

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Anatomie I  
Zelluläre Neurobiologie

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

## **Testosteron-induzierte synaptische Plastizität im männlichen und weiblichen Hippocampus**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Simon Manfred Maria Kind  
aus Fulda, Hessen

Hamburg 2016

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.12.2017**

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

**Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Gabriele Rune**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Markus Glatzel**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Jens Aberle**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>3-4</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>5-23</b>
2.1. Einführung	5-6
2.2. Der Hippocampus	
2.2.1. Anatomie	7-8
2.2.2. Histologie	8-10
2.3. Hippocampaler sexueller Dimorphismus	10-14
2.4. Neuronen und Synapsen	
2.4.1. Anatomie	14-15
2.4.2. Synaptische Plastizität	15
2.5. Enzyme und deren Bedeutung für den Hippocampus	
2.5.1. Aromatase	15-16
2.5.2. 5 $\alpha$ -Reduktase	16-18
2.6. Estrogen und dessen Funktion im Hippocampus	19-20
2.7. Androgene im Hippocampus	
2.7.1. Synthese	20
2.7.2. Rezeptor	20-21
2.7.3. Einfluss von Sexualsteroiden auf synaptische Plastizität	21-22
2.7.4. Flutamid und Finasterid	23
<b>3. Material</b>	<b>24-31</b>
3.1. Geräte	24-25
3.2. Arbeitsmaterialien	25
3.3. Chemikalien	25-27
3.4. Antikörper	27
3.5. Software	28
3.6. Lösungen	28-31
<b>4. Methoden</b>	<b>32-44</b>
4.1. Verwendete Tiere	32
4.2. Präparation der Hippocampi	32
4.3. Herstellung und Fixierung der Slicekulturen	
4.3.1. Kultivierung	33-35
4.3.2. Immunhistochemie	35-37
4.3.3. Elektronenmikroskopische Fixierung	37-38
4.4. Bildanalyse	
4.4.1. Immunhistochemie	38
4.4.2. Elektronenmikroskopie	38-39
4.5. Western-Blot	
4.5.1. SDS-Page	39-40
4.5.2. Blotten	40-41
4.5.3. Vorgehen	41-44

---

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>45-60</b>
5.1. <i>Elektronenmikroskopie</i>	45-46
5.1.1. <i>Die Dichte an Spinesynapsen ist im weiblichen höher als im männlichen Hippocampus</i>	46
5.1.2. <i>Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM DHT, Letrozol, Trilostan, DHT plus Letrozol und DHT plus Trilostan</i>	47-48
5.1.3. <i>Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM Flutamid, Finasterid, DHT, Flutamid plus DHT und Finasterid plus DHT</i>	49-51
5.1.4. <i>Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM E2, E2 plus Flutamid, ICI und Flutamid</i>	51-52
5.1.5. <i>Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM Finasterid, DMSO und 10 nM Finasterid, DMSO</i>	52-54
5.1.6. <i>Elektronenmikroskopische Beispielbilder</i>	54-57
5.2. <i>Immunhistochemie</i>	57-58
5.3. <i>Western Blots</i>	59-60
<b>6. Diskussion und Zusammenfassung</b>	<b>61-67</b>
6.1. <i>E2 ist essentiell für die Erhaltung von Spinesynapsen im weiblichen, nicht jedoch im männlichen Hippocampus</i>	61-63
6.2. <i>Nach Hemmung des Schlüsselenzymes der Testosteronproduktion und der Androgenrezeptoren kommt es zum Verlust an Spinesynapsen im männlichen Hippocampus</i>	63-66
6.3. <i>Zusammenfassung mit kritischer Beurteilung der Experimente, Summary</i>	66-67
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>68-78</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>79</b>
<b>9. Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen</b>	<b>80-81</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>82</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

5 $\alpha$ -R	5 $\alpha$ -Reduktase
°C	Grad Celsius
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mirkometer
$\mu$ m <sup>3</sup>	Kubikmikrometer
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
ant.	anterior
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgenrezeptor
Aro	Aromatase
Aufl.	Auflage
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	circa
CA	Cornu ammonis
CA1	Cornu ammonis Region 1
CA2	Cornu ammonis Region 2
CA3	Cornu ammonis Region 3
CICR	calcium-induzierter Calcium-Release
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element binding protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DG	Gyrus dentatus
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DHT	Dihydrotestosteron
d.h.	das heißt
E1	Estron
E2	17- $\beta$ -Estradiol
EM	Elektronenmikroskopie
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ER	Estrogenrezeptor
ER- $\alpha$	Estrogenrezeptor Alpha
ER- $\beta$	Estrogenrezeptor Beta
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera
Fig.	Figure
FSH	follicle-stimulating hormone
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
h	Stunde

HRE	Hormon Response Element
HRP	Horseradish peroxidase
HSS	Hypothalamus-Hypophysen-System
H <sub>2</sub> O	Wasser
l	Liter
LH	luteinizing hormone
LSM	laser scanning microscope
LTP	long term potentiation (Langzeitpotenzierung)
M	Molar
männl.	männlich
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated-protein-Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol ( 1 mol = 6,023 × 10 <sup>23</sup> Moleküle )
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Ncl.	Nucleus
nM	nano Molar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nr.	Nummer
p	Signifikanzniveau
P5	postnataler Tag 5
P24	postnataler Tag 24
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PFC	präfrontaler Cortex
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pH	pondus Hydrogenii
S.	Seite
SCC P <sub>450</sub>	side chain cleavage enzyme
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sog.	sogenannte/r
SPSS	Statistical Package for the Social Science
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
v.a.	vor allem
weibl.	weiblich
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 2. Einleitung

### 2.1 Einführung

Das menschliche Gehirn steht als zentrales Organ im Mittelpunkt körperlicher Aktivitäten und Verhaltensweisen. In ihm werden erlernte Inhalte gespeichert und verarbeitet. Es erhält alle wichtigen Informationen des Körpers und sendet Befehle in die Peripherie. Dabei ist die Regulation des Gehirns sehr komplex und hängt sowohl von äußerlichen Faktoren, als auch von endogenen Mechanismen ab. So haben vor allem Hormone, die chemischen Botenstoffe des menschlichen Körpers, eine wichtige Rolle in der Übermittlung von Informationen. Sie sorgen für eine ausgeglichene Aktivität der organischen Funktionen, indem sie in das Blut abgegeben werden und am Erfolgsorgan auf unterschiedliche Art und Weise wirken. Sie binden an einen Rezeptor und üben im Folgenden ihren Einfluss auf Stoffwechselprozesse und Enzymkaskaden aus. Es gibt eine Vielzahl von Regelkreisen, über die unsere physiologischen Aktivitäten und unser Verhalten gesteuert werden. Das Hypothalamus-Hypophysen-System steht im Mittelpunkt dieser Kreise, denn es empfängt und entsendet den größten Teil aller Signale des Körpers und bildet somit ein integratives Zentrum der Informationsverarbeitung.

Der Hippocampus ist ein wichtiges Integrationsorgan im Gehirn, welches Impulse empfängt und entsendet, indem es afferente Verbindungen zum Hypothalamus, zu den Septumkernen und zum Gyrus cinguli aufbaut. Damit ist es in den Schaltkreis von emotionalen, endokrinen und viszeralen Prozessen eingebettet und beeinflusst diese maßgebend. Der Estrogen- und Testosterongehalt des Serums beeinflusst die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus, wodurch die Sekretion von LH und FSH aus der Hypophyse reguliert wird. Diese wiederum verstärken durch Bindung an die jeweiligen Rezeptoren die Estradiolsynthese in den Granulosazellen des Ovars bzw. die Testosteronproduktion in den Leydigzellen des Hodens. Somit ergibt sich ein geschlossener Regulationsmechanismus in der Weise, dass die Steroide des Serums je nach Gehalt über einen Feedback die GnRH-Sekretion aus dem Hypothalamus bewirken (Meethal et al., 2009). Der Hippocampus ist für die Informationsübertragung vom Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis verantwortlich. Wenn er aus beiden Temporallappen entfernt wird, z.B. um Epilepsien zu behandeln, so führt dies zu drastischer Reduktion der Gedächtnisleistung. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Patient Henry Gustav Molaison (1926-2008), bei dem eine inkurable Epilepsie durch Entfernung beider Hippocampi geheilt wurde. Dies hatte jedoch eine anterograde Amnesie zur Folge. Voraussetzung für Lernprozesse ist das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP), welches im Hippocampus besonders stark ausgeprägt ist. Aufgrund seines komplexen Aufbaus und seiner endokrinen Funktionen ist der Hippocampus in den letzten Jahren mehr und mehr in den Mittelpunkt der neurologischen Forschung geraten. Durch seine endokrine Aktivität beeinflusst dieses im Archicortex gelegene Organ Lernprozesse, Gedächtnisleistung und Merkfähigkeit. Hippocampales Gewebe ist in der Lage durch das Vorkommen aller notwendigen Enzyme Steroidhormone *de novo* zu synthetisieren, die in der Folge parakrin und autokrin wirken und so die neuronale Entwicklung und Differenzierung steuern (Prange-Kiel et al., 2003). Man kann diese Steroide daher auch als Neurosteroiden bezeichnen. Synapsen, die der Informationsübermittlung zwischen Neuronen dienen, stehen unter dem Einfluss der hippocampalen Steroidhormone. Ihre Dichte kann als ein Maß für synaptische

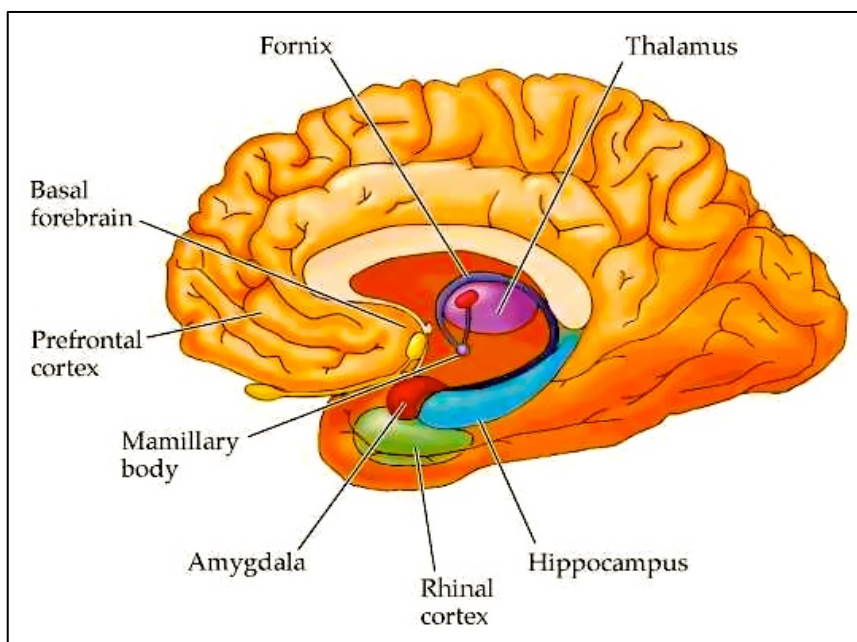
Plastizität und damit einhergehende Gedächtnisleistung gesehen werden. So wurde in der Vergangenheit nachgewiesen, dass Estrogene die Morphologie im Hippocampus verändern können, indem sie Einfluss auf Spinogenese und Synaptogenese nehmen (Gould et al., 1990; Segal und Murphy, 2001; McEwen, 2001; Li et al., 2004). McEwen konnte in den frühen 1990er Jahren z.B. zeigen, dass die Resektion der Ovarien zu einem Verlust postsynaptischer dendritischer Spines in der CA1-Region des Hippocampus führt. Die Applikation von exogenem Estradiol konnte diesen Effekt aufheben. Eine Vielzahl von Experimenten der letzten Jahre untersuchte hauptsächlich den Effekt von exogen applizierten Estradiol auf synaptische Plastizität im Hippocampus (siehe Review von Spencer et al., 2008). Man konzentrierte sich weniger auf den Einfluss der lokal gebildeten Neurosteroiden. Erst kürzlich zeigten Fester et al. (2009), dass die Behandlung hippocampaler Slice-Kulturen der CA1-Region mit Letrozol, einem Inhibitor der estrogenbildenden Aromatase, zu einer signifikanten Reduktion der Spinesynapsendichte, der Expression synaptischer Markerproteine und der LTP im Weibchen führt. Hierbei stellte man fest, dass eine exogene E2-Applikation die hemmenden Effekte des Letrozols aufheben kann. Man kam zu dem Erkenntnis, dass der Estrogen-Einfluss auf die Synapsendichte sehr spezifisch für die CA1-Region ist und vermutlich auf die Wirkung der Schaffer-Kollaterale zurückzuführen ist, die die CA3-Region mit der CA1-Region verbinden (die höchste Expression des ER (auf mRNA und Proteinebene), der Aromatase und des StAR findet man in der CA1-Region). Auch bei Tieren, denen die Ovarien (Hauptquelle von Estradiol im Weibchen) entfernt wurden, zeigte sich unter der Gabe von Letrozol ein deutlicher Spinesynapsenverlust, was wiederum die Wichtigkeit der lokal im Hippocampus synthetisierten Steroidhormone belegt. Erstaunlicherweise zeigte die gleiche Behandlung im Männchen einen gegenläufigen Effekt, in der Weise, dass die sieben-tägige Letrozol-Applikation zu einem tendenziellen Anstieg der Spinesynapsendichte führte (Fester et al., 2012). Damit scheint der Verlust von Spinesynapsen nach Aromataseinhibition spezifisch für Weibchen zu sein. Im Männchen müsste es durch die Blockade des estrogenbildenden Enzymes zu einem größeren Angebot an Testosteron kommen, welches in Folge der höheren Substratkonzentration in seinen aktiveren Metaboliten DHT umgewandelt werden kann. Bei Versuchen, die *in vitro* durchgeführt wurden, stellten Fester et al. fest, dass sich die Kapazität der E2-Synthese in dissoziierten einzelnen Neuronen zwischen Weibchen und Männchen nicht unterscheidet, wohingegen der E2-Gehalt unter *in vivo*-Bedingungen im weiblichen Hippocampus höher als im männlichen ist. Diese *in vitro*-*in vivo*-Diskrepanz lässt eine geschlechtsspezifische Regulation der Neurosteroidsynthese und eine damit einhergehende unterschiedliche Beeinflussung der Neurosteroiden auf synaptische Plastizität im Hippocampus vermuten. Welchen Einfluss das Androgen DHT, das nicht in Estradiol transformierbar ist, auf die Dichte von Synapsen im Hippocampus hat, wird in dieser Arbeit untersucht. Zudem soll der unterschiedlichen Expression des zentralen Enzymes der DHT-Bildung (5 $\alpha$ -Reduktase) im Weibchen und Männchen nachgegangen werden.



## 2.2 Der Hippocampus

### 2.2.1 Anatomie

Der paarige Hippocampus befindet sich im Lobus temporalis des Endhirns am Rand der Seitenventrikel und bildet den Hauptteil des sogenannten Archicortex, welcher entwicklungsgeschichtlich aus dem Archipallium hervorgeht und sich im Laufe der embryonalen Entwicklung zum Ammonshorn (Cornu ammonis) einrollt. Dieses wird von einer Faserschicht bedeckt, die Efferenzen enthält (Alveus hippocampi). Durch seine Lage bildet der zum limbischen System gehörende Hippocampus den medial basalen Abschluss der Hemisphären des Großhirns. Nach kaudal-dorsal grenzt er an das Corpus callosum, von wo aus er sich als Indusium griseum an der Oberfläche des Corpus callosum bis zur Commissura anterior erstreckt. Überlagert wird er vom Gyrus parahippocampalis. Dieser enthält das Subiculum, welches dem Gyrus dentatus direkt anliegt und in dem sich aus dem Cingulum kommende Afferenzen sammeln. Dorsal gelegen befindet sich das sog. Faserband (Fimbria hippocampi), das aus dem Hippocampus hervorgeht und unterhalb des Balkens am Rand des 3. Ventrikels als Fornix zu den Corpora mamillaria führt. Neben einigen Nervenfasern, die den Hippocampus über die Stria longitudinalis verlassen, enthält der Fornix alle Efferenzen, die in der Septumregion, der Regio praeoptica, dem Hypothalamus und den Corpora mamillaria enden. Die wichtigsten Afferenzen ziehen über die Regio entorhinalis und den Tractus perforans aus den Riechzentren in den Hippocampus, um an den Dendriten der Pyramidenzellen synaptische Kontakte zu bilden. Betrachtet man den Hippocampus von lateral-kranial, so erscheint er als eine Art Wulst, der sich aus dem Pes hippocampi (Fuß) und den Digitationes hippocampi (Vorwölbungen, die an Finger erinnern) zusammensetzt.



**Abb.1:** Lage des Hippocampus im medialen Teil des Lobus temporalis.

Quelle:

[http://www.chaz.org/Courses/Sapir\\_Whorf/Brain\\_language/Hippocampus.png](http://www.chaz.org/Courses/Sapir_Whorf/Brain_language/Hippocampus.png)

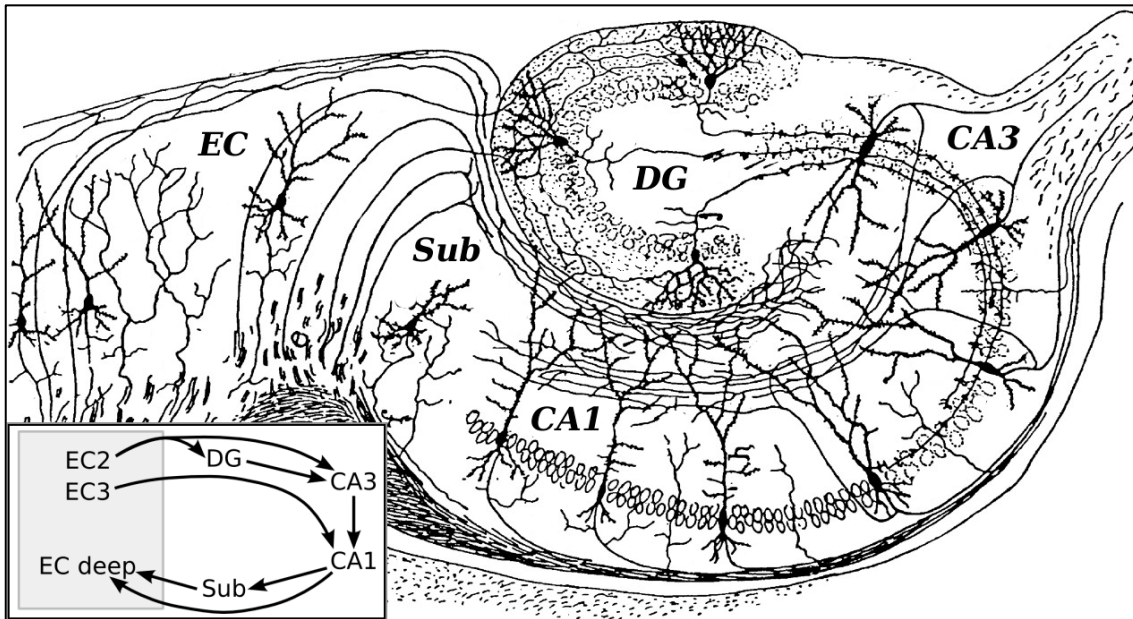
Innerhalb des komplexen Systems aus Afferenzen und Efferenzen lässt sich ein großer und wichtiger Neuronenkreis (sog. Papez-Neuronenkreis) identifizieren, der Teil des limbischen Systems ist. Er wird aus hippocampalen Efferenzen gebildet, die über den Fornix zum Corpus mamillare ziehen, dort auf das Vicq d'Azyr-Bündel umgeschaltet werden, dann Verbindung zum Nucleus ant. thalami haben, um von dort aus über den Gyrus cinguli und das sich anschließende Cingulum als afferente Fasern wieder zurück zum Hippocampus zu laufen. Funktionell gehören mehrere Strukturen wie z.B. die Regio entorhinalis zum Hippocampus, weshalb viele Anatomen auch von der sog. Hippocampusformation sprechen.

### 2.2.2 Histologie

Evolutionär gehört die Hippocampusformation zu den ältesten Strukturen des menschlichen Gehirns. Der Hippocampus weist im Gegensatz zum evolutionsgeschichtlich jüngeren Isocortex keinen sechsschichtigen Aufbau (mit Lamina molecularis, Lamina granularis externa, Lamina pyramidalis externa, Lamina granularis interna, Lamina pyramidalis interna und Lamina multiformis) auf, sondern besteht im Bereich des Gyrus dentatus im Wesentlichen nur aus 3 Schichten (Stratum granulosum (dicht geordnete Körnerzellen), Stratum moleculare (eher zellarm), polymorphe Zellschicht im Bereich des Hilus). Er ist Teil des limbischen Systems und erhält eine Vielzahl vorverarbeiteter Informationen, die er wiederum an den Hypothalamus, die Septumkerne und den Gyrus cinguli weiterleitet und somit den Fluss von Informationen maßgeblich beeinflusst. Dadurch wird die Struktur, die nach dem lateinischen Wort „Seepferdchen“ benannt wurde, in emotionale, viszerale und endokrine Abläufe im Körper eingeschaltet. Auch für große Denkleistungen ist der Hippocampus ein wichtiges Strukturelement, da er Kontakt zum kognitiven Neocortex aufbaut (Squire et al., 1986). Eine ganz besondere Bedeutung kommt dieser evolutionär alten Struktur durch seine Fähigkeit der Neurogenese zu, die ihn postnatal dazu befähigt, lebenslang neue Neurone zu bilden und somit die plastische Struktur und die sich daraus ergebende bessere Lern- und Merkfähigkeit zu verändern (Altmann et al., 1965; Kempermann et al., 1997/2004; Cameron und McKay, 1998; Gage et al., 2002; Alvarez\_Buylla und Lim, 2004). Für die Übermittlung von Informationen vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis spielt das „Seepferdchen“ die zentrale Rolle. Kommt es aufgrund pathologischer Prozesse zu einer Destruktion beider Hippocampi oder sterben Neurone in diesem Bereich ab, so entsteht eine Lücke in der Gedächtnisbildung und die Denkleistungen nehmen stark ab. Auch bei Epilepsien können hippocampale Neurone mit Spontanentladungen für epileptische Anfälle sorgen (zum Beispiel im Rahmen eines Tumors, Meyer et al., 1955).

Grundlegend besteht der Hippocampus aus der Region des Gyrus dentatus (Fascia dentata) mit dicht gepackten Körnerzellen, dem Ammonshorn (Cornu ammonis) und dem Subiculum. Das Cornu ammonis wird aufgrund struktureller Unterschiede weiter unterteilt in die Bereiche CA1, CA2 und CA3, wobei die Region 1 viele kleine Pyramidenzellen, die CA2-Region eher große Pyramidenzellen und der CA3-Sektor eher locker gepackte Zellen enthält (Nomenklatur von Lorente de Nò (1934)). An eine oberflächliche Schicht aus Fasern (Alveus) schließt sich das

Stratum oriens an, welches die Axone der angrenzenden Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale) mit glutamatergen Neuronen enthält. Dieser Zellschicht schließt sich das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare mit synaptischen Verschaltungen an.



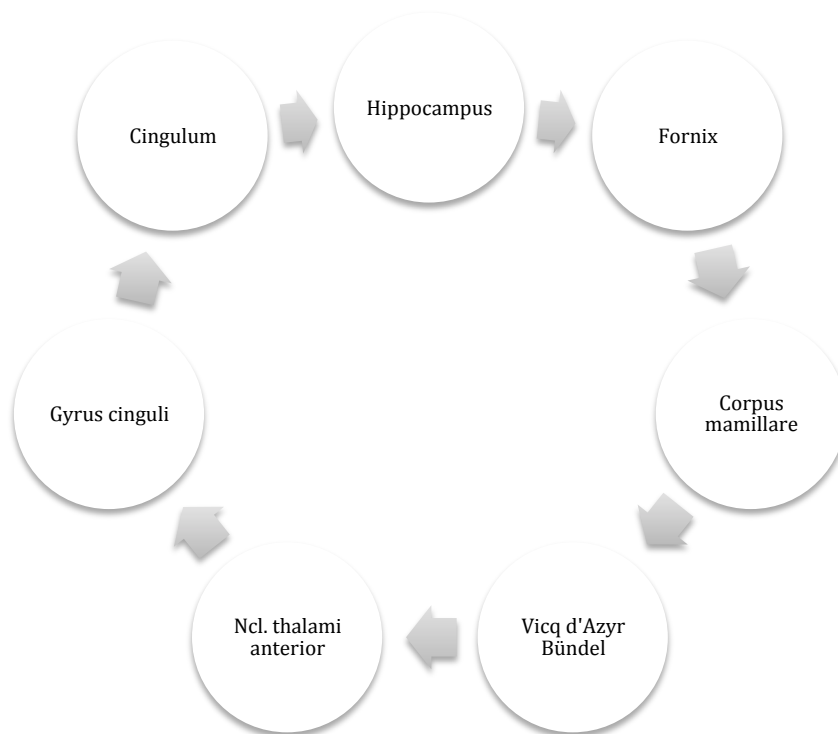
**Abb. 2:** Histologie des Hippocampus nach Santiago Ramón y Cajal, „Histologie du Système nerveux de l’Homme et des Vertébrés“ (1911)

Quelle:

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/CajalHippocampus\\_\(modified\).png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/CajalHippocampus_(modified).png)

Die Komplexität der neuronalen Verschaltung des Gehirns spiegelt sich auch im Hippocampus wider. Die Zytoarchitektur ist von zwei C-förmigen Zellbändern gekennzeichnet, die sich gegenseitig umgreifen. Eines der Zellbänder wird von vielen kleinen Körnerzellen des DG gebildet, das andere aus großen Pyramidenzellen des CA. Weitere zelluläre Bestandteile, die sich über den Hippocampus verteilen, sind Gliazellen und Mikroglia. Afferente Fasern erhält das „Seepferdchen“ aus der Regio entorhinalis mit Anteilen der primären Riechzentren, des Corpus amygdaloideum und des Neocortex (verlaufen im Stratum lacunosum-moleculare). Im Cingulum sammeln sich hauptsächlich Fasern des Gyrus cinguli, die als afferente Bahnen zum Subiculum laufen, um in den Hippocampus einzutreten. Zudem sind die beiden Hippocampi der Hemisphären miteinander in Kontakt, indem sie Faserverbindungen über die Commissura fornicis auf die Gegenseite schicken (diese Fasern laufen im Stratum oriens und radiatum). Afferenzen (glutamaterg) treten zum größten Teil über den Tractus perforans aus der Regio entorhinalis in das Cornu ammonis ein und verlaufen dabei im Stratum lacunosum-moleculare. Sie enden an den Dendriten der Pyramidenzellen des Ammonshorns oder ziehen zum großen Teil in die Fascia dentata (DG) mit seinen dicht gepackten Körnerzellen. Die Axone der Körnerzellen werden als sog. Moosfasern bezeichnet, die Kontakt mit Dendriten der CA3-Pyramidenzellen aufnehmen. Die großen Pyramidenzellen der CA3-Region projizieren anschließend mit den Schaffer-kollateralen auf die CA1-Pyramidenzellen (man kann hier von

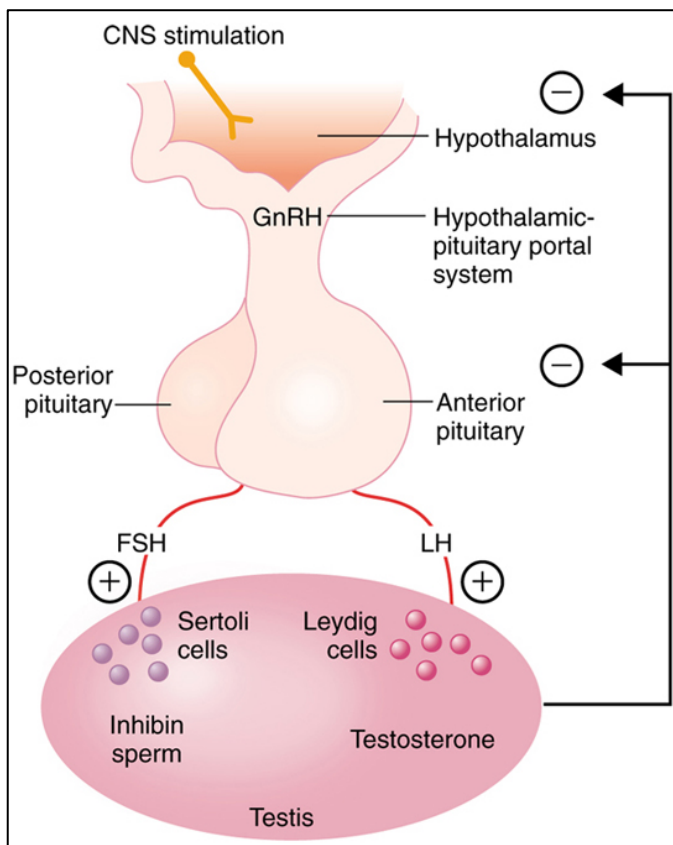
einer trisynaptischen Verschaltung sprechen: Regio entorhinalis → Körnerzellen → CA3-Pyramidenzelle → CA1-Pyramidenzelle). Deren Axone sammeln sich als efferente Elemente im Alveus und verlassen die hippocampale Rinde durch die Fimbria hippocampi, die sich als Fornix fortsetzt und projiziert zum Subiculum (bildet den Übergang vom 6-schichtigen Isocortex zum 3-schichtigen Allocortex des Hippocampus). In dieses komplexe Verschaltungsmuster exzitatorischer Synapsen sind die hemmenden GABAergen Interneurone und die Korbzellen des Stratum oriens eingeschaltet, die synaptische Kontakte mit dem Soma und den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen eingehen und für ein Gleichgewicht von Erregung und Inhibition sorgen. Über den Fornix baut der Hippocampus Kontakt mit dem Hypothalamus, den Septumkernen, der Regio praeoptica (= präkommissuraler Fornix), dem Corpus mamillare, dem Ncl. ant. thalami und dem Hypothalamus (= postkommissuraler Fornix) auf. Einige Fasern projizieren bis in das zentrale Höhlengrau, welches als graue Substanz den Aqueductus mesencephali (= Verbindung zwischen 3. und 4. Ventrikel) umgibt. Der wohl bekannteste neuronale Regelkreis des Hippocampus, der wichtiger Bestandteil des limbischen Systems ist, wird in der Literatur als „Papez-Neuronenkreis“ bezeichnet (Papez, 1937; Klüver et Bucy, 1939). Er setzt sich wie folgt zusammen:



### 2.3 Hippocampaler sexueller Dimorphismus

Die steroiden Sexualhormone der Ovarien und des Testis zeigen in ihrem Einfluss im Weibchen und Männchen geschlechtsspezifische Unterschiede. Östrogene werden bei der Frau hauptsächlich in den Follikelzellen des Ovars (Granulosa- und

Thekazellen) gebildet (auch zu geringeren Teilen in der Plazenta, in der Nebennierenrinde) und zyklusabhängig pulsatil (alle 60 bis 90 min) freigesetzt. Während der Ovulationsphase erreicht die Sekretion dabei ein Maximum. Testosteron stellt das Sexualhormon des Mannes dar. Es handelt sich um ein Androgen, das zwar auch im weiblichen Organismus vorkommt, aber dort in geringeren physiologischen Konzentrationen produziert wird und im Blut zirkuliert. Der größte Teil wird in den Leydigzellen des Hodens synthetisiert und unterliegt dabei tageszeitlichen Schwankungen. Über die Blutbahn wird Testosteron, gebunden an einem Transportprotein (Sexualhormon-bindendes Globulin = SHBG) an die Zielorgane transportiert und im Folgenden in seinen aktiveren Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Alle steroiden Sexualhormone werden aus der Vorläufersubstanz Cholesterol gebildet, wobei die Anfangsschritte der Synthese für Estrogene und Androgene identisch sind. Zudem unterliegt der Hormonhaushalt der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Durch einen negativen Feedbackmechanismus wird bei ausreichenden Konzentrationen von zirkulierenden Sexualhormonen die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus und die LH- und FSH-Sekretion aus der Hirnanhangsdrüse gehemmt. Dafür sorgt auch das Glykoprotein Inhibin, welches in Sertolizellen des Hodens und in Granulosazellen der Eierstöcke produziert wird und die FSH-Freisetzung steuert. Die produzierenden Zellen des Ovars bzw. Hodens besitzen Rezeptoren für LH und FSH. Durch diesen komplexen Regelkreis werden unphysiologische Hormonkonzentrationen verhindert.



**Abb. 3:**

Regulation der Testosteronfreisetzung aus dem Hoden (Testis) beim Mann über negativen Feedbackmechanismus. FSH: follikelstimulierendes Hormon, LH: luteinisierendes Hormon, CNS: zentrales Nervensystem

Quelle:

[http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/endocrinology/male-hypogonadism/images/MaleHypogonadismfig1\\_large.jpg](http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/endocrinology/male-hypogonadism/images/MaleHypogonadismfig1_large.jpg)

Schon in den 90er Jahren wurde bekannt, dass die Morphologie von Gehirnstrukturen unter einem hormonellen Einfluss steht. Studien der letzten

Jahre haben gezeigt, dass Estradiol die synaptische Plastizität im weiblichen Hippocampus maßgeblich beeinflusst. Die Dichte der Spines variiert während des Sexualzyklus im Weibchen und zeigt übereinstimmende Schwankungen mit variierenden E2-Spiegel im Serum. Die Produktion neuronaler und sexueller Steroide unterliegt dabei den Regulationsmechanismen des Hypothalamus-Hypophysen-Systems. Durch eine zyklische GnRH-Freisetzung aus dem weiblichen Hypothalamus ergibt sich im weiblichen Hippocampus ebenso eine synchrone, zyklische Schwankungsbreite der Dichte an Spinesynapsen. Frühere Studien konnten zeigen, dass GnRH-Rezeptoren reichlich im hippocampalen Gewebe der Frau vorhanden sind und dass die Expression von mRNA, die für GnRH-Rezeptoren codiert, im Vergleich zum Hypothalamus oder zum Cortex im Hippocampus die höchsten Werte erreicht (Prange-Kiel et al., 2008). GnRH stimuliert die hippocampale E2-Synthese und die damit verbundene Synapsendichte in weiblichen Tieren durch eine direkte Bindung an Rezeptoren und dosisabhängig. Kurz vor der Ovulation erreichen die E2- und GnRH-Werte im Serum die höchsten Spiegel, wodurch auch das Maximum an hippocampalen Spinesynapsen erklärbar ist (Woolley et al., 1990). Hierzu muss erwähnt werden, dass Estrogene über einen positiven Feedbackmechanismus die GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus und die FSH/LH-Freisetzung aus der Hypophyse regulieren. Die GnRH-stimulierte E2-Synthese kann hierbei durch die Gabe eines Aromataseinhibitors (Letrozol, wird auch zur Therapie von Brustkrebs eingesetzt) zunichtegemacht werden. Die Ergebnisse von *in vitro*-Experimenten führen zu der Hypothese, dass der variierende GnRH-Release in Folge schwankender Estradiol-Serumspiegel den Estrogenzyklus der Ovarien und des Hippocampus synchronisiert. Damit wäre auch die Annahme älterer Studien, dass das E2 der Ovarien die Spineformation im Hippocampus induziert, erklärbar. Gould et al. publizierten 1990, dass Ovariectomie zu einem Verlust postsynaptischer dendritischer Spines in der CA1-Region des Hippocampus führt und dass E2-Applikation in die Tiere diesen Effekt aufheben kann (sog. Rescue). Neuere Studien weisen jedoch immer mehr auf die Rolle von lokal im Hippocampus synthetisierten E2 hin, welches als zentraler Einflussfaktor der Spinogenese gesehen wird. Durch Inhibition der E2-Synthese in ovariectomierten weiblichen Tieren und den daraus resultierenden signifikanten Spineverlust konnten die Vermutungen der Studien bestätigt werden, wodurch das hippocampale Estradiol in den Mittelpunkt des Interesses gerückt wurde. Naftolin et al. waren die ersten Wissenschaftler, die die Expression der Aromatase – das finale Enzym der Estrogensynthese – im Diencephalon beschrieben (Naftolin et al., 1971). Mittlerweile weiß man, dass das Gehirn mit allen notwendigen Enzymen der Estrogensynthese ausgestattet ist (Shibuya et al., 2003; Do Rego et al., 2009; Pelletier, 2010). Prange-Kiel et al. zeigten die *de novo*-Synthese und Sekretion von E2 in adulten hippocampalen Neuronen, indem sie Neurone unter serum- und steroidfreien Bedingungen kultivierten (Prange-Kiel et al., 2003). Die Ergebnisse konnten von Hojo et al. (2004) bestätigt werden. Die *de novo*-Synthese geht dabei von Cholesterol aus (Fester et al., 2006; Fester et al., 2009). Hierzu transfizierten Fester et al. hippocampale Neurone mit einer gegen StAR gerichteten siRNA. StAR ist für den Transport von Cholesterol über die innere Mitochondrienmembran unerlässlich und sorgt für die Substratbereitstellung von Cholesterol für das primäre Enzym der Steroidogenese, dem side chain cleavage enzyme (SCC P<sub>450</sub>-enzyme). Diese Transfektion führte zu einem drastischen Abfall der Estrogensynthese, in dessen Folge auch die Dichte an Spinesynapsen

gleichermaßen reduziert wurde. Durch weitere Versuche zum besseren Verständnis der Rolle von hippocampaler E2-Produktion kam man zu dem Ergebnis, dass die lokale Synthese von Estrogenen von der Aromatase abhängig ist. So konnte nur die Applikation von E2 zu siRNA-transfizierten Neuronen den Effekt des Synapsenverlustes aufheben, nicht aber Testosteron oder Cholesterol (Fester et al., 2009). Eine Inhibition der Aromatase durch Letrozol führt zu einer Reduktion der hippocampalen E2-Synthese und dies wiederum induziert einen signifikanten Verlust von Spinesynapsen der CA1-Region (Kretz et al., 2004). Durch eine simultane Gabe von Estradiol zum Medium konnte dieser Effekt aufgehoben werden (Zhou et al., 2007). Der Einfluss einer Hemmung des zentralen Enzymes der Estrogensynthese zeigt im Männchen keinerlei Effekte. Dies zeigt das Vorliegen sexueller Unterschiede in der hormonellen Regulation der Synaptogenese. Auch unterliegt die Synthese von E2 im männlichen Gewebe keinem Zyklus. Die Sekretion der Releasinghormone aus dem Hypothalamus folgt hier einem tonischen, azyklischen Muster. GnRH wird im weiblichen Organismus hingegen pulsatil alle 60-90 min freigesetzt. Im Gegensatz zu der Erkenntnis, dass E2 im männlichen Hippocampus keinen Einfluss auf die Formation von Synapsen hat, ist es erstaunlich, dass männliche hippocampale Neurone *in vitro* die gleiche Kapazität zur Estradiol-Synthese besitzen wie weibliche Neurone (Fester et al., 2012). Trotzdem ist die Konzentration von E2 im Serum und im Hippocampus von weiblichen Tieren höher. Dies kann durch die Abhängigkeit der Neurosteroidsynthese vom HHS erklärt werden. Durch erhöhte GnRH-Level im Zyklus des Weibchens ergeben sich auch höhere Serumwerte an Estrogenen (Fester et al., 2012). Dabei erreicht GnRH den Hippocampus wahrscheinlich über die Blutbahn und das Liquorsystem (Lehman et al., 1986; Skinner et Caraty, 2002), da man keine Informationen über eine direkte neuronale Verbindung zwischen Hippocampus und Hypothalamus hat. Der Spineverlust im weiblichen hippocampalen Gewebe nach Aromataseinhibition scheint eine Folge der LTP-Reduktion zu sein (Vierk et al., 2012). Auch Yuste und Bonhoeffer zeigten diesen Sachverhalt, nach dem die Formation von Spinesynapsen durch LTP induziert wird (Yuste and Bonhoeffer, 2001, 2004). Dieser Effekt nach Letrozolbehandlung blieb in männlichen Tieren aus, da man keinen Abfall des LTP und der damit verbundenen Dichte an Spinesynapsen fand (Vierk et al., 2012). Auch die Entdeckung der unterschiedlichen Expression von Spines zeigte das Vorhandensein eines sexuellen Dimorphismus im Hippocampus. So weisen weibliche Neurone im Gegensatz zu männlichen eine größere Anzahl an Mushroom-Spines (= Gedächtnis-Spines) auf (Tada and Sheng, 2006; Bourne and Harris, 2007; Kasai et al., 2010). Männchen haben im Gegenzug mehr dünne Spines (Vierk et al., 2012), denen ein dynamischer und transients Charakter zugeschrieben wird. Behandelt man männliche und weibliche Kulturen mit Letrozol, so verursacht dies nur in weiblichen Neuronen einen signifikanten Verlust an Spines (v.a. an Mushroom-Spines). Männliche Neurone hingegen bleiben von dieser Behandlung unbeeinflusst (Vierk et al., 2012). Auch eine systemische Behandlung mit dem Aromatase-Inhibitor über einen Zeitraum von 4 Wochen zeigte im Männchen keinerlei Auswirkungen (Zhou et al., 2010; Fester et al., 2012). Parallel zu diesen Studien wurde die Expression synaptischer Markerproteine im Hippocampus untersucht, wobei Synaptophysin als präsynaptischer Marker und Spinophilin als postsynaptischer Marker fungiert. In weiblichen Tieren konnte gezeigt werden, dass beide Proteine hoch responsiv auf E2 reagieren (Murphy and Segal, 1996; Brake et al., 2001; Rune et al., 2002; Hao et al., 2003; Kretz et al., 2004;

Fester et al., 2009). E2-Applikation zu hippocampalen Kulturen regulierte die Expression der Markerproteine hoch, was jedoch nicht die synaptische Plastizität beeinflusst (wie oben beschrieben hat nur E2-Gabe nach Letrozol hat einen Effekt). Zudem muss angemerkt werden, dass dieses Phänomen nur bei E2-Konzentrationen von 100 nM auftritt, was nicht den physiologischen Konzentrationen entspricht. Sowohl durch Aromataseinhibition, als auch durch einen StAR-Knockdown werden Synaptophysin und Spinophilin in ihrer Expressivität gesenkt. Auch hier gibt es den schon erwähnten „Rescue-Effekt“ bei E2-Applikation, jedoch nicht bei Gabe von Testosteron oder Cholesterol bei StAR-Knockdown (Fester et al., 2009). Dies spiegelt die Spezifität estrogener hippocampaler Effekte wider, die auf auto- und parakrine Wirkungen zurückgehen. So zeigen die Schlüsselenzyme der Steroidsynthese im Hippocampus regionale Expressionsunterschiede auf, die mit denen der synaptischen Proteine übereinstimmen

Diese Sachverhalte bestätigen das Vorliegen sexspezifischer Regulationsmechanismen der synaptischen Plastizität im Hippocampus. Die Studien, die in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, beschäftigten sich jedoch hauptsächlich mit estrogenen Effekten. Der potenzielle Einfluss von männlichen Sexualsteroiden auf Synaptogenese soll in dieser Arbeit daher näher untersucht werden.

## 2.4 Neuronen und Synapsen

### 2.4.1 Anatomie

Man schätzt, dass das menschliche Gehirn aus ca. 100 Milliarden Nervenzellen und etwa gleich vielen Gliazellen besteht. Ein Neuron (diese Bezeichnung stammt von Heinrich Wilhelm Waldeyer) ist eine spezialisierte Zelle im Nervensystem des Menschen, die der Übertragung von Erregungen auf andere neuronale Zellen und der Erregungsleitung dient. Zusammen mit einer Vielzahl von Gliazellen bilden Neurone das Nervensystem. Ein typisches Neuron besitzt neben einem Soma mehrere Zellfortsätze, zumeist einige Dendriten und einen Neuriten bzw. ein Axon (sog. multipolare Nervenzelle). Morphologisch betrachtet gibt es neben der multipolaren Nervenzelle noch unipolare, pseudounipolare und bipolare Neurone. Über die Dendriten werden der Zelle Erregungen anderer Zellen im Verbund zugeleitet. Das Axon, das sehr lang sein kann, dient der Informationsweitergabe an andere Neurone. Hierzu dienen spezialisierte Ionenkanäle in der Zellmembran einer Nervenzelle, über die eine Spannung aufgebaut wird. Mit dem Axon steht ein Neuron über Synapsen mit anderen neuronalen Zellen in Kontakt. Die Information wird hier meistens über die präsynaptische Ausschüttung chemischer Botenstoffe weitergeleitet. Die Erregungsleitung kann aber auch elektrisch über sog. gap junctions passieren. Die Botenstoffe binden in Folge an Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Somit bilden Synapsen die Grundlage einer unidirektionalen Signalfortleitung von der Prä- zur Postsynapse. Das Axon bildet mit Transmittervesikeln die Präsynapse (sog. Bouton), der sich ein synaptischer Spalt anschließt (extrazellulärer Raum). Das postsynaptische Element kann entweder ein Dendrit, ein anderes Axon oder das Soma eines Neurons sein. Je nach Lage der Boutons werden Synapsen in verschiedene Gruppen untergliedert: axosomatische Synapsen, axo-axonale Synapsen, axo-dendritische Synapsen und



Spinesynapsen (Kahle W., 2001). Nach Gray gibt es eine Unterscheidung zwischen asymmetrischen Synapsen (Gray Typ 1, breiter synaptischer Spalt, prä- und postsynaptische Verdichtungen an der gesamten Synapsenfläche) mit erregender Funktion und symmetrischen Synapsen (Gray Typ 2, schmaler synaptischer Spalt, stellenweise membranöse Verdichtungen) mit hemmender Funktion. In meiner Arbeit werden die asymmetrischen (erregenden) Spinesynapsen des Hippocampus untersucht, bei denen ein Bouton mit einem Spine (auch Dornfortsatz) eines anderen Dendriten in Kontakt tritt. Ein Spine ist eine membranöse Ausstülpung eines Dendriten (Nimchinsky et al., 2002). Sie bilden im Hippocampus zum größten Teil die postsynaptische Struktur exzitatorischer Synapsen (Gray, 1959; Harris und Kater, 1994; Nimchinsky et al., 2002). Spines vergrößern durch ihre Morphologie und ihr zahlreiches Vorkommen an reifen Dendriten (bis zu 10 pro  $\mu\text{m}$ ) die Oberfläche zur Übertragung neuronaler Informationen (Sorra and Harris, 2000). Gray beschrieb 1959 zum ersten Mal die Ultrastruktur der Spines. Sie können morphologisch voneinander unterschieden werden: pilzförmige Spines mit kurzem Hals und großem Bulbus (Mushroom Spines), kurze und kleine Spines (Stubby Spines) und Spines mit langem Hals und kleinem Bulbus (Thin Spines) (Peters und Kaiserman-Abramof, 1970).

## 2.4.2 Synaptische Plastizität

Synapsen sind in der Lage ihre Morphologie und Physiologie, z.B. in Folge hormoneller Schwankungen, zu verändern. Dadurch verändert sich die synaptische Übertragung neuronaler Informationen. Trotz einiger Diskrepanzen ist die Neubildung von Spines ein zuverlässiger Parameter für Synapsenbildung. Der hormonelle Effekt von Estrogen auf die Spinesynapsenbildung ist sehr spezifisch für die CA1-Region im Hippocampus und betrifft nur asymmetrische Spinesynapsen, keine Schafsynapsen (Rune et al., 2006). Schon in den 90-er Jahren konnten Bruce McEwen und Mitarbeiter nachweisen, dass die Estrogengabe in ovariectomierten Tieren zu einer Zunahme dendritischer Spines an CA1-Neuronen führt (McEwen, 2002). Ob der gleiche Effekt auch beim Mann durch DHT hervorgerufen werden kann, wird in dieser Arbeit untersucht. Ein elektrophysiologischer Mechanismus, der die Effektivität von Synapsen erhöht, ist die Langzeitpotenzierung (LTP). Er vollzieht sich nach mehrmaliger Reizung von Nervenzellen (man spricht von einer LTP bei einer verstärkten synaptischen Weiterleitung über 15 min, messbar durch EPSPs). Die Langzeitpotenzierung kann als Basis für die Speicherung von Gedächtnisinhalten im ZNS bezeichnet werden (Muller et al., 2000; Martin et al., 2000). Auch sie unterliegt einem steroidalen Einfluss und geht der Veränderung von Spinesynapsen voraus (Yuste and Bonhoeffer, 2001, 2004). Synaptische Plastizität gilt als ein zellulärer, neurophysiologischer Mechanismus für Gedächtnis und Lernprozesse.

## 2.5 Enzyme und deren Bedeutung für den Hippocampus

### 2.5.1 Aromatase

Studien, die vor über 10 Jahren publiziert wurden, gingen schon davon aus, dass im Hippocampus eine *de novo*-Synthese von Estradiol stattfindet. Das StAR-Enzym

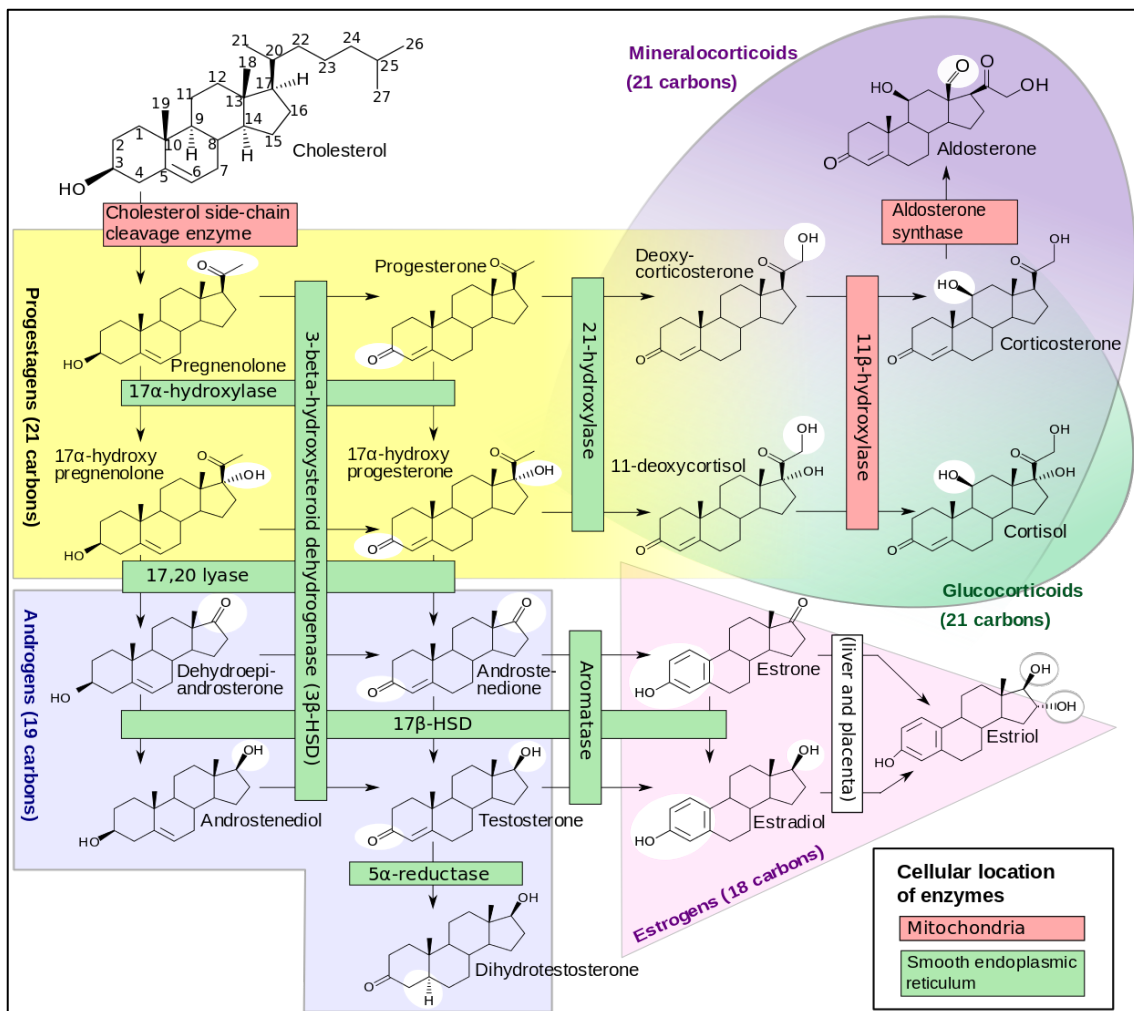
transportiert Cholesterol über die äußere Membran (rate limiting step) der Mitochondrien und liefert dadurch Substrat für die Steroidogenese, die mit der Aktivität des SCC-Enzymes an der inneren Mitochondrienmembran beginnt. Zunächst entsteht hierbei durch Hydroxylierung Pregnenolon (Enzym: Desmolase), das in weiteren Stoffwechselschritten zu Androstendion (reversibler Schritt, Enzym: 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase) und Testosteron (irreversibel, Enzym: 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase) umgebaut wird. Die Synthese der Neurosteroiden findet ab dem Substrat Pregnenolon im ER der Neurone statt. Hierfür ist das Cytochrom-P450-Enzym verantwortlich, welches den C<sub>21</sub>-Körper Pregnenolon in Progesteron oder 17-Hydroxypregnenolon konvertiert. Der finale Schritt der Estrogensynthese ist die Umwandlung von Androstendion oder Testosteron in Estrogene (E1 = Estron oder E2 = Estradiol) durch die Aromatase, die im ER lokalisiert ist. Dabei wird der Methylrest des C19-Atoms abgespalten und der Ring A des Sterangerüsts aromatisiert, wodurch das Endprodukt E2 entsteht (Sugawara et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass StAR und das finale Enzym der Estrogensynthese in hippocampalen Prinzipalneuronen kolokalisieren (Wehrenberg et al., 2001). Prange-Kiel et al. konnten kurze Zeit später die *de novo*-Synthese von E1 und E2 im Hippocampus bestätigen (Prange-Kiel et al., 2003). Alle Enzyme, die für die Herstellung von E1 und E2 notwendig sind, findet man im hippocampalen Gewebe, wodurch sich gonadale und hippocampale Produktion in ihrem Ablauf gleichen (Garcia-Seguera et al., 1999; Wehrenberg et al., 2001; Hojo et al., 2004). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sich die Produktion durch den Einsatz eines Aromataseinhibitors, der auch zur Therapie von Brustkrebs verwendet wird, signifikant reduzieren lässt (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004). Dies trifft für alle non-steroidalen Inhibitoren der Aromatase zu (Letrozol, Anastrozol, Fadrozol). Die Reduktion der Estrogenherstellung im Hippocampus kann auch durch einen Knockdown von StAR erreicht werden (Fester et al., 2009; Rune et al., 2006). Im Gegensatz dazu führt die Substratzusatzung von Cholesterol oder Testosteron zu hippocampalen Kulturen zu einer gesteigerten Estradiolsekretion in das Kulturmedium (Fester et al., 2009). *In vitro* ist die Kapazität der E2-Synthese unabhängig vom Geschlecht (Fester, 2012). *In vivo* hingegen ist die Konzentration hippocampalen Estrogens in weiblichen Tieren deutlich höher als in männlichen Tieren, was man mittels Massenspektrometrie nachweisen konnte (Fester et al. 2012). Die Mengen im Hippocampus entsprechen dabei den Konzentrationen im Serum. Die *in vivo-in vitro*-Diskrepanz lässt stark vermuten, dass die Synthese von Neurosteroiden *in vivo* sexspezifisch reguliert wird.

### 2.5.2 5 $\alpha$ -Reduktase

Die 5 $\alpha$ -Reduktase ist das finale Enzym der Testosteron-Synthese, welches Testosteron in das biologisch wirksamere Dihydrotestosteron umwandelt. Das Enzym ist somit für die Wirksamkeit von Testosteron unerlässlich. Das Phänomen der *in vivo-in vitro*-Diskrepanz bei der Neurosteroidsynthese in weiblichen und männlichen Tieren lässt vermuten, dass im männlichen Organismus nicht die Aromatase für die Erhaltung synaptischer Plastizität verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Aromatase im Weibchen zu signifikanten Synapsenverlust führt, was im Männchen selbst nach vierwöchiger Letrozolbehandlung nicht der Fall war. Es wurde der konkrete Gegensatz

gefunden; die Dichte an Spinesynapsen stieg tendenziell sogar an (Fester et al. 2012). Es sollte daher angenommen werden, dass die Inhibition der Estradiol-Synthese die vorhandene Menge an Testosteron im Gewebe steigert, wodurch automatisch mehr Substrat für die Produktion von DHT zur Verfügung steht. Die Experimente lassen einen sexspezifischen Mechanismus der Regulation der hippocampalen Neurosteroidsynthese vermuten. Die Produktion von DHT im männlichen Hippocampus scheint demnach in einem engen Zusammenhang mit synaptischer Plastizität zu stehen (Leranth et al., 2003; Leranth et al., 2004; MacLusky et al., 2006). Die Schlüsselenzyme der DHT-Synthese sind die 5 $\alpha$ -Reduktase-Isoenzyme Typ 1 und 2. Beide Isoenzyme haben gleiche Größe und enzymatische Aktivität, unterscheiden sich aber in ihrer biochemischen Charakteristik und ihrer Verteilung im Gehirn. Demnach hat 5 $\alpha$ -R2 eine deutlich höhere Substrat-Affinität als 5 $\alpha$ -R1 (Negri-Cesi et al., 1996). DHT scheint das „E2 des männlichen Organismus“ zu sein. Es reguliert die Expression von mRNA von 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 1 und Typ 2 im ZNS. Dabei haben Androgene in männlichen Ratten einen gegensätzlichen Effekt auf die Expression der mRNA in der Art, dass Androgene die 5 $\alpha$ -Reduktase 1-mRNA im PFC herunterregulieren, die der 5 $\alpha$ -Reduktase 2-mRNA aber hochregulieren (Feedforward-Mechanismus, Torres et al., 2003), weshalb man der Typ 2-Reduktase auch maskulisierende Funktionen zuweist (Torres and Ortega, 2006). DHT-Behandlung von weiblichen Tieren steigert die Expression der mRNA beider Enzyme (Torres and Ortega, 2003a), v.a. der Typ 1-Reduktase, der daher verweiblichende Effekte im Gehirn zugeschrieben werden (Torres and Ortega, 2006). Im PFC von adulten Ratten gibt es demzufolge einen Geschlechtsunterschied in der Regulation der Expression der 5 $\alpha$ -Reduktase-Isoenzyme durch Androgene (Torres and Ortega, 2003a), die bei Betrachtung der 5 $\alpha$ -R2 im weiblichen Organismus viel schwächer ist als im männlichen (Torres and Ortega, 2003a). Die überwiegende mRNA-Spezies im Gehirn von Ratten ist die 5 $\alpha$ -R-Typ 1 (Lephart, 1993), die vor allem katabolische und neuroprotektive Funktionen aufweist (Poletti et al., 1998b). 5 $\alpha$ -R Typ 2 spielt hingegen eine zentrale Rolle in sexuell dimorphen Funktionen des Männchens, wie z.B. in der Differenzierung des ZNS (Russell and Wilson, 1994; Poletti et al., 1998b). Auch die Ausbildung von Spinesynapsen trägt zur Differenzierung des ZNS bei. Der Einsatz eines Androgen-Rezeptorblockers (Flutamid) führt zu einem signifikanten Abfall der 5 $\alpha$ -R2-mRNA-Expression im männlichen Gehirn, was sich im Weibchen als weniger effektiv herausstellte (Poletti et al., 1998b). Diese schwache Regulation der 5 $\alpha$ -Reduktase 2 durch Androgene im Gehirn des Weibchens lässt vermuten, dass die DHT-Produktion hier im Gegensatz zum männlichen Organismus eine untergeordnete Rolle spielt. Im Männchen sind Androgene für die Aufrechterhaltung der CA1-Spinesynapsendichte notwendig; demzufolge führt Orchiektomie zu einer Reduktion von ca. 50% der Synapsendichte. Dieser Effekt kann durch Behandlung mit Androgen, nicht aber durch Estrogen aufgehoben werden (Leranth et al., 2003). Obwohl Testosteron in Estrogen umgewandelt werden kann, ist dieser Umbauschritt für die Aufrechterhaltung der Spinesynapsen im Männchen nicht relevant (Leranth et al., 2004). Gabe von Testosteron oder dem aktiveren DHT in kastrierte Männchen steigert das Zellüberleben hippocampaler Neurone (Spritzer and Galea, 2007). Die Verteilung von Estrogenrezeptoren (Rainbow et al., 1982; Brown et al., 1988) und Androgenrezeptoren (Roselli, 1991; Xiao and Jordan, 2002) im Gehirn ist sexuell dimorph, in der Art, dass männliche Ratten nach einwöchiger exogener Testosteronbehandlung eine signifikant höhere Expression von Androgenrezeptoren im Bereich der Stria terminalis, des Hypothalamus und

des periventrikulären präoptischen Bereiches zeigten (Roselli, 1991). Xiao und Jordan fanden die höchste Immunreaktivität der Androgenrezeptoren in der hippocampalen CA1-Region bei männlichen Ratten mit intakten Keimdrüsen (Xiao and Jordan, 2002). Weibliche Tiere verfügen hingegen über höhere Estrogenbindungskapazitäten in verschiedenen Hirnregionen (Brown et al., 1988). Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Struktur und Funktion des Hippocampus wurden schon von vielen Laboren veröffentlicht (Lewis et al., 1995; Patchev and Almeida, 1996; Tabibnia et al., 1999; Shors and Miesegaes, 2002). Wie stark die Expression der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 im Hippocampus ist und ob es auch hier wie im PFC einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Expression gibt, soll in dieser Arbeit behandelt werden.



**Abb. 4:** Synthese der Neurosteroiden in den Mitochondrien und dem glatten endoplasmatischen Reticulum von neuronalen Zellen.

Quelle:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/13/Steroidogenesis.svg/1245px-Steroidogenesis.svg.png>

## 2.6 Estrogen im Hippocampus

Estradiol (E2) wird neben der gonadalen Produktion unabhängig von dieser im Hippocampus *de novo* synthetisiert (Prange-Kiel et al, 2003). Hojo et al. konnten nachweisen, dass E2 im Hippocampus in bis zu 6-fach höheren Konzentrationen als im Serum vorliegt (Hojo et al., 2004). Das limitierende Protein der Synthese ist das Enzym StAR, welches für die Bereitstellung von Substrat in Form des Cholesterols über die Mitochondrienmembran sorgt. Wie schon beschrieben sind sowohl StAR als auch das finale Enzym der Estrogensynthese, die Aromatase und auch alle anderen notwendigen Enzyme der Steroidogenese reichlich im Hippocampus vorhanden. Höhere Konzentrationen an Estrogenen im weiblichen Hippocampus lassen auf eine geschlechtsspezifische Regulation der Estrogensynthese schließen, die im weiblichen Organismus essenziell zur Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität ist. Estradiol vermittelt seine Wirkung über die genomischen Rezeptoren ER $\alpha$  und  $\beta$ , die als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren im Zellkern fungieren (Ligand = Estrogene). Die beiden Isoformen haben eine unterschiedliche Affinität zu Estrogenen (Kuiper et al., 1998) und werden in gegensätzlicher Weise durch Estradiol reguliert. ER $\alpha$  wird demzufolge durch E2 hoch- und ER $\beta$  herunterreguliert. Letrozol zeigt hier durch Aromataseinhibition genau den umgekehrten Effekt. Diese Mechanismen machen die auto- und parakrine Wirkung der Estrogene im hippocampalen Gewebe deutlich. Neuere Studien postulieren das Vorhandensein eines weiteren, membranständigen ERs in Pyramidenzellen der CA2-Region, bei dem es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPR30) handelt. Er wird durch E2-Bindung aktiviert und leitet einen Anstieg des intrazellulären Calciums ein (Funakoshi et al., 2006). Glutamaterge und GABAerge Signalwege sind bei der Regulation der Aromataseaktivität beteiligt. Behandelt man hippocampale Kulturen mit NMDA, welches an glutamaterge Rezeptoren bindet, so lässt sich nach 30 min eine signifikante Reduktion der E2-Synthese entdecken, die nach 60 min aber wieder ansteigt. Grund hierfür ist ein CICR aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern der Neurone (Emptage et al., 1999). Ca<sup>2+</sup> senkt die Aktivität der Aromatase, indem Kinasen diese phosphorylieren. Nach 60 min sind die Ca<sup>2+</sup>-Speicher erschöpft, sodass die hemmende Wirkung aufgehoben wird. Eine Reduktion der Estrogensynthese zieht im weiblichen Hippocampus auch einen Verlust an Spinesynapsen-Formation mit sich (Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2006; Fester et al., 2009). Im männlichen Organismus hingegen findet man nach CICR und Hemmung der Aromatase einen tendenziellen Anstieg an Spinesynapsen (Fester et al., 2012). Grund hierfür ist das höhere Substratangebot an Testosteron, welches im folgenden Schritt in seinen aktiven Metaboliten DHT umgewandelt werden kann. Der signifikante Verlust an Synapsen nach kurzzeitiger (7 Tage) und langzeitiger (4 Wochen) Behandlung weiblicher Kulturen mit dem nicht-steroidalen Aromataseinhibitor Letrozol ist spezifisch für den Hippocampus; weder im Cortex noch im Cerebellum kommt es zu einem solch drastischem Ergebnis (Zhou et al., 2010). Letrozol zeigt die größten Effekte bei einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M (Kretz et al., 2004) und senkt vor allem sog. Mushroom-Spines („Memory-Spines“) im Weibchen (Prange-Kiel et al., 2013). Zudem nimmt man an, dass die Konzentrationen an E2 im hippocampalen weiblichen Gewebe regionale Differenzen zeigen, da die Schlüsselenzyme StAR und Aromatase im Hippocampus unterschiedlich stark exprimiert werden (Prange-Kiel et al., 2006; Wehrenberg et al., 2001). Am höchsten scheint die Konzentration in der CA3-Region zu sein. E2 reguliert die Expression des ER $\alpha$  in hippocampalen Neuronen

hoch. ER $\alpha$ - Aromatase und StAR-Expression ist in CA3-Pyramdienzellen höher als in CA1-Neuronen, wodurch sich auch die regionalen Konzentrationsunterschiede an E2 erklären lassen (Rune et al., 2002; Prange-Kiel, 2003). Zudem sind weibliche hippocampale Neurone äußerst sensitiv gegenüber Estrogenentzug, weniger aber gegenüber Estrogen-Applikation (von Schassen et al., 2006). Die Spinedichte im Weibchen schwankt mit den zyklusabhängigen E2-Konzentrationen (Woolley et al., 1990; Woolley et McEwen, 1992).

Estrogen spielt v.a. im weiblichen Hippocampus eine unerlässliche Rolle in der Formation von Synapsen, und damit für Gedächtnis und Lernprozesse.

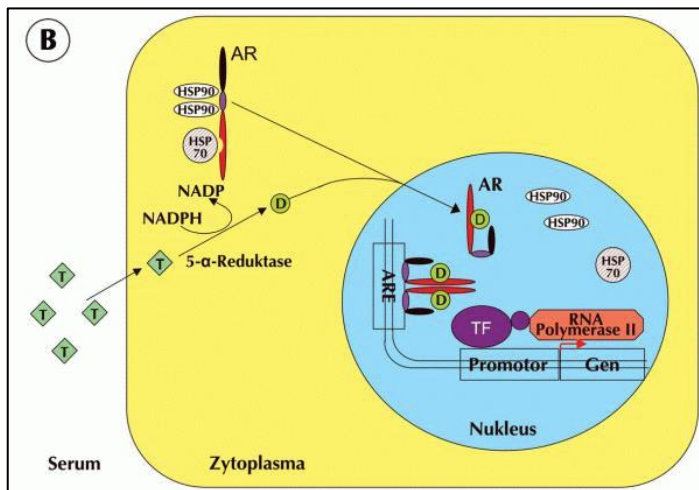
## **2.7 Androgene im Hippocampus**

### **2.7.1 Synthese**

Wie schon in 2.5 beschrieben, werden Androgene auf ähnliche Art und Weise wie Estrogene synthetisiert, mit dem Unterschied im finalen Schritt der Produktion. Das Schlüsselenzym ist die 5 $\alpha$ -Reduktase, die für die Reduktion in den aktiven Metaboliten DHT sorgt. Bei Androgenen handelt es sich um Steroide, die aus 19 Kohlenstoffatomen aufgebaut sind; anders als die aus 18 C-Atomen bestehenden Estrogene. Schwache Steroidvorläufersubstanzen sind Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) und Androstendion. DHEA, Androstendion und auch Testosteron sind zudem auch Vorläufersubstanzen der natürlichen Estrogene (siehe Abb. 4). Jedoch scheint die Aktivität der 5 $\alpha$ -Reduktase die essenzielle Rolle zur Erhaltung synaptischer Plastizität im hippocampalen Gewebe zu spielen.

### **2.7.2 Rezeptor**

Die höchste Affinität zum Androgenrezeptor hat das aktive DHT. Jedoch wird der AR auch durch Testosteron aktiviert. Er gehört wie ER $\alpha$  und  $\beta$  zu der Familie der nukleären Rezeptoren und wird durch ein auf dem X-Chromosom liegendes Gen codiert. Wie auch die Estrogenrezeptoren fungiert er als ein Transkriptionsfaktor, der nach Bindung von Androgen in seiner Konformation so verändert wird, dass sich die Hitzeschockproteine ablösen, er anschließend dimerisieren und vom Zytosol in den Nucleus wandern kann. Dort entfaltet der AR seine Wirkung, indem er direkte Wechselwirkungen durch die Bindung an ein „Response Element“ (HRE) mit der DNA eingeht. In Folge kommt es zur verstärkten Expression und Produktion bestimmter Proteine.



**Abb. 5:**  
Wirkungsmechanismus  
des nukleären ARs nach  
Androgenbindung

Quelle:  
[http://www.kup.at/kup/i  
mages/browser/3836-  
b.jpg](http://www.kup.at/kup/images/browser/3836-b.jpg)

Der männliche Hippocampus ist reich an AR-exprimierenden Zellen; eine hohe Expression wird v.a. an den Pyramidenzellen der CA1-Region gefunden (Simerly et al., 1990). Auch Ishii et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die AR-Immunreaktivität besonders hoch an den Neuronen des CA1-Areals ist, weniger im CA3-Bezirk und im DG. Neuere Studien konnten zeigen, dass DHT, abhängig von Androgenrezeptoren, in hippocampalen Neuronen den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert und somit neuronale Funktionen ausübt. Dabei scheint auch die Proteinkinase C von Bedeutung zu sein, da sie für die Phosphorylierung zuständig ist, wie man durch Experimente herausfand (Nguyen et al, 2009). Auch nicht-genomische Androgenrezeptoren scheinen an der Förderung von Gedächtnis wesentlich beteiligt zu sein. Sie üben durch Bindung von DHT ihre Wirkung über die Kopplung an membranständige Ionenkanäle aus und induzieren 2nd-Messenger Signalwege. Dadurch werden wohl schnelle Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit erreicht (Babanejad et al., 2012).

### 2.7.3 Einfluss von Sexualsteroiden auf synaptische Plastizität

Studien der Vergangenheit konnten zeigen, dass Androgene essenziell für die Erhaltung synaptischer Plastizität im Hippocampus sind. Im weiblichen Organismus ist dabei die Umwandlung des Androgens Testosteron in Estrogene von entscheidender Bedeutung, wohingegen im männlichen Organismus die Synthese des aktiven DHT essenziell zu sein scheint. 1975 konnten Pérez et al. nachweisen, dass der Hypothalamus, die Hypophyse und der Hippocampus in der Lage sind Androstendione in  $5\alpha$ -Androstendione, Testosteron und DHT umzuwandeln (Pérez et al., 1975). Die  $5\alpha$ -Reduktase wird im Gehirn in verschiedenen Arealen, darunter auch im hippocampalen Gewebe, unterschiedlich stark exprimiert und zeigte bei 1983 durchgeführten Versuchen die höchste Aktivität im Mittelhirn und der Pons (Krieger et al., 1983). DHT und Testosteron haben einen Einfluss auf die Dichte an synaptischen Spines von Neuronen der CA3-Region und zwar dort, wo die Moosfasern der Körnerzellen aus der Fascia dentata an die Pyramidalzellen des CA3-Areals herantreten (Hatanaka et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von 10 nM DHT oder Testosteron innerhalb von 2 h zu einem signifikanten Anstieg der Spinedichte führte. Zudem konnten Hatanaka et al. beweisen, dass dieser Effekt durch Blockade

verschiedener Kinasen ( MAPK, PKC ) gehemmt werden kann. PKA und PI3K waren in den Signalweg nicht involviert (Hatanaka et al., 2009). Auch die Blockade der ARs durch beispielsweise Flutamid konnte die Androgeneffekte blockieren. Man kam zu dem Ergebnis, dass Androgene die Spineformation in der CA3-Region des männlichen Hippocampus induzieren, wohingegen Estrogene einen degenerativen Effekt zeigten (Hatanaka et al., 2009). Spritzer und Galea führten Versuche durch, in denen gezeigt wurde, dass Testosteron und DHT - nicht aber E2 - das Überleben neuer hippocampaler Neurone in adulten männlichen Ratten verstärken (Spritzer and Galea, 2007). DHT scheint demnach E2-unabhängig die Kognition in männlichen Ratten zu verbessern (Frye et al., 2004). Ein Mangel an Androgenen nach einer Kastration reduziert signifikant die Anzahl apikaler dendritischer Spines und die Struktur exzitatorischer Synapsen im hippocampalen Gewebe von männlichen SAMP8-Mäusen, die als Modell für Untersuchungen der Alzheimer-Erkrankung verwendet werden. DHT-Applikation in diese Mäuse konnte die Defizite im Hippocampus reversieren, da durch die Gabe des aktiven Androgens die synaptische Plastizität deutlich stieg. Zudem stellte man fest, dass die durch DHT hervorgerufene Verbesserung der Plastizität positiv mit der mRNA- und Protein-Expression von NMDA-Rezeptoren und Synaptophysin (präsynaptisches Markerprotein) korrelierte (Li et al., 2013). Der Effekt der Hochregulation von Synaptophysin und auch von Spinophilin wurde im Weibchen durch E2-Applikation ausgelöst (Fester et al., 2009). Der NMDA-Effekt wurde schon in 2.6 dargestellt und wird durch die Studie von Li et al. bestätigt. Auch Babanejad et al. beschreiben in ihrer Studie, dass DHT Auswirkungen auf NMDA-Rezeptoren hat, die im Hippocampus lokalisiert sind. Sie scheinen somit an Lern- und Gedächtnisprozessen in männlichen Tieren beteiligt zu sein (Babanejad et al., 2012). Testosteron hat neuroprotektive Effekte (Spritzer et al., 2011). Leranath et al. postulierten 2004, dass auch die Applikation von DHT in ovariectomierte Weibchen zu einer Steigerung der Zahl dendritischer Spinesynapsen in der CA1-Region führt (Leranath et al., 2004). Signifikant höher war der Anstieg durch Behandlung mit Testosteron. Die Effekte konnten im weiblichen Tier durch Letrozol aufgehoben werden, was beim männlichen Tier jedoch keine Auswirkung hatte. Damit ist gezeigt worden, dass im Weibchen auch Aromatase-unabhängige Mechanismen die Spinedichte mit beeinflussen, dass jedoch vor allem die Umwandlung von Androgen in Estrogen von Bedeutung ist. Beide Geschlechter sind zwar responsiv auf Androgene, jedoch ist die Aufrechterhaltung synaptischer Plastizität im Männchen E2-unabhängig und somit Androgene, v.a. DHT, essenziell (Leranath et al., 2004). Estrogen-Gabe kann in weiblichen Tieren den Abfall der Anzahl an Spinesynapsen aufheben (McEwen and Woolley, 1994; Leranath et al., 2000; Leranath and Shanabrough, 2001), was im männlichen Organismus nicht möglich ist (Leranath et al., 2003). Somit scheinen die androgenen Effekte im Weibchen v.a. auf der Synthese von Estrogenen zu beruhen (Leranath et al., 2003). Obwohl im männlichen Gehirn Testosteron in E2 umgewandelt wird (Naftolin et al., 1975; Liederburg and McEwen, 1977), ist dies für die Aufrechterhaltung synaptischer Plastizität nicht notwendig. Auch MacLusky et al. (2006) postulierten diesen Befund der essenziellen Estrogenproduktion im weiblichen, nicht aber im männlichen Hippocampus (MacLusky et al., 2006).



#### 2.7.4 Flutamid und Finasterid

Um die Effekte von DHT auf die synaptische Plastizität im hippocampalen Gewebe genauer untersuchen zu können, wurden in den Versuchen dieser Arbeit Hemmstoffe eingesetzt, die die androgenen Wirkungen blockieren. Finasterid ist ein synthetischer steroidaler Hemmstoff der  $5\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 und 3, nicht vom Typ 1. Durch seine Ähnlichkeit zum natürlichen Steroid Testosteron verhindert Finasterid irreversibel die Synthese des aktiven DHT. Finasterid findet auch Einsatz zur Behandlung der benignen Prostata-Hyperplasie (BPH) beim Mann. In welcher Konzentration Finasterid signifikante Wirkungen im hippocampalen Gewebe erzielt, ist nicht bekannt. Da man weiß, dass Letrozol im weiblichen Organismus die höchsten Effekte bei einer Konzentration von  $10^{-7}$ M bewirkt (siehe Abschnitt 2.6), setzte ich Finasterid in meinen Versuchen in der gleichen Konzentration ein.

Flutamid ist ein Anti-Androgen, welches auch zur Behandlung des Prostatakarzinoms eingesetzt wird. Das nicht-steroidale Zytostatika hemmt effektiv ARs und somit die Wirkung von Androgenen an seinem Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass Flutamid-Applikation in hippocampales Gewebe von männlichen Tieren das Angstverhalten steigert (Edinger and Frye, 2006). Auch der Anstieg von Spinesynapsen in der CA3-Region des Hippocampus konnte nachweislich durch Flutamid gehemmt werden (Hatanaka et al., 2009). Babanejad et al. führten Experimente durch, in denen die positiven Effekte von DHT auf die Kognition durch Flutamid-Gabe aufgehoben wurden (Babanejad et al., 2012). Auch Flutamid wurde in der gleichen Konzentration wie Letrozol eingesetzt, da ich hier die stärksten Effekte auf die Veränderung der synaptischen Plastizität im Hippocampus vermutete.

### 3. Material

#### 3.1 Geräte

Bio-Photometer	EPPENDORF
Brutschrank, 37°C und 65°C	MEMMERT
CO <sub>2</sub> Inkubator, 37°C	HERAEUS
Diamantmesser	DIATOM
Druckgerät	CANON
Elektronenmikroskop CM 100	PHILLIPS
Falcon-Drehgerät	MACSMIX
Gefran 40 VLM 2Q (Denaturierung)	GEFRAN
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	LIEBHERR
Kühlschrank, 4°C	BOSCH und LIEBHERR
Lichtmikroskop	OLYMPUS und ZEISS
LSM Mikroskop	ZEISS
Mini-PROTEAN 3 Cell (Seriennummer: 67S/10016)	BIO RAD
Nassblot-System	XCELL II, INVITROGEN, USA
Pasteurpipetten	ASSISTENT
pH-Meter	RADIOMETER COPENHAGEN
Pinsel	DA VINC und PELIKAN
Pinzette	MERCK
Pipetten	EPPENDORF AG und GILSON
Pipetus Akku	HIRSCHMANN LABORGERÄTE
Rührer MR3001	HEIDOLPH
Rüttler	EDMUND BÜHLER
Schere	FINE SCIENCE TOOL
Serologische Pipetten	FALCON
Semidünnschnittgerät RM 2065	LEICA
TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL	BIO RAD
Ultradünnschnittgerät Ultra Cut OmU3	REICHERT
USB-Stick Cruzer Blade, 8 GB	SANDISK

Waage	METTLER
Western-Blot-Kamera	VILBER LOURMAT
Zentrifuge 5417 R	EPPENDORF
Zentrifuge Universal 32R	HETTICH

### 3.2 Arbeitsmaterialien

Cutfix Surgical Disposable Scalpel	BRAUN
Deckgläser, 20 × 46 mm	MARIENFELD
Desinfektionsmittel	BODE
DIN A4 Papier, multi-function	INOPO
Dokumentenfolie	LEITZ
Einbettungsformen	PLANO
ep T.I.P.S. Standard	EPPENDORF AG
Falcon Tubes	GREINER BIO-ONE
Feuchtkammer	EIGENBAU DES UKE
Gelatinekapseln	PLANO
Gelkämme	BIO RAD
Gildergrids	PLANO
Heidemannspatel	AESFULAP DE
Kosmetiktücher Samtess	WEPA
Küvetten	ROTH
Latexhandschuhe, Größe L	KIMBERLY-CLARK
Nitrocellulose Protran BA 85 (0,45 µm)	GE HEALTHCARE
Objektträger SuperFrost / Plus	ASSISTENT
Pipettenspitzen für Pipetus	BECTON DICKINSON LAB.
Pipettenspitzen für Pipetten	BECTON DICKINSON LAB.

### 3.3 Chemikalien

2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	SERVO
Androzol	TOCRIS

---

APS	SIGMA
Aqua dest.	BAXTER DEUTSCHLAND
BSA	SIGMA
DAKO Proteinblocker, serumfree	DAKO CYTOMATION
DAKO Dual Endogenous Enzym Block	DAKO
DAKO Antibody Diluent	DAKO
DAPI	SIGMA
DHT	SIGMA-ALDRICH
DMSO	TOCRIS
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	MERCK
Estradiol	E4389, SIGMA ALDRICH, USA
Ethanol	MERCK
Finasterid	TOCRIS
Flutamid	TOCRIS
Glutamin, 200 mM	SIGMA
Glutardialdehyd	MERCK
Glycidether	SERVA
HBSS (Hanks Balanced Salts)	GIBCO
HEPES	SIGMA
Horse Serum	GIBCO
ICI	TOCRIS
Kaliumhydrogenphosphat	MERCK
Letrozol	NOVARTIS
Methanol	J.T. BAKER
Milchpulver	HEIRLER
Minimum Essential Medium	GIBCO
Mountingmedium	DAKO
Natriumchlorid	MERCK
Natriumhydroxid	MERCK
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	MERCK

Neurobasalmedium A	GIBCO
Osmiumtetroxid	ROTH
Paraformaldehyd	MERCK
Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Ponceau S solution (0,1% in 5% acetic acid)	SIGMA LIFE SCIENCE
Precision Plus Protein Standards	BIO RAD
Propylenoxid	SERVA
Saccharose	MERCK
Salzsäure	MERCK
SDS	FLUKA
Sodium Bicarbonat Lösung, 7,5 %	SIGMA
Sterilium	BODE CHEMIE HAMBURG
Temed	SIGMA
Trilostan	SANOFI WINTHROP 220/510
Triton X100	ROCHE
Trockeneis	TMG
Tween	SIGMA
Uranylacetat	MERCK

### 3.4 Antikörper

5 $\alpha$ -Reductase 2 (H-100), polyclonal, rabbit, sc-20659	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC.
5 $\alpha$ -Reduktase 2 (SRD5A2), polyklonal, rabbit	BIORBYT
Donkey-anti-Rabbit-HRP	THERMO SCIENTIFIC
Goat anti-mouse Alexa 488	LIFE MOLECULAR PROBES
Goat-anti-Mouse-HRP	THERMO SCIENTIFIC
Goat anti-rabbit Alexa 555	LIFE MOLECULAR PROBES
M(ouse)ab anti-GAPDH	AMBION APPLIED BIOSYSTEMS
MAP2, mouse	CHEMICON

### 3.5 Software

iTEM	OLYMPUS
Mac OS X 10.9.2	APPLE
Microsoft Excel für Mac 2011 (Software)	MICROSOFT
Microsoft Excel 2000 (Software)	MICROSOFT
Microsoft Word 2000 (Software)	MICROSOFT
Microsoft Word für Mac 2011 (Software)	MICROSOFT
Macintosh-Systeme	APPLE
SPSSStatistics	IBM
Windows 2000 (Software)	MICROSOFT

### 3.6 Lösungen

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

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

#### 0,05 %-ige Triton X100-Lösung

- 5 ml 10%-ige Triton X100-Stammlösung
- 1000 ml PBS

#### 0,4 %-ige Triton X100-Lösung

- 4 ml 10%-ige Triton X100-Stammlösung
- 100 ml PBS

#### Glycidether-Mischung

- Lösung A: 77 ml Glycidether 100 und 125 ml 2-Dodecanylsuccinicacidanhydrid
- Lösung B: 100 ml Glycidether 100 und 89 ml Methylenacidanhydrid
- 4 Teile Lösung A mit 6 Teilen Lösung B und 2% 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol mischen

**HBSS**

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

**Kulturmedium für Slicekulturen (Ansatz für 100ml)**

- 25 ml Minimum Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert
- 1 ml L-Glutamin 200 mM, steril
- 580 µl Natrium Bicarbonat Lösung (7,5 %ig)
- 25 ml Hanks Balanced Salts (HBSS)
- 25 ml Horse Serum, hitzeinaktiviert, steril
- Aqua dest.
- Zugabe von NaOH (1M) bzw. HCl (1M) bis ein pH von 7,4 erreicht wird bei Raumtemperatur

**Neurobasalmedium**

- 50 ml Neurobasalmedium A
- 500 µl B27
- 125 µl L-Glutamin (200 mM)
- 500 µl Penicillin-Streptomycin

**PBS (phosphate buffered saline)**

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

**PFA 4 %**

- 4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS lösen (bei ca. 55 °C auf einer Heizplatte und mit einem Rührer vermischen)
- pH-Wert mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 einstellen

**Phosphatpuffer 0,05M**

- 1 ml 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- in Aqua dest. lösen

**Präparationsmedium für Slicekulturen (Ansatz für 100 ml)**

- 50 ml Minimum Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert
- 1 ml L-Glutamin 200 mM, steril
- 49 ml Aqua dest.
- Zugabe von NaOH (1M) bzw. HCl (1M) bis ein pH von 7,35 erreicht wird bei Raumtemperatur

**Propylenoxid/Glycidether-Mischung**

- Propylenoxid und Glycidether im Verhältnis 1:1 bzw. 1:3 mischen

**Western Blotting: Gele****Trenngel (12 %):**

- 6,7 ml H<sub>2</sub>O
- 5 ml Trenngelpuffer
- 8 ml 30%iges Acrylamid
- 200 µl 10%iges SDS
- 100 µl 10%iges APS
- 14 µl Temed
- gut durchmischen und zwischen die Glasplatten geben, ca. 30 min bei Raumtemperatur aushärten lassen, für eine glatte Oberfläche Isopropanol darübergeben

**Sammelgel:**

- 6,1 ml H<sub>2</sub>O
- 2,5 ml Sammelgelpuffer
- 1,3 ml 30%iges Acrylamid
- 100 µl 10%iges SDS
- 100 µl 10%iges APS
- 10 µl Temed
- Taschenkamm hineingeben und ebenfalls ca. 30 min bei Raumtemperatur aushärten lassen
- in feuchte Papiertücher einwickeln, in eine Plastiktüte packen und im Kühlschrank lagern

**Western Blotting: Lösungen****5-facher Laemmli-Probenpuffer:**

- 1,54 g DTT (entspricht 0,5 M),
- 2,0 g SDS (entspricht 10 %) und
- 8,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 (entspricht 0,4 M) ergeben ca 10,5 ml, ca. 30 min lösen



- 10 ml Glycerin
- eine Spatelspitze BPB hinzugeben
- Endvolumen: 20 ml

**10-facher Laemmli-Laufpuffer:**

- 30 g Tris-Base
- 144 g Glycin
- 10 g SDS
- Aqua dest. ad 1000 ml
- nicht autoklavieren
- pH sollte 8,3 sein
- um 1fachen Laemmli-Puffer herzustellen: 900 ml Aqua dest. mit 100 ml des 10fachen Laemmli-Puffers im Messzylinder mischen

**1-fach PBS mit 0,3 % Tween:**

- 100 ml PBS (10fach)
- 30 ml Tween (10%)
- ad 1 l mit Aqua dest. auffüllen

**Semi-Dry Transfer Puffer:**

- 25 mM Tris-Base (3,03 g aus der Apotheke)
- 150 mM Glycin (14,4 g aus der Apotheke) und 0,05 %iges (entspricht 5 ml/l) SDS vom 10 %igen SDS hinzugeben
- 100 ml 10 % Methanol (Kühlraum)
- mit Aqua dest. Auf 1000 ml auffüllen
- pH auf 8,3 einstellen
- NICHT autoklavieren

**Western Transfer Puffer für Nassblots:**

- 29 g Glycin
- 58 g TrisBase
- 37 ml 10%-iges SDS
- mit Aqua dest. auf ein Volumen von 800 ml auffüllen
- von dieser Lösung (10-fach) 80 ml entnehmen und mit 720 ml Aqua dest. und 200 ml Methanol auf ein Gesamtvolumen von 1 l auffüllen

## **4. Methoden**

### **4.1 Verwendete Tiere**

Zur Durchführung der wissenschaftlichen Versuche verwendeten wir im Institut für Neuroanatomie 5 Tage und 24 Tage alte Ratten (sog. P5-Ratten bzw. P24-Ratten). Die P5-Ratten stammten aus einem einzigen Wurf einer Ratte des üblich verwendeten Zuchtstammes WISTAR, um größtmögliche Ähnlichkeit der behandelten Tiere zu gewährleisten. Bei den zu immunhistochemischen Zwecken verwendeten P24-Ratten handelte es sich um eine männliche und eine weibliche, nicht behandelte Ratte. Die von den wilden Wanderratten abstammende WISTAR-Ratte ist durch die Züchtung für Laborzwecke den Forschungsbedürfnissen angepasst worden. Sie zeigen im Hinblick auf die Evolution Unterschiede zu normalen Wildratten, da sie durch ihre Funktion als Forschungsobjekt z.B. eine früher einsetzende Geschlechtsreife und zum Teil kleinere Organe haben. Am UKE gibt es eine gesonderte Zentrale für Tierhaltung, die eine kontrollierte und artgerechte Haltung der Lebewesen garantiert. Wasser und Nahrung standen ad libitum zur Verfügung. Die Versuche erfolgten unter der Einhaltung aller gesetzlichen Vorschriften der Behörde für Gesundheit und Wissenschaft.

### **4.2 Präparation der Hippocampi**

Bei der Entnahme und Kultivierung der Hippocampi orientierten wir uns an den von Stoppini et al. (1991) aufgeführten Leitlinien, die auch andernorts beschrieben werden (Kretz et al., 2004). Zunächst wurden die postnatalen Ratten tief mit reinem CO<sub>2</sub> anästhesiert, um sie im Anschluss zu dekapitieren. Hierzu wurde die Haut der Schädelkalotte resiziert und anschließend das Schädeldach median mit einer Schere geöffnet. Die Präparation erfolgte dabei unter den von Frotscher et Heimrich (1995) beschriebenen semisterilen Bedingungen. Um das Blut aus dem Körperkreislauf der Ratte zu spülen, schnitten wir ein kleines Loch in den rechten und linken Herzventrikel und führten eine Kanüle in den linken Ventrikel ein. Über diese Kanüle erfolgte zunächst eine Perfusion mit PBS (pH 7,4), dann mit 200 ml 4%igen PFA zur Fixation. Zur Entnahme des Gehirns aus dem Schädel verwendeten wir eine Heidemannspatel und überführten das herausgelöste Organ anschließend in 4°C kaltes PBS (pH 7,4) in einem Falcon und stellten die Probe über Nacht in den Kühlschrank. Um nur die Großhirnstrukturen zu erhalten, entfernten wir mit Hilfe eines Skalpells das Cerebellum und den Hirnstamm mit allen seinen Strukturen. Für die Behandlungen der P5-Gewebe wurden anschließend die Hemisphären mit einem Skalpell voneinander getrennt, sodass man von medial den Hippocampus im Temporallappen liegen sah. Diese paarig vorhandene Gehirnstruktur wurde dann aus den umgebenden Arealen des Lobus temporalis herausgelöst und in ein Kulturmedium überführt. Im Anschluss erfolgte eine 4-tägige Vorkultur im Brutschrank.

## 4.3 Herstellung und Fixierung der Slicekulturen

### 4.3.1 Kultivierung

Die Hippocampi der P5-WISTAR-Ratten wurden nach 4 Tagen Vorkultur bei 37 °C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in minimal essential medium (MEM) im Brutschrank am 4. Tag zur Behandlung in ein Kulturmedium überführt. Dieses setzte sich aus Neurobasalmedium, B27 Supplement, einer Penicillin-Streptomycin-Lösung und L-Glutamin zusammen. Jede Slicekultur überführten wir in eine Kammer, die mit 1 ml Kulturmedium gefüllt wurde. Ein Mediumwechsel erfolgte zur Gewährleistung optimaler Versuchsbedingungen am ersten Tag nach der Präparation, im Folgenden alle 2 Tage. In den 7 Tagen der Behandlung mit entweder Estrogenen, Androgenen, Rezeptorblockern oder Enzyminhibitoren wurden die Kulturen jeden 2. Tag parallel zum Mediumwechsel mit der entsprechenden Substanz stimuliert oder inhibiert. Hierbei musste auf Sterilität besonders Acht gegeben und der pH-Wert des Mediums musste vor jedem Wechsel mit NaOH (1 M) bzw. HCl (1 M) auf pH 7,4 getriggert werden. Die Stimulation bzw. Inhibition erfolgte immer zeitgleich mit dem zweitägigen Mediumwechsel. Unbehandelte Kulturen dienten bei unseren Versuchen als Kontrollgruppe. Auch die Slicekulturen der weiblichen und männlichen P24-Ratten blieben nach der viertägigen Vorkultur unbehandelt, um für die immunhistochemischen Experimente zur Verfügung zu stehen. Zur Überprüfung des Einflusses von DHT auf die Synapsendichte in der CA1-Region des Hippocampus (wie in 2.1 beschrieben, zeigen Estrogene dort den größten Einfluss auf die Dichte von Spinesynapsen) stimulierten wir die weiblichen und männlichen Slicekulturen mit Dihydrotestosteron ( $10^{-7}$  M = pharmakologische Konzentration, da bei niedrigeren Konzentrationen keine Effekte auf die synaptische Plastizität erreicht werden) bzw. inhibierten sie mit Flutamid ( $10^{-7}$  M) und Finasterid ( $10^{-7}$  M) und testeten den Effekt von einer DHT-Applikation zu den inhibierten Kulturen. Um den Effekt von E2 beim Männchen zu überprüfen, stimulierten wir zusätzlich Slicekulturen gleichzeitig mit Estradiol ( $10^{-7}$  M) plus Flutamid, mit dem genomischen Estrogenrezeptorantagonisten ICI und mit E2 ( $10^{-7}$  M = pharmakologische Serumkonzentration), da bei Stimulation mit physiologischen Serumkonzentrationen von  $10^{-10}$  M beim Weibchen und  $10^{-11}$  M beim Männchen kein Effekt in der Beeinflussung der synaptischen Plastizität beobachtbar ist (Rune et al., 2006)). Auch die Effekte von Letrozol auf die Dichte an Synapsen und die simultane Gabe von dem Aromatase-Inhibitor und DHT überprüfte ich anhand der Slices. Folgende Behandlungen wurden durchgeführt:

#### *Slicekultur 322*

männlich:

1. DHT ( $10^{-7}$  M)
2. Letrozol ( $10^{-7}$  M)
3. Trilostan ( $10^{-7}$  M)
4. DHT ( $10^{-7}$  M) und Letrozol ( $10^{-7}$  M)
5. DHT ( $10^{-7}$  M) und Trilostan ( $10^{-7}$  M)
6. Kontrolle

weiblich:

1. DHT ( $10^{-7}$  M)
2. Letrozol ( $10^{-7}$  M)
3. Trilostan ( $10^{-7}$  M)
4. DHT ( $10^{-7}$  M) und Letrozol ( $10^{-7}$  M)
5. DHT ( $10^{-7}$  M) und Trilostan ( $10^{-7}$  M)
6. Kontrolle

### *Slicekultur 356*

männlich:

1. Kontrolle
2. Flutamid ( $10^{-7}$  M)
3. Flutamid ( $10^{-7}$  M) und DHT ( $10^{-7}$  M)
4. DHT ( $10^{-7}$  M)
5. Finasterid ( $10^{-7}$  M)
6. Finasterid ( $10^{-7}$  M) und DHT ( $10^{-7}$  M)

weiblich:

1. Kontrolle
2. Flutamid ( $10^{-7}$  M)
3. Flutamid ( $10^{-7}$  M) und DHT ( $10^{-7}$  M)
4. DHT ( $10^{-7}$  M)
5. Finasterid ( $10^{-7}$  M)
6. Finasterid ( $10^{-7}$  M) und DHT ( $10^{-7}$  M)

### *Slicekultur 360*

männlich:

1. Kontrolle
2. Flutamid ( $10^{-7}$  M) und E2 ( $10^{-7}$  M)
3. ICI ( $10^{-7}$  M)
4. Kontrolle und DMSO
5. Flutamid ( $10^{-7}$  M)

### *Slicekultur 396*

männlich:

1. Finasterid ( $10^{-6}$  M)
2. Finasterid ( $10^{-7}$  M)
3. DMSO ( $10^{-6}$  M)
4. DMSO ( $10^{-7}$  M)

weiblich:

1. Finasterid ( $10^{-6}$  M)
2. Finasterid ( $10^{-7}$  M)
3. DMSO ( $10^{-6}$  M)
4. DMSO ( $10^{-7}$  M)

#### 4.3.2 Immunhistochemie

Durch Immunfluoreszenz können Proteine in Geweben oder fixierten Zellen sichtbar gemacht werden. Mittels Licht unterschiedlicher Wellenlängen können die Fluorochrome zum Leuchten gebracht werden und mithilfe spezieller Kameras detektiert werden.

Für die immunhistochemischen Versuche verwendeten wir das Gehirn von männlichen und weiblichen unbehandelten P24-WISTAR-Ratten. Hierzu wurden die präparierten, nicht behandelten Gehirne unter sterilen Bedingungen mit 4% PFA fixiert. Ich entnahm die Gewebe aus den mit  $\text{CO}_2$  anästhesierten Ratten und spülte es zweimal in einer raumtemperierten PBS-Lösung. Im Anschluss daran erfolgte der gleiche Spülvorgang mit  $4^\circ\text{C}$  temperierter PBS-Lösung, um die Gehirne dann für 24 Stunden in 4%-iger PFA-Lösung in einem Falcon zu fixieren. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gewebe abermals dreimal mit PBS gewaschen ( $4^\circ\text{C}$ ), um den größten Teil des verwendeten PFA zu eliminieren. Dann legte ich das Gehirn über Nacht in eine 25%-ige Saccharose-Lösung ein, tauschte im Anschluss die Lösung gegen eine frische ein und wartete so lange, bis sich das Gewebe zum Boden abgesenkt hatte. Anschließend wurden die Gehirne auf  $-80^\circ\text{C}$  kaltes Trockeneis gelegt, um sie schnellstmöglich zu frosten.

Um die bei  $-80^\circ\text{C}$  in Trockeneis gelagerten Gewebe immunhistochemisch behandeln zu können, wurden sie in Tissue Tek eingebettet und im Anschluss ohne Unterbrechung der Kühlkette in den Kryostaten überführt. Zum Reslicing benutzte ich eine Schnittdicke von  $20\ \mu\text{m}$ , um die jeweiligen Antikörper optimal an die zu untersuchende  $5\alpha$ -Reduktase binden zu können. Ich fertigte 32 Schnitte des männlichen Gehirns und 20 Schnitte des weiblichen Gewebes an, die ich mit einem Pinsel aus dem Kryostaten entnahm und vorsichtig auf einen Objektträger überführte. Zum Asservieren wurden alle Schnitte in einer Gefrierbox in die Gefrierkammer ( $-25^\circ\text{C}$ ) gestellt.

Die Immunhistochemie erfolgte unter semisterilen Bedingungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen an den Schnitten. An Tag 1 erfolgte die Behandlung mit dem Primärantikörper, auf die an Tag 2 der fluoreszierende Sekundärantikörper folgte. Da der verwendete polyklonale Primärantikörper aus dem Hasen gegen die  $5\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 zuvor noch nie zum Zwecke der hippocampalen Färbung verwendet wurde, musste ich zunächst in mehreren Versuchsreihen die passende Verdünnung testen, um ein optimales Färbeergebnis zu erhalten. Zudem stellte ich fest, dass eine MAP2-Färbung zur Darstellung der Dendriten eine störende Hintergrundfärbung erzeugt. Ich verwendete deshalb nur die DAPI-Kernfärbung zur Darstellung der Nuclei. Auch eine zweimalige Blockierung der Proteine vor Zugabe des Primär- und Sekundärantikörpers und

eine Inhibition der Enzyme erwies sich als gut. Das Optimum der Fluoreszenz des 5 $\alpha$ -Reduktase-Primärantikörpers (sc-20659) kristallisierte sich bei folgender Vorgehensweise heraus:

Tag 1:

1. Slicekulturen aus dem Gefrierfach entnehmen und ca. 30 min bei Raumtemperatur anwärmen (zur Vermeidung einer Hintergrundfärbung die Objekte nicht mit einem Fettstift umranden)
2. Kulturen 1  $\times$  5 min mit 0,05%-iger TritonX100-Lösung (in PBS) spülen
3. mit Methanol (MeOH) bei -20 °C für 10 min nachfixieren
4. Kulturen 3  $\times$  mit PBS (0,05% Triton X100) waschen
5. Kulturen 5 min mit PBS (0,4% Triton X100) permeabilisieren
6. anschließend 3  $\times$  mit PBS (0,05% Triton X100) waschen
7. mit dem Blocker „DAKO Endogenous Enzym Block“ benetzen
8. 1  $\times$  in PBS (0,05% Triton X100) spülen
9. alle Kulturen 30 min mit dem Proteinblocker DAKO bei RT benetzen
10. den Primärantikörper 1:50 verdünnen: dazu 100  $\mu$ l DAKO-Antibody-Diluent mit 2  $\mu$ l des Antikörpers gut mischen (Schüttler verwenden) und das Objekt benetzen; die Slicekultur zur Kontrolle (Negativkontrolle) verbleibt an Tag 1 nach der Benetzung mit dem Proteinblocker DAKO in seinem Zustand
11. alle Objekte über die Nacht in einer Feuchtkammer in den Kühlschrank (4°C) stellen

Tag 2:

1. alle Kulturen 3  $\times$  5 min in PBS (0,05% Triton X100) waschen
2. anschließend 30 min mit dem Proteinblocker DAKO benetzen
3. den Sekundärantikörper Alexa 555 (goat-anti-rabbit) 1:500 verdünnen: dazu werden 0,5 ml des DAKO-Antibody-Diluent mit 1  $\mu$ l des genannten Antikörpers gut gemischt (Schüttler verwenden)
4. anschließend alle Objekte benetzen und für 2 h in einen dunklen Schrank zur Inkubation stellen (bei RT)
5. DAPI-Kernfärbung in einer 1:100.000-Verdünnung auftragen: hierfür werden 120  $\mu$ l der DAPI-Stammlösung (1:1000 verdünnt) mit 12 ml PBS im Falcon gut durchmischt (die Lösung mit Alufolie vor Lichteinstrahlung schützen) und im Anschluss 3 min auf die Kulturen aufgetragen
6. alle Kulturen 3  $\times$  5 min in PBS (0,05% Triton X100) waschen
7. dann die Objektträger bestücken: Kulturen zu Rehydrierung kurz in Aqua dest. tauchen, am Tissue abtropfen lassen, 1-2 Tropfen Mountingmedium auf die Objekte geben und vorsichtig mit einer Pinzette deckeln

8. Kulturen über Nacht im Kühlschrank (4°C) lagern und vor Licht schützen

Bei weiteren Versuchen zum Nachweis der 5 $\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 benutzte ich einen anderen polyklonalen Primärantikörper aus dem Hasen (SRD5A2).

### 4.3.3 Elektronenmikroskopie-Fixierung

Die Slicekulturen 322, 356, 360 und 396 wurden nach 7-tägiger Behandlung mit den entsprechenden Substanzen speziell für die Elektronenmikroskopie fixiert. Das überschüssige Nährmedium wurde verworfen und die Kulturen im Anschluss dreimal mit PBS gespült, zweimal bei 37°C und das dritte Mal bei 4°C. Es erfolgte ein weiterer Spülvorgang in einem 4°C kaltem 0,1M Phosphatpuffer. Dann fixierte ich die Gewebe mit einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung für 3 h bei 4°C und bei einem konstanten pH von 7,4. Abschließend wurden die Kulturen nochmals mit Phosphatpuffer (0,1M, 4°C) gespült.

Zum Nachfixieren der Gewebe gab ich 1%-iges Osmiumtetroxid in 0,1M Natriumpufferphosphat mit Saccharose zu den Kulturen und ließ die Lösung 20-120 min einwirken. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe konnte ich die Dehydrierung der Gewebe realisieren. Dabei verwendete ich immer höhere Ethanolkonzentrationen, denen die Gewebe jeweils für mind. 10 min ausgesetzt wurden. Ich begann mit einer 35%-igen Ethanol-Lösung, benutzte dann eine 50%-ige Lösung, eine 70%-ige, eine 90%-ige und zwei Mal eine 100%-ige Ethanollösung. Anschließend wurden die Kulturen zweimal für je 15 min mit Propylenoxid versetzt. Hierbei musste besonders darauf geachtet werden, dass das Gewebe nicht austrocknete, da Propylene stark flüchtig sind. Damit war auch das Restwasser im Gewebe eliminiert.

Im Anschluss an die Nachfixierung begann ich mit der Einbettung der Kulturen. Hierfür wurde ein Intermedium (bestehend aus einer Glycidether-Mischung und Propylenoxid im Verhältnis 3:1 und einem Zusatz von 2% 2,4,6-Trisdimethylaminomethylphenol) zum Gewebe gegeben. Wenn sich das Gewebe ausreichend mit Intermedium vollgesogen hatte, sank es zu Boden. Anschließend gab ich einen Tropfen Glycidether auf die Silikonplatten und legte die Slicekulturen darauf. Abschließend bedeckte ich das Ganze mit einer Dokumentenfolie und stellte alle Kulturen über die Nacht zum Aushärten in einen 65°C warmen Brutschrank. Am nächsten Tag konnten die Folien mit denen ihr anheftenden Slicekulturen von den Silikonplatten gelöst und mit einer Gelatine kapsel, die eine Identifikationsnummer erhielt, überzogen werden. Die Aushärtung erfolgte wieder über Nacht im Brutschrank bei 65 °C.

Um die Gewebe in Semidünnschnitte zu überführen, wurden sie mit einem Diamantmesser auf einem Reichert-Jung OmU3 Ultramikrotom standardisiert auf 1  $\mu$ m geschnitten. Anschließend erfolgte eine Färbung frei schwimmend mit 1%-iger Toluidinblaulösung. Nach der Einstellung einer Übersicht auf den Hippocampus identifizierte ich das CA1-Areal und schnitt das Gewebe gezielt unter Bewahrung

des Stratum pyramidale und radiatum auf ca. 90 nm dünne Ultradünnschnitte am Ultramicrotom zu. Das Zuschneiden der Ultradünnschnitte erfolgte serienmäßig und zufallsmäßig aus der CA1-Region. Um die hauchdünnen Slicekulturen auf einen Kupferschlitzträger zu transportieren, benutzte ich eine Wimper. Dann begann ich mit der elektronenmikroskopischen Färbung der Kulturen, indem ich dem Gewebe für 30 min Uranylacetat zusetzte. Anschließend erfolgte ein Waschgang, der von Bleicitrat-Zugabe gefolgt wurde (5 min). Zum Schluss wurden die Gewebe nochmals gespült. Die verwendete Methode erfolgte nach Reynolds (Reynolds, 1963). Die Slicekulturen standen nun zur Betrachtung im EM bereit.

## **4.4 Bildanalyse**

### **4.4.1 Immunhistochemie**

Die immunhistochemischen Analysen der Hippocampi erfolgten am Laser Scanning Mikroskop. Zur objektiven Auswertung definierte ich zu Beginn der Betrachtungen einen Einstellungsstandard am Mikroskop, der im Folgenden für alle Messungen beibehalten wurde. Die Intensität DAPI-Kernfärbung wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm und die des Sekundärantikörpers gegen den Primärantikörper der 5 $\alpha$ -Reduktase bei 555 nm gemessen. Um den Hippocampus auf dem Schnitt des gesamten Gehirnes identifizieren zu können, nutzte ich zu Beginn bei 200-facher Vergrößerung die DAPI-Kernfärbung, mit der die spezifischen Strukturen wie der Gyrus dentatus und das Pyramidenzellband aufzufinden waren. Anschließend konnte ich mit einem 400-fachen Vergrößerungsfaktor das CA1- und CA3-Feld des Hippocampus fokussieren und den Kontrast scharf stellen.

### **4.4.2 Elektronenmikroskopie**

Die Betrachtung der zur Elektronenmikroskopie gefärbten Slicekulturen 322, 356 und 360 erfolgte bei einer Vergrößerung von 3000-fach im CM 100, PW 6021 Elektronenmikroskop von Philips. Stellen der CA1-Region, die große Dendriten oder Blutgefäße enthielten, wurden ausgespart, um eine mögliche Fehlerquelle zu vermeiden. Von jedem Schnitt wurden zwei Aufnahmen angefertigt, die sich in einem Abstand von ca. 80-100 nm befanden. Um die Spinesynapsen in den elektronenmikroskopischen Bildern möglichst objektiv auszuwerten, überlegte ich mir ein standardisiertes Verfahren: Ich druckte mir alle EM-Bilder auf DIN A4-Papier in größtmöglichen Kontrast aus und sortierte die Aufnahmen, die einen Schnitt jeweils im Abstand von ca. 80-100 nm zeigten. Somit bildeten diese 2 Aufnahmen ein Bilderpaar. Eine Synapse hat nach Kahle W. (2001) einen festgelegten Aufbau, den ich in meiner Auswertung berücksichtigen musste. So gibt es 5 grundlegende Elemente, die eine Synapse aufweisen muss:

1. eine präsynaptische Membran
2. präsynaptische Vesikel
3. einen synaptischen Spalt



4. eine postsynaptische Membran
5. und eine postsynaptische Verdichtung

In meiner Auswertung wurden nur die asymmetrischen Spinesynapsen berücksichtigt, bei denen Spine auf Spine trifft. Symmetrische Synapsen und Schaftsynapsen, auch wenn sie asymmetrisch waren, flossen nicht in die Zählungen ein. Fehlte die postsynaptische Verdichtung oder der synaptische Spalt, zählte ich die Spinesynapse nicht. Waren die Vesikel in der Präsynapse nicht deutlich erkennbar, aber alle anderen Elemente einer Spinesynapse vorhanden, zählte ich die Synapse als vollwertige Spinesynapse. Auf der ersten Aufnahme eines Bilderpaares markierte ich mit einem gelben Stift alle vorhandenen Spinesynapsen. Anschließend verglich ich die erste mit der zweiten Aufnahme und überprüfte, ob neue Synapsen vorhanden waren (erhielten eine grüne Markierung) oder ob sich die in der ersten Aufnahme identifizierten Synapsen verändert hatten (war dies der Fall, so markierte ich sie rot). Das Ganze konnte ich parallel am Computer mit dem Programm iTEM vergrößert betrachten und dadurch meine Beobachtungen auf den vor mir liegenden Bildern verifizieren. Blieb eine Spinesynapse in der zweiten Aufnahme unverändert (identisch wie in Aufnahme 1), erhielt sie gleichermaßen eine gelbe Markierung. Gezählt wurden im Anschluss auf der zweiten Aufnahme nur die neu aufgetauchten Spinesynapsen und diese, die sich in ihrer Morphologie so verändert hatten, dass man sie nicht mehr als Synapse definieren konnte. Damit wurden nur solche Synapsen in den Zählvorgang aufgenommen, die eindeutig in nur einem Abschnitt vorhanden waren. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Dokumenten-Klarsichtfolie, auf die eine quadratische Fläche aufgetragen wurde (11,65 cm × 11,65 cm was in Wirklichkeit 6 µm × 6 µm entspricht). Diese Folie wurde stets auf die zweite Aufnahme eines Bilderpaares gelegt. Zur quantitativen Bestimmung wählte ich den Bereich der höchsten Spinesynapsendichte aus. Um ein möglichst signifikantes und aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, fertigte ich für jede behandelte Slicekultur 3 Ultradünnschnitte (Blöcke) an und machte anschließend für jeden Ultradünnschnitt 8 Aufnahmen. Somit erhielt ich für jede Behandlung 24 EM-Bilder, wobei immer 2 Bilder ein Paar bildeten (erste und zweite Aufnahme, wie oben beschrieben).

## 4.5 Western-Blot

### 4.5.1 SDS-Page

Dieses Verfahren dient der Herstellung der SDS-Gele, die zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus den Kulturen benötigt werden. Die negativ geladenen Proteine werden dabei nach ihrer Ladung bzw. ihrer Größe voneinander getrennt.

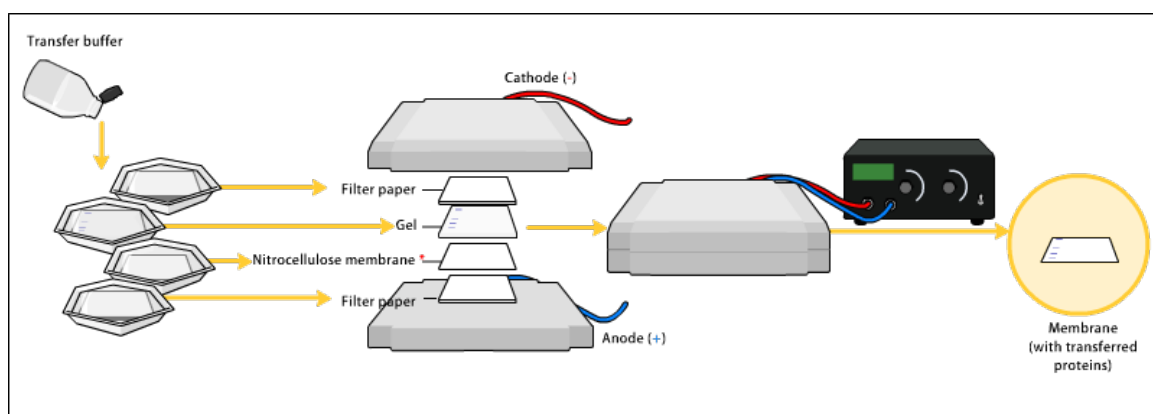
Nach dem Zusammenmischen der Chemikalien für die entsprechenden Gele (siehe Material) werden die noch flüssigen SDS-Gele zwischen eine große und eine kleinere Glasplatte gefüllt (entweder mit der Dicke 0,75 mm oder 1,5 mm; je nachdem welche Proteine es zu untersuchen gilt). Dabei wird zunächst das

Trenngel eingegossen und für 30 min. auspolymerisiert. Aqua dest. wird auf das Trenngel gegeben, damit sich ein durchgehend klarer Rand während der Auspolymerisierung bilden kann. Dieses wird nach Ablauf der Zeit verworfen und man kann das Sammelgel eingießen und ebenfalls für 30 min. aushärten lassen. Das SDS-Sammelgel bildet eine im Vergleich zum Trenngel schmalere Schicht zwischen den zwei Glasplatten. Ist der Vorgang abgeschlossen, können die Gele in die Gelelektrophoresekammer überführt werden und diese mit Laemmli-Laufpuffer aufgefüllt werden. Für die Analysen setzte ich eine Proteinmenge von 50 µg ein (sowohl für die Kontrollen, als auch für die behandelten Kulturen). Die Proteine wurden mit SDS-Laemmli-Probenpuffer und Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 60 µl für dickere Gele (1,5 mm) und auf 20 µl für dünnere Gele (0,75 mm) verdünnt. Die Proteinproben konnten anschließend in die Geltaschen pipettiert werden.

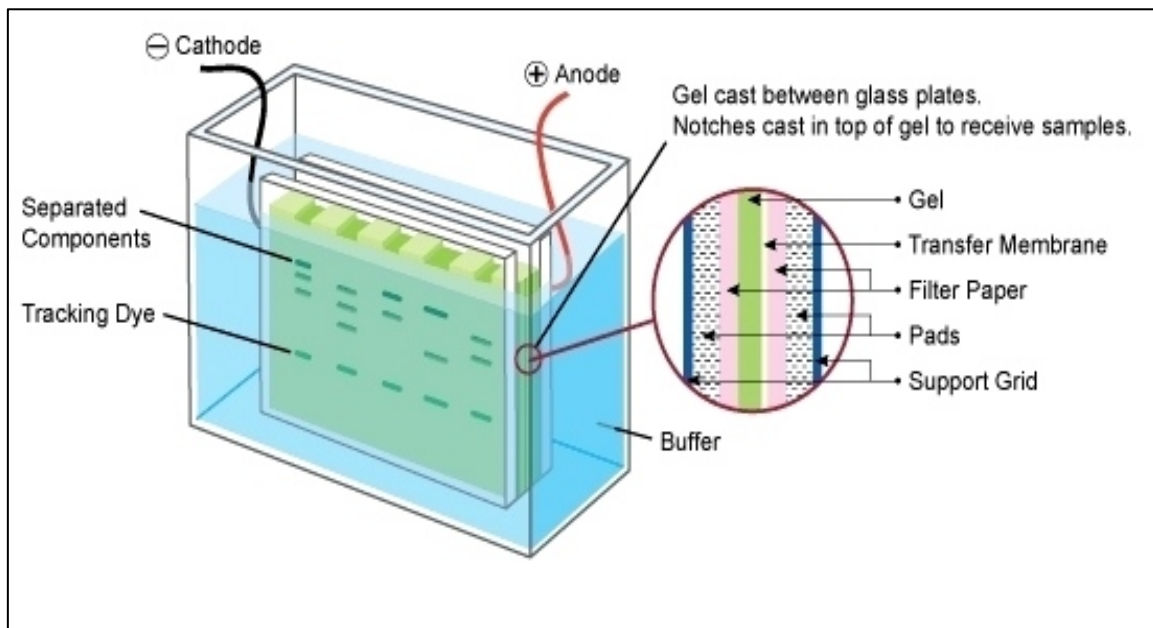
#### 4.5.2 Blotten

Beim Blotting-Verfahren werden die Proteine, die man vorher elektrophoretisch aufgetrennt hat, durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (100 V) auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen.

Der Vorgang kann mithilfe eines Semidry-Blots („Semidry-Transfer-Zelle“) oder eines Nassblots erfolgen. Bei beiden Verfahren ist darauf zu achten, dass die Nitrocellulose-Membran auf der Seite des Plus-Poles liegt und sich das SDS-Gel mit den negativ geladenen Proteinen am Minuspol befindet. Nur so wird gewährleistet, dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern.



**Abb. 7:** Schematischer Aufbau eines Semidry-Blot-Systems. Quelle: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western\\_blot\\_transfer](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western_blot_transfer).



**Abb. 8:** Schematischer Aufbau eines Nass-Blot-Systems.

Quelle: <http://www.antibodies-online.com/images/news/WesternBlotSetup.jpg>

### 4.5.3 Vorgehen

Durch die nachfolgenden Versuche wollte ich herausfinden, ob die 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 (28 kDa) durch DHT-Stimulation spezifisch im Western-Blot mittels des Primärantikörpers H-100 (von Santa Cruz Biotechnology) nachzuweisen ist. Nur wenn der Nachweis sich als positiv herausstellen würde, machte es Sinn, in der Immunhistochemie weiterhin diesen primären Antikörper gegen die 5 $\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 einzusetzen. Andernfalls musste ein anderer Primärantikörper ausgetestet werden.

Zunächst stellte ich die Gele in der Dicke von 0,75 mm und 1,5 mm zur elektrophoretischen Auftrennung nach einem standardisierten Verfahren her (siehe Material 3.6). Ich verwendete ein 12%-iges Trenngel (für kleine Proteine (28 kDa bei der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2) bestimmt) für meinen Blot.

Um die entsprechenden Proteine, die ich im Western Blot nachweisen wollte, aufzuschließen, musste ich die Neurone der hippocampalen Dispersionskulturen zunächst mit TBS (1,2% Triton X 100) behandeln. Anschließend erfolgte eine 48-stündige Stimulation mit DHT der männlichen und weiblichen Zellen. Die jeweiligen Kontrollen wurden nicht stimuliert. Anschließend konnten die Proteine entnommen und bei -20 °C gelagert werden. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford.

BSA Standard 0,5 mg/ml

Konzentration ( $\mu\text{g}$ )	BSA Standard ( $\mu\text{l}$ )	Aqua dest. ( $\mu\text{l}$ )
0	0	20
1,25	2,5	17,5
2,5	5	15
5	10	10
7,5	15	5
10	20	0

=> nach diesem Schema 20  $\mu\text{l}$  Proteinstandard und 980  $\mu\text{l}$  Bradford Reagenz mischen

Proteinproben (Doppelbestimmung):

Probe		Proteinkonz. ( $\mu\text{g}$ )	Mittelwert
1.1	Kontrolle (m.)	5,47	
1.2	Kontrolle (m.)	4,32	4,9
2.1	DHT (m.)	8,48	
2.2	DHT (m.)	4,92	6,7
3.1	Kontrolle (w.)	7,61	
3.2	Kontrolle (w.)	6,76	7,2
4.1	DHT (w.)	8,51	
4.2	DHT (w.)	8,33	8,4

=> nach diesem Schema 1  $\mu\text{l}$  Protein und 980  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz zusammenfügen

Die Proteinkonzentrationen konnten mit dem Biophotometer gemessen werden und ergaben folgende Werte:

1. Probe (männlich, Kontrolle): 4,9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
2. Probe (männlich, DHT): 6,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
3. Probe (weiblich, Kontrolle): 7,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
4. Probe (weiblich, DHT): 8,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Durch meine Proteinbestimmung wusste ich nun, welche Mengen ich für meinen Western-Blot einsetzen muss. Hierfür pipettierte ich 50  $\mu\text{g}$  Proteine, die immer auf Eis gekühlt sein mussten, in jeweils 4 Eppendorfer Reagenzgefäße und füllte sie mit Aqua dest. und 5-fachen SDS-Laemmli-Probenpuffer (musste auf 1-fach verdünnt werden) auf ein Gesamtvolumen von 60  $\mu\text{l}$  auf:

1. Probe (männlich, Kontrolle): 10,2  $\mu\text{l}$  Protein, 37,8  $\mu\text{l}$  Aqua dest., 12  $\mu\text{l}$  SDS-Puffer
2. Probe (männlich, DHT): 7,5  $\mu\text{l}$  Protein, 40,5  $\mu\text{l}$  Aqua dest., 12  $\mu\text{l}$  SDS-Puffer

3. Probe (weiblich, Kontrolle): 6,9 µl Protein, 41,1 µl Aqua dest., 12 µl SDS-Puffer
4. Probe (weiblich, DHT): 6 µl Protein, 52 µl Aqua dest., 12 µl SDS-Puffer

Die 4 Reagenzien denaturierte ich im Anschluss für 5 min bei 95 °C. Anschließend stellte ich die Proben wieder auf Eis und legte sie über Nacht in den Gefrierschrank (-20°C), damit ich am nächsten Tag mit dem Blotten beginnen konnte.

Beim ersten Western-Blot ging ich nach folgendem Schema vor:

- Verwendung des 0,75 mm dicken Gels
- Proben auftauen und zentrifugieren
- in die 1. Tasche des Sammelgels wird der Marker (Precision Plus Protein Standards) mit definierten Proteinen als Standard hinein pipettiert (10 µl)
- die Taschen 2, 3, 4, 5 erhalten die entsprechenden, angesetzten Proben (je 60 µl; Tasche 2: Kontrolle (m.), Tasche 3: DHT (m.), Tasche 4: Kontrolle (w.), Tasche 5: DHT (w.)
- für die SDS-Page eine Spannung von 80 V für ca. 15 min anlegen, damit sich die Proteine im Sammelgel sammeln können
- anschließend wird die Spannung auf 190 V erhöht, um die Proteine im Trenngel nach ihrem Gewicht aufzutrennen
- das Sammelgel kann nun abgetrennt und die Proteine auf Nitrocellulose transferiert werden; dies erfolgt im Semidry-Blot bei einer Spannung von 35 V für ca. 1 Stunde
- um einen Nachweis zu erhalten, ob überhaupt Proteine auf die Nitrocellulose-Membran übertragen wurden, färbt man das Ganze mit Ponceau-Rot an
- dann werden die Proteine mit 5%-iger Milchsäure in PBS-T (PBS-Tween) oder BSA mind. 30 min lang (oder auch über Nacht) blockiert (in meinem Fall Milchsäure; richtet sich aber nach dem jeweiligen eingesetzten Primär-Antikörper)
- Primär-Antikörper über Nacht bei 4°C auf die Membran geben (Rabbit anti-5-alpha-Reduktase, polyklonal, 1:200 => 3 ml Milchpulver und 60 µl AK mischen und in ein Falcon füllen): Membran in das Falcon legen und in den Kühlschrank stellen (unter ständiger Durchmischung)
- am nächsten Tag 3 mal 5 min in PBS-T waschen
- nun den zweiten Primär-Antikörper gegen GAPDH (38 kDa) auf die Membran auftragen (M(ouse)ab anti-GAPDH, 1:10000 (15 ml Milchpulver und 1,5 µl AK mischen), gegen das Housekeeping-Gen gerichtet), 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
- 3 mal 5 min in PBS-T waschen
- im Anschluss die sekundären Antikörper zusammen auftragen: 1. Donkey-anti-Rabbit-HRP (Horseradish-peroxidase = Meerrettich-Peroxidasegekoppelt), 2. Goat-anti-Mouse-HRP; beide 1:2500 verdünnt; 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
- dann 3 mal 5 min in PBS-T waschen

- anschließend zur Auswertung HRP 5 min lang mit Millipore Immobilon (in einer 1:1-Mischung) zum Fluoreszieren bringen und das Ergebnis auswerten

Der zweite Western-Blot erfolgte nach dem gleichen Schema und mit den gleichen Proteinproben wie beschrieben. Ich verwendete jedoch bei diesem Blot eine Geldicke von 0,75 mm, weshalb für das Gesamtvolumen aus Protein, SDS-Laemmli-Probenpuffer und Aqua dest. 20 µl ausreichen. Beim Blotten hielt ich mich an das auf Seite 40 beschriebene Schema. Vor der Inkubation mit den Primärantikörpern wurden die Proteine ins BSA-TBS für 30 min. blockiert. Ich verwendete zwei Primärantikörper gegen die 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 in der 1:200-Verdünnung (H-100 von Santa Cruz Biotechnology (zuvor schon ausgetestet) und SRD5A2 von Biorbyt; beides polyklonale AK aus dem Hasen), um sie im direkten Vergleich auswerten zu können. Der Primär-Antikörper gegen GAPDH wurde in einer 1:15000-Verdünnung verwendet. Als Verdünnungsmittel für die Antikörper diente PBS-Tween. Zudem benutzte ich statt einem Semidry-Blot-System ein Nass-Blot-System (100 V, 1 h 10 min).

## 5. Ergebnisse

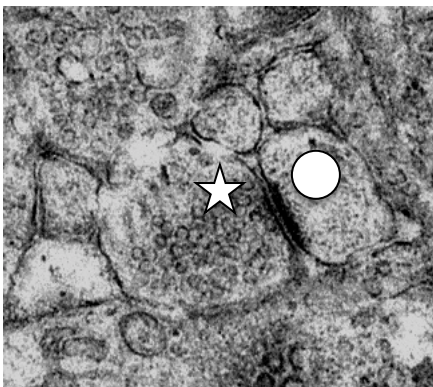
### 5.1 Elektronenmikroskopie

Um die strukturelle synaptische Plastizität nach verschiedensten Behandlungen von Schnittkulturen im hippocampalen Gewebe bewerten zu können, betrachtete ich die elektronenmikroskopischen Bilder parallel mit dem Computerprogramm iTEM, da ich dort in die Bilder zoomen konnte (100%). Bei der Auswertung beschränkte ich mich auf die CA1-Region des Hippocampus, da diese am sensibelsten auf Hormon- bzw. Hormonantagonisten-Behandlung reagiert (siehe 2.1).

Alle Slicekulturen wurden in der gleichen Art und Weise behandelt und stimuliert, um so ein möglichst aussagekräftiges und repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Ich ermittelte für jede Behandlung die durchschnittliche Anzahl an Spinesynapsen, die das Korrelat der synaptischen Plastizität sind. Ein Ergebnis ist statistisch signifikant, wenn der p-Wert der Spinesynapsen pro Slice  $< 0,05$  ist. Die Dichte an Synapsen kann als morphologischer Zuwachs- oder Abnahmeindikator der Plastizität angesehen werden. Ein standardisiertes Vorgehen ermöglichte mir eine objektive Auswertung (siehe 4.4.2). Nur neu gebildete, exzitatorische Synapsen sollten in die Ergebnisse aufgenommen werden. Wie schon erwähnt, muss eine Spinesynapsen einen strukturierten, gleichmäßigen Aufbau mit den 5 wichtigen Elementen zeigen (nach Kahle W., 2001):

1. eine präsynaptische Membran
2. präsynaptische Vesikel
3. einen synaptischen Spalt
4. eine postsynaptische Membran
5. und eine postsynaptische Verdichtung

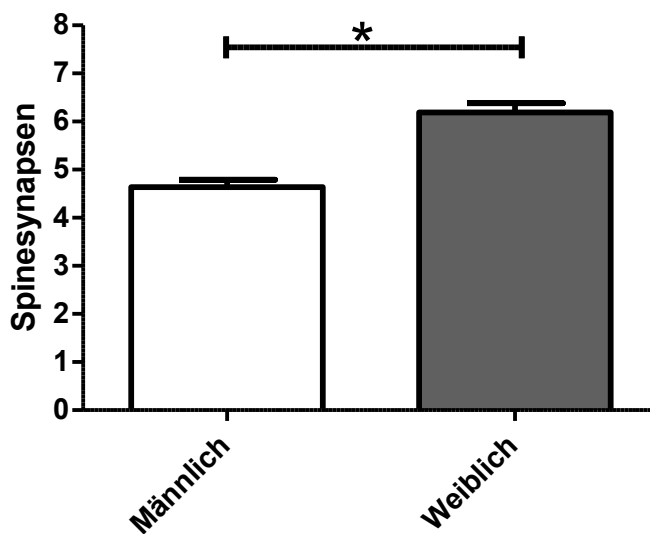
Die quantitative Auswertung wurde anhand der morphologisch intakten Synapsen vorgenommen. Für jede Stimulation wurden 24 elektronenmikroskopische Bilder ausgewertet. In allen Behandlungsgruppen, als auch in den Kontrollgruppen konnten diese nachgewiesen werden, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Folgende Abbildungen zeigen Ausschnitte der behandelten und im Elektronenmikroskop betrachteten Kulturen:



**Abb. 9:** Aufbau einer Spinesynapse mit den wichtigen 5 Elementen. Der Stern zeigt die Präsynapse mit synaptischen Vesikeln und präsynaptischer Membran. Der Kreis weist auf die Postsynapse mit postsynaptischer Membran und Verdichtung hin.

Die Daten wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse in ANOVA ausgewertet. Das Signifikanzniveau liegt bei allen Ergebnissen bei einem p-Wert von  $p < 0,05$ , SEM, gekennzeichnet mit einem Stern. Die Dichte der Spinesynapsen bezieht sich bei allen Auswertungen auf eine Fläche von  $6,4 \mu\text{m}^3$ .

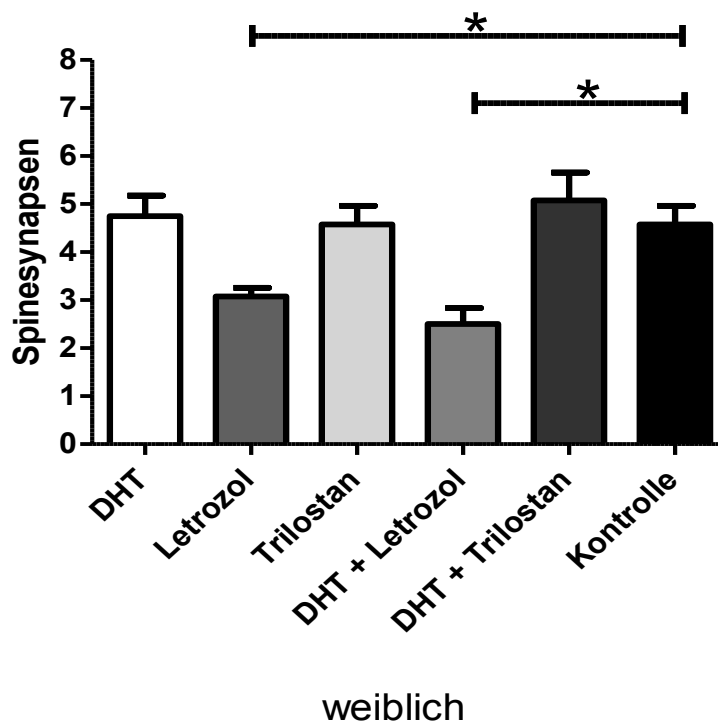
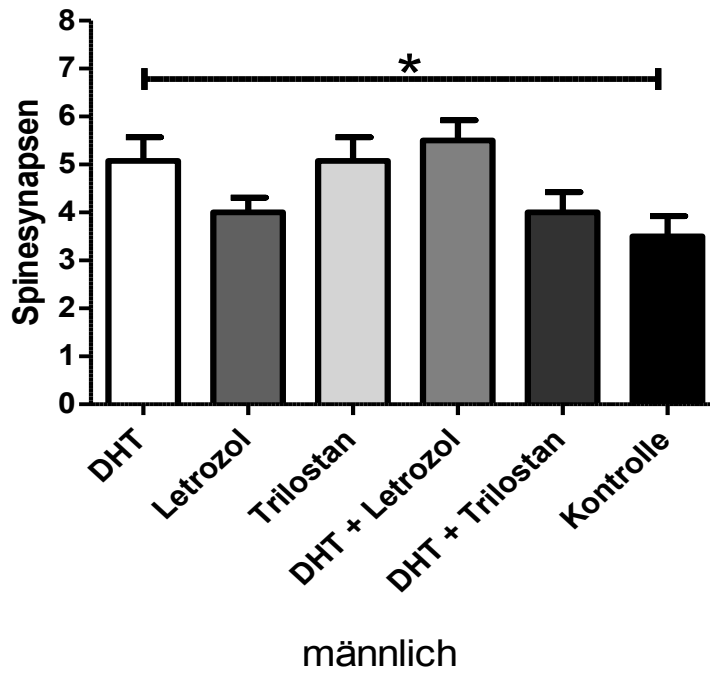
### 5.1.1 Die Dichte an Spinesynapsen ist im weiblichen prinzipiell höher als im männlichen Hippocampus



Das Schaubild veranschaulicht den quantitativen Unterschied der Anzahl an Spinesynapsen in der CA1-Region des Hippocampus. Im männlichen, unbehandelten hippocampalen Gewebe beträgt die durchschnittliche Anzahl an Spinesynapsen  $4,6 \pm 0,15$  pro  $6,4 \mu\text{m}^3$ . Bei den weiblichen Tieren finden sich hingegen im Schnitt  $6,2 \pm 1,91$  Spinesynapsen pro  $6,4 \mu\text{m}^3$ . Der sexuelle Unterschied ist signifikant.



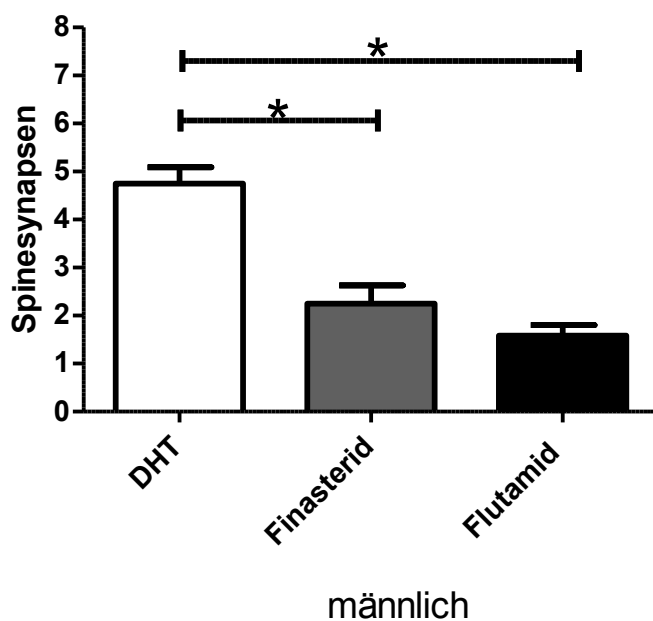
### 5.1.2 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM DHT, Letrozol, Trilostan, DHT plus Letrozol und DHT plus Trilostan



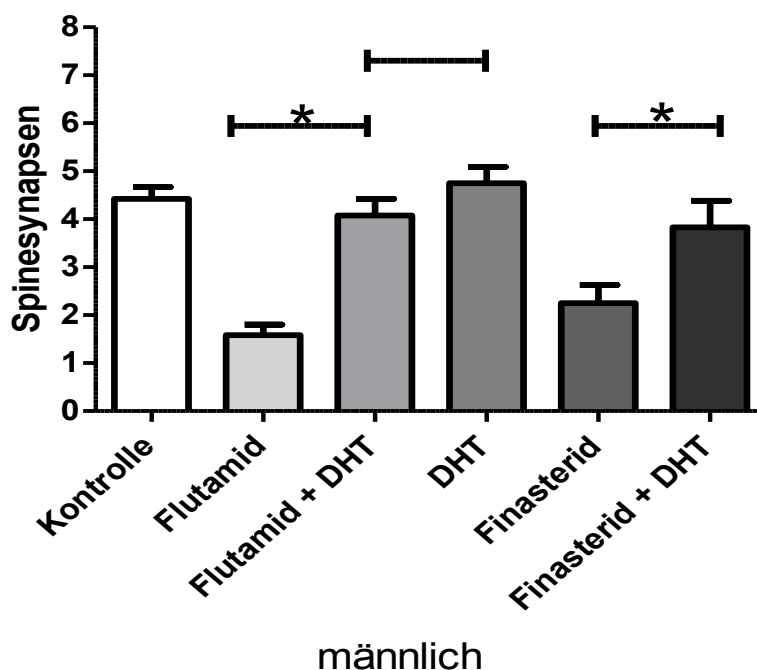
Die quantitative Auswertung erfolgte wie in Absatz 4.3.1 beschrieben nach 4 Tagen der Vorkultur und 7 Tagen der jeweiligen Behandlung mit den Hormonen und bzw. oder mit Rezeptor- und Enzyblockern.

Die Grafiken zeigen beide einen klaren Unterscheid der Dichte an Spinesynapsen in der hippocampalen CA1-Region nach Behandlung mit den entsprechenden Hormonen oder Enzyblockern. Bei den männlichen Tieren konnte ich feststellen, dass die simultane Gabe von Letrozol und DHT ( $5,5 \pm 0,42$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $3,5 \pm 0,42$ ) bei Betrachtung der Slices zu einem signifikanten Anstieg an Spinesynapsen führt ( $p = 0,033$ ). Auch die Gabe von 100 nM DHT ( $5,1 \pm 0,49$ ) erzielte in den einzelnen Aufnahmen einen Anstieg, der als signifikant zu bewerten ist ( $p = 0,015$ ). Letrozol ( $4 \pm 0,31$ ) und auch Trilostan ( $5,08 \pm 0,49$ ) haben keinen eindeutigen Effekt auf die Dichte synaptischer Spines im männlichen hippocampalen Gewebe. Im Gegensatz dazu konnte ich zeigen, dass die Applikation von 100 nM Letrozol in weibliche Schnittkulturen zu einem sehr drastischen Abfall an Spinesynapsen in der CA1-Region führt ( $3,08 \pm 0,18$ ). Der p-Wert der behandelten Letrozolgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe liegt bei 0,075. Simultane Gabe von DHT zu weiblichen, mit Letrozol behandelten Kulturen kann den signifikanten Abfall an Synapsen nicht reversieren ( $2,5 \pm 0,34$ ). Es bleibt bei der signifikant geringeren Anzahl an synaptischen Kontakten. DHT und Trilostan ( $5,08 \pm 0,58$ ) zeigen keinen eindeutigen Einfluss auf das weibliche hippocampale Gewebe. Zudem ist die Anzahl an Spinesynapsen im weiblichen Hippocampus tendenziell etwas höher als im männlichen. Dies wird durch den Vergleich aller männlichen Kontrollkulturen mit denen der weiblichen Tiere bestätigt (weibliche Kontrollen:  $6,19 \pm 0,19$ , männliche Kontrollen:  $4,64 \pm 0,15$ ).

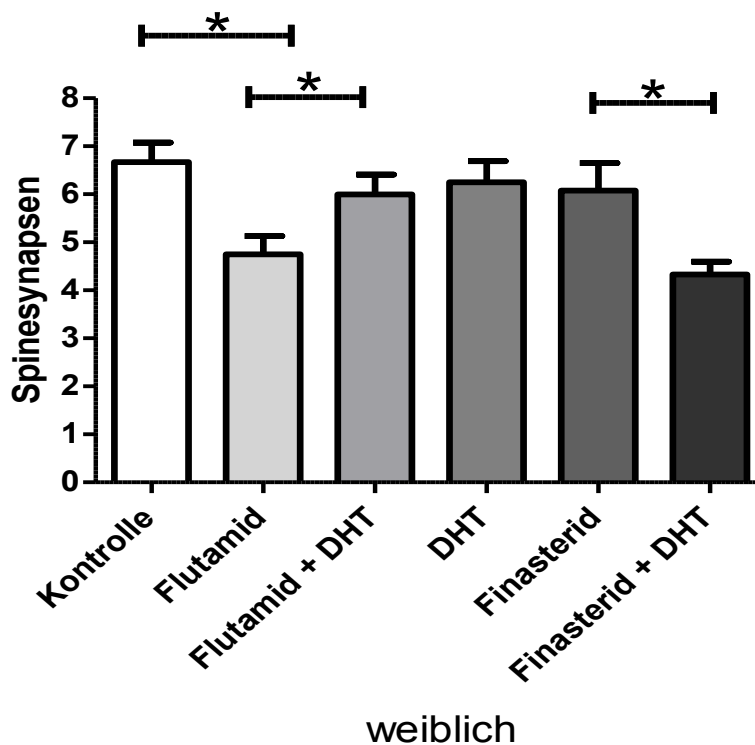
### 5.1.3 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM Flutamid, Finasterid, DHT, Flutamid plus DHT und Finasterid plus DHT



Die Grafik zeigt, dass die Behandlung der Schnittkulturen mit DHT oder Androgenrezeptorblockern bzw. Enzymhemmern der  $5\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 und 3 geschlechtsspezifische Unterschiede zeigen. Flutamid-Applikation führt im männlichen Ratten-Hippocampus zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Spinesynapsen ( $1,58 \pm 0,22$ ) ( $p = 0,000$ ). Auch Finasterid ( $2,25 \pm 0,38$ ) bewirkt im männlichen Tier den Abfall der Spinesynapsendichte, jedoch nicht ganz so signifikant wie es bei Flutamid der Fall ist ( $p = 0,003$ ).



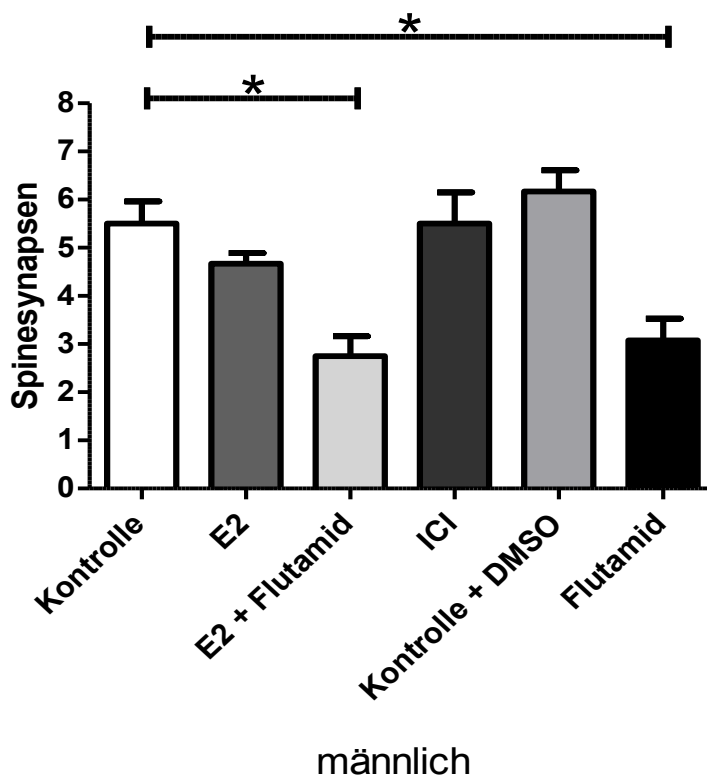
Die simultane Gabe von DHT zu diesen männlichen Schnittkulturen kann den hemmenden Effekt der Substanzen reversieren, sodass sich kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrollgruppe erkennen lässt. Die Spinedichte ist damit in den gleichzeitig mit DHT behandelten Flutamid ( $4,08 \pm 0,34$ )- bzw. Finasteridkulturen ( $3,8 \pm 0,55$ ) signifikant höher als in den reinen Flutamid / Finasterid-Schnittkulturen ( $p = 0,001$  für Flutamid plus DHT im Vergleich zu reiner Flutamid-Behandlung,  $p = 0,018$  für Finasterid plus DHT im Vergleich zur Finasterid-behandelten Kultur). Die Gabe von DHT ( $4,75 \pm 0,34$ ) in männliche Ratten führt zu einem tendenziellen Anstieg an synaptischen Kontakten in der CA1-Region.



Im Gegensatz dazu lässt sich dieser Effekt im weiblichen Tier nicht feststellen. Die Applikation von Finasterid ( $6,08 \pm 0,57$ ) zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ( $6,67 \pm 0,41$ ) ( $p = 0,425$ ). Jedoch führt die Behandlung der weiblichen Schnittkulturen mit Flutamid ( $4,75 \pm 0,38$ ) und auch mit Finasterid plus DHT ( $4,33 \pm 0,27$ ) zu einem signifikanten Verlust an neuronalen Kontakten. Auch in diesen Slicekulturen lässt sich wie in Abschnitt 5.1.1 zeigen, dass die Anzahl an Spinesynapsen im weiblichen Hippocampus deutlich höher ist als im männlichen (Kontrolle mit  $6,67 \pm 0,41$ ).

#### 5.1.4 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM E2, E2 plus Flutamid, ICI und Flutamid

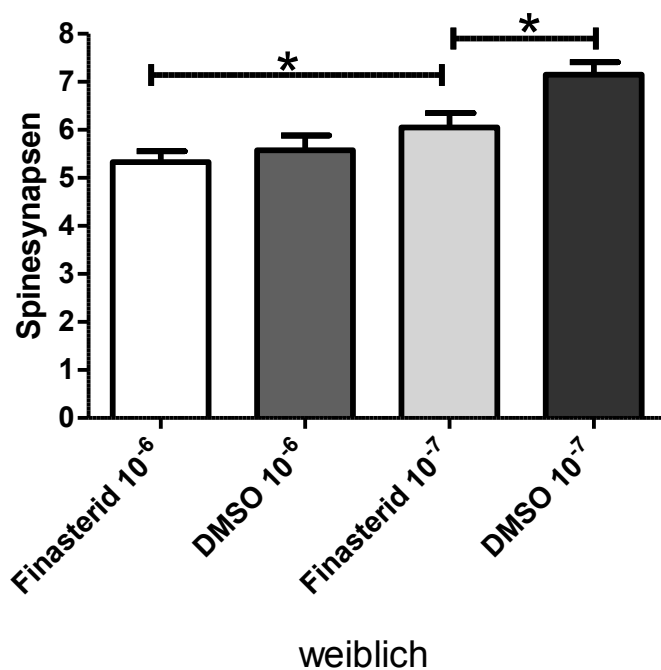
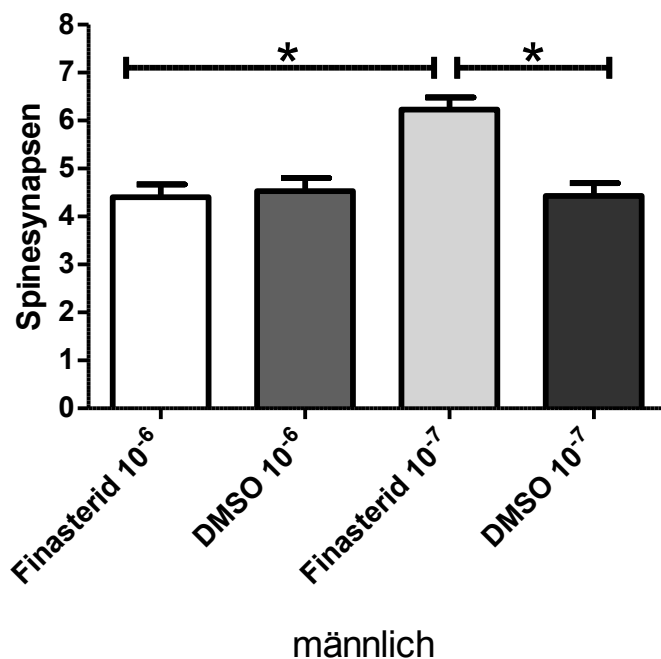
Um den Effekt von Estradiol auf den männlichen Hippocampus zu testen, wurden die Schnittkulturen mit diesem Hormon oder einem Estrogenrezeptorblocker (ICI) in einer Konzentration von 100 nM behandelt. Zudem sollte überprüft werden, ob E2 den hemmenden Effekt von Flutamid aufheben kann, wie es bei DHT in SK 356 der Fall war (siehe Abschnitt 5.1.2).



Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass E2 den signifikanten Abfall an Spinesynapsen nach Flutamid-Behandlung ( $2,75 \pm 0,41$ ) nicht „rescuen“ kann ( $p= 0,000$ ). Das Ergebnis der alleinigen Flutamidapplikation ( $3,08 \pm 0,45$ ) bestätigt diesen Befund, denn auch hier liegt der p-Wert der Reduktion bei  $< 0,05$ . Die Blockade von ERs zeigt im männlichen hippocampalen Gewebe keine signifikanten Effekte. DMSO, in dem Flutamid gelöst wird, scheint nicht für die Reduktion synaptischer Kontakte verantwortlich zu sein, denn der Wert der Spinesynapsen ( $6,17 \pm 0,44$ ) liegt nahe dem der Kontrollgruppe ( $5,5 \pm 0,46$ ).

### 5.1.5 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen nach Stimulation mit 100 nM Finasterid, DMSO und 10 nM Finasterid, DMSO

In einem letzten Versuch der Elektronenmikroskopie sollten die Ergebnisse aus 5.1.2 und 5.1.3 wiederholt und nochmals verifiziert werden. Hierbei kam es jedoch zu einem unerwarteten Effekt.

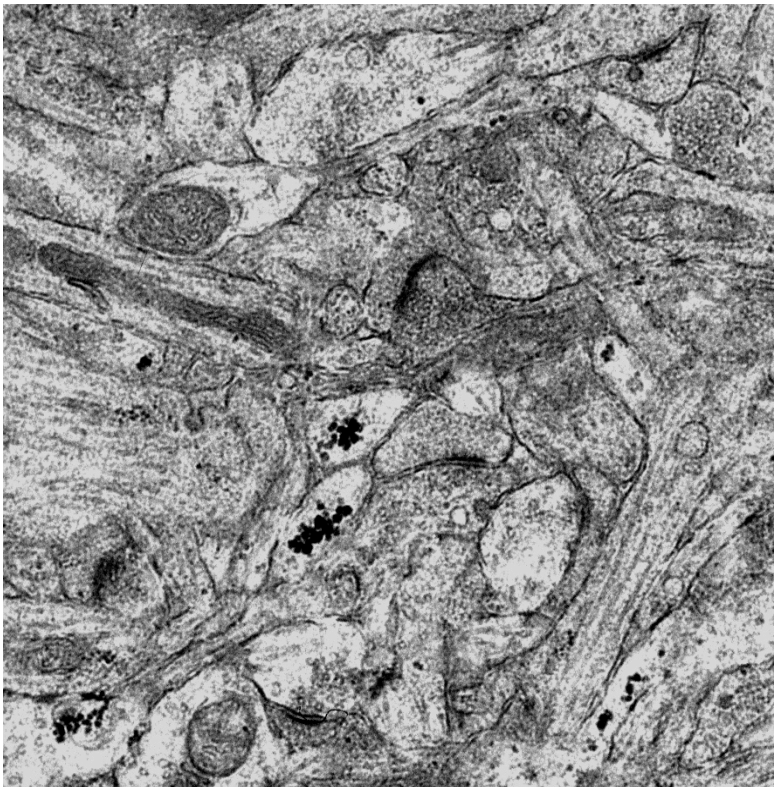


Die Konzentration von 100 nM an Finasterid hatte in der männlichen Kultur den Effekt, dass es zu einem Anstieg der Spinesynapsen ( $6,225 \pm 0,25$ ) im Vergleich zu einer Behandlung mit DMSO ( $4,425 \pm 0,27$ ) kam. Dies steht im Widerspruch zu den Effekten in 5.1.2, wobei hier ein signifikanter Abfall an synaptischen Kontakten zu verzeichnen war. Auch die Behandlung männlicher Sliceulturen mit einer höheren

Finasteridkonzentration von 1000 nM kann die Kontakte zwischen den Neuronen im Vergleich zur Behandlung mit 1000 nM DMSO nicht signifikant senken (Finasterid 10nM:  $4,4 \pm 0,27$ , DMSO 10 nM:  $4,525 \pm 0,27$ ). Erstaunlich ist, dass es in den weiblichen Kulturen nach einer Stimulation mit 100 nM Finasterid im Vergleich mit der gleichen Konzentration DMSO sogar zu einem signifikanten Abfall der synaptischen Kontakte kommt (100 nM Finasterid:  $6,05 \pm 0,3$ , 100 nM DMSO:  $7,15 \pm 0,26$ ).

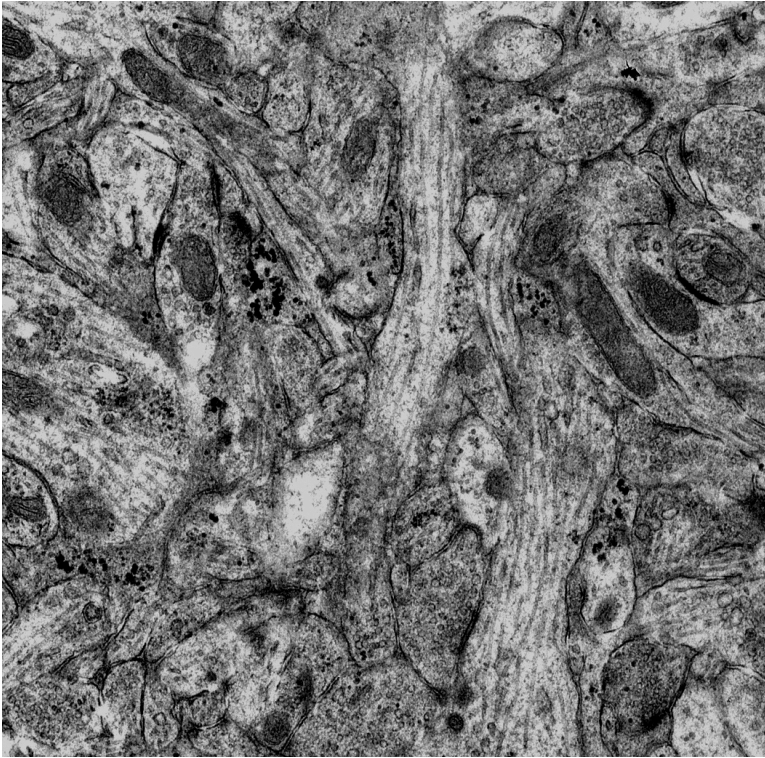
### 5.1.6 Elektronenmikroskopische Beispielfbilder

Folgende Bilder sollen einen Eindruck der Dichte an Spinesynapsen nach den unterschiedlichen Behandlungen der männlichen und weiblichen Sliceulturen mit Hormonen, Enzym- und Rezeptorblockern geben. Dihydrotestosteron, Flutamid und Finasterid kamen in einer Konzentration von 100 nM zum Einsatz.

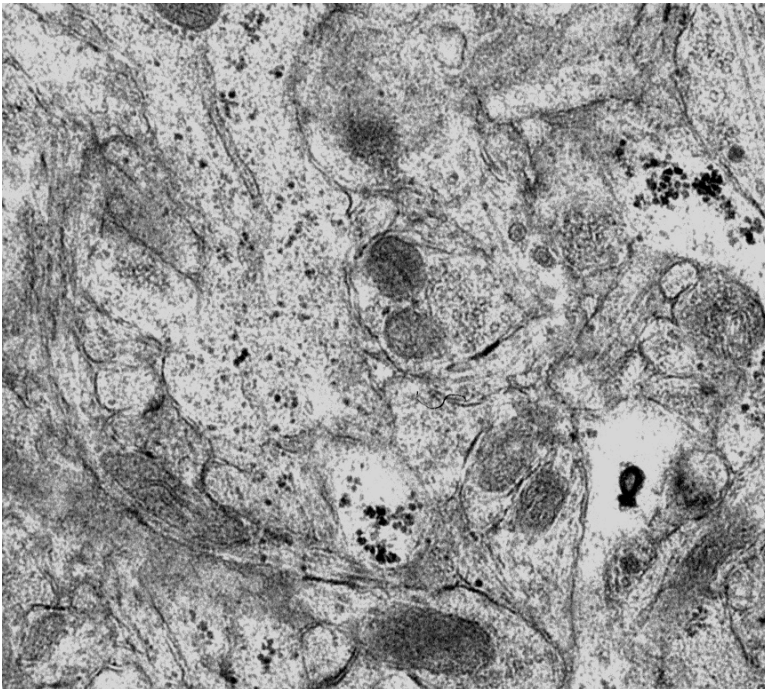


**Abb. 10:** männliche Schnittkultur, Kontrollgruppe, CA1-Region

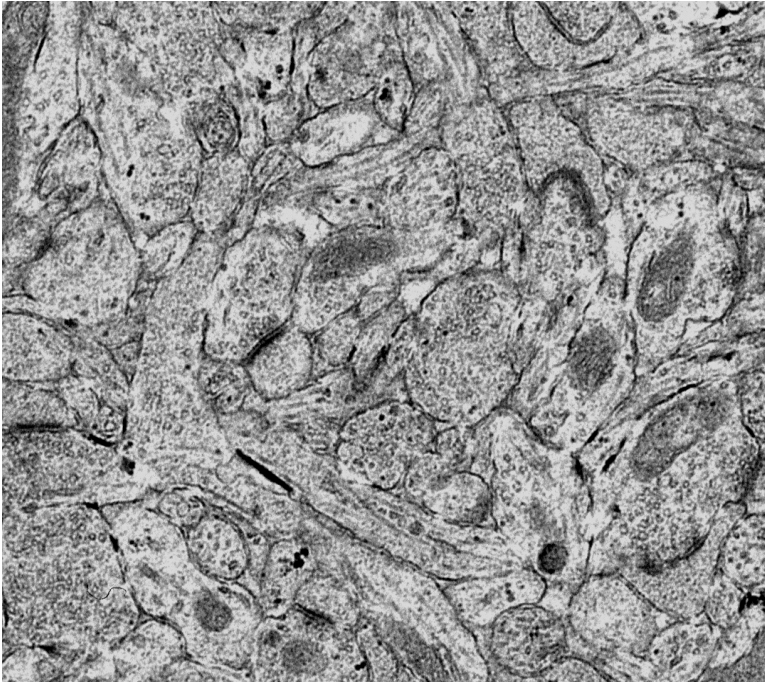




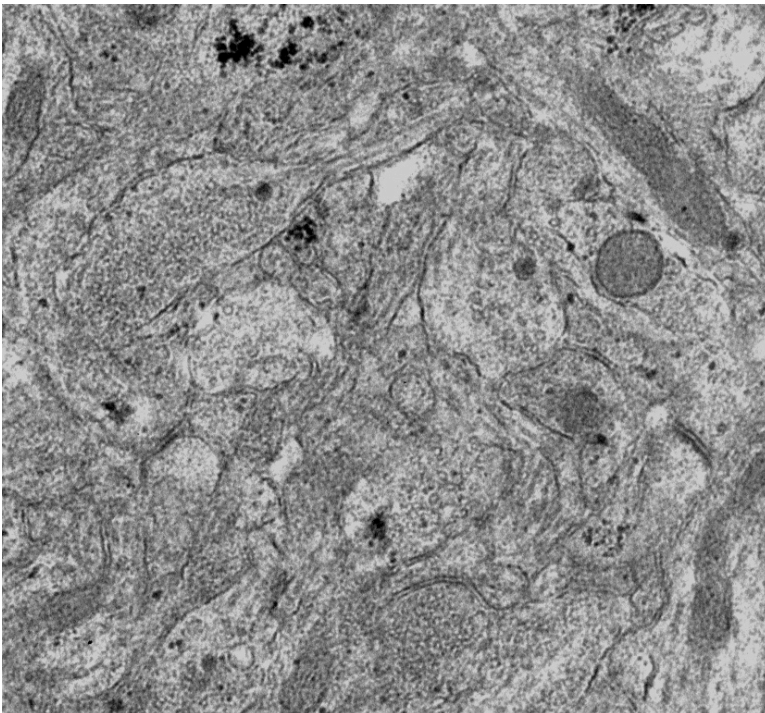
**Abb. 11:** weibliche Schnittkultur, Kontrollgruppe, CA1-Region, höhere Spinedichte als in Abb. 10



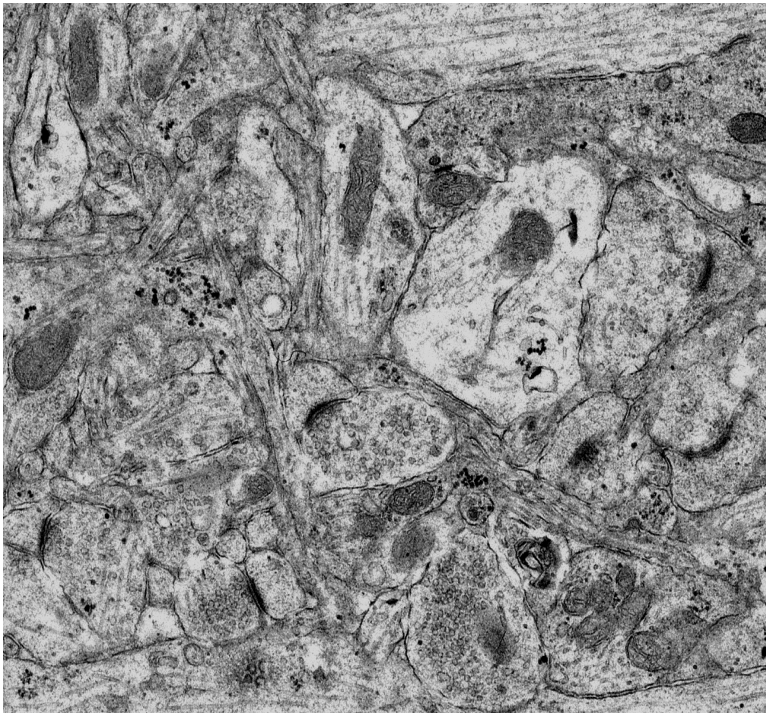
**Abb. 12:** männliche Schnittkultur, Flutamidgruppe, CA1-Region, erkennbar weniger Spinesynapsen



**Abb. 13:** männliche Schnittkultur, simultane Gabe von Flutamid und DHT, Spinesynapsendichte steigt durch DHT-Applikation wieder an

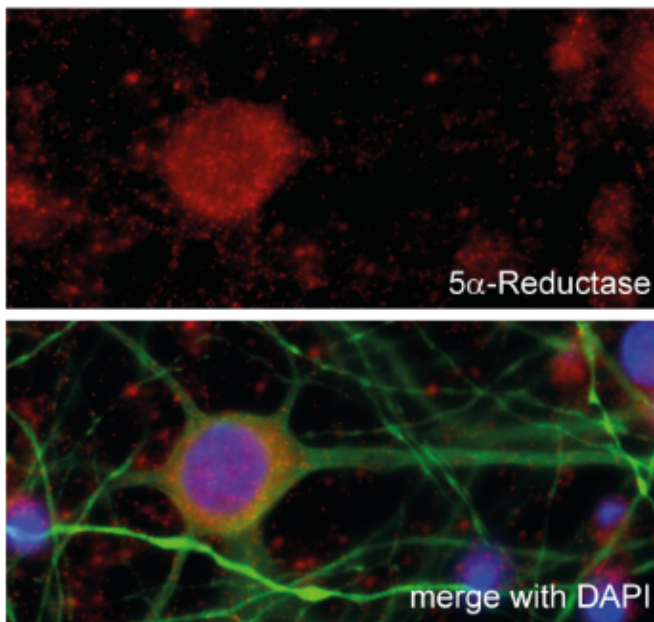


**Abb. 14:** männliche Schnittkultur, Finasteridgruppe, CA1-Region, erkennbar weniger Spinesynapsen

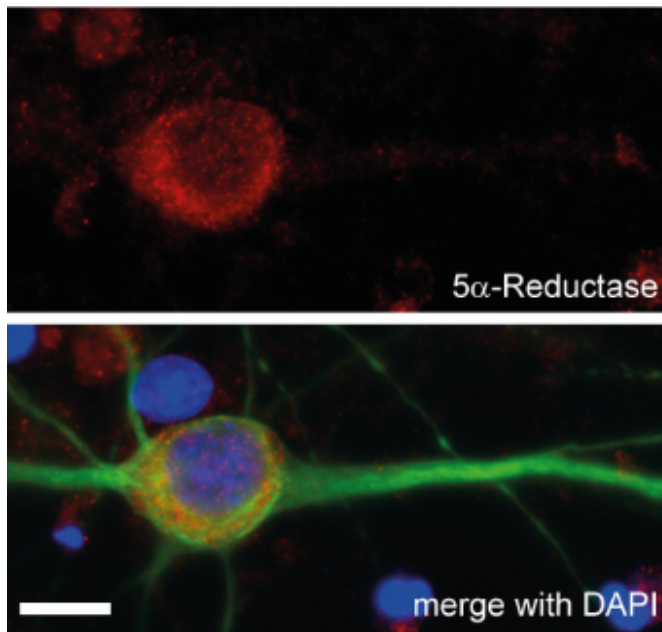


**Abb. 15:** männliche Schnittkultur, simultane Gabe von Finasterid und DHT, Spinesynapsendichte steigt durch DHT-Applikation wieder an

## 5.2 Immunhistochemie



**Abb.16:** immunhistochemische Darstellung der  $5\alpha$ -Reduktase (anti- $5\alpha$ -Reduktase sc-20659, 1:250, rote Fluoreszenz) in männlichen hippocampalen Zellkulturen; zusätzlich noch die Darstellung der Zellkerne mittels DAPI-Kernfärbung (1:100.000, blaue Fluoreszenz); Quelle: Sex specific differentiation of hippocampal neurons determines actions of sex neurosteroids in the hippocampus; Brandt et al.



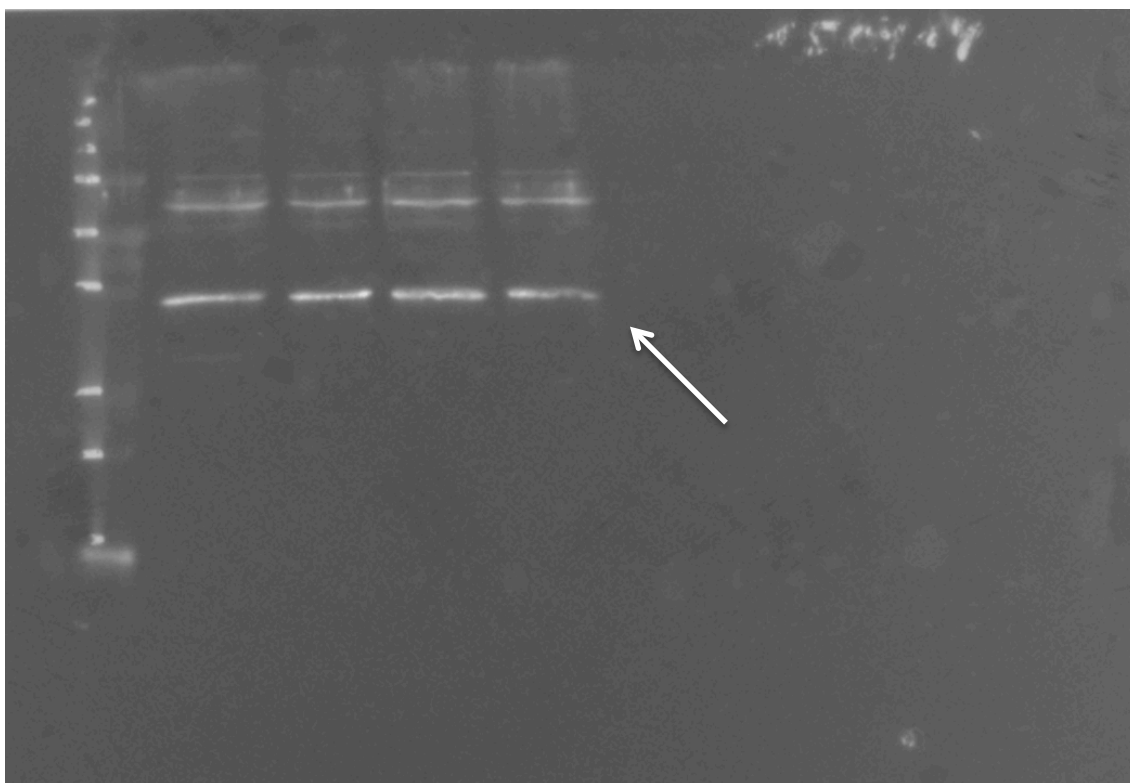
**Abb.17:**  
immunhistochemische Darstellung der  $5\alpha$ -Reduktase (anti- $5\alpha$ -Reduktase sc-20659, 1:250, rote Fluoreszenz) in weiblichen hippocampalen Zellkulturen; zusätzlich noch die Darstellung der Zellkerne mittels DAPI-Kernfärbung (1:100.000, blaue Fluoreszenz); Quelle: Sex specific differentiation of hippocampal neurons determines actions of sex neurosteroids in the hippocampus; Brandt et al.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie mit dem  $5\alpha$ -Reduktase-Antikörper sc-20659 zeigen, dass sowohl in weiblichen (Abb. 17) als auch in männlichen (Abb. 16) hippocampalen Zellkulturen die  $5\alpha$ -Reduktase in erheblichem Maße exprimiert wird (Castelli et al., 2013; Fester et al., 2012). Somit kann das aktive Dihydrotestosteron lokal im Hippocampus synthetisiert werden.

Die quantitative Auswertung der Expression der  $5\alpha$ -Reduktase in den Zellkulturen wurde von anderen Doktoranden des Instituts für Neuroanatomie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf vorgenommen.

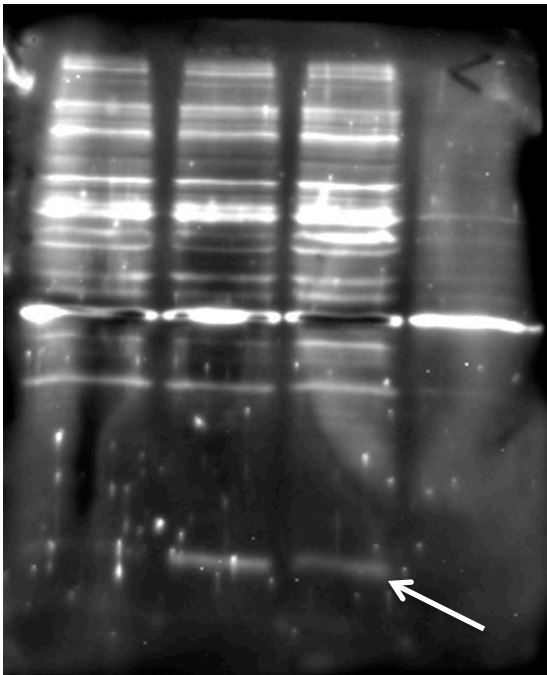
### 5.3 Western Blots

Der erste Western Blot, der unter DHT-Stimulation männlicher und weiblicher Kulturen mit dem Primärantikörper gegen die  $5\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 (H-100) durchgeführt wurde, zeigt im Bereich von 20-30 kD keine eindeutigen Banden. Diese steroidale Enzym hat ein Molekulargewicht von 28 kD, weshalb man dort ein Signal hätte erwarten können. GAPDH, welches zusätzlich zur Orientierung geblottet wird, zeigt in Abb. 18 klare Banden; sowohl in den männlichen und weiblichen Kontrollgruppen als auch in den DHT-stimulierten Kulturen.

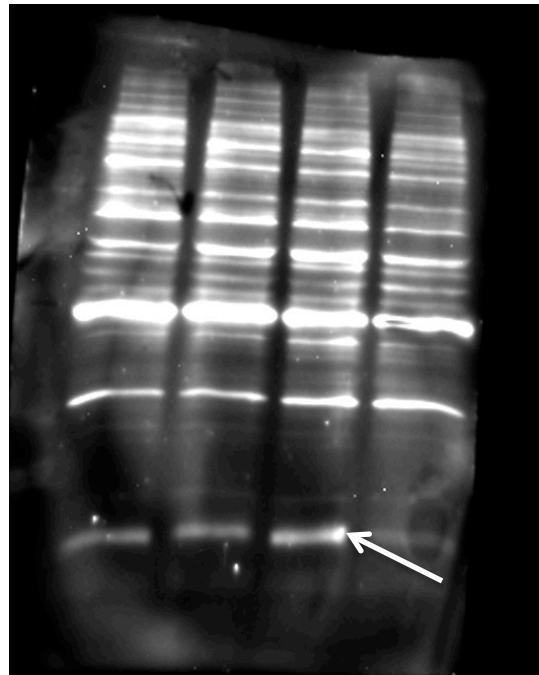


**Abb. 18:** Western-Blot mit dem Primärantikörper gegen die  $5\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 (H-100) von Santa Cruz Biotechnology. Der Pfeil zeigt die Banden von GAPDH. Die  $5\alpha$ -Reduktase ist hier nicht nachweisbar.

Der zweite Western-Blot diente dem Vergleich der zwei Primärantikörper gegen die 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 (H-100 und SRD5A2). Bei diesen Blot blockierte ich die Proteine vor Zugabe der Antikörper nicht mit 5%-iger Milchsäure in PBS-Tween, sondern mit BSA-TBS. Die folgenden Abbildungen zeigen die deutlich erkennbaren Banden im Bereich von 28 kD.



**Abb. 19:** Primärantikörper 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 H-100, sc-20659. Pfeil zeigt die Banden des Enzyms (28 kD). Von links nach rechts: Kontrolle (m.), DHT (m.), Kontrolle (w.), DHT (w.).



**Abb. 20:** Primärantikörper 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 SRD5A2, orb101414. Pfeil zeigt die Banden des Enzyms (28 kD). Von links nach rechts: Kontrolle (m.), DHT (m.), Kontrolle (w.), DHT (w.).

Weitere Versuche mit dem Verfahren des Western Blots wurden von anderen Doktoranden des Instituts für Neuroanatomie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf fortgesetzt und weiterentwickelt.

## 6. Diskussion und Zusammenfassung

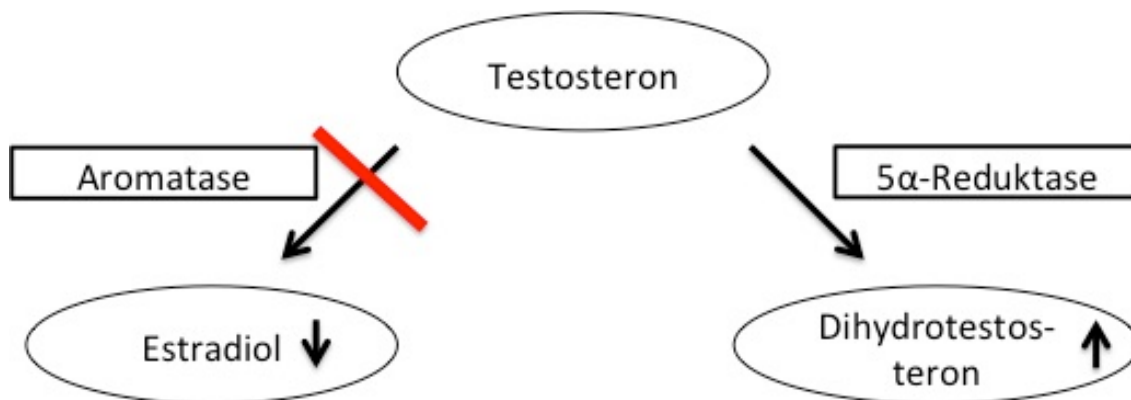
Es ist schon länger bekannt, dass Hormone die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflussen (Gould et al., 1990). Man versteht unter „synaptischer Plastizität“ eine Veränderung in der Stärke neuronaler Verschaltungsmuster durch eine sich ändernde Physiologie der Synapse. In dieser Arbeit wird die synaptische Dichte als Korrelat für synaptische Plastizität angesehen.

In bisherigen Arbeiten über hormonelle Regulation neuronaler Verschaltungsmuster im Hippocampus wurde der Fokus zumeist auf das Steroidhormon Estradiol gelegt. Wird die Synthese dieses Hormons in weiblichen Tieren gehemmt, kommt es zu einem signifikanten Verlust von Spines und Spinesynapsen im hippocampalen Gewebe (Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2006; Fester et al., 2009). Um den Effekt von Letrozol in weiblichen und männlichen Tieren zu überprüfen, betrachtete ich im Elektronenmikroskop die Dichte der Spinesynapsen im Hippocampus. Auch stellte ich mir die Frage, ob sich ein Verlust von neuronalen Kontakten durch Gabe von DHT aufheben lässt, wie es bei Letrozol und Estradiol im weiblichen Tier der Fall ist (Zhou et al., 2007). Da Östrogene im weiblichen Organismus essenziell für Lernvorgänge zu sein scheinen, wollte ich wissen, ob sie auch in männlichen Tieren diesen Effekt erzielen oder ob andere Mechanismen zur Erhaltung neuronaler Netzwerke verantwortlich sind. Als Korrelat zum Estradiol und Letrozol verwendete ich hierfür zur Behandlung der Slicekulturen das „männliche“ Hormon DHT, den Androgenrezeptorblocker Finasterid und den Enzymhemmer der  $5\alpha$ -Reduktase Flutamid. Ist es Estradiol oder DHT, welches männliche Tiere für die Aufrechterhaltung der hippocampalen Spinesynapsen benötigen? Kann Estradiol in männlichen Kulturen den gleichen Effekt erzielen wie in weiblichen? Leranath et al. veröffentlichten 2003 erstmals Ergebnisse, bei denen Testosteron zu einer Zunahme der Dichte an Spines geführt hatte (Leranath et al., 2003). Sie konnten zeigen, dass eine Behandlung ovariectomierter Tiere mit Dihydrotestosteron (nicht aromatisierbares Androgen), als auch mit Testosteron Propionat zu einer deutlichen Zunahme der Dichte an Spines in der hippocampalen CA1-Region führte. Gonadektomie führte beim männlichen, als auch beim weiblichen Geschlecht zu einer signifikanten Abnahme an Spines. Die Gabe von Estrogen konnte diese Reduktion bei weiblichen Tieren wieder aufheben, jedoch nicht in orchietomierten Männchen (Leranath et al., 2003; Leranath et al., 2004). Auf Androgengabe reagierten jedoch beide Geschlechter. Sowohl die Aromatase, als auch die  $5\alpha$ -Reduktase werden in hippocampalen Neuronen exprimiert (Fester et al., 2012; Castelli et al. 2013). Testosteron scheint daher eine zentrale Rolle hinsichtlich synaptischer Formation zuzukommen, die nicht darauf zurückzuführen ist, dass dieses Hormon als Substrat für die Aromatisierung in Estrogen dienen kann.

### 6.1. E2 ist essenziell für die Erhaltung von Spinesynapsen im weiblichen, nicht jedoch im männlichen Hippocampus

Die Behandlung von weiblichen Slicekulturen mit dem Aromatasehemmer Letrozol führt zu einem signifikanten Verlust von Spinesynapsen in der CA1-Region des Hippocampus. Somit konnte ich bisherige Ergebnisse von Fester et al. bestätigen. Damit sind Östrogene für neuronale Netzwerke im weiblichen Organismus essenziell. Eine Inhibition der Aromatase durch Letrozol führt zu einer Reduktion der hippocampalen

E2-Synthese und dies wiederum induziert einen signifikanten Verlust von Spinesynapsen der CA1-Region (Kretz et al., 2004). Die exogene Applikation von DHT zeigte nach Letrozolbehandlung im Weibchen keinen Effekt, wohl aber die simultane Zugabe von E2 zu den Kulturen. Auch Zhou et al. postulierten diesen Sachverhalt (Zhou et al., 2007). Somit scheint Estradiol den hemmenden Effekt des Letrozols aufheben zu können und sorgt für einen Wiederanstieg synaptischer Kontakte. Behandelt man männliche und weibliche Kulturen mit Letrozol, so verursacht dies nur in weiblichen Neuronen einen signifikanten Verlust an Spines (v.a. an Mushroom-Spines). Männliche Neurone hingegen bleiben von dieser Behandlung unbeeinflusst (Vierk et al., 2012). Ich konnte nachweisen, dass Letrozolbehandlung männlicher Slicekulturen keine signifikanten Auswirkungen auf die synaptische Verschaltung im Hippocampus hat. Simultane Gabe von DHT und Letrozol führen im Vergleich zu alleiniger DHT-Behandlung sogar zu noch höherer Zahl an Spinesynapsen. Dies könnte durch einen additiven Effekt erklärbar sein, da Letrozol die Aromatisierung von Testosteron zu Estradiol hemmt und in Folge mehr Substrat zur Synthese aktiven Testosterons, Dihydrotestosteron, zur Verfügung steht (Harden und MacLusky, 2005), siehe im folgenden Modell:



Exogen appliziertes DHT führt in männlichen Tieren zu einem signifikanten Anstieg an Spinesynapsen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dies ist im Weibchen nicht der Fall. Somit scheint aktives Testosteron im Männchen das Korrelat des Estradioleffektes in weiblichen Tieren zu sein. DHT kann beim weiblichen Tier den Verlust an Synapsen durch Letrozolgabe nicht reversieren, wohl aber E2. Dieser auto- und parakrine Wirkmechanismus des Östrogens ist nur im Weibchen zu verzeichnen (Zhou et al., 2010).

Dass Estradiol in männlichen Slicekulturen keine additiven Auswirkungen auf die Synaptogenese zu haben scheint, zeigt der Vergleich von männlicher Kontrollgruppe und mit E2 behandelter hippocampaler Zellen. Estradiol kann nach Flutamidgabe zu männlichen Neuronenzellen die Zahl an Spinesynapsen nicht „retten“ und es bleibt bei signifikant niedrigeren Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies bestätigt noch einmal die essenzielle Rolle des Testosterons für die Bildung synaptischer Kontakte im männlichen Hippocampus.

Bei beiden Geschlechtern regelt GnRH die Synthese der Steroidhormone. Dies funktioniert auf geschlechtsspezifische Art, da GnRH in weiblichen Neuronen die Estradiolsynthese stimuliert. Vermutlich unterliegt auch die DHT-Synthese in



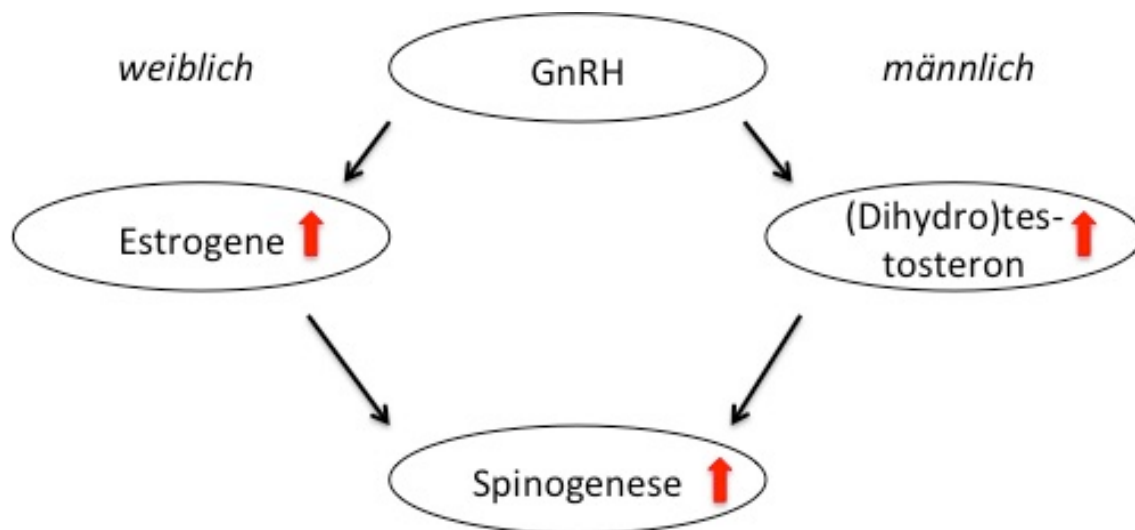
männlichen Neuronen diesem Regulationskreis; begleitet von einer Hochregulation der entsprechenden Steroidrezeptoren.

## **6.2. Nach Hemmung des Schlüsselenzymes der Testosteronproduktion und der Androgenrezeptoren kommt es zum Verlust an Spinesynapsen im männlichen Hippocampus**

Es ist bekannt, dass Letrozol im weiblichen Organismus unerlässlich für synaptische Plastizität ist. Letrozol zeigt die größten Effekte bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M (Kretz et al., 2004) und senkt vor allem sog. Mushroom-Spines („Memory-Spines“) im Weibchen (Prange-Kiel et al., 2013). Finasterid, ein synthetischer, steroidaler Hemmstoff der  $5\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 und 3, nicht vom Typ 1, kann als ein äquivalenter Hemmstoff zum Letrozol gesehen werden. Beide Substanzen hemmen Schlüsselenzyme der Synthese essenzieller Steroidhormone. Durch seine Ähnlichkeit zum natürlichen Testosteron verhindert Finasterid irreversibel die Synthese des aktiven Metaboliten DHT. Da, wie bereits gezeigt, DHT-Applikation zum Medium synaptische Plastizität in männlichen hippocampalen Neuronen fördern kann, war davon auszugehen, dass die Inhibition der  $5\alpha$ -Reduktase einen Synapsenverlust hervorbringen wird. Wie zuvor auch bei Experimenten mit Letrozol, wurde Finasterid in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Ob die Wirkung des Testosterons über den AR vermittelt wird, wurde durch seine Hemmung mittels Flutamid überprüft. Simerly et al. erbrachten 1990 den Nachweis von Androgenrezeptor-mRNA im Subiculum und im Cornu ammonis (CA) des Hippocampus beider Geschlechter. Dass die Expression vor allem an den Neuronen der CA1-Region hoch ist, konnte später gezeigt werden (Kerr et al., 1995, Zhang et al., 2008). Im Gegensatz zu weiblichen verfügen männliche Individuen dabei über eine höhere Zahl an ARs in der CA1-Region (Xiao und Jordan, 2002). Flutamid wurde ebenfalls in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Es gibt Hinweise darauf, dass ein Anstieg von Spinesynapsen in der CA3-Region des Hippocampus nachweislich durch Flutamid gehemmt werden kann (Hatanaka et al., 2009). Babanejad et al. führten Experimente durch, in denen die positiven Effekte von DHT auf die Kognition durch Flutamid-Gabe aufgehoben wurden (Babanejad et al., 2012).

Die Experimente zeigen, dass der Einsatz beider Substanzen die Zahl der synaptischen Kontakte in der CA1-Region des männlichen Hippocampus signifikant senkt. Ob dies in der CA3-Region auch der Fall ist und wie ausgeprägt die Auswirkungen dort sind, müsste in weiteren Versuchen überprüft werden. Ein sogenannter „Rescueeffekt“ kann durch simultane Gabe des aktiven Testosterons DHT zu Flutamid-behandelten Kulturen erzielt werden, da somit die Synaptogenese wieder auf Kontrollniveau angehoben wird. Im weiblichen Organismus wurde der gleiche Effekt bei Behandlung mit Letrozol und Estradiol beobachtet (Zhou et al., 2007). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die  $5\alpha$ -Reduktase nicht nur Testosteron in DHT umwandelt, sondern auch Pregnenolon in Allopregnenolon zu Beginn der Steroidsynthese, wodurch die pharmakologische Hemmung dieses Enzymes weniger spezifisch ist als die der Aromatase. Damit könnte auch erklärt werden, warum nach Zugabe von DHT zu Finasterid-behandelten Kulturen die Zahl an Spinesynapsen wieder leicht ansteigt, denn Finasterid ist ein irreversibler Hemmstoff der  $5\alpha$ -Reduktase. Man weiß, dass weibliche hippocampale Neurone äußerst sensitiv gegenüber Estrogenentzug, weniger aber gegenüber Estrogen-

Applikation sind (von Schassen et al., 2006). Dies lässt stark vermuten, dass Androgene im männlichen Organismus die Schlüsselrolle für Bildung synaptischer Kontakte spielen und dass ein Entzug dieser den äquivalenten Effekt wie die Reduktion der Estrogene im Hippocampus des Weibchens erzielt. Ein Substratüberangebot männlicher Steroidhormone scheint den Hemmstoff Flutamid von AR verdrängen zu können, sodass das Hormon durch Rezeptorbindung und anschließende Wanderung in den Nucleus seine Wirkung entfalten kann. Damit wird wahrscheinlich auch die Expression aller für die Synaptogenese relevanter Enzyme erhöht. Der Signalweg scheint somit über die Androgenrezeptoren vermittelt zu werden. Der männliche Hippocampus ist reich an AR-exprimierenden Zellen. Eine hohe Expression wird v.a. an den CA1-Pyramidenzellen gefunden (Simerly et al., 1990). Auch Ishii et al. zeigten, dass die AR-Immunreaktivität besonders hoch an den Neuronen des CA1-Areals ist, weniger im CA3-Bezirk und im DG (Ishii et al., 2007). Am höchsten ist die Affinität des aktiven Dehydrotestosterons für die Androgenrezeptoren (Zhou et al., 1995; Labrie et al., 2005). Erstaunlicherweise konnte durch die Versuche gezeigt werden, dass Flutamid in weiblichen Slicekulturen ebenfalls zu einer signifikant niedrigeren Anzahl an Spinesynapsen führt. Eigentlich hätte man hier vermutet, dass es eher zu einem Anstieg synaptischer Kontakte kommen müsste, da durch Hemmung von AR mehr Substrat an Testosteron zur Aromatisierung in Östrogene zur Verfügung stehen müsste. Vielleicht ist das Angebot für die Aromatase an Hormonen so hoch, dass es zu einer Art negativen Feedback kommt und die hohen Hormonspiegel eher hemmend auf das Schlüsselenzym der Estradiolsynthese wirken. Auch könnte das Ergebnis auf einem Nebeneffekt des Flutamids beruhen, den Roselli und Resko 1984 zeigen konnten: Das Pharmakon inhibiert die Aromataseaktivität, wodurch der Verlust an Spinesynapsen mit dem nach Letrozolbehandlung übereinstimmen würde (Roselli und Resko, 1984). Finasterid hat wie vermutet im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Effekt im weiblichen hippocampalen Gewebe.



DHT scheint daher für weibliche Tiere nicht essenziell für die Synaptogenese zu sein. Auch andere Studien zeigen, dass Testosteron und DHT, nicht aber E2, das Überleben neuer hippocampaler Neurone in adulten männlichen Ratten verstärken (Spritzer and Galea, 2007). DHT scheint demnach E2-unabhängig die Kognition in männlichen

Ratten zu verbessern (Frye et al., 2004). Kastration männlicher Mäuse reduziert die Anzahl apikaler dendritischer Spines signifikant. DHT-Applikation in diese Mäuse konnte die Defizite im Hippocampus aufheben, da durch die Gabe des aktiven Androgens die synaptische Plastizität deutlich stieg (Frye et al., 2004). Zudem stellte man fest, dass die durch DHT hervorgerufene Verbesserung der Plastizität positiv mit der mRNA- und Protein-Expression von NMDA-Rezeptoren und Synaptophysin (präsynaptisches Markerprotein) korrelierte (Li et al., 2013). Im Vergleich wurde dieser Effekt der Hochregulation von Synaptophysin und auch von Spinophilin im Weibchen durch E2-Applikation ausgelöst (Fester et al., 2009). Auch Babanejad et al. beschreiben in ihrer Studie, dass DHT Auswirkungen auf NMDA-Rezeptoren hat, die im Hippocampus lokalisiert sind. Sie scheinen somit an Lern- und Gedächtnisprozessen in männlichen Tieren beteiligt zu sein (Babanejad et al., 2012). Testosteron hat neuroprotektive Effekte (Spritzer et al., 2011). Leranthe et al. postulierten 2004, dass auch die Applikation von DHT in ovariectomierte Weibchen zu einer Steigerung der Zahl dendritischer Spinesynapsen in der CA1-Region führt (Leranthe et al., 2004). Signifikant höher war der Anstieg durch Behandlung mit Testosteron, welches durch Aromatisierung in Estrogen umgewandelt werden kann. Die Effekte konnten im weiblichen Tier durch Letrozol aufgehoben werden, was beim männlichen Tier jedoch keine Auswirkung hatte. Damit ist gezeigt worden, dass im Weibchen auch Aromatase-unabhängige Mechanismen die Spinedichte mit beeinflussen, dass jedoch vor allem die Umwandlung von Androgen in Estrogen von entscheidender Bedeutung ist. Reduziert man die Estrogensynthese im weiblichen Hippocampus, so zieht dies einen Verlust der Spinesynapsen-Formation mit sich (Kretz et al., 2004; Prange-Kiel et al., 2006; Fester et al., 2009). Beide Geschlechter sind zwar responsiv auf Androgene, jedoch ist die Aufrechterhaltung synaptischer Plastizität im Männchen E2-unabhängig und somit Androgene, v.a. DHT, essenziell (Leranthe et al., 2004). Eine alleinige Behandlung von männlichen Kulturen mit DHT führte zu einer etwas höheren Anzahl an Spinesynapsen, jedoch nicht als signifikant zu werten. Nach der sog. „Calcium-induzierten Calciumfreisetzung“, kurz CICR, aus dem endoplasmatischen Retikulum und Hemmung der Aromatase ist im männlichen hippocampalen Gewebe ein tendenzieller Anstieg an Spinesynapsen zu verzeichnen (Fester et al., 2012). In weiblichen Kulturen waren die synaptischen Kontakte in der Kontrollgruppe am ausgeprägtesten.

Wie bereits beschrieben, ist die Zahl an Spinesynapsen im weiblichen Tier prinzipiell etwas höher als im männlichen hippocampalen Gewebe. Dieser Fakt konnte durch die hier vorliegenden Versuche bestätigt werden. Da die Kulturen frei von Steroiden waren, ist es wahrscheinlich, dass der Unterschied zwischen den Geschlechtern durch die Geschlechtschromosomen oder durch fetale Testosteronsekretion während der kritischen perinatalen Zeit zustande kommt (Arnold und Gorski, 1984; Arnold 2012).

Erstaunlicherweise kam es bei dem Experiment, nochmals die Wirkung des Hemmstoffes der  $5\alpha$ -Reduktase Finasterid in den Konzentrationen 100 nM und 1000 nM zu überprüfen, zu einem konträren Ergebnis. Finasterideffekte im Hinblick auf eine Reduktion der Spinesynapsendichte konnten hierbei nicht gefunden werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit DMSO in äquivalenter Konzentration behandelt wurde, konnte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gesehen werden. Der Effekt von 100 nM Finasterid hatte im männlichen Individuum bezüglich der Synaptogenese sogar positive Auswirkungen, da sich hier die Zahl synaptischer Kontakte signifikant erhöhte. Vielleicht ist die Rolle von Estradiol in gewissen Konzentrationen auch für den männlichen Hippocampus in Anbetracht neuronaler Verschaltung von protektiver

Bedeutung oder es liegt ein Fehler in der Versuchsauswertung vor. Es könnte sein, dass die Proben beider Geschlechter vertauscht wurden, denn in den weiblichen Kulturen konnte der erwartete und zuvor beschriebene, negative Effekt von 100 nM Finasterid gefunden werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe verringerte sich in der weiblichen CA1-Region die Zahl von Spinesynapsen nach Finasteridgabe signifikant. Möglicherweise kann dieses Ergebnis auch auf Fehler in der Kultivierung der Neurone, unphysiologische Konzentrationen oder Probleme in der Elektronenmikroskopie zurückzuführen sein. Zu berücksichtigen ist auch, dass es sich bei allen Experimenten um Versuche handelt, bei denen der Hippocampus nach der Präparation aus dem Temporallappen isoliert vorliegt und von hormonellen Regelkreisen, wie zum Beispiel der Hypothalamus-Hypophysen-Achse abgekoppelt ist. Wo genau der Fehler liegt oder ob vielleicht doch aktives Testosteron für den Hippocampus weiblicher Tiere in gewissem Maße bedeutsam ist, lässt sich im Nachhinein schwer verifizieren und müsste durch weitere Versuche überprüft werden. Dass es immer wieder zu widersprüchlichen Ergebnissen kommt, zeigen auch die Untersuchungen anderer Wissenschaftler. Ivanova und Beyer postulierten zum Beispiel, dass sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  mRNA im männlichen Hippocampus am Ende der ersten postnatalen Woche erhöhte Expressionen aufweisen (Ivanova und Beyer, 2000). Daher kann man annehmen, dass Estrogene bezüglich synaptischer Formation nicht unwichtig sind. Interessant sind auch die Ergebnisse von Peterson et al.: Demnach ist der Anteil von Präsynapsen, die das Enzym Aromatase enthalten, im männlichen Tier deutlich höher als im weiblichen (Peterson et al., 2005). Welchen genauen Effekt die Aromatase hier hat, bleibt offen. Bowers et al. behaupteten 2010, dass sowohl die Aktivität der Aromatase als auch die Estradiolmenge sexuell keine Unterschiede zeigen (Bowers et al., 2010).

Dies lässt wieder die Rolle des Testosterons, besonders die des aktiven Testosterons DHT, in den Mittelpunkt rücken und würde meine These unterstützen, dass DHT essenziell wichtig für die Ausbildung und Erhaltung synaptischer Plastizität im männlichen Individuum ist.

### 6.3. Zusammenfassung mit kritischer Beurteilung der Experimente

Bei den *in vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Testosteron und vor allem sein aktiver Metabolit Dihydrotestosteron von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung synaptischer Verschaltung im männlichen hippocampalen Gewebe sind.

Kritisch zu beurteilen ist der Fakt, dass ich mich bei meinen Forschungen auf die CA1-Region des Hippocampus fokussiert habe, da man dort zuvor in Studien die stärksten Testosteron-Effekte postuliert hatte. Ishii et al. kamen 2007 zu dem Ergebnis, dass die AR-Immunreaktivität besonders hoch an den Neuronen des CA1-Areals ist, weniger im CA3-Bezirk und im DG (Ishii et al., 2007). Im Gegensatz dazu scheint die Konzentration von Estrogenen in der CA3-Region am höchsten zu sein. E2 reguliert die Expression des ER $\alpha$  in hippocampalen Neuronen hoch. ER $\alpha$ -Aromatase und StAR-Expression ist in CA3-Pyramdienzellen höher als in CA1-Neuronen, wodurch sich auch die regionalen Konzentrationsunterschiede an E2 erklären lassen würden (Rune et al., 2002; Prange-Kiel, 2003).

Zudem setzte ich bei meinen Versuchen definierte Konzentrationen an Hormonen und Enzymhemmern ein. Ob dies den physiologischen Gegebenheiten und Hormonspiegeln

entspricht, ist schwierig zu bewerten. Hormonspiegel unterliegen einer Vielzahl von Einflüssen, wie z.B. zirkadianer Rhythmik, Angstverhalten und Stress. Diese Faktoren könnten meine Experimente ebenfalls beeinflusst haben. Letztendlich können gewisse Tendenzen nur postuliert und mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit als relevant bewertet werden.

Die Vielzahl meiner Untersuchungen, die genaue statistische Auswertung und die signifikanten Ergebnisse führen mich zu dem Schluss, dass der positive Einfluss von Testosteron auf synaptische Plastizität im männlichen Hippocampus mit großer Wahrscheinlichkeit gegeben ist. Da der Hippocampus zur Gedächtniskonsolidierung dient (Milner, 1966; Zola-Morgan et al., 1986) und als Teil des limbischen Systems an der Verarbeitung emotionaler Gedächtnisinhalte und Beeinflussung des Affektes und Treibverhaltens maßgeblich beteiligt ist, kann Testosteron im männlichen Hippocampus als protektives Hormon angesehen werden. Resultierend kann vermutet werden, dass unzureichende Hormonspiegel zu gestörter Affektivität und unzureichendem Gedächtnistransfer führen können.

### Summary

Testosterone and especially the active metabolite Dihydrotestosterone are highly much needed for the maintenance of the synaptic plasticity in the male hippocampal tissue. Synaptic formation in the male hippocampus is independent of estradiol, compared to female synaptic contacts which require certain estradiol-levels for the maintenance of synaptic plasticity. Therefore active testosterone in the male animal seems to be the correlate of the effects of estradiol in the female animals.

The experiments have to be seen critical. They focused the CA1-region of the hippocampus, because in previous studies it was described that the highest testosterone-effects are placed in this area. Ishii et al. postulated 2007 that the reactivation of the androgenreceptor is very high at the neurons of the CA1-region, much less in the CA3-region and the Gyrus Dentatus (Ishii et al., 2007). Contrary to this fact, concentrations of estrogens are higher in the CA3-area of the hippocampal tissue (Rune et al., 2002; Prange-Kiel, 2003).

The plurality of the analyses in this dissertation, the exact statistical evaluation and the significant findings let arrive at the conclusion that testosterone has a positive influence on the synaptic plasticity of the male hippocampus. Given that the hippocampus serves for the consolidation of the memory and that it is part of the limbic system, testosterone could be seen as a protective hormone for these functions. Deficient hormone levels could induce a malfunctioning affectivity and memory-transfers.

## 7. Literaturverzeichnis

### 7.1 Literaturquellen

- ALTMAN, J., DAS, G.D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.*, 124:319-35.
- ALVAREZ-BUYLLA, A., LIM, D.A. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.*, 41(5):683-6.
- ARNOLD, A.P., GORSKI, R.A. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 7, 413-442.
- BABANEJAD, S., NAGHDI, N., HAERI ROHANI, S.A. 2012. Microinjection of Dihydrotestosterone as a 5 $\alpha$ -Reduced Metabolite of Testosterone into CA1 Region of Hippocampus Could Improve Spatial Learning in the Adult Male Rats. *Iran J Pharm Res.*, 11(2):661-9.
- BOURNE, J., HARRIS, K.M. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol.*, 17:381-386.
- BOWERS, J.M., WADDELL, J. & MCCARTHY, M.M. 2010. A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biology of sex differences*, 1,8.
- BRAKE, W.G., ALVES, S.E., DUNLOP, J.C., LEE, S.J., BULLOCH, K., ALLEN, P.B., GREENGARD, P., MCEWEN, B.S. 2001. Novel target sites for estrogen action in dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology*, 142:1284-1289.
- BROWN, T.J., HOCHBERG, R.B., ZIELINSKI, J.E., MACLUSKY, N.J. 1988. Regional sex differences in cell nuclear estrogen-binding capacity in the rat hypothalamus and preoptic area. *Endocrinology*, 123(4):1761-70.
- CAMERON, H.A., MCKAY, R. 1998. Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.*, 8(5):677-80. Review.
- CANDEMIR, M., SEMIZ, S., YONGUC, G.N., OZDEMIR, M.B., ABBAN-METE, G., ADIGUZEL, E. 2013. Effect of testosterone propionate on hippocampal pyramidal neuron number in female rats. *Singapore Med J.*, 54(6):315-20.
- CASTELLI, M.O., et al. 2013. Regional distribution of 5 $\alpha$ -reductase type 2 in the adult rat brain: an immunohistochemical analysis. *Psychoneuroendocrinology* 38, 281-293.
- DAUVOIS, S., WHITE, R., PARKER, M.G. 1993. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.*, 106(Pt 4):1377-88.
- DO REGO, J.L., SEONG, J.Y., BUREL, D., LEPRINCE, J., LUU-THE, V., TSUTSUI, K., TONON, M.C. PELLETIER, G., VAUDRY, H. 2009. Neurosteroid

- biosynthesis: enzymate pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol.*, 30:259-301.
- EDINGER, K.L., FRYE, C.A. 2006. Intrahippocampal administration of an androgen receptor antagonist, flutamide, can increase anxiety-like behavior in intact and DHT-replaced male rats. *Horm Behav.*, 50(2):216-22.
  - EMPTAGE, N., BLISS, T.V., FINE, A. 1999. Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines, *Neuron*, 22:115-124.
  - FESTER, L., PRANGE-KIEL, J., RUNE, G.M. 2007. Hippocampale Estrogensynthese und synaptische Plastizität. *Neuroforum* 4/07.
  - FESTER, L., PRANGE-KIEL, J., ZHOU, L., BLITTERSDORF, B.V., BOHM, J., JARRY, H., SCHUMACHER, M., RUNE, G.M. 2012. Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 131:24-9.
  - FESTER, L., RIBEIRO-GOUVEIA, V., PRANGE-KIEL, J., VON SCHASSEN, C., BÖTTNER, M., JARRY, H., RUNE, G.M. 2006. Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem.*, 97:1136-1144.
  - FESTER, L., ZHOU, L., BUTOW, A., HUBER, C., VON LOSSOW, R., PRANGE-KIEL, J., JARRY, H., RUNE, G.M. 2009. Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus*, 19:692-705.
  - FESTER, L., ZHOU, L., VOETS, C., OSSIG, C., DISTELDORF, E., PETERS, C., BLAUTE, F., PRANGE-KIEL, J., DUDZINSKI, D., JARRY, H., RUNE, G.M. 2009. The opposing role of estradiol on synaptic protein expression in hippocampal cultures. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1, S.123-9.
  - FILOVÁ, B., OSTATNÍKOVÁ, D., CELEC, P., HODOSY, J. 2013. The effect of testosterone on the formation of brain structures. *Cell Tissues Organs*. 197(3):169-77.
  - FRYE, C.A., EDINGER, K.L., SELIGA A.M., WAWRZYCKI, J.M. 2004. 5alpha-reduced androgens may have actions in the hippocampus to enhance cognitive performance of male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 29(8):1019-27.
  - FUNAKOSHI, T., YANAI, A., SHINODA, K., KAWANO, M.M., MIZUKAMI, Y. 2006. G-protein-coupled receptor 30 is an estrogen-receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.*, 346:904-10.
  - GAGE, F.H. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci.*, 22(3):612-3.
  - GARCIA-SEGUERA, L.M., WOZNIAK, A., AZCOITIA, I., RODRIGUEZ, J.R., HUTCHISON, R.E., HUTCHISON, J.B. 1999. Aromatase expression by

- astrocytes after brain injury: Implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89,567-578.
- GOULD, E., WOOLLEY, C.S., FRANKFURT, M., MCEWEN, B.S. 1990. Gonadal steroid regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*, 10:1286-91.
  - GRAY, E.G. 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex – an electron microscope study. *Journal of Anatomy*, 93,420-433.
  - HAMSON, D.K., WAINWRIGHT, S.R., TAYLOR, J.R. 2013. Androgens Increase Survival of Adult-Born Neurons in the Dentate Gyrus by an Androgen Receptor- Dependent Mechanism in Male Rats. *Neuroendocrinology*, 154(9):3294-3304.
  - HAO, J.D., JANSSEN, W.G.M., TANG, Y., ROBERTS, J.A., MCKAY, H., LASLEY, B., ALLEN, P.B., GREENGARD, P., RAPP, P.R., KORDOWER, J.H., HOF, P.R., MORRISON, J.H. 2003. Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, 465,540-550.
  - HARDEN, C., MACLUSKY, N.J. 2005. Aromatase inhibitors as add-on treatment form men with epilepsy. *Expert Rev Neurother* 5, 123-127.
  - HARRIS, K.M., KATER, S.B. 1994. DENDRITIC SPINES – CELLULAR SPECIALIZATIONS IMPARTING BOTH STABILITY AND FLEXIBILITY TO SYNAPTIC FUNCTION. *Annual Review of Neuroscience*, 17,341-371.
  - HATANAKA, Y., MUKAI, H., MITSUHASHI, K., HOJO, Y, MURAKAMI, G., KOMATSUZAKI, Y., SATO, R., KAWATO, S. 2009. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*. 381(4):728-32.
  - HOJO, Y., HATTORI, T., ENAMI, T., FURUKAWA, A., SUZUKI, K., ISHII, H.T., MUKAI, H., MORRISON, J.H., JANSSEN, W.G.M., KOMINAMI, S., OTHERS. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:865-70.
  - ISHII, H., TSURUGIZAWA, T., OGIUE-IKEDA, M., ASASHIMA, M., MUKAI, H., MURAKAMI, G., HOJO, Y., KIMOTO, T. KAWATO, S. 2007. Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscientist*, 13(4):323-34.
  - IVANOVA, T. & BEYER, C. 2000. Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell and Tissue Reserach*, 300, 231-237.



- KAHLE, W., FROTSCHER, M. 2001. Taschenatlas der Anatomie. Band 3 Nervensystem und Sinnesorgane. 7. Auflage Thieme, Stuttgart New York.
- KASAI, H., FUKUDA, M., WATANABE, S., HAYASHI-TAKAGI, A., NOGUCHI, J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.*, 33:121-129.
- KEMPERMANN, G., JESSBERGER, S., STEINER, B., KRONENBERG, G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.*, 27(8): 447-52. Review.
- KEMPERMANN, G., KUHN, H.G., GAGE, F.H. 1997. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(19):10409-14.
- KEMPERMANN, G., WISKOTT, L., GAGE, F.H. 2004. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.*, 14(2):186-91. Review.
- KERR, J.E., ALCORE, R.J., BECK, S.G. & HANDA, R.J. 1995. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) an AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology*, 136, 3213-3221.
- KLÜVER, H., BUCY, P. 1939. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch neurol Psych.*, 42:979.
- KRETZ, O., FESTER, L., WEHRENBERG, U., ZHOU, L., BRAUCKMANN, S., ZHAO, S., PRANGE-KIEL, J., NAUMANN, T., JARRY, H., FROTSCHER, M., RONE, G.M. 2004. Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *J. Neuroscience*, 24(26): 5913-5921.
- KRIEGER, N.R., SCOTT, R.G., JURMAN, M.E. 1983. Testosterone 5 alpha-reductase in rat brain. *J Neurochem.*, 40(5):1460-4.
- LABRIE, F. 2005. Tetrahydrogestrinone induces a genomic signature typical of a potent anabolic steroid. *J Endocrinol* 184, 427-433.
- LEHMAN, M.N., ROBINSON, J.E., KARSCH, F.J., SILVERMAN, A.J. 1986. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol.*, 244:19-35.
- LEPHART, E.D. 1993. Brain 5alpha-reductase: cellular, enzymatic, and molecular perspectives an implications for biological function. *Mol Cell Neurosci.*, 4(6):473-84.
- LERANTH, C., HAJSZAN, T., MACLUSKY, N.J. 2004. Androgens Increase Spine Synapse Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Ovariectomized Female Rats. *The Journal of Neuroscience*. 24(2):495-499.

- LERANTH, C., PETNEHAZY, O., MACLUSKY, N.J. 2003. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *The Journal of Neuroscience*, 23(5):1588-1592.
- LERANTH, C., SHANABROUGH, M. 2001. Supramammillary area mediates subcortical estrogenic action on hippocampal synaptic plasticity. *Exp Neurol*, 167:445-450.
- LERANTH, C., SHANABROUGH, M., HORVATH, T.L. 2000. Hormonal regulation of hippocampal spine synapse density involves subcortical mediation. *Neuroscience*, 101:349-356.
- LEWIS, C., MCEWEN, B.S., FRANKFURT, M. 1995. Estrogen-induction of dendritic spines in ventromedial hypothalamus and hippocampus: effects of neonatal aromatase blockade and adult GDX. *Brain Res Dev Brain Res*, 87(1):91-5.
- LI, C.J., BRAKE, W.G., ROMEO, R.D., DUNLOP, J.C., GORDON, M., BUZESCU, R., MAGARINOS, A.M., ALLEN, P.B., GREENGARD, P., LUINE, V., MCEWEN, B.S. 2004. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2185-2190.
- LI, S., KANG, L., ZHANG, C., XIE, G., LI, N., ZHANG, Y., DU, J., CUI, H. 2013. Effects of dihydrotestosterone on synaptic plasticity of hippocampus in male SAMP8 mice. *Exp Gerontol*, 48(8)778-85.
- MACLEAN, P.D. 1955. The limbic system („visceral brain“) and emotional behavior. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 73: 130-134.
- MACLUSKY, N.J., HAJSZAN, T., JOHANSEN, J.A., JORDAN, C.L., LERANTH, C. 2006. Androgen effects on hippocampal CA1 spine synapse numbers are retained in Tfm male rats with defective androgen receptors. *Endocrinology*, 147(5):2392-8.
- MACLUSKY, N.J., HAJSZAN, T., PRANGE-KIEL, J., LERANTH, C. 2006. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience*, 138(3):957-65.
- MARTIN, P.D., SHAPIRO, M.L. 2000. Disparate effects of long-term potentiation on evoked potentials and single CA1 neurons in the hippocampus of anesthetized rats. *Hippocampus*, 10:207-212.
- MATSUZAKI, S., CANIS, M., VAURS-BARRIÈRE, C., POULY, J.L., BOESPFLUG-TANGUY, O., PENAULT-LLORCA, F., DECHELOTTE, P., DASTUGUE, B., OKAMURA, K., MAGE, G. 2004. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. *Mol Hum Reprod*, 10:719-728.

- MCEWEN, B. 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Progress in Hormone Research, Vol 57*. Bethesda: Endocrine Soc.
- MCEWEN , B.S. 2001. Genome and hormones: Gender differences in physiology – Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology*, 91, 2785-2801.
- MCEWEN, B.S., LIEBERBURG, I., CHAPTAL, C., KREY, L.C. 1977. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Horm Behav.*, 9(3):249-63.
- MCEWEN, B.S., WOOLLEY, C.S. 1994. Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Exp Gerontol.*, 29(3-4):431-6.
- MEYER, A., BECK, E. 1955. The hippocampal formation in temporal lobe epilepsy. *Proc R Soc Med.*, 48(6):457-62.
- MILNER, WHITTY, C.W.M., ZANGWILL, O.L. 1966. Amnesia following operation in the temporal lobes. *Amnesia, p. 109-133, Butterworths, London*.
- MUKAI, H., KIMOTO, T., HOJO, Y., KAWATO, S., MURAKAMI, G., HIGO, S., HATANAKA, Y., OGIUE-IKEDA, M. 2010. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochem Biophys Acta.*, 1800(10):1030-44.
- MULLER, D. 2000. Spine changes associated with long term potentiation. *Hippocampus*, 10:596-674.
- MURPHY, D.D, SEGAL, M. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci.*, 16:4059-4068.
- NAFTOLIN, F., RYAN, K.J., DAVIES, I.J., PETRO, Z., KUHN, M. 1975. The formation and metabolism of estrogens in brain tissues. *Adv Biosci.*, 15:105-21.
- NAFTOLIN, F., RYAN, K.J., PETRO, Z. 1971. Aromatization of androstendione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab.*, 33:368-370.
- NEGRI-CESI, P., POLETTI, A., CELOTTI, F. 1996. Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5alpha-reductase and aromatase in brain differentiation and functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 58(5-6):455-66.
- NGUYEN, T.V., YAO, M., PIKE, C.J. 2009. Dihydrotestosterone activates CREB signaling in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.*, 1298:1-12.
- NIMCHINSKY, E.A., SABATINI, B.L. AND SVOBODA, K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, 64:313-353.

- OKAMOTO, M., HOJO, Y., INOUE, K. 2012. Mild exercise increases DHT in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(32):13100-5.
- PAPEZ, J.W. 1995. A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7: 103-112.
- PATCHEV, V.K., ALMEIDA, O.F. 1996. Gonadal steroids exert facilitating and „buffering“ effects on glucocorticoid-mediated transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor genes in rat brain. *J Neurosci.*, 16(21):7077-84.
- PELLETIER, G. 2010. Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. *Prog Brain Res.*, 181:193-207.
- PÉREZ, A.E., ORTÍZ, A., CABEZA, M., BEYER, C., PÉREZ-PALACIOS, G. 1975. In vitro metabolism of 3-H-androstenedione by the male rat pituitary, hypothalamus, and hippocampus. *Steroids*. 25(1):53-62.
- PETERS, A. AND KAISERMANN-ABRAMOF. 1970. The Small Pyramidal Neuron of the Rat Cerebral Cortex. The Perikaryon, Dendrites and Spines. *American Journal of Anatomy*, 127,321.
- PETERSON, R.S., YARRAM, L., SCHLINGER, B.A. & SALDANHA, C.J. 2005. Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272, 2089-2096.
- POLETTI, A., COSCARELLA, A., NEGRI-CESI, P., COLCIAGO, A., CELOTTI, F., MARTINI, L. 1998. 5 alpha-reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids*. 63(5-6):246-51.
- PRANGE-KIEL, J., FESTER, L., ZHOU, L., LAUKE, H., CARRETERO, J., RUNE, G.M. 2006. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 16, 464-471.
- PRANGE-KIEL, J., FESTER, L., ZHOU, L., JARRY, H., RUNE, G.M. 2009. Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *Journal of Neural Transmission*, 116, 1417-1425.
- PRANGE-KIEL, J., JARRY, H., SCHOEN, M., KOHLMANN, P., LOHSE, C., ZHOU, L., RUNE, G.M. 2008. Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Cell Biology*, 180, 417-426.
- PRANGE-KIEL, J., SCHMUTTERER, T., FESTER, L., ZHOU, L., IMHOLZ, P., BRANDT, N., VIERK, R., JARRY, H., RUNE, G.M. 2013. Endocrine regulation of estrogen synthesis in the hippocampus? *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 48(2013)49-64.

- PRANGE-KIEL, J., WEHRENBURG, U., JARRY, H., RUNE, G.M. 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13,226-234.
- RAINBOW, T.C., PARSONS, B., MCEWEN, B.S. 1982. Sex differences in rat brain oestrogen and progestin receptors. *Nature*, 300(5893):648-9.
- ROSELLI, C.E. 1991. Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected region of the rat brain. *Endocrinology*, 128(3):1310-6.
- ROSELLI, C.E., RESKO, J.A. 1984. Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism. *Endocrinology* 114, 2183-2189.
- RUNE, G.M., LOHSE, J., PRANGE-KIEL, J., FESTER, L., FROTSCHER, M. 2006. Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res.*, 31:145-155.
- RUNE, G.M., VON SCHASSEN, C., FESTER, L., PRANGE-KIEL, J. 2006. Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth. *Journal of Neuroendocrinology*, 18:847-856.
- RUNE, G.M., WEHRENBURG, U., PRANGE-KIEL, J., ZHOU, L., ADELMANN, G., FROTSCHER, M. 2002. Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*, 113:167-75.
- RUSSELL, D.W. WILSON, J.D. 1994. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem.*, 63:25-61. Review.
- SÁNCHEZ, P., TORRES, J.M., CASTRO, B., DEL MORAL, R.G., DE DIOS LUNA, J., ORTEGA, E. 2013. Steroid 5 $\alpha$ -reductase in adult rat brain after neonatal dihydrotestosterone administration. *Neurochem Res.*, 38(3):557-63.
- SEGAL, M., MURPHY, D. 2001. Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: Functional correlates. Joint Meeting of the 6th International Conference on Hormones, Brain, and Behavior/Society-for-Behavioral-Neuroendocrinology, Aug 05-09 2001 Madrid, Spain. Academic Press Inc, 156-159.
- 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.A., KAWATO, S. 2003. Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochem Biophys Acta*, 1619:301-316.

- SHORS, T.J., MIESEGAES, G. 2002. Testosterone in utero and at birth dictates how stressful experience will affect learning in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(21):13955-60.
- SIMERLY, R.B., CHANG, C., MURAMATSU, M., SWANSON, L.W. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol*, 294:76-95.
- SKINNER, D.C., CARATY, A. 2002. Measurement and possible function of GnRH in cerebrospinal fluid in ewes. *Reprod Suppl*, 59: 25-39.
- SORRA, K.E., HARRIS, K.M. 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10:501-511.
- SPENCER, J.L., WATERS, E.M., ROMEO R.D., WOOD G.E., MILNER T.A., MCEWEN B.S. 2008. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol*, 29(2):219-37.
- SPRITZER, M.D., GALEA, L.A. 2007. Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. *Dev Neurobiol*, 67(10):1321-33.
- SPRITZER, M.D., IBLER, E., INGLIS, W., CURTIS, M.G. 2011. Testosterone and social isolation influence adult neurogenesis in the dentate gyrus of male rats. *Neuroscience*, 195:180-90.
- SQUIRE, L.R. 1986. Mechanisms of memory. *Science*, 232(4758):1612-9.
- SUGAWARA, T., HOLT, J.A., KIRIAKIDOU, M., STRAUSS, J.F. 3RD. 1996. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochem*, 35:9052-9.
- TADA, T., SHENG, M. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin neurobiol*, 16:95-101.
- TORRES, J.M., ORTEGA, E. 2003. Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J*, 17(11):1428-33.
- TORRES, J.M., ORTEGA, E. 2006. Steroid 5alpha-reductase isozymes in the adult female rat brain: central role of dihydrotestosterone. *J Mol Endocrinol*, 36(2):239-45.
- VIERK, R., GLASSMEIER, G., ZHOU, L., BRANDT, N., FESTER, L., DUDZINSKI, D., WILKARS, W., BENDER, R.A., LEWERENZ, M., GLOGER, S. OTHERS. 2012. Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci*, 32:8116-26.

- VON SCHASSEN, C., FESTER, L., PRANGE-KIEL, J., LOHSE, C., HUBER, C., BÖTTNER, M., RUNE, G.M. 2006. Oestrogen Synthesis in the Hippocampus: Role in Axon Outgrowth. *Journal of Neuroendocrinology*. 18. 847-856.
- WEHRENBURG, U., PRANGE-KIEL, J., RUNE, G.M. 2001. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem*, 76:1879-86.
- WOOLLEY, C.S., MCEWEN, B.S. 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*. 12:2549-2554.
- WOOLLEY, C.S., GOULD, E., FRANKFURT, M., MCEWEN, B.S. 1990. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*. 10:4035-4039.
- XIAO, L., JORDAN, C.L. 2002. Sex differences, laterality, and hormonal regulation of androgen receptor immunoreactivity in rat hippocampus. *Horm Behav.*, 42(3):327-36.
- YUSTE, R. AND BONHOEFFER, T. 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 24:1071-1089.
- YUSTE, R. AND BONHOEFFER, T. 2004. Genesis of dendritic spines. Insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*. 5:24-34.
- ZHANG, J.-M., KONKLE, A.T.M., ZUP, S.L. & MCCARTHY, M.M. 2008. Impact of sex and hormones on new cells in the developing rat hippocampus: a novel source of sex dimorphism? *European Journal of Neuroscience*, 27, 791-800.
- ZHOU, L., FESTER, L., VON BLITTERSDORFF, B., HASSU, B., NOGENS, H., PRANGE-KIEL, J., JARRY, H., WEGSCHEIDER, K., RUNE, G.M. 2010. Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology*, 151:1153-60.
- ZHOU, Z.X., LANE, M.V., KEMPPAINEN, J.A., FRENCH, F.S., WILSON, E.M. 1995. Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol*, 9:208-218.
- ZHOU, L., LEHAN, N., WEHRENBURG, U., DISTELDORF, E., VON LOSSOW, R., MARES, U., JARRY, H., RUNE, G.M. 2007. Neuroprotection by estradiol: A role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. *Exp Neurol*, 203:72-81.
- ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L.R., AMARAL, D.G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6: 2950-2967.

## 7.2 Internetquellen

- [www.chaz.org/Courses/Sapir\\_Whorf/Brain\\_language/Hippocampus.png](http://www.chaz.org/Courses/Sapir_Whorf/Brain_language/Hippocampus.png) (entnommen am 02.04.2014 um 21.29 Uhr)
- [www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/endocrinology/male-hypogonadism/images/MaleHypogonadismfig1\\_large.jpg](http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/endocrinology/male-hypogonadism/images/MaleHypogonadismfig1_large.jpg) (entnommen am 02.04.2014 um 21.29 Uhr)
- <https://www.dasgehirn.info/entdecken/anatomie/der-hippocampus> (entnommen am 19.06.2016 um 13.11 Uhr)
- [www.kup.at/kup/images/browser/3836-b.jpg](http://www.kup.at/kup/images/browser/3836-b.jpg)
- [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/CajalHippocampus\\_\(modified\).png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/CajalHippocampus_(modified).png) (entnommen am 02.04.2014 um 21.30 Uhr)
- <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/13/Steroidogenesis.svg/1245px-Steroidogenesis.svg.png> (entnommen am 02.04.2014 um 21.30 Uhr)



## **8. Danksagung**

Hiermit bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und jederzeit mit ihrer Hilfe und Ratschlägen zur Seite standen.

Ganz besonderer Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. Gabriele Rune und meiner Betreuerin Frau Dr. Nicola Brandt, durch die meine Doktorarbeit überhaupt erst möglich gemacht wurde.

## **9. Lebenslauf**

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen



## 10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: .....

Simon Kind