

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin

Institut für Neuroanatomie

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

Geschlechtsspezifische Aspekte der Spinogenese im Hippocampus

Dissertation

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

vorgelegt von:

Tobias Löffler
aus Schenefeld

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.08.2020**

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Gabriele Rune

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Matthias Kneussel

Inhalt

1. Einleitung	5
1.1 Hippocampus und Hippocampusformation	6
1.1.1 Makroskopie und Funktion	6
1.1.2 Histologie, Zytologie und neuronale Verschaltung	7
1.1.3 Synapsen und Spines	9
1.1.4 Beteiligung an pathologischen Prozessen.....	10
1.1.5 Thy-1-Tiermodell.....	11
1.2 Physiologische und biochemische Aspekte	12
1.2.1 Neurotransmitter Glutamat und seine Rezeptoren	12
1.2.2 Langzeitpotenzierung und -Depression.....	12
1.3 Sexualhormonelle Einflüsse und sexueller Dimorphismus	13
1.3.1 Weibliche Sexualhormone und ihr Regelkreis.....	13
1.3.2 Synaptogenese und synaptische Spines.....	14
1.3.3 Langzeitpotenzierung.....	15
1.3.4 Rezeptorexpression	15
1.3.5 Sexueller Dimorphismus	16
1.4 Fragestellung.....	17
2. Material	18
2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte	18
2.2 Software	20
2.3 Chemikalien.....	21
2.4 Antikörper.....	23
2.4.1 Immunhistochemie – Thy-1.....	23
2.4.2 Western-Blots	23
2.5 Lösungen.....	25
2.5.1 Immunhistochemie – Thy-1.....	25
2.5.2 Zellkulturen und Proteingewinnung	26
2.5.3 Elektrophorese und Western-Blots.....	28
3. Methoden	30
3.1 Spinedichtebestimmung	30
3.1.1 Tiere	30
3.1.2 Aufarbeitung und Immunhistochemie.....	30
3.1.3 Mikroskopie	31
3.1.4 Auswertung und Quantifizierung	32
3.1.5 Statistik.....	33
3.2 Glutamatrezeptorexpression.....	35

3.2.1 Tiere	35
3.2.2 Aufarbeitung	36
3.2.3 Elektrophorese und Western-Blots.....	37
3.2.4 Auswertung und Quantifizierung	37
3.2.5 Statistik.....	38
4. Ergebnisse	39
4.1 Spinedichte.....	39
4.1.1 Gesamtspinedichte im Vergleich <i>Männchen – Weibchen</i>	41
4.1.2 Dichte maturer Spines im Vergleich <i>Männchen – Weibchen</i>	41
4.1.3 Mature Spines apikal und basal im Vergleich <i>Männchen – Weibchen</i>	42
4.1.4 Prozentualer Anteil maturer Spines an der Gesamtspinedichte im Vergleich <i>Männchen – Weibchen</i>	43
4.1.5 Prozentualer Anteil maturer Spines an der Gesamtspinedichte apikal und basal im Vergleich <i>Männchen – Weibchen</i>	44
4.1.6 Dichte maturer Spines im Zyklusverlauf	45
4.1.7 Gesamtspinezahl im Vergleich <i>apikal – basal</i>	47
4.1.8 Anzahl maturer Spines im Vergleich <i>apikal – basal</i>	48
4.2 Rezeptorexpression.....	49
4.2.1 NMDAR1-Expression.....	50
4.2.2 NMDAR2A/B-Expression	53
4.2.3 GluR1-Expression.....	56
5. Diskussion.....	58
5.1 Mature dendritische Spines sind Teil des sexuellen Dimorphismus im Hippocampus.....	59
5.2 Spines werden zyklusabhängig von Neurosteroiden beeinflusst.....	61
5.3 Glutamatrezeptorexpression und Geschlechtsunterschiede der LTP-abhängigen synaptischen Plastizität.....	63
5.4 Das Thy-1-Modell als Ergänzung bisheriger Methodik	66
5.5 Spineuntersuchungen tragen zum Krankheitsverständnis bei.....	67
5.6 Ausblick.....	69
6. Zusammenfassung	71
7. Summary.....	72
8. Abkürzungsverzeichnis.....	73
9. Literatur- und Abbildungsverzeichnis.....	76
10. Danksagung	85
11. Lebenslauf.....	86
12. Eidesstattliche Erklärung	88

1. Einleitung

Die Bedeutung des Hippocampus für Lern- und Gedächtnisprozesse ist spätestens seit den eindrücklichen Berichten über die bilaterale mediale Temporallappenresektion am Patienten Henry M. bekannt (Scoville u. Milner 1957). Zunehmend werden diese Beobachtungen durch physiologische und morphologische Forschungserkenntnisse unterstützt: So scheint allen voran die Fähigkeit hippocampaler Neurone zur lebenslangen Anpassung, Neuordnung und gar Neubildung, in anderen Worten zu struktureller und funktioneller Plastizität, für die Gedächtnisbildung unabdingbar zu sein (Martin, Grimwood u. Morris 2000; Stuchlik 2014).

Einen wesentlichen Anteil dieser Plastizität hat dabei der ständige morphologische Wandel, dem die Synapsen, und insbesondere ihre postsynaptischen Anteile, die dendritischen Dornfortsätze oder Spines, unterliegen. Man spricht von *synaptischer* Plastizität (Frankfurt u. Luine 2015). Weiteren Anteil an der Plastizität hat die Fähigkeit des Hippocampus, in das bestehende neuronale Netzwerk fortwährend Neurone zu integrieren, die sich aus Stammzellen differenzieren (Frankfurt u. Luine 2015; Gu, Janoschka u. Ge 2012). Hier stellt der Hippocampus eine Ausnahme dar, da unter physiologischen Bedingungen in fast allen anderen Teilen des Hirns nach dessen Entwicklung die Neurogenese abgeschlossen ist (Ming u. Song 2011).

Der synaptischen Plastizität liegen funktionelle Mechanismen zu Grunde: Aktivitätsabhängig führt die Langzeitpotenzierung (LTP) bzw. Langzeitdepression (LTD) zur Stärkung oder Schwächung synaptischer Verbindungen (Ming u. Song 2011; Nicoll 2017). Entsprechend ändert sich auch die postsynaptische Expression der an der LTP beteiligten Rezeptoren von *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA) je nach synaptischer Aktivität (Derkach et al. 2007; Heynen et al. 2000).

Weiterhin etabliert ist, dass die Dichte und Morphologie von Synapsen und Spines hippocampaler Neurone von exogen (gonadal) und endogen (neuronal) produzierten Sexualhormonen abhängig ist (Gould et al. 1990; Kretz et al. 2004). Zudem spricht deren vom Geschlecht abhängige Morphologie und Anzahl für die Existenz eines sexuellen Dimorphismus synaptischer Entwicklung im Hippocampus, zumindest nach bisherigen *in-vitro*-Erkenntnissen (Brandt, Vierk u. Rune 2013; Vierk et al. 2012).

Gegenstand dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob sich diese bisher *in-vitro* gezeigten Geschlechtsunterschiede auch in adulten Mäusen, das heißt unter *in-vivo*-Bedingungen, zeigen und falls ja, ob sich dies auch bei der Expression der mit der Spinedichte assoziierten und an der LTP beteiligten Rezeptoren von NMDA und AMPA bemerkbar macht.

1.1 Hippocampus und Hippocampusformation

1.1.1 Makroskopie und Funktion

Zu unterscheiden sind zunächst die Begrifflichkeiten *Hippocampusformation* und *Hippocampus*, deren Abgrenzung in der Literatur nach wie vor unterschiedlichen Interpretationen unterliegt. Zur Hippocampusformation werden das Subiculum, das Cornu ammonis (Ammonshorn; Rindenband oder Hippocampus proprius) und der Gyrus dentatus, z.T. auch das Presubiculum, Parasubiculum und der entorhinale Cortex, gezählt. Die Bezeichnung Hippocampus entspricht je nach Literatur dem Cornu ammonis (CA), Cornu ammonis mitsamt Gyrus dentatus (DG) oder wird gar synonym zur Hippocampusformation genutzt (Amaral u. Lavenex 2006). Im Folgenden bezieht sich der Begriff Hippocampus auf das Cornu ammonis; abgrenzend von der Hippocampusformation, wenn von der (makroskopischen) Gesamtheit gesprochen wird.

Sowohl beim Menschen als auch bei den hier untersuchten Mäusen und Ratten bildet der Hippocampus den Hauptteil des entwicklungs geschichtlich betrachtet alten Archicortex. Lokalisiert ist er dabei an der medialen Seite des Temporallappens mit medialem Kontakt zum dritten Ventrikel (Kahle u. Frotscher 2013). Bei Nagern befindet sich die Hippocampusformation dorsal, lateral des Corpus callosum. Beim Menschen hingegen ist er weit nach ventral und medial gedrängt, was mit der Entwicklung der beim Menschen viel größeren Großhirnrinde erklärbar ist. Die C-förmige Ausbreitung von Cornu ammonis und Gyrus dentatus verläuft bei Ratten und Mäusen schräg von medial-rostrrodorsal nach lateral-caudoventral (S. Abb. 1 - A). Beim Menschen befindet sich die C-Form fast entlang einer sagittalen Achse von rostro-ventral (anterior) nach caudo-dorsal (posterior) (Amaral u. Lavenex 2006; Kahle u. Frotscher 2013).

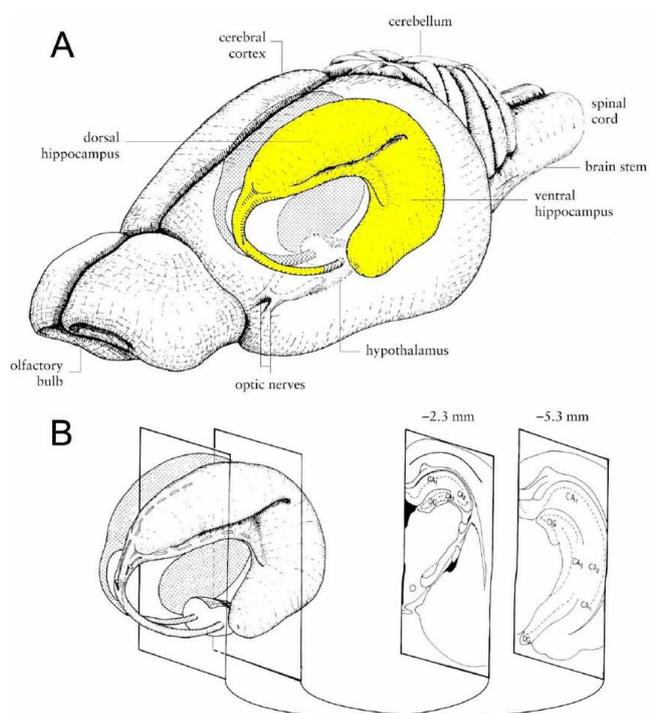


Abb. 1: Hippocampus der Ratte
(Witter u. Amaral, 2004)

Funktionell spielt die Hippocampusformation eine wesentliche Rolle für das explizite bzw. deklarative Wissensgedächtnis, d.h. bei der Übertragung von episodischen oder semantischen Informationen in das Langzeitgedächtnis (Pape 2009). Wird der Hippocampus beidseitig zerstört oder entfernt (Scoville u. Milner 1957), kommt es zu einer anterograden Amnesie, während ältere Gedächtnisinhalte noch abrufbar sind. Dies belegt die Eigenschaft der Hippocampusformation zur Langzeitgedächtnisbildung, während das eigentliche Speichern der Informationen im Neocortex erfolgt.

Die von Papez postulierte Rolle der Hippocampusformation als Teil eines für die Gedächtnisprozesse zuständigen Neuronenkreises (Papez 1937) weicht dabei zunehmend komplexeren Erklärungsversuchen. Dies gilt auch für das limbische System, an dem die Hippocampusformation ebenfalls beteiligt ist und das für basale Triebe und Emotionen verantwortlich sein soll (Catani, Dell'Acqua u. De Schotten 2013). Darüber hinaus ist der Hippocampus vor allem bei Tieren wichtig für die räumliche Erinnerung sowie Orientierung (Andersen et al. 2006).

Die Funktion des Hippocampus scheint sich dabei topographisch entlang der Ausrichtung der C-Form ventrol-dorsal (bei Nagern), bzw. anterior-posterior (Mensch) bestimmten Bereichen zuordnen zu lassen. Der ventrale bzw. anteriore Teil wird dabei emotionalen Prozessen, der dorsale bzw. posteriore Teil räumlich-kognitiven Prozessen zugeschrieben. Ob es jedoch umschriebene Regionen hierfür gibt oder sich die Funktionen eher unspezifisch entlang eines anatomischen Gradienten verteilen, bleibt Gegenstand der Forschung (Robinson, Barron u. Kirby 2015).

1.1.2 Histologie, Zytologie und neuronale Verschaltung

Betrachtet man den histologischen Querschnitt durch die Hippocampusformation, sieht man den fließenden Übergang der verschiedenen Abschnitte des Pyramidenzellbandes, welches sich in die Regionen CA1, CA2 und CA3 unterteilt (teilweise wird noch eine Region CA4 beschrieben). Über dem Hippocampus proprius liegt dicht angrenzend der Gyrus dentatus (Kahle u. Frotscher 2013).

Neurone (Körnerzellen im Gyrus dentatus und Pyramidenzellen in den CA-Regionen), Gliazellen sowie inhibitorische Interneurone bilden das zelluläre Gerüst der Hippocampusformation. Dabei finden sich in CA1 vor allem kleine Pyramidenzellen, in CA2 ein enger Verband größerer Pyramidenzellen und in CA3 wiederum bilden diese einen lockeren Verband (Kahle u. Frotscher 2013).

Fasereingänge, d.h. Afferenzen, erhält die Formation aus dem Neocortex und Riechhirn über die Regio entorhinalis sowie motorische, somatische, olfaktorische, visuelle und auditorische Signale aus dem Septum und Gyrus cinguli. Über die sogenannte trisynaptische Verschaltung (s. Abb. 2) werden die Signale im Hippocampus verarbeitet, um schließlich als Efferenz über den Fornix (sowie untergeordnet über die Stria longitudinalis) den Hippocampus Richtung Septum, Thalamus und Hypothalamus zu verlassen (Kahle u. Frotscher 2013).

Über den Tractus perforans erhalten die Körnerzellen des Gyrus dentatus afferenten Eingang aus dem entorhinalen Cortex; zudem kommunizieren einige Fasern des Tractus direkt mit den Dendriten der Pyramidenzellen. Die synaptische Information der Körnerzellen gelangt über Moosfasern indirekt ebenso ins Ammonshorn, jedoch lediglich zu den Dendriten in CA3. Die Axone der Pyramidenzellen bilden hiernach die Efferenzen und sammeln sich im Alveus,

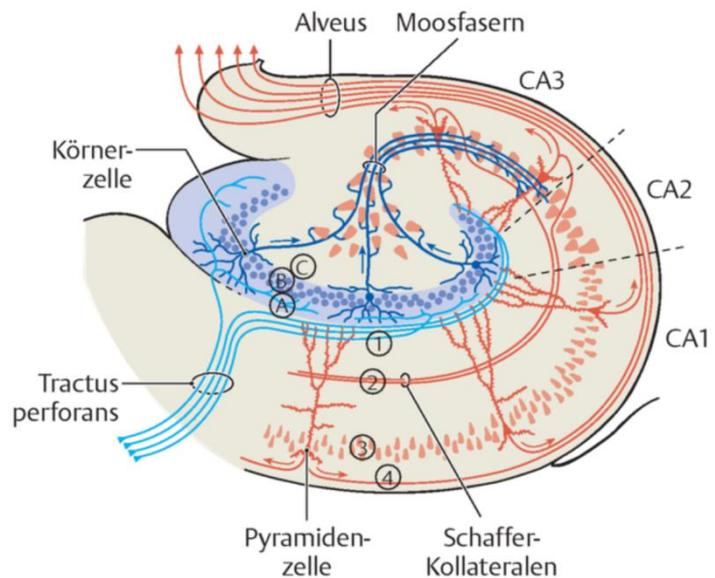


Abb. 2: Verschaltung hippocampaler Neurone
(Mensch, Aumüller et al. 2010)

um wiederum die Hippocampusformation über die Fimbria hippocampi Richtung Fornix zu verlassen. Einige Pyramidenzellaxone aus CA3 kommunizieren jedoch über die Schaffer-Kollaterale auch rückläufig mit Neuronen aus CA1 (Kahle u. Frotscher 2013).

Neurotransmitter der exzitatorischen Synapsen entlang dieser sogenannten trisynaptischen Verschaltung (s. Abb. 2) ist dabei Glutamat, das in präsynaptischen Vesikeln in den Boutons der Axone gespeichert ist und postsynaptisch unter anderem an AMPA- und NMDA-Rezeptoren bindet (S. 1.2).

1.1.3 Synapsen und Spines

Chemische Synapsen stellen im zentralen Nervensystem (ZNS) als interneuronale Schnittstellen einen wesentlichen Bestandteil der Signalübertragung dar. An der präsynaptischen (axonalen) Endigung werden aktionspotentialvermittelt Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt. Diese binden postsynaptisch an Membranrezeptoren und erzeugen wiederum ein elektrisches Signal in der Zielzelle.

Dendritische Dornenfortsätze oder Spines bilden an den meisten exzitatorischen Synapsen den postsynaptischen Partner, so auch in den Pyramidenzellen des Hippocampus. Dabei werden sie gemeinhin als Indikator der Synapsenplastizität gesehen; ihre Rolle in der Gedächtnisbildung und die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge (S. 1.2.) sind dabei seit Längerem bekannt (Hering u. Sheng 2001; Frankfurt u. Luine 2015).

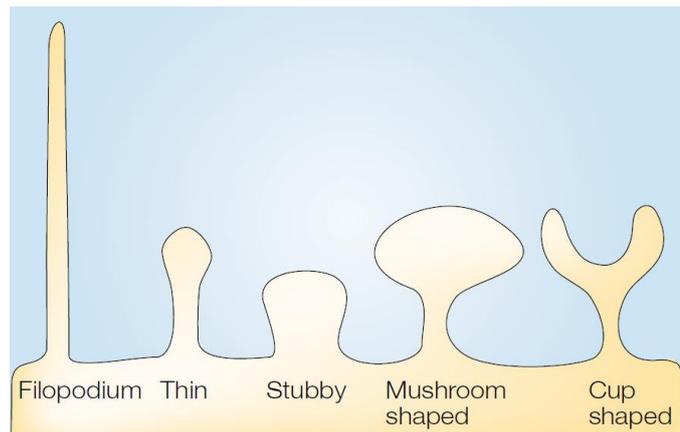


Abb. 3: Morphologische Klassifikation dendritischer Spines (Hering u. Sheng, 2001)

Die strukturell sehr inhomogenen Spines können morphologisch in verschiedene Klassen differenziert werden (s. Abb. 3). Wichtige Merkmale sind der Spinehals und, soweit ausgeprägt, das Spineköpfchen. Es wird unterschieden zwischen dünnen, stummeligen, sessilen und pilzförmige Spines, die jeweils eine Synapse tragen. Sogenannte tassenförmige Spines bilden Synapsen mit verschiedenen Axonen. Filopodien gelten als Vorläufer- oder Reservespines, die keine synaptische Aktivität aufweisen (Hering u. Sheng 2001).

Pyramidenzellen in CA1 des Hippocampus mit ihrem meist im oder nahe des Stratum pyramidale gelegenen Soma weisen apikal und basal einen konisch geformten Dendritenbaum auf. Die apikalen Dendriten erstrecken sich dabei über das Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare in Richtung Gyrus dentatus, die basalen Dendriten über das Stratum oriens Richtung Alveus. Dabei macht das Stratum basale ca. ein Drittel der totalen Länge, gemessen von Gyrus dentatus bis Alveus, aus (Spruston u. McBain 2006; Bannister u. Larkman 1995a).

Sowohl die apikalen als auch die basalen Dendriten sind dicht mit Dornfortsätzen besetzt. Trotz unterschiedlicher Untersuchungsmethoden findet sich in der Literatur bei Nagern meist eine Dichte von 2-3 Spines/ μm Dendritenlänge im Mittel, wobei sich je nach Entfernung vom Soma teils erhebliche Unterschiede bemerkbar machen (Spruston u. McBain 2006; Bannister u. Larkman 1995b; Murakami et al. 2006). Die beiden Dendritenbäume besitzen distinkte morphologische und funktionelle Unterschiede:

Apikal ist meist ein prominenter Stammdendrit zu beobachten, der basal nicht ausgeprägt ist (Spruston u. McBain 2006). Ebenfalls finden sich apikal mehr mature Spines/ μm als basal, während die Gesamtzahl von Spines/ μm Länge ungefähr gleich ist. Von der Gesamtzahl der Spines befinden sich ca. 40% basal, d.h. im Stratum oriens, 50% im apikalen Stratum radiatum und ca. 10% im apikalen Stratum lacunosum-moleculare (Murakami et al. 2006). Auch der synaptische Eingang ist unterschiedlich: Während beide Dendritenbäume Afferenzen aus CA3 erhalten, interagieren die Schaffer-Kollateralen ebenso wie die Moosfasern primär mit apikalen Dendriten (Spruston u. McBain 2006, Kahle u. Frotscher 2013, Spruston 2008).

Funktionell bedeutsam ist die Unterscheidung zwischen dünnen bzw. immaturren (unreifen) und pilzförmigen bzw. maturated (reifen) Spines. Im Folgenden werden entsprechend gängiger morphologisch-funktioneller Abgrenzungen immature Spines als solche mit einem Köpfchendurchmesser von $< 0,6 \mu\text{m}$ und mature Spines als solche mit einem Köpfchendurchmesser $\geq 0,6 \mu\text{m}$ definiert (Sorria u. Harris 2000).

Mature Spines sind stabil, persistieren teils über Monate, verfügen über mehr Glutamaterezeptoren und größere postsynaptische Dichten (PSD); immature Spines gelten als transient und funktionell schwächer. So werden mature Spines auch als „Gedächtnis“-Spines und immature Spines als „Lern“-Spines bezeichnet, wobei beide Formen aufgrund der synaptischen Plastizität aktivitätsabhängig in die jeweils andere übergehen können (Bourne u. Harris 2008; Holtmaat et al. 2005; Kasai et al. 2010; Tada u. Sheng 2006; Zuo et al. 2005).

1.1.4 Beteiligung an pathologischen Prozessen

Neben der bereits erwähnten anterograden Amnesie nach beidseitiger Zerstörung oder Entfernung des Hippocampus (Scoville u. Milner 1957), welche heutzutage nur noch unilateral als Ultima ratio bei der Behandlung von Epilepsie von Bedeutung ist (Engel et al. 2003), finden sich Veränderungen an der Hippocampusformation auch bei anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen, die aufgrund ihrer Prävalenz von enormer Bedeutung sind.

Hier scheint insbesondere eine intakte synaptische Plastizität von zentraler Wichtigkeit zu sein, sodass sich pathologische Veränderungen (auch) an einer gestörten Spinemorphologie bemerkbar machen (Penzes et al. 2011), wobei diese Veränderungen von einem physiologischen, altersbedingten Spine- und Synapsendichteverlust abgegrenzt werden müssen (Dickstein et al. 2013):

Bereits zu einem frühen klinischen Zeitpunkt, noch vor den pathognomonischen Charakteristika wie der Bildung von beta-Amyloid-Plaques, neurofibrillären Bündeln oder neuronalem Zelltod ist beim Morbus Alzheimer ein Untergang von Synapsen und Spines feststellbar (Selkoe 2002).

Ein anderes Beispiel stellt die Autismus-Spektrum-Störung dar, bei der es im Gegensatz zu neurodegenerativen Prozessen wie beim Morbus Alzheimer zu einer pathologisch erhöhten Spine- und Synapsendichte kommt; hypothetisiert wird eine lokal-neuronale Hyperkonnektivität, während zwischen übergeordneten Hirnregionen eine Hypokonnektivität besteht und es somit zu den typischen Symptomen kommt (Penzes et al. 2011).

1.1.5 Thy-1-Tiermodell

Neben diversen licht- und elektronenmikroskopischen Methoden, die zur morphologischen Erforschung des Hippocampus und seinen Strukturen genutzt werden, hat sich zur Betrachtung einzelner Neurone und ihrer Bestandteile das Thy-1-Tiermodell etabliert.

Thy-1 (CD 90) ist ein Oberflächenprotein (entsprechend seiner ursprünglichen Beschreibung in Lymphozyten des Thymus benannt), das in verschiedenen Neuronen, Gliazellen, sowie nicht-neuronalen Zellen, wie z.B. im lymphatischen Gewebe, exprimiert wird. Funktionell ist es erst ansatzweise verstanden; so spielt es als Regulatorkomplex eine Rolle z.B. beim axonalen Wachstum, der T-Zell-Aktivierung, der Zellstabilität und als Tumorsuppressorgen (Feng et al. 2000; Haeryfar u. Hoskin 2004).

In den genutzten transgenen Thy-1-Mäusen (Thy-1-GFP-M-Linie) wird nachgeschaltet eines modifizierten, neuronenspezifischen Promotors des Thy-1-Regulatorkomplexes die Sequenz des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP, beschrieben erstmals in Quallen der Gattung *Aequorea victoria* (Shimomura 2005)) in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) integriert. Entscheidend ist, dass es nur in einem Bruchteil der Neurone zu einer Expression von GFP kommt, sodass einzelne Pyramidenzellen abgegrenzt werden können und die Untersuchung ihrer Dendriten, bzw. Spines, lichtmikroskopisch möglich ist (Feng et al. 2000).

1.2 Physiologische und biochemische Aspekte

1.2.1 Neurotransmitter Glutamat und seine Rezeptoren

Glutaminsäure, bzw. ihre ionisierte Form, Glutamat, stellt einen wichtigen Vermittler des Exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) und damit der Auslösung von postsynaptischen Aktionspotentialen, dar. Axonal in synaptischen Vesikeln gespeichert, bindet es nach präsynaptischer, aktionspotentialvermittelter Freisetzung an post – oder präsynaptische Rezeptoren. Unterschieden werden dabei die ionotropen NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren sowie die metabotropen, G-Protein-gekoppelten mGlu-Rezeptoren (Müller-Esterl et al. 2010a).

Die im Folgenden näher untersuchten NMDA- und AMPA-Rezeptoren sind tetramere Ionenkanäle, wobei NMDA-Rezeptoren einen nicht-selektiven Kationeneinstrom erlauben, AMPA-Rezeptoren jedoch nur permeabel für Natrium- und Kalium-Ionen (bzw. z.T. auch Calcium) sind. Während beide Rezeptorkanäle ligandenabhängig sind, ist die Öffnung bei NMDA-Rezeptoren zusätzlich spannungsabhängig, da der Kanal bei normalem Ruhemembranpotential durch ein Magnesium-Ion (Mg^{2+}) blockiert ist. Nur durch starke afferente Reizung, d.h. Depolarisation der Postsynapse durch andere glutamatabhängige, non-NMDA-Rezeptoren, löst sich die Mg^{2+} -Blockade und ein Calciumeinstrom ist möglich (Müller-Esterl et al. 2010a, s. 1.2.2).

Beide Rezeptorkanäle besitzen eine Vielzahl von Subtypen, wobei die Nomenklatur inzwischen erneuert wurde: So wird nun bei AMPA von GluA1-GluA4 (zuvor GluR1-GluR4), bei NMDA von GluN1-GluN3B (zuvor NR1-NR3B) sowie GluK1-GluK5 (zuvor GluR5 – GluR6, sowie KA-1 und KA-2) bei Kainat gesprochen (Müller-Esterl et al. 2010a). In dieser Arbeit wird die konventionelle Nomenklatur genutzt.

1.2.2 Langzeitpotenzierung und -Depression

Den morphologisch erkennbaren Veränderungen der synaptischen Verbindungen und Spines, die für Lern- und Gedächtnisprozesse so entscheidend sind, wird molekular das Modell der Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP) und Langzeitdepression (long-term depression, LTD) zugrunde gelegt (Yuste u. Bonhoeffer 2001). Diese in verschiedenen kortikalen Arealen beobachteten Prozesse wurden im Hippocampus besonders gut untersucht, was nicht zuletzt am o.g. vergleichsweise einfachen Aufbau des Archicortex liegt (Kahle u. Frotscher 2013).

Nur eine gleichzeitige, starke Reizung (Aktionspotentiale von 10-100 Hz) mehrerer afferenter Fasern oder eine wiederholte hochfrequente Depolarisation führen über den Neurotransmitter Glutamat und non-NMDA-rezeptorvermittelt (vor allem AMPA-Rezeptoren) zur Abstoßung des Magnesium-Ions am NMDA-Rezeptorkanal und damit zum postsynaptischen Calcium-Einstrom. Dies hat zum einen die kurzfristige Folge, dass Ca²⁺-Calmodulin-Kinase II-vermittelt vermehrt AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran eingebaut werden, bzw. bestehende Kanäle sensibilisiert werden, und dadurch die Synapse kurzzeitig für wenige Stunden eine starke Depolarisation erfährt. Langfristig kommt es postsynaptisch, vermittelt durch das „cAMP response-element binding protein“ (CREB), zur vermehrten Proteinexpression; der ebenfalls postsynaptisch ausgeschüttete „Brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) führt zur verstärkten präsynaptischen Glutamatausschüttung. Somit kommt es insgesamt langanhaltend zu einer Vergrößerung der Amplitude des Exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) und damit zum selektiven Wachstum der Synapse (Müller-Esterl et al. 2010b).

Entgegengesetzt kommt es bei fehlender oder längerer asynchroner präsynaptischer Aktivität zur mGlu-vermittelten Phosphorylierung und Endozytose von AMPA-Rezeptoren, womit die EPSP-Amplitude dauerhaft reduziert werden kann (Müller-Esterl 2010b). Bereits Hebb hatte Ende der 1940er Jahre postuliert, dass wiederholt aktivierte Synapsen vergrößerten postsynaptischen Einfluss gewinnen (Hebb 1949). Alle bisher gewonnenen biochemischen und physiologischen Erkenntnisse über die LTP und LTD bestärken diesen bereits damals hypothetisierten Grundsatz der synaptischen Plastizität und damit des Lernprozesses.

1.3 Sexualhormonelle Einflüsse und sexueller Dimorphismus

1.3.1 Weibliche Sexualhormone und ihr Regelkreis

Estrogene bilden als weibliche Sexualhormone eine Untergruppe der Steroidhormone. Die Synthese von Estron und Estradiol aus Androstendion bzw. Testosteron wird von der Aromatase katalysiert. Bereits lange etabliert ist der hormonelle Regelkreis der Sexualhormone: Das hypothalamische „Gonadotropin-Releasing-Hormon“ (GnRH) stimuliert die Ausschüttung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) aus dem Vorderlappen der Hypophyse in den Blutkreislauf. Ihre Ausschüttung sorgt in den männlichen Gonaden für die LH-vermittelte Testosteronsynthese der Leydig-Zellen sowie FSH-vermittelt für die Spermienbildung (Müller-Esterl 2010c).

Im weiblichen Organismus entspricht dies FSH-vermittelt der Follikelreifung und Hormonsynthese (Theka- und Granulosazellen) und der LH-abhängigen Ovulation und Progesteronsynthese. Dabei unterliegt die Ausschüttung der Sexualhormone einem Zyklus, im männlichen Regelkreis hingegen einer pulsatilen GnRH-Sezernierung. Beide Regelkreise haben jedoch den negativen Rückkopplungsmechanismus gemein (Müller-Esterl 2010c).

1.3.2 Synaptogenese und synaptische Spines

Spätestens seit den 1990er Jahren gilt zudem der Einfluss von Sexualhormonen auf die hippocampale Synapsenbildung und die Dichte synaptischer Spines als gesichert. So konnten Gould und Kollegen zeigen, dass nach Gonadektomie und damit Entfallen von Estradiol und Progesteron aus der Blutzirkulation weibliche Ratten eine signifikant niedrigere Spinedichte in CA1 aufweisen als Tiere mit intakter gonadaler Funktion (Gould, Woolley u. Frankfurt 1990). Auch die Morphologie der Spines scheint in ovariektomierten Tieren verändert: So weisen diese weniger Spineköpfchen, sowie seltener mature Spineköpfchen auf. Durch artifiziellen Hormonersatz (sog. Wiederherstellungsversuch) zeigten sich diese Effekte reversibel (Gould, Woolley u. Frankfurt 1990). Bestätigt wurde dies durch die Feststellung, dass mit zyklusbedingter Schwankung von Sexualhormonen eine unterschiedlich hohe Spinedichte im Hippocampus einhergeht. So zeigte sich in der Phase des höchsten Serumestradiolspiegels, dem Proestrus, die Spinedichte ebenfalls am höchsten (Woolley, Gould u. Frankfurt 1990).

Nach Abfall des Serumestradiols auf seinen tiefsten Stand im Estrus war auch die Spinedichte am niedrigsten; im Diestrus als intermediäre Phase zeigten sich ebenso intermediäre Spinedichten. Insgesamt wurde eine Fluktuation von über 30% der absoluten Spinezahlen über den fünftägigen Zyklus der Ratte beobachtet, was eine bemerkenswerte Plastizität unterstreicht.

Neuere Untersuchungen zeigten zudem, dass hippocampale Pyramidenzellen mit allen für die Estradiolsynthese benötigten Enzymen ausgestattet sind (Pelletier 2010; Shibuya et al. 2003). Ebenso gelang der direkte Nachweis, dass sich dies auch in aktiven Prozessen widerspiegelt: Hippocampale Neurone synthetisieren und sezernieren selbst Estradiol (Prange-Kiel, Wehrenberg u. Jarry 2003). *In-vitro* konnte zudem gezeigt werden, dass dieses lokal produzierte Estradiol entscheidend für die Spinedichte hippocampaler Neurone ist: Wird die Aromatase als Schlüsselenzym der Estradiolsynthese mittels Letrozol gehemmt, kommt es in der Zellkultur bei Dendriten von aus Weibchen gewonnenen Neuronen zu einer signifikanten Abnahme der Spinedichte (Vierk et al. 2012). Somit offenbart sich neben dem Einfluss systemisch zirkulierender Sexualhormone auf die Spinedichte auch eine signifikante Abhängigkeit von lokal sezerniertem Estradiol.

Eine genaue Abgrenzung, welcher Anteil schlussendlich überwiegt, bleibt bei z.T. widersprüchlicher Studienlage Gegenstand weiterer Untersuchungen. Sicher ist, dass GnRH sowohl die Sexualhormonsynthese in den Gonaden als auch in den Pyramidenzellen stimuliert, und somit eine hormonelle Schlüsselrolle einnimmt (Prange-Kiehl et al. 2008). Wie dabei GnRH seine hippocampalen Rezeptoren erreicht, ist dabei noch nicht schlüssig dargelegt (Ferris, Tse u. Hamson 2015).

1.3.3 Langzeitpotenzierung

Zunehmend konnten die zuvor genannten morphologischen Feststellungen auch durch funktionelle Untersuchungen gestützt werden. Passend zur o.g. Zyklizität der Spinedichte zeigte sich korrelierend auch die in Schnittkulturen gemessene LTP zyklusabhängig (Warren, Humphreys u. Juraska 1995). In ovariectomierten Tieren zeigte sich nach Wiederherstellungsversuch ebenfalls eine LTP-Abhängigkeit (Montoya u. Carrer 1997), ebenso in Schnittkulturen von mit Estradiol behandelten Schnitten aus Männchen (Foy et al. 1999).

Schließlich konnten Vierk und Kollegen dies auch im direkten Geschlechtervergleich belegen und darüber hinaus die Rolle des exogenen (gonadalen) und endogenen (hippocampalen) Estradiols näher untersuchen: Die Inhibierung der Aromatase durch Letrozol reduzierte die Langzeitpotenzierung sowohl bei den Weibchen, bei den gonadektomierten Weibchen als auch bei den Männchen signifikant. Die alleinige Ovariectomie führte jedoch nicht zu einem signifikanten Verlust der EPSP-Amplitude. Dies lässt den Schluss zu, dass vor allem endogen synthetisierte Estrogene essenziell für die synaptische Plastizität in CA1 sind (Vierk et al. 2012).

1.3.4 Rezeptorexpression

Eine weitere Beziehung zwischen Struktur und Funktion zeigt die Feststellung, dass mature Spines eine signifikant höhere Dichte von AMPA-Rezeptoren aufweisen als dünne, immature Spines und Filopodien (Matsuzaki u. Ellis 2001). Dabei scheint die Rekrutierung der AMPA-Rezeptoren entsprechend des LTP-Modells direkt von der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren abhängig zu sein (Ultanir et al. 2007).

Auch bei der Rezeptorexpression ist etabliert, dass Sexualhormone einen signifikanten Einfluss auf deren Dichte an Spines haben. Hierbei sorgt Estradiol über eine Aktivierung der Estrogenrezeptoren ER α und ER β sowie des Plasmamembran-Estrogenrezeptors mER für eine Transkription zahlreicher Proteine der Biosynthese, des Zellwachstums,

der Synaptogenese, der Neuroprotektion und nicht zuletzt der an der LTP beteiligten Glutamatrezeptoren, insbesondere NMDAR (Aenlle et al. 2009; Bean, Janov u. Foster 2014). So zeigte der Wiederherstellungsversuch bei ovariectomierten Ratten, dass eine Estradiolsubstituierung die Zahl von NMDA-Bindestellen erhöht (Gazzaley, Weiland u. McEwen 1996; Woolley, Weiland u. McEwen 1997).

Dabei scheint die sexualhormongesteuerte Proliferation und Ausbildung von Spines vor allem von einer intakten NMDA-Rezeptorfunktion abhängig zu sein: Wird der NMDA-Rezeptor blockiert, kommt es in ovariectomierten Ratten trotz Estradiolsubstitution zu einer verminderten Spinedichte im Vergleich zu placebobehandelten Tieren. Wird hingegen der AMPA-Rezeptor antagonisiert, blieben ähnliche Effekte aus (Woolley u. McEwen 1994).

1.3.5 Sexueller Dimorphismus

Während sich zusammenfassend zahlreiche hormonelle Einflüsse auf die hippocampale Morphologie und Funktionalität nachweisen ließen, muss ebenso festgestellt werden, dass dies nicht für beide Geschlechter gleichermaßen gilt. Eine Aromatasehemmung bei Männchen sorgt im Gegensatz zu Weibchen zu keinem signifikanten Abfall der Spinedichte, obwohl beide Estradiol im Hippocampus synthetisieren können (Brandt, Vierk u. Rune 2013). *In-vitro* wiesen Dendriten von Neuronen aus primären dissoziierten Kulturen, die aus weiblichen Hippocampi stammen, einen höheren Anteil an maturaen Spines aus als solche aus männlichen Hippocampi (Vierk et al. 2012). Die Letrozolbehandlung führte im Männchen zu einer weit geringeren LTP-Minderung als im Weibchen (Vierk et al. 2012).

Somit ergeben sich aus den bisherigen, meist *in-vitro* gewonnenen Beobachtungen, zahlreiche Hinweise auf einen sexuellen Dimorphismus bezüglich Morphologie, Synaptogenese und Plastizität hippocampaler CA1-Neurone.

1.4 Fragestellung

Im Folgenden soll anhand zweier Aspekte untersucht werden, inwiefern sich bisher durch *in-vitro*-Versuche gewonnene Erkenntnisse bzgl. des sexuellen Dimorphismus auch durch *in-vivo*-Versuche bestätigen lassen:

1.) Anhand GFP-markierter Dendriten im Thy-1-Tiermodell soll die Spinedichte, insbesondere die Dichte maturer Spines, mittels konfokaler Mikroskopie an Gewebeschnitten unbehandelter, adulter Mäuse bestimmt und zwischen den Geschlechtern verglichen werden.

Es soll überprüft werden, ob sich eine im Schnitt höhere Dichte maturer Spines, korrelierend mit den von Vierk und Kollegen vorgelegten Zahlen (Vierk et al. 2012), zeigt und inwiefern sich die zyklusabhängige Expression von Spines auch in diesem Modell widerspiegelt und sich damit mit früheren Erkenntnissen, z.B. durch die Golgi-Färbungen von Gould und Woolley (Gould et al. 1990; Woolley, Gould u. Frankfurt 1990), deckt.

Zudem können die ermittelten Werte bzgl. der Spinezahl/ μm mit bisher bekannten Untersuchungen (Spruston u. McBain 2006; Bannister u. Larkman 1995b; Murakami, Tsurugizawa u. Hatanaka 2006) verglichen und etabliert werden, wo und ob sich das Thy-1-Modell in bisherige Ergebnisse einordnen lässt. Insbesondere sollen mögliche Unterschiede der Dichte maturer Spines zwischen basalem und apikalen Dendritenbaum beleuchtet werden.

2.) Analog zur Dichte maturer Spines soll als funktionelles Korrelat die Expression der an der LTP beteiligten Rezeptoren von AMPA und NMDA bei adulten und neugeborenen Mäusen zwischen den Geschlechtern verglichen werden.

Somit soll neben einem zeitlich punktuellen Ist-Vergleich adulter Tiere auch eine entwicklungsabhängige Betrachtung gewährleistet werden, um den zeitlichen Beginn eines möglichen sexuellen Dimorphismus in der embryonalen und postnatalen Neurogenese abzugrenzen. Zusätzlich sollen mögliche Expressionsunterschiede der Rezeptoren auch mittels aus embryonalen und perinatalen Ratten gewonnenen hippocampalen Primärneuronen (pränatal, E18, postpartum P0) betrachtet werden, um zu untersuchen, ob mögliche Unterschiede auch speziesübergreifend zu beobachten sind.

2. Material

2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

Produkt:	Hersteller:
Aluminiumfolie	Universal
Brutschrank „Serie WTC“	Binder
Deckgläser, 24mm x 46mm	Marienfeld
Einmalhandschuhe, Vinyl	Hartmann
Entwicklungskamera	Vilber Lourmat
Färbekästen nach Hellendahl (Küvetten)	Roth
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	Liebherr
Heidemannspatel	Aesculap
Instrumentenkasten	Merck
Insulinspritze (0,3 ml) mit Kanüle (0,3 mm)	BD Micro-Dine
Laser-Scanning-Mikroskop SP5 u. Zubehör	Leica GmbH
Kühlschrank, 4°C	Bosch/Liebherr
Kühlzentrifuge	Hettich
Laborflaschen, diverse	Schott
Magnetrührer	Heidolph
Magnetrührstäbchen, Standard	VWR
Micro Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Mikro-Dismembrator	Bertin
Neubauer-Zählkammer	Brand
Netzteil – Elektrophorese/Western-Blots	Life Technologies
Nitrozellulosemembran	Astorius-Stedim
Objektiv, 20-fache Vergrößerung	Zeiss
Objektiv, 63-facher Vergrößerung	Zeiss
Objekträger	Marienfeld
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25 cm	Merck
Petrischalen, diverse	Falcon
pH-Meter	Knick
Photometer	Eppendorf
Pinzette nach Dumont	Merck
Pinzette, fein und gebogen	FST
Pipetten, diverse	Eppendorf

Pipettenspitzen, diverse	Eppendorf
Pipette (elektronisch) „Pipetboy“	Integra Bioscience
Plastik-Einmalpipetten, 10ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße (Einmal), 1; 5; 50 ml	Eppendorf
Rüttler	Bühler
Vakuum-Anlage zum Mediumwechsel	Millipore
Schere	Aesculap
Sicherheitswerkbank Klasse 2 „LaminAir HVR 2472“	Heraeus
Skalpelle (Einweg), diverse	Braun
Stereomikroskop - binokular	Zeiss
Tischzentrifuge	Biozym
Vortexmischer „Genie 2“	Scientific Industries
Vibratom und Zubehör	Leica
Waage	Sartorius
Wasserbad mit Schüttler	GFC
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius
Western-Blot-System und Zubehör	Life Technologies
Zellkulturplatte – 6 und 24-Well	Sarstedt
Zellkratzer „Cell Scraper“	Greiner Bio-One
Zellsieb	Greiner Bio-One
Zellstofftücher	Wepa
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

2.2 Software

Fiji/Image J

National Institutes of Health (NIH), USA - Wayne Rasband
Version 1.52

IBM SPSS Statistics 22

IBM Corporation – Armonk, USA
Version 22.0.0.0

Leica Application Suite (LAS)

Leica Microsystems GmbH – Wetzlar, Deutschland
Version 3.4.0

Neurolucida 360

MicroBrightField Bioscience inc. – Williston, USA
Version 2.00.3

Neurolucida Explorer

MicroBrightField Bioscience inc. – Williston, USA
Version 2.00.3

Office 365

Microsoft Corporation – Redmond, USA
Version 1903

2.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Aqua destillata/ Aqua bidestillata	Wasseraufbereitungsanlage (Sartorius)
B27-Ergänzungsmedium	Gibco
Bromphenolblau (BPB)	Merck
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol
DAKO-Einbettungsmedium	Dako
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethanol (C ₂ H ₆ O, 96%)	J.T. Baker
Salzlösung nach Hank (HBSS)	Gibco
Immersionsöl	Zeiss
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Küvetten, Acryl 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
Laemmli-Probenpuffer	Bio-Rad
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Methanol (CH ₄ O)	J.T. Baker
Millipore-Substrat	Millipore
Molekulargewichtsmarker für SDS-Gele „Page Ruler All Blue“	Bio-Rad
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natrium-Desoxychlorat	Sigma-Aldrich
Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate - SDS)	Biomol
Neurobasal-Kulturmedium	Gibco
Nonylphenoethoxylat (NP40)	Calbiochem
Normales Ziegen Serum / Normal goat serum (NGS)	Sigma-Aldrich
Papain	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich

Phosstop	Roche
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Polysorbat 20 (Tween)	Merck
Ponceau-Rot	Merck
Proteaseinhibitor	Roche
Rotiphorese-Gel	Roth
Sterillium	Bode Chemie
Stickstoff	Apotheke UKE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Thimerosal	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trockeneis	TMG

2.4 Antikörper

2.4.1 Immunhistochemie – Thy-1

Primärantikörper:

Grün fluoreszierendes Protein (GFP):

Rabbit-Anti-GFP - ab 6556 – 0,5 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:2.500

Abcam Public Company – Cambridge, UK

Sekundärantikörper:

Goat-Anti-Rabbit - Alexa Fluor 488 – 2 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:500

Abcam Public Company – Cambridge, UK

2.4.2 Western-Blots

Primärantikörper:

NMDAR1:

Mouse-Anti-NMDAR1 – MAB363 – 4,18 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:500

Merck-Millipore – Billerica, USA

NMDAR2A/B:

Rabbit Anti-NMDAR2A/B - AB1548 – 0,1 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:500

Merck-Millipore – Billerica, USA

GluR1:

Mouse-Anti-GluA1 – 182011 – 1 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:750

Synaptic Systems – Göttingen, Deutschland

GAPDH:

Mouse-Anti-GAPDH, Clone 6C5 – AM4300 – 4 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:10.000

Thermo Fisher Scientific – Waltham, USA

Sekundärantikörper:

Goat-Anti-Mouse-IgG – G-21040 – 0,8 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:2500

Thermo Fisher Scientific – Waltham, USA

Donkey-Anti-Rabbit-IgG – A16023 – 0,8 mg/ml

Verdünnungsfaktor: 1:2500

Thermo Fisher Scientific – Waltham, USA

2.5 Lösungen

2.5.1 Immunhistochemie – Thy-1

1. 1x Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline - PBS)

8 g	Natriumchlorid	Roth 3957.1
0,2 g	Kaliumchlorid	Merck 1.04936
1,44 g	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck K 49142680726
0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck 1.04873
Ad 1.000 ml	Aqua bidestillata	
pH	einstellen auf 7,4	
Lagerung bei Raumtemperatur		

2. Paraformaldehydlösung (PFA) - 4%

20 g	PFA – Pulver	Sigma 158127
in 400 ml	Aqua bidestillata lösen	
Ad 500 ml	Aqua destillata	

3. Blockierungslösung:

8500 µl	1x PBS	
1 ml	10% Normal-Goat-Serum (NGS)	Abcam ab7481
500 µl	0,5% Triton X-100	Sigma T8787

4. Antikörperverdünnungslösung – Primärantikörper:

9200 µl	1x PBS	
300 µl	3% Normal-Goat-Serum (NGS)	Abcam ab7481
500 µl	0,5% Triton X-100	Sigma T8787

5. Antikörperverdünnungslösung – Sekundärantikörper:

9700 µl	1x PBS	
300 µl	3% Normal-Goat-Serum (NGS)	Abcam ab7481

2.5.2 Zellkulturen und Proteingewinnung

1. Salzlösung nach Hanks (Hank`s balanced salt solution – HBSS):

50 ml	10x HBSS	Gibco 14180-146
5,04 ml	HEPES	Sigma H3537
Ad 450 ml	Aqua destillata	
pH	einstellen auf 7,3	
Ad 500 ml	Aqua destillata	
steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C		

2. Trypsin-EDTA/HBSS:

2 ml	Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific R001100
Ad 10 ml	HBSS	

3. Neurobasal-Kulturmedium:

50 ml	Neurobasalmedium	Gibco 12349-015
500 µl	B 27	Gibco 17504-044
125 µl	L-Glutamin 200mM	Sigma G7513
500 µl	Penicillin/Streptomycin	Gibco 15140-122

4. Poly-L-Lysin zur Beschichtung der Zellkulturplatten:

6,183 g	Borsäure	Merck 1.00265.01
in 800 ml	Aqua destillata lösen	
pH	einstellen auf 8,5	
Ad 1000 ml	Aqua destillata	
steril filtrieren		
100 mg	Poly-L-Lysin darin lösen	Sigma P2636
Lagerung bei -20 °C		

5. Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline, TBS):

6,05 g	Tris	Sigma T1503
8,76 g	Natriumchlorid	Roth 3957.1
in 800 ml	Aqua destillata lösen	
pH	einstellen auf 7,6	
Ad 1000 ml	Aqua destillata	
Lagerung bei 4 °C		

6. Zell-Aufschlusspuffer:

500 µl	TBS, 10x	
600 µl	10% TX-100	Sigma T8787
200 µl	Proteaseschutz	Roche 11 697 498 001
50 µl	0,5 M EDTA	Merck 1.08435
500 µm	PhosStop 1:10	Roche 04 906 845 001
Ad 5 ml	Aqua destillata	

7. Radioimmunpräzipitationsassaypuffer (RIPA)

1,5 ml	Natriumchlorid 150mM	Roth 3957.1
2,5 ml	Tris 50 mM	Sigma T1503
5 ml	1% NP40	Calbiochem 492016
500 µl	0,1% SDS	Biomol 51430
2,5 ml	Natrium-Desoxychlorat	Sigma 30968
0,5 ml	EDTA	Merck 1.08435
ad 50 ml	Aqua destillata	

8. RIPA – Lysepuffer

1 Tabl.	Phosstop lösen in	Roche 04 906 845 001
1 ml	RIPA	

2.5.3 Elektrophorese und Western-Blots

1. Tris-Glycin-Puffer (Laemmli-Laufpuffer):

30,3 g	Tris	Sigma T1503
144,2 g	Glycin	Roth 3908.2
10 g	SDS	Biomol 51430
Ad 1000 ml	Aqua bidestillata	

2. 10% Ammoniumperoxiddisulfat (APS)

1 g	Ammoniumperoxiddisulfat in	Sigma A3678
10 ml	Aqua destillata lösen	

3. 10%- Natriumlaurylsulfat (sodium dodecal sulfate – SDS)

1 g	SDS in	Biomol 51430
10 ml	Aqua destillata lösen	

4. Western-Blot-Transferpuffer: 12,5 x Ausgangslösung

18,2 g	Tris	Sigma T1503
90 g	Glycin	Roth 3908.2
Ad 1000 ml	Aqua bidestillata	

5. Western-Blot-Transferpuffer

80 ml	12,5 x Ausgangspuffer (s.o.)	
200 ml	Methanol	J.T. Baker 8045
2 ml	10% SDS	Biomol 51430
Ad 1000 ml	Aqua bidestillata	

6. PBS-Tween

100 ml	1 x PBS	
3 ml	Tween	Merck 8.22184.0500
ad 1000ml	Aqua destillata	

7. 5%-Bovines Serumalbumin (BSA):

10 g	BSA lösen in	Biomol 01400
200 ml	PBS-Tween	
800 µm	10% Thimerosal	Sigma T5125

8. 8% Trenngel (2 Gele)

3,32 ml	Rotiphorese-Gel 30 (30%)	Roth 3029.1
2,5 ml	Lösung a), s.u.	
4,18 ml	Aqua destillata	
100 µl	10% APS	
20 µl	TEMED	Serva 35930.01

Lösung a)

36,3 g	Tris lösen in	Sigma T1503
8 ml	10% SDS und in	Biomol 51430
200 ml	Aqua destillata	

9. 8 % Sammelgel (2 Gele)

1,0 ml	Rotiphorese-Gel 30 (30%)	Roth 3029.1
2,5 ml	Lösung b), s.u.	
6,15 ml	Aqua destillata	
100 µl	10% APS	
20 µl	TEMED	Serva 35930.01

Lösung b)

6,0 g	Tris lösen in	Sigma T1503
4,0 ml	10% SDS und in	Biomol 51430
200 ml	Aqua destillata	

3. Methoden

3.1 Spinedichtebestimmung

3.1.1 Tiere

Insgesamt 8 adulte (acht Monate alte) Thy1-GFP-Mäuse (Thy-1-GFP-M-Linie, n = 4 männlich sowie n = 4 weiblich), zur Verfügung gestellt durch Prof. M. Frotscher (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg - ZNMH, Universität Hamburg), wurden für die immunhistochemische Aufarbeitung genutzt.

3.1.2 Aufarbeitung und Immunhistochemie

Die Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen, entsprechend den Qualitätsbestimmungen der Forschungstierhaltung (FTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE), gehalten und fanden Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum*. Nach Richtlinien der Tierschutzbeauftragten der FTH des UKE wurden die Mäuse sachgemäß betäubt (Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgemisch) und mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) getötet (vollständiges Erlöschen aller Vitalfunktionen und Schutzreflexe). Post-mortem wurden die Tiere mit eiskaltem PBS für fünf Minuten, gefolgt von 4%-Paraformaldehydlösung (PFA) für weitere fünf Minuten, linksventrikulär über den großen Körperkreislauf, perfundiert und die Gehirne im Ganzen entnommen. Post-mortem wurde ebenfalls der Zyklusstatus der weiblichen Tiere anhand der Zytologie vaginaler Abstriche mikroskopisch bestimmt (vgl. Byers et al. 2012).

Nach erneuter Postfixation mit 4%-PFA sowie anschließendem Spülen mit Phosphat-gepufferter-Salzlösung (PBS) wurden von den Gehirnen mittels Vibratom von rostral nach caudal coronare Schnitte mit Dicken von 50 µm angefertigt (schematisch dargestellt in Abb. 1 B).

Von jedem Tier wurden Schnitte aus einer vergleichbaren, zentral gelegenen Region des Hippocampus (ca. 5 mm ab rostral) ausgewählt und in freischwebender Immunhistochemie aufgearbeitet, um das bereits endogen vorhandene GFP-Signal noch besser visualisieren zu können:

Nach mehrmaligem kurzem Waschen mit PBS (3 x 5 Minuten) wurden die Schnitte für eine Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (s. 2.5.1) inkubiert. Hierauf erfolgte erneut kurzes Waschen mit PBS. Mit 1:2.500 in 3%-NGS/PBS/T-Lösung (s. 2.5.1) verdünntem Primärantikörper (s. 2.4.1) wurden die Schnitte bei 4°C und unter leichter Bewegung auf einem Rüttler über zwölf Stunden inkubiert.

Wiederum erfolgten mehrere kurze Waschvorgänge mit PBS und hiernach die Inkubation mit dem 1:500 in 3% NGS/PBS-Lösung (s. 2.5.1) verdünnten Sekundärantikörper für zwei Stunden (abgedunkelt unter erneuter Rotation). Nach letztmaligem Waschen wurden die Schnitte auf Objektträgern in Dako-Trägerlösung gebettet, mit Deckgläschen fixiert und fortan bei 4° C aufbewahrt.

3.1.3 Mikroskopie

Zur Bildgewinnung wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop vom Typ SP5 der Firma Leica genutzt. Bei 63-facher Vergrößerung mittels Öl-Immersionsobjektiv (Leica HCX PL APO 63x/1,40 Oil) und zusätzlichem 6-fachem Zoom wurden Dendritenabschnitte von Pyramidenzellen in CA1 der 2. und 3. Ordnung sowohl apikal (in einem Korridor 50-100 µm entfernt vom Soma) als auch basal (in einem Korridor von 25-75µm vom Soma) mit 2.024 x 512 Pixeln aufgenommen, was einer absoluten Größe von ca. 40 x 10 µm und einer Dendritenlänge von maximal 40 µm entsprach. Dabei entsprechen 40 µm einer in der Literatur gebräuchlichen Länge, um zu hohe Datenstreuungen zu minimieren, die sich bei zu kurzen Abschnitten ergeben könnten (Bannister u. Larkmann 1995b; Morley u. Mervis 2013).

Um eine dreidimensionale Beurteilung zu ermöglichen, wurden Z-Serien (Z-Abstand der Aufnahmen 0,13 µm; Voxel-Größe insgesamt 0,02 x 0,02 x 0,13 µm) erstellt. Übersichtsaufnahmen (s. Abb. 6) wurden mit 20-facher Vergrößerung (Öl-Objektiv Leica HCX PL APO CS 20x/0,7 IMM) und Z-Abständen von 0,63 µm aufgenommen.

Hierbei wurde die Wellenlänge des stimulierenden Lasers entsprechend des Sekundärantikörpers mit 488 nm gewählt, um grüne Fluoreszenz anzuregen. Die ausgesendeten Photonen wurden mit einem Photomultiplier (PTM) detektiert. Mit den gewählten Parametern konnte dabei unter Berücksichtigung der physikalisch-technischen Grenzen sowie sich zeigender Bleichungsprozesse nach zunehmender Laserexposition, die bestmögliche Auflösung für die spätere Quantifizierung erzielt werden.

3.1.4 Auswertung und Quantifizierung

Entsprechend der in 1.1.3 genannten Einteilung wurden mature Spines als solche mit einem Köpfchendurchmesser von $\geq 0,6 \mu\text{m}$ und immature Spines als solche mit einem Köpfchendurchmesser von $< 0,6 \mu\text{m}$ definiert. Pro Geschlecht wurde ein Minimum von 90 Zellen, mit jeweils 2-3 Dendritenabschnitten (mind. einem apikalen und einem basalen Abschnitt) aufgenommen. Hierfür wurden pro Tier jeweils zwei coronare Schnitte gewählt.

Die morphometrischen Bestimmungen wurden mittels Neurolucida 360 – Bildanalysesoftware durchgeführt, indem die Dendritenlänge sowie die Köpfchendurchmesser sämtlicher erfasster Spines pro Z-Serie gemessen und verzeichnet wurden (s. exemplarisch Abb. 4 und 5). Durch den Neurolucida-Explorer wurden die Messungen tabellarisch quantifiziert und abschließend in Excel zusammengefasst.

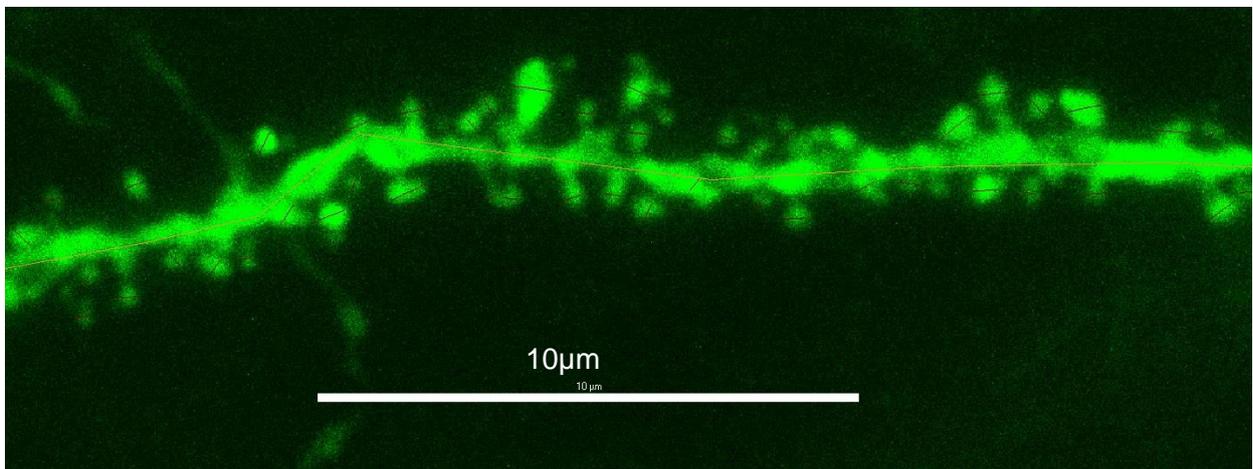


Abb. 4: Apikaler Dendrit, Leica SP5 GFP/Al488, 63-fache Vergrößerung, 6-facher Zoom

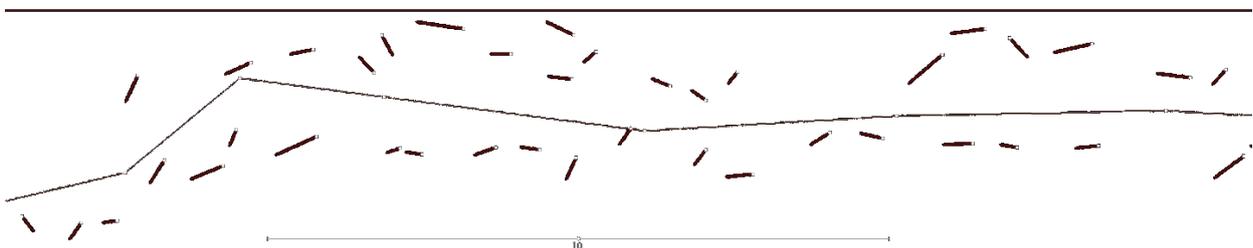


Abb. 5: Apikaler Dendrit, Leica SP5 GFP/Al488, 63-fache Vergrößerung, 6-facher Zoom - Softwareabstraktion

Hierbei wurden die Gesamtzahl der Spines (pro 40 μm und pro μm), die Zahl der immaturen und maturen Spines (pro 40 μm und pro μm) und der prozentuale Anteil der maturen Spines an der Gesamtzahl der Spines ermittelt; es erfolgte jeweils eine Subbetrachtung nach apikaler und basaler Lokalisation. Insgesamt wurden pro Geschlecht vier Tiere, mindestens 90 Zellen, 240 Dendritenabschnitte (jeweils 120 basal bzw. apikal), ca. 10.000 Spines sowie ca. 9.600 μm Gesamtdendritenlänge untersucht.

3.1.5 Statistik

Die Daten wurden jeweils in den in 3.1.4 genannten Kategorien über alle 4 Tiere pro Geschlecht zusammengeführt und auf Normalverteilung getestet. Anschließend wurden die Daten mittels gemischten Modells analysiert. Dies erfolgte mit der IBM SPSS – Statistiksoftware.

Dabei wurde ein Konfidenzniveau wie folgt festgelegt:

$p \leq 0.05$ (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, n.s. = nicht signifikant). In den Fehlerindikatoren sind jeweils entweder die Standardabweichung (SD) oder der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Als unabhängige Variablen wurden a) das Geschlecht (Männchen – Weibchen), b) die Lokalisation (basal – apikal) sowie als abhängige Variable c) die Spinemorphologie (immatur – matur) definiert.

Verglichen und auf geschlechtsabhängige (signifikante) Unterschiede untersucht wurden dabei die Gesamtspinezahlen, die Zahl maturer Spines und der prozentuale Anteil maturer Spines. Die zentralen Hypothesen wurden wie folgt aufgestellt:

H_0 : Die Anzahl maturer Spines weist keinen Geschlechtsunterschied auf.

H_1 : Die Anzahl maturer Spines ist bei den Weibchen höher als bei den Männchen.

Zur Gesamtspinezahl wurde hypothetisiert:

H_0 : Die Gesamtspinezahl weist keinen Geschlechtsunterschied auf.

H_1 : Die Gesamtspinezahl ist bei den Weibchen höher als bei den Männchen.

Weitergehend wurde untersucht, inwiefern sich die Spinedichte bzgl. der Lokalisation unterscheidet. Hierzu wurde folgende Hypothesen definiert:

a)

H_0 : Die Gesamtspinezahl weist keinen Unterschied zwischen apikalen und basalen Dendritenbaum auf.

H_1 : Die Gesamtspinezahl ist apikal höher als basal.

b)

H_0 : Die Anzahl maturer Spines weist keinen Unterschied zwischen apikalen und basalen Dendritenbaum auf.

H_1 : Die Anzahl maturer Spines ist apikal höher als basal.

3.2 Glutamatrezeptorexpression

3.2.1 Tiere

Die Bestimmung der Rezeptorexpression erfolgte mittels gelelektrophoretischer Proteinauftrennung, anschließender Proteinübertragung im Western-Blot-Verfahren und densometrischer, softwaregestützter Analyse der relevanten Proteinbanden. Genutzt wurden folgende Tiermodelle:

a) Mäuse

Proteine wurden gewonnen aus:

- dem Zellhomogenat präparierter Hippocampi adulter C57BL/6J-Mäuse (n= 6 Männchen sowie n= 8 Weibchen).
- dem Zellhomogenat präparierter Hippocampi postnataler P0-C57BL/6J-Mäuse (n= 10 Männchen sowie n= 8 Weibchen).

b) Ratten

Proteine wurden gewonnen aus:

- dem Zellhomogenat von Zellkulturen 21 Tage lang inkubierter hippocampaler Neurone aus embryonalen (E 18, n = 4 Kulturen, n = 36 Männchen, n = 34 Weibchen) sowie postnatalen (P0, n = 4 Kulturen, n = 35 Männchen, n = 36 Weibchen) Ratten der WISTAR-Linie.

c) Haltung und Tötung

Die adulten Mäuse sowie die Muttertiere der WISTAR-E18 und -P0-Ratten hatten dabei Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum* und wurden nach sachgemäßer Betäubung (s. 3.1.2) dekapitiert und damit getötet. Nach Dekapitation des Muttertieres wurden die embryonalen Ratten fachgerecht aus dem Uterus präpariert und sofort dekapitiert. Hiernach wurde das Gehirn im Ganzen entnommen und gleichzeitig das Geschlecht durch Aufsuchen der Hodenstränge, bzw. Ovarien, bestimmt. Analog wurde bei den P0-Tieren verfahren, die kurze Zeit nach Geburt dekapitiert wurden. Alle Tiere stammen aus den Linien der Eigenzucht der Forschungstierhaltung der Universität Hamburg.

3.2.2 Aufarbeitung

a) Adulte Mäuse:

Nach Präparation der Hippocampi unter mikroskopischer Kontrolle wurden diese in einem Mikro-Dismembrator in 150 µl RIPA-Puffer unter Zusatz eines Proteaseinhibitors (s. 2.5.2) homogenisiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 13.000 G und 4° C Temperatur für 30 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen, unmittelbar unter Verwendung von flüssigem Stickstoff gefroren und bei – 80 °C gelagert.

b) Neugeborene Mäuse:

Die ebenfalls unter mikroskopischer Kontrolle gewonnen Hippocampi der P0-Tiere für die direkte Gewinnung eines Zellhomogenats wurden in 150 µl RIPA-Puffer (s. 2.5.2), ergänzt durch einen Proteaseinhibitor, mechanisch mittels Pasteurpipette homogenisiert und bei 20.000 G und 4° C Temperatur für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gewonnen und für den späteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80° C aufbewahrt.

c) Zelldispersionskulturen aus embryonalen und neugeborenen Ratten

Die hippocampalen Neurone für die Zellkulturen wurden dabei nach Brewer (1997) aus embryonalen E18-, bzw. aus P0-Wistar-Ratten gewonnen:

Nach der Präparation der Hippocampi unter mikroskopischer Kontrolle werden diese in HBSS (bzw. Papain bei P0, s. 2.5.2) aufgenommen und anschließend mit Trypsin/EDTA/HBSS (s. 2.5.2) behandelt, um die Zellen chemisch aufzutrennen. Nach weiterer mechanischer Auftrennung mittels Pasteur-Pipette wurde die Zellsuspension mit einem 40 µm-Zellsieb von Debris befreit und ihre Konzentration mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat von 450.000 Zellen/ml- in Neurobasal-Kulturmedium in mit poly-L-Lysin beschichteten 6-Well Platten (s. 2.5.2) mit 2 ml pro Well.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und fünfprozentiger CO₂-Konzentration, nach einmaligem Kulturmediumwechsel eine Stunde nach Aussaat, für insgesamt 21 Tage im Brutschrank.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurden bei allen so gewonnen Proteinlysaten mittels Bradford-Proteinassay bestimmt. Hierbei wurde die Proteinkonzentration unter Vergleich einer Standardreihe (0; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10 µg/µl bovinem Serum-Albumin (BSA)) photometrisch bestimmt.

3.2.3 Elektrophorese und Western-Blots

Die im Homogenat enthaltenen Proteine wurden zunächst mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) mit 8%-Acrylamid-Gelen aufgetrennt. Dabei war das Verfahren für alle Altersstufen, Gewinnungsmethoden und beide Spezies gleich:

Die in der mit Laemmli-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer eingespannten 8%-Acrylamid-Gele (s. 2.5.3) wurden pro Laufspur mit 30 µg Probe (je nach Konzentration aufgefüllt mit Aqua-Dest. um mit jeweils 5 µl Laemmli-Probenpuffer versetzt, Gesamtmenge 25 µl), versehen. Zuvor wurde das Gemisch bei 95° C für 5 Minuten erhitzt und für kurze Zeit zentrifugiert. Zur späteren Einordnung der Größe der Proteinbande wurde auf einer der Laufspuren 5 µg Molekulargewichtsmarker für SDS-Gele („Page Ruler All Blue“, Bio-Rad) hinzugefügt. Unter 180 V Spannung wurde die Elektrophorese dann für ca. 1,5 Stunden bis zum Durchlaufen der Proben über die gesamte Höhe der Gele durchgeführt.

Im eigentlich Western-Blot-Verfahren wurden die Proteine anschließend über 2 h bei 40 V in der Westernblottkammer, gefüllt mit Transferpuffer (s. 2.5.3), auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Qualität der Übertragung, d.h. die Intaktheit aller relevanten Proteinbanden, wurde mittels abwaschbarer Ponceau-Rot-Färbung kontrolliert.

Nach einstündiger Behandlung in 3%-BSA wurden die Nitrozellulosemembranen mit dem Primäantikörper entsprechend des zu untersuchenden Rezeptors, gelöst in 5% BSA, für 12 h bei 4°C, inkubiert. Die Inkubation mit den Sekundäantikörpern erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.

3.2.4 Auswertung und Quantifizierung

Nach mehrmaligem Waschen mit PBS (3 x 5 min) wurden die auf den Nitrozellulosemembran befindlichen Proteinbanden mit Millipore-Agens (1 ml pro Membran) als lichtsensibles Detektionsmittel benetzt und sichtbar gemacht und mittels Entwicklungskammer und Software aufgenommen. Zur Bestimmung der auszuwertenden Proteinbanden wurde die aus der Literatur bekannte Größe der Rezeptoren (s. 4.2) mit dem jeweils übertragenem Molekulargewichtsmarker verglichen.

Quantifiziert wurden die aufgenommenen Proteinbanden im Densitometrieverfahren, softwaregestützt mit ImageJ/Fiji. Hierbei wurde zunächst jeder Blot separat betrachtet und die gemessenen Absolutwerte als prozentualer Anteil der Proteinexpression der Weibchen in Relation zu den Männchen dargestellt, über GAPDH als Ladekontrolle normiert und anschließend im Geschlechtervergleich betrachtet, wobei die Werte der Männchen als jeweilige Referenz mit 100% festgelegt wurden.

3.2.5 Statistik

Anschließend konnten die Daten aller Blots verglichen werden. Die prozentualen Verhältnisse der Weibchen wurden gemittelt (männliche Werte wurden als Referenz mit 100% festgelegt, s.o.) und der Unterschied der Mittelwerte durch Applikation eines Mann-Whitney-U-Tests hinsichtlich einer möglichen Signifikanz analysiert. Dies erfolgte mit der IBM SPSS – Statistiksoftware.

Dabei wurde ein Konfidenzniveau wie folgt festgelegt:

$p \leq 0.05$ (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, n.s. = nicht signifikant). In den Fehlerindikatoren sind jeweils die Standardabweichung (SD) oder der Standardfehler der Mittelwerte (Standard error of mean = SEM) angegeben. Unabhängige Variable war das Geschlecht (Männchen – Weibchen); abhängige Variable die Expression des jeweiligen Glutamatrezeptorsubtyps (NMDAR1, NMDAR2A/B, GluR1). Folgende Hypothesen wurde aufgestellt:

H_0 : Es gibt keinen Geschlechtsunterschied bei der Expression der Glutamatrezeptorsubtypen.

H_1 : Die Expression der Glutamatrezeptorsubtypen ist bei den Weibchen höher als bei den Männchen.

4. Ergebnisse

4.1 Spinedichte

Für die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung wurde die Spinedichte der Dendriten hippocampaler Pyramidenzellen mittels zuvor beschriebener Verfahren (s. 3.1) in CA1 *in-situ* in bestimmt. Im gewählten transgenen Mausmodell war die nur punktuell stattfindende Expression von GFP und damit Anfärbung neuronaler Zellen von besonderer Wichtigkeit, da somit eine individuelle Abgrenzbarkeit der Zellbestandteile möglich war, s. Übersicht in Abbildung 6. Untersucht wurde dabei ein möglicher sexueller Dimorphismus bezüglich

- der Gesamtspinedichte (s. 4.1.1),
- der Dichte maturer Spines; sowohl gemittelt über die gesamte Zelle (s. 4.1.2) als auch separat betrachtet für den apikalen und basalen Dendritenbaum (s. 4.1.3),
- des prozentualen Anteils der maturen Spines an der Gesamtspinezahl (s. 4.1.4); sowie ebenfalls separat nach apikal und basal analysiert (s. 4.1.5).

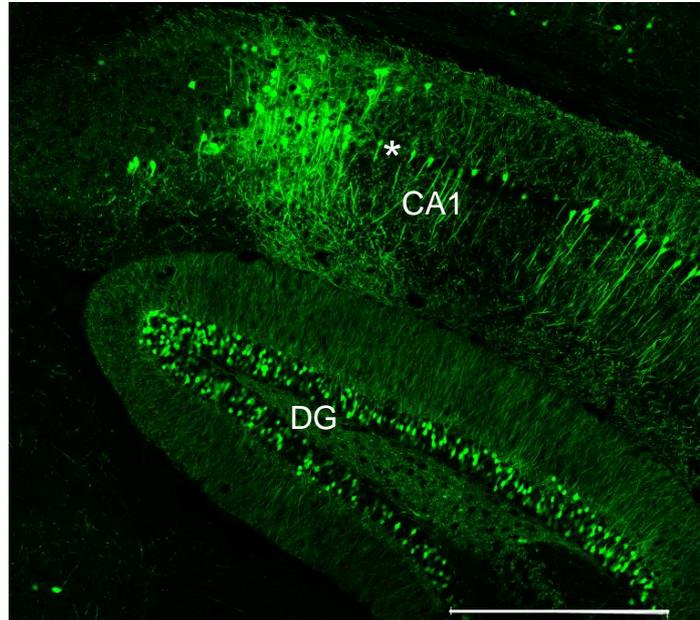


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Hippocampus einer Thy1-GFP-Maus (Anti-GFP Färbung, Leica SP5, GFP/AI488, 20-fach). Dargestellt sind der Gyrus dentatus (DG) und Cornu ammonis Region 1 (CA1) sowie die beispielhafte Lokalisation (*) des Somas eines GFP-exprimierenden Neurons (Maßstabsleiste \cong 500 μ m).

Anschließend wurde beleuchtet, inwiefern sich die bereits beschriebene (s. 1.3.2) Abhängigkeit der Spinedichte vom Zyklusstadium im untersuchten Thy-1-Modell *in-vivo* zeigt (s. 4.1.6). Zudem wurden mögliche Unterschiede der Spinedichte zwischen apikalen und basalen Dendriten untersucht. Auch hier fand eine Differenzierung zwischen der Gesamtspinedichte (s. 4.1.7) und der Dichte mature Spines (jeweils pro Geschlecht betrachtet) statt (s. 4.1.8).

Der Gesamterhebungsumfang für die in 4.1.1 – 4.1.8 gezeigten Ergebnisse betrug pro Geschlecht $n = 4$ Tiere mit jeweils mindestens 90 Zellen, 240 Dendritensegmenten und ca. 10.000 Spines. Die Daten der Gesamtspinezahl waren normalverteilt, die Daten der matura Spines waren nichtparametrisch, sodass vor weiterer statistischer Untersuchung im gemischten Modell eine In-Transformation durchgeführt wurde.

4.1.1 Gesamtspinedichte im Vergleich

Männchen – Weibchen

Wie Abbildung 7 verdeutlicht, zeigte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung keinen signifikanten Unterschied der Gesamtzahl der Spines pro 40 μm /Dendritenlänge (Werte gemittelt für $n = 4$ Männchen und $n = 4$ Weibchen, jeweils 90 Zellen, 240 Dendritenabschnitte und ca. 10.000 Spines) zwischen den Geschlechtern nicht signifikant. So betrug sie im Männchen $85,489 \pm 0,882$ (SD) und im Weibchen $87,290 \pm 0,882$ (SD) Spines pro 40 μm /Dendritenlänge ($p = 0,173$).

Berechnet auf die in der Literatur (s. 1.1.3) vorherrschende Angabe in μm /Dendritenlänge entspräche dies bei den Männchen $2,14 (\pm 0,022$ (SD)) und bei den Weibchen $2,14 (\pm 0,022$ (SD)) Spines pro μm .

4.1.2 Dichte maturer Spines im Vergleich

Männchen – Weibchen

Betrachtet man hingegen die nähere morphologische Klassifikation der Spines (matur $\geq 0,6 \mu\text{m}$ Köpfchendurchmesser, immatur $< 0,6 \mu\text{m}$, s. 1.2.1), ergibt sich ein klarer sexueller Dimorphismus (s. Abbildung 8). So betrug die Anzahl maturer Spines pro 40 μm /Dendritenlänge (Werte gemittelt für $n = 4$ Männchen und $n = 4$ Weibchen, jeweils 90 Zellen, 240 Dendritenabschnitte und ca. 10.000 Spines) aller Tiere $6,844 \pm 0,226$ (SD) bei den Männchen und $8,251 \pm 0,226$ (SD) bei den Weibchen, was einen signifikanten Unterschied bedeutet ($p \leq 0,0001$).

Pro μm /Dendritenlänge entspräche dies $0,171 \pm 0,006$ (SD) maturen Spines bei den Männchen und $0,206 \pm 0,006$ (SD) bei den Weibchen.

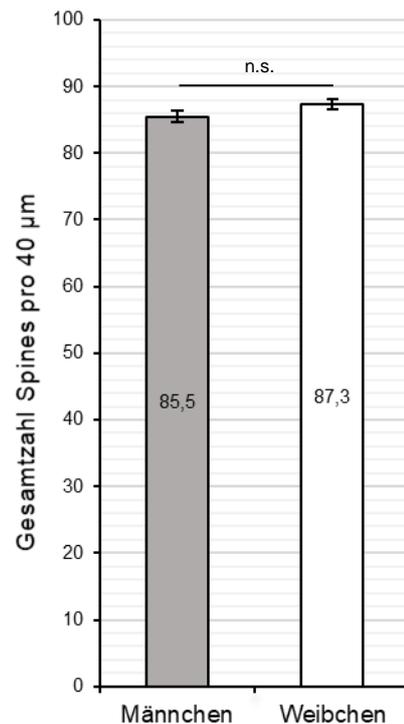


Abb. 7: Gesamtspinezahl pro 40 μm /Dendritenlänge im Vergleich Männchen – Weibchen ($p = 0,173$; Fehlerbalken \triangleq SD)

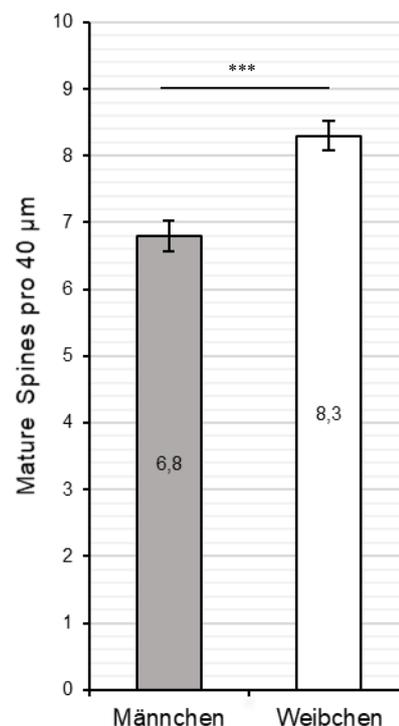


Abb. 8: Dichte maturer Spines pro 40 μm /Dendritenlänge im Vergleich Männchen – Weibchen ($p \leq 0,0001$; Fehlerbalken \triangleq SD)

4.1.3 Mature Spines apikal und basal im Vergleich *Männchen – Weibchen*

Der in 4.1.2 dargestellte signifikante Unterschied der Anzahl maturer Spines pro Abschnitt/Dendritenlänge zeigt sich auch bei näherer Betrachtung der zwei Dendritenbäume, d.h. basal und apikal (Werte gemittelt für $n = 4$ Männchen und $n = 4$ Weibchen, jeweils 90 Zellen, 120 Dendritenabschnitte und ca. 5.000 Spines basal bzw. apikal).

So beträgt die Zahl maturer Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge an apikalen Dendriten $9,076 \pm 0,32$ (SD) bei den Männchen und $10,433 \pm 0,32$ (SD) bei den Weibchen (s. Abbildung 9). Dies entspricht einem signifikanten Unterschied ($p = 0,001$).

Bei den basalen Dendriten (s. Abbildung 10) finden sich $4,611 \pm 0,32$ (SD) mature Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge bei den Männchen, und bei den Weibchen $6,069 \pm 0,32$ (SD), was einen ebenfalls signifikanten Unterschied ausmacht ($p = 0,001$).

Es fällt auf, dass die Zahl der maturen Spines am basalen Dendritenbaum sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen weit kleiner als apikal ist, s. hierzu 4.1.6 zur näheren Darstellung.

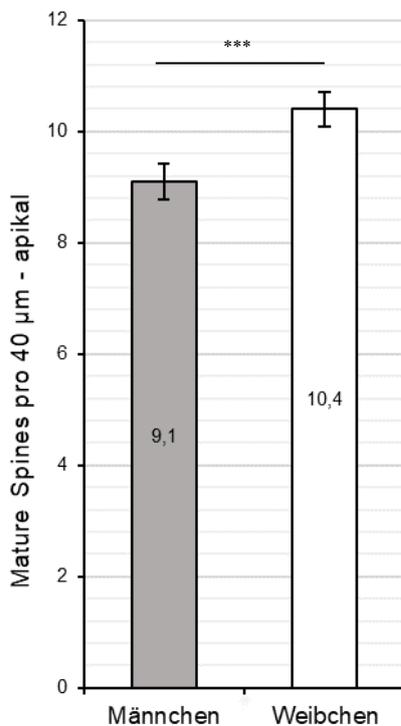


Abb. 9: Apikale Dichte maturer Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge im Vergleich Männchen - Weibchen ($p = 0,001$; Fehlerbalken \triangleq SD)

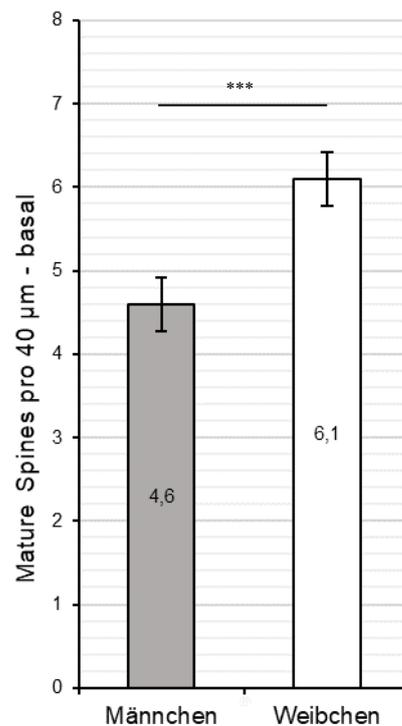


Abb. 10: Basale Dichte maturer Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge im Vergleich Männchen - Weibchen ($p = 0,001$; Fehlerbalken \triangleq SD)

4.1.4 Prozentualer Anteil maturer Spines an der Gesamtspinedichte im Vergleich Männchen – Weibchen

Aus den zuvor gesehenen signifikanten Unterschieden der Anzahl maturer Spines pro Längenabschnitt und der in 4.1.1 festgestellten nahezu gleichen Gesamtspineanzahl ergibt sich zwangsläufig, dass der prozentuale Anteil der maturaen Spines an der Gesamtzahl ebenso Unterschiede im Geschlechtsvergleich aufweisen muss.

In Abbildung 11 zeigt sich, dass die maturaen Spines im Männchen (Werte gemittelt für $n = 4$ Männchen und $n = 4$ Weibchen, jeweils 90 Zellen, 240 Dendritenabschnitte und ca. 10.000 Spines) $7,91\% \pm 0,31$ (SEM) an der Gesamtzahl der Spines ausmachen, im Weibchen jedoch $9,51\% \pm 0,39$ (SEM), was einem signifikanten Unterschied entspricht ($p = 0,0002$).

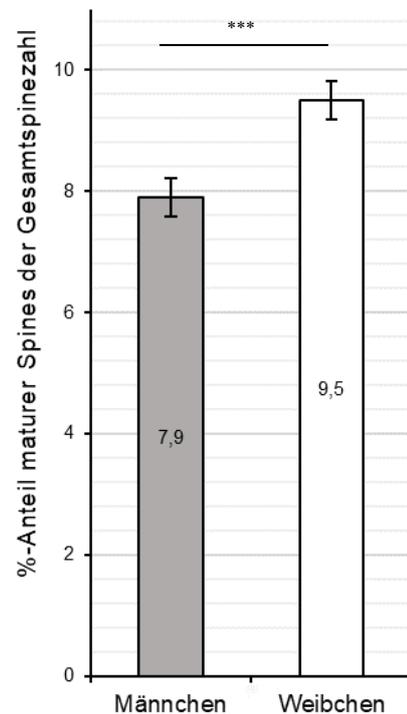


Abb. 11: Prozentualer Anteil maturer Spines der Gesamtspinezahl im Vergleich Männchen – Weibchen ($p = 0,0002$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

4.1.5 Prozentualer Anteil maturer Spines an der Gesamtspinedichte apikal und basal im Vergleich *Männchen – Weibchen*

Die in 4.1.4 betrachteten prozentualen Anteile können ebenfalls nach Lokalisation (basal oder apikal) unterschieden werden (Werte gemittelt für $n = 4$ Männchen und $n = 4$ Weibchen, jeweils 90 Zellen, 120 Dendritenabschnitte und ca. 5.000 Spines basal bzw. apikal).

Bei den Weibchen beträgt der Prozentsatz maturer Spines apikal (s. Abbildung 12) mit $11,92\% \pm 0,43$ (SEM) signifikant ($p = 0,007$) mehr als bei den Männchen $10,29\% \pm 0,40$ (SEM).

Auch basal (s. Abbildung 13) macht der Anteil maturer Spines an der Gesamtzahl im Männchen mit $5,53\% \pm 0,31$ (SEM) signifikant weniger ($p = 0,0003$) aus als im Weibchen mit $7,11\% \pm 0,29$ (SEM).

Wiederum ist der Unterschied zwischen den beiden Dendritenbäumen klar ersichtlich, während bei beiden Geschlechtern die matura Spines apikal mehr als ein Zehntel der Gesamtspinedichte ausmachen, sind dies in den basalen Dendriten nur etwas mehr als ein Zwanzigstel (s. 4.1.6 u. 4.1.7 für den direkten Vergleich zwischen basal und apikal).

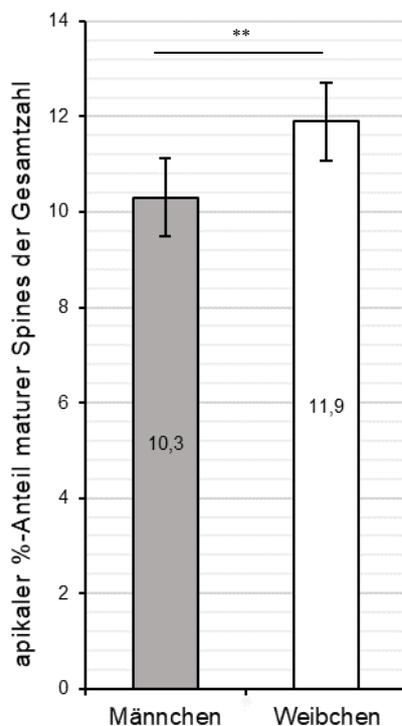


Abb. 12: Apikaler prozentualer Anteil maturer Spines der Gesamtspinezahl im Vergleich Männchen – Weibchen ($p = 0,007$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

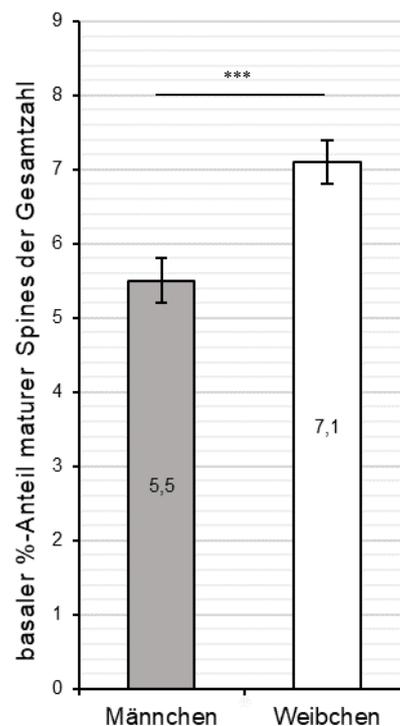


Abb. 13: Basaler prozentualer Anteil maturer Spines der Gesamtspinezahl im Vergleich Männchen – Weibchen ($p = 0,0003$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

4.1.6 Dichte maturer Spines im Zyklusverlauf

Wie bereits einleitend ausgeführt, ändert sich die Spinedichte bei weiblichen Tieren entsprechend des Zyklusverlaufs (S. 1.3.2). Um mögliche Effekte auch im vorliegenden Thy-1-Modell in situ zu untersuchen, wurde das Zyklusstadium der weiblichen Tiere nach Dekapitation (s. 3.1.2) bestimmt. Es zeigte sich, dass sich alle Weibchen in unterschiedlichen Abschnitten befanden.

Betrachtet man die Zahl maturer Spines nicht wie bisher im Mittel über alle Tiere, sondern im Zyklusverlauf pro Individuum, bestätigen sich die aus der Literatur bekannten Unterschiede. So wies das Weibchen im späten Diestrus mit 9,7 matura Spines pro 40 μm /Dendritenlänge die mit Abstand höchste Zahl auf, im Proestrus zeigte sich mit 8,2 die zweithöchste Zahl. Im Estrus waren es noch 8 matura Spines pro 40 μm /Dendritenlänge, im Metestrus nur noch 7,2. Somit entspricht die Spinezahl der Schwankung der Serum-Estradiolkonzentration (vgl. Abb. 14).

Tabelle 1, Abschnitt 1 zeigt dies in zusammengefasster Form. Abschnitte 2 und 3 zeigen, dass diese Beobachtung auch für die separate Betrachtung der apikalen und basalen Dendriten gilt.

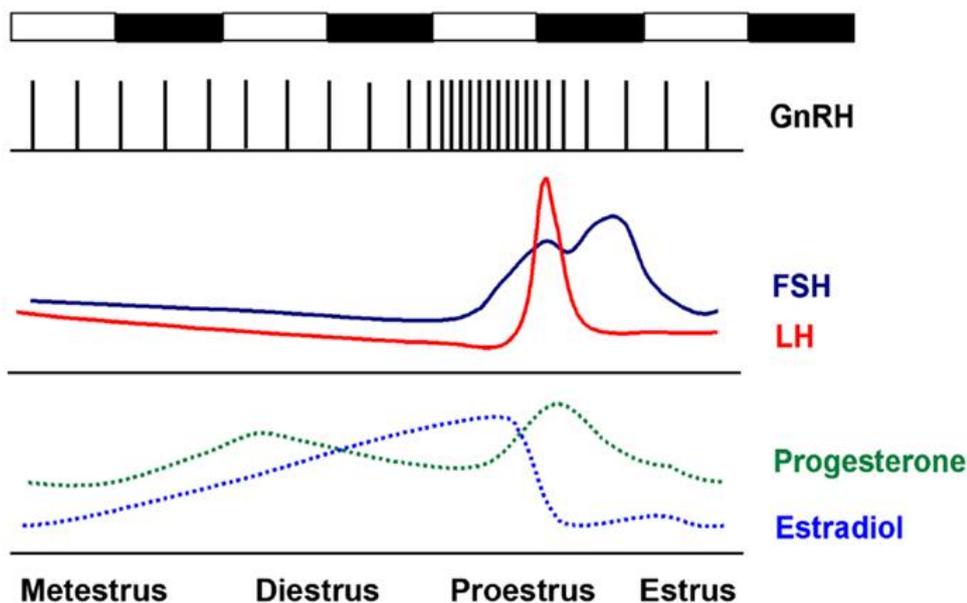


Abb. 14: Schematische Darstellung der Sexualhormonkonzentrationen im Verlauf des Zyklus der Ratte (adaptiert nach Miller u. Takahashi, 2014)

	Geschlecht	Zyklusstadium	Dichte maturer Spines pro 40µm Dendritenabschnitt ± SD (N = Abschnitte)
Abschnitt 1	Männchen (n = 4)	(Referenz)	6.8 ± 4.3 (N = 240)
	Weibchen (n = 1)	Metestrus	7.2 ± 4.3 (N = 60)
	Weibchen (n = 1)	Später Diestrus	9.7 ± 3.7 (N = 60)
	Weibchen (n = 1)	Proestrus	8 ± 3.7 (N = 60)
	Weibchen (n = 1)	Estrus	8.2 ± 3.7 (N = 60)
			Apikale Dichte maturer Spines pro 40µm Dendritenabschnitt ± SD (N = Abschnitte)
Abschnitt 2	Männchen (n = 4)	(Referenz)	9.1 ± 4.3 (N = 120)
	Weibchen (n = 1)	Metestrus	9.2 ± 4.6 (N = 30)
	Weibchen (n = 1)	Später Diestrus	11.4 ± 3.3 (N = 30)
	Weibchen (n = 1)	Proestrus	10.4 ± 3.4 (N = 30)
	Weibchen (n = 1)	Estrus	10.6 ± 3.54 (N = 30)
			Basale Dichte maturer Spines pro 40µm Dendritenabschnitt ± SD (N = Abschnitte)
Abschnitt 3	Männchen (n = 4)	(Referenz)	4.6 ± 3 (N = 120)
	Weibchen (n = 1)	Metestrus	5.1 ± 2.6 (N = 30)
	Weibchen (n = 1)	Später Diestrus	7.9 ± 3.1 (N = 30)
	Weibchen (n = 1)	Proestrus	5.5 ± 1.9 (N = 30)
	Weibchen (n = 1)	Estrus	5.7 ± 1.8 (N = 30)

Tabelle 1: Dichte maturer Spines im Zyklusverlauf: Abschnittsweise verglichen jeweils Männchen (Referenz) mit den Stadien Metestrus, später Diestrus, Proestrus, Estrus. Abschnitt 1: Dichte maturer Spines gemittelt über beide Dendritenbäume. Abschnitt 2: Dichte maturer Spines des apikalen Dendritenbaums. Abschnitt 3: Dichte maturer Spines des basalen Dendritenbaums.

4.1.7 Gesamtspinezahl im Vergleich *apikal* – *basal*

Analysiert man die Spinezahl nicht in Bezug auf das Geschlecht, sondern im Vergleich apikal zu basal, so lässt sich feststellen, dass sich die Gesamtzahl der Spines zwischen apikalen und basalen Dendriten (Werte geschlechtsübergreifend gemittelt, jeweils 180 Zellen, 240 Dendritenabschnitte und ca. 10.000 Spines basal bzw. apikal) signifikant ($p = 0,003$) unterscheidet (s. Abb. 16). Im Schnitt weisen apikale Dendriten $88,20 \pm 1,247$ (SD) Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge auf, basale hingegen $84,48 \pm 1,247$ (SD).

Eine separate Betrachtung der Geschlechtergruppen bestätigt diesen signifikanten Unterschied bei den Männchen (s. Abb. 17, Werte gemittelt für $n = 4$ Männchen, jeweils 90 Zellen, 120 Dendritenabschnitte und ca. 5000 Spines basal bzw. apikal): Diese weisen $82,82 \pm 1,247$ (SD) Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge basal und $88,16 \pm 1,247$ (SD) Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge apikal auf ($p = 0,003$).

Bei den Weibchen (s. Abb. 18, Werte gemittelt für $n = 4$ Weibchen, jeweils 90 Zellen, 120 Dendritenabschnitte und ca. 5000 Spines basal bzw. apikal) ist der Unterschied mit $86,14 \pm 1,247$ (SD) Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge basal und $88,24 \pm 1,247$ (SD) Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge apikal nicht signifikant ($p = 0,234$).

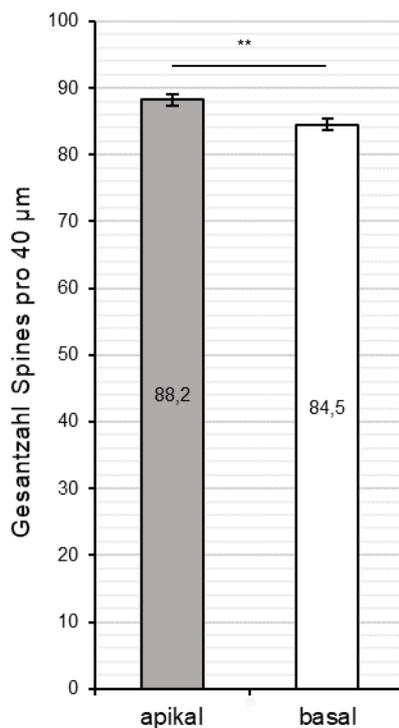


Abb. 15: Gesamtspinezahl pro $40 \mu\text{m}$ Dendritenlänge im Vergleich apikal – basal ($p = 0,003$; Fehlerbalken \triangleq SD)

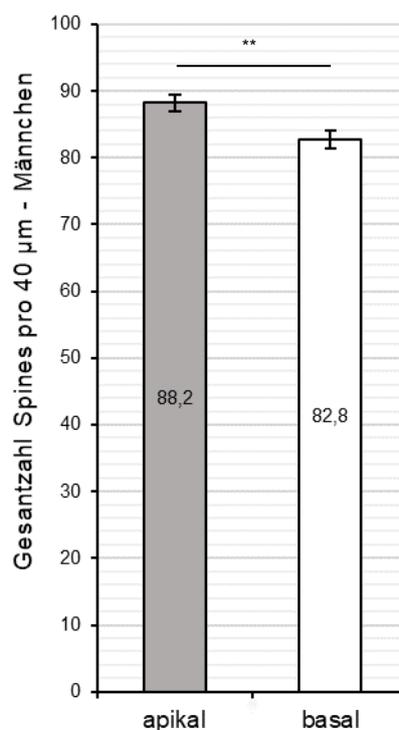


Abb. 16: Gesamtspinezahl pro $40 \mu\text{m}$ Dendritenlänge im Vergleich apikal – basal (Männchen) ($p = 0,003$; Fehlerbalken \triangleq SD)

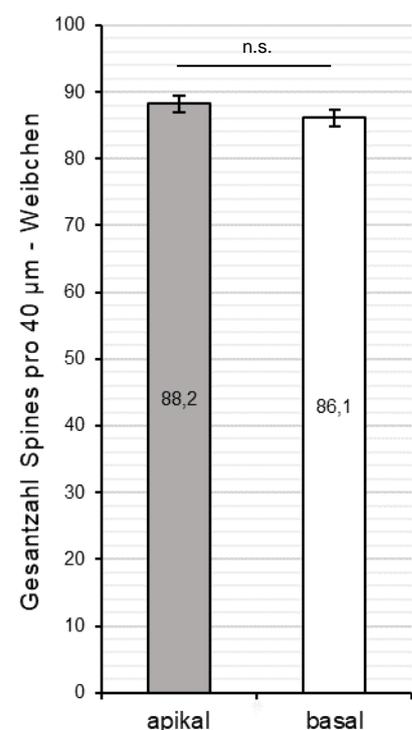


Abb. 17: Gesamtspinezahl pro $40 \mu\text{m}$ Dendritenlänge im Vergleich apikal – basal (Weibchen) ($p = 0,234$; Fehlerbalken \triangleq SD)

4.1.8 Anzahl maturer Spines im Vergleich *apikal* – *basal*

Betrachtet man wiederum die Anzahl der matura Spines separat, ergeben sich auch hier klare Verteilungsunterschiede zwischen den apikalen und basalen Dendriten: Geschlechtsübergreifend (s. Abb. 18, Werte geschlechtsübergreifend gemittelt, jeweils 180 Zellen, 240 Dendritenabschnitte und ca. 10.000 Spines basal bzw. apikal) besitzen apikale Dendriten mit $9,76 \pm 0,227$ (SD) matura Spines signifikant mehr als basal mit $5,32 \pm 0,189$ (SD) matura Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenabschnitt ($p \leq 0,0001$).

Im Männchen (s. Abb. 19, Werte gemittelt für $n = 4$ Männchen, jeweils 90 Zellen, 120 Dendritenabschnitte und ca. 5000 Spines basal bzw. apikal) beträgt die Zahl matura Spines apikal mit $9,08 \pm 0,321$ (SD) fast doppelt so viel wie basal mit $4,59 \pm 0,321$ (SD) Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge und ist damit signifikant höher ($p = 0,003$).

Im Weibchen (s. Abbildung 20, Werte gemittelt für $n = 4$ Weibchen, jeweils 90 Zellen, 120 Dendritenabschnitte und ca. 5000 Spines basal bzw. apikal) finden sich $10,43 \pm 0,321$ (SD) matura Spines und basal $6,06 \pm 0,321$ (SD) matura Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenabschnitt, was ebenfalls einen signifikanten Unterschied darstellt ($p = 0,001$).

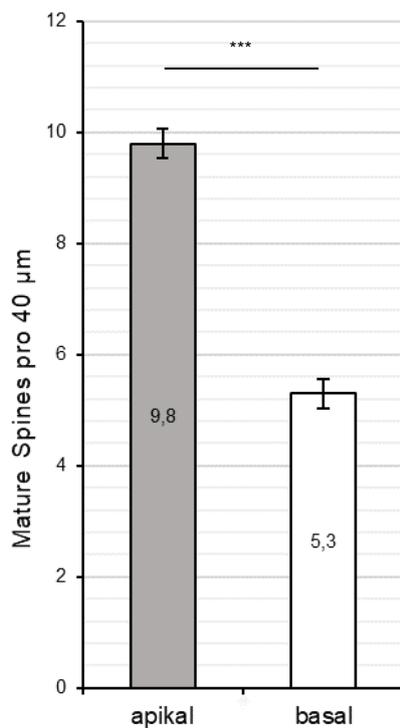


Abb. 18: Mature Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge im Vergleich apikal – basal ($p \leq 0,0001$; Fehlerbalken \triangleq SD)

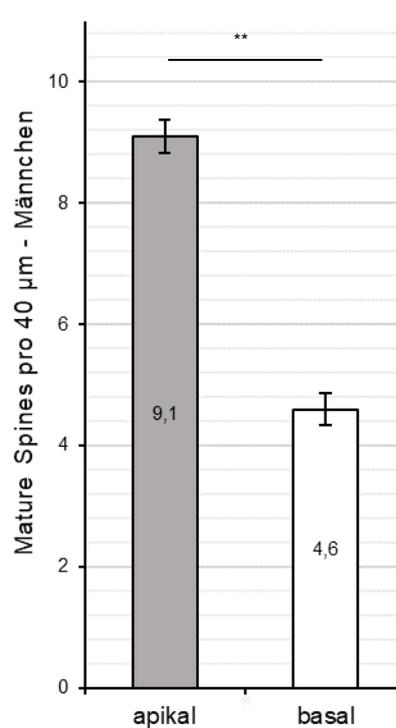


Abb. 19: Mature Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge im Vergleich apikal – basal (Männchen) ($p = 0,003$; Fehlerbalken \triangleq SD)

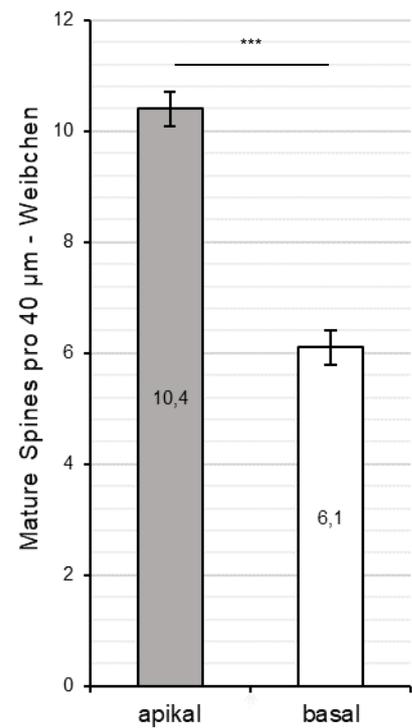


Abb. 20: Mature Spines pro $40 \mu\text{m}$ /Dendritenlänge im Vergleich apikal – basal (Weibchen) ($p = 0,001$; Fehlerbalken \triangleq SD)

4.2 Rezeptorexpression

Um den zweiten Teil der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung zu untersuchen, wurden durch die in 3.2 beschriebenen Verfahren aus adulten Mäusen und neugeborenen P0-Mäusen, sowie von Zelldispersionskulturen embryonaler E18-Ratten und postnataler P0-Ratten geschlechtsspezifische hippocampale Proteinlysate gewonnen und die Expression verschiedener Subtypen von Glutamatrezeptoren verglichen. Betrachtet wurde dabei ein möglicher sexueller Dimorphismus bezüglich der Expression von:

- NMDAR1 (s. 4.2.1)
- NMDAR2A/B (s. 4.2.2)
- GluR1 (s. 4.2.3)

Somit kann die Rezeptorexpression zu verschiedenen Zeitpunkten in der Neurogenese dargestellt und zwischen den Geschlechtern und Spezies verglichen werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse entsprechend nach Spezies und Entwicklungsalter beschrieben und dargestellt.

Dabei wurden die Proteinbanden von NMDAR1 (~ 106 kDa), NMDAR2A/B (~160 kDa), GluR1 (~106 kDa) jeweils mit der Bande von GAPDH (~ 37 kDa) normalisiert.

4.2.1 NMDAR1-Expression

Zur exemplarischen Darstellung der NMDAR1-Proteinbande (~ 106 kDa) im Vergleich zu GAPDH (~ 37 kDa) s. Abb. 21. Links abgebildet der Molekulargewichtsmarker mit den Standardgrößen 37, 50, 75, 100 und 150 kDa.

a) Maus – adult und neugeboren

Die P0-Tiere (s. Abb. 22) zeigen eine bei den Weibchen um 46,8 % signifikant ($p = 0,007$, $n = 10$ Blots mit 10 Männchen/8 Weibchen) höhere Expression im Vergleich zu den Männchen (Männchen $100\% \pm 8,1\%$ (SEM); Weibchen $146,8 \pm 7,01\%$ (SEM)).

Deutlich ist der Geschlechtsunterschied ebenfalls zwischen adulten Männchen mit $100\% \pm 26,7\%$ und Weibchen (s. Abb. 23) mit $160,7\% \pm 13,9\%$ (SEM) erkennbar ($p \leq 0,001$, $n = 10$ Blots mit 6 Männchen/8 Weibchen).

b) Ratte – E18- und P0-Zellkultur

Die Weibchen wiesen mit $107,3\% \pm 11,5\%$ (SEM) in der E18-Kultur (s. Abb. 24) der Ratte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Männchen ($100\% \pm 12,3\%$ (SEM)) auf ($p = 0,492$, $n = 11$ Blots aus 4 DIV 21-Kulturen).

Die Kultur der P0-Ratten (s. Abb. 25) zeigte mit $100\% \pm 14,5\%$ (SEM) bei den Männchen und $120\% \pm 13,4\%$ (SEM) bei den Weibchen einen signifikanten Geschlechtsunterschied ($p = 0,006$, $n = 12$ Blots aus 4 DIV 21-Kulturen).

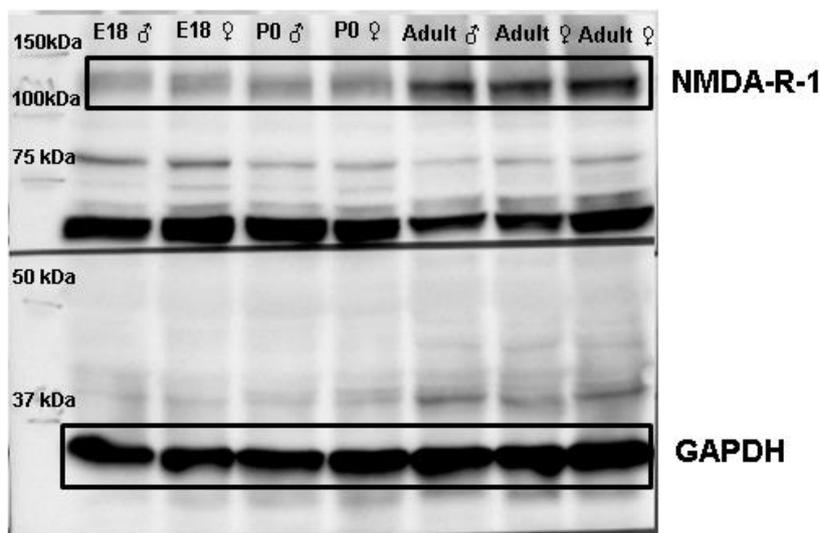
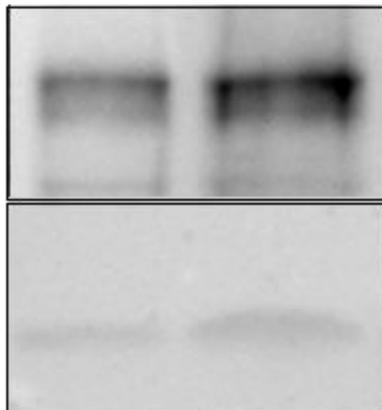
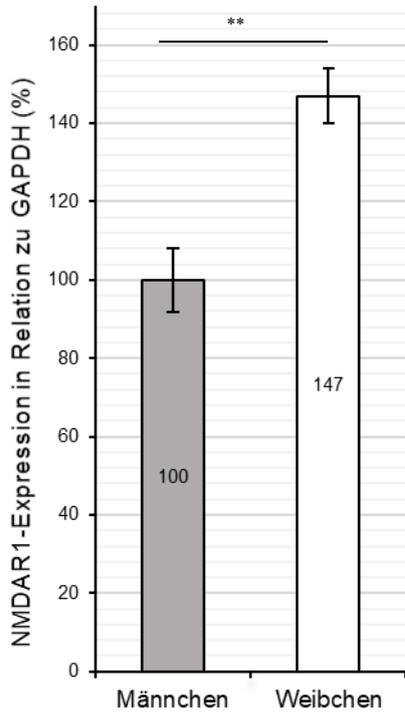


Abb. 21: Exemplarische Western-Blot-Analyse von Zellextrakten hippocampaler Neurone bzw. hippocampalen Gewebes. Nachweis der Proteinexpression von NMDAR1 sowie GAPDH, jeweils im direkten Geschlechtsvergleich. Links aufgetragen die Banden des Molekulargewichtsmarkers.



NMDAR1
~ 106 kDa

GAPDH
~ 37 kDa

Abb. 22: NMDAR1-Expression im Gewebe von P0-Mäusen, repräsentative Darstellung der NMDAR1- und GAPDH-Bande ($p = 0,007$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

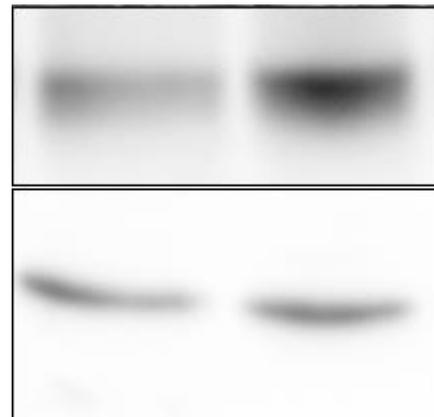
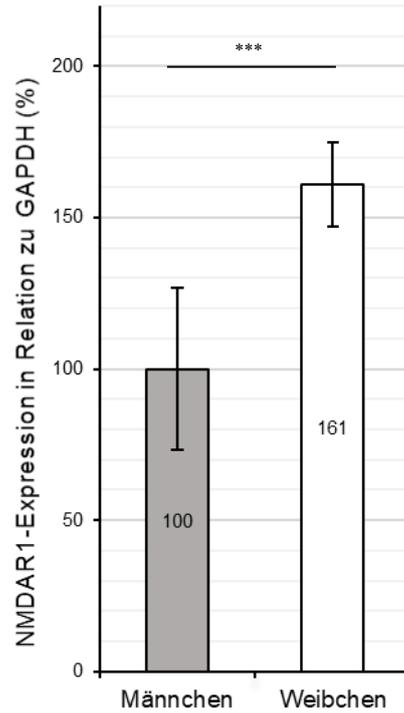
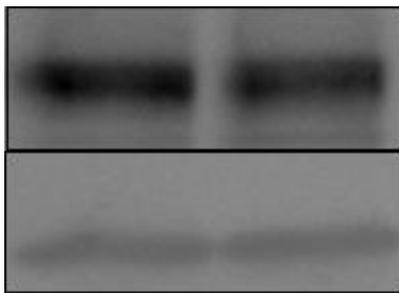
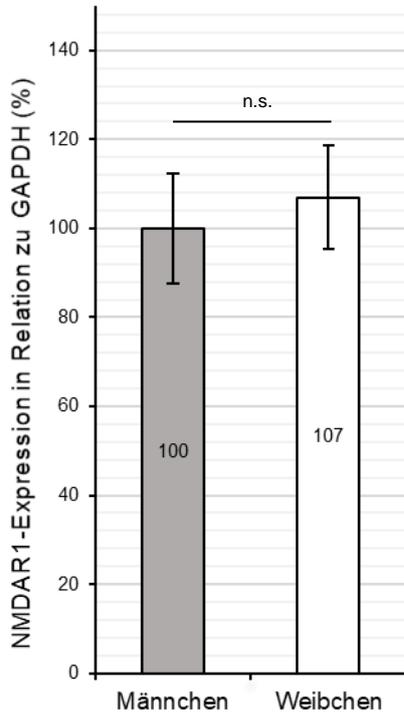


Abb. 23: NMDAR1-Expression im Gewebe adulter Mäuse, repräsentative Darstellung der NMDAR1- und GAPDH-Bande ($p \leq 0,001$; Fehlerbalken \triangleq SEM)



NMDAR1
~ 106 kDa

GAPDH
~ 37 kDa

Abb. 24. NMDAR1-Expression hippocampaler E18-Zellkulturen (DIV 21), repräsentative Darstellung der NMDAR1- und GAPDH-Bande ($p = 0,492$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

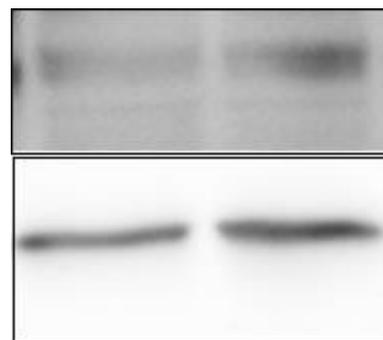
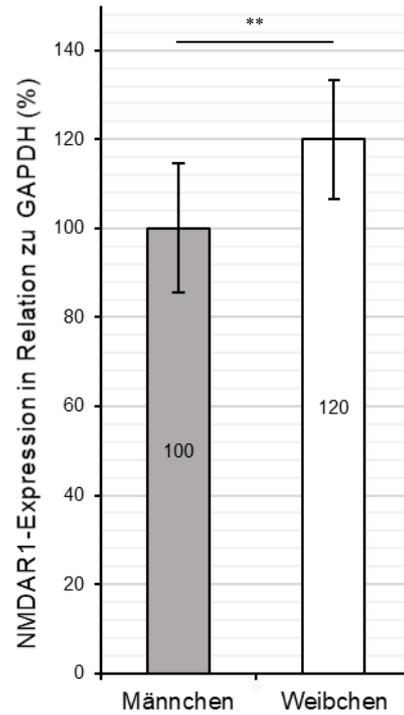


Abb. 25: NMDAR1-Expression hippocampaler P0-Zellkulturen (DIV 21), repräsentative Darstellung der NMDAR1- und GAPDH-Bande ($p = 0,006$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

4.2.2 NMDAR2A/B-Expression

Zur exemplarischen Darstellung der NMDAR2A/B-Proteinbande (~ 160 kDa) im Vergleich zu GAPDH (~ 37 kDa) s. Abb. 26. Links abgebildet der Molekulargewichtsmarker mit den Standardgrößen 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa.

a) Maus – adult und neugeboren

P0 *in-vivo* (s. Abb. 27) besteht zwischen den Männchen (100%, \pm 11,8 % (SEM)) und Weibchen (104%, \pm 11,1% (SEM)) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,419$, $n = 10$ Blots mit 10 Männchen/8 Weibchen).

Bei den adulten Tieren (s. Abb. 28) zeigt sich mit 57,6 % eine signifikant höhere Expression ($p = 0,002$, $n = 9$ Blots mit 6 Männchen/8 Weibchen) bei den Weibchen als bei den Männchen (Männchen 100% \pm 18,9% (SEM), Weibchen 157,6% \pm 15,2% (SEM)).

b) Ratte – E18- und P0-Zellkultur

Bei den E18-Zellkulturen (s. Abb. 29) betrug der Unterschied zwischen Männchen (100%, \pm 21,1% (SEM)) und Weibchen (110% \pm 22,5% (SEM)) 10% ($p = 0,369$, $n = 8$ Blots aus 4 DIV 21-Kulturen).

Die Weibchen (126,6% \pm 17,4% (SEM)) der Kultur P0 (s. Abb. 30) wiesen mit 26% eine signifikant ($p = 0,015$, $n = 8$ Blots aus 4 DIV 21 Kulturen) höhere Expression auf als die Männchen (100% \pm 21,3 (SEM)).

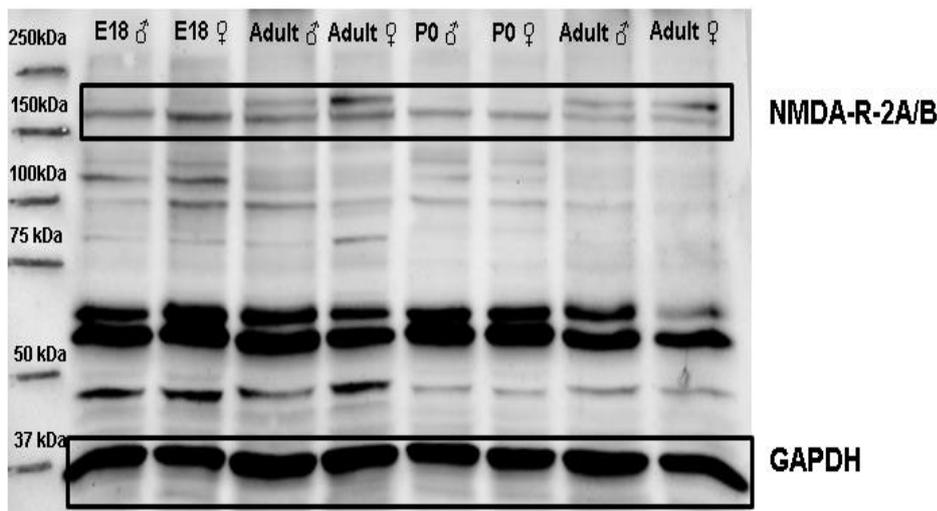
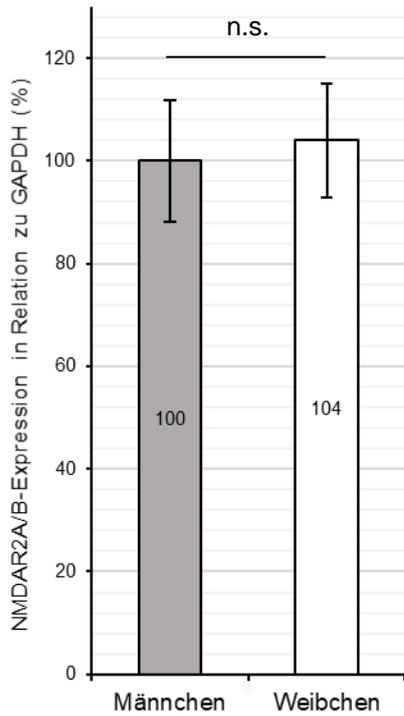


Abb. 26: Exemplarische Western-Blot-Analyse von Zellextrakten hippocampaler Neurone bzw. hippocampalen Gewebes. Nachweis der Proteinexpression von NMDAR-2A/B sowie GAPDH, jeweils im direkten Geschlechtsvergleich. Links aufgetragen die Banden des Molekulargewichtsmarkers.



NMDAR2A/B
~ 160 kDa

GAPDH
~ 37 kDa

Abb. 27: NMDAR2A/B-Expression im Gewebe von P0-Mäusen, repräsentative Darstellung der NMDAR2A/B- und GAPDH-Bande ($p = 0,419$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

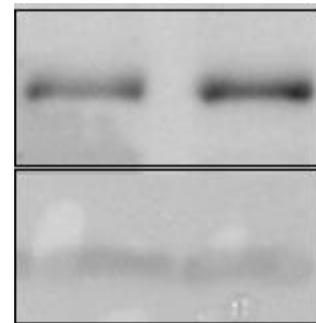
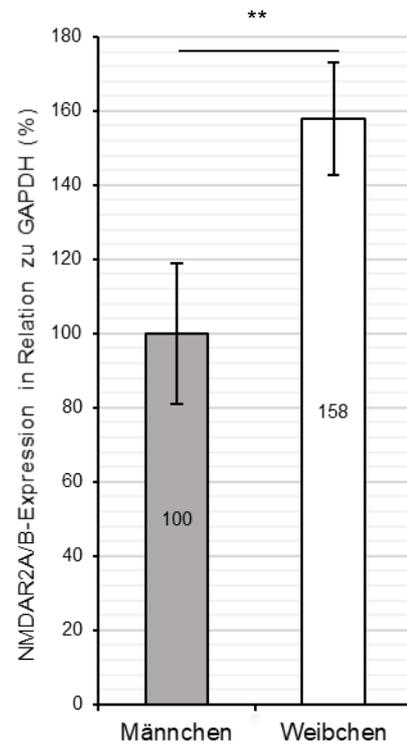
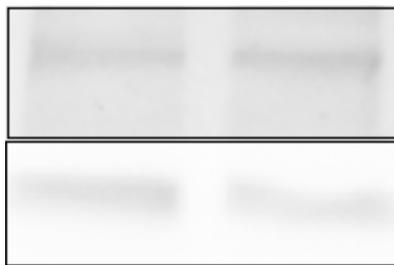
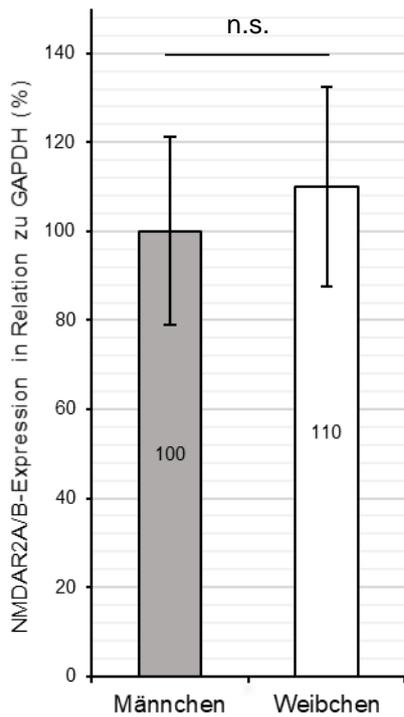


Abb. 28: NMDAR2A/B-Expression im Gewebe adulter Mäuse, repräsentative Darstellung der NMDAR2A/B- und GAPDH-Bande ($p = 0,002$; Fehlerbalken \triangleq SEM)



NMDAR2A/B
~ 160 kDa

GAPDH
~ 37 kDa

Abb. 29: NMDAR2A/B-Expression hippocampaler E18-Zellkulturen (DIV 21), repräsentative Darstellung der NMDAR2A/B- und GAPDH-Bande ($p = 0,369$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

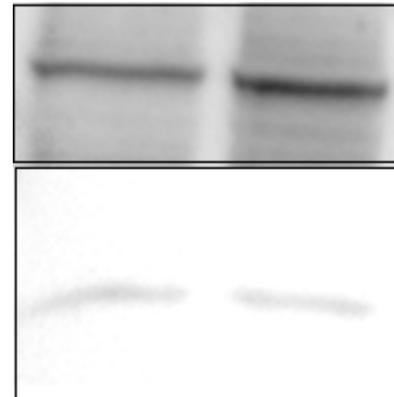
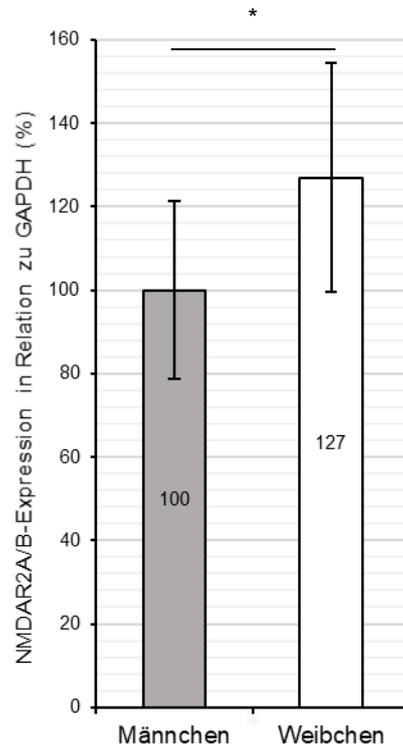


Abb. 30: NMDAR2A/B-Expression hippocampaler P0-Zellkulturen (DIV 21), repräsentative Darstellung der NMDAR2A/B- und GAPDH-Bande ($p = 0,015$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

4.2.3 GluR1-Expression

Zur exemplarischen Darstellung der GluR1-Proteinbande (~ 106 kDa) im Vergleich zu GAPDH (~ 37 kDa) s. Abb. 31. Links abgebildet der Molekulargewichtsmarker mit den Standardgrößen 37, 50, 75 und 100 kDa. Aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede wurde abschließend auf eine weitere Untersuchung von aus *in-vivo* gewonnenem P0-Material aus der Maus verzichtet.

a) Maus – adult

Bei den adulten Tieren (s. Abb. 34, n = 7 Blots mit je 4 Tieren/Geschlecht) lagen 7% Unterschied ($p = 0,2$) zwischen den Männchen ($100\% \pm 35,4\%$ (SEM)) und Weibchen ($107\% \pm 13,9\%$ (SEM)).

b) Ratte – E18- und P0-Zellkultur

In der E18-Kultur (s. Abb. 32, n = 7 Blots aus 5 DIV 21-Kulturen) betrug der Unterschied 33% ($p = 0,32$) zwischen den Männchen ($100\% \pm 37,8\%$ (SEM)) und Weibchen ($133\% \pm 53,8\%$ (SEM)).

In der P0-Kultur (s. Abb. 33, n = 7 Blots aus 5 DIV 21-Kulturen) war die Expression der Weibchen ($112\% \pm 26,7$ (SEM)) um 12% höher ($p = 0,51$) als die der Männchen ($100\% \pm 26,7$ (SEM)).

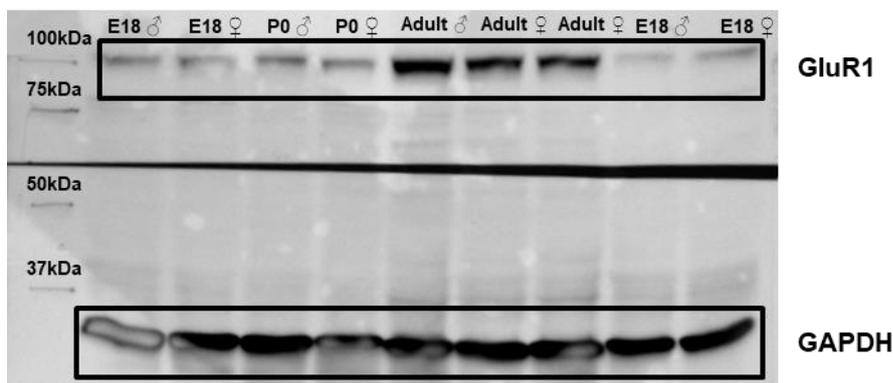


Abb. 31: Exemplarische Western-Blot-Analyse von Zellextrakten hippocampaler Neurone bzw. hippocampalen Gewebes. Nachweis der Proteinexpression von GluR1 sowie GAPDH, jeweils im direkten Geschlechtsvergleich. Links aufgetragen die Banden des Molekulargewichtsmarkers.

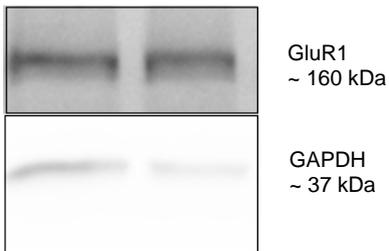
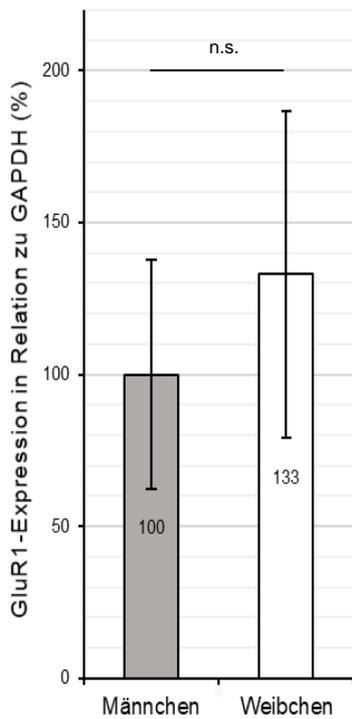


Abb. 32: GluR1-Expression hippocampaler E18-Zellkulturen (DIV 21), repräsentative Darstellung der GluR1- und GAPDH-Bande ($p = 0,2$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

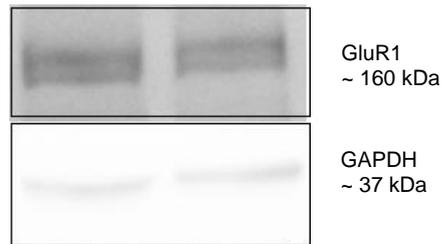
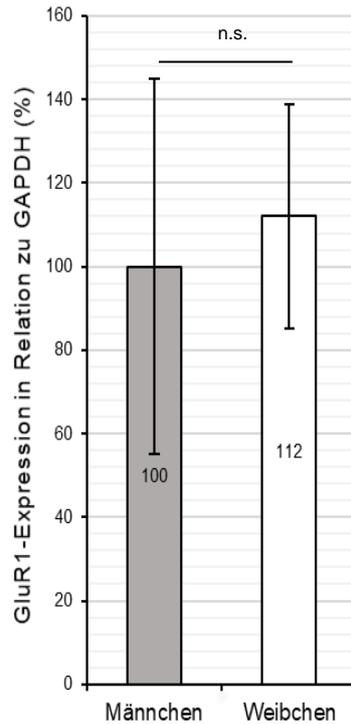


Abb. 33: GluR1-Expression hippocampaler P0-Zellkulturen (DIV 21), repräsentative Darstellung der GluR1- und GAPDH-Bande ($p = 0,32$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

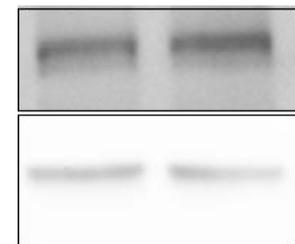
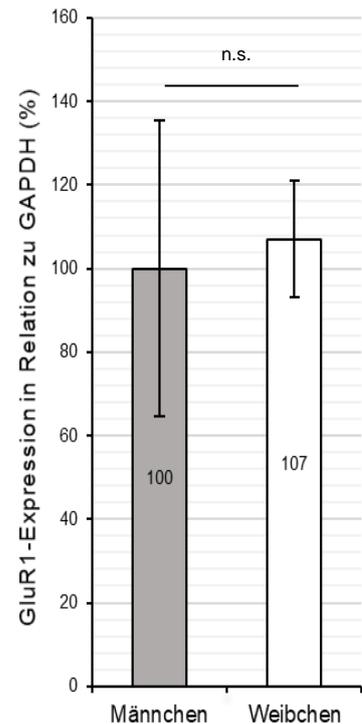


Abb. 34: GluR1-Expression im adulten Gewebe, repräsentative Darstellung der GluR1- und GAPDH-Bande ($p = 0,51$; Fehlerbalken \triangleq SEM)

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis möglicher Manifestationen eines sexuellen Dimorphismus im Hippocampus. Untersucht wurden dazu:

- 1) die Dichte dendritischer Spines von CA1-Pyramidenzellen adulter Thy-1-Mäuse.
- 2) die Expression von ausgewählten Subtypen der NMDA- und AMPA-Rezeptoren in adulten und neugeborenen Mäusen sowie in aus embryonalen und perinatalen Ratten gewonnenen hippocampalen Primärneuronen. Hier lag ein besonderer Fokus auf einer entwicklungsabhängigen Betrachtung.

Getragen wurden diese Untersuchungen von der Absicht, zuvor *in-vitro* gewonnene Erkenntnisse (Vierk et al. 2012) unter Berücksichtigung bekannter Auswirkungen der hormonellen Zyklizität auf hippocampale Spines (Gould et al. 1990; Woolley, Gould u. Frankfurt 1990, Frankfurt u. Luine 2015; Sheppard, Choleris u. Galea 2019) auch in einem *in-vivo*-Modell zu untersuchen und mit funktionellen Aspekten zu verknüpfen. Nachfolgend sollen folgende Kernaussagen, zu denen sich die erhobenen Befunde zusammenfassen lassen, diskutiert werden:

Zu 1)

- a) Die Dichte maturer Spines ist bei adulten weiblichen Thy-1-Mäusen signifikant höher als bei männlichen; die Gesamtzahl der Spines hingegen weist keinen Unterschied auf.
- b) Es bestehen Hinweise auf eine zyklusabhängige Dichte von maturen Spines bei den Weibchen.
- c) Sowohl bei Weibchen als auch Männchen zeigt der apikale Dendritenbaum signifikant mehr mature Spines als der basale; bei den Männchen, nicht aber den Weibchen, ist auch die Gesamtspinezahl apikal signifikant höher als basal.

Zu 2)

- a) Im hippocampalen Gewebe weiblicher adulter Mäuse ist die Expression von NMDAR1- und 2A/B signifikant höher als bei Männchen. Ähnliche Unterschiede wurden auch im hippocampalen Gewebe neugeborener Mäuse sowie in aus perinatalen Ratten gewonnenen hippocampalen Primärneuronen gefunden.
- b) Bei der Expression von GluR1 gibt es keine signifikanten Geschlechtsunterschiede.

5.1 Mature dendritische Spines sind Teil des sexuellen Dimorphismus im Hippocampus

Die Erforschung von Geschlechtsunterschieden neuronaler Morphologie, Verschaltung und resultierender Verhaltensmuster ist von ungebrochener neurowissenschaftlicher Relevanz. Über die Wichtigkeit des rein deskriptiven Verständnisses hinaus gehen Erkenntnisse des sexuellen Dimorphismus einher mit neuen Einblicken in psychiatrisch-neurologische Erkrankungen, verbesserten Modellen für deren Pathophysiologie und damit schlussendlich präziserem Einsatz medikamentöser Therapie (vgl. zur Übersicht Koss u. Frick 2017).

Der Hippocampus stellt hier keine Ausnahme dar. Wie eingangs beschrieben, ist er als wichtiges anatomisches Korrelat bei der Gedächtnisbildung und räumlichen Orientierung eine Schlüsselstruktur im Gesamtsystem des ZNS. Entsprechend vielfältig wurden hippocampale Geschlechtsunterschiede über die letzten Jahrzehnte untersucht. Von morphologischen Studien der späten 1980er und frühen 1990er wandte sich ein Fokus rasch den zugrundeliegenden endokrinen Mechanismen, insbesondere der evident wichtigen Rolle der Neurosteroiden (vgl. zusammenfassend Brandt u. Rune 2019), zu; andere Gruppen konzentrierten sich auf Unterschiede bei der Signaltransduktion und der synaptischen Plastizität (Koss u. Frick 2017). Verhaltensuntersuchungen bei Nagern und menschlichen Probanden stellen einen weiteren Aspekt dar. Wo können nun die Daten der fluoreszenzmikroskopisch untersuchten hippocampalen CA1-Pyramidenzellen dieser Arbeit eingeordnet werden? Schließlich zeugt die hier *in-vivo* gezeigte signifikant höhere Anzahl maturer Spines bei den Weibchen verglichen mit den Männchen der Thy-1-Maus von einer weiteren Manifestation dieses sexuellen Dimorphismus. Sind morphologische Unterschiede immer so eindeutig wie in diesem Modell?

Frühe Ergebnisse von Gould sowie Juraska wiesen bereits auf Geschlechtsunterschiede bei bestimmten *dendritischen* Substrukturen hin: Bei weiblichen Ratten können mehr Primärdendriten (in CA3) als bei männlichen festgestellt werden (Gould, Allan u. McEwen 1990b); der proximale apikale Dendritenbaum in CA3 bei Weibchen hat eine höhere Anzahl von Verzweigungen verglichen mit den Männchen; diese Unterschiede sind am distalen Dendritenbaum genau umgekehrt (Juraska, Fitch u. Washburne 1989). Später wurde beschrieben, dass Männer (Barrera et al. 2001) in CA1 einen größeren basalen Dendritenbaum als Frauen aufweisen. Im Dendritenbaum des Hippocampus finden sich somit distinkte morphologische Geschlechtsunterschiede, die jedoch keine eindeutigen funktionellen Rückschlüsse zulassen.

Da jedoch nicht primär Dendriten, sondern Spines für die synaptische Plastizität von Bedeutung sind (Frankfurt u. Luine 2015) und entsprechend in dieser Arbeit untersucht wurden, stellt sich die Frage, ob sich auf dieser kleineren zellulären Ebene eindeutige Geschlechtsunterschiede finden. Schließlich unterliegen Spines im Gegensatz zum Gesamtdendriten einem raschen morphologischem Wandel und es ließe sich vermuten, dass sich *funktionelle* Geschlechtsunterschiede auch hier quantitativ widerspiegeln. Jedoch konnten weder Gould und Kollegen noch weitere Arbeitsgruppen einen Unterschied der Gesamtspinedichte feststellen (Gould, Allan u. McEwen 1990b; Markham et al. 2005; Salas-Ramirez et al. 2010; Bowman et al. 2015). Insoweit fügen sich die Daten aus dem Thy-1-Modell nahtlos in die Literatur ein: Auch hier zeigt die Gesamtzahl der Spines keinen Geschlechtsunterschied.

Die entscheidende Neuerung besteht jedoch darin, dass in dieser Arbeit im Gegensatz zu den meisten bisherigen Untersuchungen explizit zwischen verschiedenen Spinetypen (matur vs. immatur) differenziert und verglichen wird, und ein sexueller Dimorphismus bei *maturen* Spines festzustellen ist. Da inzwischen davon ausgegangen wird, dass die Anzahl und Ausbildung *maturer* Spines für die synaptische Plastizität essenziell ist (Bourne u. Harris 2008; Holtmaat et al. 2005; Kasai et al. 2010; Tada u. Sheng 2006; Zuo et al. 2005), muss man also Studien hinzuziehen, die nicht nur die Spinezahl, sondern auch deren Morphologie vergleichen. Vierk und Kollegen konnten bei *in-vitro*-Zellkulturuntersuchungen ebenfalls keinen Unterschied der Gesamtspinezahl *in-vitro* im Geschlechtsvergleich feststellen. Jedoch weisen die Weibchen signifikant mehr mature Spines als die Männchen auf (Vierk et al. 2012), was von dieser Arbeit *in-vivo* bestätigt wird.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass weder beim Dendritenbaum noch bei der Gesamtspinezahl ein eindeutiger Geschlechtsunterschied auffällt, jedoch deutliche Hinweise bestehen, dass dieser bei Betrachtung der *maturen* Spines zu finden ist. Die Daten dieser Arbeit ergänzen dabei bisherige Befunde auch methodisch. Vierk und Kollegen (2012) beispielsweise nutzten EGFP-transfizierte hippocampale dissoziierte Neurone, kultivierten diese für 16 Tage *in-vitro* und zählten Spines in zwei Dimensionen, d.h. orthogonal hinter oder vor dem Dendriten vorstehende Spines wurden nicht quantifiziert. Diese konnten in der vorliegenden Arbeit mittels Z-Analysen adulter *in-vivo*-Schnitte berücksichtigt werden. In noch früheren Arbeiten waren Golgi-Färbemethoden üblich (Gould et al. 1990; Woolley, Gould u. Frankfurt 1990, Woolley u. McEwen 1994). Es wird jedoch auch deutlich, dass die Untersuchung *maturer* Spines bzgl. eines Geschlechtsunterschiedes bisher von untergeordneter Rolle gegenüber Erhebungen der Gesamtspinedichte war und weitere Studien zur Bestätigung wünschenswert sind.

5.2 Spines werden zyklusabhängig von Neurosteroiden beeinflusst

Zwangsläufig stellt sich die Frage, inwiefern Daten aus weiblichen Tieren unterschiedlicher Zyklusstadien gemittelt werden können und ob sich aus den gemittelten Daten trotz der zyklusabhängigen Unterschiede ein einziger „weiblicher“, repräsentativer Wert ergibt. Für die Bildung eines Mittels spricht, dass sich von den vier untersuchten Weibchen jedes einzelne in einem unterschiedlichen Zyklusabschnitt befand und bei jedem weiblichen Tier, selbst im Metestrus, d.h. der Phase mit dem niedrigsten Wert maturer Spines, die Anzahl der maturen Spines immer noch höher ist als bei den männlichen Tieren. Um dies jedoch weiter zu untermauern und auszuschließen, dass die Zyklusabhängigkeit bei $n = 1$ Weibchen pro Abschnitt zufälliger Natur war, führte unsere Arbeitsgruppe weitergehende Zählungen bei Weibchen durch, wobei insgesamt jeweils 4 Tiere pro Zyklusabschnitt ausgewertet wurden. Tatsächlich bestätigte sich nicht nur eine im Mittel höhere Anzahl maturer Spines beim Weibchen, auch die Zyklusabhängigkeit wurde mit dem gleichen Verteilungsmuster wie in Tabelle 1 (s. S. 46) bestätigt (Brandt u. Löffler et al. 2020): Im Diestrus ist ihre Anzahl am höchsten und fällt danach im Verlauf des Proestrus und Estrus bis zum niedrigsten Wert im Metestrus ab.

Die Zyklusabhängigkeit der Spinedichte ist seit den Untersuchungen der 1990er etabliert (Woolley, Gould u. Frankfurt 1990; Woolley et al. 1997). Schon früh wurde entsprechend darauf geschlossen, dass Sexualhormone einen wichtigen Einfluss auf die Spinedichte und Spinemorphologie sowie die synaptische Plastizität im Hippocampus haben. Aus Experimenten, in denen der Einfluss von Ovariectomien und entsprechenden hormonellen Wiederherstellungsversuchen untersucht wurde, wurde auf die dafür entscheidende Rolle systemischer Estrogene geschlossen (Woolley, Gould u. Frankfurt 1990). Später wurde auch bei männlichen Primaten eine ähnliche Auswirkung auf die Dichte von Spinesynapsen nach Orchiektomie gesehen (Leranth et al. 2004). Damit stellt sich die Frage, ob es ausschließlich die geschlechtsspezifischen hormonellen Regelkreisläufe sind, die für eine Ausprägung dieses sexuellen Dimorphismus sorgen. Betrachtet man *in-vitro*-Daten (Vierk et al. 2012), bei denen systemische Hormoneinflüsse entfallen, sich aber trotzdem ein sexueller Dimorphismus zeigt (sich sozusagen „weibliche“ und „männliche“ Neurone differenzieren), wird ersichtlich, dass die Ursache(n) hierfür in der Zelle selbst liegen muss/müssen.

Tatsächlich gelang der Nachweis, dass Spines eben nicht nur durch systemische Sexualhormone, sondern insbesondere von endogenen, d.h. hirn- und neuroneneigenen sog. Neurosteroiden, beeinflusst werden. Hippocampale Neurone synthetisieren selbst Estrogene (Prange-Kiel, Wehrenberg u. Jarry 2003; Fester et al. 2009), da sie mit allen hierfür notwendigen Enzymen und Substraten ausgestattet sind.

Dabei ist die Synthese über dieselbe Achse wie der Zyklus synchronisiert (Prange-Kiel et al. 2008), und zwar GnRH-abhängig über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Aus weiteren Studien ist bekannt, dass die lokale Konzentration von Sexualhormonen im Gehirn weit höher liegt als die Serumkonzentration, sodass eine entscheidende Rolle endogener Hormone postuliert wurde (Hojo et al. 2009; Ooishi et al. 2012). Dies wird durch *in-vitro*-Studien, in denen der Einfluss systemischer Hormone ausgeschaltet wurde, bestätigt. Tatsächlich hat die lokale Synthese (und deren artifizielle Unterbrechung) von Sexualhormonen einen signifikanten Einfluss auf die Spinedichte.

Nachdem zunächst meist Weibchen im Vordergrund dieser Untersuchungen standen und herausgefunden wurde, dass die aromataseabhängige Synthese von 17β -Estradiol aus Testosteron den Schlüsselfaktor hierfür darstellt (Fester et al. 2009; Zhou et al. 2010, 2014), rückt nunmehr auch die Untersuchung der neurosteroidalen Mechanismen bei den Männchen in den Fokus. Hier sind es vor allem das Testosteron und sein Metabolit Dihydrotestosteron (DHT), welche die Dichte maturer Spines beeinflussen (Brandt et al. 2019). Somit stellt sich als zugrunde liegend des sexuellen Dimorphismus eine komplexe, jeweils geschlechtsspezifische endogene und exogene hormonelle Regulation dar, in welcher sich die vorliegenden Ergebnisse einreihen lassen. Nicht unerwähnt darf dabei jedoch bleiben, dass hierüber hinaus auch andere Mechanismen bekannt sind, die für Geschlechtsunterschiede verantwortlich sind. So spielen auch geschlechtsspezifische Chromosomen- und Genverteilungen sowie Umweltfaktoren eine Rolle (Arnold et al. 2013; McCarthy u. Arnold 2011).

Die Bestätigung einer zyklusabhängigen Spinedichtefluktuations aus dem Thy-1-Mausmodell reiht sich damit einerseits auf eindrückliche Weise in die vorbekannten Erkenntnisse ein. Andererseits können aus diesen Daten keine direkten Rückschlüsse auf die o.g. zugrundeliegenden Mechanismen getroffen werden, da mit dieser Methodik nicht zwischen endo- und exogenen Hormonen unterschieden werden kann, d.h. die Tiere wurden weder gonadektomiert noch medikamentös behandelt.

Interessanterweise wurden in den vorherigen Untersuchungen fast immer Ratten genutzt. Lediglich Spencer und Kollegen untersuchten bei Mäusen eine Zyklizität bzgl. der Expression verschiedener synaptischer Proteine, wie z.B. des postsynaptischen Dichteproteins-95 (PSD-95), und konnten ebenfalls einen Zykluseinfluss identifizieren (Spencer et al. 2008). Als nebenbefundliche methodische Feststellung ergibt sich daher, dass (mature) Spines nicht nur bei Ratten, sondern auch bei Mäusen signifikanten zyklusabhängigen Schwankungen unterliegen.

5.3 Glutamatrezeptorexpression und Geschlechtsunterschiede der LTP-abhängigen synaptischen Plastizität

Doch wo lässt sich die im zweiten Teil der Arbeit gewonnene Erkenntnis einordnen, dass beide untersuchten NMDA-Rezeptorsubtypen einen sexuellen Dimorphismus bei den adulten Mäusen *in-vivo*, sowie zum Teil auch bei den neugeborenen Mäusen *in-vivo* und Ratten *in-vitro* aufweisen? Zunächst muss ein valider Zusammenhang zwischen der rein morphologischen Untersuchung der Spines in CA1 und der Rezeptorexpression als postuliertes funktionelles Korrelat diskutiert werden:

Denn NMDA- und AMPA-Rezeptoren werden in einer Vielzahl von (neuronalen) Geweben exprimiert. Dabei beschränkt sich die Expression weder ausschließlich auf Neurone noch auf Synapsen. So wird allgemein unterschieden zwischen synaptischer und extrasynaptischer Expression (Sanz-Clemente, Nicoll u. Roche 2013). Dieser Aspekt kann jedoch mit der hier genutzten Methodik nicht direkt nachvollzogen werden, da bei dem *in-vivo* gewonnenem Gewebematerial und dem hieraus gewonnenem Proteinlysat extrasynaptische und synaptische Glutamatrezeptoren nicht unterschieden werden können. Um diesem Faktor zu begegnen und die o.g. Ergebnisse der Spinemorphologie und Rezeptorexpression aussagekräftig verknüpfen zu können, untersuchte unsere Arbeitsgruppe (Brandt u. Löffler et al. 2020) die NMDA-Rezeptorexpression in isolierten Fraktionen der postsynaptischen Dichte (PSD) aus hippocampalem Gewebe adulter Mäuse (C57BL/6). Die PSD ist essenziell für die Konzentrierung und Stabilisierung zahlreicher an der Signaltransduktion beteiligter Proteine und Rezeptoren, so auch von NMDA-Rezeptoren (Walikonis et al. 2000, Won et al. 2016), und damit ein morphologischer und funktioneller Schlüssel der LTP (Nicoll 2017). Sie ist dabei in ihrer Größe direkt von der Spinemorphologie abhängig; je größer der Dornfortsatz, desto mehr PSD und verankerte Glutamatrezeptoren findet sich in ihm (Arellano et al. 2007; Tada u. Sheng 2006; Bourne u. Harris 2008). Die Ergebnisse der Studie weisen auch bei der in der PSD bestimmten Rezeptorexpression, sowohl bei NMDA-Rezeptor-Subtyp R1 als auch -Subtyp 2AB, einen sexuellen Dimorphismus auf (Brandt u. Löffler et al. 2020). Bei beiden Subtypen fand sich eine signifikant höhere Expression bei den Weibchen, sodass hier von einem Zusammenhang zwischen *morphologischem* Geschlechtsunterschied maturer dendritischer Spines in CA1 und *funktionellem* sexuellem Dimorphismus ausgegangen werden kann, da extrasynaptische Glutamatrezeptorquellen weitestgehend ausgeschlossen wurden.

Die bereits diskutierten Neurosteroiden sind nicht nur bedeutend für die Erklärung geschlechtsabhängiger Spinemorphologien, sondern auch für das Verständnis zugrundeliegender *funktioneller* Prozesse. So stellt sich zunehmend heraus, dass Hormone, sowie deren Rezeptoren und Signalwege, an der Ausprägung der LTP und LTD geschlechtsspezifisch beteiligt sind.

Betrachtet man beispielsweise 17β -Estradiol, kann festgestellt werden, dass dieses sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen *in-vitro* (Fester et al. 2012) sowie *in-vivo* (Hojo et al. 2009; Kato et al. 2013, Ooishi et al. 2012) im Hippocampus nachgewiesen werden kann und für die Glutamat-Ausschüttung, Sensibilität und LTP-Amplitude (vgl. zur Übersicht Frick 2015) wichtig ist. Die Estrogenrezeptorsubtypen, welche hierfür von Bedeutung sind, unterscheiden sich jedoch geschlechtsabhängig. Bei den Männchen scheint präsynaptisch ER α und postsynaptisch ER β , bei den Weibchen hingegen ER β präsynaptisch und der G-Protein-gekoppelte ER postsynaptisch von Bedeutung zu sein (Oberlander u. Wooley 2017). Auch funktionell zeigen sich, insbesondere nach Hemmung der Neurosteroidsynthese, Unterschiede. Eine Hemmung der aromatasen-abhängigen Estrogensynthese resultiert in einem Erlöschen der LTP bei Weibchen, jedoch nur in einer mäßigen Reduktion bei Männchen (Vierk et al. 2012). Bei den Männchen sorgen hingegen vor allem Testosteron und die 5-Alpha-Reduktase-abhängige Synthese von Dihydrotestosteron für ein Aufrechterhalten der LTP (Brandt et al. 2019).

Doch spiegeln sich diese Unterschiede auch bei der Expression der direkt an der LTP beteiligten NMDA- und AMPA-Rezeptoren wider?

Bisherige Studien konnten einen sexuellen Dimorphismus der Expression von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten belegen. Sowohl Zuena und Kollegen (2008) als auch Higuera-Matas et al. (2012) stellten eine höhere NMDA-Rezeptorexpression bei weiblichen Ratten als bei männlichen fest. Die Arbeitsgruppe um Monfort konnte beim GluR1-Rezeptor (Monfort u. Gomez 2015), passend zu den vorliegenden Untersuchungen, keine signifikanten Geschlechtsunterschiede feststellen. Damit gehen die vorliegenden Ergebnisse prinzipiell mit bisherigen Befunden einher.

Doch hierbei muss der Einfluss der Zyklizität auch auf funktionelle Aspekte berücksichtigt werden, da die Glutamatrezeptorexpression und synaptische Plastizität 17β -Estradiol-abhängig sind (Frick 2015). So konnte gezeigt werden, dass Weibchen im Proestrus einen signifikant höheren Grad der Langzeitpotenzierung erreichen als im Estrus und im Diestrus (Warren et al. 1995; Good, Day u. Muir 1999).

Diese Differenzierung kann in dieser Arbeit nicht vorgenommen werden, da die Daten der adulten Weibchen gemittelt wurden und in den Kulturen die Zykluseinflüsse entfallen. Jedoch weisen die Daten eindeutig darauf hin, dass auch bei der Rezeptorexpression gonadale Einflüsse nur zu einem Teil eine Rolle spielen. In der perinatalen Phase scheint sich also in den hippocampalen Zellen selbst ein endogener sexueller Dimorphismus der Konnektivität herauszubilden, schließlich fanden sich in „weiblichen“ P0-Kulturen eine höhere NMDAR1-Expression als in „männlichen“.

Warum sich signifikante Unterschiede nur bei den Subtypen des einen, jedoch nicht bei denen des anderen an der LTP beteiligten Rezeptors feststellen lassen, bleibt zu diskutieren. Aufgrund der Dynamik der LTP kann vermutet werden, dass die Zahl der fest verankerten NMDA-Rezeptoren weniger stark Fluktuationen unterliegt als die der AMPA-Rezeptoren, die nach Stimulation nicht nur empfindlicher werden, sondern auch vermehrt transkribiert werden (s. 1.3.3).

Die Induktion einer LTP ist jedoch abhängig von NMDA-Rezeptoren (s. 1.3.3 und 1.3.4); womit sich die Frage stellt, ob bei unterschiedlicher Expression von NMDA-Rezeptoren auch Geschlechtsunterschiede bei der LTP feststellbar sind. Einige Arbeitsgruppen fanden nach Theta-Burst-Stimulation einen signifikant stärkeren LTP-Anstieg bei männlichen als bei weiblichen Ratten (Bronzino et al. 1996; Monfort et al. 2015; Yang et al. 2004). Vierk und Kollegen konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied des LTP-Anstiegs nach Stimulation zwischen männlichen und weiblichen Mäusen feststellen (Vierk et al. 2012, 2015). Somit ergibt sich ein insgesamt uneindeutiger Stand zur LTP bzgl. eines sexuellen Dimorphismus.

NMDA-Rezeptoren sind essenziell für eine funktionierende Langzeitpotenzierung; jedoch geht dabei ein höherer Grad der NMDA-Rezeptorexpression nicht zwangsläufig mit einer vermehrten LTP-Induktion bzw. höheren LTP-Amplitude einher. Dies wirft insbesondere die Frage auf, ob sich signifikante Geschlechts- und Zyklusunterschiede bei der Langzeitpotenzierung in ebenso signifikanten Unterschieden der Verhaltens- und Gedächtnisleistung widerspiegeln oder lediglich funktionell zu vernachlässigende Schwankungen darstellen. Bisher ist diese Frage noch unklar.

Bei der zeitlichen Entwicklung der Rezeptorexpression lässt sich feststellen, dass a) alle Subtypen der betrachteten Glutamaterezeptoreinheiten zu allen Zeitpunkten exprimiert werden, d.h. vorhanden sind und sich b) ein sexueller Dimorphismus erst mit zunehmendem Alter feststellen lässt.

Daraus lässt sich schließen, dass zur Ausprägung des sexuellen Dimorphismus die Neurone ein bestimmtes Mindestalter (mindestens P0) erreicht haben müssen, und es eine gewisse Zeit braucht, bis dieser voll ausgeprägt ist. Dies scheint bei Nagern in die Phase zwischen 0 und 21 Tagen nach der Geburt zu fallen. Jedoch kann aus dieser Arbeit nur ungefähr abgeschätzt werden, zu welchem Zeitpunkt der sexuelle Dimorphismus auftritt. Für eine bessere Betrachtung der Genese des sexuellen Dimorphismus müssten Entwicklungsstudien jeweils an einer Spezies in engen zeitlichen Abständen vorgenommen werden. Dennoch bleibt bemerkenswert, dass sich ein signifikanter Geschlechtsunterschied offenbar bereits in der perinatalen Phase, und damit weit vor Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale, ausprägt.

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich Geschlechtsunterschiede nicht nur durch den Einfluss systemischer Sexualhormone nach Ausbildung der Gonaden entwickeln (Arnold et al. 2013, McCarthy & Arnold 2011).

Somit kann hinsichtlich der bisher diskutierten Aspekte des sexuellen Dimorphismus im Hippocampus festgestellt werden, dass einzelne Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Morphologie und Funktionalität bestehen, diese an anderer Stelle jedoch noch fehlen bzw. widersprüchlicher Natur sind.

5.4 Das Thy-1-Modell als Ergänzung bisheriger Methodik

Jenseits der Untersuchung von Geschlechtsunterschieden kann die Vielzahl der erhobenen Daten aus dem in dieser Arbeit genutzten Modell für eine methodische Einordnung und Diskussion genutzt werden.

Es liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor, in denen die Zahl der Spines entlang von Dendriten hippocampaler Pyramidenzellen untersucht wurde, wobei sich die im vorliegenden *in-vivo*-Thy-1-Mausmodell festgestellten Quantifizierungen der Spines pro μm /Dendritensegment gut in bisherige Erkenntnisse aus den Hippocampi von Nagern einordnen lassen: Im Schnitt beträgt die Spinedichte im hier genutzten Thy-1-Modell ca. 2,1 Spines/ μm . Bisherige Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen kommen zu ähnlichen Werten von ca. 2 Spines/ μm (Woolley, Gould u. Frankfurt 1990; Bannister u. Larkman 1995b; Murakami et al. 2006; Ultanir et al. 2007; Morley u. Mervis 2013).

Zwar unterscheiden sich Faktoren wie Spezies (Maus, Ratte), Alter (embryonal, juvenil oder adult), Dendritenabschnitt/Lokalisation (apikal oder basal, proximal oder distal des Soma) und auch Färbe- sowie Zählmethoden (Golgi-Impregnation, Immunhistochemie, Dimensionalität der Analyse, manuell oder softwaregestützt) teils erheblich zwischen den Studien. Dennoch zeigt sich eine Beständigkeit der Werte innerhalb eines engen Rahmens, in die sich auch diese Arbeit einfügt. Das bedeutet, dass die Daten aus dem Thy-1-Modell nicht nur in sich verglichen werden können; auch eine Vergleichbarkeit mit bisherigen Studien ist gegeben, sodass sich das Modell gut für weitere Spineuntersuchungen *in-vivo* eignet.

Die Einordnung ist für die Anzahl bzw. Dichte der maturen Spines ungleich schwieriger vorzunehmen. Im Thy-1-Modell konnten ca. 6-8 mature Spines pro $40\mu\text{m}$ (ca. 0,2 Spines/ μm), je nach Geschlecht und Lokalisation, gezählt werden. Damit ergab sich ein prozentualer Anteil der maturen Spines an der Gesamtspinezahl von ca. 5-10%.

Anhand der vorliegenden Arbeit wird jedoch deutlich, welche große Fluktuation, d.h. Plastizität, die maturen Spines unterliegen.

Es wurde bereits festgestellt, dass diese Plastizität u.a. von Alter, Krankheit, Lokalisation, Geschlecht und Zyklusstadium abhängig ist. Damit stellt die Betrachtung der absoluten Zahl der maturen Spines lediglich eine Momentaufnahme dar und muss als Teil einer Dynamik gesehen werden. Nicht immer wird in der Literatur eine Unterteilung der Spines vorgenommen; diejenigen Arbeitsgruppen, die vergleichbar mit dieser Arbeit Spines differenzierten, beschrieben jedoch ähnliche Werte von ca. 0,1-0,2 maturen Spines/ μm Dendritenabschnitt, bzw. einem prozentualen Anteil von um die 10% (Matsuzaki et al. 2001; Morley u. Mervis 2013). Teils finden sich erheblich abweichende Messungen, so beschreiben Li und Kollegen ca. 1 maturen Spine/ μm . Allerdings wurde hier rein morphologisch anhand der Spineköpfchenausbildung, ohne entsprechende Messung des Durchmessers, klassifiziert (Li et al. 2012).

Dass sich je nach Lokalisation der untersuchten Dendritenabschnitte die Anzahl der Spines signifikant unterscheidet, ist aus morphologischen Studien bekannt (s. 1.1.3). Auch hier konnte festgestellt werden, dass sich basal insgesamt weniger Spines finden, wobei dieser Unterschied sowohl im geschlechtsübergreifenden Mittel als auch im Männchen separat gesehen signifikant ist, nicht jedoch im Weibchen. Interessanterweise ist der Unterschied bei der Dichte maturer Spines zwischen apikalen und basalen Dendriten jedoch bei beiden Geschlechtern signifikant. Apikal finden sich fast zweimal so viele mature Spines wie basal. Dies mag aus den unterschiedlichen synaptischen Eingängen (s. 1.1.2) resultieren. Erstaunlicherweise waren direkte Vergleiche zwischen der Dichte maturer Spines der beiden Dendritenbäume bisher kaum Gegenstand von Untersuchungen. Meist wurden Spines insgesamt gezählt, oder die nähere Betrachtung der Morphologie war nur nebensächlich analysiert worden.

5.5 Spineuntersuchungen tragen zum Krankheitsverständnis bei

Um den Bogen über die methodischen Aspekte zurück zu den funktionellen Aspekten des sexuellen Dimorphismus im Hippocampus zu schließen, soll abschließend die Bedeutung der Geschlechtsunterschiede maturer Spines und synaptischer Plastizität im klinischen Kontext betrachtet werden. So ist bekannt, dass neben einem physiologischen altersbedingten Spine- und Spinesynapsenverlust (Dickstein et al. 2013) auch bei Krankheiten wie Morbus Alzheimer oder den Autismus-Spektrum-Störungen Veränderungen der Spinedichte- und Morphologie auftreten (Penzes et al. 2011, Selkoe 2002).

Die Untersuchung geschlechtsspezifischer Krankheitsausprägungen- und Merkmale ist nicht neu. Ebenso wurden Unterschiede der kognitiven Leistung bei Nagern und Menschen durch mehr- oder weniger komplexe Verhaltenstests bereits umfassend beleuchtet (Koss u. Frick 2017).

Inwiefern ist daher die festgestellte unterschiedliche Dichte der funktionell bedeutsamen maturaen Spines im Kontext von Krankheiten und deren sexuellem Dimorphismus von Bedeutung? Bei einer Betrachtung geschlechtsspezifischer Prävalenzen von Erkrankungen fallen zunächst keine eindeutigen Muster auf. So ist die Prävalenz von Autismus oder Aufmerksamkeits-Defizit-Syndromen in der Adoleszenz bei Jungen höher (Christensen et al. 2016). Männer sind jedoch weniger häufig von Alzheimer-Demenzkrankungen oder Schizophrenie betroffen (Gillies und McArthur 2010). Diese Komplexität resultiert aus einer Vielzahl anderer Faktoren wie Alter, (Risiko)Verhalten, Genetik oder Stress, die Einfluss auf Krankheitsentstehung- und Prävalenz nehmen. Somit ist die Übertragung von Befunden aus Tiermodellen auf pathophysiologische Mechanismen beim Menschen mit Umsicht vorzunehmen.

Jedoch kann eine möglichst umfassende und genaue Grundlagenforschung dazu beitragen zu klären, wie diese Faktoren zelluläre Mechanismen stören und wodurch diese Störungen (medikamentös) zu verhindern oder gar zu revidieren sind. Ein anschauliches und in dem Kontext dieser Arbeit relevantes Beispiel ist dabei die Auswirkung von Aromatasehemmern wie Letrozol. Diese stellen eine Säule der medikamentösen Behandlung des Brustkrebses dar und gehen teils mit deutlichen Gedächtniseinschränkungen als Nebenwirkung einher (Bayer et al. 2015). Wie bereits beschrieben konnte mittels derselben Wirkstoffe und deren Inhibierung der Estrogensynthese im Hippocampus gezeigt werden, dass die Spineanzahl und LTP-Amplitude der Weibchen signifikant sinkt (Vierk et al. 2012).

Entsprechend ist zu hoffen, dass auch die Ergebnisse dieser Arbeit einst einen Baustein eines Verständnisprozesses bilden, der dabei hilft, neue therapeutische Ansätze zu finden, o.g. Krankheiten zu behandeln. Beispielsweise würden Wirkstoffe, die spezifisch die Zirkulation systemischen Estradiols unterbinden und dabei die hirneigene Synthese nicht beeinflussen, einen pharmakologischen Meilenstein darstellen.

5.6 Ausblick

Bisherige *in-vitro*-Studien, die sich mit dem sexuellen Dimorphismus der Spinemorphologie im Hippocampus beschäftigt haben, wiesen den Vorteil auf, dass die Zyklizität von Sexualhormonen als Einflussfaktor ausgeschaltet war. Untersucht man Geschlechtsunterschiede *in-vivo*, ergibt sich die Tatsache, dass aus dem Zyklus der Weibchen signifikante Schwankungen der Werte resultieren. Sowohl systemische gonadale als auch neuronal synthetisierte Sexualhormone spielen dabei eine Rolle, wobei der entscheidende Einfluss letzterer in den vergangenen Jahren zunehmend evident wurde.

Folglich wäre eine weiterführende Untersuchung, welchen Stellenwert gonadale Steroide gegenüber Neurosteroiden für die beobachteten Effekte im *in-vivo*-Modell der Thy-1-Maus haben, konsequent und von Interesse. Hierzu könnten Daten von ovariectomierten bzw. orchietomierten Thy-1-Tieren gewonnen und mit den vorliegenden Ergebnissen verglichen werden. Zudem könnte mit Hilfe von Aromataseinhibitoren wie Letrozol und 5-Alpha-Reduktasehemmern wie Finasterid auch die Hormonsynthese *in-vivo* (bestenfalls sowohl bei gonadektomierten als auch nicht-gonadektomierten Mäusen) unterbunden werden und entsprechende Auswirkungen quantifiziert werden.

Betrachtet man die Befunde zu den Rezeptoren, bleibt zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt der für die Entwicklung so wichtigen perinatalen Phase, und auf welchen Einfluss hin die unterschiedliche Expression der Glutamatrezeptoren entsteht. Hier könnten Reihen zeitlich genauerer *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen helfen, nähere Eingrenzungen zu erzielen. Zudem sollte die Rezeptorexpression an adulten Weibchen mit zuvor bestimmten Zyklusabschnitt bestimmt werden, um auch hier Einflüsse von Sexualhormonen näher abgrenzen zu können.

Bekanntermaßen unterscheiden sich die neuronalen Eingänge von CA1-Pyramidenzellen basal und apikal, worauf man den in den Daten festgestellten lokalisationsabhängigen signifikanten Unterschied der Zahl maturer Spines zurückführen könnte. Diese Differenzierung entfiel bei der untersuchten Rezeptorexpression, da jeweils Proteine des gesamten Hippocampus, bzw. aller hippocampalen Zellen, gewonnen wurden. Damit kann der Einfluss anderer Zellarten, wie z.B. von Interneuronen oder Mooszellen, nicht beurteilt werden. Für eine weitere Differenzierung könnten immunhistochemische Methoden genutzt werden, um mögliche Unterschiede zu beleuchten.

Grundsätzlich stellt sich die Frage nach der biologischen Bedeutung des festgestellten sexuellen Dimorphismus. Stellt die höhere Dichte maturer Spines bei den Weibchen eine Reservemaßnahme dar, um die bekannten Schwankungen aus der sexualhormonellen Zyklizität auszugleichen? Wäre sie schließlich im Mittel so hoch wie bei den Männchen, würde es vermutlich Zyklusstadien geben, in denen die Dichte der matura Spines weit unter dem Durchschnitt der Männchen läge, woraus eventuell ein Nachteil bei Lern- und Gedächtnisprozessen resultieren würde.

Anzustreben ist der direkte Vergleich der gewonnenen Erkenntnisse mit funktionellen LTP-Studien sowie Verhaltens-, bzw. Gedächtnisuntersuchungen. In einem idealen Modell müssten hierfür an Tieren der gleichen Spezies und Zuchtlinie und des gleichen Alters Verhaltensmuster und Gedächtnisleistungen in standardisierten Verfahren verglichen werden, um im Anschluss die Spinemorphologie, Rezeptorexpression und die LTP an der gleichen hippocampalen Region zu bestimmen. Vorstellbar wäre z.B., aus den Gehirnen adulter Thy-1-Mäuse akute Schnitte zur LTP-Bestimmung zu gewinnen und diese danach immunhistochemisch auf Rezeptorexpression und Spinemorphologie zu untersuchen. Mit einer solch umfassenden Betrachtung könnten weitere Aussagen bzgl. der grundsätzlichen biologischen Bedeutung dieses sexuellen Dimorphismus getroffen werden.

6. Zusammenfassung

Ein sexueller Dimorphismus der Dichte maturer Spines an Dendriten hippocampaler CA1-Pyramidenzellen ist aus *in-vitro*-Studien bekannt. Zudem gibt es funktionelle Geschlechtsunterschiede, welche sich bei der LTP- und LTD-abhängigen synaptischen Plastizität und der ihr zugrunde liegenden Mechanismen zeigen, wobei insbesondere neurosteroidalen Einflüsse eine zentrale Rolle zukommt.

Durch die vorliegende Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich dieser sexuelle Dimorphismus *in-vivo* widerspiegelt und es eine korrelierende Verteilung der am LTP beteiligten Rezeptoren von AMPA (Subtyp GluR1) und NMDA (Subtypen NMDAR1 und NMDAR2A/B) sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten gibt.

Hierzu wurde die Spinedichte und -Morphologie hippocampaler CA1-Neurone *in-vivo* fluoreszenzmikroskopisch anhand von Gewebeschnitten aus dem Thy-1-Mausmodell untersucht. Des Weiteren wurden *in-vivo* und *in-vitro* gewonnene hippocampale Proteine bzgl. der Glutamatrezeptorexpression im Geschlechtsvergleich analysiert.

Während sich die Gesamtzahl der untersuchten Spines nicht unterschied, wiesen Weibchen signifikant mehr mature Spines auf als Männchen, dies sowohl am apikalen als auch basalen Dendritenbaum hippocampaler CA1-Pyramidenzellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung der (maturen) Spines signifikant zwischen dem apikalen und basalen Dendritenbaum unterscheidet.

Die Expression beider untersuchter NMDA-Rezeptorsubtypen war *in-vivo* (adult) bei den Weibchen signifikant stärker als im Männchen, so auch z.T. *in-vivo* (P0) sowie *in-vitro* (Ratte, P0). Beim GluR1-Subtyp des AMPA-Rezeptors wurden keine klaren Unterschiede gesehen, wenngleich die Expression einen Trend zugunsten einer höheren Expression bei den Weibchen aufwies. Dabei scheint sich der sexuelle Dimorphismus zeitlich in der perinatalen Phase der Entwicklung auszuprägen.

Zusammenfassend zeigte sich im Thy-1-Modell ein sexueller Dimorphismus unter *in-vivo*-Konditionen. Die Glutamatrezeptoruntersuchungen konnten diesen zum Teil auf funktioneller Ebene bestätigen. Grundlegend konnte dargelegt werden, dass sich die bisherigen *in-vitro*-Erkenntnisse, zumindest unter Teilaspekten, auch unter *in-vivo*-Bedingungen widerspiegeln.

7. Summary

A sexual dimorphism regarding the density of mature spines of hippocampal CA1 pyramidal cells is known from *in vitro* studies. There are also clear-cut sex-dependent differences in functionality which can be observed in LTP and LTP dependant synaptic plasticity and its mechanisms for example.

This study was designed to explore whether the above-described sexual dimorphism can be seen *in vivo* and whether there is a corresponding distribution of LTP associated AMPA (subunit GluR1) and NMDA receptors (subunits NMDAR1 and NMDAR2A/B) in mice and rats.

For this, spine density and spine morphology were studied in hippocampal tissue slices from Thy-1 mice using fluorescence microscopy. Additionally, protein lysates which were won *in vivo* and *in vitro* were analysed in terms of a sexual dimorphism in glutamate receptor expression.

There was no difference in total spine density between males and females. However, females had a significantly higher number of mature spines compared to males. This held true for apical as well as basal CA1 pyramidal cells. Furthermore, there was a significant difference in (mature) spine distribution between the apical and basal dendritic tree.

Both NMDA receptor subunits showed a significantly higher expression in adult females compared to males *in vivo*. Significant differences were also shown in part at the perinatal (P0) stage *in vivo* and the perinatal (P0) stage *in vitro* (rats). No differences were seen in the expression of AMPA subunit GluR1. However, there was a trend in data towards a higher expression in females. Sexual dimorphism seems to take shape in the perinatal stage of development.

Altogether, an *in vivo* sexual dimorphism was shown using the Thy-1 model. The dimorphism was seen in correlating functional analyses. Thus, existing *in vitro* results were confirmed by *in vivo* studies, at least to some extent.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BDNF	Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (Brain-derived neurotrophic factor)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
Ca ²⁺	Calcium (ionisiert)
CA	Cornu ammonis
CD	Differenzierungscluster (Cluster of differentiation)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	„cAMP response-element binding protein“
DG	Gyrus dentatus
d.h.	das heißt
DHT	Dihydrotestosteron
DIV	Tage in vitro (Days in vitro)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E18	Embryonaltag 18
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Verstärktes grün fluoreszierendes Protein (Enhanced green fluorescent protein)
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ER	Estrogen-Rezeptor
Et al.	Et alii (und andere)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FTH	Forschungstierhaltung
G	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GluR1	Glutamat-Rezeptor, Subtyp AMPA 1

GnRH	Gonadoliberin/Gonadotropin-Releasing-Hormon
HBSS	Salzlösung nach Hank (Hank`s balanced salt solution)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
H ₀ / H ₁	Nullhypothese/ Alternativhypothese
kDa	kilo-Dalton (atomare Masseinheit)
LH	Luteinisierendes Hormon
ln	natürlicher Logarithmus
LPP	Laemmli-Probenpuffer
LTD	Langzeitdepression (Long time depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (Long time potentiation)
Mg ²⁺	Magnesium (ionisiert)
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
n	Umfang (Anzahl) der Elemente in der Stichprobe
NGS	Normales Ziegenserum (Normal goat serum)
nm	Nanometer
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMDAR	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
n.s.	nicht signifikant
o.g.	oben genannt
p	Signifikanzwert
P0	Post-Partum Alter 0 Tage (Neugeborenen)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
PSD	Postsynaptische Dichte/Densität
PSD-95	postsynaptisches Dichteprotein-95
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassaypuffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer)
s.	siehe
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecal sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard error of the mean)
sog.	sogenannte
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan

u.	und
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
vgl.	vergleiche
vs.	versus
Z.B.	Zum Beispiel
Z.T.	Zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Literatur- und Abbildungsverzeichnis

- Aenlle, KK, Kumar, A, Cui, L, Jackson, TC u. Foster, TC (2009), "Estrogen effects on cognition and hippocampal transcription in middle-aged mice", *Neurobiology of Aging*, Vol. 30, No. 6, S. 932–945.
- Amaral, D u. Lavenex, P, (2006), "*Hippocampal Neuroanatomy*" In: Andersen, P, Morris, R, Amaral, D, Bliss, T, O'Keefe, J, *The Hippocampus Book*, 1. Auflage, Oxford University Press, Kap. 3, S. 37-114.
- Andersen, P, Morris, R, Amaral, D, Bliss, T u. O'Keefe, J (2006), "Historical Perspective: Proposed Functions, Biological Characteristics, and Neurobiological Models of the Hippocampus" In: Andersen, P, Morris, R, Amaral, D, Bliss, T, O'Keefe, J, *The Hippocampus Book*, 1. Auflage, Oxford University Press, Kap. 2, S. 9-36.
- Arellano, JI, Benavides-Piccione, R, DeFelipe, J, Yuste, R (2007), "Ultrastructure of dendritic spines: Correlation between synaptic and spine morphologies", Vol. 1, No. 1, S. 131-143.
- Arnold, AP, Chen, X, Link, JC, Itoh, Y, Reue, K (2013), "Cell-autonomous sex determination outside of the gonad", *Developmental Dynamics*, Vol. 242, No. 4, S. 371-379.
- Bannister, NJ u. Larkman, AU (1995a), "Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns", *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 360, S. 150-160.
- Bannister, NJ u. Larkman, AU (1995b), "Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions", *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 360, S. 161-171.
- Barrera, A, Jimenéz, L, González, GM, Montiel, J, Aboitiz, F (2001), "Dendritic structure of single hippocampal neurons according to sex and hemisphere of origin in middle-aged and elderly human subjects", *Journal of Brain Research*, Vol. 906, S. 31-37.
- Bayer, J, Rune, GM, Schultz, H, Tobia, MJ, Mebes, I, Katzler, O, Sommer, T (2015), "The effect of estrogen synthesis inhibition on hippocampal memory", *Psychoneuroendocrinology*, Vol. 56, S. 213-225.
- Bean, LA, Ivanov, L u. Foster, TC (2014), "Estrogen receptors, the hippocampus, and memory", *Neuroscientist*, Vol. 20, No. 5, S. 534–545.
- Bourne, JN u. Harris, KM (2008), "Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines", *The Annual Review of Neuroscience*, Vol. 31, S. 47-67.
- Bowman, RE, Luine, V, Diaz Weinstein, S, Khandaker, H, DeWolf, S, Frankfurt, M (2015), "Bisphenol-A exposure during adolescence leads to enduring alterations in cognition and dendritic spine density in adult male and female rats", Vol. 69, S. 89-97.

- Brandt, N, Löffler, T, Fester, L u. Rune, GM (2020), „Sex-specific features of spine densities in the hippocampus“, *Scientific Reports*, Vol. 10, Art.-Nr. 11405, S. 1-12.
- Brandt, N u. Rune, GM (2019), "Sex-dependency of oestrogen-induced structural synaptic plasticity: Inhibition of aromatase versus application of estradiol in rodents", *European Journal of Neuroscience*, S. 1-12.
- Brandt, N, Vierk, R u. Rune, GM (2013), "Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus", *The International Journal of Developmental Biology*, Vol. 57, No. 5, S. 351–356.
- Brewer, GJ (1997), "Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons", *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 71, S. 143-155.
- Bronzino, JD, Kehoe, P, Austin, RJ, Rushmore RJ u. Kurdian J (1996), "Neonatal isolation alters LTP in freely moving juvenile rats: sex differences", *Brain Research Bulletin*, Vol. 41, No. 3, S. 175-183.
- Byers, SL, Wiles MV, Dunn, SL u. Taft, RA (2012), "Mouse estrous cycle identification tool and images", *PloS One*, Vol. 7, No. 4, S. 1-5.
- Catani, M, Dell'Acqua, F u. De Schotten, MT (2013), "A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol. 37, S. 1724-1737.
- Christensen, DL, Baio, J, Van Naarden Braun, K, Bilder, D, Charles, J, Constantino, JN, Daniels, J, Durkin, MS, Firzgerald, RT, Kurzius-Spencer, M, Lee, LC, Pettygrove, S, Robinson, C, Schulz, E, Wells, C, Wingate, MS, Zahorodny, W, Yeargin-Alisopp, M, CDC (2016), " Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012", *The Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Surveillance Summaries*, Vol. 65, No. 3, S. 1-23.
- Derkach, VA, Oh, MC, Guire, ES u. Soderling, TR (2007), "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity", *Nature Reviews. Neuroscience*, Vol. 8, S. 101–113.
- Dickstein, DL, Weaver, CM, Luebke, JI u. Hof, PR (2013), "Dendritic spine changes associated with normal aging", *Neuroscience*, Vol. 251, S. 21-32.
- Engel, J, Jr, Wiebe, S, French, J u. Sperling, M (2003), "Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy", *American Academy of Neurology*, Vol. 60, S. 538-547.
- Feng, G, Mellor, RH, Bernstein, M u. Keller, C (2000), "Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP", *Neuron*, Vol. 28, No.1, S. 41-51.

- Ferris, JK, Tse, MT u. Hamson, DK (2015), "Neuronal Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) and Astrocytic Gonadotrophin Inhibitory Hormone (GnIH) Immunoreactivity in the Adult Rat Hippocampus', *Journal of Neuroendocrinology*, Vol. 27, S. 772-786.
- Fester, L, Zhou, L, Bütow, A, Huber, C, von Lossow, R, Prange-Kiel, J, Jarry, H, Rune, GM (2009), "Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus", *Hippocampus*, Vol. 19, No. 8, S. 692-705.
- Foy, MR, Xu, J, Xie, X u. Brinton, RD (1999), "17 β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation', *Journal of Neurophysiology*, Vol. 8, No. 2, S. 925-929.
- Frankfurt, M u. Luine, V (2015), "The evolving role of dendritic spines and memory: interaction (s) with estradiol", *Hormones and Behavior*, Vol. 74, S. 28-36.
- Frick, KM (2015), "Molecular mechanisms underlying the memory-enhancing effects of estradiol", *Hormones and Behaviour*, Vol. 74, S. 4-18.
- Gazzaley, AH, Weiland, NG u. McEwen, BS (1996), "Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus", *The Journal of Neuroscience*, Vol. 16, No. 21, S. 6830-6838.
- Gillies, GE, McArthur, S (2010), "Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines", *Pharmacological Reviews*, Vol. 62, No. 2, S. 155-198.
- Good, M, Day, M u. Muir, JL (1999), "Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region", *European Journal of Neuroscience*, Vol. 11, No. 12, S. 4476-4480.
- Gould, E, Woolley, CS u. Frankfurt, M u. McEwen, BS (1990), "Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood", *The Journal of Neuroscience*, Vol. 10, No. 4, S. 1286-1291.
- Gould, E, Allan, MD, McEwen, BS (1990b), "Dendritic spine density of adult hippocampal pyramidal cells is sensitive to thyroid hormone", *Journal of Brain Research*, Vol. 525, No. 2, S. 327, 329.
- Gu, Y, Janoschka, S u. Ge, S (2012), "Neurogenesis and hippocampal plasticity in adult brain", In: Belzung C., Wigmore P. *Neurogenesis and Neural Plasticity. Current Topics in Behavioral Neurosciences*, Vol. 15, S. 31-48.
- Haeryfar, S u. Hoskin, DW (2004), "Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker", *Journal of Immunology*, Vol. 173, S. 3581-3588.
- Hebb, DO (1949), "The organization of behavior", Wiley u. Sons inc., New York, S. 62
- Hering, H u. Sheng, M (2001), "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation", *Nature Reviews. Neuroscience*, Vol. 2, S. 880-887.

- Heynen, AJ, Quinlan, EM, Bae, DC u. Bear, MF (2000), "Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo", *Neuron*, Vol. 28, S. 527–536.
- Higuera-Matas, A, Miguens, M, Coria, SM, Assis, MA, Borcel, E, del Olmo, N u. Ambrosio, E (2012), "Sex-specific disturbances of the glutamate/GABA balance in the hippocampus of adult rats subjected to adolescent cannabinoid exposure", *Neuropharmacology*, Vol. 62, No. 5-6, S. 1975-1984.
- Hojo, Y, Higo, S, Ishii, H, Ooishi, Y, Mukai, H, Murakami, G, Kominami, T, Kimoto, T, Honma, S, Poirier, D u. Kawato, S (2009), "Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus", *Endocrinology*, Vol. 150, No. 11, S. 5106-5112.
- Holtmaat, A, Trachtenberg, JT u. Wilbrecht, L (2005), "Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo", *Neuron*, Vol. 45, S. 279-291.
- Juraska, JM, Fitch, JM, Washburne, DL (1989), "The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. II. Effects of gender and the environment", *Journal of Brain Research*, Vol. 479, S. 115-119.
- Kahle, W u. Frotscher, M (2013), "Archicortex" In: Kahle, W, Frotscher M, *Taschenatlas Anatomie - 3: Nervensystem und Sinnesorgane*, 11. Auflage, Thieme, Stuttgart/New York, Kap. 7, S. 232-269.
- Kasai, H, Fukuda, M u. Watanabe, S (2010), "Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition", *Trends in Neurosciences*, Vol. 33, No. 3, S. 121-129.
- Kato, A, Hojo, Y, Higo, S, Komatsuzaki, Y, Murakami, G, Yoshino, H, Uebayashi, M, Kawato, S (2013), "Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines", *Frontiers in Neural Circuits*, Vol. 7, Art. 149, S. 1-13.
- Koss, WA, Frick, KM (2017), "Sex differences in hippocampal function", *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 95, S. 539-562.
- Kretz, O, Fester, L, Wehrenberg, U, Zhou, L, Brauckmann, S, Zhao, S, Prange-Kiel, J, Naumann, T, Jarry, H, Frotscher, M u. Rune, GM (2004), "Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis", *Journal of Neuroscience*, Vol. 24, No. 26, S. 5913–5921.
- Leranth, C, Prange-Kiel, J, Frick, KM, Horváth, TL (2004), "Low CA1 spine synapse density is further reduced by castration in male non-human primates.", *Cerebral Cortex*, Vol. 14, S. 503-510.

- Li, M, Masugi, M, Takanami, K, Yamada u. S, Kawara, M (2012), "Testosterone has sublayer-specific effects on dendritic spine maturation mediated by BDNF and PSD-95 in pyramidal neurons in the hippocampus CA1 area", *Brain Research*, Vol. 1484, S. 76-84.
- Markham, JA, McKian, KP, Stroup, TS, Juraska, JM (2005), " Sexually Dimorphic Aging of Dendritic Morphology in CA1 of Hippocampus", *Hippocampus*, Vol. 15, S. 97-103.
- Martin, SJ, Grimwood, PD u. Morris, RG (2000), "Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis", *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 23, S. 649–711.
- Matsuzaki, M, Ellis, G, Nemoto, T, Miyashita, Y, Iino M u. Kasai, H (2001), "Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons", *Nature Neuroscience*, Vol. 4, No. 11, S. 1086-1092.
- McCarthy, MM, Arnold, AP (2011), "Reframing sexual differentiation of the brain", *Nature Neuroscience*, Vol. 14, No. 6, S. 677-683.
- Ming, G-L u. Song, H (2011), "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions.", *Neuron*, Vol. 70, S. 687–702.
- Monfort, P, Gomez-Gimenez, B, Llansola, M u. Felipo, V (2015), "Gender differences in spatial learning, synaptic activity, and long-term potentiation in the hippocampus in rats: molecular mechanisms", *ACS Chemical Neuroscience*, Vol. 6, No. 8, S. 1420-1427.
- Montoya, D u. Carrer, HF (1997), "Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats", *Brain Research*, Vol. 778, S. 430-438.
- Morley, BJ u. Mervis, RF (2013), "Dendritic spine alterations in the hippocampus and parietal cortex of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mice", *Neuroscience*, Vol. 233, S. 54-63.
- Müller-Esterl, W, Brandt, U, Anderka, O, Kerschner S, Voelcker, G u. Greiner, I (2010a), "Ionenpumpen und Membrankanäle" In: Müller-Esterl, W, Brandt, U, Anderka, O, Kerschner S, Voelcker, G, Greiner, I, *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Kapitel 26, S. 345-361.
- Müller-Esterl, W, Brandt, U, Anderka, O, Kerschner S, Voelcker, G u. Greiner, I (2010b), "Neuronale Erregung und Transmission" In: Müller-Esterl, W, Brandt, U, Anderka, O, Kerschner S, Voelcker, G, Greiner, I, *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Kapitel 32, S. 349-465.

- Müller-Esterl, W, Brandt, U, Anderka, O, Kerscher S, Voelcker, G u. Greiner, I (2010c), "Hormonelle Steuerung komplexer Systeme" In: Müller-Esterl, W, Brandt, U, Anderka, O, Kerscher S, Voelcker, G, Greiner, I, *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Kapitel 32, S. 409-431.
- Murakami, G, Tsurugizawa, T, Hatanaka, Y, Komatsuzaki, Y, Tanabe, N, Mukai, H, Hojo, Y, Kominami, S, Yamazaki, T, Kimoto, T u. Kawato, S (2006), "Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 351, S. 553-558.
- Nicoll, RA (2017), "A Brief History of Long-Term Potentiation", *Neuron*, Vol. 93, No. 2, S. 281–290.
- Oberlander, JG u. Wooley, CS (2017), "17 β -Estradiol acutely potentiates glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus through distinct mechanisms in males and females", *Journal of Neuroscience*, Vol. 37, No. 50, S. 12314-12327.
- Ooishi, Y, Kawato, S, Hojo, Y, Hatanaka, Y, Higo, S, Murakami, G, Komatsuzaku, Y, Ogiue-Ikeda, Kimoto, T, Mukai, H (2012), "Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen", *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 131, No.1-2, S. 37-51.
- Pape, HC (2009), "Integrative Funktionen des Gehirns" In: Klinke, R, Pape, HC, Kurtz, A, Silbernagl, S, *Physiologie*, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart/New York, Kap. 25, S. 816 ff.
- Papez, JW (1937), "A Proposed Mechanism of Emotion", *Archives of Neurology and Psychiatry*, Vol. 38, No. 4, S. 725-743.
- Pelletier, G (2010), "Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects", *Progress in Brain Research*, Vol. 181, S. 193-207.
- Penzes, P, Cahill, ME, Jones, KA u. VanLeeuwen, JE (2011), "Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders", *Nature Neurosciece*, Vol. 14, No. 3, S. 285-293.
- Prange-Kiel, J, Fester, L, Zhou, L, Jarry, H u. Rune, GM (2009), "Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms.", *Journal of Neural Transmission*, Vol. 116, No. 11, S. 1417-1425.
- Prange-Kiel, J, Jarry, H, Schoen, M, Kohlmann, P, Lohse, C, Zhou, L u. Rune, GM (2008), "Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis", *Journal of Cell Biology*, Vol. 180, No.2, S. 417-426.
- Prange-Kiel, J, Wehrenberg, U u. Jarry, H (2003), "Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons", *Hippocampus*, Vol. 13, No. 2, S. 226-234.
- Robinson, JL, Barron, DS u. Kirby, L (2015), "Neurofunctional topography of the human hippocampus", *Human Brain Mapping*, Vol. 36, No. 12, S. 5018-5037.

- Salas-Ramirez, KY, Frankfurt, M, Alexander, A, Luine, VN, Friedman, E (2010), "Prenatal cocaine exposure increases anxiety, impairs cognitive function and increases dendritic spine density in adult rats: influence of sex", *Neuroscience*, Vol. 169, No. 3, S. 1287-1295.
- Sanz-Clemente A, Nicoll, RA, Roche, KW (2013), "Diversity in NMDA Receptor composition: many regulators, many consequences", *Neuroscientist*, Vol. 19, No.1, S. 62-75.
- Scoville, WB u. Milner, B (1957), "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions", *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, Vol. 20, No. 1, S.11-21.
- Selkoe, DJ (2002), "Alzheimer's disease is a synaptic failure", *Science*, Vol. 298, No. 5594, S. 789-791.
- Sheppard, PAS, Choleris, E, Galea, LAM (2019), "Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents", *Molecular Brain*, Vol. 12, Art. 22, S. 1-17.
- Shibuya, K, Takata, N, Hojo, Y, Furukawa, A, Yasumatsu, N, Kimoto, T, Enami, T, Suzuki, K, Tanabe, N, Ishii, H, Mukai, H, Takahashi, T, Hattori, T u. Kawato, S (2003), "Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1619, No. 3, S. 301-316.
- Shimomura, O (2005), "The discovery of aequorin and green fluorescent protein", *Journal of Microscopy*, Vol. 217, S. 3-15.
- Sorra, KE u. Harris, KM (2000), "Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines", *Hippocampus*, Vol. 10, No. 5, S. 501-511.
- Spencer, JL, Waters, EM, Milner, TA u. McEwen, BS (2008), "Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice", *Neuroscience*, Vol. 162, No. 4, S. 1106-1119.
- Spruston, N (2008), "Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration", *Nature Reviews. Neuroscience*, Vol. 9, No. 3, S. 206-221.
- Spruston, N u. McBain, C (2006), *Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons* In: Andersen, P, Morris, R, Amaral, D, Bliss, T, O'Keefe, J, *The Hippocampus Book*, 1. Auflage, Oxford University Press, Kap. 5, S. 133-202.
- Stuchlik, A (2014), "Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update", *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, Vol. 8, No. 106, S. 1-6.
- Tada, T u. Sheng, M (2006), "Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis", *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 16, No.1, S. 95-101.
- Ultanir, SK, Kim, JE, Hall, BJ, Deerinck, T, Ellisman, M u. Ghosh, A (2007), "Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 104, No. 49, S. 19553-19558.

- Vierk, R, Glassmeier, G, Zhou, L, Brandt, N, Fester, L, Dudzinski, D, Wilkars, W, Bender, RA, Lewerenz, M, Gloger, S, Graser, L, Schwarz, J u. Rune, GM (2012), "Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice", *Journal of Neuroscience*, Vol. 32, No. 24, pp. 8116–8126.
- Vierk, R, Bayer, J, Freitag, S, Muhia, M, Kutsche, K, Wolbers, T, Kneussel, M, Sommer-Blöchl, T u. Rune, GM (2015), "Structure-function-behavior relationship in estrogen-induced synaptic plasticity", *Hormones and Behavior*, Vol. 74, S. 139-148.
- RS, Jensen, ON, Mann, M, William Provan Jr, D, Mercer, JA, Kennedy, MB (2000), "Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry", *The Journal of Neuroscience*, Vol. 20, No. 11, S. 4069-4080.
- Warren, SG, Humphreys, AG u. Juraska, JM (1995), "LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats", *Brain Research*, Vol. 703, No. 1-2, S. 26-30.
- Won, S, Incontro, S, Nicoll, RA, Roche, KW (2016), "PSD-95 stabilizes NMDA receptors by inducing the degradation of STEP61", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 113, No. 32, S. E4736-E4744.
- Woolley, CS u. McEwen, BS (1994), "Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism", *Journal of Neuroscience*, Vol. 14, No. 12, S. 7680-7687.
- Woolley, CS, Gould, E u. Frankfurt, M (1990), "Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons", *Journal of Neuroscience*, Vol. 10, No. 12, S. 4035-4039.
- Woolley, CS, Weiland, NG u. McEwen, BS (1997), "Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density", *Journal of Neuroscience*, Vol. 17, No. 5, S. 1848-1859.
- Yang, DW, Pan, B, Han, TZ u. Xie, W (2004), "Sexual dimorphism in the induction of LTP: critical role of tetanizing stimulation", *Life Sciences*, Vol. 75., No.1, S. 119-127.
- Yuste, R u. Bonhoeffer, T (2001), "Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity", *Annual Reviews Neuroscience*, Vol. 24, S. 1071-1089.
- Zhou, L, Fester, L, von Blittersdorf, B, Hassu, B, Nogens, H, Prange-Kiel, J, Jarry, H, Wegscheider, K, Rune, GM (2010), "Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice.", *Endocrinology*, Vol. 151, No. 3, S. 1153-1160.

- Zhou, L, Fester, L, Haghshenas, S, de Vrese, X, von Hacht, R, Gloger, S, Brandt, N, Bader, M, Vollmer, G, Rune, GM (2014), "Oestradiol-induced synapse formation in the female hippocampus: roles of oestrogen receptor subtypes", *Journal of Endocrinology*, Vol. 26, No. 7, S. 439-447.
- Zuena, AR, Mairesse, J, Casolini, P u. Cinque, C (2008), "Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats", *Plos One*, Vol. 3, No. 5, S. 1-13.
- Zuo, Y, Lin, A, Chang, P u. Gan, WB (2005), "Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex", *Neuron*, Vol. 46, No. 2, S. 181-189.

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Brandt, N¹, Löffler, T¹, Fester, L u. Rune, GM (2020), „Sex-specific features of spine densities in the hippocampus“, *Scientific Reports*, Vol. 10, Art.-Nr. 11405, S. 1-12. (¹Co-Autoren)

Abbildungen aus bereits veröffentlichten Werken

Abbildung 1: Witter u. Amaral (2004), "Hippocampal Formation", In: Paxinos, G, *The Rat Nervous System*, 3. Auflage, Elsevier, San Diego, USA, S. 638.

Abbildung 2: Mense, S (2010), "ZNS – funktionelle Systeme", In: Aumüller, G, Aust, G, Doll, A, Engele, J, Kirsch, J, Mense, S, Reißig, D, Salvetter, J, Schmidt, W, Schmitz, F, Schulte, E, Spanel-Borowski, K, Wolff, W, Wurzinger, LJ, Zilch, H, *Duale Reihe Anatomie* 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, Kapitel 2.3.2, S. 1146.

Abbildung 3: Hering, H u. Sheng, M (2001), "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation", *Nature Reviews. Neuroscience*, Vol. 2, S. 881.

Abbildung 14: Miller u. Takahashi (2014), "Central circadian control of female reproductive function", *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol. 4, Art. 195, S. 2.

Alle weiteren Abbildungen wurden aus eigenen Daten erstellt bzw. eigenen mikroskopischen Aufnahmen entnommen.

10. Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune für die Vergabe dieser Arbeit und die Möglichkeit, an ihrem Institut wissenschaftlich zu arbeiten.

Frau Dr. Nicola Brandt und Prof. Dr. Roland Bender, den Betreuern meiner Doktorarbeit, gilt mein besonderer Dank für die Formulierung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Forschungsarbeiten sowie der Abfassung der Arbeit.

Große Unterstützung in allen mathematisch-statistischen Fragen erfuhr ich durch Prof. Dr. Lars Fester, dem ich herzlich danke.

Ohne die Arbeit und Unterstützung der Technischen Assistenten ist die Grundlagenforschung im Labor nur schlecht möglich; dies gilt insbesondere i.R. der Dissertation. Daher möchte ich mich hierfür bei allen technischen Angestellten bedanken, explizit aber bei Frau Herdis Hamann und Frau Christiane Schröder-Birkner.

Die Arbeit im Institut der Anatomie werde ich als erfahrungsreichen Abschnitt meiner Ausbildung in Erinnerung behalten und nicht missen wollen.

Mein Dank gilt über die o.g. Personen hinaus allen weiteren Mitarbeitern, sowie Mitdoktoranden der Anatomie, die mich an verschiedensten Stellen unterstützt haben bzw. stets für kurzweilige Atmosphäre sorgten. Hier seien Benjamin Bay sowie Phillip Bittorf erwähnt.

11. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

12. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift:

Tobias Löffler