste Mediumentnahme. Vier weitere schlossen wir in zweitägigem Abstand über einen Stimulationszeitraum von sieben Tagen an.

Bei jedem Mediumwechsel entnahmen wir mindestens 8 ml, die wir sogleich zum Einfrieren übergaben.

Für die folgende Asservation wurden die Proben fortlaufend nummeriert, sodass die Auswertung mittels Radioimmunoassay in Unkenntnis der Kulturbehandlung erfolgte.

Um die als Vergleichsniveau dienende Standardkurve für die folgenden Messungen zu erstellen wurde unbehandeltes Kulturmedium verwendet.

Dazu wurde durch stufenweise Erhöhung der 17- $\beta$ -Estradiolkonzentration (X-Achse) mit Hilfe des RIA der entsprechende Response-Wert (Y-Achse) ermittelt.



**Abb. 5:** Kalibrierungskurve als Grundlage der quantitativen Estradiolbestimmung.

Die Durchführung des Radioimmunoassay erfolgte in der Universitätsklinik Göttingen, Department für Endokrinologie. Zur Analyse wurden von jeder Probe 5 ml Medium getrocknet und in 250  $\mu$ l Peptid-Puffer aufgenommen.

17- $\beta$ -Estradiol wurde auf SEP-PAK C18-Extraktionskartuschen selektiv adsorbiert und anschließend mit Methanol eluiert. Die quantitative Bestimmung im Eluat erfolgte mittels RIA unter Anwendung des Standardprotokolls. Die Zählung der Impulse (*counts per minute*; CPM) erfolgte anschließend mithilfe eines Gamma Counters.

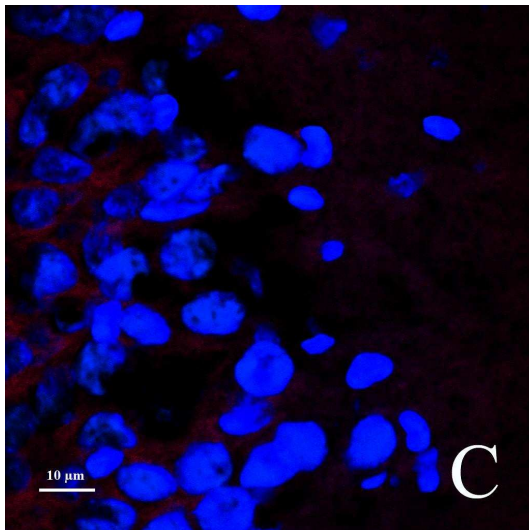
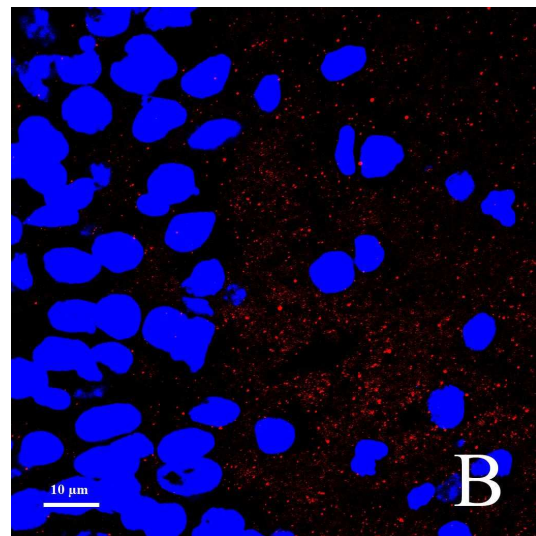
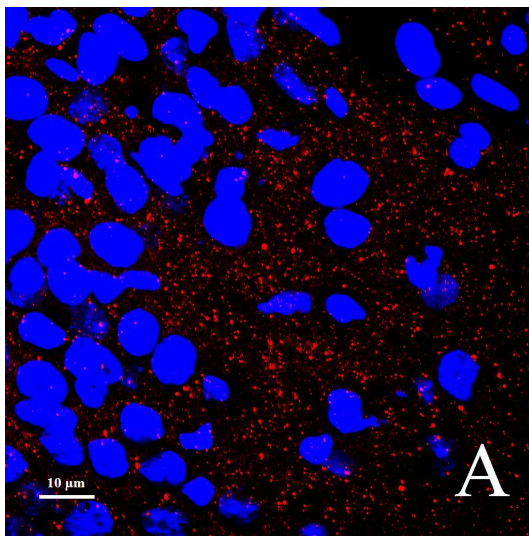
## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Immunhistochemie**

Untersuchungen der letzten Jahre bestätigen, dass hippocampal synthetisiertes Estradiol die synaptische Plastizität beeinflusst. Prange-Kiel et al. (2008) konnten dosisabhängige Effekte von GnRH auf die Estrogensynthese und die nachfolgende Spinebildung zeigen. Im Hinblick auf geschlechtsspezifische physiologische Unterschiede der GnRH-Sekretion war für uns die Frage nach sexuellen Differenzen der Spinogenese von Interesse. Hierfür untersuchten wir die Spinophilinimmunreaktivität als Marker der synaptischen Plastizität. Dieses Aktin-assoziierte Gerüstprotein ist fast ausschließlich in dendritischen Spines angereichert (Allen et al., 1997). Da diese das postsynaptische Element exzitatorischer Synapsen bilden, dient Spinophilin als verlässlicher postsynaptischer Marker (Tang et al., 2004)

Um der Fragestellung einer genusabhängigen Änderung der Spinophilinmenge gezielt nachzugehen, erfolgte zunächst eine viertägige Vorkultivierung der hippocampalen Schnitte und anschließend eine siebentägige Behandlung mit GnRH in Konzentrationen von 100 nM und 500 nM.

In den konfokalmikroskopischen Übersichtsaufnahmen fielen bereits Signalunterschiede auf, wobei bei einer Stimulationskonzentration von 100 nM gegenüber der Stimulation mit 500 nM GnRH deutlich mehr fluoreszierende Signale auftraten. Die nachfolgende Abbildung 6 stellt exemplarisch den Vergleich der Stimulationskonzentrationen in der CA1-Region männlicher Gewebsschnitte dar.



**Abb. 6:** CA1-Region des Hippocampus. Blau: Nuclei der Pyramidenzellen und rot: Spinophilinsignale im angrenzenden Stratum radiatum. A) Deutlich sichtbare Spinophilinsignale nach Stimulation mit 100 nM GnRH; B) Vereinzelt Spinophilinsignale nach Stimulation mit 500 nM GnRH und C) Pyramidenzellschicht und angrenzendes Stratum radiatum der Kontrolle, ohne Applikation des Erst-Antikörpers, es sind keine Spinophilinsignale erkennbar. Alle Aufnahmen stammen aus männlichen Tieren.

### 5.1.1 Spinophilinmenge nach Stimulation mit 100 nM GnRH

Nach anschließender Auswertung am konfokalen Mikroskop berechneten wir den Quotienten aus Intensität und Fläche als relativen *staining index*.

Dabei untersuchten wir die CA1- und CA3-Region getrennt voneinander, um regionsspezifisch quantitative Unterschiede zu erfassen.

Für die nun folgende statistische Datenanalyse wurde die Verteilung der Daten graphisch untersucht und durch Logarithmierung normalisiert.

Um die Signifikanz der verschiedenen Versuchsparameter und ihrer Einflüsse auf das Ergebnis zu ermitteln, führten wir eine Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) durch. Diese ist ein Instrument zum Aufspüren derjenigen Faktoren in einem multivariaten Modell, die das Modell am stärksten beeinflussen.

In unserem Experiment wurden hierbei der Einfluss von Geschlecht, Stimulationskonzentration sowie deren Wechselwirkung zusammenhängend betrachtet. Mit dem Ziel, valide Aussagen über geschlechtsgebundene Reaktionen treffen zu können, verglichen wir zunächst das Ausgangsniveau unbehandelter männlicher und weiblicher Kontrollgruppen. Hierbei zeigten sich sowohl in der CA1- als auch in der CA3-Region keine signifikanten Unterschiede.

Nach siebentägiger Behandlung ließ sich in der CA1-Region, mittels der oben beschriebenen Varianzanalyse, eine hohe Signifikanz für den Einfluss des Geschlechtes ( $p < 0.0001$ ), der Stimulationskonzentration ( $p < 0.0001$ ) sowie ein signifikanter Zusammenhang für das Zusammenspiel dieser beiden Parameter ermitteln ( $p = 0.0004$ ). In der statistischen Auswertung fielen in der mit 100 nM GnRH stimulierten Gruppe geschlechtsspezifische Unterschiede der Spinophilinmenge auf.

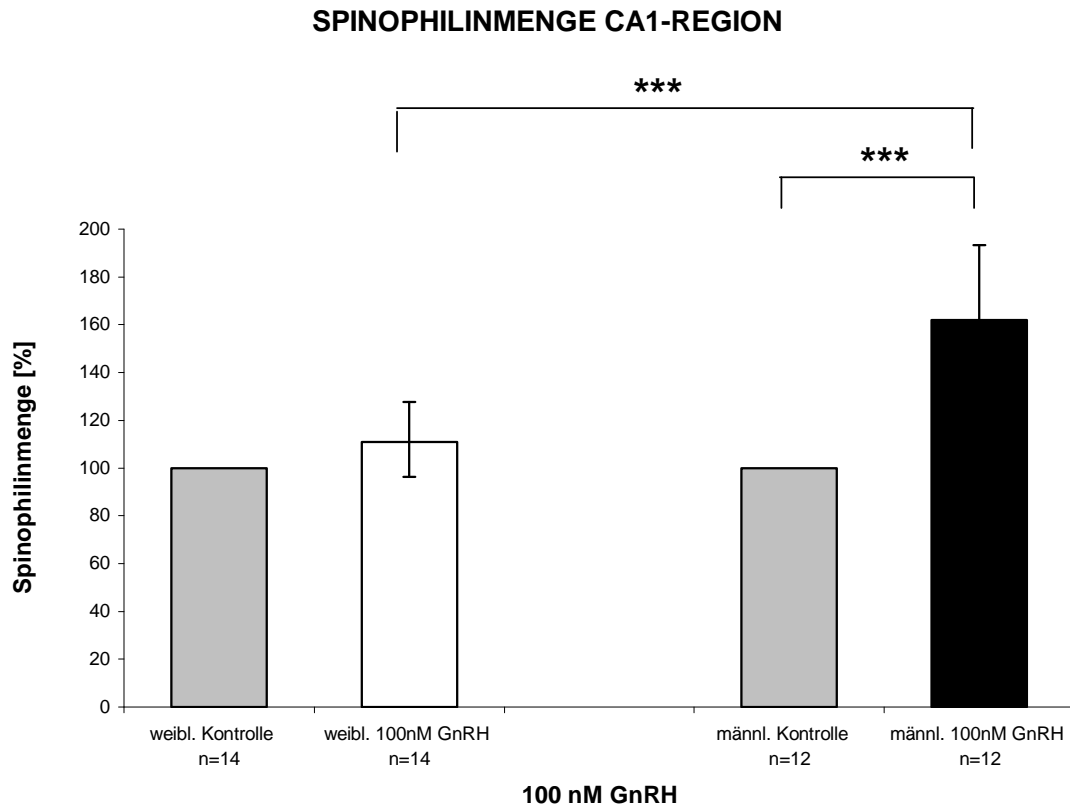
Dabei zeigte die immunhistochemische Auswertung männlicher Hippocampi eine signifikante Zunahme der Spinophilinmenge von 62 % gegenüber dem Kontrollniveau ( $p < 0.0001$ ;  $n = 12$ ). Die Intensitätsmessung der weiblichen Hippocampi wies im Vergleich eine geringere Zuwachsrate auf, die mit 11 % gegenüber der Kontrolle keine statistische Signifikanz erreichte ( $p = 0.1467$ ;  $n = 14$ ).

Die Auswertung der CA3-Region ergab vergleichbare Ergebnisse, jedoch erbrachte die statistische Berechnung hierbei keine Signifikanz.

Mit 22 % ( $p = 0.0596$ ;  $n = 9$ ) wiesen männliche Tiere auch hier einen stärkeren Zuwachs als weibliche Tiere auf, bei denen der Zuwachs nur 1 % ( $p = 0.9301$ ;  $n = 10$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle betrug.

Der Einfluss des Geschlechtes ( $p = 0.0844$ ) sowie die Effekte der Stimulationskonzentration ( $p = 0.1061$ ) lagen knapp über dem Signifikanzniveau. Auch die Interaktion beider Parameter zeigte in dieser Region keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p = 0.3220$ ).

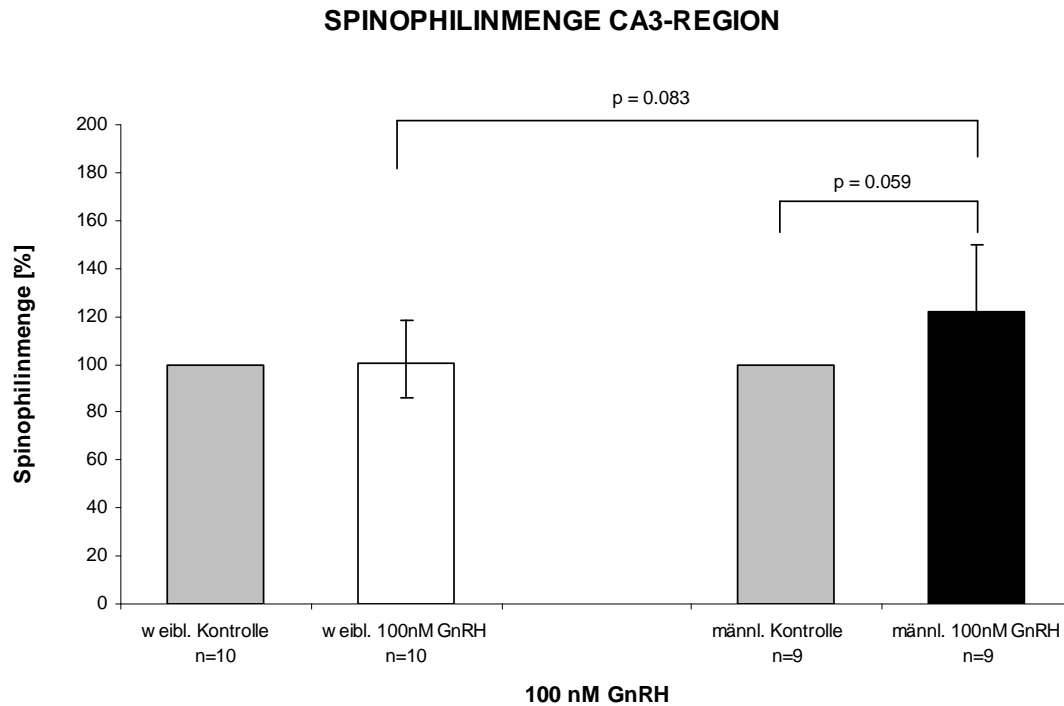
Abbildung 7 und 8 stellen die Ergebnisse der vergleichenden immunhistochemischen Auswertung getrennt nach CA1- und CA3-Region dar. Um die Zunahme der Spinophilinmenge beider Geschlechter vergleichend darzustellen zu können, wurden die Mittelwerte der Kontrollgruppen gleich 100 % gesetzt.



**Abb. 7:** Relative Spinophilinmenge hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 100 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

| <b>Änderung der Spinophilinmenge gegenüber der Kontrollgruppe CA1-Region</b> |                                   |    |         |                            |
|--|-----------------------------------|----|---------|----------------------------|
|  | Änderung der Spinophilinmenge [%] | n  | p       | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>  | +62 %                             | 12 | <0.0001 | 136;193                    |
| <b>weiblich</b>  | +11 %                             | 14 | 0.1467  | 96;127                     |

**Tab. 1:** Numerische Darstellung der Versuchsergebnisse nach Stimulation mit 100 nM GnRH. n = Anzahl der ausgewerteten paarigen Schnitte, dabei ist die Auswahl zufällig und stammt aus jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.



**Abb. 8:** Relative Spinophilinmenge hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 100 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die geschlechtsvergleichende Änderung der Spinophilinmenge liegt mit  $p = 0.083$  knapp über dem Signifikanzniveau.

| Änderung der Spinophilinmenge gegenüber der Kontrollgruppe CA3-Region |                                   |    |        |                            |
|---|-----------------------------------|----|--------|----------------------------|
|   | Änderung der Spinophilinmenge [%] | n  | p      | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>   | +22%                              | 9  | 0.0596 | 99;150                     |
| <b>weiblich</b>   | +1%                               | 10 | 0.9301 | 86;118                     |

**Tab. 2:** Numerische Darstellung der Versuchsergebnisse nach Stimulation mit 100 nM GnRH. n = Anzahl der ausgewerteten paarigen Schnitte, dabei ist die Auswahl zufällig und stammt aus jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.



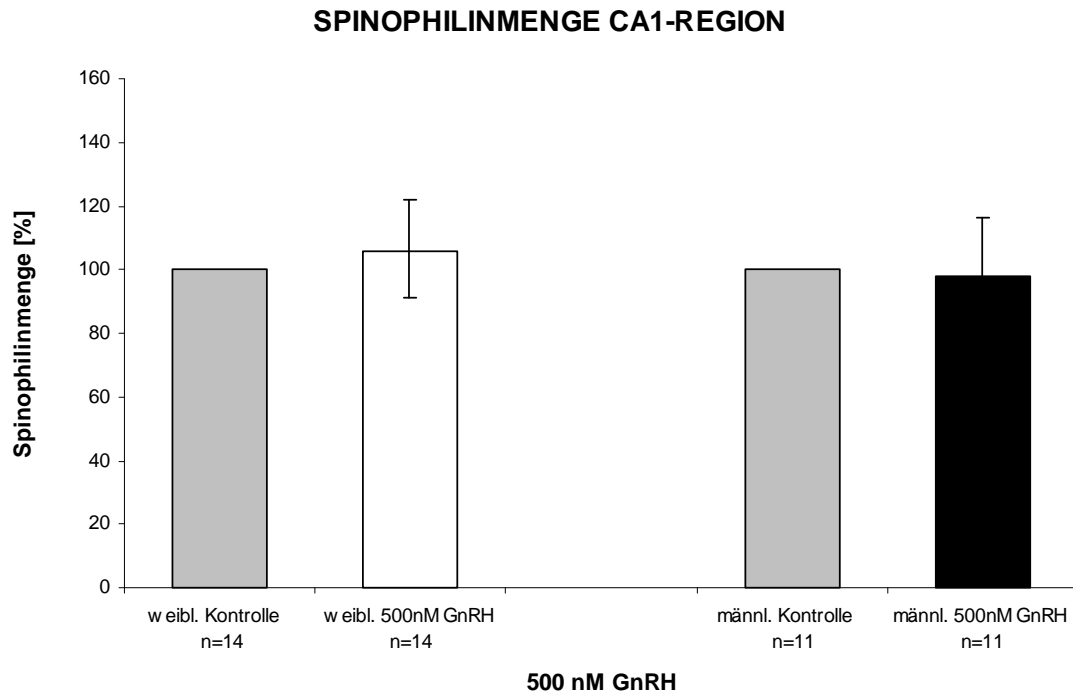
### 5.1.2 Spinophilinmenge nach Stimulation mit 500 nM GnRH

Aus Arbeiten von Prange-Kiel et al. ist bekannt, dass eine Stimulation mit höheren Dosen GnRH nicht in einer weiteren Zunahme der Spinesynapsen resultiert (Prange-Kiel et al., 2008). Vor diesem Hintergrund war im folgenden Teil des Experimentes zu klären, ob dieser Sachverhalt bei männlichen und weiblichen Tieren in ähnlicher Weise nachzuweisen ist. Dazu erfolgte bei vergleichbarem Versuchsaufbau nach viertägiger Vorkultur eine siebentägige Stimulation mit einer GnRH-Konzentration von 500 nM.

Die Auswertung der CA1-Region zeigte bei männlichen Tieren eine um 2 % (n = 11) gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe herabgesetzte Spinophilinmenge. Bei weiblichen Versuchstieren ließ sich ein geringer Anstieg der Spinedichte um 6 % (n = 14) detektieren. Die Evidenzprüfung mittels statistischer Testverfahren belegte, dass weder die Änderungen der Spinophilinsignale noch die geschlechtsspezifischen Signaländerungen signifikant waren. Die Berechnung erfolgte analog zum ersten Versuch.

Die nachfolgende Auswertung der CA3-Region zeigte in der Gruppe männlicher Versuchstiere einen Anstieg der Spinophilinsignale um 1 % (n = 10), die der weiblichen Tiere sank um 10 % (n = 14) im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kulturen. Alle gemessenen Änderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

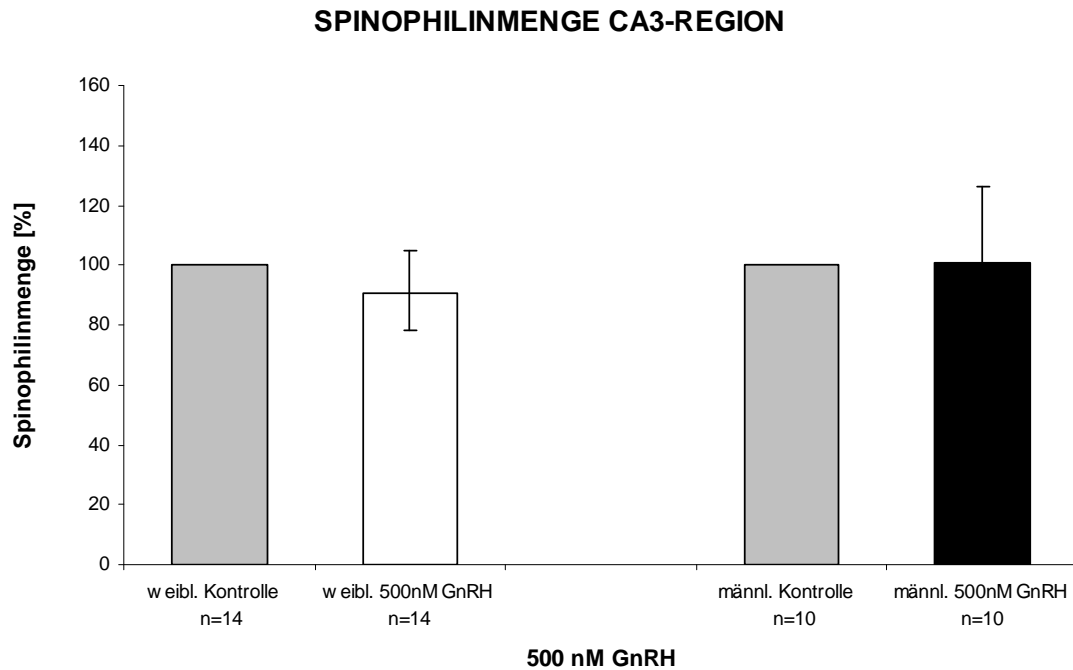
Abbildung 9 und 10 stellen das Ergebnis der Applikation von 500 nM GnRH getrennt nach CA1- und CA3-Region dar.



**Abb. 9:** Relative Spinophilinmenge hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 500 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die geschlechtsvergleichende Änderung der Spinophilinmenge zeigte mit  $p = 0.6175$  keine Signifikanz.

| <b>Änderung der Spinophilinmenge gegenüber der Kontrollgruppe CA1-Region</b> |                                   |    |        |                            |
|--|-----------------------------------|----|--------|----------------------------|
|  | Änderung der Spinophilinmenge [%] | n  | p      | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>  | -2%                               | 11 | 0.8233 | 83;117                     |
| <b>weiblich</b>  | +6%                               | 14 | 0.4584 | 91;122                     |

**Tab. 3:** Numerische Darstellung der Versuchsergebnisse nach Stimulation mit 500 nM GnRH. n = Anzahl der ausgewerteten paarigen Schnitte, dabei ist die Auswahl zufällig und stammt aus jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.



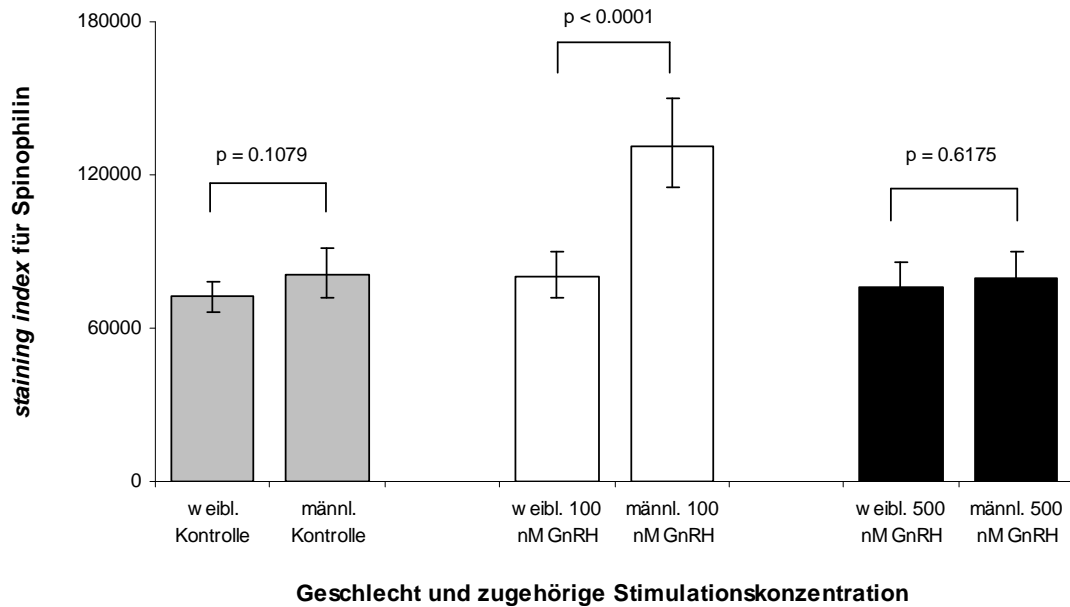
**Abb. 10:** Relative Spinophilinmenge hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 500 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die geschlechtsvergleichende Änderung der Spinophilinmenge zeigte mit  $p = 0.1791$  keine Signifikanz.

| <b>Änderung der Spinophilinmenge gegenüber der Kontrollgruppe CA3-Region</b> |                                   |    |        |                            |
|--|-----------------------------------|----|--------|----------------------------|
|  | Änderung der Spinophilinmenge [%] | n  | p      | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>  | +1%                               | 10 | 0.9472 | 80;127                     |
| <b>weiblich</b>  | -10%                              | 14 | 0.1854 | 78;105                     |

**Tab. 8:** Numerische Darstellung der Versuchsergebnisse nach Stimulation mit 500 nM GnRH. n = Anzahl der ausgewerteten paarigen Schnitte, dabei ist die Auswahl zufällig und stammt aus jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.

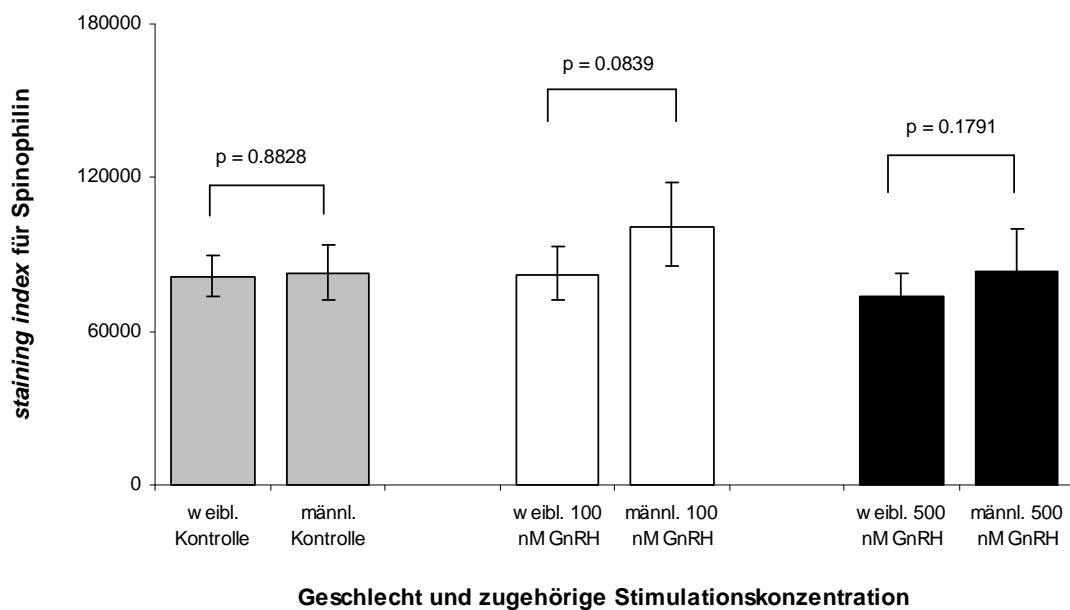
### 5.1.3 Zusammenfassende Darstellung der Immunhistochemie

#### Geschlechtervergleich Spinophilinmenge nach GnRH-Stimulation CA1-Region



**Abb. 11:** Zusammenfassende geschlechtsvergleichende Darstellung der Spinophilinmenge hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 100 nM und 500 nM GnRH. Dargestellt sind die Mittelwerte der CA1-Region  $\pm$  95%-Konfidenzintervall.

#### Geschlechtervergleich Spinophilinmenge nach GnRH-Stimulation CA3-Region



**Abb. 12:** Zusammenfassende geschlechtsvergleichende Darstellung der Spinophilinmenge hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 100 nM und 500 nM GnRH. Dargestellt sind die Mittelwerte der CA3-Region  $\pm$  95%-Konfidenzintervall.

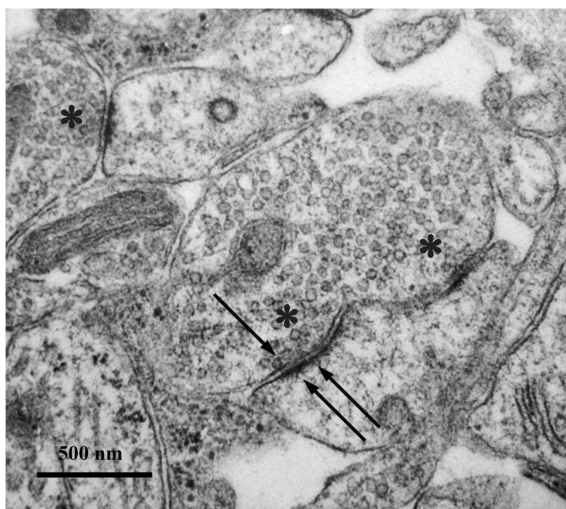
## 5.2 Elektronenmikroskopie

Zur Durchführung eines ergänzenden Experimentes hinsichtlich synaptischer Plastizität unter GnRH-Stimulation verwendeten wir ein vergleichbares Versuchsschema. Da sich im ersten Versuch die stärksten Signaländerungen in der CA1-Region zeigten, beschränkten wir unsere Untersuchungen auf dieses Areal, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Resultate erfolgte die Stimulation der hippocampalen Schnittkulturen in identischer Weise wie für die Immunhistochemie (siehe erster Versuch).

In dieser Versuchsanordnung ermittelten wir die Anzahl der Spinesynapsen als entsprechenden Zuwachsindikator, wobei die resultierenden Ergebnisse hierbei das morphologische Korrelat der Spinophilinmessung widerspiegeln. Zu Beginn definierten wir ein Standardvorgehen, um eine objektive Auswertung zu ermöglichen. Hierbei werteten wir nur Strukturen, die dem definierten Aufbau einer [asymmetrischen] Synapse folgen:

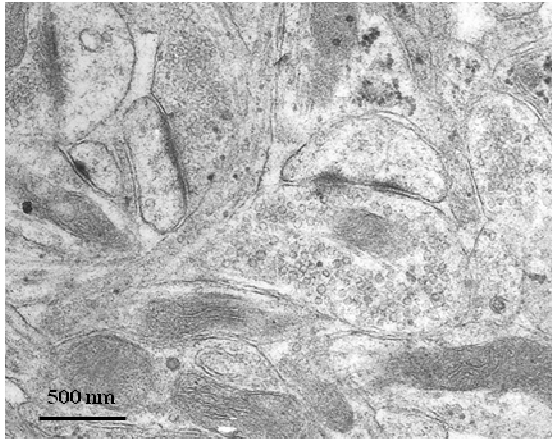
präsynaptische Membran/ präsynaptische Vesikel/ synaptischer Spalt/ postsynaptische elektronische Membranverdichtung (Kahle W., 2001).

Wir verglichen dazu jeweils zwei Aufnahmen, die den Schnitt abgebildet von beiden Seiten wiedergaben, und zählten ausschließlich jene Synapsen, die nur auf einem der beiden Bilder waren. Durch dieses Vorgehen stellten wir sicher, dass nur neu gebildete, exzitatorische Synapsen, welche für die synaptische Plastizität entscheidend sind, in die Auswertung einfließen. Abbildung 13 stellt exemplarisch den Aufbau intakter Spinesynapsen als Grundlage der Auswertung dar.

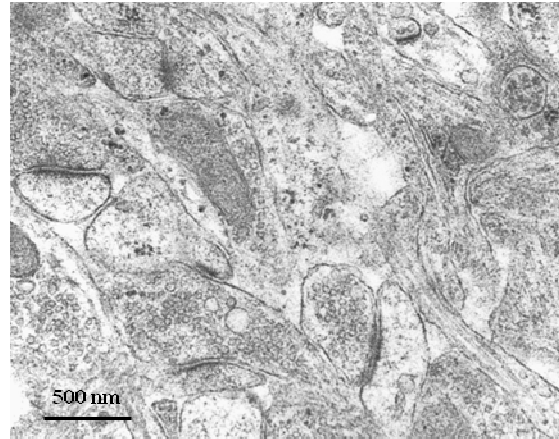


**Abb. 13:** Elektronenmikroskopisches Bild. Dargestellt sind drei Spinesynapsen (\*). Man erkennt den charakteristischen Aufbau bestehend aus: präsynaptischer Membran mit präsynaptischen Vesikeln (einfacher Pfeil), synaptischem Spalt und postsynaptischer elektronischer Membranverdichtung (doppelter Pfeil).

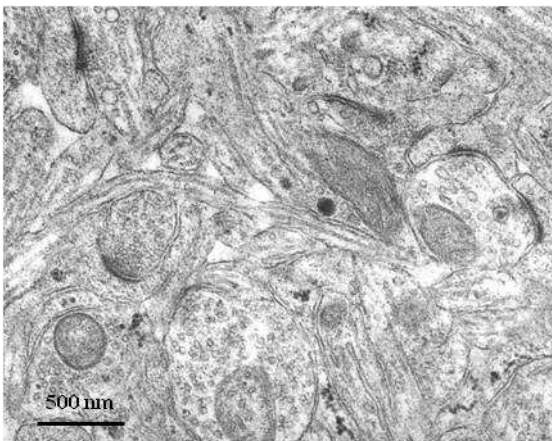
Zur quantitativen Auswertung wurden nur morphologisch intakte Synapsen herangezogen. Diese konnten wir für alle Stimulationsgruppen nachweisen (Abb. 14-19).



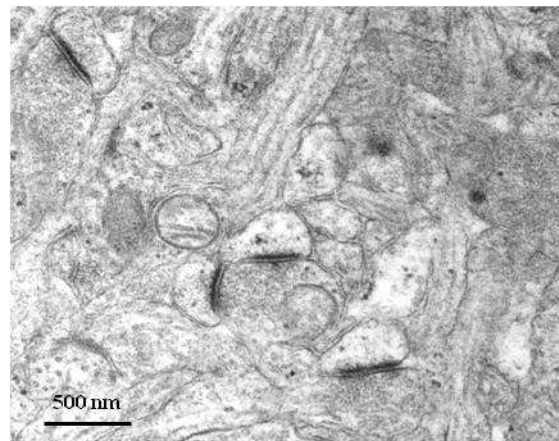
**Abb. 14:** Spinesynapsen weibl. Kontrolle



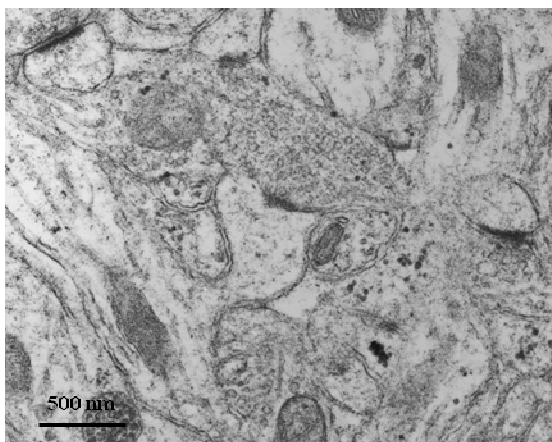
**Abb. 15:** Spinesynapsen männl. Kontrolle



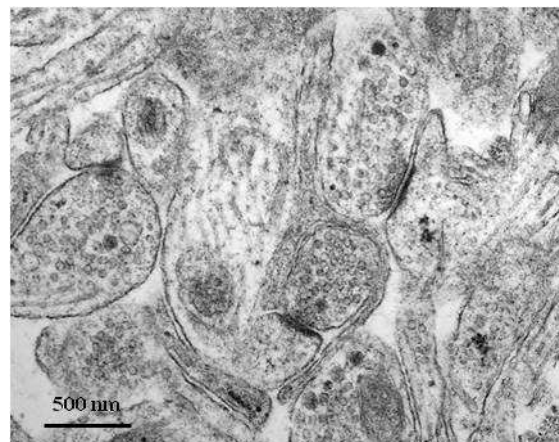
**Abb. 16:** Spinesynapsen weibl. Tiere nach Stimulation mit 100 nM GnRH.



**Abb. 17:** Spinesynapsen männl. Tiere nach Stimulation mit 100 nM GnRH.



**Abb. 18:** Spinesynapsen weibl. Tiere nach Stimulation mit 500 nM GnRH.



**Abb. 19:** Spinesynapsen männl. Tiere nach Stimulation mit 500 nM GnRH.

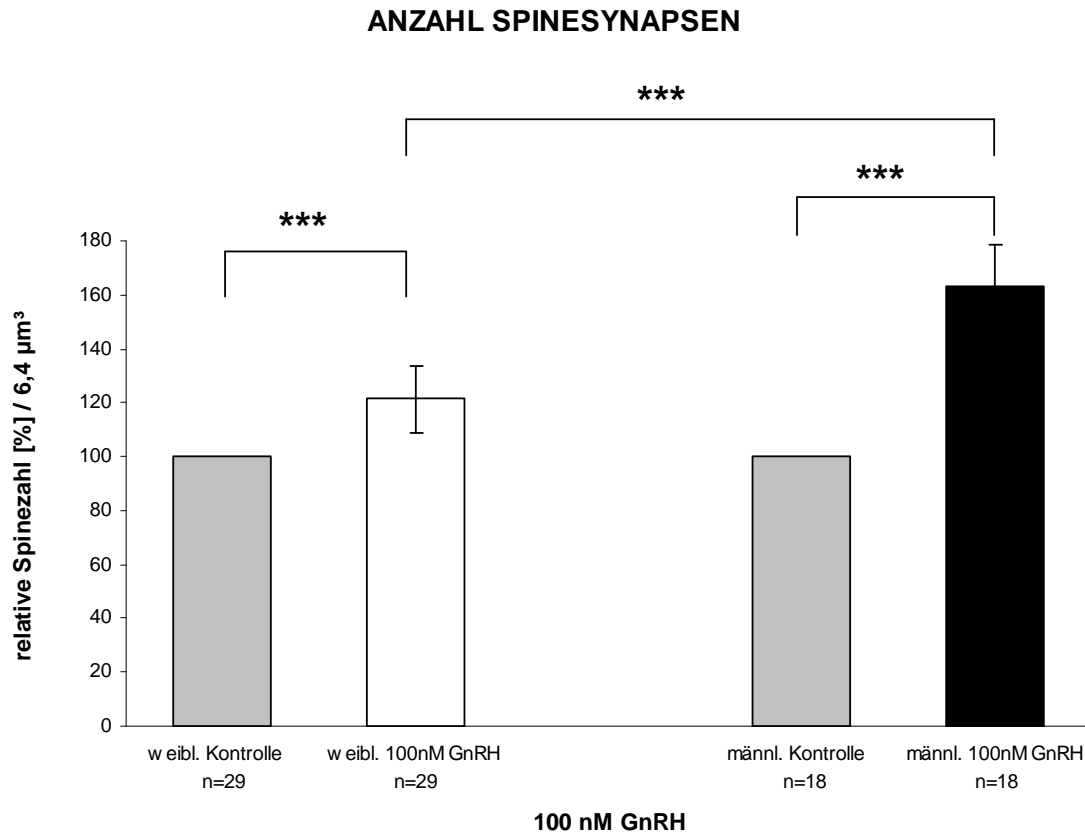
### **5.2.1 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM GnRH**

Die quantitative Auswertung der Spinesynapsen erfolgte nach viertägiger Vorkultur und sieben Behandlungstagen mit 100 nM GnRH. Hierfür wurden die Synapsen nach den oben genannten Kriterien ausgezählt.

Die Ergebnisse der männlichen Versuchsgruppe zeigten nach der Applikation von 100 nM GnRH einen Zuwachs von 63 % gegenüber dem Kontrollniveau ( $p < 0.0001$ ;  $n = 18$ ).

Die Zunahme der Spinesynapsen weiblicher Versuchstiere wies einen im Vergleich zum männlichen Kollektiv geringgradigeren Anstieg auf, der in diesem Experiment mit einem Zuwachs von 21 % Signifikanz erreichte ( $p = 0.0006$ ;  $n = 29$ ).

In der initialen Auswertung mittels ANOVA berechneten wir, wie auch in der Immunhistochemie, eine hohe Signifikanz für den Einfluss des Geschlechtes, der Stimulationskonzentration sowie eine signifikante Wechselwirkung dieser beiden Faktoren ( $p = 0.0002$ ).



**Abb. 20:** Relative Anzahl der Spinesynapsen hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 100 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

| Änderung der Spinesynapsenzahl gegenüber der Kontrollgruppe |                                    |    |         |                            |
|---|------------------------------------|----|---------|----------------------------|
|   | Änderung der Spinesynapsenzahl [%] | n  | p       | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>   | +63%                               | 18 | <0.0001 | 148;179                    |
| <b>weiblich</b>   | +21%                               | 29 | 0.0006  | 109;134                    |

**Tab. 9:** Numerische Darstellung der Versuchsergebnisse nach Stimulation mit 100 nM GnRH. n = Anzahl der ausgewerteten elektronenmikroskopischen Schnitte. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.

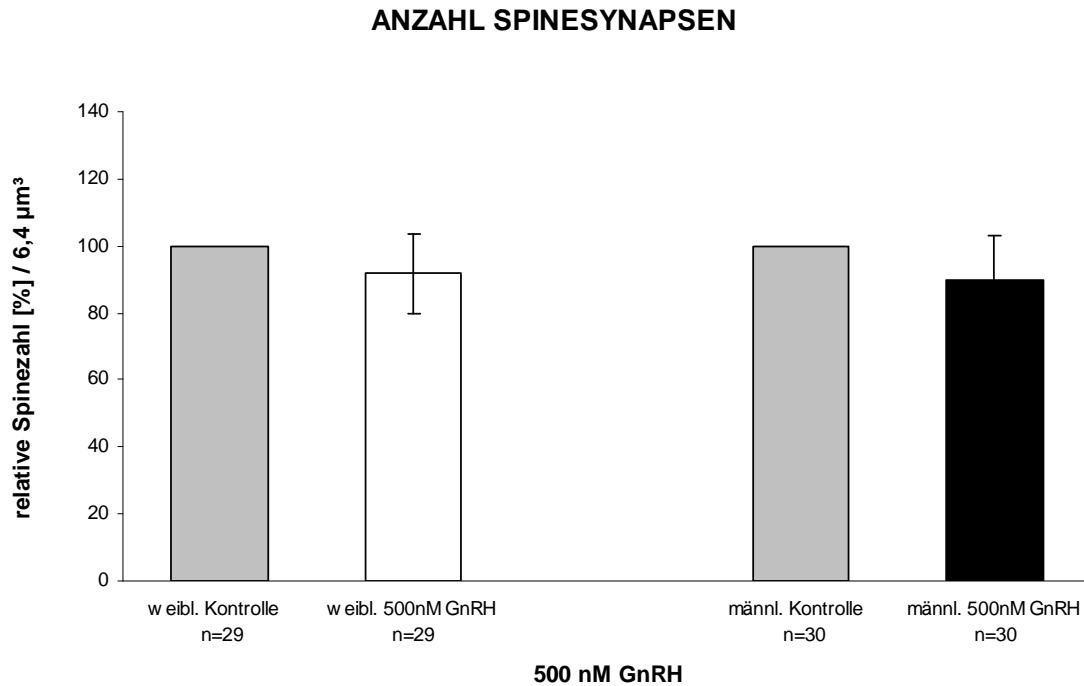


### **5.2.2 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 500 nM GnRH**

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden in gleicher Weise auch nach Stimulation mit 500 nM GnRH durchgeführt.

Bei den Schnittkulturen männlicher Versuchstiere zeigte sich die Spinezahl um 10 % gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe reduziert.

Die Auswertung hippocampaler Schnitte weiblicher Ratten ergab eine Reduktion um 8 %. Diese Veränderungen erreichten weder in der Gruppe männlicher noch in der Gruppe weiblicher Versuchstiere das Signifikanzniveau ( $\text{♂}$ :  $p = 0.1305$ ;  $n = 30$ ;  $\text{♀}$ :  $p = 0.1768$ ;  $n = 29$ ).



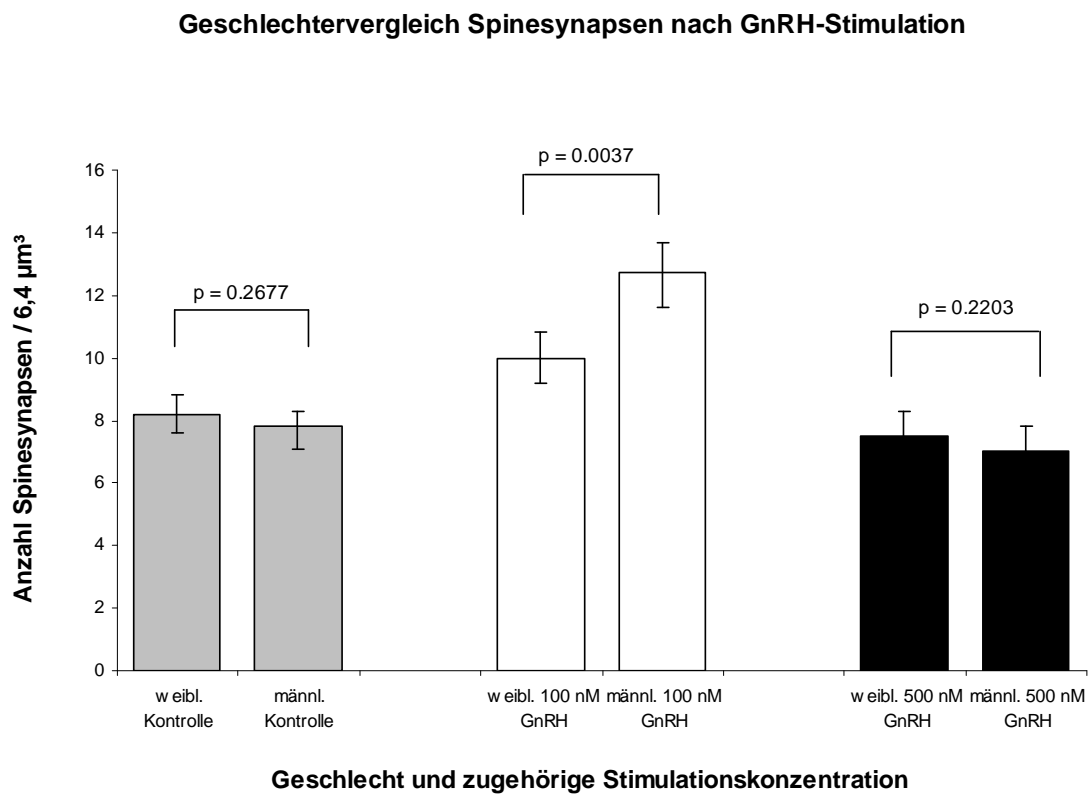
**Abb. 21:** Relative Anzahl der Spinesynapsen hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 500 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die geschlechtsvergleichende Änderung der Synapsenzahl zeigte mit  $p = 0.2203$  keine Signifikanz.

| <b>Änderung der Spinesynapsenzahl gegenüber der Kontrollgruppe</b> |                                    |    |        |                            |
|--|------------------------------------|----|--------|----------------------------|
|  | Änderung der Spinesynapsenzahl [%] | n  | p      | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>  | -10%                               | 30 | 0.1305 | 76;103                     |
| <b>weiblich</b>  | -8%                                | 29 | 0.1768 | 80;104                     |

**Tab. 10:** Numerische Darstellung der Versuchsergebnisse nach Stimulation mit 100 nM GnRH. n = Anzahl der ausgewerteten elektronenmikroskopischen Schnitte. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.

### 5.2.3 Zusammenfassende Darstellung der Elektronenmikroskopie

Die folgende Abbildung 22 zeigt deutlich, dass männliche Tiere nach einer Stimulation mit 100 nM GnRH signifikant mehr Spinesynapsen als weibliche Tiere bilden. Dieser Effekt trat nach Applikation von 500 nM GnRH nicht auf.



**Abb. 22:** Zusammenfassende geschlechtsvergleichende Darstellung der Spinesynapsenzahl hippocampaler Schnittkulturen nach der Stimulation mit 100 nM und 500 nM GnRH. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  95%-Konfidenzintervall.

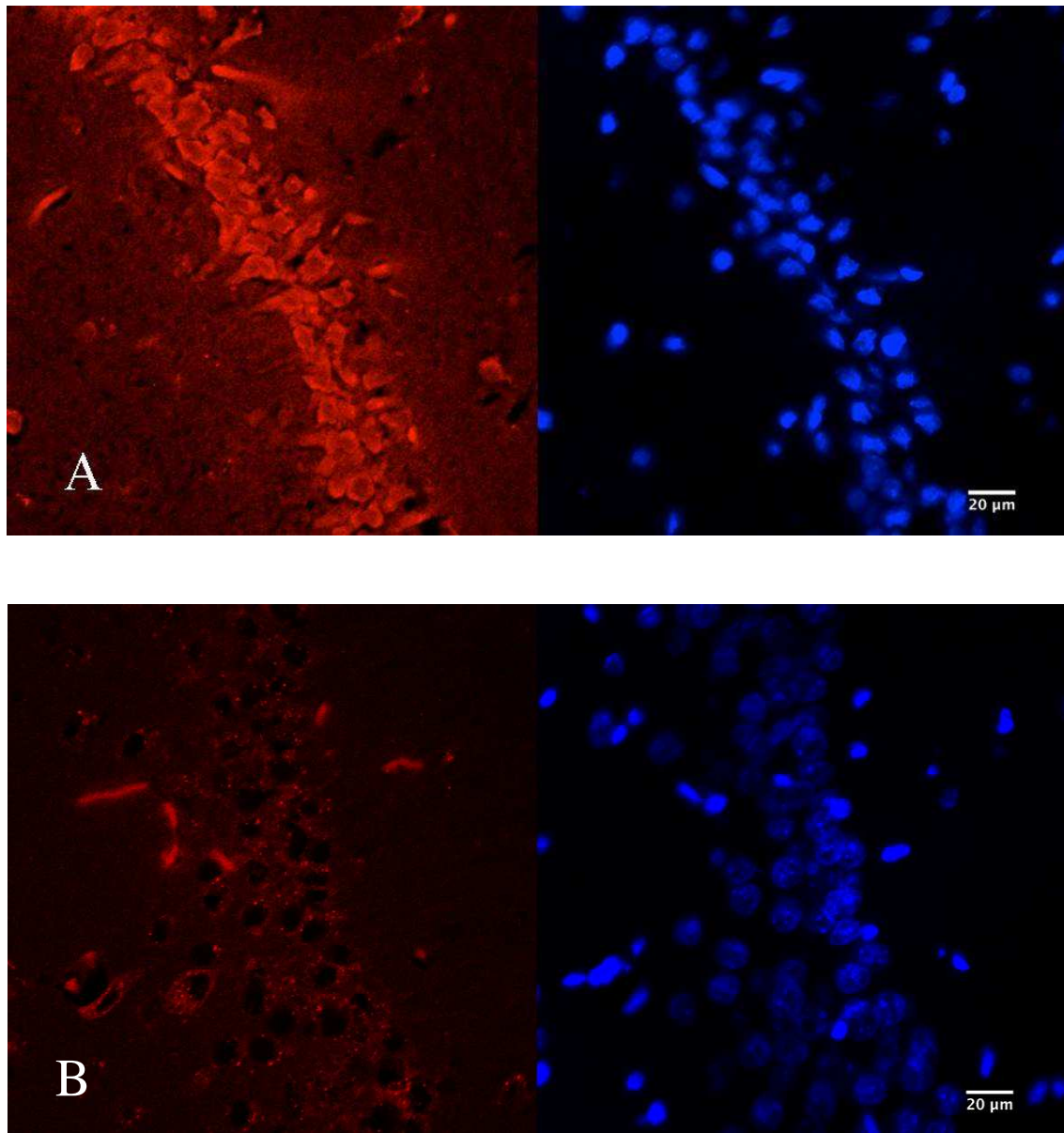
### **5.3 Immunhistochemische Darstellung des GnRH-Rezeptors bei männlichen und weiblichen Tieren**

Aus bereits publizierten Untersuchungen ist bekannt, dass der GnRH-Rezeptor hippocampal exprimiert wird (Jennes und Conn, 1994; Patrick Kohlmann 2008, med. Dissertation). Da in diesen Arbeiten jedoch keine explizite Differenzierung zwischen weiblichen und männlichen Tieren erfolgte, untersuchten wir, ob die Ursache des darstellbaren Geschlechtsunterschiedes möglicherweise auf GnRH beziehungsweise der Verteilung seines Rezeptors beruht.

Zur Klärung dieser Frage führten wir eine immunhistochemische Färbung an Gehirnschnitten männlicher und weiblicher Ratten durch. Für dieses Experiment verwendeten wir 12 Wochen alte, adulte Ratten. Die Auswertung erfolgte sowohl licht- als auch konfokalmikroskopisch. Hierbei erfolgte die Bewertung des GnRH-Rezeptors und seiner quantitativen Ausprägung durch vergleichende Betrachtung der Färbungen.

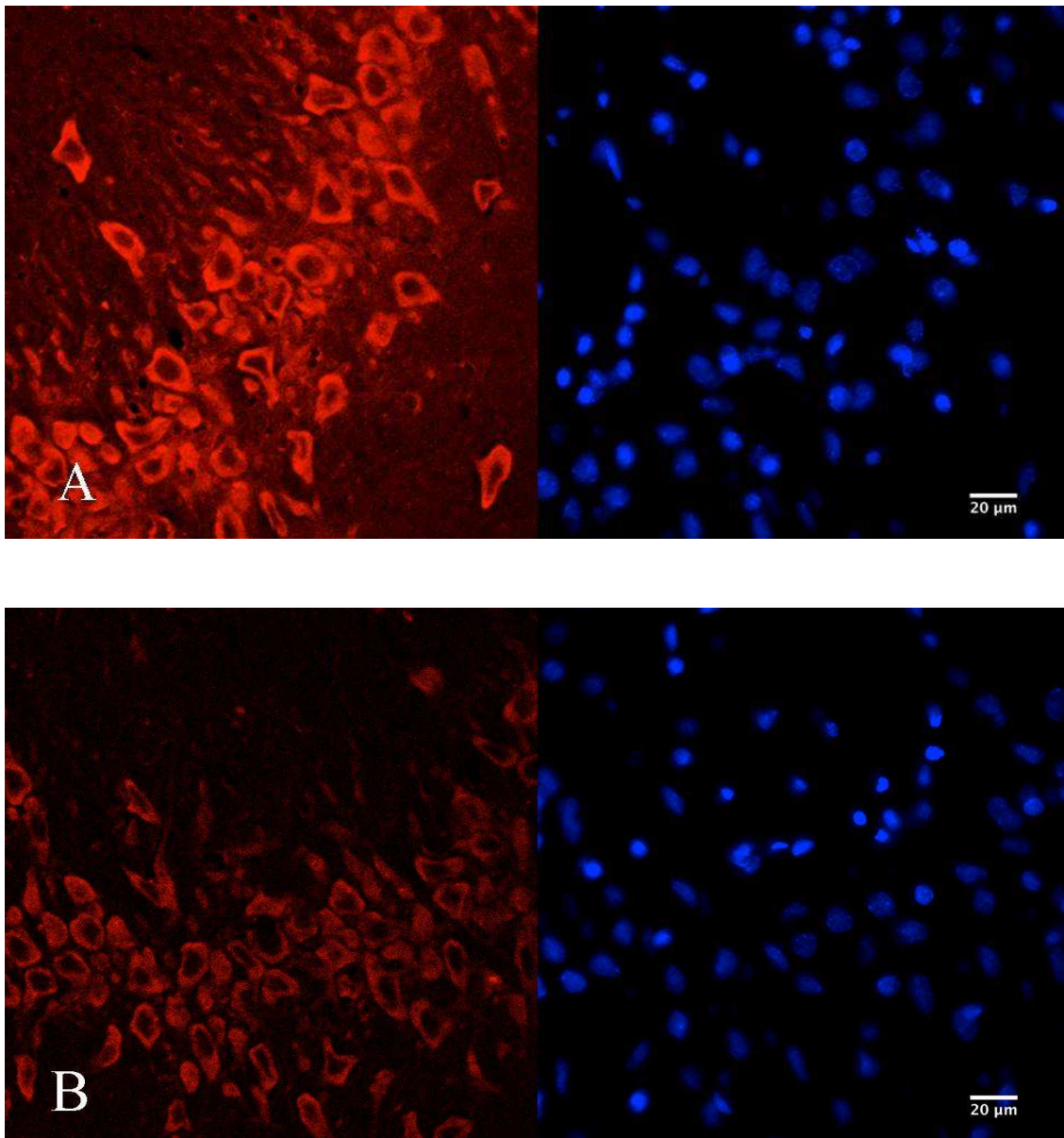
Bereits in den lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahmen fielen regionale und genusspezifische Ausprägungen des GnRH-Rezeptors auf. Dabei zeigten die Schnitte weiblicher Tiere gegenüber Schnitten männlicher Tiere ein deutlich stärkeres GnRH-Rezeptorsignal. Weiterhin fanden sich in beiden Geschlechtern mehr fluoreszierende Signale in der CA3-Region als in der CA1-Region.

Die folgenden Abbildungen 23 und 24 zeigen die regionale Verteilung des GnRH-Rezeptors in den hippocampalen Regionen männlicher und weiblicher Tiere.



**Abb. 23:** CA1-Region des Hippocampus. Blau: Pyramidenzellschicht und rot: GnRH-Rezeptorsignale.

A) CA1-Region des weiblichen Hippocampus. Deutlich sichtbare GnRH-Rezeptorsignale in der Pyramidenzellschicht. B) CA1-Region des männlichen Hippocampus. Vereinzelt GnRH-Rezeptorsignale in der Pyramidenzellschicht.



**Abb. 24:** CA3-Region des Hippocampus. Blau: Pyramidenzellschicht und rot: GnRH-Rezeptorsignale. A) CA3-Region des weiblichen Hippocampus. Deutlich sichtbare GnRH-Rezeptorsignale in der Pyramidenzellschicht. B) CA3-Region des männlichen Hippocampus. Die GnRH-Rezeptorsignale in der Pyramidenzellschicht sind gegenüber den Signalen bei weiblichen Tieren vermindert.

## **5.4 Quantitative Estrogenbestimmung im Medium nach Stimulation mit GnRH**

In Gewebe- und Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass hippocampale Neurone die Fähigkeit besitzen, Estrogen *de novo* zu produzieren und in das Medium zu sezernieren (Prange-Kiel et al., 2003).

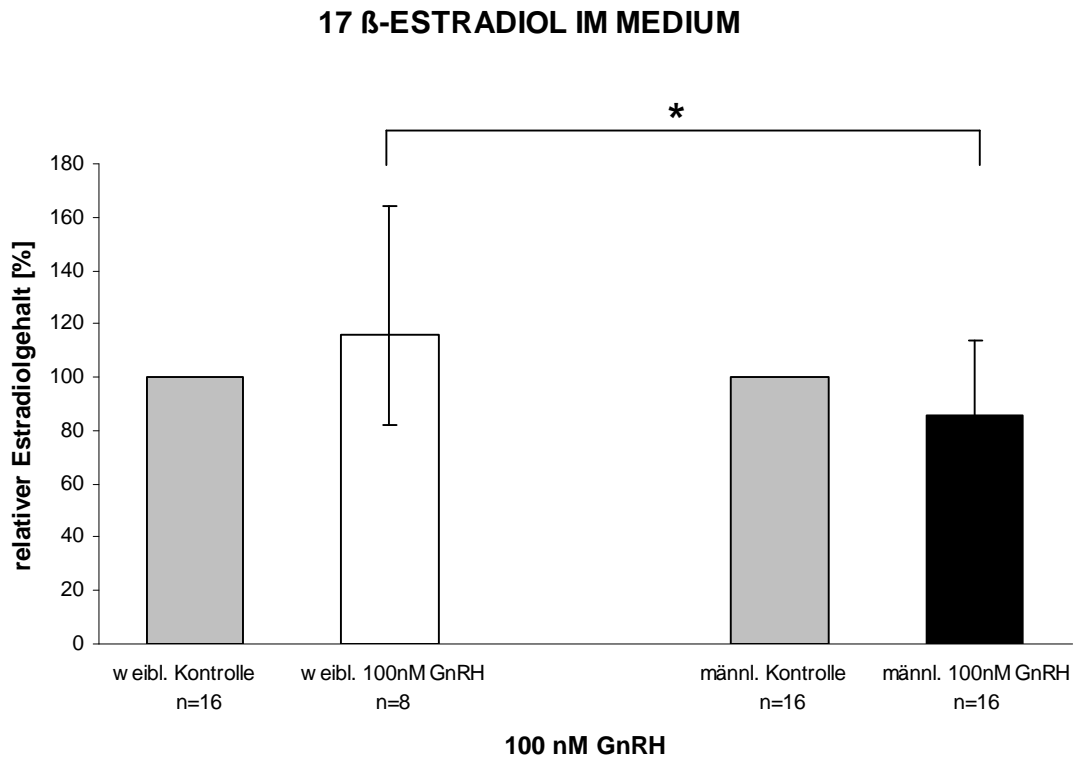
In unserer Untersuchung sollte nun überprüft werden, ob eine geschlechtsspezifische Korrelation zwischen Estrogensynthese und Spinewachstum zu detektieren ist.

Dafür sammelten wir das Medium dissoziierter Neuronenkulturen zweitägig vor jeder nachfolgenden Stimulation, wobei die jeweiligen Kontrollkulturen ohne GnRH-Behandlung verblieben. Der Estrogengehalt des Mediums wurde quantitativ mittels Radioimmunoassay bestimmt (siehe Kapitel 4.9).

### **5.4.1 Quantitative Estrogenbestimmung nach Stimulation mit 100 nM GnRH**

Die folgende quantitative Auswertung des 17- $\beta$ -Estradiolgehaltes im Kulturmedium zeigte bei weiblichen Tieren eine Zunahme des Estradiolgehaltes um 16 % ( $p = 0.3843$ ;  $n = 8$ ). Die Auswertung des Mediums männlicher Tiere zeigte eine Abnahme der Hormonkonzentration um 14 % ( $p = 0.2712$ ;  $n = 16$ ). Damit erwiesen sich die Veränderungen gegenüber den Kontrollgruppen weder bei weiblichen noch bei männlichen Tieren als signifikant. Jedoch ließ sich für die Änderung der Hormonkonzentration zwischen den Geschlechtern mit  $p = 0.0272$  ein signifikanter Unterschied berechnen (Abb. 23).

Weiterhin berechneten wir mittels Varianzanalyse den Einfluss der Parameter Geschlecht und Stimulationskonzentration sowie die Signifikanz der Interaktion dieser beiden Faktoren. Dabei ließ sich mit  $p = 0.0094$  ein signifikanter Einfluss für das Geschlecht ermitteln. Die Stimulationskonzentration sowie die Interaktion von Geschlecht und Stimulationskonzentration lagen über dem Signifikanzniveau.



**Abb. 25:** Gehalt an 17- $\beta$ -Estradiol im Medium nach der Stimulation mit 100 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

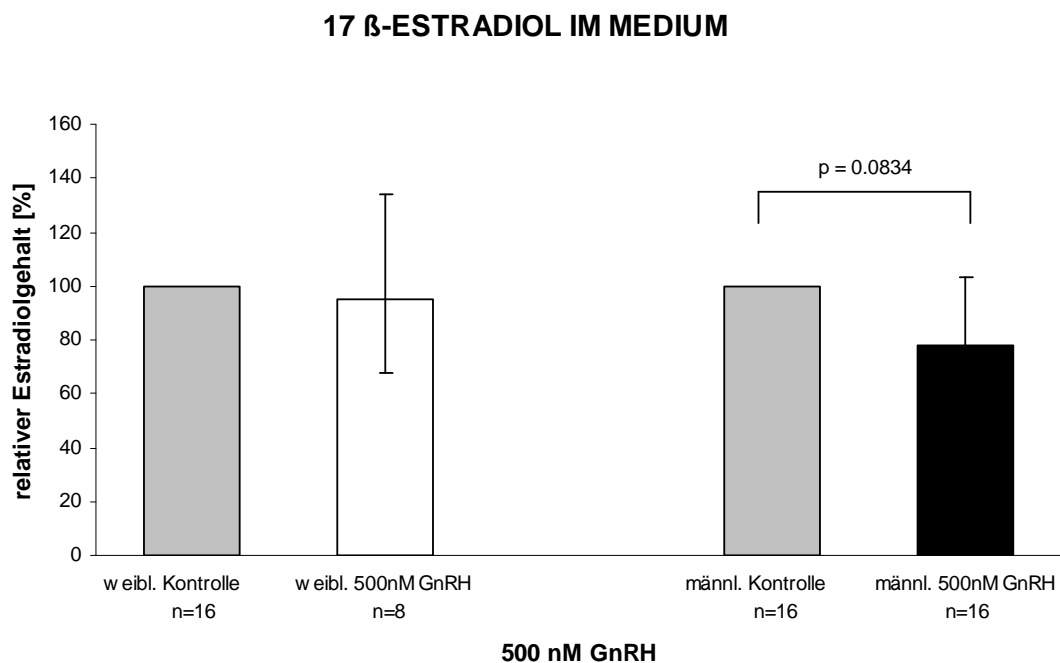
| <b>17-<math>\beta</math>-Estradiol im Medium</b> |                                    |        |                            |
|--|------------------------------------|--------|----------------------------|
|  | Änderung des Estradiolgehaltes [%] | p      | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>                                  | -14%                               | 0.2712 | 65;113                     |
| <b>weiblich</b>                                  | +16%                               | 0.3843 | 82;164                     |

**Tab. 11:** Änderung des 17- $\beta$ -Estradiolgehaltes nach Stimulation mit 100 nM GnRH. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.



### 5.4.2 Quantitative Estrogenbestimmung nach Stimulation mit 500 nM GnRH

Nach neuntägiger Stimulation mit 500 nM GnRH ergab die Quantifizierung der Hormonkonzentration weiblicher Versuchstiere eine Reduktion um 5 % ( $p = 0.7732$ ;  $n = 8$ ). In männlichen Kulturgruppen sank die Hormonkonzentration um 22 % ( $p = 0.0834$ ;  $n = 16$ ). Somit ließ sich in diesem Experiment zeigen, dass die Applikation von 500 nM GnRH zu einer Herunterregulation des 17- $\beta$ -Estradiolgehaltes gegenüber den Kontrollkulturen führt. Ein geschlechtsspezifischer Effekt ließ sich hierbei nicht ermitteln (Abb. 24).



**Abb. 26:** Gehalt an 17- $\beta$ -Estradiol im Medium nach der Stimulation mit 500 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Kontrollen entsprechen 100%. Die geschlechtsvergleichende Änderung der Estrogenfreisetzung zeigte mit  $p = 0.1044$  keine Signifikanz.

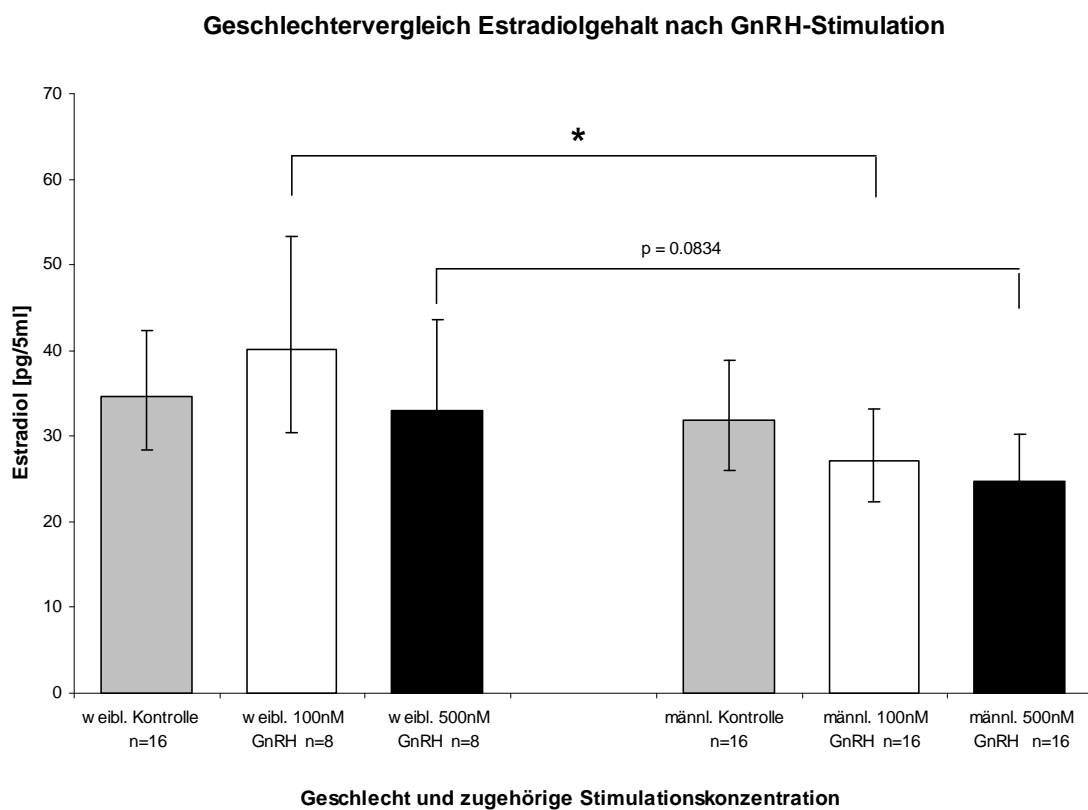
| <b>17-<math>\beta</math>-Estradiol im Medium</b> |                                    |        |                            |
|--|------------------------------------|--------|----------------------------|
|  | Änderung des Estradiolgehaltes [%] | p      | 95%-Konfidenzintervall [%] |
| <b>männlich</b>                                  | -22%                               | 0.0834 | 59;103                     |
| <b>weiblich</b>                                  | -5%                                | 0.7732 | 67;134                     |

**Tab. 12:** Änderung des 17- $\beta$ -Estradiolgehaltes nach Stimulation mit 500 nM GnRH. Die Kontrollgruppen entsprechen jeweils 100%.

### 5.4.3 Zusammenfassende Darstellung der Estrogenfreisetzung ins Medium

Die folgende Abbildung 25 zeigt, dass weibliche Tiere nach einer GnRH-Stimulation mit 100 nM GnRH die Tendenz einer erhöhten Estrogensynthese aufweisen. Bei männlichen Tieren resultierte die Gabe von 100 nM GnRH in einer verminderten Estrogenfreisetzung, was bei dieser Stimulationskonzentration zu einem signifikanten Unterschied in der GnRH-Antwort bei männlichen und weiblichen Tieren führte.

Nach Applikation von 500 nM GnRH zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Effekte der Estrogensynthese.



**Abb. 27:** Zusammenfassende geschlechtsvergleichende Darstellung des 17- $\beta$ -Estrogengehaltes dissoziierter Neuronenkulturen nach der Stimulation mit 100 nM und 500 nM GnRH. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen  $\pm$  95%-Konfidenzintervall. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

## 6. Diskussion

Über die Regulation der Estrogensynthese beeinflusst GnRH die synaptische Plastizität im Hippocampus (Prange-Kiel et al., 2008). Dabei versteht man unter dem Begriff „synaptische Plastizität“ eine Änderung der synaptischen Übertragungsstärke durch eine sich verändernde Physiologie oder Morphologie der Synapse. In dieser Arbeit nahmen wir die synaptische Dichte als Parameter für synaptische Plastizität. Mit den von uns durchgeführten Versuchen sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern das Geschlecht einen Einfluss auf die estrogenabhängige hippocampale Plastizität besitzt.

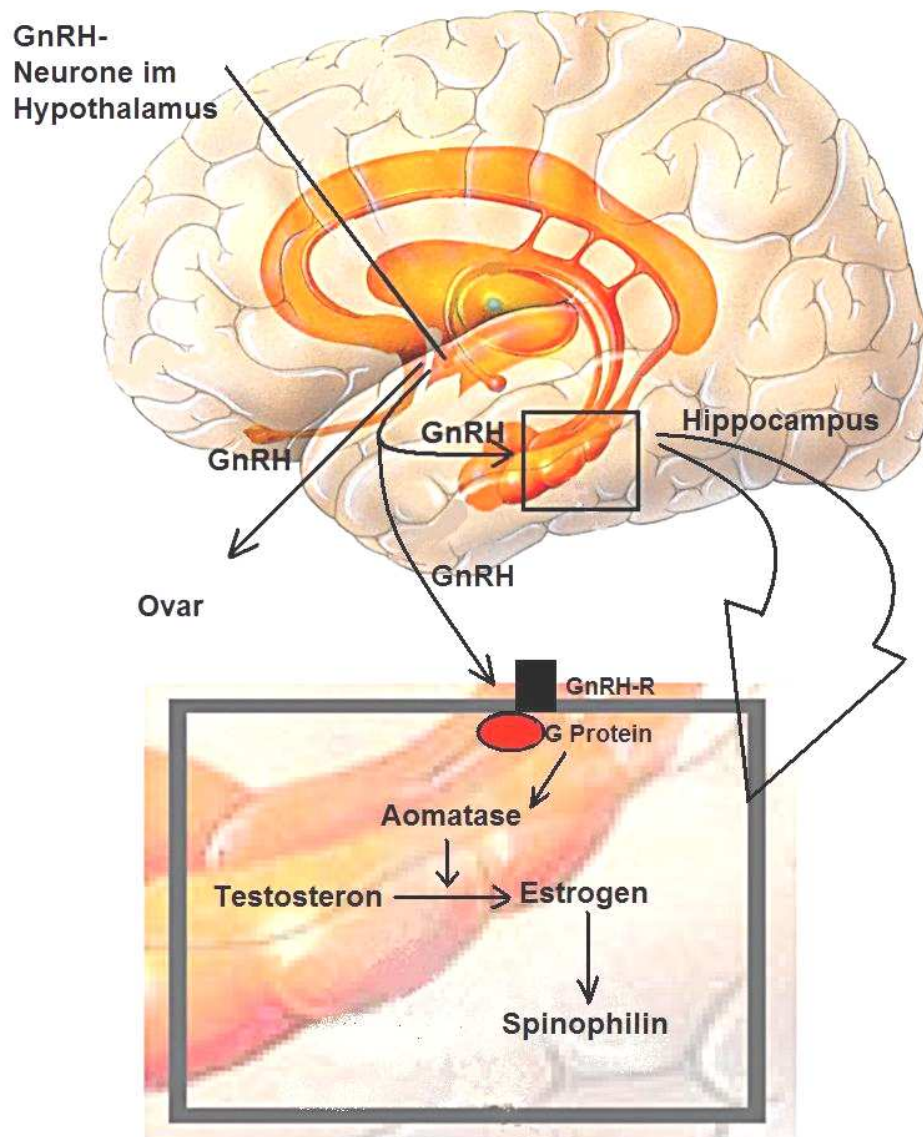
Die schematische Abbildung (Abb. 26) soll deutlich machen, dass GnRH die Estrogensynthese reguliert (Prange-Kiel et al., 2008) und Estrogen wiederum die Spinogenese beeinflusst (Gould et al., 1990; Woolley et al., 1990; Segal und Murphy, 2001; McEwen, 2001; Li et al., 2004). Da GnRH die Estradiolsynthese über eine mehrschrittige Signalkaskade reguliert, lassen sich verschiedene Fragen in Bezug auf eine geschlechtsspezifische, regionalspezifische und dosisabhängige Wirkung von GnRH formulieren.

Frage 1: Ist die Zunahme synaptischer Signale durch Estrogen und seine Wirkung an Estrogenrezeptoren (ER) geschlechtsspezifisch kontrolliert? Sind geschlechtsspezifische Estrogenkonzentrationen für die sexuell dimorphe synaptische Plastizität verantwortlich?

Frage 2: Aromatase vermittelt den wichtigen Schritt der Konversion von Testosteron zu Estrogen. Ist eine unterschiedliche Aromataseaktivität in beiden Geschlechtern regulierender Faktor der unterschiedlichen Spinogenese?

Frage 3: Testosteron ist als Substrat der Aromatase die Vorstufe in der Estrogensynthese. Ist Estrogen allein Stimulus der Spinogenese, oder kommt gerade dem männlichen Sexualhormon Testosteron selber eine bedeutende Rolle zu?

Frage 4: Oder aber ist eine unterschiedliche GnRH-Rezeptordichte Ursache des sexuellen Dimorphismus?



**Abb. 28:** Schematische Darstellung der Spinophilinbildung. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann der Spinophilin Gehalt mit der Spinezahl gleichgesetzt werden.

Die Estrogensynthese erfolgt aus Cholesterol, welches im ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt durch das *steroidogenicacute regulatory protein* (StAR) an die innere Mitochondrienmembran transportiert wird (Arakane et al., 1996; Kallen et al., 1998). Über verschiedene Zwischenschritte entsteht daraus zunächst Testosteron, welches in einem letzten Schritt mittels Aromatase zu Estrogen umgewandelt wird. Estrogen vermittelt nachfolgend die Spinophilinbildung beziehungsweise Spinogenese. Welcher Mechanismus für die Zunahme der Spinesynapsen (Spinogenese) beziehungsweise für die Vermehrung postsynaptischer Proteine (Spinophilinbildung) die ausschlaggebende Rolle spielt, ist bis heute noch nicht abschließend geklärt.

## 6.1 Regionale und dosisabhängige GnRH-Responsivität im Hippocampus

Unsere Ergebnisse an hippocampalen Slicekulturen zeigen, dass die Spinophilinmenge dosisabhängig durch GnRH reguliert wird. Bei einer Stimulationskonzentration von 100 nM GnRH erhielten wir in männlichen Tieren eine signifikante Zunahme der postsynaptisch markierten Spinophilinsignale, bei weiblichen Tieren lag die Zunahme knapp über dem Signifikanzniveau. Die Stimulation mit 500 nM GnRH resultierte in einer Signalminderung, die gegenüber der Stimulation mit 100 nM GnRH einen signifikant niedrigeren Färbeindex für Spinophilin aufwies.

Da die von uns durchgeführten Messungen der Spinophilinmenge nicht notwendigerweise der Anzahl der Spinesynapsen entsprechen (Zhou et al., 2010), führten wir ein weiteres Experiment durch. Wir zählten die Anzahl neu gebildeter Synapsen nach Stimulation mit denselben GnRH-Konzentrationen wie in den Spinophilinexperimenten elektronenmikroskopisch aus. Hierbei zeigte sich, dass Spinophilinmenge und Anzahl der Spinesynapsen positiv korrelieren. Daraus abgeleitet kann angenommen werden, dass Spinophilin als Indikator für die Spinedichte verwendet werden kann.

Bisherige Studien, bei denen allerdings nicht geschlechtsspezifisch untersucht wurde, zeigen vergleichbare Ergebnisse (Prange-Kiel et al., 2008): Die Behandlung von hippocampalen Schnittkulturen mit 10 nM und 100 nM GnRH führte zu einer Zunahme der Spinophilinsignale, wobei dieser Effekt hier nur nach Applikation von 10 nM GnRH signifikant war. Die entsprechenden elektronenmikroskopischen Experimente zeigten eine signifikante Zunahme neu gebildeter Spines bei einer Konzentration von 100 nM GnRH. Die Applikation von 500 nM GnRH führte in beiden Versuchen zu einer Verminderung der Spinophilinsignale und Sistieren einer GnRH-induzierten Neubildung dendritischer Spines (Prange-Kiel et al., 2008).

Weiterhin ließ sich durch unsere immunhistochemischen Experimente eine regionale Spezifität der synaptischen Plastizität darstellen. Dabei erwies sich die Zunahme der Spinophilinmenge in der CA1-Region signifikant, wohingegen sie in der CA3-Region keine Signifikanz erreichte. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen weisen andere Forschergruppen darauf hin, dass Änderungen der synaptischen Plastizität vorwiegend in der CA1-Region zu finden sind (Woolley et al., 1990; Gould et al., 1990; Brake et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2006).

Dieser Befund ist zunächst erstaunlich, da in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die beiden Schlüsselenzyme der Estrogensynthese *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) und Aromatase, gerade in Neuronen der CA3-Region verstärkt nachzuweisen sind (Prange-Kiel et al., 2006). Dabei fand sich in den Synapsen der CA3-Region ein dreimal höherer Enzymgehalt als in denen der CA1-Region und des Gyrus dentatus (Prange-Kiel et al., 2006). Weiterhin ist eine erhöhte Estrogenrezeptor mRNA Expression in der CA3-Region gezeigt worden was darauf hinweist, dass gerade in dieser Region eine höhere Estrogenresponsivität gegenüber der CA1-Region und des Gyrus dentatus zu finden ist (Rune et al., 2002).

Diese Befunde lassen vermuten, dass Estrogen über ein verstärktes Axonwachstum (von Schassen et al., 2006) mithilfe der Schaffer-Kollateralen an Dendriten der CA1-Pyramidenzellen die Bildung neuer Spines induziert (Rune et al., 2002; Prange-Kiel et al., 2006). Konsequenterweise würde das bedeuten, dass Spinophilinmessungen im Stratum radiatum der CA1-Region auf ein verändertes Proteinprofil in der CA3-Region zurückzuführen sind.

## 6.2 Geschlechtsspezifische GnRH-Responsivität im Hippocampus

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal an hippocampalen Schnittkulturen untersucht, ob die Spinogenese geschlechtsspezifisch reguliert wird. Zur Markierung postsynaptischer Elemente wurde eine spezifische Färbung von Spinophilin an hippocampalen Schnittkulturen männlicher und weiblicher Tiere durchgeführt. Wir konnten zeigen, dass die Behandlung weiblicher und männlicher Hippocampuskulturen mit 100 nM GnRH zu signifikant höheren Spinophilinmengen in männlichen Kulturen führt, was damit auf eine stärkere Spinogenese gegenüber weiblichen Tieren hinweist. Die Applikation von 500 nM GnRH führte bei beiden Geschlechtern weder zu einer signifikanten Änderung gegenüber den unbehandelten Kontrollkulturen noch zu einem signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Diese von uns ermittelten Ergebnisse beschränken sich auf die CA1-Region. Geschlechtsspezifischen Unterschiede ließen sich in der CA3-Region nicht darstellen.

In den von uns durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließen sich die immunhistochemischen Befunde verifizieren. Es zeigte sich bei männlichen Kulturen nach einer Stimulation mit 100 nM GnRH eine signifikant höhere Anzahl neu gebildeter

Spinesynapsen gegenüber weiblichen Tieren, wohingegen die Applikation von 500 nM GnRH zu keinem Unterschied führte.

Estrogene liegen in geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Konzentrationen im Blut vor, wobei Männer mit  $10^{-12}$  M gegenüber Frauen mit  $10^{-10}$  M einen niedrigen Spiegel aufweisen (Balthazart und Ball, 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass periphere Hormonkonzentrationen keinen Einfluss auf Gewebekonzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen haben, beziehungsweise dass postnatal sich ändernde Steroidhormonkonzentrationen in Hypothalamus und Hippocampus keinen Zusammenhang mit der Blutkonzentration aufweisen (Konkle und McCarthy, 2011).

Die naheliegende Vermutung, dass auch hippocampale Estradiolkonzentrationen sich in ähnlicher Weise wie hormonale Blutkonzentrationen unterscheiden könnten, wurde durch Amateau et al. 2004 widerlegt. In ihren Versuchen zeigten sie, dass sich bei Geburt die Estradiolkonzentrationen von Männern und Frauen im Hippocampus nicht unterscheiden (Amateau et al., 2004; Konkle und McCarthy, 2011).

Wenn sich nun die Hormonkonzentrationen selber nicht unterscheiden, sind möglicherweise die Estrogenrezeptoren für eine unterschiedliche Regulation verantwortlich? Hier sind die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse widersprüchlich. Die Forschergruppe um Weiland zeigte, dass Geschlechtsunterschiede weder in der Anzahl noch in der Färbeintensität immunreaktiver Estrogenrezeptorpositiver Zellen im Hippocampus darstellbar waren (Weiland et al., 1997). In anderen Experimenten konnte dahingegen gezeigt werden, dass bei Männern sowohl ER- $\alpha$ , als auch ER- $\beta$  mRNA am Ende der ersten postnatalen Woche im Hippocampus eine erhöhte Expression aufweist (Ivanova und Beyer, 2000), wodurch sich ein möglicher Ansatz bieten würde, das sexuell dimorphe Spinogenesepotential zu erklären.

Über ihre Rezeptoren sind Estrogene in der Lage, ihre Effekte zum einen klassisch über langsame, genomische, zum anderen über schnelle, nicht genomische Mechanismen zu vermitteln (McEwen und Alves, 1999; McEwen, 2002). Gerade der Hippocampus scheint hierbei eine Region zu sein, in der die schnellen, nicht genomischen Mechanismen eine Rolle für die neuronale Plastizität spielen (Gould et al., 1990; Moss und Gu, 1999; Ivanova und Beyer, 2000). Bei seiner nicht-genomischen Wirkvermittlung über membranassoziierte Rezeptoren setzt die Estrogenbindung

intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, zu denen die Aktivierung von cAMP, MAPkinase, IP<sub>3</sub>, Calciumeinstrom in die Zelle sowie Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern gehören (Beyer und Raab, 1998; Beyer und Karolczak, 2000).

Gerade in Bezug zu unserer zweiten Frage nach einer dimorphen Aromataseaktivität bietet die Wirkung auf Calcium einen Diskussionsansatz.

Wie bereits erwähnt, ist Aromatase das Schlüsselenzym für die Konversion von Testosteron zu Estradiol. Den Nachweis, dass hippocampales Gewebe über dieses Enzym verfügt, erbrachten verschiedene Forschergruppen zunächst auf Proteinebene (Sanghera et al., 1991; Garcia Segura et al., Garcia Segura et al., 2001). In unserem Labor führten wir erstmals den Nachweis auf mRNA Ebene durch (Wehrenberg et al., 2001).

Balthazart et al. wiesen darauf hin, dass eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zu einer Phosphorylierung der Aromatase führt und auf diese Weise ihre Aktivität senkt (Balthazart et al., 2003; Balthazart und Ball, 2006).

Kurze Zeit später wiesen Nuñez et al. nach, dass Frauen intrazellulär über einen höheren basalen Calciumspiegel verfügen (Nuñez und McCarthy, 2009). Wenn Calcium nun die enzymatische Aktivität der Aromatase senkt und der basale Calciumspiegel bei Frauen höher als bei Männern ist, lässt dies den begründeten Verdacht zu, dass Männer über eine höhere Aromataseaktivität verfügen und dies möglicherweise der Grund ist, warum der Spinezuwachs bei Männern signifikant höher als bei Frauen ist.

Hierbei ist noch nicht restlos geklärt, ob der basale Calciumspiegel für die Wirkvermittlung eine essentielle Rolle spielt. In diesem Zusammenhang wurde in unserem Labor gezeigt, dass für die Inhibition der Aromatase das Calcium aus intrazellulären Speichern von Bedeutung ist (Corinna Voets 2008, med. Dissertation). Da jedoch Estrogen über verschiedene Mechanismen einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum bewirkt, welcher dann selber die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern triggert (Prange-Kiel et al., 2009), wäre es denkbar, dass bei einem erhöhten basalen Calciumgehalt der Schwellenwert für die intrazelluläre Calciumfreisetzung leichter erreicht werden könnte. Auf diese Weise könnte es bei Frauen schneller zu einer Aktivitätsminderung der Aromatase kommen und somit letztlich im Vergleich zu Männern zu einem geringeren Anstieg der Spinophilinmenge beziehungsweise Synapsenzahl.



Weiterhin scheint nicht nur die Aktivität der Aromatase sondern auch ihre Verteilung eine Rolle zu spielen. Die Aromatase ist prä- und postsynaptisch sowie auch im endoplasmatischen Retikulum der Pyramidenzellen lokalisiert. Besonders hohe Enzymaktivitäten findet man vor allem in präsynaptischen Boutons (Hojo et al., 2004; Peterson et al., 2005; Balthazart und Ball, 2006; Mukai et al., 2006).

Durch lokale Änderung des Steroidmilieus sowie erhöhten Estrogenkonzentrationen im synaptischen Spalt könnte gerade diese in den präsynaptischen Boutons lokalisierte Aromataseaktivität für die synaptische Plastizität entscheidend sein. Interessanterweise ist bei männlichen Individuen der Anteil aromatasepositiver Präsynapsen deutlich höher als bei weiblichen (Peterson et al., 2005). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass synaptische Aromatisierung sexuell dimorph reguliert wird und Synapsen im männlichen Gehirn möglicherweise lokal höheren Estrogenkonzentrationen ausgesetzt sind (Peterson et al., 2005). Diese könnten dann sowohl über postsynaptische Estrogenrezeptoren und die oben beschriebenen Mechanismen als auch über einen veränderten Neurotransmitterrelease oder Änderung elektrischer Membranpotentiale eine erhöhte synaptische Aktivität ermöglichen (Gu et al., 1999; Milner et al., 2001).

Zusätzlich zeigten andere Studien, dass auf mRNA Ebene die postnatalen Aromatasespiegel bei männlichen Tieren gegenüber denen der weiblichen erhöht sind (Ivanova und Beyer, 2000). Untersuchungen an embryonalen Tieren zeigten zunächst keine Unterschiede. Nach der Geburt jedoch stieg bei männlichen Tieren die Enzymaktivität um 80 %, wohingegen sie bei weiblichen Tieren mit einem Anstieg um nur 50 % signifikant niedriger war (Ivanova und Beyer, 2000).

In zusammenhängender Betrachtung mit den Ergebnissen unserer Forschung spiegeln diese Werte annähernd die Verhältnisse der Zunahme der Spinophilinmenge wider.

Hinsichtlich der Aromataseaktivität gibt es jedoch widersprüchliche Forschungsergebnisse. So wurde im Unterschied zu den oben aufgeführten Befunden ebenso gezeigt, dass sowohl die Estradiolmenge als auch die Aromataseaktivität nicht sexuell dimorph ausgeprägt sind (Bowers et al., 2010; Konkle und McCarthy, 2011). Angesichts dieser konträren Ergebnisse stellt sich daher die Frage, ob die Konversion der Androgene zu Estrogen und damit das Enzym Aromatase der Schlüssel der sexuell dimorphen Spinogenese ist, oder aber ob Testosteron, wie in unserer dritten Frage vermutet, selber eine bedeutende Rolle in der Spinogenese zukommt?

Im Jahr 2003 veröffentlichten Leranthe et al. Untersuchungen, die erstmals darauf hinweisen, dass Testosteron selber zu einer Zunahme der Spinedichte führt (Leranthe et al., 2003). In ihren Versuchen behandelten sie ovariectomierte Tiere sowohl mit Dihydrotestosteron (einem nicht aromatisierbaren Androgen) als auch mit Testosteron Propionat, welches durch Aromatisierung in Estrogen umgewandelt werden kann. Hierbei stellten sie in beiden Behandlungsgruppen eine signifikante Zunahme der Spinedichte in der CA1-Region fest. Letrozolapplikation vor der Steroidinjektion führte bei Testosteron Propionat dazu, dass nachfolgend die Spinesynapsendichte auf dem Niveau ovariectomierter Tiere war, wohingegen die Wirkung von Dihydrotestosteron unbeeinflusst blieb. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Gonadektomie zu einer reduzierten CA1-Spinezahl in beiden Geschlechtern führt, wobei Estrogengabe diesen Effekt bei weiblichen Tieren wieder aufhob, jedoch keine Auswirkung in orchiectomierten Tieren zeigte (Leranthe et al., 2003; Leranthe et al., 2004). Diese Diskrepanz trat nach Androgengabe nicht auf, wobei beide Geschlechter auf dieses Hormon reagierten. Aus den Ergebnissen abgeleitet begründet sich daher die Vermutung, dass Mechanismen, die weder von Aromatase abhängig noch durch Estrogen vermittelt sind, eine Rolle spielen (Leranthe et al., 2003; Leranthe et al., 2004).

Diese These wird gestützt durch aktuelle Ergebnisse aus in unserem Labor durchgeführten *in vivo* Versuchen. In diesen zeigte sich, dass Letrozolbehandlung männlicher Tiere nicht zu einem Abfall der Spinesynapsendichte führt, wohingegen Letrozolapplikation bei weiblichen Tieren diesen Effekt vermittelt (MacLusky et al., 2004; Breda von Blittersdorf 2011, med. Dissertation). Offensichtlich besitzt Testosteron selber einen protektiven Effekt und seine Wirkung beruht nicht nur auf seiner Rolle als Substrat für die Estrogensynthese. Weiterhin lässt sich aus den Ergebnissen die Vermutung ableiten, dass Testosteron insbesondere im männlichen Organismus eine bedeutende Funktion in der Spinogenese besitzt.

Dass Testosteron einen aktivierenden Effekt hat, konnten auch andere Forschergruppen nachweisen. 20 Minuten nach Testosteronbehandlung gonadektomierter Tiere ließ sich ein signifikanter Anstieg der Amplitude erregender postsynaptischer Potentiale (EPSP) verzeichnen, welcher sich außerdem signifikant höher darstellte als nach der Gabe von Estrogen oder Progesteron (Smith et al., 2002). Gonadektomie hingegen führte zu einer Amplitudenminderung, die jedoch nur bei männlichen Tieren auftrat. Weiterhin zeigte

sich in intakten männlichen Tieren, dass der Gehalt an zirkulierendem Testosteron im Serum positiv mit der EPSP-Amplitude korrelierte (Smith et al., 2002). Diese Befunde weisen auf eine bedeutende Rolle von Testosteron selber für die synaptische Plastizität hin.

Es ist bekannt, dass Testosteron im Hippocampus zum einen durch Umwandlung zu Estradiol wirkt, neben diesem Mechanismus kann Testosteron seine Wirkung aber auch über die Bindung an intranukleäre Androgenrezeptoren entfalten (Xiao und Jordan, 2002). Den Nachweis von Androgenrezeptor mRNA im Cornu ammonis (CA) und Subiculum des Hippocampus erbrachten Simerly et al. 1990. Später zeigte sich, dass Androgenrezeptoren vorwiegend an CA1-Neuronen exprimiert werden, wobei ihre Verteilungsdichte wesentlich höher als die der Estrogenrezeptoren ist (Kerr et al., 1995; Zhang et al., 2008). Zusätzlich ließ sich ein geschlechtsspezifisches Bild ihrer Anzahl darstellen, wobei die CA1-Neurone männlicher Tiere über mehr Androgenrezeptoren als die weiblicher Tiere verfügen (Xiao und Jordan, 2002). Wenn nun die Wirkung der Androgene im männlichen Organismus für die synaptische Plastizität eine essentielle Rolle spielt, ergibt sich daraus ein weiterer Hinweis, die verstärkte Spinogenese gegenüber den weiblichen Organismen zu erklären.

### **6.3 Geschlechtsspezifische Darstellung des GnRH-Rezeptors**

Nach neueren Ergebnissen kann man von einer GnRH gesteuerten Steroidhormonsynthese im Hippocampus ausgehen (Prange-Kiel et al., 2008), in der GnRH auf bisher noch nicht geklärte Weise hippocampale Neurone beeinflusst. Da in unserem experimentellen System aufgrund der *in vitro* Kultivierung hippocampaler Schnittkulturen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der GnRH-Konzentration auftreten konnten, untersuchten wir zur Klärung unserer vierten Frage in einem immunhistochemischen Experiment, ob Unterschiede in der Verteilung beziehungsweise Anzahl der GnRH-Rezeptoren darstellbar sind.

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen erstmalig, dass der GnRH-Rezeptor eine sowohl sexuell dimorphe als auch regionale Verteilung aufweist. Hierbei fanden sich im weiblichen Organismus deutlich mehr GnRH-Rezeptoren als im männlichen. In beiden

Geschlechtern war das GnRH-Rezeptorsignal in der CA3-Region stärker als in der CA1-Region.

Verschiedene Forschergruppen zeigten bereits das Vorhandensein des GnRH-Rezeptors in hippocampalem Gewebe (Jennes und Conn, 1994; Kakar und Jennes, 1995; Wilson et al., 2006; Albertson et al., 2008; Schang et al., 2011). Jennes und Woolums wiesen zunächst GnRH-Rezeptor mRNA in hippocampalen Pyramidenzellen nach (Jennes und Woolums, 1994), später ließ sich der GnRH-Rezeptor immunhistochemisch auch auf Pyramidenzellen darstellen (Wilson et al., 2006). In unserem Labor konnten wir diese Ergebnisse bestätigen (Patrick Kohlmann 2008, med. Dissertation).

Weiterhin konnte durch quantitative *Real-Time PCR* gezeigt werden, dass die GnRH-Rezeptormenge im Hippocampus fünfmal höher als im Kortex ist, was unter der Voraussetzung einer gleichsinnigen Regulation von RNA- und Proteinmenge, auf eine besondere GnRH-Empfindlichkeit des Hippocampus hinweist (Prange-Kiel et al., 2009).

Mittels *in situ* Hybridisierung durchgeführte Untersuchungen im Hippocampus belegen außerdem regionale Unterschiede der GnRH-Rezeptorexpression. Dabei zeigte die quantitative Auswertung, dass die Menge der GnRH-Rezeptor mRNA in der CA1-Region am niedrigsten und in der CA3-Region am höchsten ist (Jennes et al., 1995). Diese Ergebnisse stützen zusätzlich unsere eingangs formulierte These, dass Hormonwirkungen vorwiegend in der CA3-Region stattfinden und veränderte Spinophilinmengen der CA1-Region auf Hormonwirkungen in der CA3-Region zurückzuführen sind.

Jedoch sind die Ergebnisse in Bezug auf eine geschlechtsspezifische GnRH-Rezeptormenge kritisch zu bewerten. Weiterführende Untersuchungen aus unserem Labor konnten die sexuell dimorphe Rezeptorverteilung nicht reproduzieren. Insbesondere im weiblichen Organismus zeigte sich das Bild der GnRH-Rezeptorfärbung variabel.

An hypothalamischen und hypophysären Ratten-Geweben konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Rezeptoren, der G-Proteine und auch die GnRH-Rezeptor mRNA Spiegel während des Zyklus variieren (Bouvier et al., 1991; Jennes et al., 1996; Stanislaus et al. 1998). Daraus, sowie aus unseren Ergebnissen abgeleitet, stellt sich die begründete

Frage, ob dieses Modell auf hippocampales Gewebe zu übertragen ist und auch hier der GnRH-Rezeptor zyklischen Schwankungen unterliegt.

In der Literatur gibt es bereits Hinweise auf eine zyklische Änderung des GnRH-Rezeptors im Nucleus arcuatus des Hypothalamus sowie hippocampalem Gewebe. Jennes und Mitarbeiter konnten zeigen, dass GnRH-Rezeptor mRNA Spiegel im Diestrus II und dem nachfolgenden Proestrus ansteigen und dass dieser Anstieg mit zunehmenden Estrogenplasmaspiegeln zusammenfällt. In der Zeit abnehmender Estrogenplasmaspiegel lagen dagegen verringerte GnRH-Rezeptor mRNA Spiegel vor, woraus geschlossen werden kann, dass Estradiol scheinbar eine zentrale Rolle in der Regulation des Rezeptors besitzt (Jennes et al., 1996).

Die Änderungen der GnRH-Rezeptor mRNA Level im Hippocampus zeigten das gleiche Muster wie die Änderungen im mediobasalen Hypothalamus. Obwohl die statistische Auswertung in dieser Region keine Signifikanz erbrachte, konnte gezeigt werden, dass auch im Hippocampus die Konzentration der GnRH-Rezeptor mRNA Änderungen unterliegt, die mit veränderten Hormonspiegeln einhergehen (Jennes et al., 1996).

Ein weiterer Grund, der die Vermutung einer zyklischen GnRH-Rezeptorregulation im Hippocampus nahe legt, ist aus dem Hinweis abzuleiten, dass sowohl GnRH selber als auch Estradiol den Rezeptor regulieren. So konnte gezeigt werden, dass die Frequenz und Pulsamplitude der GnRH-Freisetzung Einfluss auf die GnRH-Rezeptor mRNA Expression besitzen (Kaiser et al., 1993; Yasin et al., 1995). Dabei traten regulative Effekte in beiden Geschlechtern bei jeweils charakteristischen Frequenzen beziehungsweise Pulsamplituden auf.

Aber auch Estradiol scheint einen Einfluss auf die Expression des GnRH-Rezeptors zu haben (Sealfon et al., 1990; Yasin et al., 1995; Jennes et al., 1996). Versuche an Ratten, an denen mittels Ovariectomie und Phenoxybenzaminbehandlung ein GnRH-freies System imitiert wurde zeigten, dass es 12 Stunden nach Estrogenapplikation zu einer Erhöhung, 24 Stunden später sogar zu einer Verdopplung der GnRH-Rezeptor mRNA in der Hypophyse kam (Yasnin et al., 1995). In Experimenten von Stuart et al. führte die Stimulation mit 10 nM Estradiol an Hypophysenzellen von Schafen zu einer dreifach erhöhten GnRH-Bindungskapazität, sowie einer sechsfachen Erhöhung der GnRH Rezeptor mRNA Expression (Jennes et al., 1996).

Eine Hochregulation des GnRH-Rezeptors durch Estradiol ist jedoch kein universeller Mechanismus, sondern scheinbar gewebespezifisch. In humanen Granulosazellen des Gelbkörpers führte eine 24-stündige Behandlung mit Estrogen (1-100 nM) zu einer signifikanten Abnahme der GnRH-Rezeptor mRNA (Nathwani et al., 1999). Eine sechsstündige Behandlung mit geringen Estrogenkonzentrationen (1 nM) resultierte aber auch hier in einer Zunahme (Nathwani et al., 1999).

Versuche aus unserem Labor führen zu der Vermutung, dass endogenes Estradiol in der Regulation der GnRH-Rezeptormenge eine bedeutende Rolle spielt. In hippocampalen Zellkulturen führte die Applikation des Aromataseinhibitors Letrozol zu einer Zunahme des GnRH-Rezeptors (Patrick Kohlmann 2008, med. Dissertation). Dieser Befund weist darauf hin, dass endogenes Estradiol den GnRH-Rezeptorspiegel auf niedrigem Niveau hält und dass geringere endogene Estrogenspiegel durch Erhöhung der GnRH-Rezeptorexpression kompensiert werden.

Angesichts der Komplexität der Estradiolwirkung, schon allein auf die GnRH-Rezeptordichte, sind sorgfältige, kontrollierte Untersuchungen notwendig, bei denen sowohl das Geschlecht als auch die jeweiligen Zyklusphasen weiblicher Tiere berücksichtigt werden müssen, um sexuell dimorphen Regulationsmechanismen des GnRH-Rezeptors verstehen zu können.

#### **6.4 Geschlechtsspezifische Estrogensynthese**

Um der Ursache der geschlechtsspezifischen Spinogenese weiter nachzugehen, untersuchten wir an männlichen und weiblichen neuronalen Zellkulturen, ob sich ein Unterschied in der nach GnRH-Stimulation auftretenden 17- $\beta$ -Estradiolsynthese findet. Unsere Experimente zeigen erstmalig, dass GnRH-Stimulation in beiden Geschlechtern konzentrationsabhängig zu einer signifikant unterschiedlichen Estrogensynthese führt. Wir konnten nachweisen, dass die Stimulation mit 100 nM GnRH in den Kulturen weiblicher Tiere zu einer erhöhten Estrogensynthese gegenüber der Kontrolle führt, wohingegen bei männlichen Tieren die Menge von 17- $\beta$ -Estradiol gegenüber der unbehandelten Kultur sank. In der statistischen Auswertung erwies sich die 17- $\beta$ -Estradiolkonzentration nach Stimulation mit 100 nM GnRH zwischen den Geschlechtern als signifikant verschieden. Die Behandlung mit 500 nM GnRH zeigte keine

signifikanten Unterschiede der Hormonsekretion. Der 17- $\beta$ -Estradiolgehalt war hier sowohl in weiblichen als auch männlichen Zellkulturen gegenüber den Kontrollen vermindert.

In vorhergehenden Experimenten ließ sich an weiblichen Ratten zeigen, dass Dosen von 10 nM und 100 nM GnRH zu einer erhöhten Estrogensynthese führen (Prange-Kiel et al., 2008). Es wurde angenommen, dass über diesen Mechanismus eine erhöhte Spinogenese vermittelt wird (Prange-Kiel et al., 2008). Interessanterweise lassen sich diese Zusammenhänge im männlichen Organismus nicht darstellen, trotz einer Abnahme der Estradiolsynthese ist hier die Spinogenese gegenüber weiblichen Tieren erhöht. Es stellt sich erneut die Frage, inwiefern GnRH die Estrogensynthese reguliert, beziehungsweise warum die Stimulation mit denselben Dosen GnRH im männlichen Organismus nicht zu einer erhöhten Estrogenkonzentration, trotzdem aber zu einer vermehrten Spinogenese gegenüber weiblichen Tieren führt.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass hohe Dosen GnRH zu einer Internalisierung des GnRH-Rezeptors führen (Loumaye und Catt, 1982; Tsutsumi et al., 1995). Im Hinblick auf unsere Ergebnisse wäre es denkbar, dass dieser Effekt bei männlichen und weiblichen Tieren eine andere Dosisabhängigkeit aufweist. So wäre es möglich, dass im männlichen Organismus bereits niedrigere Dosen GnRH ausreichen, um zu einer Rezeptorinternalisierung zu führen. Wenn nun GnRH über seinen Rezeptor einen aktivierenden Einfluss auf die Aktivität der Aromatase ausübt, würde eine bereits durch niedrigere Dosen GnRH induzierte Abnahme der GnRH-Rezeptormenge, rascher zu einer verminderten Aromataseaktivität in männlichen Zellen führen. In diesem Falle würde weniger Testosteron zu Estrogen umgewandelt werden, wodurch die intrazelluläre Testosteronkonzentration ansteigen würde. Da sich wie bereits besprochen zunehmend Hinweise ergeben, dass gerade im männlichen Organismus Testosteron an der Spinogenese beteiligt ist (Leranth et al., 2003), bietet sich hieraus ein Erklärungsansatz, warum bei männlichen Tieren trotz vermindertem Estrogengehalt sowohl die Zahl der Spinesynapsen als auch die Zahl postynaptisch markierter Proteine signifikant höher als bei weiblichen Tieren ist. Diese Idee deckt sich weiterhin mit aktuellen Experimenten aus unserem Labor, in denen gezeigt wurde, dass die Hemmung der Aromatase bei männlichen Tieren nicht zu einem Synapsenverlust führt (Breda von Blittersdorf 2011, med. Dissertation).

In Bezug auf eine geschlechtsdimorphe Aromataseregulation wäre aber auch eine geschlechtsspezifische Aktivierung von G-Proteinen und *second messenger* Systemen denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass der GnRH-Rezeptor in der Lage ist verschiedene G-Proteine zu binden (Hawes et al., 1992; Stanislaus et al., 1998). In diesem Zusammenhang ließ sich weiterhin darstellen, dass die Anzahl des Rezeptors einen Einfluss auf die Art der gebundenen G-Proteine besitzt (Stanislaus et al., 1998). Diese Ergebnisse legen die Idee nahe, dass eine geschlechtsdimorphe Aromataseregulation und Estrogensynthese durch eine unterschiedliche Rezeptorzahl und nachfolgend durch eine unterschiedliche G-Proteinaktivierung vermittelt sein könnte.

Weiterhin weisen Untersuchungen an neuronähnlichen Zellmodellen darauf hin, dass GnRH zu einer erhöhten Cholesterolsynthese sowie erhöhten *StAR*-Aktivität führt (Rosati et al., 2011). Diese könnte nachfolgend in einer erhöhten Testosteronsynthese, sowie vermehrten Konversion von Testosteron zu Estrogen resultieren. Wenn nun die Aromatase in beiden Geschlechtern vollständig gesättigt arbeitet, könnte zusätzlich anfallendes Testosteron die Spinogenese im männlichen Organismus weiter erhöhen, wodurch dieser Effekt auch ohne steigende Estrogenkonzentrationen aufzutreten vermag.

Zusammenfassend betrachtet unterstützen diese Fakten unsere dritte Hypothese, dass eine erhöhte Spinezahl im männlichen Organismus nicht mit einer erhöhten hippocampalen Estrogensynthese einhergehen muss und estrogenunabhängige Mechanismen für die Regulation der Spinogenese eine bedeutende Rolle spielen. Von besonderem Interesse scheint hierbei Testosteron zu sein.

## **6.5 Kritische Beurteilung des experimentellen Modells**

Wie bereits erwähnt, konnte in dieser Studie erstmals mittels immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen gezeigt werden, dass in männlichen und weiblichen hippocampalen Schnittkulturen ein Unterschied in der durch GnRH induzierten synaptischen Plastizität besteht. Jedoch ist hierbei das Modellsystem und die



Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf die tatsächlich *in vivo* vorliegende Situation kritisch zu betrachten.

Wie in unserer vierten Frage formuliert, könnte auch GnRH selber eine bedeutende Rolle in der Erklärung geschlechtsspezifischer Unterschiede der hippocampalen Plastizität zukommen. Da in unseren Experimenten jedoch definierte Mengen GnRH auf hippocampale Schnitte appliziert wurden, die frei von Verbindungen zu anderen Gehirnstrukturen und zusätzlichen Einflüssen waren, lässt sich über diesen Zusammenhang keine valide Aussage treffen.

Insbesondere aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass GnRH-Neurone und ihre integrative Verarbeitung neuronaler Signale für geschlechtsdimorphe Regulationen der Spinogenese von entscheidender Bedeutung sein könnten.

GnRH sezernierende Neurone bestehen aus einer kleinen Population von circa 800-2000 Zellen, die ausschließlich im Hypothalamus gelegen sind (Gore A., 2002). Von dort aus projizieren sie mit ihren Fasern in über 53 Gehirnregionen (Boehm et al., 2005; Christian Mayer 2011, biol. Dissertation). Bisherige Studien zeigen, dass diese Neuronenpopulation keine geschlechtsspezifische Organisation aufweist (Gore A., 2002; Semaan und Kauffman, 2010). Ihre Wirkung vermitteln GnRH-Neurone im Organismus durch eine pulsatile Hormonsekretion in das Kapillarnetz der Eminentia mediana (Chu et al., 2008). Bis heute ist noch nicht abschließend geklärt auf welchem Weg GnRH die Strukturen des Hippocampus erreicht, um dort seine Wirkung zu entfalten. Es konnte nachgewiesen werden, dass GnRH-Fasern im Hippocampus existieren und GnRH auf diese Weise zu seinem Wirkort gelangen könnte (Jennes und Stumpf, 1980; Witkin et al., 1982). Aber auch die Sekretion in die cerebrospinale Flüssigkeit wird als Mechanismus betrachtet, über den GnRH möglicherweise auf den Hippocampus wirken könnte (Skinner und Caraty, 2002).

Da GnRH-Neurone nun selbst keine geschlechtsdimorphe Organisation aufweisen (Semaan und Kauffman, 2010) und weder über Estrogenrezeptor- $\alpha$  noch Androgenrezeptoren verfügen (Kauffmann, 2010), müssten genusspezifische Unterschiede von afferenten Signalwegen für die unterschiedlich ablaufenden Regulationen der reproduktiven Achse verantwortlich sein (Boehm et al., 2005).

Neurone aus dem Nucleus periventricularis anteroventralis (AVPV-Region) projizieren auf GnRH-Neurone des Hypothalamus und besitzen interessanterweise stark

geschlechtsdimorphe Unterschiede. Insbesondere die Gesamtzahl der Nervenzellen, die Anzahl dopaminerger, GABAerger und glutamaterger Neurone weisen hierbei starke Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf, wobei Frauen mehr dieser Zellen besitzen (Forger, 2009; Semaan und Kauffman, 2010).

Zusätzlich wurde in dieser Region eine weitere Neuronenpopulation detektiert, die zunehmende Bedeutung für die Regulation von GnRH-Neuronen aufweist und einen neuen Ansatz bietet, geschlechtsspezifische Reaktionen *in vivo* zu erklären. Hierbei handelt es sich um Kisspeptin-Neurone (Gottsch et al., 2004; Irwig et al., 2004).

Diese Zellen erweisen sich in ihrem Vorkommen ebenfalls geschlechtsdimorph organisiert. In weiblichen Individuen finden sich 25-mal mehr Kisspeptin-Zellen, eine erhöhte mRNA-Expression und auch erhöhte Proteinlevel gegenüber männlichen Individuen (Clarkson und Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007a).

Vor wenigen Jahren erst stellte sich heraus, dass diese Zellpopulation die Aktivität der GnRH-Neurone reguliert, wobei gezeigt werden konnte, dass Kisspeptin *in situ* an hypothalamischen Explantaten die Freisetzung von GnRH induziert (Semaan und Kauffman, 2010). Zusätzlich konnte auch *in vivo* eine GnRH-Freisetzung in das Portalsystem nach Kisspeptin-Stimulation induziert werden (Messenger et al., 2005; de Tassigny et al., 2008). Weiterhin weiß man, dass es die Expression von FOS, einem Marker für neuronale Aktivität, induziert (Irwig et al., 2004; Kauffman et al., 2007b) und auch die Aktionspotentiale der GnRH-Neurone verlängert (Han et al., 2005; Pielecka-Fortuna et al., 2008). Die Vermutung, dass GnRH-Neurone einer direkten Regulation durch Kisspeptin unterliegen, wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Fasern von Kisspeptin-Neuronen an die Somata oder Axone von GnRH-Neuronen reichen (Clarkson und Herbison, 2006; Decourt et al., 2008; Ramaswamy et al., 2008), welche ihrerseits den Kisspeptin-Rezeptor exprimieren (Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005).

Kisspeptin-Neurone besitzen auf ihrer Oberfläche sowohl Estrogen- als auch Androgenrezeptoren und scheinen auf diese Weise in die regulatorische Aktivität der gonadalen Sexualhormone eingebunden zu sein (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b; Smith et al., 2006; Clarkson et al., 2008). Da bekannt ist, dass GnRH-Neurone selber

diese Rezeptoren nicht besitzen, könnten sie das entscheidende Bindeglied zwischen Estrogensignalen aus dem Plasma und GnRH-Neuronen darstellen.

Darüber hinaus stellt sich der Kisspeptin-Rezeptor nicht nur auf GnRH-Neuronen dar. Beschrieben ist seine Genexpression in besonderem Maße in Hypothalamus, präoptischer Region, Hippocampus, Habenula und Amygdala (Lee et al., 1999; Muir et al., 2001; Kauffman, 2010). Entgegengesetzte Forschungsergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass im Hippocampus keine Immunoreaktivität von Kisspeptin gefunden werden kann (Clarkson et al., 2009). Diese Diskrepanz lässt erkennen, dass bis heute keine eindeutige Aussage über die Wirkungen von Kisspeptin getroffen werden kann und daher weitere Untersuchungen notwendig sind, um einen möglichen direkten Einfluss von Kisspeptin auf den Hippocampus abzuschätzen.

GnRH stimuliert die Freisetzung von FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon). LH bewirkt die Testosteronbildung in den Gonaden. FSH fördert die Umwandlung von Testosteron zu Estrogen. Betrachtet man die *in vivo* Situation, ist ein Einfluss dieser beiden Hormone auf die hippocampale synaptische Plastizität ebenfalls zu bedenken. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass LH-Rezeptoren im Hippocampus vorhanden sind und sich auch FSH-Rezeptoren in der CA1- und CA3-Region darstellen lassen (Lei et al., 1993; Chu et al., 2008). Es wäre also denkbar, dass möglicherweise LH oder FSH einen zusätzlichen Einfluss auf die Aromataseaktivität besitzen. Damit wären GnRH-Effekte, die nicht durch Estrogen oder Testosteron vermittelt sind, in Betracht zu ziehen und ein Teil der GnRH-Wirkung könnte hierbei durch LH- beziehungsweise FSH- Rezeptoren vermittelt sein.

Weiterhin zeigte sich in Experimenten von Leranath et al. erstmalig, dass Verbindungen des medialen basalen Septums für die estrogeninduzierte Spinogenese im Hippocampus von Bedeutung sind. In ihren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Estrogen intakte subkortikale Faserverbindungen benötigt um eine Spinogenese zu induzieren (Leranath et al., 2000a). Hierzu wurde eine unilaterale Durchtrennung des Fornix weiblicher Ratten vorgenommen und nachfolgend auf beiden Seiten die Spinedichte bestimmt. Die Analyse der Synapsenzahl zeigte im Seitenvergleich zunächst keine Unterschiede, was darauf hindeutete, dass eine Fornixdurchtrennung per se nicht zu einer veränderten Spinezahl führt (Leranath et al., 2000a). Interessanterweise führte

sowohl systemisch als auch lokal appliziertes Estrogen auf der Seite intakter Faserverbindung zu einer Zunahme der Spinezahl, nicht hingegen auf der Seite des durchtrennten Fornix (Leranth et al., 2000a; Lâm et al., 2003). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass neben der direkten Estrogenwirkung am Hippocampus, *in vivo* über subkortikale Strukturen vermittelte Estrogeneffekte eine Rolle spielen. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch Testosteron einen Teil seiner Effekte über subkortikale Strukturen vermittelt (Kovacs et al., 2003), woraus sich ein begründeter Ansatz ergibt, geschlechtsdimorphe Regulationsmechanismen der Spinogenese *in vivo* zu untersuchen.

## 7. Zusammenfassung

Vorausgegangene *in vitro* Studien belegen, dass Estrogene im Hippocampus *de novo* produziert werden und lokal die synaptische Plastizität modifizieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im weiblichen Organismus diese Estrogensynthese einem direkten Regulationsmechanismus durch GnRH unterliegt und GnRH somit indirekt einen Einfluss auf die Spinogenese ausübt. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob dieser Mechanismus auch für den männlichen Organismus gilt.

Dafür wurden hippocampale Schnittkulturen männlicher und weiblicher Ratten mit GnRH behandelt und im Hinblick auf synaptische Dichte, die Expression des postsynaptischen Markers Spinophilin und die Kapazität zur Estradiolsynthese hin untersucht.

In Schnittkulturen weiblicher Ratten führte die Behandlung mit 100 nM GnRH zu einer Steigerung der hippocampalen Estradiolsynthese, wie in einem Radioimmunoassay gezeigt werden konnte. Die stereologische Auszählung von Spinesynapsen in elektronenmikroskopischen Bildern dieser Kulturen ergab eine signifikante Zunahme der Synapsendichte, die zudem mit einer konsistenten, quantitativ erfassten Zunahme der Spinophilinexpression einherging. In Schnittkulturen männlicher Ratten dagegen bewirkte dieselbe Dosis GnRH eine Abnahme der Estradiolsynthese, bei gleichzeitiger Zunahme von Synapsendichte und Spinophilinexpression, die außerdem noch signifikant höher war als in den Schnittkulturen weiblicher Ratten.

Im Ergebnis zeigen unsere Befunde einen deutlichen sexuellen Dimorphismus der hippocampalen GnRH-Responsivität, was zudem durch eine deutlich höhere GnRH-Rezeptordichte im weiblichen Hippocampus gegenüber dem männlichen Hippocampus unterstrichen wird. Unsere Ergebnisse bestätigen vorausgegangene Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass GnRH im weiblichen Hippocampus über eine Stimulation der Aromataseaktivität die Estradiolsynthese und in der Folge davon die Synaptogenese stimuliert. Im männlichen Hippocampus dagegen muss nach unseren Ergebnissen davon ausgegangen werden, dass die durch GnRH stimulierte Synaptogenese aromataseunabhängig zustande kommt.

## 8. Literaturverzeichnis

- ALBERTSON, A. J., NAVRATIL, A., MIGNOT, M., DUFOURNY, L., CHERRINGTON, B. & SKINNER, D. C. 2008. Immunoreactive GnRH type I receptors in the mouse and sheep brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35, 326-333.
- ALLEN, P. B., OUIMET, C. C. & GREENGARD, P. 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9956-9961.
- AMARAL, D. G. & WITTER, M. P. 1989. The 3-dimensional organization of the hippocampal-formation - a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31, 571-591.
- AMATEAU, S. K., ALT, J. J., STAMPS, C. L. & MCCARTHY, M. M. 2004. Brain estradiol content in newborn rats: Sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology*, 145, 2906-2917.
- ARAKANE, F., SUGAWARA, T., NISHINO, H., LIU, Z. M., HOLT, J. A., PAIN, D., STOCCO, D. M., MILLER, W. L. & STRAUSS, J. F. 1996. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13731-13736.
- BALTHAZART, J., BAILLIEN, M., CHARLIER, T. D. & BALL, G. F. 2003. Calcium-dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1591-1606.
- BALTHAZART, J. & BALL, G. F. 2006. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends in Neurosciences*, 29, 241-249.
- BEHL, C. & HOLSBOER, F. 1999. The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 441-444.
- BEHL, C. & MANTHEY, D. 2000. Neuroprotective activities of estrogen: An update. *Journal of Neurocytology*, 29, 351-358.
- BENDER, C. M., SEREIKA, S. M., BERGA, S. L., VOGEL, V. G., BRUFISKY, A. M., PARASKAR, K. K. & RYAN, C. M. 2006. Cognitive impairment associated with adjuvant therapy in breast cancer. *Psycho-Oncology*, 15, 422-430.
- BERTHOIS, Y., KATZENELLENBOGEN, J. A. & KATZENELLENBOGEN, B. S. 1986. Phenol red in tissue-culture media is a weak estrogen: Implications

- concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 2496-2500.
- BEYER, C. 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anatomy and Embryology*, 199, 379-390.
- BEYER, C. & KAROLCZAK, M. 2000. Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *Journal of Neuroscience Research*, 59, 107-116.
- BEYER, C. & RAAB, H. 1998. Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *European Journal of Neuroscience*, 10, 255-262.
- BLOODGOOD, B. L. & SABATINI, B. L. 2007. Ca<sup>2+</sup> signaling in dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 17, 345-351.
- BOEHM, U., ZOU, Z. H. & BUCK, L. B. 2005. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell*, 123, 683-695.
- BOUVIER, C., LAGACE, G. & COLLU, R. 1991. G-PROTEIN MODULATION BY ESTROGENS. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 79, 65-73.
- BOWERS, J. M., WADDELL, J. & MCCARTHY, M. M. 2010. A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biology of sex differences*, 1, 8.
- BRAKE, W. G., ALVES, S. E., DUNLOP, J. C., LEE, S. J., BULLOCH, K., ALLEN, P. B., GREENGARD, P. & MCEWEN, B. S. 2001. Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: An examination of synaptic proteins. *Endocrinology*, 142, 1284-1289.
- BREWER, G. J. 1997. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 71, 143-155.
- CHU, C., GAO, G. & HUANG, W. 2008. A study on co-localization of FSH and its receptor in rat hippocampus. *Journal of Molecular Histology*, 39, 49-55.
- CLARKSON, J., DE TASSIGNY, X. D. A., COLLEDGE, W. H., CARATY, A. & HERBISON, A. E. 2009. Distribution of Kisspeptin Neurones in the Adult Female Mouse Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 673-682.
- CLARKSON, J., DE TASSIGNY, X. D. A., MORENO, A. S., COLLEDGE, W. H. & HERBISON, A. E. 2008. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*, 28, 8691-8697.

- CLARKSON, J. & HERBISON, A. E. 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; Sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147, 5817-5825.
- DANIEL, J. M., FADER, A. J., SPENCER, A. L. & DOHANICH, G. P. 1997. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Hormones and Behavior*, 32, 217-225.
- DE TASSIGNY, X. D. A., FAGG, L. A., CARLTON, M. B. L. & COLLEDGE, W. H. 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology*, 149, 3926-3932.
- DECOURT, C., TILLET, Y., CARATY, A., FRANCESCHINI, I. & BRIANT, C. 2008. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 36, 131-137.
- FENG, J., YAN, Z., FERREIRA, A., TOMIZAWA, K., LIAUW, J. A., ZHUO, M., ALLEN, P. B., OUIMET, C. C. & GREENGARD, P. 2000. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9287-9292.
- FESTER, L., ZHOU, L., VOETS, C., OSSIG, C., DISTELDORF, E., PETERS, C., BLAUTE, F., PRANGE-KIEL, J., DUDZINSKI, D., JARRY, H. & RONE, G. M. 2009. The opposing roles of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1, S123-9.
- FISCHER, M., KAECH, S., KNUTTI, D. & MATUS, A. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20, 847-854.
- FORGER, N. G. 2009. Control of Cell Number in the Sexually Dimorphic Brain and Spinal Cord. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 393-399.
- FURUKAWA, A., MIYATAKE, A., OHNISHI, T. & ICHIKAWA, Y. 1998. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: Colocalization of StAR, cytochrome P-450(SCC) (CYP XIA1), and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 71, 2231-2238.
- GARCIA-SEGURA, L. M., AZCOITIA, I. & DONCARLOS, L. L. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*, 63, 29-60.
- GARCIA-SEGURA, L. M., WOZNIAK, A., AZCOITIA, I., RODRIGUEZ, J. R., HUTCHISON, R. E. & HUTCHISON, J. B. 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: Implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89, 567-578.
- GORE, A.C. 2002. GnRH: The Master Molecule of Reproduction. Kluwer Academic



Publishers, Boston.

- GOTTSCH, M. L., CUNNINGHAM, M. J., SMITH, J. T., POPA, S. M., ACOHIDO, B. V., CROWLEY, W. F., SEMINARA, S., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145, 4073-4077.
- GOULD, E., WOOLLEY, C. S., FRANKFURT, M. & MCEWEN, B. S. 1990. Gonadal Steroids Regulate Dendritic Spine Density in Hippocampal Pyramidal Cells in Adulthood. *Journal of Neuroscience*, 10, 1286-1291.
- GRAY, E. G. 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex - an electron microscope study. *Journal of Anatomy*, 93, 420-433.
- GU, Q., KORACH, K. S. & MOSS, R. L. 1999. Rapid action of 17 beta-estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology*, 140, 660-666.
- HAMPSON, E. 1990. ESTROGEN-RELATED VARIATIONS IN HUMAN SPATIAL AND ARTICULATORY-MOTOR SKILLS. *Psychoneuroendocrinology*, 15, 97-111.
- HAN, S. K., GOTTSCH, M. L., LEE, K. J., POPA, S. M., SMITH, J. T., JAKAWICH, S. K., CLIFTON, D. K., STEINER, R. A. & HERBISON, A. E. 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *Journal of Neuroscience*, 25, 11349-11356.
- HAO, J. D., JANSSEN, W. G. M., TANG, Y., ROBERTS, J. A., MCKAY, H., LASLEY, B., ALLEN, P. B., GREENGARD, P., RAPP, P. R., KORDOWER, J. H., HOF, P. R. & MORRISON, J. H. 2003. Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, 465, 540-550.
- HARRIS, K. M. & KATER, S. B. 1994. DENDRITIC SPINES - CELLULAR SPECIALIZATIONS IMPARTING BOTH STABILITY AND FLEXIBILITY TO SYNAPTIC FUNCTION. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 341-371.
- HAWES, B. E., MARZEN, J. E., WATERS, S. B. & CONN, P. M. 1992. Sodium fluoride provokes gonadotrope desensitization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotrope sensitization to A23187: evidence for multiple G proteins in GnRH action. *Endocrinology*, 130, 2465-2475.
- HERBISON, A. E. 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Reviews*, 19, 302-330.

- HOJO, Y., HATTORI, T., ENAMI, T., FURUKAWA, A., SUZUKI, K., ISHII, H. T., MUKAI, H., MORRISON, J. H., JANSSEN, W. G. M., KOMINAMI, S., HARADA, N., KIMOTO, T. & KAWATO, S. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 865-870.
- IRWIG, M. S., FRALEYB, G. S., SMITH, J. T., ACOHIDO, B. V., POPA, S. M., CUNNINGHAM, M. J., GOTTSCH, M. L., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80, 264-272.
- IVANOVA, T. & BEYER, C. 2000. Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 300, 231-237.
- JANSSENS, R. M. J., BRUS, L., CAHILL, D. J., HUIRNE, J. A. F., SCHOEMAKER, J. & LAMBALK, C. B. 2000. Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Human Reproduction Update*, 6, 505-518.
- JENKINS, V., SHILLING, V., FALLOWFIELD, L., HOWELL, A. & HUTTON, S. 2004. Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? A pilot study. *Psycho-Oncology*, 13, 61-66.
- JENNES, L., BRAME, B., CENTERS, A., JANOVICK, J. A. & CONN, P. M. 1995. Regulation of hippocampal gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor mRNA and GnRH-stimulated inositol phosphate production by gonadal steroid hormones. *Brain Res Mol Brain Res*, 33, 104-110.
- JENNES, L. & CONN, P. M. 1994. Gonadotropin-Releasing-Hormone and Its Receptors in Rat-Brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 15, 51-77.
- JENNES, L., MCSHANE, T., BRAME, B. & CENTERS, A. 1996. Dynamic changes in gonadotropin releasing hormone receptor mRNA content in the mediobasal hypothalamus during the rat estrous cycle. *Journal of Neuroendocrinology*, 8, 275-281.
- JENNES, L. & STUMPF, W. E. 1980. LHRH-systems in the brain of the golden hamster. *Cell and Tissue Research*, 209, 239-256.
- JENNES, L. & WOOLUMS, S. 1994. LOCALIZATION OF GONADOTROPIN-RELEASING-HORMONE RECEPTOR MESSENGER-RNA IN RAT-BRAIN. *Endocrine*, 2, 521-528.

- KAISER, U. B., JAKUBOWIAK, A., STEINBERGER, A. & CHIN, W. W. 1993. Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 133, 931-934.
- KAHLE, W., FROTSCHER, M. 2001. Taschenatlas der Anatomie. Bd. 3 Nervensystem und Sinnesorgane. 7. Aufl. Thieme, Stuttgart New York.
- KAKAR, S. S. & JENNES, L. 1995. Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues. *Cancer Letters*, 98, 57-62.
- KALLEN, C. B., BILLHEIMER, J. T., SUMMERS, S. A., STAYROOK, S. E., LEWIS, M. & STRAUSS, J. F. 1998. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 26285-26288.
- KAUFFMAN, A. S. 2010. Coming of age in the Kisspeptin Era: Sex differences, development, and puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324, 51-63.
- KAUFFMAN, A. S., GOTTSCH, M. L., ROA, J., BYQUIST, A. C., CROWN, A., CLIFTON, D. K., HOFFMAN, G. E., STEINER, R. A. & TENA-SEMPERE, M. 2007a. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, 148, 1774-1783.
- KAUFFMAN, A. S., PARK, J. H., MCPHIE-LALMANSINGH, A. A., GOTTSCH, M. L., BODO, C., HOHMANN, J. G., PAVLOVA, M. N., ROHDE, A. D., CLIFTON, D. K., STEINER, R. A. & RISSMAN, E. F. 2007b. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *Journal of Neuroscience*, 27, 8826-8835.
- KERR, J. E., ALLORE, R. J., BECK, S. G. & HANDA, R. J. 1995. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology*, 136, 3213-3221.
- KNOBIL, E. 1988. The neuroendocrine control of ovulation. *Human Reproduction*, 3, 469-472.
- KOHLMANN, P. 2008. Einfluss von exogenem und endogenem Estradiol auf die Expression hippocampaler GnRH- und LH-Rezeptoren in vitro. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- KONKLE, A. T. M. & MCCARTHY, M. M. 2011. Developmental Time Course of Estradiol, Testosterone, and Dihydrotestosterone Levels in Discrete Regions of Male and Female Rat Brain. *Endocrinology*, 152, 223-235.

- KOVACS, E. G., MACLUSKY, N. J. & LERANTH, C. 2003. Effects of testosterone on hippocampal CA1 spine synaptic density in the male rat are inhibited by fimbria/fornix transection. *Neuroscience*, 122, 807-810.
- KRETZ, O., FESTER, L., WEHRENBURG, U., ZHOU, L. P., BRAUCKMANN, S., ZHAO, S. T., PRANGE-KIEL, J., NAUMANN, T., JARRY, H., FROTSCHER, M. & RUNE, G. M. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Neuroscience*, 24, 5913-5921.
- LEE, D. K., NGUYEN, T., O'NEILL, G. P., CHENG, R., LIU, Y., HOWARD, A. D., COULOMBE, N., TAN, C. P., TANG-NGUYEN, A. T., GEORGE, S. R. & O'DOWD, B. F. 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *Febs Letters*, 446, 103-107.
- LEI, Z. M., RAO, C. V., KORNYEI, J. L., LICHT, P. & HIATT, E. S. 1993. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology*, 132, 2262-2270.
- LERANTH, C., HAJSZAN, T. & MACLUSKY, N. J. 2004. Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Journal of Neuroscience*, 24, 495-499.
- LERANTH, C., PETNEHAZY, O. & MACLUSKY, N. J. 2003. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *Journal of Neuroscience*, 23, 1588-1592.
- LI, C. J., BRAKE, W. G., ROMEO, R. D., DUNLOP, J. C., GORDON, M., BUZESCU, R., MAGARINOS, A. M., ALLEN, P. B., GREENGARD, P., LUINE, V. & MCEWEN, B. S. 2004. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2185-2190.
- LOUMAYE, E. & CATT, K. J. 1982. Homologous Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors in Cultured Pituitary Cells. *Science*, 215, 983-985.
- MACLUSKY, N. J., HAJSZAN, T. & LERANTH, C. 2004. Effects of dehydroepiandrosterone and flutamide on hippocampal CA1 spine synapse density in male and female rats: Implications for the role of androgens in maintenance of hippocampal structure. *Endocrinology*, 145, 4154-4161.
- MATSUO, H., BABA, Y., NAIR, R. M. G., ARIMURA, A. & SCHALLY, A. V. 1971. STRUCTURE OF PORCINE LH- AND FSH-RELEASING HORMONE .1. PROPOSED AMINO ACID SEQUENCE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43, 1334-&.

- MAYER, C. 2011. Die Rolle der Kisspeptin-Neurone während der Pubertät von Mäusen. Biol. Dissertation. Universität Hamburg.
- MCCULLOUGH, L. D. & HURN, P. D. 2003. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14, 228-235.
- MCEWEN, B. 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Progress in Hormone Research, Vol 57*. Bethesda: Endocrine Soc.
- MCEWEN, B. S. 2001. Genome and hormones: Gender differences in physiology - Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology*, 91, 2785-2801.
- MCEWEN, B. S. & ALVES, S. E. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews*, 20, 279-307.
- MESSAGER, S., CHATZIDAKI, E. E., MA, D., HENDRICK, A. G., ZAHN, D., DIXON, J., THRESHER, R. R., MALINGE, I., LOMET, D., CARLTON, M. B. L., COLLEDGE, W. H., CARATY, A. & APARICIO, S. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1761-1766.
- MILNER, T. A., MCEWEN, B. S., HAYASHI, S., LI, C. J., REAGAN, L. P. & ALVES, S. E. 2001. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *Journal of Comparative Neurology*, 429, 355-371.
- MOSER, M. B., TROMMALD, M. & ANDERSEN, P. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 12673-12675.
- MOSS, R. L. & GU, Q. 1999. Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons. *Steroids*, 64, 14-21.
- MUIR, A. I., CHAMBERLAIN, L., ELSHOUBAGY, N. A., MICHALOVICH, D., MOORE, D. J., CALAMARI, A., SZEKERES, P. G., SARAU, H. M., CHAMBERS, J. K., MURDOCK, P., STEPLEWSKI, K., SHABON, U., MILLER, J. E., MIDDLETON, S. E., DARKER, J. G., LARMINIE, C. G. C., WILSON, S., BERGSMA, D. J., EMSON, P., FAULL, R., PHILPOTT, K. L. & HARRISON, D. C. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 28969-28975.
- MUKAI, H., TSURUGIZAWA, T., OGIUE-IKEDA, M., MURAKAMI, G., HOJO, Y., ISHII, H., KIMOTO, T. & KAWATO, S. Local neurosteroid production in the

- hippocampus: Influence on synaptic plasticity of memory. 6th International Congress of Neuroendocrinology, Jun 19-22 2006 Pittsburgh, PA. Karger, 255-263.
- MULY, E. C., SMITH, Y., ALLEN, P. & GREENGARD, P. 2004. Subcellular distribution of spinophilin immunolabeling in primate prefrontal cortex: Localization to and within dendritic spines. *Journal of Comparative Neurology*, 469, 185-197.
- NATHWANI, P. S., KANG, S. K., CHENG, K. W., CHOI, K. C. & LEUNG, P. C. K. Regulation of gonadotropin-releasing hormone and its receptor gene expression by 17 beta-estradiol in cultured human granulosa-luteal cells. 32nd Annual Meeting of the Society-for-the-Study-of-Reproduction, Jul 1999 Pullman, Washington. Endocrine Soc, 1754-1763.
- NIMCHINSKY, E. A., SABATINI, B. L. & SVOBODA, K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, 64, 313-353.
- NUÑEZ, J. L. & MCCARTHY, M. M. 2009. RESTING INTRACELLULAR CALCIUM CONCENTRATION, DEPOLARIZING GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID AND POSSIBLE ROLE OF LOCAL ESTRADIOL SYNTHESIS IN THE DEVELOPING MALE AND FEMALE HIPPOCAMPUS. *Neuroscience*, 158, 623-634.
- PACKARD, M. G. 1998. Posttraining estrogen and memory modulation. *Hormones and Behavior*, 34, 126-139.
- PARINAUD, J., BEAUR, A., BOURREAU, E., VIEITEZ, G. & PONTONNIER, G. 1988. Effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 50, 597-602.
- PETERS, A. & KAISERMAIR 1970. The Small Pyramidal Neuron of the Rat Cerebral Cortex. The Perikaryon, Dendrites and Spines. *American Journal of Anatomy*, 127, 321-&.
- PETERSON, R. S., YARRAM, L., SCHLINGER, B. A. & SALDANHA, C. J. 2005. Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272, 2089-2096.
- PHILLIPS, S. M. & SHERWIN, B. B. 1992. EFFECTS OF ESTROGEN ON MEMORY FUNCTION IN SURGICALLY MENOPAUSAL WOMEN. *Psychoneuroendocrinology*, 17, 485-495.
- PIELECKA-FORTUNA, J., CHU, Z. & MOENTER, S. M. 2008. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron

- activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*, 149, 1979-1986.
- PRANGE-KIEL, J., FESTER, L., ZHOU, L., JARRY, H. & RUNE, G. M. 2009. Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *Journal of Neural Transmission*, 116, 1417-1425.
- PRANGE-KIEL, J., FESTER, L., ZHOU, L., LAUKE, H., CARRETERO, J. & RUNE, G. M. 2006. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 16, 464-471.
- PRANGE-KIEL, J., JARRY, H., SCHOEN, M., KOHLMANN, P., LOHSE, C., ZHOU, L. & RUNE, G. M. 2008. Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Cell Biology*, 180, 417-426.
- PRANGE-KIEL, J., WEHRENBERG, U., JARRY, H. & RUNE, G. M. 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13, 226-234.
- RAMASWAMY, S., GUERRIERO, K. A., GIBBS, R. B. & PLANT, T. M. 2008. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*, 149, 4387-4395.
- REYNOLDS, E. S. 1963. USE OF LEAD CITRATE AT HIGH pH AS AN ELECTRON-OPAQUE STAIN IN ELECTRON MICROSCOPY. *Journal of Cell Biology*, 17, 208-212.
- ROSATI, F., STURLI, N., CUNGI, M. C., MORELLO, M., VILLANELLI, F., BARTOLUCCI, G., FINOCCHI, C., PERI, A., SERIO, M. & DANZA, G. 2011. Gonadotropin-releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH-SY5Y cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 124, 77-83.
- RUNE, G. M., 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, 167-175.
- RYAN, J., SCALI, J., CARRIERE, I., RITCHIE, K. & ANCELIN, M. L. Hormonal treatment, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Conference on MCI in the Elderly and Populations at Risk, Jan 21-23 2008 Bethesda, MD. Cambridge Univ Press, 47-56.

- SANGHERA, M. K., SIMPSON, E. R., MCPHAUL, M. J., KOZLOWSKI, G., CONLEY, A. J. & LEPHART, E. D. 1991. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*, 129, 2834-2844.
- SARROUILHE, D., DI TOMMASO, A., METAYE, T. & LADEVEZE, V. 2006. Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie*, 88, 1099-1113.
- SCHANG, A.-L., NGO-MULLER, V., BLEUX, C., GRANGER, A., CHENUT, M.-C., LOUDES, C., MAGRE, S., COUNIS, R., COHEN-TANNOUDJI, J. & LAVERRIERE, J.-N. 2011. GnRH Receptor Gene Expression in the Developing Rat Hippocampus: Transcriptional Regulation and Potential Roles in Neuronal Plasticity. *Endocrinology*, 152, 568-580.
- SCOVILLE, W. B. & MILNER, B. 1957. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 20, 11-21.
- SEALFON, S. C., LAWS, S. C., WU, J. C., GILLO, B. & MILLER, W. L. 1990. Hormonal Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors and Messenger RNA Activity in Ovine Pituitary Culture. *Molecular Endocrinology*, 4, 1980-1987.
- SEGAL, M. & MURPHY, D. Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: Functional correlates. Joint Meeting of the 6th International Conference on Hormones, Brain, and Behavior/Society-for-Behavioral-Neuroendocrinology, Aug 05-09 2001 Madrid, Spain. Academic Press Inc, 156-159.
- SEMAAN, S. J. & KAUFFMAN, A. S. 2010. Sexual differentiation and development of forebrain reproductive circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 20, 424-431.
- SHERWIN, B. B. 2003. Steroid hormones and cognitive functioning in aging men - A mini-review. *Journal of Molecular Neuroscience*, 20, 385-393.
- SHILLING, V., JENKINS, V., FALLOWFIELD, L. & HOWELL, T. 2003. The effects of hormone therapy on cognition in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86, 405-412.
- SIMERLY, R. B., CHANG, C., MURAMATSU, M. & SWANSON, L. W. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology*, 294, 76-95.



- SINGH, M., SUMIEN, N., KYSER, C. & SIMPKINS, J. W. 2008. Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us. *Frontiers in Bioscience*, 13, 1083-1089.
- SKINNER, D. C. & CARATY, A. 2002. Measurement and possible function of GnRH in cerebrospinal fluid in ewes. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 59, 25-39.
- SMITH, J. T., CUNNINGHAM, M. J., RISSMAN, E. F., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 2005a. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146, 3686-3692.
- SMITH, J. T., DUNGAN, H. M., STOLL, E. A., GOTTSCH, M. L., BRAUN, R. E., EACKER, S. M., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 2005b. Differential regulation of Kiss-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, 146, 2976-2984.
- SMITH, J. T., POPA, S. M., CLIFTON, D. K., HOFFMAN, G. E. & STEINER, R. A. 2006. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*, 26, 6687-6694.
- SMITH, M. D., JONES, L. S. & WILSON, M. A. 2002. Sex differences in hippocampal slice excitability: Role of testosterone. *Neuroscience*, 109, 517-530.
- SORRA, K. E. & HARRIS, K. M. 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10, 501-511.
- STANISLAUS, D., PINTER, J. H., JANOVIK, J. A. & CONN, P. M. 1998. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 144, 1-10.
- STOFFEL-WAGNER, B. 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *European Journal of Endocrinology*, 145, 669-679.
- STOPPINI, L., BUCHS, P. A. & MULLER, D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37, 173-182.
- TANG, Y., JANSSEN, W. G. M., HAO, J. D., ROBERTS, J. A., MCKAY, H., LASLEY, B., ALLEN, P. B., GREENGARD, P., RAPP, P. R., KORDOWER, J. H., HOF, P. R. & MORRISON, J. H. 2004. Estrogen replacement increases spinophilin-immunoreactive spine number in the prefrontal cortex of female rhesus monkeys. *Cerebral Cortex*, 14, 215-223.
- VOETS, C. 2008. Zur Rolle des Calciums bei Estrogen-vermittelter synaptischer Plastizität. Med. Dissertation. Universität Hamburg.

- TSUTSUMI, M., LAWS, S. C., RODIC, V. & SEALFON, S. C. 1995. Translational regulation of the gonadotropin releasing hormone receptor in alpha T3-1 cells. *Endocrinology*, 136, 1128-1136.
- VON SCHASSEN, C., FESTER, L., PRANGE-KIEL, J., LOHSE, C., HUBER, C., BOTTNER, M. & RUNE, G. M. 2006. Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth. *Journal of Neuroendocrinology*, 18, 847-856.
- WEHRENBURG, U., PRANGE-KIEL, J. & RUNE, G. M. 2001. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of Neurochemistry*, 76, 1879-1886.
- WEILAND, N. G., ORIKASA, C., HAYASHI, S. & MCEWEN, B. S. 1997. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *Journal of Comparative Neurology*, 388, 603-612.
- WILSON, A. C., SALAMAT, M. S., HAASL, R. J., ROCHE, K. M., KARANDE, A., MEETHAL, S. V., TERASAWA, E., BOWEN, R. L. & ATWOOD, C. S. 2006. Human neurons express type I GnRH receptor and respond to GnRH I by increasing luteinizing hormone expression. *Journal of Endocrinology*, 191, 651-663.
- WITKIN, J. W., PADEN, C. M. & SILVERMAN, A. J. 1982. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 35, 429-438.
- WOOLLEY, C. S., GOULD, E., FRANKFURT, M. & MCEWEN, B. S. 1990. Naturally Occuring Fluctuation in Dendritic Spine Density on Adult Hippocampal Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 10, 4035-4039.
- XIAO, L. & JORDAN, C. L. 2002. Sex differences, laterality, and hormonal regulation of androgen receptor immunoreactivity in rat hippocampus. *Hormones and Behavior*, 42, 327-336.
- YASIN, M., DALKIN, A. C., HAISENLEDER, D. J., KERRIGAN, J. R. & MARSHALL, J. C. 1995. Gonadotropin-Releasing hormone (GnRH) pulse pattern regulates GnRH receptor gene expression: augmentation by estradiol. *Endocrinology*, 136, 1559-1564.
- YUSTE, R. & BONHOEFFER, T. 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1071-1089.

- ZHANG, J.-M., KONKLE, A. T. M., ZUP, S. L. & MCCARTHY, M. M. 2008. Impact of sex and hormones on new cells in the developing rat hippocampus: a novel source of sex dimorphism? *European Journal of Neuroscience*, 27, 791-800.
- ZHAO, L., CHEN, S., WANG, J. M. & BRINTON, R. D. 2005. 17 beta-estradiol induces Ca<sup>2+</sup> influx, dendritic and nuclear Ca<sup>2+</sup> rise and subsequent cyclic amp response element-binding protein activation in hippocampal neurons: A potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience*, 132, 299-311.
- ZHOU, L., FESTER, L., VON BLITTERSDORFF, B., HASSU, B., NOGENS, H., PRANGE-KIEL, J., JARRY, H., WEGSCHEIDER, K. & RUNE, G. M. 2010. Aromatase Inhibitors Induce Spine Synapse Loss in the Hippocampus of Ovariectomized Mice. *Endocrinology*, 151, 1153-1160.
- ZILLES, K., REHKÄMPER, G. 1998. Funktionelle Neuroanatomie. 3. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- ZOLAMORGAN, S., SQUIRE, L. R. & AMARAL, D. G. 1986. Human Amnesia and the Medial Temporal Region - Enduring Memory Impairment Following a Bilateral Lesion Limited to Field CA1 of the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 6, 2950-2967.

## 9. Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune danke ich sehr für die Vergabe dieser Arbeit, die Formulierung des Themas und der Möglichkeit in ihrer Forschungsgruppe zu arbeiten. Auch möchte ich mich für die konstante konstruktive Zusammenarbeit, die wertvollen Denkanstöße und ihre aufgeschlossene Art bedanken, die mich auf meinem Weg stets begleitet und motiviert haben und damit einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Herrn Dr. Lepu Zhou, gilt mein besonderer Dank für seine unermüdliche Unterstützung insbesondere während der Durchführung des praktischen Teils der Arbeit.

Frau PD Dr. rer. nat. Felicitas Pröls möchte ich ebenfalls ganz besonderen Dank aussprechen, da sie mich durch wertvolle konstruktive Kritik aus Schreibsackgassen holte und mich anregte neue Ideen zu entwickeln und andere Pfade zu gehen. Ich habe durch sie viel gelernt und mit ihrer Hilfe erstaunlicherweise auch in hindernisreichen Zeiten die große Freude am Schreiben behalten. Vielen Dank Felicitas!

Ganz besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Lars Fester, der sich immer Zeit nahm bei Problemen und Fragen zu helfen. Darüber hinaus möchte ich mich für die unvergleichliche Unterstützung der experimentellen Arbeit bedanken, die mir über viele unberechenbare Hindernisse hinweg half.

Ein großes Dankeschön auch an Frau Bettina Kruck, die mich mit großer Geduld in die Welt der wissenschaftlichen Laborarbeit aufnahm.

Auch bei Frau Helga Herbort möchte ich mich bedanken, die mir mit ihrer ruhigen, freundlichen Art stets hilfsbereit für Fragen zur Verfügung stand und einen großen Anteil am Gelingen der Dispersionkulturen hatte.

Des Weiteren möchte ich keinesfalls Frau Brigitte Asmus vergessen, die mir sehr durch die Entwicklung meiner elektronenmikroskopischen Bilder half.

Ebenso möchte ich Frau Maria Metten von der Universität Göttingen für die hervorragende Kooperation bei der Bestimmung der Hormonspiegel danken.

Die Arbeit im Institut der Anatomie werde ich stets in guter Erinnerung behalten. Mein Dank gilt daher auch weiteren Mitarbeitern, sowie Mitdoktoranden der Anatomie I, da sie es durch ihre positive und herzliche Stimmung geschafft haben, dass ich mich jederzeit in diesem Institut sehr wohl gefühlt habe.

Besonders wichtig ist es mir auch meinen Freunden zu danken, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und mich trotz Phasen fehlender Anrufe immer wieder motiviert haben. Ich freue mich jeden Tag aufs Neue so tolle Menschen an meiner Seite zu wissen.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre großzügige Unterstützung mein Studium und diese Doktorarbeit ermöglicht haben. Ich möchte ihnen dafür danken, dass sie immer für mich da sind. Diese Arbeit sei ihnen gewidmet.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Julia Maria Böhm  
Geburtsdatum 10.10.1982  
Geburtstort Potsdam

### Schulbildung

1989 – 1995 Grundschule Rosa-Luxemburg, Potsdam  
1995 – 2002 Hermann-von-Helmholtz-Gymnasium, Potsdam  
09 / 1999 – 12 / 1999 Hove Park School, Brighton, England  
2002 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

2003 / 2004 Freie Universität Berlin: Spanisch,  
Kunstgeschichte  
04 / 2004 – 10 / 2006 Georg-August-Universität Göttingen;  
Humanmedizin  
03 / 2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Physikum  
10 / 2006 Wechsel an die Universität Hamburg  
07 / 2008 Beginn der Forschung im Rahmen der  
Doktorarbeit  
10 / 2010 – 11 / 2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
01 / 2011 Erteilung der Approbation

### Famulaturen/Hospitation

09 / 2004 – 10 / 2004 Krankenpflegepraktikum im Kinderkrankenhaus:  
Materno Infantil Germán Urquidi, Cochabamba,  
Bolivien  
02 / 2005 – 04 / 2005 Krankenpflegepraktikum Kinderkrankenhaus,  
Cochabamba, Bolivien; eigenes Projekt (aus eigenen  
Spendengeldern finanziert) zur Förderung der med.  
Versorgung  
07 / 2007 – 08 / 2007 Innere Medizin: St. Josefs-Krankenhaus Potsdam  
08 / 2007 – 09 / 2007 Innere Medizin: Kreiskrankenhaus Schmalkalden  
07 / 2008 – 08 / 2008 Gynäkologie: Praxis für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe, Potsdam  
04 / 2009 – 05 / 2009 Dermatologie: Asklepiosklinik St. Georg,  
Hamburg

**Univ. Wahlfach**

10 / 2006 – 12 / 2006

Gynäkologie und Geburtshilfe, Asklepiosklinik  
Altona, Hamburg**Praktisches Jahr**

08 / 2009 – 10 / 2009

**Unfallchirurgie:** UKE, Hamburg

10 / 2009 – 12 / 2009

**Chirurgie:** Hospital Alemán, Buenos Aires,  
Argentinien

12 / 2009 – 01 / 2010

**Gynäkologie & Geburtshilfe:**  
Marienkrankenhaus, Hamburg

02 / 2010 – 03 / 2010

**Gynäkologie & Geburtshilfe:** Hospital La Paz,  
Madrid

03 / 2010 – 08 / 2010

**Innere:** Hospital La Paz, Madrid**Außeruniversitäre Aktivitäten,  
Nebentätigkeiten**

09 / 2002 – 02 / 2003

Arbeit im Thalia Arthousekino Potsdam

10 / 2005 – 02 / 2006

Arbeit als studentische Hilfskraft in der Anatomie,  
PräpHiwi**Sprachen/****Auslandserfahrungen**

Deutsch: Muttersprache

Englisch: fließend

Spanisch: fließend

Französisch: Grundkenntnisse

1999

Brighton, England, Schulaustausch

02 / 2003 – 06 / 2003

Auslandsaufenthalt in Mexico und Guatemala,  
Verbesserung der Spanischkenntnisse

2004 / 2005

Bolivien, Famulaturen

2008

Sprachkurs Valencia, Spanien

2010

Buenos Aires, Argentinien, PJ-Tertial

2011

Madrid, Spanien, PJ-Tertiale

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Unterschrift: \_\_\_\_\_

Julia Maria Böhm