

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

**Genomische und nicht-genomische Wirkung von Testosteron in  
hypothalamischen Neuronen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wilhelm Baumgärtel

(2020)

## **Für meine Familie**

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker  
Erstgutachterin: Prof. Dr. Olga A. Sergeeva  
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Charlotte von Gall

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

**als Publikation:**

**De Luca, R, Suvorava, T, Yang D, Baumgärtel W, Kojda, G, Haas, HL, Sergeeva OA (2016).** Identification of histaminergic neurons through histamine 3 receptor-mediated autoinhibition. *Neuropharmacology* 106:102- 115.

## Zusammenfassung

Histaminerge (HA) Neurone sind im Gehirn ausschließlich im *Nucleus tuberomamillaris* (TMN) vorzufinden. Ihre Feueraktivität korreliert mit dem Vigilanzgrad. Sie aktivieren die Großhirnrinde und subkortikale Areale, welche die kortikale Aktivierung (*cortical arousal*) kontrollieren. Eine Steigerung der Vigilanz im Rahmen auf die Fortpflanzung bezogener Verhaltensweisen durch synergistische Beteiligung der histaminergen und orexinergen Neurone wurde in früheren Studien nachgewiesen.

Angesichts der, in diesem Zusammenhang erhöhten Testosteronspiegel untersuchte die vorliegende Dissertation die Wirkung von Testosteron auf die Aktivität der HA Neurone mit Hilfe elektrophysiologischer, bildgebender und immunhistochemischer Methoden.

Testosteron aktivierte dosisabhängig HA Neurone der Maus in Spannungsklemm-Versuchen im *cell attached* Modus. Der Androgenrezeptor (AR) Antagonist Flutamid blockierte diese Wirkung. Testosteron erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel in Experimenten mit den Kalziumindikatoren Fluo4 und GCaMP6f.

Die Mehrzahl der HA Neurone (~80%) zeigte sich immunopositiv für den AR, wobei die Zellkernfärbung häufiger bei juvenilen als bei adulten/adoleszenten Neuronen nachzuweisen war. Entsprechend reagierten kultivierte Neurone altersabhängig auf Testosteron.

Für die konditionell dopaminergen Neurone aus dem TMN wie auch aus der benachbarten Region des *Nucleus praemamillaris ventralis* (PMV) konnte ebenfalls eine AR-Expression gefunden werden. Durch erregende Verbindungen zu den HA Neuronen ist eine Verstärkung der Vigilanz fördernden Wirkung von Testosteron möglich.

Die Ergebnisse der Studie lassen vermuten, dass Testosteron durch seine schnelle, direkte, nicht genomische Wirkung auf HA Neurone eine Rolle für erhöhte Vigilanz bei, auf die Fortpflanzung bezogenem Verhalten spielt. Die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse wird im Licht der möglichen präventiven Wirkungen des Testosterons im Synergismus mit histaminergen Therapeutika beim metabolischen Syndrom diskutiert.

## Summary

Brain histaminergic (HA) neurons are localized exclusively in the tuberomammillary nucleus (TMN) of hypothalamus. Their firing rate positively correlates with the vigilance grade and they promote wakefulness by projections to the cortex and subcortical brain areas that control cortical arousal. Previous studies have shown that anticipation and performance of mating activities demand a high degree of vigilance, the former is supported by synergistic activation of histaminergic and orexinergic systems.

This dissertation discloses a role of testosterone as modulator of HA neuron activity with electrophysiological, immunohistochemical and calcium imaging techniques. Testosterone activated dose-dependently mouse HA neurons recorded in voltage-clamp cell attached mode, an action impaired by the androgen receptor (AR) antagonist flutamide. An increase in the intracellular calcium level was shown in the presence of testosterone using fluo4 and GCaMP6f indicators.

The majority of HA neurons were immunopositive for AR (~80%) with nuclear staining more frequently observed in juvenile than in adult/adolescent neurons. Responses to testosterone were age-dependent in cultured neurons. Conditionally dopaminergic (DA) neurons of TMN and the neighbouring region, the premammillary nucleus ventralis, were also AR immunopositive and could play a role in vigilance promoting effects of testosterone through their excitatory connections to HA neurons.

The results of this study suggest that a fast and direct (non genomic) action of testosterone on HA neurons plays a role for the increased vigilance. Clinical relevance of these results, possibly for the treatment of metabolic syndrome, is discussed in light of the synergistic action of steroidal and histaminergic therapeutics.

## Abkürzungsverzeichnis

5HT	Serotonin
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
AgRP	Aguti related peptide
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ARAS	aszendierendes, retikuläres Arousal System
AR	Androgenrezeptor
ARC	Nucleus arcuatus
ATP	Adenosintriphosphat
AVPV	anteroventraler periventrikulärer Kern
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BNST	Nucleus striae terminalis
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP/cGMP	zyklisches Adenosinmonophosphat/Guanosinmonophosphat
CART	cocaine amphetamine regulated transcript
CCK	Cholecystokinin
cFos	Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CCD Kamera	charge coupled device Kamera
cpGFP	circularly permuted green fluorescent protein
CREB	cAMP response element binding protein
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CTRL-Phase	Kontrollphase
D1/2/3/4-R	Dopamin-1/2/3/4-Rezeptor
DA/DAT	Dopamin/Dopamintransporter
DHT	Dihydrotestosteron
DMH	dorsaler medialer Hypothalamus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPAC	3,4-dihydroxy-phenylacetic acid
DR/MR	Dorsale/mediale Raphe Kerne
EEG	Elektroenzephalogramm
EDAC	1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid
ER	Estrogenrezeptor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
Fura-2/4AM	Fura-2/4-acetoxymethylester
GABA	gamma aminobutyric acid
GCaMPs/GECI	genetically encoded calmodulin proteins/calcium indicator
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GINA	genetically encoded indicator of neuronal activity
GMP	Guanosinmonophosphat
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H1/2/3R	Histamin-1/2/3-Rezeptor
HA	Histamin
HBS	HEPES gepufferte Lösung
HDC	Histidindecaboxylase
HDL	high density lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHG	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
IP3	Inositoltrisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KO Maus	knock out Maus
LC	Locus coeruleus

LDL	low density lipoprotein
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LH	luteinisierendes Hormon
LHA	laterale hypothalamische Area
MAP Kinase	mitogen activated protein kinase
MCH	Melanin konzentrierendes Hormon
MEAN±SEM	Mittelwert±Standardfehler
MEA	microelectrode array, Mikroelektrodengitter
MeA	mediale Amygdala
MPO/MPOA	mediale Area praeoptica
MPTP	1-Methyl-4Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
MWT	Mann-Whitney-U-Test
NAD	Nicotinamiddinukleotid
NADPH+H	reduziertes Nicotinamiddinukleotidphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale NO-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
ORX	Orexin/Hypocretin
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PBS(T)	phosphate buffered saline(+triton)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMV	ventraler präamillärer Kern
POMC	Proopiomelanocortin
PPY	Pankreatisches Polypeptid
PTT/LDT	pedunculopontines/laterodorsales Tegmentum
PVN	Nucleus paraventricularis
rb	rabbit
REM	rapid eye movement
SHBG	sex hormone binding globulin
SRY-Gen	sex determining region of Y
SWS	slow wave sleep
T	Testosteron
TH	Tyrosinhydroxylase
TMdiff	diffuser TMN
TMMd/v	dorsaler/ventraler TMN, medialer Anteil
TMN	tuberomamillärer Kern
TMVr/c	rostraler/caudaler TMN, ventraler Anteil
Tmt	Tomatoprotein
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
VLPO	ventrolaterales präoptisches Areal
VM(A)T2	vesicular monoamine transporter 2
VMN/H	ventraler medialer hypothalamischer Kern
VOCC	voltage gated calcium channel
vPAG	ventrales periaquäduktales Grau
vs.	versus
VTA	ventrale tegmentale Area
WP	Waschphase
ZNS	zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1. Einleitung .....	1
1.1 Grundlagen .....	1
1.1.1 Der histaminerge Kern des Hypothalamus (Nucleus tuberomamillaris, TMN) und Cortical Arousal.....	1
1.1.2 TMN: Anatomie.....	1
1.1.3 Zentrales Histamin: Synthese.....	3
1.1.4 Histaminerge Neurone: Elektrophysiologische Eigenschaften.....	3
1.1.5 Histaminerge Neurone: Die wichtigsten Afferenzen und Rezeptoren.....	4
1.1.6 Zentrales Histamin: Funktionen, ein Überblick.....	6
1.1.7 Histamin und Arousal.....	7
1.1.8 Testosteron: Überblick.....	9
1.1.9 Testosteronspiegel und Konzentrationsschwankungen .....	11
1.2 Testosteron als Neuromodulator – Aromatisierungshypothese.....	12
1.3 Androgenrezeptor und Signalkaskaden – Genomische und nicht genomische Wirkungsmechanismen .....	14
1.4 Konditionelle Dopaminneurone (TMN und PMV).....	19
1.4.1 Der PMV.....	20
1.5 Testosteron und Arousal.....	21
1.6 Fragestellung.....	23
Kapitel 2. Material und Methoden .....	25
2.1 Mauslinien.....	25
2.2 Spannungsklemm-Versuche (Patch-Clamp) an akut dissoziierten Neuronen des tuberomamillären Kerns (TMN) .....	25
2.3 Kalziumfluoreszenzmessungen (calcium imaging): Messung von Kalziumionenströmen in Kulturen dissoziierter Nervenzellen des TMN in Abhängigkeit von KCl/Testosteron.....	28
2.4 Ableitung von Kulturen dissoziierter Neurone des TMN auf Mikroelektrodengittern (microelectrode array, MEA).....	31
2.5 Immunhistochemie.....	33
2.6 Chemikalien und Substanzen.....	38
2.7 Statistische Auswertung.....	38
Kapitel 3. Ergebnisse .....	40
3.1 Testosteron erhöht die Feuerfrequenz der Histaminneurone des TMN.....	40
3.2 Der Frequenzanstieg der HA Neurone ist konzentrationsabhängig.....	41
3.3 Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels der TMN Neurone durch Testosteron ...	43
3.4 Beteiligung des Androgenrezeptor am Testosteron abhängigen Frequenzanstieg der TMN Neurone.....	45
3.5 Expression des Androgenrezeptor in Neuronen des TMN.....	46
3.6 Kernimmunreaktivität vs. Somaimmunreaktivität: Konfokalmikroskopische Aufnahmen und Image J Auswertungen.....	52
3.7 Expression des Androgenrezeptor in DAT positiven Neuronen des PMV und TMVr und Feuerfrequenzanstieg dieser Neuronenpopulation durch Testosteron.....	55
3.8 Das Alter ist von Bedeutung: Testosteroneffekt auf kultivierte TMN Neurone in Abhängigkeit von Konzentration und Alter .....	58
Kapitel 4. Diskussion .....	61
4.1 Überblick.....	61
4.2 Testosteron erhöht die Feueraktivität der Histaminneurone des TMN dosisabhängig .....	62
4.3 Testosteron erhöht den intrazellulären Kalziumspiegel in Kulturen von TMN Neuronen .....	65
4.4 Der Androgenrezeptor ist Bestandteil der Signalkaskade des Testosteroneffekts: Flutamid-Wirkung und Expression des Androgenrezeptor .....	67
4.5 Konditionelle Dopaminneurone in TMN und PMV: AR Expression und	

Testosteronwirkung .....	72
4.6 Das Alter ist von Bedeutung: Der Testosteroneffekt auf die Histaminneurone ist altersabhängig und verbunden mit einer entsprechenden Dynamik der intrazellulären Lokalisation des Androgenrezeptor.....	73
4.7 Schlussfolgerung und physiologischer Ausblick .....	76
Kapitel 5. Literaturverzeichnis .....	82
5.1 Publikationen.....	82
5.2 Internetseiten.....	98

# Kapitel 1. Einleitung

## 1.1 Grundlagen

### 1.1.1 Der histaminerge Kern des Hypothalamus (*Nucleus tuberomamillaris*, TMN) und *Cortical Arousal*

Histamin ist das biogene Amin der basischen Aminosäure L-Histidin. Im Gehirn kommt es in zwei verschiedenen Pools vor, in den Mastzellen, wo es bei Entzündungsprozessen von Bedeutung ist und in den Neuronen des tuberomamillären Kerns im posterioren Hypothalamus (*Nucleus tuberomamillaris*, TMN). Dieser Kern ist der einzige Ort histaminerg (HA) Neurone im zentralen Nervensystem (Haas et al., 2008).

Die sich anschließenden Kapitel beschreiben anatomische, pharmakologische und elektrophysiologische Merkmale dieser Neurone, welche ihnen eine wichtige Rolle für die kortikale Aktivierung und verschiedene, lebensnotwendige Funktionen zuweisen.

### 1.1.2 TMN: Anatomie

Der *Nucleus tuberomamillaris* ist evolutionsgeschichtlich zwischen den unterschiedlichen Wirbeltierspezies stark konserviert. Er kann sowohl bei Säugetieren wie Ratte und Maus als auch bei Fischen, wie dem Zebrafisch, gefunden werden. In seiner Größe variiert er zwischen 2.000-3.000 Neuronen bei Ratten und bis zu 64.000 Neuronen im menschlichen Hypothalamus (Haas et al., 2008, Peitsaro et al., 2000). Der Kern gliedert sich in mehrere Untergruppen. Man unterscheidet bei Nagern eine mediale von einer ventralen Fraktion, die zwischen dem *Recessus mamillaris* des dritten Ventrikels und den Kernen der *Corpora mamillaria* angeordnet sind. Die mediale Neuronengruppe liegt in nächster Nähe zum dritten Ventrikel im Bereich des Mamillarrezessus. Diese wird weiterhin in eine dorsale Gruppe gegliedert, die am oberen Pol des dritten Ventrikels neben dem dorsomedialen hypothalamischen Kern (DMN) gelegen ist. Eine ventrale Population histaminergischer Nervenzellen ist weiter kaudal zwischen dem *Nucleus arcuatus* sowie dem dorsalen und ventralen prämamillären Kern (PMD/PMV) angeordnet. Je nach Autor werden diese medialen Anteile des TMN als ventraler, medialer (TMMv) und dorsaler, medialer (TMMd) Abschnitt des TMN (Ericson et al., 1987) oder E3 und E4 (Inagaki et al., 1990) benannt. Die ventrale Untergruppe des TMN liegt um die Kerngebiete der *Corpora mamillaria* verstreut. Durch diese ist sie in eine rostrale Portion unterteilt, die vor dem medialen und lateralen mamillären Kern (MM, LM) zu finden ist. Des Weiteren unterscheidet man eine kaudale Gruppe, die hinter dem lateralen mamillären Kern (LM) liegt.

Diese Fraktion des TMN wird je nach Forschungsgruppe entweder als rostraler, ventraler (TMVr) und kaudaler, ventraler Abschnitt des TMN (Ericson et al., 1987) oder E1 und E2 (Inagaki et al., 1990) bezeichnet. Zu diesen beiden Gruppen finden sich noch weit verstreute HA Neurone, die überwiegend in der lateralen hypothalamischen Area (LHA) gelegen sind und als diffuser TMN oder E5 zusammengefasst werden.

Besonderes Merkmal der histaminergen Neurone ist ihre Größe von 16 bis 25µm (De Luca et al., 2016), vor allem in der ventralen Portion des TMN. Es handelt sich um multipolare Neurone mit 2-3 Dendriten und einem Axon, das von einem prominenteren Dendriten entspringt. Die interneuronale Kommunikation der HA Neurone erfolgt über Verdickungen entlang ihrer Axone, den Varikositäten, die auch als *Synapse en passant* bezeichnet werden. Die HA Neurone des TMN bilden weitreichende Verbindungen, die das gesamte Gehirn durchziehen. Wichtige Zielgebiete histaminergener Efferenzen sind die Großhirnrinde mit dem prämotorischen Kortex und somatosensorischen Arealen (*Gyrus postcentralis*), dem limbischen System einschließlich Amygdala, Septum und dem diagonalen Band von Broca, der Riechrinde sowie dem Hippocampus. Dazu kommen die Basalganglien wie *Nucleus caudatus*, *Putamen* und *Globus pallidus* sowie thalamische Kerne und in hoher Faserdichte der Hypothalamus mit in erster Linie der medialen präoptischen Area (MPO), dem supraoptischen (SON) und suprachiasmatischen Kern (SCN) sowie dem *Nucleus paraventricularis* (PVN), *dorsomedialis* (DMN), *ventromedialis* (VMN) und *arcuatus* (ARC). Im Mittelhirn und Hirnstamm sind die *Formatio reticularis* sowie die aminergen Kerngebiete des aufsteigenden, aktivierenden Systems (ARAS) wichtige Zielstrukturen, bevor die histaminergen Fasern weiter zum Rückenmark ziehen (Köhler et al., 1985; Takeda et al., 1984; Wouterlood und Gaykema, 1988; Wouterlood et al., 1988).

Diese weitreichenden Verbindungen durch das ZNS erfolgen über zwei aufsteigende und ein absteigendes Faserbündel. Von den beiden aszendierenden, histaminergen Fasersträngen zieht das eine nach ventral über die *Eminentia mediana* und den Hypothalamus zum Kortex und das andere nach dorsal entlang des dritten Ventrikels zum Thalamus und Kortex.

Das absteigende Fasersystem verläuft über den *Fasciculus longitudinalis medialis* durch den Hirnstamm zum Rückenmark (Haas, HL, et al., 2008). Die HA Neurone stehen damit mit den meisten kortikalen und subkortikalen Hirnzentren sowie dem Hirnstamm in Verbindung und haben durch ihre oberflächliche Lage direkten Kontakt mit den inneren (dritter Ventrikel, mediale Gruppe des TMN) und äußeren Liquorräumen (*Cisterna interpeduncularis*, ventrale Gruppe des TMN).

### 1.1.3 Zentrales Histamin: Synthese

Haupttransmitter der Neurone des TMN ist das Histamin. Dieses synthetisieren sie mittels der, für alle TMN Neurone charakteristischen Histidindecaboxylase (HDC). Die Aktivität der Histidindecaboxylase ist von dem Vitamin-B6-Derivat Pyridoxalphosphat abhängig. Das Enzym katalysiert die  $\alpha$ -Decarboxylierung der basischen Aminosäure L-Histidin zu dessen biogenem Amin Histamin unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  (Moya-Garcia et al., 2009). Histamin wird in erster Linie in den Varikositäten der HA Neurone gebildet und mittels des vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) in die Speichervesikel aufgenommen. Auf ein Aktionspotential, gefolgt von dem typischen Kalziumanstieg verschmelzen die Vesikel mit der Membran der Varikositäten und setzen Histamin ins Interstitium frei. Dort wird es durch die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) zu N $\tau$ -methylhistamin (Tele-Methylhistamin) inaktiviert, das im Gehirn mithilfe der Monoaminoxidase-B (MAO-B) zu einem Imidazolessigsäure-Derivat umgewandelt wird. Es wird renal eliminiert (Haas und Panula, 2003). Neben Histamin verfügen die TMN Neurone je nach Spezies über weitere Transmitter wie GABA (Mehrzahl der Neurone), Galanin, Proenkephalin-Derivate wie Met-Enkephalin-Arg-Phe (MERF) und Substanz P, deren Funktionen bis dato noch ungewiss bleiben (Airaksinen et al., 1992).

### 1.1.4 Histaminerge Neurone: Elektrophysiologische Eigenschaften

Elektrophysiologisch zeichnen sich die HA Neurone durch die Fähigkeit zur Spontanaktivität aus. Sie feuern mit einer Frequenz von 0.1-10Hz, meistens in Form von 2 bis 5 Aktionspotentialen pro Sekunde (Fujita et al., 2017). Das Ruhemembranpotential der Neurone liegt bei etwa  $-50\text{mV}$  (Haas et al., 2008). Das Aktionspotential besteht aus einer Depolarisationsphase mit einer langsamen und einer schnellen Komponente, die den charakteristischen *overshoot* bewirkt. Es folgt eine Repolarisationsphase mit anschließender starker Negativierung des Membranpotentials, was als Nachhyperpolarisation bezeichnet wird. Ein Aktionspotential dauert etwa 1,8-2,4ms (Brown et al., 2000; Haas et al., 2008, De Luca et al., 2016). Die Depolarisationsphase ist abhängig von spannungsabhängigen, Tetrodotoxin (TTX) sensitiven, nicht inaktivierbaren Natriumionenkanälen sowie einer Vielzahl spannungsabhängiger Kalziumionenkanäle vom L-, T-, N- und P/Q-Typ. Die Repolarisation wird anfangs durch verzögerte Kaliumionengleichrichterkanäle getragen, die von Kalzium abhängigen Kaliumionenkanälen unterstützt werden, welche die Nachhyperpolarisation mit einem Membranpotential von  $-80\text{mV}$  verursachen. Diese Hyperpolarisation aktiviert einerseits einen auswärts gerichteten Kaliumionenstrom, der die Rückkehr des Membranpotentials zum Ruhe- bzw. Schwellenpotential verzögert und

andererseits einen gemischten, einwärts gerichteten Natrium-/Kaliumionenstrom, der die Depolarisation des Membranpotentials in Richtung Aktionspotential vorantreibt.

Die Hyperpolarisation führt zur Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumionenkanäle (L-Typ bei  $-50\text{mV}$ , T-Typ bei  $-90\text{mV}$ ), die zusammen mit den Natriumionenkanälen ein erneutes Aktionspotential auslösen. Auf diese Weise kommt die Spontanaktivität der HA Neurone zustande (Stevens et al., 2001; Haas, Panula, 2003).

### **1.1.5 Histaminerge Neurone: Die wichtigsten Afferenzen und Rezeptoren**

Entsprechend der, den TMN erreichenden Afferenzen exprimieren die histaminergen Neurone eine Reihe von ionotropen und metabotropen Rezeptoren auf ihren Perikarya und Varikositäten. Der Großteil der Afferenzen zum TMN stammen aus dem präfrontalen Kortex, dem Septum, dem Hypothalamus, allen voran aus anterioren Abschnitten und der medialen (MPOA) sowie der ventrolateralen präoptischen Area (VLPO). Dazu kommen Fasern des cholinergen Systems des pontinen Tegmentums sowie der aminergen Systeme des Hirnstamms mit den adrenergen Neuronen der Region C1-3, den noradrenergen Neuronen der Region A1 und A2 sowie den serotoninergen Neuronen der Kerngruppe B5-B9. So exprimieren die HA Neurone beispielsweise die glutamatergen AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Hierüber erhalten die TMN Neurone stimulierende Eingänge, vor allem aus dem präfrontalen Kortex, der lateralen präoptischen Area und dem lateralen Hypothalamus. Einer der wohl wichtigsten Rezeptoren der HA Neurone sind die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, über die deren Aktivität unterdrückt wird. Hauptquelle GABAerger Eingänge sind die Neuronen der VLPO, die in der Regulation des Schlafs eine zentrale Rolle übernehmen. Die HA Neurone verfügen auch über Acetylcholinrezeptoren, worüber sie mit dem mesopontinen, cholinergen System in Verbindung stehen, die an der Weckreaktion des zentralen Nervensystems beteiligt sind. Auch Serotonin aus den Raphe Kernen (B5-9) stimuliert die HA Neurone. Diese verfügen über Serotoninrezeptoren in Form des 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptors, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor. Über ein G<sub>q/11</sub>-Protein bewirkt dieser einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und somit die Aktivierung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers, was eine Zunahme der Feueraktivität der HA Neurone nach sich zieht (Sergeeva et al., 2003). Die weiteren, monoaminergen Fasern mit den Neurotransmittern Adrenalin und Noradrenalin aus den Hirnstammkernen ziehen zu den GABAergen Projektionen aus der VLPO, wo sie über  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren präsynaptisch hemmend auf die GABA-Freisetzung wirken und so die Aktivität der histaminergen Neurone positiv beeinflussen. Weiterhin sind die HA Neurone empfindlich gegenüber Purinverbindungen wie ATP, ein häufiger Kotransmitter

sympathischer Transmission, da sie den Purinrezeptor P2X2 exprimieren. Es handelt sich dabei um einen nicht-selektiven Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Kationenkanal, der nach Bindung von ATP eine Depolarisation der histaminergen Neurone auslöst (Vorobjev et al., 2003).

Eine ebenfalls wichtige Verbindung im Rahmen der Regulation des Wachheitszustands und der Kontrolle des Energiehaushalts besteht zu den orexinergen Neuronen der LHA.

Diese wirken mittels des Orexin-2-Rezeptor (ORX- 2-R), einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR), stimulierend auf die Feueraktivität der TMN Neurone. Eventuell ist auch eine Aktivierung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers beteiligt (Anaclet et al., 2010; Leonard und Kukkonen, 2013). Ein weiterer, in den histaminergen Neuronen vertretender Rezeptor ist der Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (Fekete et al., 1999; Gotoh et al., 2009). Außerdem verfügen die HA Neurone über den Histamin-3-Rezeptor, einem Autorezeptor.

Dieser übernimmt hauptsächlich die Rolle der negativen Feedback-Hemmung der Histaminfreisetzung. Anwesend auf histaminergen Varikositäten und präsynaptisch auf Synapsen benachbarter Neurone, limitiert der H3R die Transmittersekretion. Der zugrunde liegende Mechanismus besteht in einem G<sub>i/o</sub> vermittelten Block der Adenylatcyclase sowie spannungsabhängiger Kalziumkanäle, über die, Aktionspotential abhängig, die Kalzium bedingte Vesikelverschmelzung ausgeführt wird (Brown, et al., 2001).

Es gibt weitere HA Rezeptoren, den H1R, den H2R sowie den H4R, der überwiegend im peripheren Nervensystem eine Rolle spielt. Der H1R vermittelt exzitatorische Signale der histaminergen Neurone. Er ist ein GPCR, der nach Aktivierung über ein G<sub>q/11</sub>-Protein die PLC $\beta$ -IP3-Signalkaskade initiiert und durch eine Mobilisierung von intrazellulären Kalziumionen ein, durch diese Ionen getragenes Depolarisationssignal auslöst.

Ein weiterer Mechanismus der H1R getragenen Depolarisation ist die Aktivierung von TRPCs (*transient receptor potential channels*). Diese Gruppe (TRPC1-7) von unspezifischen Kationenkanälen, die auch für Kalziumionen durchlässig sind, werden in ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit durch *second messenger* beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielt die Phospholipase C $\beta$ , worin die Verbindung zu dem H1R besteht. So konnten Obukhov und Nowycky, 2002 an einem Modell chromaffiner Zellen zeigen, dass der H1R über den TRPC4 einen Kalziumioneneinstrom bewirken konnte, der zur Exocytose der Speichervesikel dieser Zellen führte. Des Weiteren beschrieben Tabarean und Gallyas, 2012, dass Histamin über den H1R und TRPCs eine Kalzium vermittelte Aktivierung von thermoregulatorischen Neuronen des medianen, präoptischen Kerns (MnPO) bewirken konnte.

Neben dem beschriebenen Zusammenhang zwischen H1R und den TRPCs konnte De Luca, 2016 zeigen, dass eine Population von HA Neuronen den Capsaicin-Rezeptor (VR1, Vanilloid-Rezeptor 1 oder TRPV1 *transient receptor potential vanilloid receptor 1*) exprimiert. Dieser, zur Familie der TRPCs gehörende Rezeptor ist als Nozizeptor an der Verarbeitung von Schmerzsignalen im peripheren Nervensystem beteiligt.

Auf den HA Neuronen bewirkt er ein Depolarisationssignal mit einer Zunahme der Feueraktivität der entsprechenden Neurone. Der H2R ist als weiterer GPCR an ein G<sub>s</sub>-Protein gekoppelt, das den Adenylatcyclase/cAMP/ PKA-Signalweg aktiviert. Neben der Stimulation der Transkription des CREB werden über die PKA Kalzium-abhängige Kaliumkanäle inaktiviert, was zu einer Verkürzung der Nachhyperpolarisation und damit einer Verstärkung der Erregbarkeit der Zielzelle führt. Das, in dieser Signalkaskade anfallende cAMP bewirkt zusätzlich eine Hemmung des durch Hyperpolarisation aktivierten Kationenstroms (I<sub>h</sub>), was einem schwachen Depolarisationssignal entspricht (Haas et al., 2008).

### 1.1.6 Zentrales Histamin: Funktionen, ein Überblick

Die histaminergen Neurone des TMN sind, basierend auf ihren weiten Efferenzen durch das gesamte zentrale Nervensystem, an multiplen, integrativen und regulativen neuronalen Funktionen beteiligt, unter anderem der Schlaf-Wach-Regulation, der Kontrolle des Wasser- und Energiehaushalts sowie von Lernprozessen (Haas et al., 2008). Die wohl wichtigste Funktion kommt ihnen im Schlaf-Wach-Rhythmus zu. Zusammen mit den aminergen Neuronengruppen der *Formatio reticularis* des Hirnstamms (ARAS) bewirken sie die Aufhebung des thalamischen Blocks und damit die Weckreaktion des Großhirnkortex. Dabei fungieren sie im Zusammenspiel der aminergen Transmittersysteme wie ein Dirigent über sein Orchester verfügt. Sie sind prädestiniert für diese Rolle aufgrund ihrer strikten Wachaktivität. Sie sind aktiv im Wachheitszustand und inaktiv im Schlaf. Ihr wichtigster Gegenspieler sind die GABAergen und galaninergen Neurone der VLPO, die während der Schlafphasen typischerweise höchst aktiv sind, inhibitorisch auf die HA Neurone des TMN wirken und diese in einen *Off*-Zustand überführen (Saper et al., 2005, Haas und Sergeeva, 2012). Wichtigster Mitspieler der TMN Neurone sind die Orexin-Zellen der LHA, die, den Gegenspielern TMN und VLPO übergeordnet, für weiche Übergänge zwischen den beiden Aktivitätszuständen des Organismus sorgen. Zudem sind sie wichtige Synergisten der HA Neurone in der Regulation des Energiehaushalts. Zusammen vermitteln sie ein anorektisches Signal. Histamin erhöht das Sättigungsgefühl durch Beeinflussung der Neuronengruppen im ventromedialen, hypothalamischen Kern (VMH) und paraventriculären Kern (PVN). Die histaminergen Neurone sind des Weiteren an der Weitergabe anorektischer Signale im Energiehaushalt beteiligt. Sie stimulieren den Energiestoffwechsel zur Bereitstellung von Energiereserven und steigern die Wärmeproduktion (Brown et al., 2001). Eine weitere Funktion kommt den histaminergen Neuronen in Lernprozessen und der Bildung von Gedächtnisspuren im Hippocampus zu. Trotz teils konträrer Erkenntnisse, ist

gesichert, dass Histamin einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration, die Langzeitpotenzierung und die NMDA-Rezeptoren der CA1-Neurone des Hippocampus hat, was zu einer positiven Beeinflussung von Lernprozessen führt (Haas und Panula, 2003).

### 1.1.7 Histamin und *Arousal*

Der TMN ist ein wichtiger Kern der Weckreaktion (*Arousal*) des zentralen Nervensystems bzw. der Wachheit des Organismus, die im Elektroenzephalogramm (EEG) durch Desynchronisation, d.h. niedrige Amplituden und hohe Frequenzen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Wellen gekennzeichnet ist. Die Rolle des Histamin als *Arousal* Transmitter wird zum einen durch die sedierenden Nebenwirkungen der Antihistaminika, in erster Linie der 1. Generation wie *Dimetinden* begründet, die in der antiemetischen oder antiallergischen Therapie Anwendung finden (Tasaka et al., 1989). Hier konnte gezeigt werden, dass die Antihistaminika als H1-Rezeptor-Antagonisten neben peripheren Wirkungen auf Bronchien, Gefäßen und der Area postrema auch zentrale H1-Rezeptoren besetzen, worüber Histamin die Weckreaktion vermittelt (Tashiro et al., 2002). Ein weiterer Grund ist die Abhängigkeit der Aktivität dieser Neurone vom Schlaf-Wach-Rhythmus. Während des Tiefschlafs sind die HA Neurone inaktiv, im Zustand von Wachheit dagegen aktiv. Zusätzlich führt die Zerstörung von Neuronen im posterioren Hypothalamus genauso wie die Applikation eines GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Agonisten wie *Muscimol* in dieses Gebiet zu einem Zustand von Somnolenz und Hypersomnie mit Zunahme der Tiefschlafphasen (*slow wave sleep*, SWS) (Lin et al., 1988). Weiterhin konnten Fujita et al., 2017 in einer optogenetischen Versuchsreihe durch lichtabhängiges Ausschalten von HA Neuronen ebenfalls eine signifikante Zunahme von Tiefschlafphasen beschreiben. In der Initiation der Weckreaktion und dem Aufrechterhalten des Wachheitszustands, der Vigilanz, nimmt das histaminerge System eine zentrale Stellung ein und koordiniert das Zusammenspiel einer Reihe weiterer *Arousal* Transmittersysteme wie den monoaminergen Hirnstammkernen mit dem *Locus coeruleus* (LC, Noradrenalin), den medianen und dorsalen Raphe Kernen (MR, DR, Serotonin) und dem ventralen periaquäduktalen Grau (vPAG, Dopamin), dem aufsteigenden, retikulären, aktivierenden System (ARAS; Acetylcholin), bestehend aus den cholinergen Kerngebieten des pedunculopontinen (PTT) und laterodorsalen Tegmentum (LDT), den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns (*Substantia innominata* & Co.) sowie den Orexin/Hypocretin Neuronen der LHA. Die Weckreaktion des Kortex verläuft über zwei parallele, aufsteigende Faserbahnen. Die erste hat ihren Ursprung in den cholinergen Kerngebieten des pedunculopontinen und laterodorsalen Tegmentums, dem ARAS, die zu den Relais-Kernen, dem *Nucleus reticularis* sowie den intralaminären Kernen des Thalamus ziehen.

Diese thalamischen Kerne sind für die Weiterleitung peripherer, sensorischer Signale an den Kortex verantwortlich, wo diese zum Bewusstsein werden. Die cholinergen Eingänge aus dem ARAS stimulieren diese Kerngebiete und ermöglichen so die thalamokortikale Transmission, einem wichtigen Schritt für die Vigilanz. Die zweite Bahn führt am Thalamus vorbei. Sie beginnt im monoaminergen System des mesopontinen Hirnstamms.

Von hier aus ziehen noradrenerge (*Locus coeruleus*), serotoninerge (dorsale & mediane Raphe Kerne) und dopaminerge (ventrales periaquäduktales Grau) Fasern in die LHA, wo histaminerge Fasern aus dem TMN sowie orexinerge Fasern aus der LHA hinzukommen, die gemeinsam zum basalen Vorderhirn oder direkt weiter auf die Großhirnrinde projizieren.

Die monoaminergen Fasern bilden des Weiteren Synapsen mit den Varikositäten der HA Neurone und verstärken deren Aktivität. Vom basalen Vorderhirn entspringen cholinerge und GABAerge Fasern zum Kortex, den sie über das Prinzip der Disinhibition (Enthemmung) aktivieren. Über die Aktivierung dieser beiden Fasersysteme kommt es zu der Weckreaktion des Kortex.

Wichtiges Charakteristikum eines Großteils dieser Neurone, insbesondere der monoaminergen Nervenzellen, ist ihre Aktivität im Wachzustand und die fehlende Aktivität während Tiefschlaf (*Non-REM*-Schlaf) und *REM*-Schlaf. Gegenspieler dieses Systems sind die, vor allem im Tiefschlaf (*SWS*, *slow wave sleep*) aktiven Neurone der VLPO.

Diese enthalten als Neurotransmitter das inhibitorische GABA und Galanin und ziehen mit ihren Fasern zu allen beteiligten Kernen des aufsteigenden *Arousal* Systems wie dem TMN, den orexinergen Neuronen der LHA, dem LC, den DR und MR, dem vPAG sowie PTT und LDT. Im Zustand tiefen Schlafs hemmen die Neurone der VLPO auf diese Weise das aufsteigende aktivierende System. Im Gegenzug stehen die Zellen der VLPO im Wachzustand unter dem hemmenden Einfluss noradrenerger Fasern des LC, serotoninerger Fasern der DR und MR sowie inhibitorischer Eingänge aus dem TMN, in erster Linie mittels GABA, Galanin oder Enkephalin, da die VLPO Neurone über keine Histaminrezeptoren verfügen. Die Regulation der Schlaf-Wach-Zyklen folgt dem Prinzip einer Wippe oder eines Schalters: ist der eine Zustand aktiv, dann ruht der andere.

Um das Auftreten von Übergängen zwischen diesen beiden Zuständen zu minimieren bzw. zu verhindern, ist diesem System ein Regulator übergeordnet, die orexinergen Neurone der LHA. Sie senden stimulierende Eingänge an alle Kerngebiete des *Arousal* Systems und stehen unter hemmendem Einfluss der VLPO. Im Wachzustand aktivieren sie die monoaminergen Kerne (TMN, LC, DR, MR, PPT, LDT), die über ihre hemmenden Verbindungen zur VLPO deren Aktivität supprimieren. Im Zustand des Schlafs werden die orexinergen Neurone durch die jetzt aktive VLPO gehemmt, wodurch der Orexin vermittelte, aktivierende Effekt auf die monoaminergen Neurone und im Gegenzug deren hemmende Eingänge auf die VLPO im Sinne einer Disinhibition wegfallen (Saper et al., 2001; Saper et

al., 2005; Lin et al., 2011; Brown et al., 2001). Die Besonderheit der Orexinneurone wird im Krankheitsbild der Narkolepsie deutlich, die durch im Tagesverlauf abrupt einsetzende Schlafattacken in Kombination mit plötzlichem Tonusverlust der Muskulatur gekennzeichnet ist. Pathophysiologisch liegt ein Untergang der Orexinneurone, ein Orexinmangel bzw. ein Defekt des Orexin-2-Rezeptors (ORX-2R) zugrunde, wodurch der Stabilisator des Schlaf-Wach-Schalters wegfällt und es so häufiger zu Übergangszuständen kommt (Nishino et al., 2000). Dabei scheint der TMN eine zentrale Rolle in der Wachheit vermittelnden Orexin-Wirkung einzunehmen. Orexin erhöht den Wachheitszustand in Wildtyp-Mäusen und Ratten nach direkter Applikation in den TMN. In *H1R-KO* Mäusen kann dieser Effekt nicht beobachtet werden, ebenso wenig narkoleptische Zustände wie sie bei *Orexin-KO* Mäusen beschrieben wurden. Es ist daher anzunehmen, dass Orexin zumindest einen Teil seiner *Arousal* Wirkung über die HA Neurone und den H1-Rezeptor vermittelt (Huang et al., 2001). Ein weiterer Hinweis für die zentrale Rolle von Histamin und des H1-Rezeptors im Rahmen der Weckreaktion und Vigilanz ist die Beobachtung verlängerter *Non-REM*-Schlafphasen bei *H1R-KO* Mäusen sowie der negative Effekt der H3-Rezeptoragonisten auf den Wachheitszustand. Im Gegensatz dazu bewirken die H3-Rezeptorantagonisten in Wildtyp-Mäusen eine Steigerung der Vigilanz (Huang et al., 2006). Der TMN vermittelt also Wachheit und *Arousal* im Rahmen eines komplexen Systems exzitatorischer und inhibitorischer Transmittersysteme, die in einem zyklisch wechselnden Gleichgewicht mit der VLPO stehen.

### 1.1.8 Testosteron: Überblick

Testosteron ist das C<sub>19</sub>-Hydroxyketon-Derivat des Cholesterol. Die erste Beschreibung geht auf Brown-Sequard, 1889 zurück. Die Isolierung der für diese Eigenschaften verantwortlichen Substanz gelang erst 1935 der Arbeitsgruppe um Ernst Laqueur bei chemischen Untersuchungen an Stierhoden (David et al., 1935). Sie nannten die, aus den Stierhoden gewonnene Substanz „*Testosteron*“. Die Aufklärung der chemischen Struktur sowie die künstliche Synthese aus Cholesterol erfolgte noch im selben Jahr unabhängig von einander durch Ruzicka, L und Wettstein A sowie Butenandt und Hanisch, 1935.

Testosteron ist chemisch das Androsten-17 $\alpha$ -3 $\alpha$ , eine vom Cholesterol abgeleitete Verbindung mit 19 Kohlenstoff-, 28 Wasserstoff- und 2 Sauerstoffatomen (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>) sowie einer Ketogruppe am dritten C-Atom, einer Hydroxylgruppe am C-Atom 17 und einer Doppelbindung zwischen C4 und C5 (Delta 4,  $\Delta$ 4).

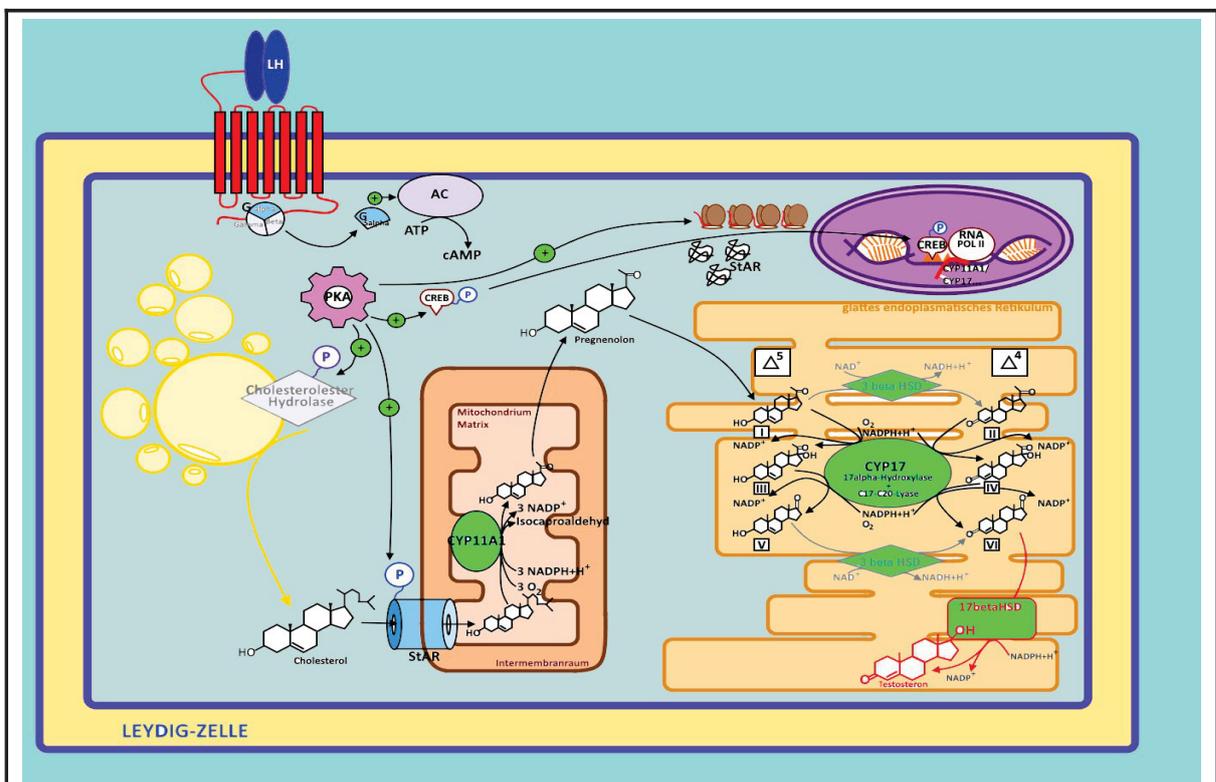
Die Hormonsynthese bei männlichen Spezies erfolgt überwiegend in den Leydig-Zellen der Hoden mit einem Anteil von fast 95%. Weitere Syntheseorte sind die Nebennierenrinde (5%, Mensch, ♀/♂), die Theca-Interna-Zellen der Follikel des Ovars (Mensch, Maus, Ratte) sowie

die Plazenta (Maus, Ratte) beim weiblichen Geschlecht (Payne und Hales, 2004; Ye et al., 2011, vgl. Abb. 1.1). Bei der Synthese handelt sich um eine Reihe von Redoxreaktionen vom Cholesterin ausgehend, die in den Mitochondrien und dem glatten endoplasmatischen Retikulum ablaufen und in Abbildung 1.1 zusammengefasst dargestellt sind.

Die Regulation der Hormonsynthese wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG) gesteuert. Eine zentrale Rolle spielt das Peptidhormon Luteotropin (LH, luteinisierendes Hormon). Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist die Aufnahme von Cholesterin in die Mitochondrien mittels des StAR-Proteins (vgl. Abb. 1.1).

Weitere regulative Schritte umfassen die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese der Enzyme CYP11A, CYP17, 3 $\beta$ HSD und 17 $\beta$ HSD (Stocco und Clark, 1996).

Testosteron ist definiert als das männliche Sexualhormon, dessen Funktion nicht nur im männlichen, sondern auch im weiblichen Organismus von nicht unwesentlicher Bedeutung ist (Durdiakova et al., 2011).



**Abb. 1.1 Testosteronbiosynthese und Regulation.**

**Bildmitte** Geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Mitochondrienmatrix. Ausgangspunkt der Synthese sämtlicher Steroidhormone ist das Pregnenolon **Rechter Bildrand** Das endoplasmatische Retikulum beherbergt alle weiteren Schritte der Testosteronbiosynthese, die als  $\Delta^5$ - oder  $\Delta^4$ -Syntheseweg ablaufen kann **Bild oben** Der LH- Rezeptor ist ein GPCR, der den cAMP-PKA-Signalweg aktiviert. Die Proteinkinase A vermittelt durch Phosphorylierung die Aktivierung der Testosteronbiosynthese für schnelle, kurzzeitige sowie langandauernde Veränderung der Synthesegeschwindigkeit. Abkürzungen: AC Adenylatcyclase, CREB cAMP response element binding protein, LH luteinisierendes Hormon RNA-Pol-II RNA- Polymerase II, StAR steroidogenic acute regulatory protein, (Quelle eigene Darstellung frei nach: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe, Köhrle, J, Petrides PE, S.865f., In: Biochemie & Pathobiochemie, Hrsg. Löffler, G, Petrides, PE, Heinrich PC, 2007).

### 1.1.9 Testosteronspiegel und Konzentrationsschwankungen

Entgegen peptiderger Hormone, die in der Zelle in größeren Mengen gespeichert werden, diffundieren Steroidhormone, wie auch das Testosteron, nach Synthese aus der Zelle und gelangen in das Blut. Dort werden sie in der Regel an die Plasmaproteinfraktion des Serums gebunden. Im Falle des Testosteron sind 97-98% des Sexualhormons an Plasmaproteine gebunden, in erster Linie an das Testosteron-bindende Globulin (TeBG) bzw. Sexhormon-bindende Globulin (*sex hormone binding globulin*, SHBG) und Albumin.

Laut Borst und Mulligan, 2007 liegt der Plasmatestosteronspiegel bei gesunden Männern im Bereich von 15,6nM bis 34,7nM (450-1000ng/dl) mit Mittelwerten um 23nM (650ng/dl).

Von diesen 23nM Testosteron verteilen sich etwa 44% auf das SHBG und 50% auf die Albumin-Fraktion. Der verbleibende Anteil fällt, mit fast zu vernachlässigenden 4%, auf das Kortikosteroid-bindende Globulin (*corticosteroide binding globulin*, CBG) und allein 2% verbleiben im Pool des freien Testosteron (Dunn et al., 1981). Als bioverfügbares und somit wirksames, aktives Testosteron wird neben den 2% des freien Testosterons auch das an Albumin gebundene Testosteron angesehen, das je nach Bedingung, ob im Krankheitsfall oder in Anwesenheit von Medikamenten etc., freigesetzt werden kann (Manni et al., 1985).

Die Testosteronspiegel im Plasma des männlichen Organismus, insbesondere bei Menschen, sind im Laufe des Lebens großen Schwankungen unterworfen. Gegen Ende der Schwangerschaft ist das Kind den Hormonen der Mutter ausgesetzt. Die hohen maternalen Östrogenspiegel bewirken niedrige Konzentrationen der kindlichen Gonadotropine.

Postpartal steigen, durch den Wegfall des hemmenden Effekts der mütterlichen Östrogene, die LH- und Testosteronkonzentrationen innerhalb der ersten Woche auf Werte nahe denen an, die während der Pubertät gemessen werden können (Quigley et al., 2002).

Die frühkindlichen LH- und Testosteronspiegel erreichen nach zwei Monaten ihr Maximum mit etwa 10nM (200-300ng/dL) für Testosteron (Gendrel et al., 1980; Amano T, 1985).

Vier bis sechs Monate nach Geburt fallen die LH- und Testosteronspiegel zurück auf niedrige, für die Kindheit typische Werte. Mit Beginn der Pubertät, zwischen dem 15. und 16. Lebensjahr, steigen die Testosteronlevel auf das Zwanzig- bis Dreißigfache an (Duke et al., 2014), um dann im voranschreitenden Erwachsenenalter über einen Zeitraum von Ende zwanzig bis Mitte achtzig (28.-85.Lebensjahr) langsam wieder abzunehmen (Dabbs, 1990).

Die absolute Abnahme des Serumtestosterons ist mit dem Alter aber relativ gering.

Als Mechanismen für die, im Alter abnehmende Bioverfügbarkeit des Testosteron werden zum einen auf der Ebene der Hoden ein zunehmender Sensibilitätsverlust der Leydig-Zellen für die steigenden LH-Spiegel (Tenover et al., 1987) sowie ein Anstieg der SHBG-gebundenen Testosteronfraktion diskutiert, die im Vergleich zum freien Testosteron und dem Albuminpool als nicht wirksames Testosteron gilt (Matsumoto, 1993).

Auch für die Männchen bei Ratten und Mäusen ist ein Schwanken der Testosteronspiegel von der Geburt bis hin zur Adoleszenz nachgewiesen worden (Lee et al., 1975). In den ersten 25 Tagen nach Geburt konnten hohe LH-Werte und Testosteronkonzentrationen um die 100ng/dl (3,5nM) gemessen werden. Zwischen dem 25.-30.Tag postpartal fielen diese auf ein Minimum ab, um dann zwischen dem 70. und 80.Lebenstag wieder auf maximale Werte der beginnenden Geschlechtsreife von zirka 230ng/dl (8nM) anzusteigen. Neben den Veränderungen der Testosteronlevel im Laufe des Lebens eines Mannes schwanken die Spiegel für Testosteron auch im Tages- und Jahresverlauf. Im Tagesverlauf unterscheidet man einen circadianen Rhythmus, also Testosteron-schwankungen bezogen auf 24 Stunden, von einem ultradianen Rhythmus, das sind Schwankungen der Testosteronspiegel in einem Zeitraum von weniger als 24 Stunden. Der ultradiane Rhythmus von Testosteron entspricht der pulsatilen Freisetzung von Testosteron alle 90 Minuten. Bezogen auf 24 Stunden ergibt sich ein Anstieg der Testosteronkonzentration über Nacht auf maximale Werte (675ng/dl; 23,4nM) in den frühen Morgenstunden (6:00-7:00Uhr), gefolgt von einer Abnahme der Testosteron -spiegel im Verlauf des Nachmittags und der frühen Abendstunden auf minimale Werte (464ng/dl; 16,1nM) zwischen 19:00-20:00Uhr (Lacerda et al., 1973; Dabbs, 1990).

## 1.2 Testosteron als Neuromodulator – Aromatisierungshypothese

Zu den charakteristischen Effekten von Testosteron gehören in erster Linie das Wachstum und die Differenzierung der männlichen Geschlechtsdrüsen und -merkmale sowie die Hypertrophie der Skelettmuskulatur. Neuromodulatorische Wirkungen werden weniger mit Testosteron assoziiert. Jedoch ist es bereits Pfaff und Pfaffmann, 1969 an Ratten gelungen zu zeigen, dass Testosteron die elektrische Aktivität von Neuronen der *Area praeoptica* und des *Bulbus olfactorius* nach elektrischer Stimulation (olfaktorischer Schock) oder Duftapplikation beeinflussen kann. Nach lokaler Applikation von Testosteron konnten sie eine Zunahme der elektrischen Aktivität präoptischer Neurone feststellen. Ähnliches gelang Yamada, 1979 ebenfalls an Nagetieren. Er untersuchte die Wirkung mehrerer Steroide wie Estradiol, Betamethason und Testosteron auf die Spontanaktivität hypothalamischer Neurone. Dabei konnte er zeigen, dass Testosteron, aber weder Estradiol noch Betamethason die Feueraktivität bestimmter, hypothalamischer Neuronen steigern konnte. Die Lokalisation der Testosteron sensiblen Neurone gelang Yamada ebenfalls. Die überwiegende Mehrzahl dieser Neurone konnte er zum *Nucleus septi lateralis* und dem anterioren Hypothalamus zuordnen. Der Nachweis eines vergleichbaren Effekts von Testosteron beschreiben auch Kendrik und Drewett, 1979, die die Refraktärzeit von

Neuronen der kortikalen, medialen Amygdala und des medialen, präoptischen Hypothalamus nach Kastration und anschließender Testosteronsubstitution untersuchten. Sie konnten einen rekonvaleszenten Effekt von Testosteron auf die, durch Kastration verlängerte Refraktärzeit der Neurone ermitteln. Zusammengefasst konnten diese frühen Studien bereits neuromodulatorische Eigenschaften für Testosteron nachweisen.

Für das weibliche Sexualhormon Estradiol sind diese neuromodulatorischen Eigenschaften schon lange akzeptiert. So ist beispielsweise bekannt, dass es in physiologischen und auch nicht physiologischen Konzentrationen eine Zunahme der Feueraktivität der GnRH-Neurone des anterioren Hypothalamus auslöst (Chu et al., 2009). Des Weiteren existiert bereits die Kenntnis über einer Verbindung zu den histaminergen Neuronen des TMN. Neben der bekannten Expression des Estrogenrezeptor  $\alpha$ , konnte unter Einsatz von Spannungsklemm-Versuchen im *whole-cell* Modus beobachtet werden, dass Estradiol den exzitatorischen Effekt von Histamin (HA) und NMDA auf Neurone des VMH verstärken konnte (Dupre et al., 2010, Kow et al., 2005).

Grund für die geringe Aufmerksamkeit der Forschung für Testosteron als Neuromodulator ist die weitverbreitete Aromatisierungshypothese. Darunter versteht man ursprünglich die, während der Embryonalentwicklung stattfindende Umwandlung von gonadalem Testosteron des männlichen Fötus im Gehirn zu Estradiol, das die Maskulinisierung des ZNS initiiert. Durch die Erweiterung des Forschungsfelds wird heute unter dieser Aromatisierungshypothese der Zusammenhang zwischen Testosteron und Estradiol bezeichnet, nachdem viele Testosteron Effekte indirekt durch Umwandlung zu Estradiol via des Enzyms Aromatase (CYP19) vermittelt werden. Sie spielt eine wichtige Rolle in der sexuellen Differenzierung des Gehirns, der Regulation der LH-Sekretion, dem männlichen Sexualverhalten und übernimmt zudem neuroprotektive Funktionen nach Hirnschäden z.B. bei Hirnischämie nach Schlaganfall (Roselli et al., 2009; Garcia-Segura, 2008). Das entsprechende Enzym, die Cytochrom-P-450-Aromatase (CYP19), ist in Fisch (Diotel et al., 2010), Vogel (Corfield et al., 2013), Säugetier (Rhesusaffen, Roselli und Resko, 2001) und Mensch (Sasano et al., 1998) zu finden und wird in vielen Körperzellen exprimiert wie z.B. den Gonaden, der Leber und dem Fettgewebe so auch im Gehirn. Wichtige Neuronengruppen im Gehirn umfassen in erster Linie den Hypothalamus und das limbische System (Amygdala) mit der medialen präoptischen Area/anteriorem Hypothalamus, VMH, BNST sowie kortikale (CA) und mediale Amygdala (MA) (Wu et al., 2009). Über die Expression der Aromatase im *Nucleus tuberomammillaris* ist bekannt, dass beispielsweise Rhesusaffen im entsprechenden Kerngebiet keine Aromatase exprimieren (RNA-in-situ-Hybridisierung; Roselli et al., 2001). In Untersuchungen an Mäusen existieren leider keine Daten zum TMN, aber für benachbarte Areale wie die LHA, den dorsalen präamillären Kern (PMD) und den *Nucleus arcuatus*, wo nur niedrige Expressionsraten festgestellt werden konnten (Stanic et al., 2014).

### **1.3 Androgenrezeptor und Signalkaskaden – Genomische und nicht genomische Wirkungsmechanismen**

Testosteron obliegt als Steroidhormon im klassischen Sinne die Regulation der Genexpression der Androgen sensiblen Gewebe. Dies wird über einen Liganden abhängigen Transkriptionsfaktor, den Androgenrezeptor (AR) vermittelt (Lubahn et al., 1988; Chang et al., 1988). Charakteristisch für diese „klassischen“ oder „genomischen“ Signalkaskaden ist die Beteiligung des Androgenrezeptor, die zeitliche Latenz zwischen Exposition und Zellantwort von mindestens 30-40 Minuten sowie Testosteronkonzentrationen im picomolaren bis niedrigen nanomolaren Bereich (1pM-1000pM) (Walker, 2009). Einen Überblick über die wichtigsten Schritte der „genomischen“ Androgenrezeptorsignalkaskade gibt die Abbildung 1.2, Bild Unten.

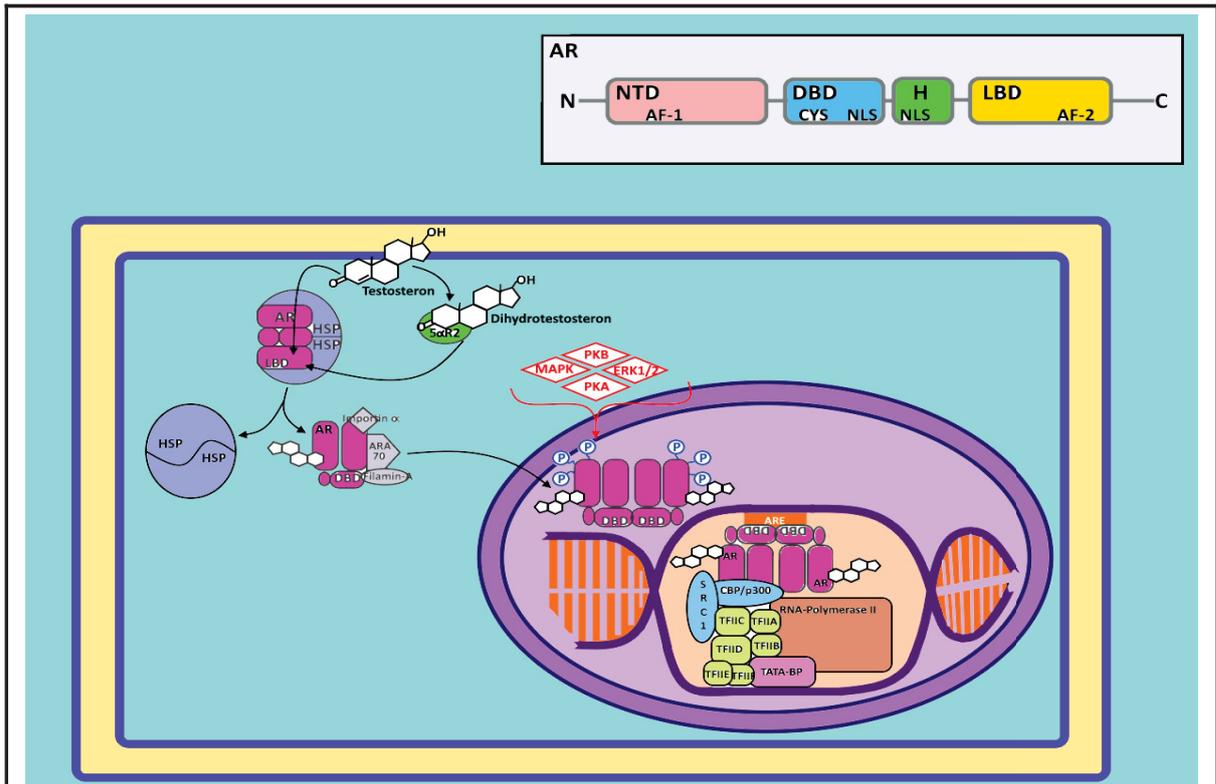
Die Effekte des Testosteron wie in der Funktion als Neuromodulator werden im Gegensatz dazu über die erst kürzlich beschriebenen „nicht klassischen“ oder „nicht genomischen“ Signalwege vermittelt. Diese nicht genomischen Signalkaskaden wurden zu erst von Szego und Davis, 1967 für Estradiol und später in den Achtzigern von der Arbeitsgruppe um Koenig et al., 1982 für Testosteron beschrieben. Beide konnten zelluläre Antworten auf die Steroidhormone innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten feststellen, die eine Beteiligung der Genexpression und der Proteinbiosynthese unmöglich machten (Michels und Hoppe, 2008). Das Wissen über nicht genomische Signalwege von Testosteron ist umfangreich (Reviews hierzu: Michels und Hoppe, 2008; Papadopoulou et al., 2008; Rahman und Christian, 2007; Foradori et al., 2008; Walker, 2009/2010).

Die endgültige Aufklärung über die zugrundeliegenden Mechanismen fehlt bisher allerdings. Charakteristisch für die nicht genomischen Androgensignalwege gilt die geringe zeitliche Latenz zwischen Exposition und zellulärer Antwort, der Ausgangspunkt der Signalkaskade von der Plasmamembran mit nicht obligater Beteiligung des AR sowie eine Unabhängigkeit des Signalwegs von der Translationsmaschinerie (Foradori et al., 2007).

Zentrale Signalmoleküle in den nicht genomischen Signalkaskaden des Testosteron sind Proteinkinasen (PKA, PKB, MAPK), Ionenkanäle sowie die Regulatorelemente der intrazellulären Kalziumkonzentration (IP3-Rezeptoren, VOCCs). Die Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über die möglichen und bereits bekannten nicht genomischen Signalwege des Testosteron, die kurz Erwähnung finden sollen.

So ist einerseits der SHBG-Rezeptor-Signalweg zu nennen. Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor wird auf vielen Testosteron sensiblen Geweben wie Prostata, Skelett- und Herzmuskel, Hoden und Nervenzellen, aber auch Krebszellen aus Prostata und Brustdrüse exprimiert. Eine Aktivierung des Rezeptors erfolgt erst nach Ligandenbindung an den SHBG-

SHBG-Rezeptor-Komplex (Rosner et al., 1991/1999, Hryb et al., 1990). Dies führt zur Initiierung eines  $G_{s\alpha}$ -Adenylatcyclase-cAMP-PKA-Signalwegs. Zielstrukturen der PKA sind Koaktivatoren des AR und der nukleäre Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (*nuclear inhibitor of protein phosphatase 1, NIPP-1*), der die Aktivierung der nukleären Proteinphosphatase 1 (PP- 1N) ermöglicht und den Phosphorylierungsgrad des AR moduliert. Der Effekt entspricht einem *feedforward* Mechanismus zur Potenzierung des genomischen AR-Signalweges (Michels und Hoppe, 2008). Weitere Zielstrukturen der PKA sind beispielsweise Ionenkanäle wie z.B. spannungsabhängige Kalziumkanäle der Plasmamembran (vgl. Abb. 1.3, Links Unten).



**Abb. 1.2 Androgenrezeptor und klassischer, genomischer Signalweg.**

**Oben grauer Kasten** Struktur des AR von N- nach C-terminal. Dargestellt sind die vier Funktions- und Strukturuntereinheiten des Androgenrezeptor mit den entsprechenden, für ihre Funktion notwendigen Aminosäuresequenzen. Abkürzungen: AF1/2 Aktivierungsfunktion 1,2, CYS Cysteinreste der Zinkfingerdomäne, DBD DNA-Bindungsdomäne, H hinge region, LBD Liganden Bindungsdomäne, NTD N-terminale Domäne, NLS Nuclear localization sequence

**Bild unten** Signalkaskade des genomischen Weges der klassischen Androgensignalkaskade. Zentrale Schritte sind 1. die Ligandenbindung (LBD) im Zytosol und die Freisetzung des AR aus dem HSP90-Komplex, 2. die Translokation des AR (NLS) entlang des Zytoskeletts in den Zellkern, 3. die Dimerisierung und Phosphorylierung des aktiven AR sowie 4. die DNA-Bindung (DBD) mit der Kofaktorbindung (SRC/p160, CBP/p300), Dekondensierung der DNA, Rekrutierung der RNA-Polymerase II und der notwendigen Transkriptionsfaktoren (Bennett, NC, et al., 2009; Gelmann, EP, 2002 ). Abkürzungen: ARA 70 AR associated protein 70, ARE AR response element, CBP/p300 CREB binding protein, ERK1/2 extracellular signal regulated kinase, HSP heat shock proteins, MAPK mitogen activated kinase, PKA/B Proteinkinase A/B, SRC1 steroid receptor coactivator 1, TFIIA-F Transkriptionsfaktoren IIA-F, (**Quelle** eigene Darstellung frei nach: Bennett, Nigel C.; Gardiner, Robert A.; Hooper, John D.; Johnson, David W.; Gobe, Glenda C. (2010): Molecular cell biology of androgen receptor signalling. In: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 42 (6), S. 813–827).



Die Beeinflussung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen ist ein weiterer nicht genomischer Testosteroneffekt. Dies erreicht Testosteron zum Beispiel an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im ZNS als agonistischer Ligand in Form des Neurosteroids 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (*Androstendiol, 3 $\alpha$ -diol*) (Reddy, 2004) oder an ATP abhängigen Kaliumionenkanälen (K<sup>+</sup>ATP- Kanäle) über die Abnahme der PIP<sub>2</sub>-Konzentration durch einen GPCR/G<sub>q</sub>/PLC $\beta$ /IP<sub>3</sub>-Signalweg (vgl. Abb. 1.3, Rechte Seite, von Ledebur et al., 2002; Loss et al., 2004).

Einer der verbreitetsten, nicht genomischen Effekte des Testosteron ist die Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Kalziumionen sind vielseitige Signalmoleküle mit ubiquitärem Einsatz in jeder wohl bekannten Zelle des Organismus. Der extrazelluläre Kalziumionenpool liegt bei etwa 2mM, der zur einen Hälfte an Albumin gebunden ist und zur anderen die Fraktion der freien Kalziumionen bildet. Als Mechanismen zum Eintritt in die Nervenzelle können spannungsabhängige Kalziumionenkanäle dienen (*voltage gated calcium channels, VOCCs*) wie L-Typ, N- oder P-/Q-Typ Kalziumionenkanäle. Als intrazelluläre Speicher dienen das glatte endoplasmatische Retikulum (*smooth endoplasmatic reticulum, sER*) oder das Korrelat in Muskelzellen in Form des sarkoplasmatischen Retikulums. Die Kalziumionenkonzentrationen liegen hier im mikromolaren Bereich. Die Freisetzung der Kalziumionen ins Zytosol erfolgt über die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren oder in Muskelzellen die Ryanodinrezeptoren. Daten zu Testosteron abhängigen Kalzium-Signalwegen stammen aus einer Vielzahl von Geweben. Beispiele sind die Prostata-Karzinom-Zellen (Steinsapir et al., 1991), männliche Osteoblasten (Lieberherr und Grosse, 1994), Makrophagen (Guo et al., 2002), murine T-Zellen (Benten et al., 1997), humane Granulosa-Lutein-Zellen (Machelon et al., 1998), Sertoli-Zellen von Ratten (Gorczyńska und Handelsman, 1995), Neuroblastomzellen (Estrada et al., 2006), GT1-7-GnRH-Neurone (Shakil et al., 2002), Nierenzellen von Kaninchen (Couchourel et al., 2004), glatte Muskelzellen aus Gefäßen (Hall et al., 2006) sowie Skelettmuskel- (Estrada et al., 2003) und Herzmuskelzellen (Vicencio et al., 2006) von Ratten.

Man unterscheidet AR unabhängige von AR abhängigen Mechanismen. Der Unterschied in den beiden Signalwegen liegt lediglich in dem Startpunkt. In Sertoli-Zellen oder GT1-7-Neuronen konnte zum Beispiel eine Beteiligung des Androgenrezeptor in der Initiation der Kalziumionenfreisetzung beobachtet werden (Hemmung des Effekts durch Flutamid).

In der Mehrzahl der Gewebe wie Skelett- und Herzmuskel oder Prostata-Karzinom-Zellen und Immunzellen wird von der Existenz eines neuartigen Membranrezeptors ausgegangen. Dieser entspricht einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, der ein G<sub>q</sub>-Protein binden kann. Abgesehen von diesen Unterschieden führen beide Wege entweder zu einem Einstrom von Kalziumionen von extrazellulär oder einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

Für den Einstrom aus dem Extrazellularraum ist zumeist eine Öffnung spannungsabhängiger

Kalziumionenkanäle, insbesondere der L-Typ Kalziumionenkanäle, verantwortlich.

Die Mobilisierung aus intrazellulären Depots beinhaltet die G<sub>q</sub>-Protein vermittelte Aktivierung der PLCβ, die IP<sub>3</sub> aus PIP<sub>2</sub> freisetzt, welches an die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren bindet und den Kalziumionenausstrom ins Zytosol bewirkt (vgl. Abb. 1.3, Rechte Seite).

Grundlage dieses Wissens ist die Forschung an der Dynamik des Kalziumionenhaushalts der entsprechenden Zellen mithilfe der Kalziumfluoreszenzdarstellung, dem *calcium imaging*. Die Weiterentwicklung und Optimierung dieser Methodik ist wesentlich von zwei Faktoren abhängig, der Entwicklung eines entsprechenden Indikatormoleküls und dem bildgebenden Verfahren zur Messung der Kalziumsignale. Zu den ersten Kalziumindikatoren gehörten das bioluminiszierende Protein *Aequorin* oder die chemischen Verbindungen *Fura2-AM* und deren Derivate, die auch in der hier vorliegenden Arbeit Anwendung gefunden haben.

Letztere sind eine Kombination aus einem Kalziumchelator-molekül und einem Fluorophor. Ihr Emissionsspektrum liegt im Bereich von 500nm Wellenlänge und ist stimulierbar durch Ultraviolettlicht. Nach Bindung von Kalziumionen verändert sich deren Emissionsspektrum und das damit emittierte Fluoreszenzsignal, welches entsprechend registriert werden kann. Vorteile sind die einfache Anwendung, die je nach Verbindung fehlende oder bestehende Permeabilität der Zellmembran sowie die unterschiedlichen Anregungsspektren, die die Kombination unterschiedlicher Indikatoren in einem Versuch möglich macht.

Für die Registrierung der Fluoreszenzsignale ist eine Apparatur aus einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit einer Ultraviolett-Lichtquelle im Sinne einer Halogenlampe und einem Videokamerasystem, meist einer CCD (*coupled charge detector*) Kamera, notwendig, die eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung der Signale erlaubt. Nachteil dieser Form des *calcium imaging* ist das relativ hohe Hintergrundrauschen und die je nach Inkubationstechnik ungenauere Zuordnung der Signale zu den untersuchten Zelltypen (Grienberger und Konnerth, 2012).

Abhilfe dafür stammt aus der Gentechnologie: genetisch veränderte Kalziumproteine, deren Expression zellspezifisch gesteuert werden kann. Ein Beispiel hierfür sind die genetisch kodierten Kalziumindikatoren (*genetically encoded calcium indicators*, GECIs), die zur Gruppe der so genannten genetisch kodierten Indikatoren neuronaler Aktivität, kurz GINAs (*genetically encoded indicators of neuronal activity*), gehören. Diese modifizierten Indikatormoleküle bestehen aus einer Bindungsdomäne für das zu detektierende Molekül, in diesem Fall Kalziumionen, sowie einer Detektordomäne, die über ein oder mehrere Fluoreszenzproteine verfügt und die Bindung des Zielmoleküls signalisiert.

Die Aufnahme der Fluoreszenzemissionen erfolgt über hoch moderne Mikroskoptechnik (Broussard et al., 2014, Grienberger und Konnerth, 2012). Ein häufig verwendetes GECl ist das genetisch veränderte Calmodulin. Calmodulin ist ein evolutionär konserviertes, ubiquitär vorkommendes Protein, das als Verstärker der Signalkaskade des *second messenger*

Kalziumionen fungiert. Es umfasst nur 148 Aminosäuren und bildet in der Tertiärstruktur eine Hantelform, die aus einer zentralen  $\alpha$ -Helix und den beiden Kalziumionen-Bindedomänen in Form von jeweils zwei EF-Hand oder Helix-Loop-Helix Motiven besteht. Pro Calmodulin Molekül können vier Kalziumionen gebunden werden.

Die Bindung der Kalziumionen führt zu einer Konformationsänderung des Moleküls, was eine Exposition hydrophober Aminosäurereste bewirkt und die Interaktion mit Zielmolekülen wie Proteinkinasen (z.B. Calmodulin-Kinasen), Kalziumionen-ATPasen, Kalziumionenkanälen oder den Motorproteinen der Kontraktionselemente ermöglicht (Chattopadhyaya et al., 1992, Clapham, 2007). Bei dem genetisch modifizierten Calmodulin handelt es sich um ein Einzelfluorophor-GECI, das zur Familie der GCaMPs gehört (GCaMP, *genetically encoded calmodulin proteins*). Diese bestehen aus einem zirkulären Fluoreszenzprotein, dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), das auf der einen Seite von Calmodulin und auf der anderen Seite von einem Calmodulin bindenden Peptid M13 der Myosin-Leichtkette-Kinase umgeben ist. Die Bindung von Kalziumionen am Calmodulin führt zu einer Interaktion zwischen Calmodulin und M13, was eine Konformationsänderung des Fluoreszenzproteins nach sich zieht und eine Veränderung des emittierten Fluoreszenzsignals herbeiführt. Diese Änderung des Fluoreszenzsignals kann über ein entsprechendes Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Mithilfe dieser GCaMPs ist man in der Lage Kalziumionenströme einer einzigen, spezifischen Zelle bis auf ein einzelnes Aktionspotential aufzuzeichnen (Broussard et al., 2014, Grienberger und Konnerth, 2012).

Die größten Probleme der ersten GCaMPs waren das zu geringe Signal:Hintergrund Verhältnis, geringe Photostabilität, geringe Kalziumionenaffinität sowie unzureichende Dynamik bei der Registrierung schneller Kalziumsignale, wodurch sie den herkömmlichen, synthetischen Kalziumindikatoren unterlegen waren. Erst die Entwicklung des GCaMP6 und dessen Derivate, die über eine, der neuronalen Transmission entsprechende räumliche und zeitliche Auflösung verfügen, ermöglichte die suffiziente Aufzeichnung von Kalziumionenströmen der Neurone (Chen et al., 2013, Tian et al. 2009). Ein Model für die Expression eines GCaMP6 in den HA Neuronen ist die in der Arbeitsgruppe Sergeeva gezüchtete B6;129S-Gt(ROSA)26Sortm-95.1(CAG-GCaMP6f)Hze/J Maus. Die Testosteron Wirkung wurde damit noch nicht untersucht.

## 1.4 Konditionelle Dopaminneurone (TMN und PMV)

Dopaminneurone sind definiert als Neurone, die die Tyrosinhydroxylase exprimieren (für Review-Artikel siehe Björklund und Dunnett, 2007). Laut Jaeger et al., 1983 gibt es im Hypothalamus, Hirnstamm und Rückenmark Neurone, die weder Tyrosinhydroxylase noch

Dopamin immunreaktiv sind, dies aber nach Exposition gegenüber Vorstufen wie L-DOPA werden können. Sie exprimieren die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) und den Dopamintransporter (DAT) und können so, nach Aufnahme von L-DOPA via dem DAT, mittels der AADC Dopamin synthetisieren und Aktionspotential abhängig freisetzen. Sie sind also dopaminerg, unter der Bedingung der L-DOPA Exposition, was sie zu konditionellen Dopaminneuronen macht (Zoli et al., 1993, De Luca et al., 2016).

### 1.4.1 Der PMV

Der ventrale präamilläre Kern (PMV) ist eine kompakte Zellgruppe mittelgroßer Neurone im Hypothalamus, die sich zwischen dem periventriculären Kern, dem dorsalen präamillären Kern (PMD) und nach kaudal den Kernen der Mamillarkörper (LMN/MMN) befindet (Gurdjian, 1927). Die Axone dieser Neurone bilden drei wesentliche Faserstränge, zwei aufsteigende und ein absteigendes Faserbündel. Das erste aufsteigende Bündel zieht mit dem Großteil der Fasern in den periventriculären Hypothalamus und bildet Synapsen mit dem periventriculären Kern, dem ARC, dem PVN und dem anteroventralen periventriculären Kern (AVPV) und steht somit mit dem neuroendokrinen Teil des Hypothalamus (GnRH-Neurone etc.) und der Adenohypophyse in Verbindung. Der zweite aufsteigende Faserstrang zieht durch den medialen Hypothalamus zum VMN, medialen präoptischen Kern (MPN), dem BNST, dem lateralen Septum (LS) und der Amygdala, mit in erster Linie dem medialen posterioren und posterior kortikalen Kern, wo er mit den Zentren der Regulation des Sexualverhalten und der Aggression kommuniziert. Das absteigende Bündel der Axone läuft zum posterioren Hypothalamus mit dem TMN, dem supramamillären und medialen mamillären Kern und zu weiteren Kerngebieten im Hirnstamm wie dem aquäduktalen Grau oder den *Nuclei raphe* (Canteras et al., 1992).

Der größte Teil der afferenten Fasern stammt vom medialen Kern der Amygdala (MeA), dem BNST, dem LS und dem MPN. Weitere Eingänge ziehen vom *Subiculum*, periventriculären Hypothalamus, ARC, VMN und diffuse Afferenzen aus dem posterioren Hypothalamus und supramamillären Kern zum PMV (Cavalcante et al., 2014). Zusätzlich bestehen direkte, synaptische Verbindungen zum TMN. Der PMV liegt im Bereich hoher bis moderater Dichte histaminerg Fasern (Panula et al., 1989).

Im Bezug auf die Neurotransmitter Expression stellt sich der PMV als sehr heterogener Neuronenverband dar. Die überwiegende Mehrheit der Neurone synthetisiert Glutamat. Häufige Kostransmitter sind Peptide wie Kokain und Amphetamin reguliertes Transkript (CART), Substanz P und der flüchtige Neurotransmitter NO (Expression der nNOS). Über den inhibitorischen Transmitter GABA verfügen die Neurone nicht (Donato und Elias,

2011). Des Weiteren exprimiert eine große Population der PMV Neurone den Androgenrezeptor in hohem bis sehr hohem Maße, was aus vielen Säugetierarten wie Ratte (Simerly et al., 1980), Hamster (Wood und Newman, 1999), Frettchen (Kashon et al., 1996), Opossum (Iqbal et al., 1995) und Affe (Michael et al., 1995) bekannt ist.

Explizite Daten zur Expression des Androgenrezeptor in PMV Neuronen der Maus sind bis dato nicht bekannt. Eine weitere Eigenschaft dieser Neurone ist die Fähigkeit zur Synthese und Freisetzung von Dopamin. Die Neurone des PMV exprimieren die AADC und die Mehrheit verfügt über keine Tyrosinhydroxylase (TH) Expression, weshalb sie keine echten Dopaminneurone sind (Karasawa et al., 1994). Diese Neurone sind jedoch in der Lage Dopamin aus Vorstufen wie L-DOPA zu synthetisieren. Grund dafür ist, neben der AADC, die Expression des DAT. Aufgrund dieser Fähigkeit werden sie zu den konditionellen Dopaminneuronen oder nach Jaeger zur D-Gruppe der Dopaminneurone gezählt (Jaeger et al., 1983, Zoli et al., 1993, De Luca et al., 2016).

Bezüglich ihres Aufgabenbereichs übernehmen die Neurone des PMV eine Schlüsselstellung in der Integration metabolischer und reproduktiver Signale. So vermitteln sie beispielsweise metabolische Signale via Leptin an die GnRH-Neurone zur Initiierung des präovulatorischen LH-Anstiegs im weiblichen Zyklus. Des Weiteren verbinden sie olfaktorische Signale mit Paarungsverhalten, Aggression oder Abwehrverhalten gegenüber Kontrahenten/Gefahren für den Nachwuchs im Sinne maternaler Aggression (Cavalcante et al., 2014, Donato und Elias, 2011).

## 1.5 Testosteron und *Arousal*

Sexualverhalten verbunden mit Reproduktion ist ein evolutionär manifestiertes Verhaltensregimen zur Weitergabe der Gene eines entsprechenden Individuums in die nächste Generation und somit ein Mittel der Arterhaltung wie auch der Unsterblichkeit, das im Reich der Lebewesen eine ubiquitäre Verbreitung hat. Im männlichen Geschlecht besteht das Sexualverhalten zum einen aus dem Werben um den weiblichen Geschlechtspartner, besonders imposant bei Vögeln, gefolgt von präkopulatorischen Verhaltensmaßnahmen oder dem sogenannten Vorspiel, das zum Beispiel bei Nagern aus dem Beschnupern der anogenitalen Region des Weibchens und dem Ausstoßen hochfrequenter Laute besteht (Hull et al., 2002). Dem, im Geschlechtsakt endenden Sexualverhalten geht üblicherweise eine sexuelle Erregung, *sexual arousal*, voraus. Die sexuelle Erregtheit ist ein, durch sexuelle Stimuli ausgelöster Zustand erhöhter Wachheit und Erregung mit der Bereitschaft zu sexuellen Handlungen (Janssen, 2011). Dieser Zustand des *sexual arousal*, der in dem Abrufen sexueller Verhaltensweisen mündet, umfasst vier Ebenen, eine kognitive, eine

motivationale, eine emotionale und eine autonome Ebene. Auf neuronaler Ebene entsteht der Zustand sexueller Erregung durch Zusammenspiel des lateralen orbitofrontalen Kortex (Kognitiver Aspekt: Reizerkennung), der *Insula* (Emotionaler Aspekt: sexuelle Lust), des kaudalen, anterioren *Gyrus cinguli* und dem Claustrum (Motivationaler Aspekt: Ausleben sexueller Gedanken/Begierden) sowie dem rostralen, anterioren *Gyrus cinguli*, Anteile der *Insula* und dem posterioren Hypothalamus (autonom/endokriner Aspekt: genitale Reaktionen etc.). Dieses System der sexuellen Erregung kann auf der kognitiven Ebene durch Abwerten sexueller Stimuli (medialer, orbitofrontaler Kortex/Temporallappen) sowie auf der autonomen Ebene durch Unterbindung der vegetativen Reaktionen gehemmt werden (*Caput nuclei caudati & Putamen*) (Stoléru und Mouras, 2007). Sexuelle Stimulation erhöht den Testosteronspiegel ebenso wie sexuelle Aktivität und sexuelles Verlangen mit erhöhten Testosteronkonzentrationen einher gehen (Escasa et al., 2010; Welling et al., 2008). Aus Untersuchungen an Mäusen (James und Nyby, 2002; Amstislavskaya und Popova, 2004; James et al., 2006) und Ratten (Shulman und Spritzer, 2014) ist bekannt, dass es bei den Männchen nach Kontakt mit brünstigen Weibchen oder deren Urin zu einem Anstieg der Plasmatestosteronkonzentration innerhalb von 30 Minuten nach Kontakt kommt. Eine Kastration führt zum Ausbleiben männlichen Sexualverhaltens wie Paarung, Erektion und Ejakulation, was durch anschließende Therapie mit Testosteron reversibel ist. Estradiol hat in der Hormonersatztherapie nach Kastration äquivalente Wirkung wie Testosteron, wohingegen die 5 $\alpha$ -reduzierten Testosteronderivate wie DHT keinen oder nur schwache Effekte zeigen. Daher ist anzunehmen, dass Testosteron an der Regulation und dem Ausleben von Sexualverhalten direkt sowie indirekt über Estradiol beteiligt ist. Die MPOA, als Zentrum für die Regulation von sexuell motiviertem Verhalten, exprimiert den Androgenrezeptor, den Estrogenrezeptor sowie die Aromatase (Handa et al., 1995). Testosteron und Estradiol stimulieren die Freisetzung von Dopamin aus der MPOA (Hull et al., 1997). Der zugrunde liegende Mechanismus ist eine Testosteron bedingte Induktion der Expression der nNOS. Neben der MPOA wirkt Testosteron auch auf die, in der VTA repräsentierte Belohnungsschleife des Sexualverhaltens. Erfolgreich in der Wiederherstellung der Kopulationsbereitschaft nach Kastration ist die Testosteronapplikation jedoch nur bei gleichzeitiger Injektion in die VTA und die MPOA (Sipos und Nyby 1996). Studien an Hamstern haben gezeigt, dass die mediale Amygdala (MeA) ebenfalls einen Angriffspunkt für Testosteron darstellt: die alleinige Testosteronapplikation in die MeA stellt das Sexualverhalten nach Kastration wieder her, ebenso wie die Stimulation der MPOA (Coolen und Wood, 1999; Wood und Williams, 2001). Einen konkreten Zusammenhang zwischen den durch Orexin/Hypocretin und HA Neuronen repräsentierten *Arousal* System des ZNS und den Sexualsteroiden im Rahmen der sexuellen Stimulation (*sexual arousal*) konnten Zhao et al., 2012 beobachten. In einem Feldversuch an

Mäusen konnten sie zeigen, dass Männchen bei der Anwesenheit eines Weibchens im, durch eine Glaswand getrennten Nachbarkäfig zu einer signifikanten Zunahme der Wachheit der Männchen führte. Weder die Exposition gegenüber einem anderen Männchen noch einem kastrierten Weibchen oder die hormonelle Kastration des betroffenen Männchens mittels Flutamid konnte eine entsprechende Zunahme des Wachheitszustands hervorrufen. Dies legt eine Abhängigkeit des *sexual arousal* von den Sexualsteroiden nahe. Darüber hinaus konnten Zhao et al. die orexinergen sowie histaminergen Neurone als Komponenten der *Arousal* Funktion im Rahmen der sexuellen Stimulation eindeutig identifizieren. Sowohl die Applikation eines Orexinrezeptorantagonisten als auch des Histaminsynthesehemmers  $\alpha$ FMH führten zu einem Ausbleiben der beobachteten Wachheitszunahme. Dabei scheint, dass den orexinergen Neuronen eine zentrale Rolle in dieser *Arousal* Funktion zukommt, da im *knock out* Modell allein bei der *Ox-KO* Maus ein Ausbleiben der sexuellen Erregtheit nachgewiesen werden konnte. Wie sich hier abzeichnet, ist die hormonelle Kontrolle der Kerngebiete des Sexualverhaltens komplex und bei weitem nicht ausreichend verstanden. Fakt ist, dass Testosteron sowohl für die sexuelle Stimulation (*sexual arousal*) als auch für das Ausleben von sexuellem Verlangen und Verhaltensweisen notwendig ist. Das System der Orexin/Hypocretin und HA Neurone scheint dabei im *sexual arousal* eine wichtige Zielstruktur androgener Signaltransmission zu sein. Der genaue Mechanismus steht jedoch noch offen.

## 1.6 Fragestellung

Amstislavskaya und Popova, 2004 konnten zeigen, dass sexuelle Stimulation (olfaktorisch: Pheromone, visuell: rezeptives Weibchen) bei Nagetieren zu einer Steigerung des Wachheitszustands sowie eines reflexiven Anstiegs der Plasmatestosteronspiegel führt. Aufgrund dieses Vigilanz steigernden Potentials im Rahmen sexueller Verhaltensweisen kommen die histaminergen Neurone des tuberomamillären Kerns (TMN) in Betrachtung. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe um JS Lin (Lyon) in Verhaltensexperimenten eine Beteiligung histaminergener und orexinergener Neurone am *sexual arousal* männlicher Mäuse nachweisen. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes haben wir uns der Bearbeitung folgender Fragen gewidmet:

- Welche Wirkung hat Testosteron auf die Aktivität der HA Neurone?
- Ist der Androgenrezeptor an der Testosteronwirkung beteiligt?

Darüber hinaus wurden in diesem Projekt weitere Fragen bearbeitet:

- Liegt dem Testosteroneffekt eine Kalziumantwort zugrunde?
- Wird der Androgenrezeptor in den histaminergen Neuronen des TMN, den konditionellen Dopaminneuronen des TMN und den Neuronen des PMV exprimiert?
- Ist das Alter von Relevanz bei dem Ausmaß des Testosteroneffekts auf die HA Neurone?

Der TMN ist bekannt für die vom Wachheitszustand des Organismus abhängige Feueraktivität seiner HA Neurone. Diese sind aktiv während Wachheit und inaktiv im Tiefschlaf (Haas et al., 2008). Eine Zerstörung bzw. eine Hemmung (über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten) dieser Neurone führt zum Überhang somnolenter Zustände und Hypersomnie (Lin et al., 1988). Der TMN ist damit ein wichtiger Kern des kortikalen *Arousal* und der Aufrechterhaltung der Vigilanz. Die von uns (De Luca et al., 2016) beschriebenen, konditionellen Dopaminneurone im TMN unterstreichen den bereits durch Yanovsky et al., 2011 postulierten Synergismus zwischen den histaminergen und dopaminergen Neuronen. Die unmittelbare Nachbarschaft und Verbindung der TMN Neurone zu einem großen Pool konditioneller Dopaminneurone im ventralen präamillären Kern (PMV, D8-Neurone, nach Jaeger et al. 1983/1984) kann für die Regulation des Metabolismus und des Sexualverhaltens von Bedeutung sein.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden überwiegend elektrophysiologische Methoden verwendet. Zum einen wurde die Aktivität akut isolierter HA Neurone sowie von Neuronen in Hirnschnitten in Spannungsklemm-Versuchen im *cell attached* Modus abgeleitet.

Darüber hinaus wurde mithilfe immunhistochemischer Verfahren die Androgenrezeptor Verteilung in den HA Neuronen des TMN, den konditionellen Dopaminneuronen des TMN und den Neuronen des PMV bestimmt. Als Modell für die HA Neurone diente hier die transgene HDC-Cre/Tmt-Reporter-Maus (HDC-Tmt), deren histaminerge Neurone durch die Verbindung des Histidindecaboxylase-Gens mit dem Gen des Tomatoproteins rot fluoreszierend markiert sind. Für die Kalziumfluoreszenzmessungen wurde einerseits auf den Kalziumchelator Fluo-4- AM zurückgegriffen und andererseits ein genetisch kodierter Kalziumindikator der GCaMP-Familie verwendet. Dabei konnte ein neues Mausmodell etabliert werden, das das GCaMP6f-Gen in den Cre positiven, histaminergen Neuronen des TMN (Yanovsky et al., 2012) exprimiert (HDC-GCaMP6f). Als Modell für die konditionellen Dopaminneurone des PMV diente die DAT-Cre/Tmt-Reporter-Maus (De Luca et al., 2016). Zuletzt galt es noch, einen relevanten Einfluss des Alters der untersuchten Tiere auf die Testosteronwirkung an den HA Neuronen festzustellen. Dazu wurden immunhistochemische Daten (AR-Färbung in 2 Altersklassen) im Vergleich mit Kulturen akut isolierter Neurone aus der Kernregion des TMN auf Mikroelektrodengittern (MEA) untersucht.

## Kapitel 2. Material und Methoden

### 2.1 Mauslinien

Für die elektrophysiologischen Ableitungen sowie immunhistochemischen Färbungen bezüglich der Expression des Androgenrezeptor, Histamin und Tyrosinhydroxylase wurden transgene Reporter-Mauslinien verwendet. Zur Verwendung kamen die DAT-Tmt und die HDC-Tmt-Reporter-Maus. Die DAT-Tmt-Reporter-Maus (Instituts-interne Bezeichnung: 9170) ist eine Kreuzung aus der DAT/Cre Maus (Parlato et al., 2006) mit der Reporter-Mauslinie B6J/N(Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAGtdTomato)) (Jackson Laboratory, #007908) (De Luca et al., 2016). Die HDC-Tmt-Reporter-Maus (Instituts-interne Bezeichnung: 9061) ist eine Kreuzung aus der HDC-Cre Maus (Instituts interne Bezeichnung: 7009) mit der Reporter-Mauslinie B6J/N(Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAGtdTomato)) (Yanovsky et al., 2012).

In den Versuchen zur Kalziumfluoreszenzmessung mithilfe des chemischen Kalziumchelators Fluo4-AM wurden C57Bl6 Mäuse verwendet. Im Rahmen der moderneren Kalziumfluoreszenzmessmethode mit der Verwendung von genetisch kodierten Kalziumindikatoren (GECIs) im Sinne der GCaMP-Familie wurde eine neue, transgene Mauslinie eingeführt, die das GCaMP6f-Gen in den histaminergen Neurone des TMN exprimiert (Linie 9272, HDC-GCaMP6f).

Die Gehirnentnahme erfolgte nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland sowie lokaler Richtlinien der Bezirksregierung Düsseldorf. Die Zahl der benötigten Tiere wurde so gering wie möglich gehalten. Die Tötung der Tiere mittels Dekapitation wurde ausschließlich durch Befugte (Frau Professor Sergeeva; Organentnahme Projekt: 058/91) vorgenommen. Die Tiere stammten aus der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben Düsseldorf (ZETT).

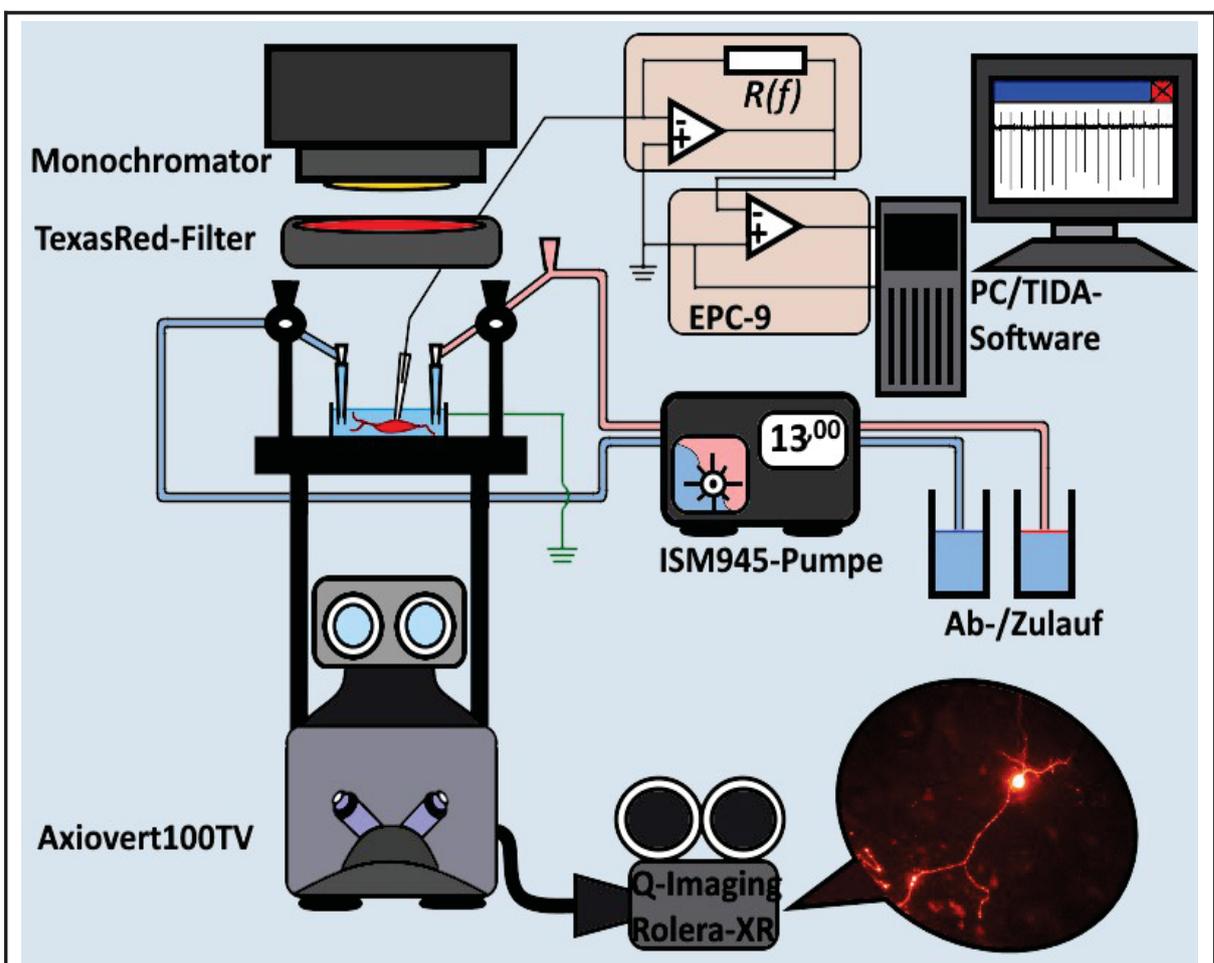
### 2.2 Spannungsklemm-Versuche (*Patch-Clamp*) an akut dissoziierten Neuronen des tuberomamillären Kerns (TMN)

Es wurden Gehirnschnitte aus dem Bereich des posterioren Hypothalamus von 23,3±5,4 Tage alten männlichen Mäusen unterschiedlicher Zuchtlinien hergestellt. Das Gehirn wurde aus der Schädelkalotte entnommen und in eisgekühlte Sucrose-Lösung (Sucrose 17,3g, Glucose 0,45g, NaHCO<sub>3</sub> 0,55g, 10xACSF-Lsg. ohne NaCl 25ml, deionisiertes H<sub>2</sub>O 250ml; 10xACSF-Lsg ohne NaCl (in mM): KCl 3,75, MgSO<sub>4</sub> 1,3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,25, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2) überführt. Nach Abtrennung des Kleinhirns und Hirnstamms von kaudal-okzipital wurden aus dem hinteren Anteil des Diencephalon in koronaler Schnittführung der posteriore



Die Ableitung der akut dissoziierten Neurone erfolgte als Extrazellärableitung im *cell attached* Modus. Es wurden Aktionspotentialströme (APS) gemessen. Dazu wurden Glaspipetten aus Filament Glaskapillarrohlingen (GB150F-8P; Science Products GmbH, Germany) mit einem durchschnittlichen Widerstand von  $5\text{M}\Omega$  ( $4\text{-}6\text{M}\Omega$ ) verwendet (Pipettenziehgerät/Puller, @Narishige, Japan).

Für die Ableitung wurden die Pipetten bis zu einem Drittel ihrer Länge mit HEPES gepufferter Lösung (HBS) gefüllt. Die Aufnahme der Aktionspotentialströme wurde mittels eines EPC-9-*Patch-Clamp*-Verstärkers und der Registrierungs-Software TIDA 5.2.1 (HEKA Electronics) sichergestellt. Die Visualisierung der Neurone erfolgte in 400facher Vergrößerungen durch ein ZEISS-Mikroskop AXIOVERT 100TV in Kombination mit der Fluoreszenzlicht sensiblen Videokamera *Q-Imaging-Rolera-XR Fast 1094* (Chromaphor Analysen GmbH, Germany).



**Abb. 2.2 Versuchsaufbau der Spannungsklemm-Versuche.**

Inverses Lichtmikroskop (Axiovert 100TV, ZEISS) mit Normallicht- und Fluoreszenzlichtfunktion. Monochromator HBO100 und Filterset mit den Anregungsmaxima 488nm (FITC = Fluoresceinisothiocyanat) und 540nm (Texas Red). Objektive mit 40X-Vergrößerung. Auf dem Mikroskopiertisch Messkammer mit Perfusionssystem (Zulauf(rot)/Ablauf(blau)) angetrieben durch die Perfusionspumpe vom Typ ISM945 (ISMATEC®). Perfusionsgeschwindigkeit 1,6-1,7ml/min (Stufe 13). Applikation manuell über einen Einspritzlauf oder via Einlauf des Perfusionssystems. Messung der Aktionspotentialströme (APS) mittels EPC-9-*Patch-Clamp*-Verstärker und Registrierungs-Software TIDA 5.2.1 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Germany). Visualisierung der Neurone über die Videokamera *Q-Imaging-Rolera-XR Fast 1094* (Chromaphor Analysen GmbH, Germany) mit der *Imaging-Software Q-Capture*, (Quelle: eigene Darstellung).

Die Fluoreszenzlichtfunktion wurde durch eine Halogenlampe HBO100 als UV-Lichtquelle und ein Filterset mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)- und Texas Red-Filter sichergestellt. Dem Hintergrundrauschen wurde mittels Tiefpassfilter (FR212, Schaffner) und Faradayschen Käfig begegnet (vgl. Abb. 2.2). Die dissoziierten Zellen wurden in die, mit 1ml HBS gefüllte Messkammer pipettiert und für eine viertel Stunde sedimentieren lassen. Histaminerge Neurone wurden morphologisch (Durchmesser ca. 15-25µm, spindelförmig) oder mittels Fluoreszenz (HDC-Tmt Mäuse) detektiert. Die abschließende Identifizierung abgeleiteter Zellen erfolgte durch die Applikation von R- $\alpha$ -Methylhistamin (RAMH, 2µM), was sich im Falle eines HA Neurons an einer Abnahme der Spontanfeuerfrequenz zeigte (Sergeeva et al. 2010, Haas und Panula, 2003). Die Zellen wurden nach Erreichen eines Gigaseals (Widerstand R im Gigaohmbereich) und konstanter Spontanaktivität im *voltage clamp* Modus des EPC-9-Verstärkers abgeleitet. Es wurden die Aktionspotentialströme für mindestens 5 Minuten Äquilibrierungszeit in HBS, gefolgt von einer fünfminütigen Phase der Testosteronwirkung und 15 Minuten Waschphase in HBS aufgezeichnet. Der Effekt von RAMH wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten Applikation und fünfzehnminütiger Waschphase in HBS beobachtet.

Analog erfolgte die Ableitung histaminergener Neurone an Hirnschnitten der HDC-Tmt Maus. Die Präparation der Schnitte erfolgte in kontinuierlich mit Carbogen (5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>) inkubierter, eisgekühlter, artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, in mM: Sucrose 202, Glucose 12, NaHCO<sub>3</sub> 26, KCl 3,75, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O 1,25, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 1,3, CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O 2, pH 7,4). Alle weiteren Vorbereitungsschritte, die Ableitungen und die Füllung der *Patch* Pipetten wurden in ACSF mit 125mM NaCl anstatt 202mM Sucrose durchgeführt. Die Datengewinnung erfolgte *offline* mit der Software TIDA 5.2.1 (HEKA, Electronics, Germany). Es wurde die Anzahl der Aktionspotentialströme (Spikes pro Minute) mithilfe des Programms *MiniAnalysis 6.0.3* (Synaptosoft, Leonia, NJ) analysiert.

## **2.3 Kalziumfluoreszenzmessungen (*calcium imaging*): Messung von Kalziumionenströmen in Kulturen dissoziierter Nervenzellen des TMN in Abhängigkeit von KCl/Testosteron**

Kalziumfluoreszenzmessungen wurden an Kulturen dissoziierter Neurone des TMN durchgeführt, die auf Polyethylenimin(PEI) beschichteten, optischen Gläschen gepflanzt waren. Details zur Gewebepräparation ist dem Abschnitt 2.4 zu entnehmen.

Als Gewebematerial dienten 0-3 Tage alte, männliche Tiere (n = 5) der Mauslinien 9061 und 1397. Als Kalziumindikator wurde Fluo-4-AM (Acetoxymethyl) von invitrogen ® verwendet.

Die Kulturen wurden ab einer Kulturzeit von im Mittel  $15 \pm 5$  Tagen untersucht. 3-7  $\mu$ l Fluo-4-AM wurden auf 1ml MV10-Nährlösung verdünnt und eine Kultur damit für 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ -Gehalt, 95% Luft und 80-90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in HEPES gepufferter Lösung (HBS) wurden die Kulturen mit temperiertem HBS ( $34^\circ\text{C}$ , Temperature Controller TC20) perfundiert (Perfusionsgeschwindigkeit 1,6ml/min).

Die Kalziumfluoreszenzmessungen erfolgten mit einem Weitfeldfluoreszenzmikroskop (AXIOVERT100TV, ZEISS). Als Lichtquelle diente eine HBO50-Halogenlampe (ZEISS). Als Filtersystem wurde ein FITC-Filter (Anregungsmaximum 488nm) verwendet.

Die Detektion der Fluoreszenzemissionen der Zellkulturen wurde durch eine CCD-Kamera (Photonics) sichergestellt. Die Datenaufnahme und Visualisierung erfolgte mit der Software „Vision“ (Photonics) (vgl. Abb. 2.3). Als Messparameter galt die Änderung des Fluoreszenzsignals  $\Delta F$  der Kulturen in HBS, nach Applikation von 30mM Kaliumchlorid ACSF (in mM: NaCl 98,75, Glucose 12,  $\text{NaHCO}_3$  26, KCl 30,  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,3,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2, pH 7,4) und nach Gabe von  $1 \mu\text{M}$  Testosteron/DMSO-Lösung.

Das Aufnahmeprotokoll für die Versuche mit Kaliumchlorid umfasste 60 Sekunden (s) in HBS als Kontrollphase zur Bestimmung der basalen Fluoreszenzemission, gefolgt von 240s (4 Minuten) für die KCl Applikation und 960s (16 Minuten) Waschphase nach KCl Gabe.

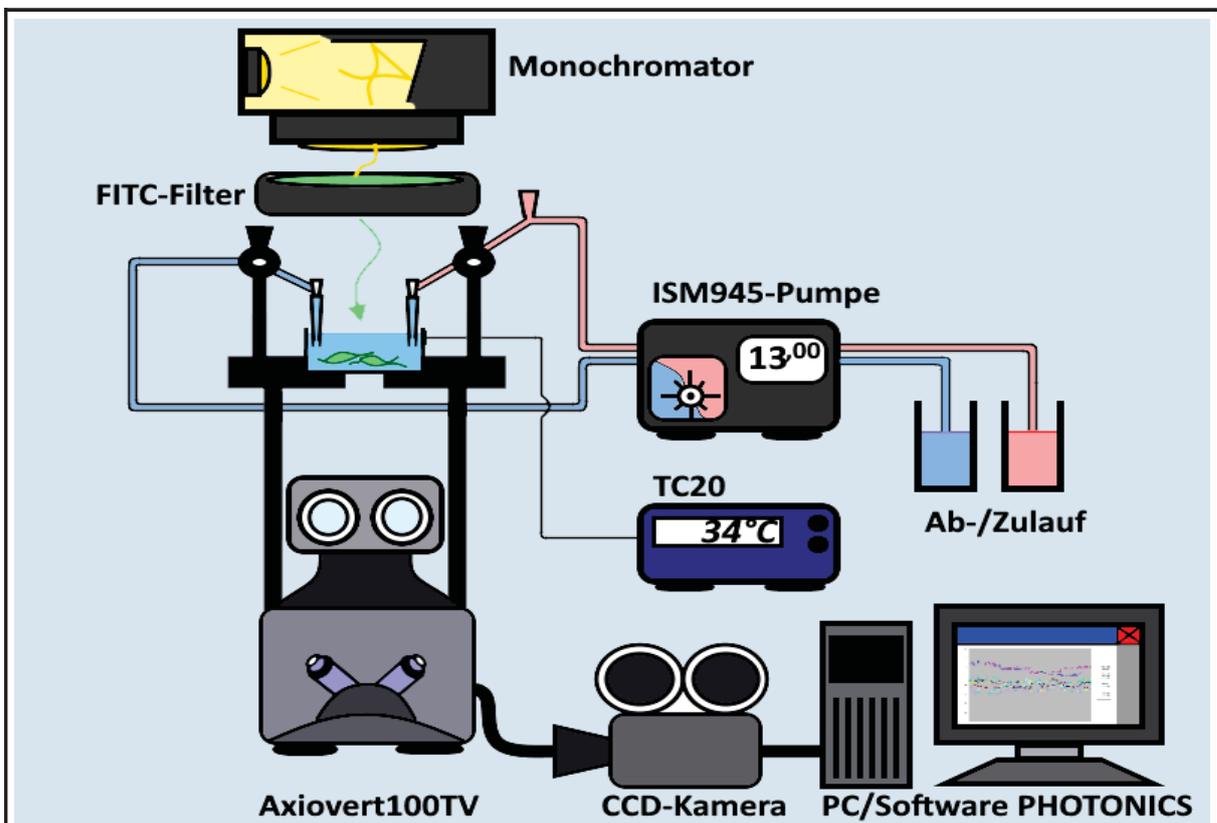
Für die Untersuchung der Wirkung von Testosteron ( $1 \mu\text{M}$ ) wurden neben einer Kontrollphase von 60s, 300s (5 Minuten) Applikationsphase und 1500s (25 Minuten) Waschphase angesetzt. Es wurde die Änderung der Fluoreszenzemission pro Zeiteinheit und damit die Veränderung des intrazellulären Kalziumionenspiegels im Versuchsverlauf in den als *region of interest* (ROI) markierten Nervenzellen der Kulturen in Abhängigkeit von Kaliumchlorid und Testosteron analysiert. Kaliumchlorid diente dabei als Standardsubstanz für Kalzium abhängige Membrandepolarisation von Nervenzellen durch Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran für Kalziumionen über *voltage gated calcium channels* (VOCCs).

Typisches KCl Protokoll für die Kalziumfluoreszenzmessungen beschrieben Barreto-Chang und Dolmetsch, 2009 oder Ratz et al. 2005. Der Testosteroneffekt auf den intrazellulären Kalziumspiegel wurde zum einen als *baseline* korrigierte, durchschnittliche Änderung der Fluoreszenzemission ( $\Delta F$ ) und zum anderen als Anteil der Änderung der Fluoreszenzemission nach KCl (30mM) (*percentage of  $\Delta F(\text{KCl})$* ) angegeben.

Als Alternative zu dieser Methode des *calcium imaging* wurde auf eine kürzlich, in dem Review-Artikel von Broussard et al., 2014 beschriebene Methodik der Verwendung von genetisch kodierten Indikatoren für Nervenzellaktivität (GINAs) zurückgegriffen.

Für die Darstellung von Kalziumionenströmen stehen die genetisch kodierten Derivate des Calmodulin (CaM), die sogenannten GCaMPs, zur Verfügung. Es existiert eine Vielzahl von GCaMP Genprodukten, die sich in der Kinetik der Darstellung der Kalziumionenströme unterscheiden. Das hier verwendete GCaMP6f ist ein schneller Kalziumindikator, der in der

Lage ist, ein einzelnes Aktionspotential aufzuzeichnen (vgl. Chen et al., 2013). Zur Kombination des Kalziumindikators mit den Zielzellen stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen, wie in Chen et al., 2013 beschrieben, mithilfe viraler Transfektion, der in das Virusgen inserierten Gensequenz des Kalziumindikators. Eine andere Möglichkeit besteht in der Zucht einer entsprechenden transgenen Mauslinie. In der Arbeitsgruppe Sergeeva wurde eine GCaMP6f Maus (B6;129S- Gt(ROSA) 26Sortm95.1(CAG-GCaMP6f)Hze/J) mit einer HDC-Cre Maus gekreuzt (Yanovsky et al., 2012). Die resultierende transgene GCaMP6f+/Cre+ Mauslinie verfügt über die Kombination des GCaMP Gens mit der Gt(ROSA)26Sor-Promotor-Einheit und einem Cre-Rekombinase Gen. Die Neurone dieser Mauslinie exprimieren das GCaMP6f und emittieren ein Fluoreszenzsignal nach Kalziumionenbindung an das Calmodulin. Dies ermöglicht die visuelle Detektion von Kalziumionenströmen mit hoher räumlicher, im Sinne einer einzelnen spezifischen Zelle, sowie hoher zeitlicher Auflösung im Bereich bis auf ein einzelnes Aktionspotential.



**Abb. 2.3** Versuchsanordnung der Kalziumfluoreszenzuntersuchungen (*calcium imaging*).

Weitfeldmikroskop (AXIOVERT100TV) mit Perfusionssystem (Applikationskapillare und Zulauf (rot, rechts) sowie Ablauf (blau, links)) und Messkammer mit optischem Gläschen.

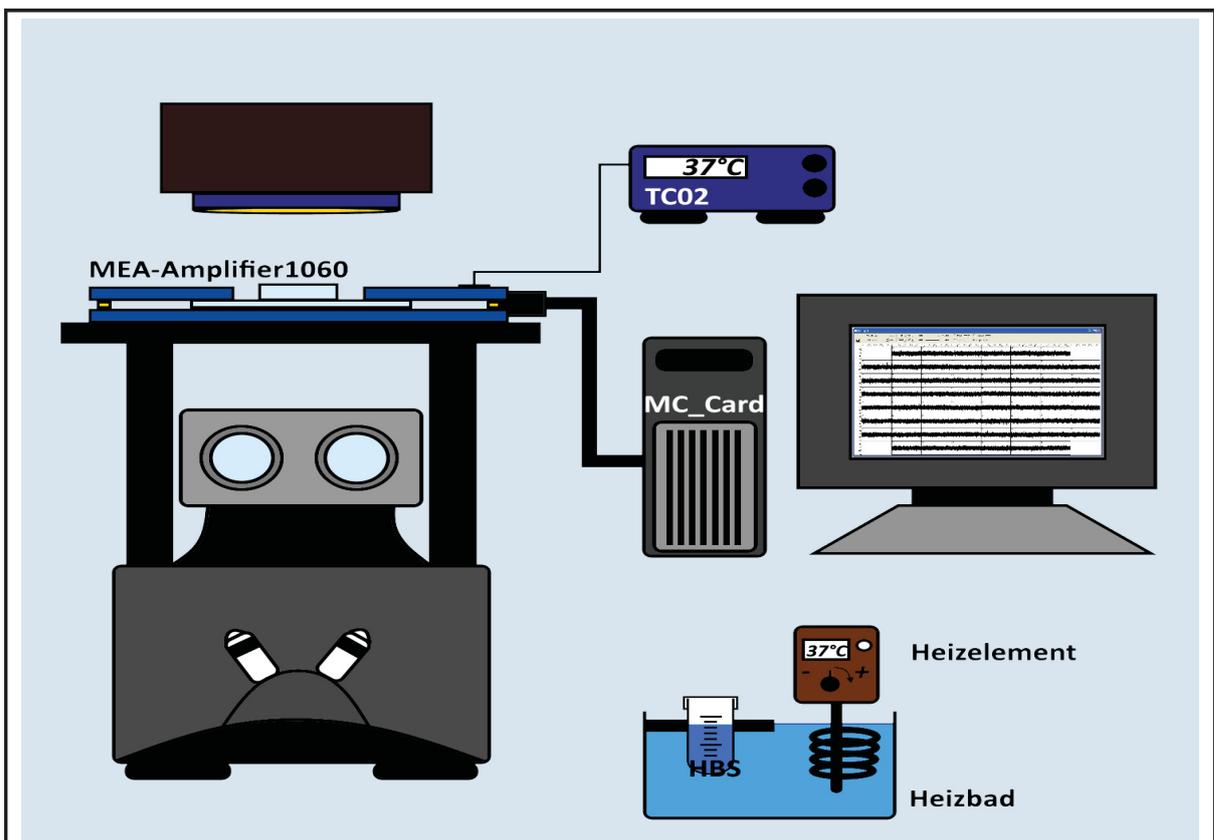
Perfusionspumpe ISM945 mit Perfusionsgeschwindigkeit von 1,6ml/min. Heizung der Messkammer über die Temperaturregulatoreinheit TC20 auf konstante 34°C.

Optisches System aus HBO50-Halogenlampe, Monochromator mit FITC-Filter und 20X-Objektiv. Detektion der Fluoreszenzemission über CCD-Kamera und Vision-Software (Datengewinnung & -darstellung) von PHOTONICS, (Quelle: eigene Darstellung)

## 2.4 Ableitung von Kulturen dissoziierter Neurone des TMN auf Mikroelektrodengittern (*microelectrode array, MEA*)

Zur Vorbereitung auf die Kultur wurden die Mikroelektrodengitter (MEA) mit deionisiertem Wasser gründlich gewaschen und anschließend für mindestens zwei Stunden in einer 3%igen Natriumbleichlauge/Kaliumhydroxid-Lösung ((in ml): NaClO/KOH 24, deionisiertes H<sub>2</sub>O 800), inkubiert. Nach gewissenhaftem Spülen mit deionisiertem Wasser (zirka 22X) wurden die MEA in einem schonenden Reinigungsprogramm autoklaviert (Tischautoklav Systemec 2540E, Programm 6 bei 134°C, 1Minute). Im Falle einer Kontamination aus vorheriger Kultur (bakteriell, viral, mykotisch) wurde das entsprechende MEA vorerst für bis zu 15 Minuten mit einer bakteriziden, virusziden und antimykotischen Lösung (FERMACIDAL\_D2®, IC Products, CH) behandelt. Nach erfolgreichem Autoklavieren wurden die MEA unter einer Sterilbank für 30 Minuten getrocknet. Die Beschichtung der MEA erfolgte dann mit 1%iger PEI Lösung (Polyethylenimin 400mg, steriles H<sub>2</sub>O 200ml) über Nacht. Am nächsten Tag folgte das Entfernen des überschüssigen PEI mit sterilem H<sub>2</sub>O und das Sterilisieren der MEA unter UV-Licht (UV-Lichtfunktion der Sterilbank, ScanLaf, LaboGene). Die Zellen der Kulturen dissoziierter Neurone aus der Region des TMN stammten ausschließlich von männlichen, neugeborenen C57Bl6 Mäusen (P0-3; n = 32) unterschiedlicher Zuchtlinien (inkl. 1303, 1397, 1524, 7009, ZETT Düsseldorf). Zur Zellgewinnung wurden koronale Hirnschnitte des posterioren Hypothalamus (vgl. Abschnitt 2.2, Abb. 2.1) in Phosphat gepufferter Lösung (PBS, (in ml): Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X 20, steriles H<sub>2</sub>O 180) konserviert und anschließend die Abschnitte der höchsten Dichte an HA Neuronen mittels Skalpell abgetrennt und zerkleinert. Danach wurde das Gewebe mit Trypsin (1 Aliquot: 0,05% Trypsin + EDTA 1X + Phenolrot, invitrogen®) für 20 Minuten bei 37°C enzymatisch verdaut. Nach Waschen mit PBS und MV10-Nährmedium ((in ml): Minimum Essential Medium 1X (MEM) 43, Fetal Bovine Serum (FBS) 5, HEPES 1,0M 0,5, Glucose 60% 0,5, Glutamin 200nM 0,5, Insulin 0,1U/ml 0,5) wurde die Gewebeprobe in 400µl MV10-Nährlösung überführt und für 4 Minuten bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R). Nach dem Zentrifugieren wurde das entstandene Zellpellet in 30µl MV10-Lösung gelöst und je nach Anzahl der verwendeten Mäuse auf ein oder zwei MEA im Zentrum derer Kulturkammern aufgetragen. Die Inkubation der MEA Kulturen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) unter folgenden Kulturbedingungen: Luftfeuchtigkeit 80-90%, Temperatur 37°C (36,9°C-37,1°C), CO<sub>2</sub>-Konzentration 5% (4,9-5,1%), Luft 95%. Vier Stunden nach Kulturanlage wurden die Kulturkammern der MEA unter sterilen Bedingungen mit 1-2ml (1,6ml) temperierter (37°C) MV10-Lösung aufgefüllt.

Die Pflege der Kulturen bestand im Aufrechterhalten der hohen Luftfeuchtigkeit des Inkubators und dem Wechsel des MV10-Nährmediums nach Indikatorumschlag. Die Ableitung der MEA Kulturen erfolgte mit einem MEA60-System der Firma MultiChannelSystems (MCS, Reutlingen Germany) (Abb. 2.4). Die verwendeten MEA (Typ 200/30iR-Ti-gr) hatten folgende Maße: Zahl der Mikroelektroden 60, Zwischenelektrodenabstand 200µm, Mikroelektroden-Durchmesser 30µm, Elektrodenmaterial Titan, interne Referenzelektrode (iR) und Glasring (gr) als Kulturkammer mit variablem Durchmesser und Höhe. Es wurden extrazelluläre Stromänderungen pro Zeiteinheit gemessen. Die Datengewinnung erfolgte mittels des MEA1060-Verstärkers, die -speicherung und -visualisierung durch die MC\_Rack-Software. Die Ableitung der MEA wurde in Magnesium freier HEPES gepufferter Lösung (HBS) bei einer Umgebungstemperatur von durchschnittlich 37°C (Temperatur-Kontrollelement Temperature Controller TC02) und einer Kulturzeit von im Mittel 15±6 Tagen durchgeführt. Das Wachstum und die Vitalität der Kulturen wurde mithilfe eines inversen Lichtmikroskops von LEICA in 100 bis 200facher Vergrößerung beurteilt.



**Abb. 2.4 Versuchsaapparatur (Setup) der Ableitungen an Mikroelektrodengittern (MEA).** MEA60-System mit MEA1060-Amplifier und eingespanntem MEA vom Typ 200/30iR-Ti-gr. TC02 Temperaturkontrollelement für das Aufrechterhalten konstanter Temperaturen um 37°C im Versuchsverlauf. Datenübermittlung an die MC\_Card mit MC\_Rack-Software zur Speicherung und Darstellung der Stromänderungen an den einzelnen Kanälen. Beobachtung und Kontrolle des Wachstums und der Qualität der Kulturen mittels LEICA-Mikroskop (10X/20X-Objektiv). Aufbewahren der Testsubstanzen bei +4°C. Anwärmen des Magnesium freien HBS auf 37°C im Wasserbad, (**Quelle:** eigene Darstellung)

Zur Ableitung der MEA wurde das MV10-Nährmedium durch Magnesium freies HBS ersetzt und eine Äquilibrationszeit von 20 Minuten abgewartet. Bei Vorliegen deutlicher Aktivität und geringem Hintergrundrauschen in mindestens 5 bis 10 Kanälen wurde mit der Aufnahme begonnen. Für jedes MEA wurden 10 Minuten Kontrollphase zur Bestimmung der Grundaktivität der Kanäle aufgenommen. Darauf folgten 7 Minuten Applikation der Testsubstanz Testosteron und 10 Minuten Waschphase. Zur Identifizierung histaminerner Neurone diente auch in diesem Fall die Applikation von 2µM RAMH. Dazu wurden 7 Minuten für die Applikation und mindestens 10 Minuten für das Waschen nach RAMH angesetzt. Die Analyse der Daten erfolgte *offline* mithilfe der Software „SpAnNer XBD 3.5“ (Medizinische Analysetechnik Result GmbH, Düsseldorf, Germany). Es wurde jeder einzelne, aktive Kanal nach der Anzahl der Potentialänderungen (*spikes*) pro Minute ausgewertet. Dabei wurden ausschließlich Kanäle mit signifikanter Abnahme der Spontanaktivität nach Applikation von RAMH in die Auswertung einbezogen.

## 2.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen der HA Neurone des tuberomamillären Kerns wurden an HDC-Tmt Mäusen (Linie 9061, ZETT) durchgeführt (Yanovsky et al., 2012; Walker et al. 2013). Die Hirnschnitte zur Darstellung dopaminhaltiger Nervenzellen im posterioren Hypothalamus stammten von DAT-Tmt Mäusen (Linie 9170, De Luca et al., 2016) (vgl. Tabelle 2.5.1). Pro Maus wurden dabei ein bis zwei 400µm dicke, koronale Hirnschnitte aus dem okzipitalen Diencephalon (posteriorer Hypothalamus) angefertigt.

HDC-Tmt	
Gruppe 1: Juvenil	Gruppe 2: Adult
9061/P10/♂	9061/P40/♂
9061/P12/♂	9061/P29/♂
9061/P10/♂	9061/P30/♂
9061/P10/♂,19/03/17	9061/P170/♂
9061/P10/♂,19/03/17	9061/P171/♂
9061/P10/♂,01/09/17	
9061/P12/♂,01/09/17	
DAT-Tmt	
9170/P20/♂, 15/01/17	
9170/P20/♂, 22/02/17	
9170/P24/♂, 03/03/17	
9170/P24/♂, 03/03/17	

**Tabelle 2.5.1:** Mauslinien für die immunhistochemischen Färbungen

Die Fixierung der Schnitte wurde in etwa 5ml EDAC Lösung (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, (in mg): EDAC 400, N-Hydroxysuccinimid 20 + 0,1M PB 9ml) über Nacht bei +4°C durchgeführt. Es folgte eine zweite Fixierung am folgenden Morgen in 4%iger PFA Lösung (Paraformaldehyd, PFA 4/16mg + 0,1M PB 100/400ml) für einen Zeitraum von 30min bei +4°C. Zuletzt wurden die Schnitte in 20%iger Sucrose-Lösung (Sucrose (Saccharose) 40mg+0,1M PB 200ml) überführt und bei wiederum +4°C für mindestens 30min bzw. bis zum vollständigen Absinken der Schnitte auf den Boden des verwendeten Gefäßes inkubiert. Das Schneiden der nun fixierten, 400µm dicken, koronalen Hirnschnitte erfolgte durch ein Gefriermikrotom (LEICA SM 2000R, LEICA) in Dünnschnitte mit einer Dicke von 25µm. Diese wurden anschließend in, mit 0,1M PB (phosphate buffer, (in g): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 28,8/22,97, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 5,2 + deionisiertes H<sub>2</sub>O 2L) gefüllten Mikrowell-Platten überführt, wobei auf die Einhaltung ihrer anatomischen Lage zueinander geachtet wurde. Die Dünnschnitte wurden anschließend auf, mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträgern (Gelatine 1,5g + deionisiertes H<sub>2</sub>O 72ml, Chrom-(III)-Kaliumsulfat -Dodecahydrat 0,1g + deionisiertes H<sub>2</sub>O, Ethanol 95% 30ml) aufgezogen. Für ein optimales Haften der Schnitte an der Objektträgeroberfläche musste die Beschichtung mit der Chromalaun-Gelatine mindestens 1 bis 2 Tage vor dem Aufziehen der Schnitte abgeschlossen sein. Vor dem Auftragen auf die Objektträger wurden die Dünnschnitte in *mounting solution* ((in ml): Gelatine 1g, 0,1M PB 100, Ethanol 100% 100, deionisiertes H<sub>2</sub>O 1000) aufbewahrt, wodurch ein ebenes und sauberes Haften der Schnitte an der Objektträgeroberfläche sichergestellt werden konnte. Die Übertragung auf die Objektträger erfolgte mit einem dünnen, weichen Haarpinsel (Faber Castell) und einer Plastik-Pipette. Dabei wurde versucht die korrekte, anatomische Folge der Schnitte von rostral nach okzipital möglichst einzuhalten. Es wurden maximal drei oder vier Schnitte pro Objektträger aufgetragen. Die abschließende Beschriftung des Objektträgers umfasste neben der Mauslinie, das Geschlecht, Alter, Datum der Anfertigung, die Fixierung, die Gehirnregion und Schnittnummer in Zahlen und Buchstaben. Das Antrocknen der Schnitte erfolgte bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei +4°C gelagert, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern. Die Färbung der koronalen Hirnschnitte erfolgte nach der indirekten Methode unter Nutzung eines Primär- sowie eines Sekundärantikörpers. Für die Schnitte der HDC-Tmt Mäuse galt es, die Expression des Androgenrezeptor in den Nervenzellen des tuberomamillären Kerngebietes darzustellen, wobei folgendes Färbungsprotokoll zur Anwendung kam. Die Schnitte wurden zunächst drei Mal in 0,01M PBS-T (phosphate buffered saline + triton, (in ml): NaCl 9g, 0,1M PB 100, Triton-X-100 8, deionisiertes H<sub>2</sub>O 1000) für maximal 15 Minuten gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper bei +4°C über Nacht inkubiert. Es wurde ein polyklonaler Anti-Androgenrezeptor-Antikörper verwendet (Tabelle

2.5.2). Jeder Objektträger wurde dabei mit etwa 50-100µl Antikörperlösung benetzt. Nach abgeschlossener Inkubation folgte ein weiteres, dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS-T. Zur Darstellung der, durch den Primärantikörper markierten Androgenrezeptoren wurde als Sekundärantikörper ein entsprechender in Tabelle 2.5.2 aufgeführter Antikörper verwendet. Der Sekundärantikörper wurde in PBS-T in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt (vgl. Tabelle 2.5.2). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtverschluss für 90 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte drei Mal in 0,01M PBS (phosphate buffered saline, (in ml): NaCl 18g, 0,1M PB 200, deionisiertes H<sub>2</sub>O 2000) gewaschen und mit Glycerol ((in ml): Glycerol 1, 0,1M PB 1) bzw. mit Aquapolymount abgedeckt. Als Negativkontrolle diente ein Objektträger, der im Schritt der Primärantikörper-Inkubation statt des Antikörpers mit 100µl-PBS-T benetzt wurde. Für eine alternative Darstellung der Androgenrezeptor Expression in der Population der Histamin immunreaktiven Neurone im Sinne einer Kombinationsfärbung von Androgenrezeptor und Histamin kam der polyklonale Anti-AR-Antikörper *goat AR (G13)* zur Anwendung (vgl. Tabelle 2.5.2). Das Färbungsprotokoll entsprach dem, des *rabbit AR(N-20)*. Als Sekundärantikörper fungierte ein spezifischer Antikörper, der der Tabelle 2.5.2 entnommen werden kann. Sämtliche hier verwendeten polyklonalen Anti-AR-Antikörper sind derzeit nicht mehr verfügbar und lediglich monoklonale Alternativen käuflich erhältlich (Letzter Stand 09/2020).

In den Schnitten der DAT-Tmt Mäuse erfolgte die Färbung der Neurone des TMN nach Histamingehalt, Tyrosinhydroxylase Expression und der Markierung durch Biocytin (Sigma, 0,1%, in vorausgegangenen Spannungsklemm- Versuchen) wie in De Luca et al., 2016 beschrieben. Es wurde analog zu oben beschriebenem Protokoll gearbeitet. Sämtliche Primär- und Sekundärantikörper sind in der Tabelle 2.5.2 aufgeführt. Zur Auswertung wurden die Schnitte an einem aufrechten Fluoreszenzlichtmikroskop (AXIOVERT 100, ZEISS) durchmustert, das zur Fluoreszenzmikroskopie mit einer Halogenlampe HBO 100 (ZEISS) als UV-Lichtquelle und einem Filterset (Fs25) mit Filtern der Anregungsmaxima für grünes Licht (488nm, FITC), rotes Licht (570nm, Texas Red) und blaues Licht (350nm, BFP(*blue fluorescent protein*)) ausgestattet war.

Die Fotodokumentation der Schnitte erfolgte mit einer Nikon-3000 Digitalkamera sowie mit dem ZenLite2012-Kamera- und Software-System (ZEISS, Oberkochen, Germany).

In den Schnitten der HDC-Tmt Mäuse wurden die Nervenzellen des tuberomamillären Kerns nach der Expression des Tomatoproteins (rot) und dem Vorhandensein des Androgenrezeptor (grün, Sekundärantikörper *goat-anti-rabbitAlexaFluor488nm*) untersucht. Im ersten Zählen, direkt am Präparat, wurden so Tomatoprotein (Tmt) positive, aber Androgenrezeptor (AR) negative von Tomatoprotein und Androgenrezeptor positiven TMN-Neuronen unterschieden. Es wurde in der Regel mit 400facher und nur in Einzelfällen mit 1000facher Vergrößerung gezählt. Im zweiten Zählen, anhand der Fotodokumente, wurde

die Gruppe der Tmt und AR immunreaktiven TMN Neurone weiter unterteilt in AR-Kernimmunreaktivität (AR-*nuclear*) und AR-Somaimmunreaktivität (AR-*soma*).

Primärantikörper			
Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
<i>rabbit-anti-androgen receptor (N20)</i>	Kaninchenserum	1:100	Santacruz Biotechnologies
<i>goat-anti-androgen receptor (G13)</i>	Ziegenserum	1:50, 1:100, 1:200, 1:500	Santacruz Biotechnologies
<i>rabbit-anti-histamine-AB5885</i>	Kaninchenserum	1:1000	Millipore, Temecula, CA, USA
<i>chicken-anti-tyrosinhydroxylase-AB76442</i>	Hühnerserum	1:100	Abcam
Sekundärantikörper			
Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
<i>goat-anti-rabbitAlexaFluor488</i>	Ziegenserum	1:500	invitrogen®
<i>donkey-anti-goat AF488</i>	Esenserum	1:500	invitrogen®
<i>donkey-anti-rabbit AF488</i>	Esenserum	1:500	LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA
<i>goat-anti-rabbit Cy5</i>	Ziegenserum	1:500	Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
<i>goat-anti-chicken Cy5</i>	Ziegenserum	1:500	Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA

**Tabelle 2.5.2: Primär- und Sekundärantikörper**, Auflistung der entsprechenden Antikörper mit Namen, Ursprungsserum, Verdünnung in PBS-T und Hersteller; für die verwendeten Fluorophore der Sekundärantikörper gilt: Cy5 = Cyanin5 (Absorptionsmaximum: 649nm, Emissionsmaximum: 666nm), AlexaFluor488 (Absorptionsmaximum: 493nm, Emissionsmaximum: 519nm).

Die Daten der beiden Zähldurchläufe wurden für die zwei Altersgruppen juvenil (Alter 10-12Tage), und adolescent-adult (Alter 29-170Tage) erhoben. Des Weiteren wurde bei den Zellzählungen die Unterteilung des tuberomamillären Kerns nach Ericson et al., 1987 und Inagaki et al., 1990 berücksichtigt. Es wurde die ventrale Gruppe des TMN (TMV) mit einem rostralen (TMVr) und einem kaudalen Abschnitt (TMVc) und die mediale Zellpopulation des TMN (TMM) mit einem dorsalen (TMMd) und einem ventralen Anteil (TMMv) unterschieden. Zur Verifizierung und Objektivierung der beiden AR Lokalisationen innerhalb der TMN Neurone, der AR-Zellkern- versus AR-Somaimmunreaktivität, erfolgten Intensitätsmessungen mithilfe eines Konfokalmikroskops (Axioskop, ZEISS) (s.u.). Die Aufnahmen wurden mit der Software LSM (META510) unter Verwendung der Laser HeNe1 mit der Wellenlänge 543nm (Spektrum des roten Lichts) und Argon2 mit den Wellenlängen 458/477/488/514nm im Spektrum des grünen Lichts sowie HeNe2 mit der Wellenlänge 647nm durchgeführt.

Die Messungen erfolgten in einer Vergrößerung von 1:400 unter Verwendung des Phase-3-40X-Objektivs oder des Plan-Neofluor 40X/1.30OilPH3-Objektivs. Es wurden insgesamt 21 Zellen aufgenommen. Für die Auswertung der Intensitätsmessungen wurde das Programm Image J, in der Version 1.48v, Java 1.6.0\_20(64bit) (vgl. <https://imagej.nih.gov/ij/>) verwendet. Die Bilder im LSM-Format wurden als Graubilder in Image J geöffnet.

Die Intensitätsmessungen erfolgten in Grauwerteinheiten. Zunächst wurde die Intensität in der jeweiligen Zelle im Vergleich zum Hintergrund bestimmt. Die Intensitätswerte wurden als Mittelwerte aus vier Werten pro Zelle als Intensität entlang der Senkrechten, Waagerechten sowie ersten und zweiten Winkelhalbierenden durch die Zelle erhoben. Bei einem signifikanten Unterschied der Intensitäten von Hintergrund und Zelle zum Signifikanzniveau von  $< 5\%$  ( $p < 0,05$ ) wurde von AR-Immunreaktivität der entsprechenden Zelle gesprochen. In der Gruppe der AR immunreaktiven Zellen wurden nun die jeweiligen Intensitätswerte für das Zytoplasma und den Zellkern gemessen. Bei einem signifikanten Intensitätsunterschied zwischen Zellkern und Zytoplasma wurden die Zellen zur Gruppe der Neurone mit AR-Kernimmunreaktivität gezählt. Bei fehlendem Intensitätsgradienten zwischen Zytoplasma und Zellkern erfolgte die Bezeichnung als AR-Somaimmunreaktivität. Die Daten wurden mit der Statistik-Software GraphPad-Prism6 bearbeitet. Es wurden die Mittelwerte der, in Grauwerteinheiten erhobenen Intensitäten einschließlich der Standardfehler und Standardabweichung bestimmt sowie die Normalverteilung. Aufgrund der Annahme nicht normal verteilter Daten erfolgte der Nachweis statistischer Signifikanz mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (MWT, s.u.). Für die Auswertung der Schnitte der DAT-Tmt Mäuse wurde, wie in De Luca et al., 2016 beschrieben, ein Konfokalmikroskop (510 META/Axioskop 2 Plus, ZEISS) mit einer AxioCam MRc Kamera (ZEISS, Göttingen, Germany) und das ZenLite2012-Kamera- und Software-System verwendet. Die Schnitte wurden nach der Lokalisation der DAT-Tmt positiven Nervenzellen im posterioren Hypothalamus sowie nach einem möglichen Histamingehalt der DAT-Tmt Neurone und der Expression der Tyrosinhydroxylase sowohl in DAT-Tmt als auch in histaminergen Neuronen untersucht.

Zuletzt wurden Übersichtsbilder der Schnitte in Form von Panoramabildern angefertigt. Dazu wurde ein repräsentativer koronaler Hirnschnitt ausgewählt und mit dem ZenLite2012-Kamera-System (ZEISS) systematisch abfotografiert. Als Vergrößerung wurde ein Faktor von 200 für die Fotos ausgewählt. Das Präparat wurde dann beginnend von der späteren linken unteren Bildecke von rechts nach links reihenweise bis zur rechten oberen Ecke vollständig aufgenommen. Im Durchschnitt wurden pro Schnitt 50 bis 90 Einzelfotos hergestellt. Bei der Aufnahme der Einzelfotos war auf eine ausreichende Überlappung der, im späteren Panoramabild benachbarten Fotos zu achten. Das Zusammenfügen der Einzelbilder zu einem Panoramabild erfolgte mit dem *Stitching* Programm Microsoft Image Composite Editor 2.0.3 für Windows (Microsoft Research).

## 2.6 Chemikalien und Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien und Substanzen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka Analytical, Fresenius Kabi GmbH, Merck, Gibco®, Invitrogen® Life technologies, Santacruz-Biotechnology und VWR Prolabo-Chemicals bezogen.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Analyse und graphische Darstellung der Daten aller Experimente erfolgte mit der Software Microsoft Office Excel 2003/2007 (Microsoft Corporation) und GraphPad-Prism5/6/7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Skizzen und Zeichnungen wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm paint.net 4.0.12 (Washington State University) angefertigt.

Die immunhistochemischen und elektrophysiologischen Daten wurden als *baseline* korrigierte Mittelwerte mit Standardfehler (MEAN±SEM) angegeben.

Die Prüfung auf eine Normalverteilung der Daten erfolgte mittels des Normalitätstest D'Agostino-Pearson OmnibusK2-Normalitätstest, in dem die Wölbung (Kurtose) und die Schiefe der Kurve eines Datensatzes betrachtet und die Abweichung von der Normalverteilung nach Gauß bestimmt wird ([https://en.wikipedia.org/wiki/D%27Agostino%27s\\_K-squared\\_test](https://en.wikipedia.org/wiki/D%27Agostino%27s_K-squared_test)). Bei Annahme einer Normalverteilung erfolgte der statistische Vergleich hinsichtlich Signifikanz entweder mithilfe des t-Test abhängiger oder unabhängiger Stichproben bei Vergleich von zwei Gruppen oder dem *oneway analysis of variance test* (One way ANOVA, OWA) bei Vergleich von  $n > 2$  Gruppen ([https://en.wikipedia.org/wiki/One-way\\_analysis\\_of\\_variance](https://en.wikipedia.org/wiki/One-way_analysis_of_variance)). Mithilfe des t-Tests wird geprüft, ob die Mittelwerte zweier Stichproben sich voneinander unterscheiden. Bei dem t-Test abhängiger oder verbundener Stichproben (paired t-test) wird in jeweils der einen und der anderen Stichproben eine Variabel gemessen, die sich gegenseitig bedingt, beispielsweise in Wiederholungsmessungen wie die Feueraktivität eines Neurons oder von Neuronen vor und nach einer Substanzapplikation. Der t-Test unabhängiger oder unverbundener Stichproben (unpaired t-test) untersucht eine Variabel in zwei Stichproben, wobei sich die Messwerte aus beiden Stichproben nicht beeinflussen, wie zum Beispiel die Untersuchung der Wirkung einer Substanz an einer Fall- und einer Kontrollgruppe ([https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html)). Beim Oneway ANOVA-Test erfolgt der Vergleich der Mittelwerte von  $n > 2$  Stichproben, wobei hier die Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert jeder einzelnen Stichprobe mit den Abweichungen der jeweiligen Gruppenmittelwerte vom Gesamtmittelwert verglichen und als F-Ratio und p-Wert X ausgedrückt werden. Im Falle nicht normal verteilter Daten wurde als statistischer Test der Mann-Whitney-U-Test (MWT) verwendet (<https://www.empirical->

[methods.hslu.ch/entscheidbaum/unterschiede/zentrale-tendenz/mann-whitney-u/](https://methods.hslu.ch/entscheidbaum/unterschiede/zentrale-tendenz/mann-whitney-u/)).

Dieser vergleicht die Mittelwerte zweier Stichproben, in dem er die Einzelwerte vom kleinsten zum größten Wert hin sortiert, einen Rang verteilt und dann die Rangsummen bestimmt.

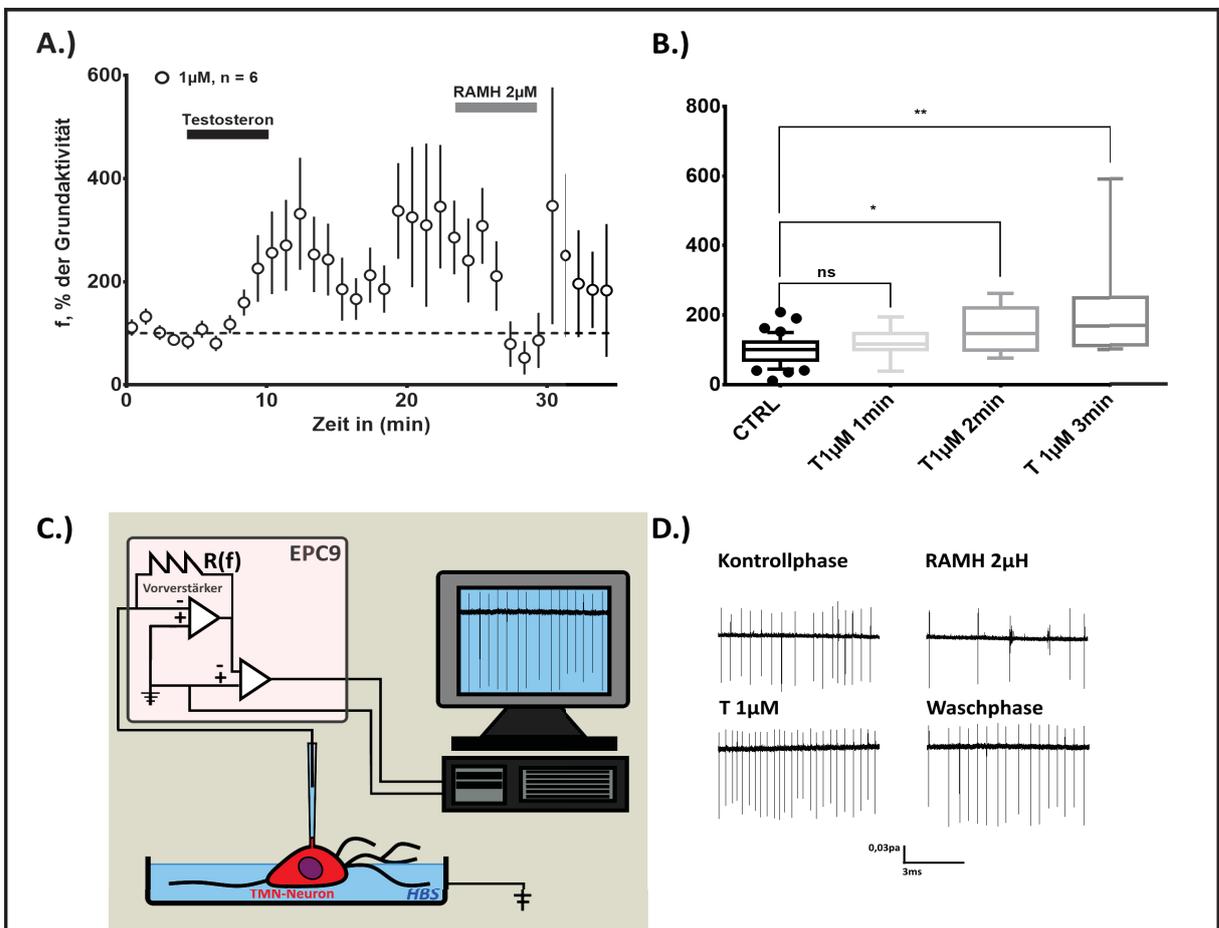
Im Falle eines großen Unterschieds zwischen den Rangsummen beider Stichproben liegt ein statistisch signifikanter Unterschied vor (<https://matheguru.com/stochastik/t-test.html>).

Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  (< 5%) definiert.

# Kapitel 3. Ergebnisse

## 3.1 Testosteron erhöht die Feuerfrequenz der Histaminneurone des TMN

Die Applikation von 1µM Testosteron für 5 Minuten erhöhte die Aktionspotentialfrequenz der HA Neurone auf durchschnittlich 206±29,2% der Ausgangsaktivität (MWT, p = 0,01). In der Waschphase konnte ein Anstieg auf durchschnittlich 263±17% (p = 0,01) für weitere 10 Minuten beobachtet werden. Die Beendigung der Aufnahme erfolgte durch die Gabe von 2µM RAMH zur Identifikation der HA Neurone. Insgesamt wurden 15 Minuten Zellaktivität nach Applikation von Testosteron aufgezeichnet (vgl. Abb. 3.1, A.). Die Abbildung 3.1.B. zeigt die Latenzzeit zwischen Testosteronapplikation und Frequenzanstieg. Diese belief sich auf etwa 2-3 Minuten (117,6±17,8%, p = 0,33 für Minute 1, 159,7±25,22%, p = 0,02 für Minute 2, 226±65%, p = 0,002 für Minute 3, MWT).



**Abb. 3.1** Feuerfrequenzverhalten der HA Neurone unter 1µM Testosteron in Spannungsklemmversuchen (*cell attached Modus*)

**A.** Anstieg der Feuerfrequenz der HA Neurone nach Testosteron 1µM

**B.** Latenzzeit der Testosteronantwort. Signifikanter Frequenzanstieg nach 2 Minuten Testosteron Exposition, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, MWT **C.** Schemazeichnung der Versuchsdurchführung (**Quelle:** eigene Darstellung) **D.** Typisches Frequenzband bei Ableitung der akut isolierten Neurone des TMN.

Zusammenfassend konnte mit der Applikation von 1µM Testosteron auf die akut dissoziierten HA Neurone ein Testosteroneffekt in Form einer Zunahme der Feuerfrequenz der Neurone nachgewiesen werden. Es handelte sich um einen schnellen Testosteroneffekt, der mit einer Latenzzeit von knapp 2 Minuten einsetzte. Der Frequenzanstieg hielt mindestens für 15 Minuten an und entspricht etwa dem Doppelten bis Dreifachen (4-6Hz) der Ausgangsaktivität der Neurone.

### **3.2 Der Frequenzanstieg der HA Neurone ist konzentrationsabhängig**

Wie bei jedem Effekt auf die Feuerfrequenz von Neuronen, stellt sich die Frage nach einer Dosis-Wirkungs-Beziehung. Entsprechend wurde eine mögliche Dynamik des exzitatorischen Effekts von Testosteron auf die Feuerfrequenz der histaminergen Neurone untersucht. Als Konzentrationen wurden physiologische Testosteronspiegel zwischen 0,1 bis 100nM sowie hoch physiologische (300nM) und unphysiologisch hohe Konzentrationen wie 1 und 10µM verwendet. Die Ableitung erfolgte an Hirnschnitten.

In der Applikationsphase konnte, unter Ausschluss der Dosis von 0,1nM, bei keiner der untersuchten Testosteronkonzentrationen ein signifikanter Unterschied in den Frequenzanstiegen beobachtet werden (OWA,  $F(5; 42) = 0,97$ ,  $p = 0,45$ ).

Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zeichnete sich nicht ab. Für die Frequenzanstiege in der Waschphase konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Konzentrationen nachgewiesen werden (OWA,  $F(6; 49) = 4,5$ ,  $p < 0,01$ ).

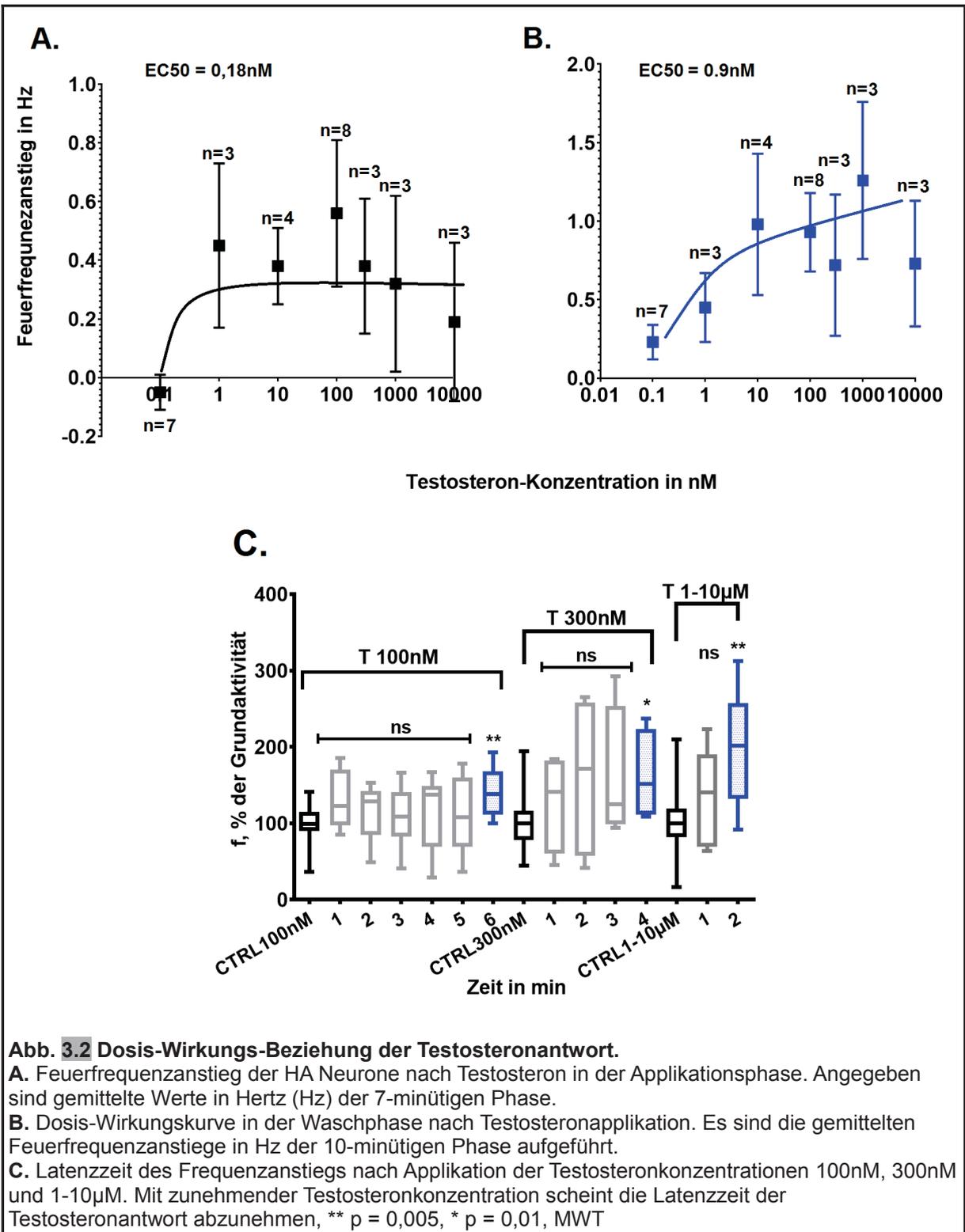
Es ließ sich eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachten (vgl. Abb. 3.2, B).

Die Dosis, bei der 50% des Testosteroneffekts erreicht war (EC50), lag bei knapp 1nM.

Eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung scheint sich auch in den Latenzzeiten des Frequenzanstiegs zwischen den verwendeten Testosteronkonzentrationen widerzuspiegeln (vgl. Abb. 3.2, C). Am deutlichsten zeigte sich dieser Zusammenhang bei den

Konzentrationen von 100nM, 300nM und 1-10µM Testosteron. Bei T100nM betrug die Latenzzeit 6 Minuten (CTRL vs. T(6min),  $p = 0,0022$ ), bei T300nM 4 Minuten (CTRL vs. T(4min),  $p = 0,0175$ ) und bei T1-10µM 2 Minuten (CTRL vs. T(2min),  $p = 0,006$ , MWT).

Zusammenfassend konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Feueraktivität der HA Neurone nach Applikation von Testosteron beobachtet werden. Eine statistische Signifikanz der Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte sich vor allem in der Waschphase mit einer entsprechenden Latenzzeit. Diese Latenzzeit scheint ebenfalls einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zu unterliegen. Je höher die Testosteronkonzentration, desto kürzer die Latenzzeit.



**Abb. 3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung der Testosteronantwort.**

**A.** Feuerfrequenzanstieg der HA Neurone nach Testosteron in der Applikationsphase. Angegeben sind gemittelte Werte in Hertz (Hz) der 7-minütigen Phase.

**B.** Dosis-Wirkungskurve in der Waschphase nach Testosteronapplikation. Es sind die gemittelten Feuerfrequenzanstiege in Hz der 10-minütigen Phase aufgeführt.

**C.** Latenzzeit des Frequenzanstiegs nach Applikation der Testosteronkonzentrationen 100nM, 300nM und 1-10µM. Mit zunehmender Testosteronkonzentration scheint die Latenzzeit der Testosteronantwort abzunehmen, \*\*  $p = 0,005$ , \*  $p = 0,01$ , MWT

### 3.3 Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels der TMN Neurone durch Testosteron

Als Methode wurde die Kalziumfluoreszenzmessung (*calcium imaging*) mittels des chemischen Kalziumchelators Fluo4-AM angewendet. Kaliumchlorid (KCl) wurde in der Standardkonzentration von 30mM verwendet. Die KCl Applikation erfolgte für 4 Minuten.

Die Aufnahme verlief über insgesamt 10 Minuten. Die Daten der KCl bedingten Kalziumantwort zeigt Abbildung 3.3.1.A/B. Der Effekt begann nach zirka 4 Minuten ( $104,7 \pm 0,47\%$ ,  $p < 0,0001$ , MWT), dauerte etwa 6-8 Minuten an und entsprach einem durchschnittlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von 10% ( $99,6 \pm 0,03\%$ , CTRL vs.  $110,2 \pm 0,49\%$ ). Es zeigte sich die typische Parabelform.

Die Testosteronapplikation ( $1\mu\text{M}$ , 5 Minuten) erzeugte eine durchschnittliche Intensität von  $99,91 \pm 0,02\%$  ( $99,96 \pm 0,03\%$ , CTRL  $99,91 \pm 0,025\%$ , T-Phase,  $p = 0,4$ , ns, MWT).

Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied von der Ausgangsintensität.

In der Waschphase wurde ein durchschnittlicher Anstieg der Intensität um  $101,2 \pm 0,03\%$  (CTRL vs. WP,  $p < 0,0001$ , MWT) gemessen, mit vereinzelt, oszillierenden Elementen und maximalen Intensitätswerten von 104,3% (vgl. Abb. 3.3.1.C/D). Eine Identifikation der Neurone nach histaminergem Charakter wurde nicht durchgeführt.

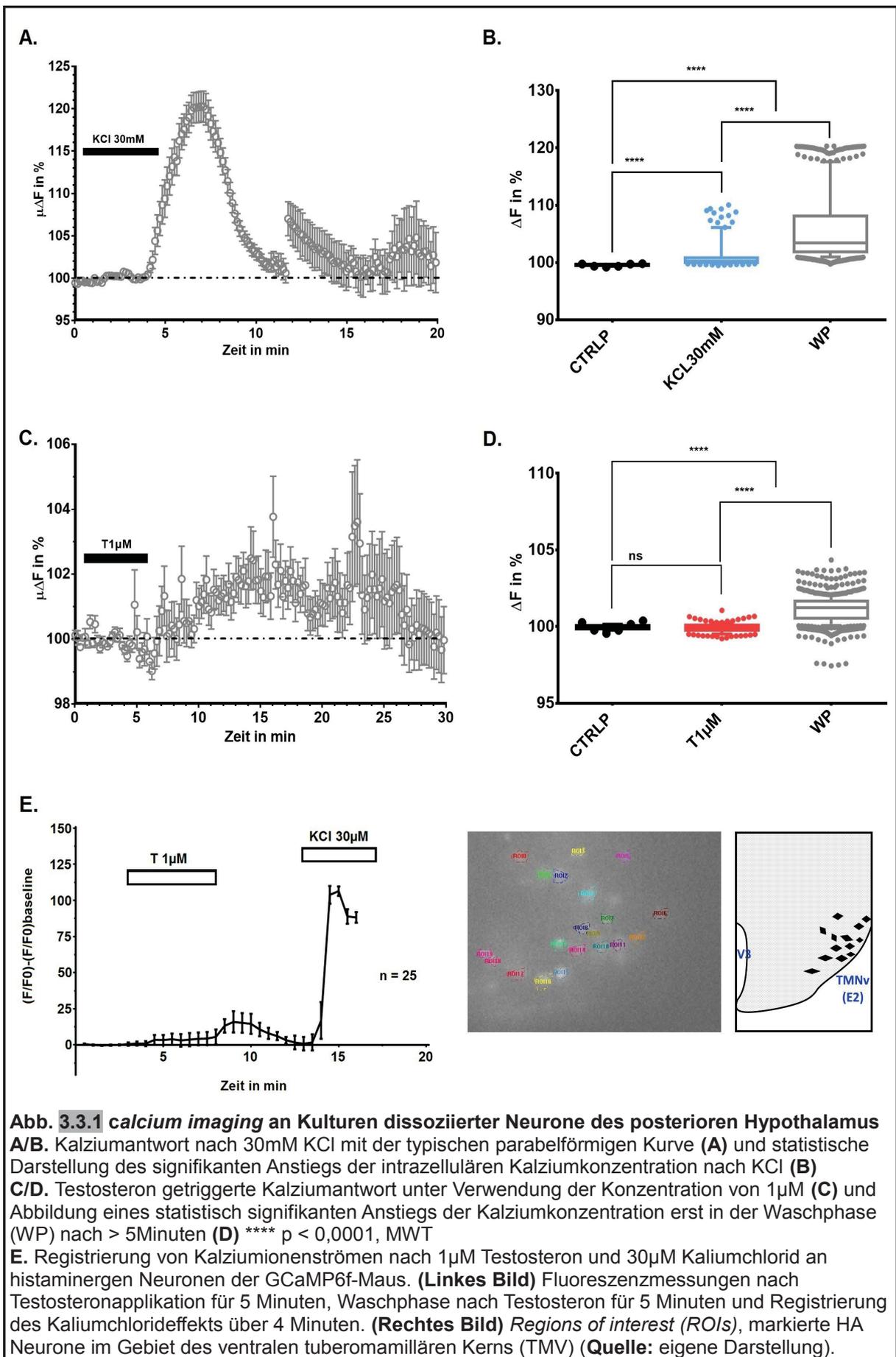
Zur Verdeutlichung der Testosteronantwort wurden die Intensitätswerte bezogen auf die Referenzgröße von 30mM KCl berechnet. Demzufolge entsprach der mittlere

Testosteroneffekt Werten von  $10,31 \pm 0,23\%$  während der Applikation bis  $15,94 \pm 0,33\%$  des durch KCl ausgelösten  $\Delta F$  in der Waschphase. Maximale Werte für  $\Delta F$  nach Testosteron lagen um 19,53%. Insgesamt entsprach der durchschnittliche Testosteroneffekt 10-20% der

KCl Antwort. Erste Daten aus der alternativen Kalziumfluoreszenzmessung mithilfe der GCaMP6f-Maus zeigt Abbildung 3.3.1.E. Hier konnte nach Identifikation der histaminergen Neurone eine vergleichbare Kalziumantwort nach  $1\mu\text{M}$  Testosteron beobachtet werden.

Alles in allem konnte gezeigt werden, dass Testosteron einen minimalen Effekt auf die Kalziumionenkonzentration der Neurone des posterioren Hypothalamus hat. Dieser liegt zwischen durchschnittlich 1% und maximal 4%, setzt mit einer Latenzzeit von 8 Minuten ein und erstreckt sich über einen Zeitraum von knapp 20 Minuten im Sinne eines transienten Anstiegs des intrazellulären Kalziumionenspiegels.

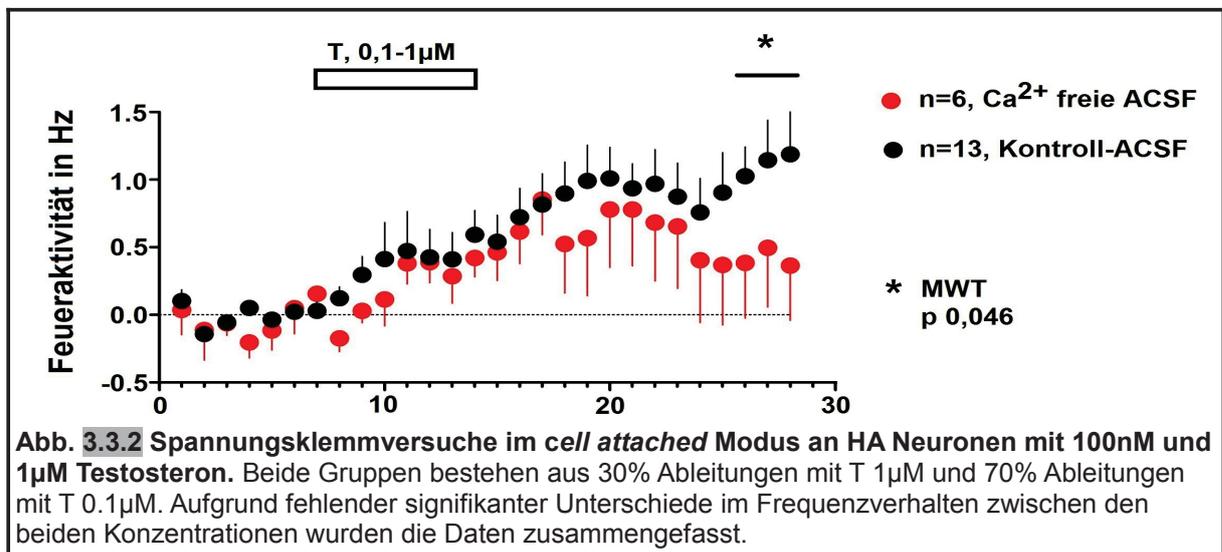
An dieser Stelle kommt die Frage auf, ob der, durch Testosteron bedingte Anstieg der Feueraktivität der HA Neurone durch den hier beobachteten, transienten Kalziumionenstrom bedingt ist. Es wurden Spannungsklemmversuche im *cell attached* Modus in artifizierlicher Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) und in Kalzium freiem ACSF durchgeführt. Die Daten zeigt Abbildung 3.3.2. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Frequenzverhalten nach 100nM oder  $1\mu\text{M}$  Testosteron zwischen den beiden Medien gefunden werden.



**Abb. 3.3.1 calcium imaging an Kulturen dissoziierter Neurone des posterioren Hypothalamus**

**A/B.** Kalziumantwort nach 30mM KCl mit der typischen parabelförmigen Kurve (**A**) und statistische Darstellung des signifikanten Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration nach KCl (**B**)  
**C/D.** Testosteron getriggerte Kalziumantwort unter Verwendung der Konzentration von 1µM (**C**) und Abbildung eines statistisch signifikanten Anstiegs der Kalziumkonzentration erst in der Waschphase (WP) nach > 5Minuten (**D**) \*\*\*\* p < 0,0001, MWT  
**E.** Registrierung von Kalziumionenströmen nach 1µM Testosteron und 30µM Kaliumchlorid an histaminergen Neuronen der GCaMP6f-Maus. (**Linkes Bild**) Fluoreszenzmessungen nach Testosteronapplikation für 5 Minuten, Waschphase nach Testosteron für 5 Minuten und Registrierung des Kaliumchlorideffekts über 4 Minuten. (**Rechtes Bild**) Regions of interest (ROIs), markierte HA Neurone im Gebiet des ventralen tuberomammillären Kerns (TMV) (**Quelle:** eigene Darstellung).

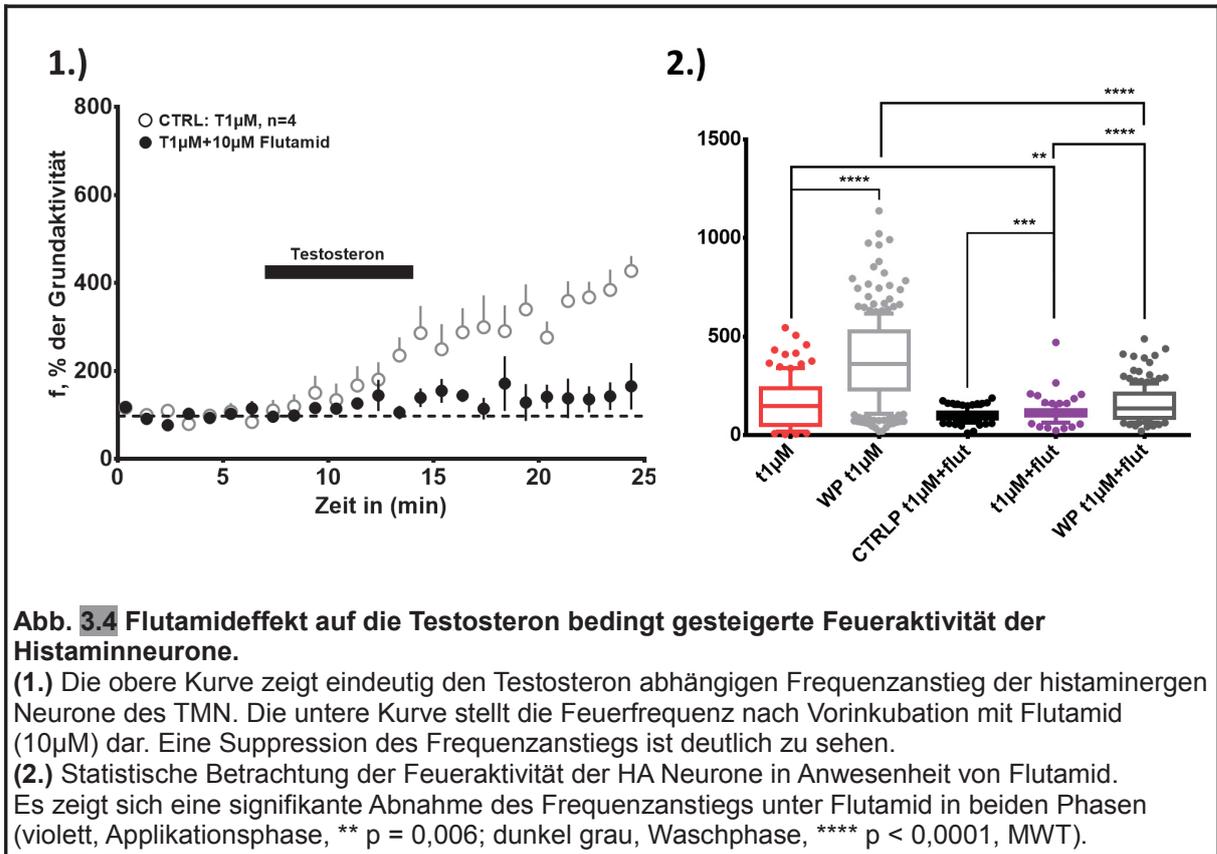
Lediglich in der späten Waschphase zeichnete sich im Kalzium freien Medium bereits ein Rückgang der Feueraktivität der HA Neurone ab, wohingegen in der Kontrollgruppe ein weiterer Frequenzanstieg zu beobachten war. Eine durch Kalziumionen getragene Zunahme der Feueraktivität der HA Neurone nach Testosteron ist damit weniger wahrscheinlich.



### 3.4 Beteiligung des Androgenrezeptor am Testosteron abhängigen Frequenzanstieg der TMN Neurone

Im Zusammenhang mit dem hier dargestellten, schnellen Testosteroneffekt stellt sich die Frage nach einer Beteiligung des Androgenrezeptor (AR) an der zugrunde liegenden Signalkaskade. In diesem Sinne wurden Spannungsklemmversuche an HA Neuronen aus Hirnschnitten männlicher Mäuse durchgeführt. Als Kontrollgruppe fungierte die Ableitung mit 1µM Testosteron. Für die Prüfung der Beteiligung des Androgenrezeptor wurden die Hirnschnitte mit Flutamid in der Konzentration von 10µM eine Stunde vor der Testosteronapplikation inkubiert. In der Kontrollgruppe zeigte sich der bereits oben beschriebene Frequenzanstieg der HA Neurone. In der Gruppe der Vorinkubation mit 10µM Flutamid wurde in der Applikationsphase von Testosteron ein signifikanter Anstieg der Feuerfrequenz auf  $115,8 \pm 4,95\%$  (CTRL vs. T-Phase,  $p < 0,05$ , paired t-test) gemessen. In der Waschphase wurde eine durchschnittliche Feuerfrequenz von  $156,5 \pm 6,3\%$  (CTRL vs. WP,  $p < 0,0001$ , paired t-test) aufgezeichnet (vgl. Abb. 3.4.1). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in der Gruppe mit Flutamid Vorinkubation eine signifikante Reduktion des Frequenzanstiegs um 29% in der Applikationsphase. In der Waschphase belief sich die Abnahme um 41% im Vergleich zum Wert der Kontrollgruppe ( $p < 0,0001$ , MWT). Bezüglich der statistischen Signifikanz der Hemmung des Frequenzanstiegs unter Flutamid gibt die Abbildung 3.4 Aufschluss.

Zusammengefasst führte die Vorinkubation mit 10µM Flutamid zu einer signifikanten Abnahme des Testosteron abhängigen Frequenzanstiegs der HA Neurone sowohl während der Applikation als auch in der Waschphase. Flutamid konnte keine vollständige Hemmung des Testosteroneffekts bewirken. Eine Beteiligung des Androgenrezeptor an der Testosteron abhängigen Frequenzsteigerung der HA Neurone ist anzunehmen.



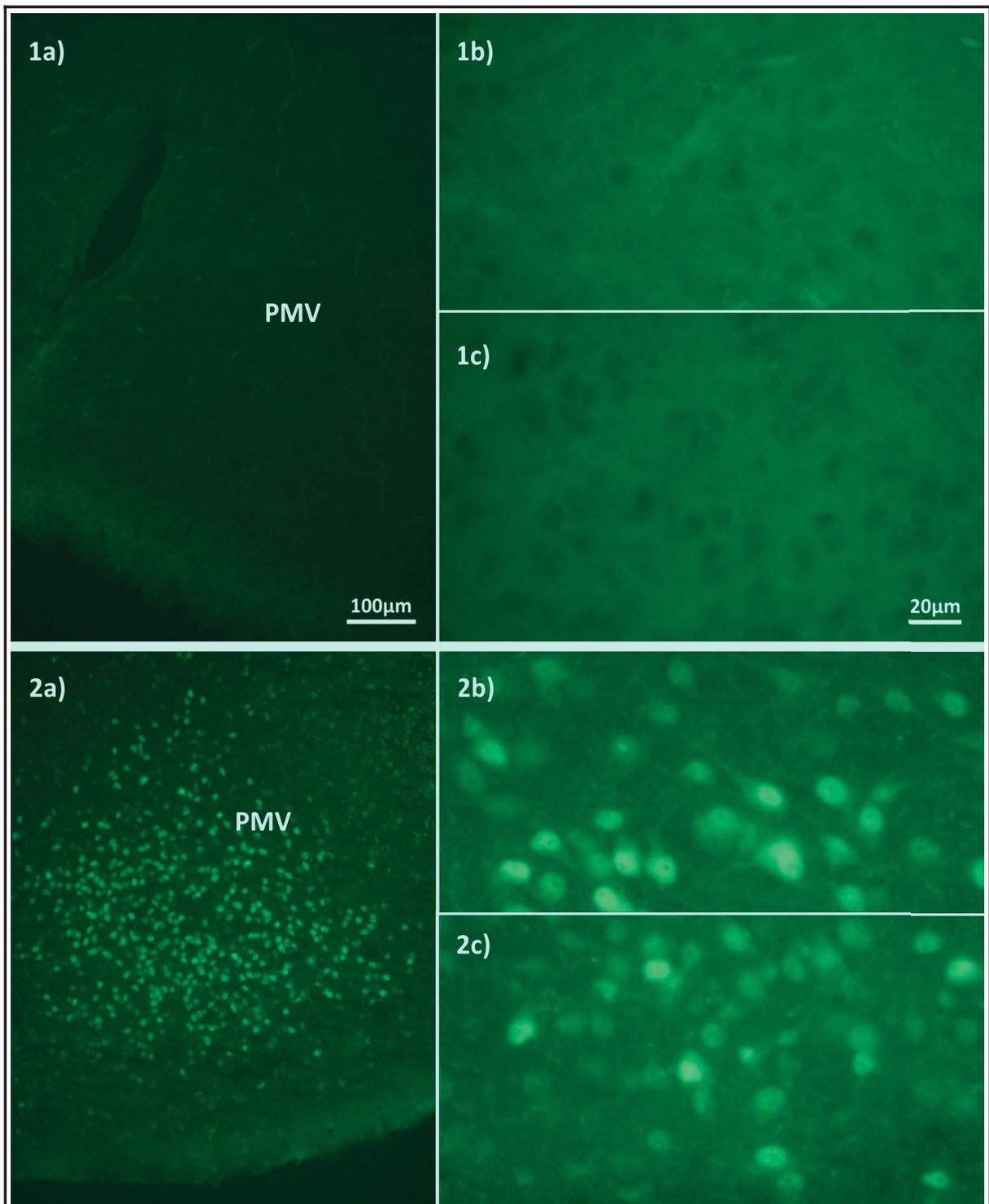
### 3.5 Expression des Androgenrezeptor in Neuronen des TMN

Über die Expression des Androgenrezeptor im tuberomamillären Kern ist nicht viel bekannt. So wird der TMN in der umfangreichen In-situ-Hybridisierungsstudie für den AR und ER von Simerly et al., 1990 nur nebenbei als AR positives Kerngebiet angeführt.

Vor dem Hintergrund des, in dieser Arbeit beschriebenen, exzitatorischen Effekts von Testosteron auf die Feueraktivität der TMN Neurone sowie der Hemmung dieses Effekts durch den nichtsteroidalen Androgenrezeptorantagonisten Flutamid stellte sich nun die Frage nach dem Ausmaß der Expression des Androgenrezeptor in den Neuronen des TMN in der männlichen Maus.

Dazu wurden immunhistochemische Färbungen mit einem aus Kaninchenserum stammenden Antikörper durchgeführt. Ziel war eine Kombinationsfärbung mit dem Anti-AR-

und einem Anti-Histamin-Antikörper. Aufgrund der gemeinsamen Basis auf Kaninchenserum musste auf einen, aus Ziegenserum stammenden Anti-AR-Antikörper zurückgegriffen werden (*goat* AR, G13, santacruz biotechnologies).



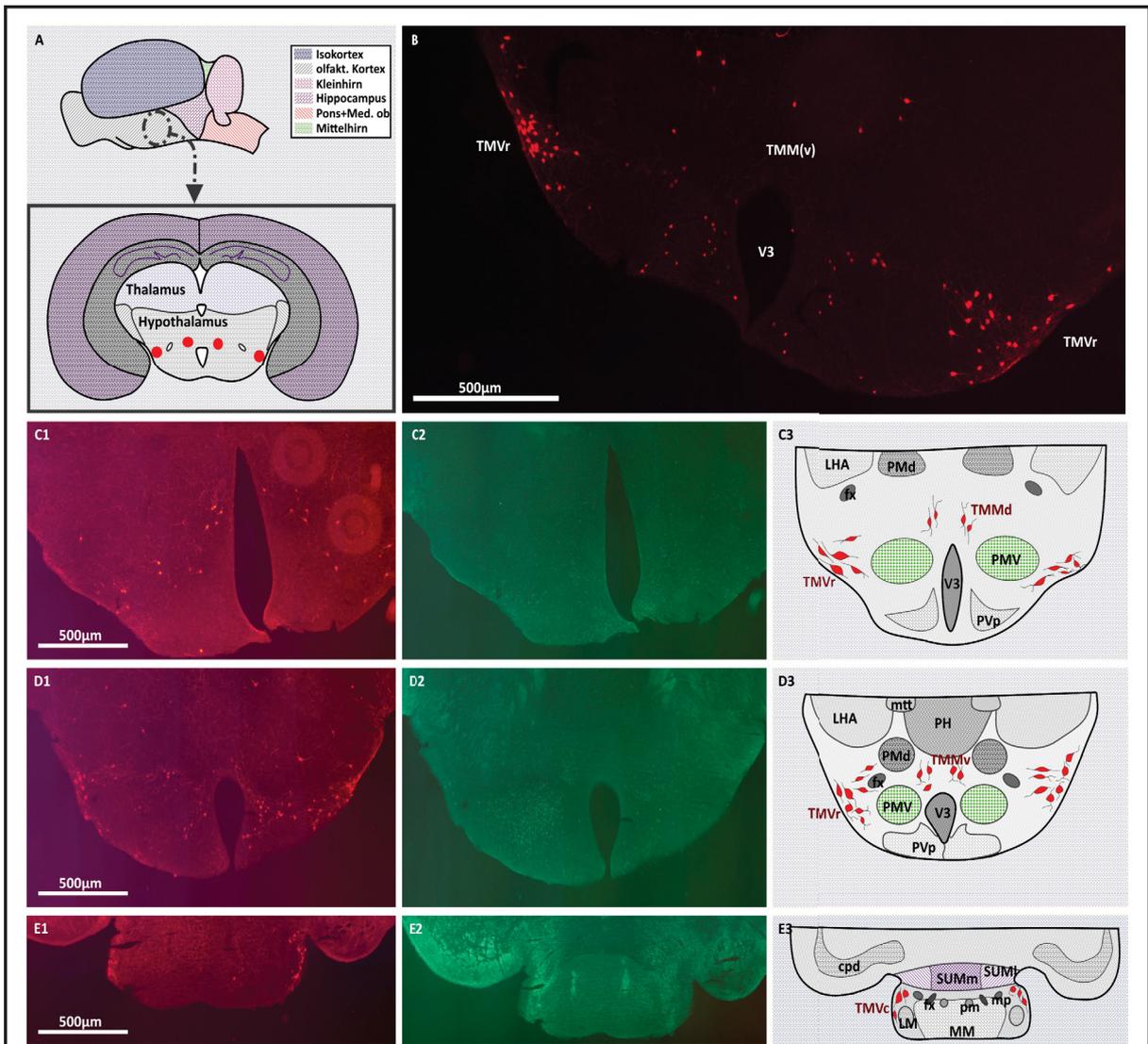
**Abb. 3.5.1 Anti-AR-Antikörper-Färbungen**

(1) Repräsentatives Resultat unter Verwendung des *goat* AR, G13, (santacruz biotechnologies) (Konzentration 1:500) (a) PMV Region und Detail des PMV (b) zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle (c) keine eindeutige Immunreaktivität

(2) Färbungsserie nach Verwendung des *rabbit* AR, G 20, (santacruz biotechnologies) (Konzentration 1:500) (a) PMV Überblick und (b,c) Details der PMV Region weisen eine eindeutige, in erster Linie Zellkern betonte Immunreaktivität für den AR auf.

Eine zuverlässige Kernfärbung, auch von Neuronengruppen bekannter AR-Immunreaktivität, wie dem PMV, konnte in keiner der Konzentrationen von 1:100 bis 1:1000 erzielt werden. Abbildung 3.5.1 zeigt die Gegenüberstellung der beiden Anti-AR-Antikörper *rabbit* AR und *goat* AR anhand der Neurone des PMV einer Maus. Aufgrund der unzuverlässigen Ergebnisse mit dem *goat* AR-Antikörper wurde ein bereits bewährtes, durch Yanovsky et al., 2012 beschriebenes Modell einer transgenen Maus angewendet, der HDC-Cre/Tmt-Maus (vgl. Abschnitt 2.1, Methoden). Die Zellen dieser Maus, die die Histidindecaboxylase (HDC) exprimieren, exprimieren auch das rote Fluoreszenzprotein Tomatoprotein und erscheinen dadurch im Fluoreszenzmikroskop rot.

Ausführliche Beschreibungen der Anatomie des tuberomamillären Kerns stammen von Ericson et al., 1987 und Inagaki et al., 1990 in erster Linie an Ratten. Sie teilten das Kerngebiet jeweils in fünf Untergruppen ein, die in etwa vergleichbar sind. Im Falle der HDC-Tmt Maus wurde sich an die Einteilung von Ericson gehalten. Abbildung 3.5.2 verdeutlicht die getroffene Einteilung und Topographie des posterioren Hypothalamus der Maus. Auch bei der HDC-Tmt Maus ließ sich eine mediale (TMM) von einer ventralen (TMV) Neuronengruppe unterscheiden. Die mediale Gruppe befand sich in unmittelbarer Nähe zum dritten Ventrikel (Abb. 3.5.2, C1-3). Diese konnte in zwei Untergruppen geteilt werden. Der dorsale Anteil, mit durchschnittlich magnozellularen, etwa 15-20µm großen Neuronen, war dorsal, medial des dritten Ventrikels anordnet. Eine ventrale, sehr zerstreute Gruppe parvozellulärer, etwa 10µm großer Neurone befand sich ventral, medial des dritten Ventrikels in enger Beziehung zum *Nucleus periventricularis pars posterior*. Die ventrale Gruppe des TMN (TMV), die überwiegend magnozelluläre, 20-25µm große Neuronen enthielt, erstreckte sich weit lateral an der ventralen Oberfläche des Hypothalamus mit engem Kontakt zum äußeren Liquorraum und der Fornix. Das Kriterium für den rostralen Anteil des ventralen TMN war das Vorhandensein eines Anschnitts des dritten Ventrikels (Abb. 3.5.2, D1-3/E1-3). Charakteristisch für den kaudalen Anteil mit Bezug zu den Mamillarkörperchen war der fehlende Anschnitt des dritten Ventrikels (vgl. Abb. 3.5.2, E1-3). Ein diffuser Abschnitt konnte aufgrund des zum Teil ineinander übergehenden TMMd und TMVr sowie TMMv und TMVr nicht sicher unterschieden werden, weshalb diese Unterteilung nicht vorgenommen wurde. Es wurde die AR-Expression der HDC-Tmt Neurone an zwei Altersgruppen untersucht. Dabei wurde die Gruppe der juvenilen Mäuse, mit einem durchschnittlichen Alter von P11 Tagen (n = 5) von der Gruppe der adoleszent-adulten Mäuse unterschieden, deren Durchschnittsalter bei 88 Tagen (n = 5) lag. Grund dieser Differenzierung nach dem Alter der Mäuse war die Annahme einer möglichen Dynamik der AR-Expression in Abhängigkeit der, sich verändernden Testosteronspiegel, von dem Testosteron naiven, juvenilen Alter bis in das Testosteron sensible, adoleszent, adulte Alter der Mäuse (vgl. McCutcheon und Marinelli, 2009).



**Abb. 3.5.2 Anatomische Verhältnisse des posterioren Hypothalamus in der männlichen HDC-**

**Tmt Maus A.** Lokalisation der Schnitte im Mausgehirn (**Quelle:** eigene Darstellung frei nach [mouse.brain-map.org/AllenBrainAtlas](http://mouse.brain-map.org/AllenBrainAtlas)). **B.** Repräsentativer Schnitt der Region des posterioren Hypothalamus mit Anschnitt der Untergruppen des TMN mit medialer (TMM) und ventraler Gruppe (TMV), (Axiovert100, ZEISS, Vergrößerung 10x20, Fs25, Texas Red).

**C-E.** Sequentielle Darstellung der typischen Schnitte durch den posterioren Hypothalamus im Bereich des TMN **C1-2** Rostraler Schnitt mit länglichem Anschnitt des dritten Ventrikels

**D1-2** Intermediärer Schnitt mit charakteristischem, tränenförmigen Anschnitt des dritten Ventrikels

**E1-2** Kaudaler Schnitt ohne Anschnitt des dritten Ventrikels mit den prominenten Pedunculi cerebri

**C3/D3/E3** Schemazeichnung der entsprechenden Schnitte mit Berücksichtigung der wichtigsten Neuronengruppen und anatomischen Landmarken des posterioren Hypothalamus

(**Quelle:** eigene Darstellung frei nach [mouse.brain-map.org/AllenBrainAtlas](http://mouse.brain-map.org/AllenBrainAtlas))

Abkürzungen: *cpd* Pedunculi cerebri, *fx* Fornix *LHA* laterale hypothalamische Area, *LM* Nucleus mamillaris lateralis, *MM* Nucleus mamillaris medialis, *mp* Pedunculus mamillaris, *mtt* Tractus mamillothalamicus, *PH* Nucleus hypothalamicus posterior, *PMv/d* Nucleus preamillaris pars ventralis et pars dorsalis, *pm* Tractus mamillaris principalis, *PVp* Nucleus periventricularis pars posterior, *SUMm/l* Nucleus supramamillaris medialis/lateralis, *TMMv/d* Nucleus tuberomamillaris medialis pars ventralis/dorsalis, *TMVr/c* Nucleus tuberomamillaris ventralis pars rostralis/caudalis.

Bei den adolescent-adulten Mäusen wurden im Schnitt  $1230 \pm 92$  HDC-Tmt positive Neurone im Bereich des TMN gezählt. Der Anteil AR immunreaktiver HDC-Tmt Zellen betrug im

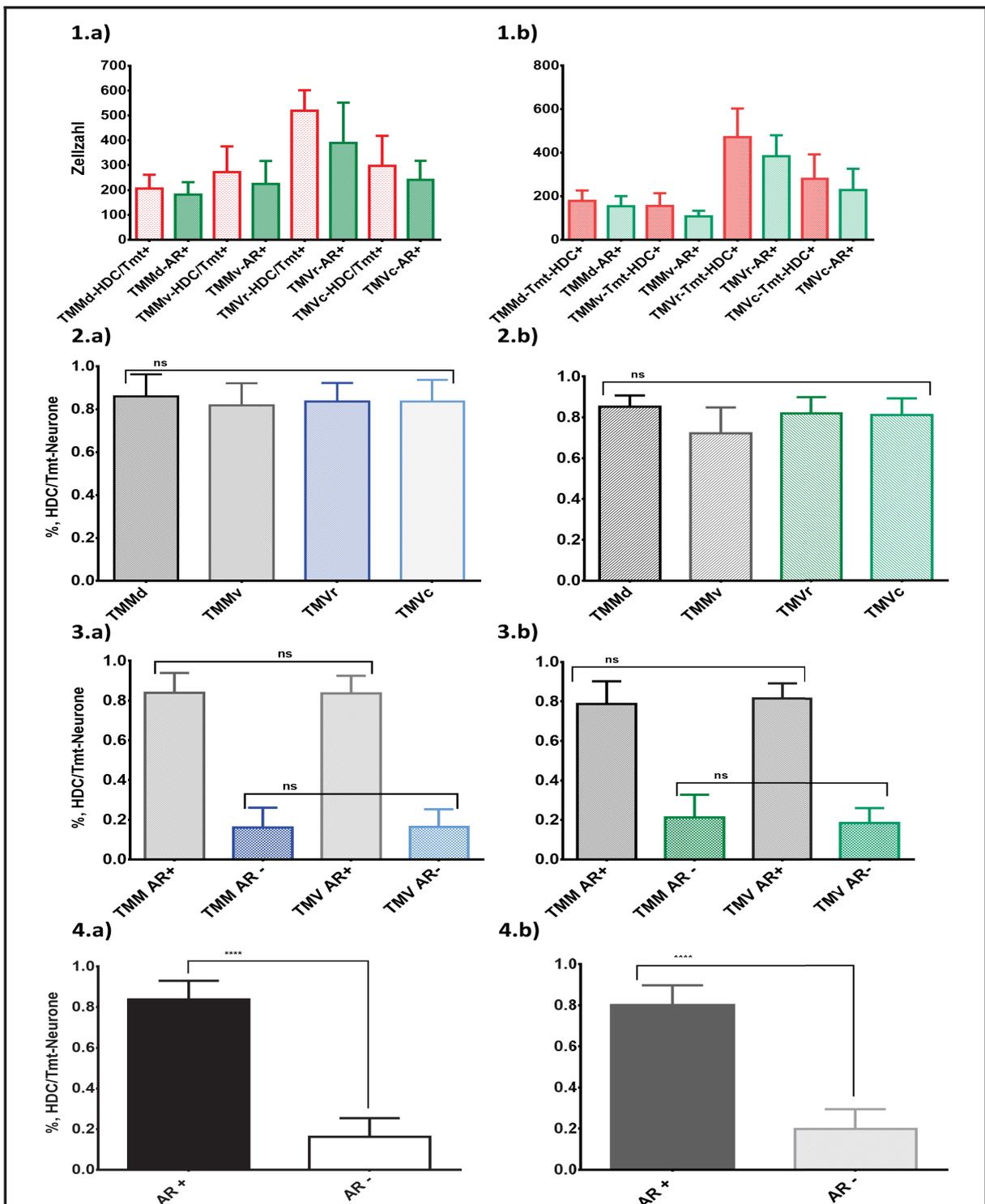
gesamten TMN  $83,77 \pm 2,1\%$ . Der Anteil AR immun negativer HDC-Tmt Neurone belief sich auf zirka  $16,23 \pm 2,1\%$  (Abb. 3.5.3.4a). Für die Untergruppen des TMN wurden jeweils Werte über 80% AR immunreaktiver HDC-Tmt Neurone erhoben (TMMd  $86 \pm 4,6\%$ , TMMv  $81,8 \pm 4,6\%$ , TMVr  $83,6 \pm 3,9\%$ , TMVc  $83,6 \pm 4,5\%$ , vgl. Abb. 3.5.3.2a).

Abbildung 3.5.3.2a und 3a zeigen die statistische Auswertung. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der AR-Expression der HDC-Tmt Neurone weder zwischen den Untergruppen (F(3;16) 0,1511,  $p = 0,9275$ , OWA) noch bei der Unterscheidung zwischen medialem (TMMd + TMMv) und ventralen TMN (TMVr + TMVc;  $p = 0,9446$ , unpaired t-test) festgestellt werden. Die rostrale Gruppe des ventralen TMN (TMVr) umfasste die größte Anzahl HDC-Tmt positiver Neurone mit im Schnitt  $454 \pm 73$  Zellen pro Maus (vgl. Abb. 3.5.3.1a).

Der Unterschied war statistisch signifikant zu beiden Untergruppen des medialen TMN ( $p = 0,0002$  (TMMd),  $p = 0,006$  (TMMv)) sowie zur kaudalen Fraktion des ventralen TMN ( $p < 0,05$ , TMVc, unpaired t-test).

In der Gruppe der juvenilen Mäuse wurden etwa  $1085 \pm 122$  HDC-Tmt positive Neurone gezählt. Eine Androgenrezeptorexpression zeigte sich bei  $80,14 \pm 2,14\%$  der Neurone. Der Anteil der HDC-Tmt Neurone ohne AR-Immunreaktivität betrug zirka  $19,86 \pm 2,14\%$  (vgl. Abb. 3.5.3.4b). Das Expressionslevel des AR im Bezug auf die einzelnen Untergruppen des TMN ist in Abbildung 3.5.3.2b dargestellt und lag zwischen 72-85% (TMMd  $85,23 \pm 4,45\%$ , TMMv  $72,2 \pm 5,7\%$ , TMVr  $81,9 \pm 3,6\%$ , TMVc  $81,2 \pm 3,6\%$ ). Auch hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der AR-Immunreaktivität der HDC-Tmt Neurone weder zwischen den Untergruppen (F(3;16) 1,944,  $p = 0,1633$ , OWA) noch zwischen dem medialen (TMM) und ventralen Abschnitt (TMV) des TMN ( $p = 0,52$ , unpaired t-test) festgestellt werden (vgl. Abb. 3.5.3.2b+3b). Ebenso wie bei der Altersgruppe der adoleszent-adulten Mäuse stellte sich heraus, dass der rostrale Anteil der ventralen Portion des TMN statistisch signifikant die größte Anzahl HDC-Tmt positiver Neurone umfasste, mit im Schnitt  $472 \pm 59$  Zellen pro Maus ( $p = 0,0016$  (TMMd),  $p = 0,0012$  (TMMv),  $p = 0,0378$  (TMVc), unpaired t-test, Abb.3.5.3.1b). Den statistischen Vergleich der Expressionsrate des AR beider Altersgruppen machen Abbildung 3.5.3.4a und 4b deutlich. Mit  $83,77 \pm 2,1\%$  in der Gruppe der adoleszent-adulten gegenüber  $80,14 \pm 2,14\%$  in der Gruppe der juvenilen Mäuse konnte kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der AR-Expression gefunden werden ( $p = 0,2298$ ). Gleiches gilt für die Gesamtzahl der HDC-Tmt positiven Neuronen beider Altersgruppen ( $p = 0,3686$ , unpaired t-test).

Zusammengefasst weisen etwa 80% der HDC-Tmt Neurone eine Androgenrezeptor-Immunreaktivität auf. Diese ist unabhängig von der Altersgruppe (juvenil vs. adoleszent-adult) und der einzelnen Untergruppen des TMN (TMMd vs. TMMv vs. TMVr vs. TMVc). Der rostrale Anteil der ventralen Portion des TMN (TMVr) ist der Abschnitt des TMN mit der größten Anzahl HDC-Tmt positiver Neurone.



**Abb. 3.5.3** Expressionslevel des Androgenrezeptor in den HDC-Tmt Neuronen juveniler (rechte Spalte) und adolescent-adulter (linke Spalte), männlicher Mäuse

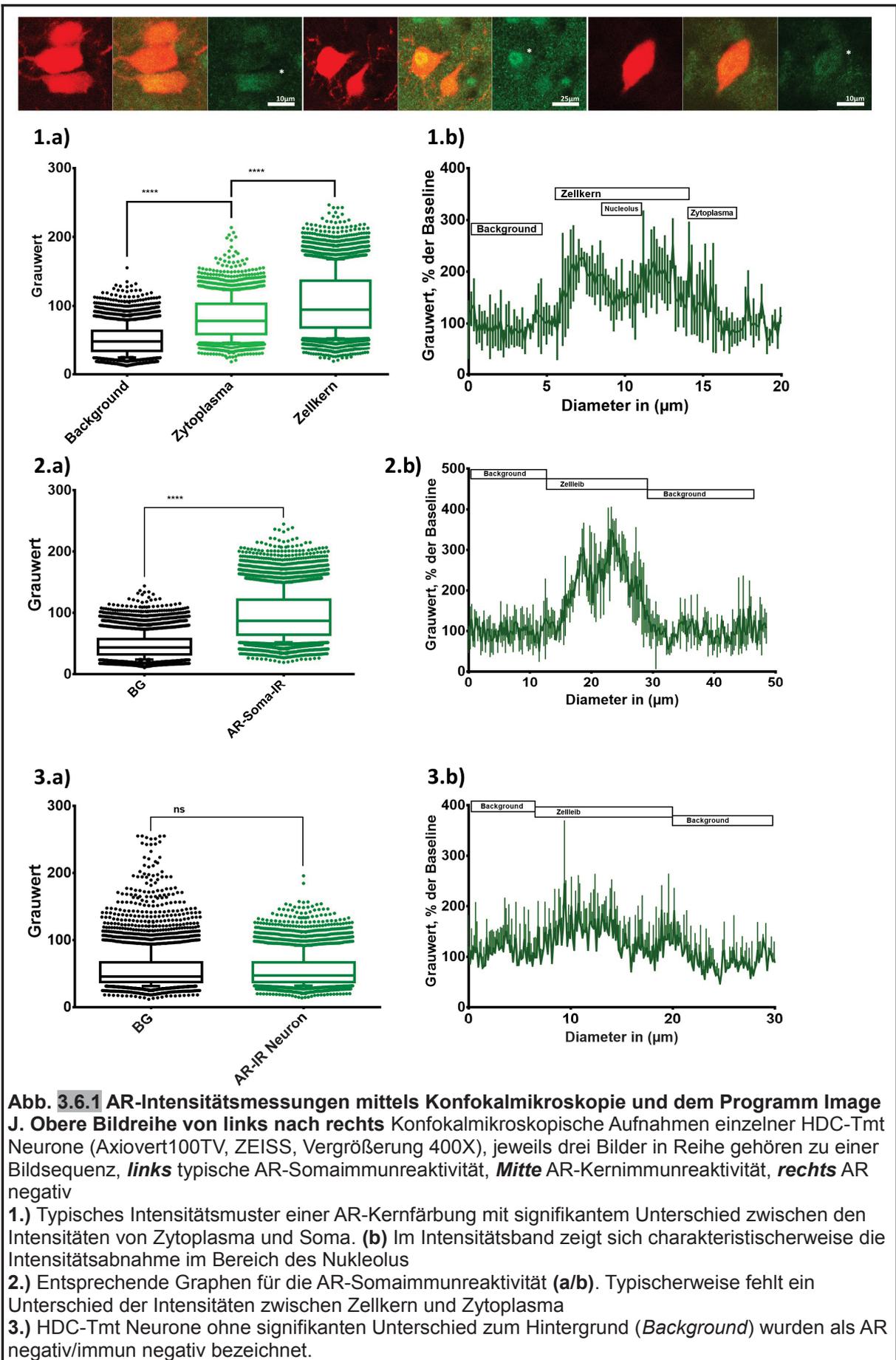
1. Absolute Zahlen der HDC-Tmt Neurone (rote Balken) und deren AR-Expression (grüne Balken) in der Gruppe der juveniler (a) und adolescent-adulter (b) Mäuse.
2. Anteil AR immunreaktiver HDC-Tmt Neurone an der Gesamtzahl pro Subgruppe und Altersgruppe (a/b). Es lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen (OWA)
3. Expressionslevel des AR der medialen vs. der ventralen Gruppe des TMN. Auch hier zeigt sich keine statistische Signifikanz (unpaired t-test)
4. AR-Expression der HDC-Tmt Neurone unabhängig von der Unterscheidung nach Subgruppen des TMN. Das Expressionslevel liegt bei beiden Altersgruppen um zirka 80%. Ein Altersunterschied in der AR-Expression lässt sich statistisch nicht festmachen.

### **3.6 Kernimmunreaktivität vs. Somaimmunreaktivität: Konfokalmikroskopische Aufnahmen und *Image J* Auswertungen**

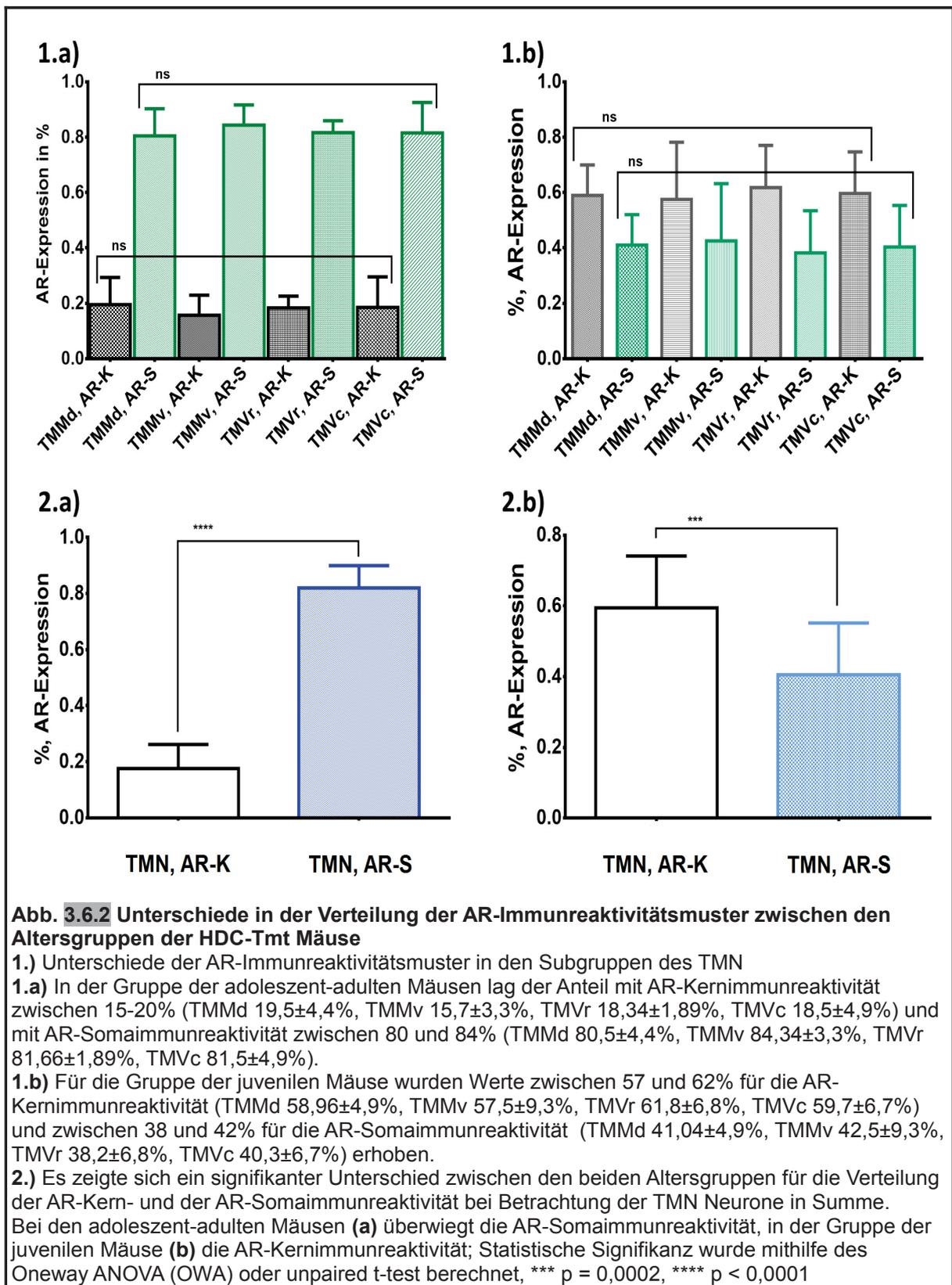
Bereits Wood und Newmann beschrieben in ihrer Publikation von 1999 das Vorhandensein von AR-Immunreaktivität im Zellkern sowie im Zytoplasma nach Färbung von Hirnschnitten männlicher syrischer Hamster mit einem, aus Kaninchenserum stammenden Anti-AR-Antikörper. Sie konnten zeigen, dass diese AR-Immunreaktivität von den Plasmatestosteronspiegeln abhängig ist. Kastrierte Hamster wiesen einen hohen Grad an Zytoplasmaimmunreaktivität auf, wohingegen bei gonadal intakten Männchen überwiegend AR-Kernimmunreaktivität vorzufinden war. Ähnliches konnten Lu et al., 1998 bei Mäusen, Clansy et al., 1992 an Ratten und Affen sowie Fernández-Guasti et al., 2000 an Menschen nachweisen.

Auch in dieser Arbeit konnte bei der Erhebung der Daten zur Expressionsrate des AR im TMN ein Unterschied in der Lokalisation des Androgenrezeptor in den HDC-Tmt Neuronen festgestellt werden. Zur Objektivierung dieser Beobachtung wurden konfokalmikroskopisch gesteuerte Intensitätsmessungen durchgeführt. Es wurde die Intensität der AR-Immunreaktivität als Grauwert gemessen. Die Intensitäten pro Neuron wurden als Mittelwert von vier Intensitätsmessungen durch die Zelle angegeben. Dabei konnten drei Formen der AR-Immunreaktivität deutlich voneinander unterschieden werden.

Zellen mit AR-Kernimmunreaktivität wiesen zwei Intensitätsstufen auf. Das Zytoplasma hatte eine Intensität von im Mittel  $82,5 \pm 0,6$  Grauwerteinheiten. Typische Intensitätswerte für den Zellkern lagen bei durchschnittlich  $103,7 \pm 0,6$  Grauwerteinheiten. Es zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied der Intensitäten von Zytoplasma und Zellkern (MWT,  $p < 0,0001$ , vgl. Abb. 3.6.1.1a). Die Zellen ohne signifikanten Unterschied zwischen den Intensitätswerten vom Zellkern und Zytoplasma wurden in die Kategorie der AR-Somaimmunreaktivität eingeordnet. Gemessene Werte beliefen sich auf im Mittel  $94,8 \pm 0,4$  Grauwerteinheiten (Abb. 3.6.1.2a). Es konnte ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen den Intensitätswerten der AR-Kern- und der AR-Somaimmunreaktivität gefunden werden (AR-Kern vs. AR-Soma,  $p < 0,0001$ , MWT). Die durchschnittliche Intensität des Hintergrunds betrug etwa  $50,84 \pm 0,21$  Grauwerteinheiten. Als nicht AR immunreaktiv bzw. AR negativ wurden Zellen mit mittleren Grauwerteinheiten um  $55 \pm 0,4$  bezeichnet, bei denen sich kein statistisch signifikanter Unterschied zur Hintergrundintensität zeigte ( $p = 0,3$ , MWT, Abb. 3.6.1.3a).



Mit der Idee eines möglichen Unterschieds in der Verteilung der AR-Immunreaktivitätsmuster der HDC-Tmt Neurone innerhalb der Subgruppen des TMN bzw. zwischen den beiden Altersgruppen der Mäuse, erfolgte eine erneute Untersuchung der AR immunreaktiven Zellpopulation (vgl. Abb. 3.6.2).



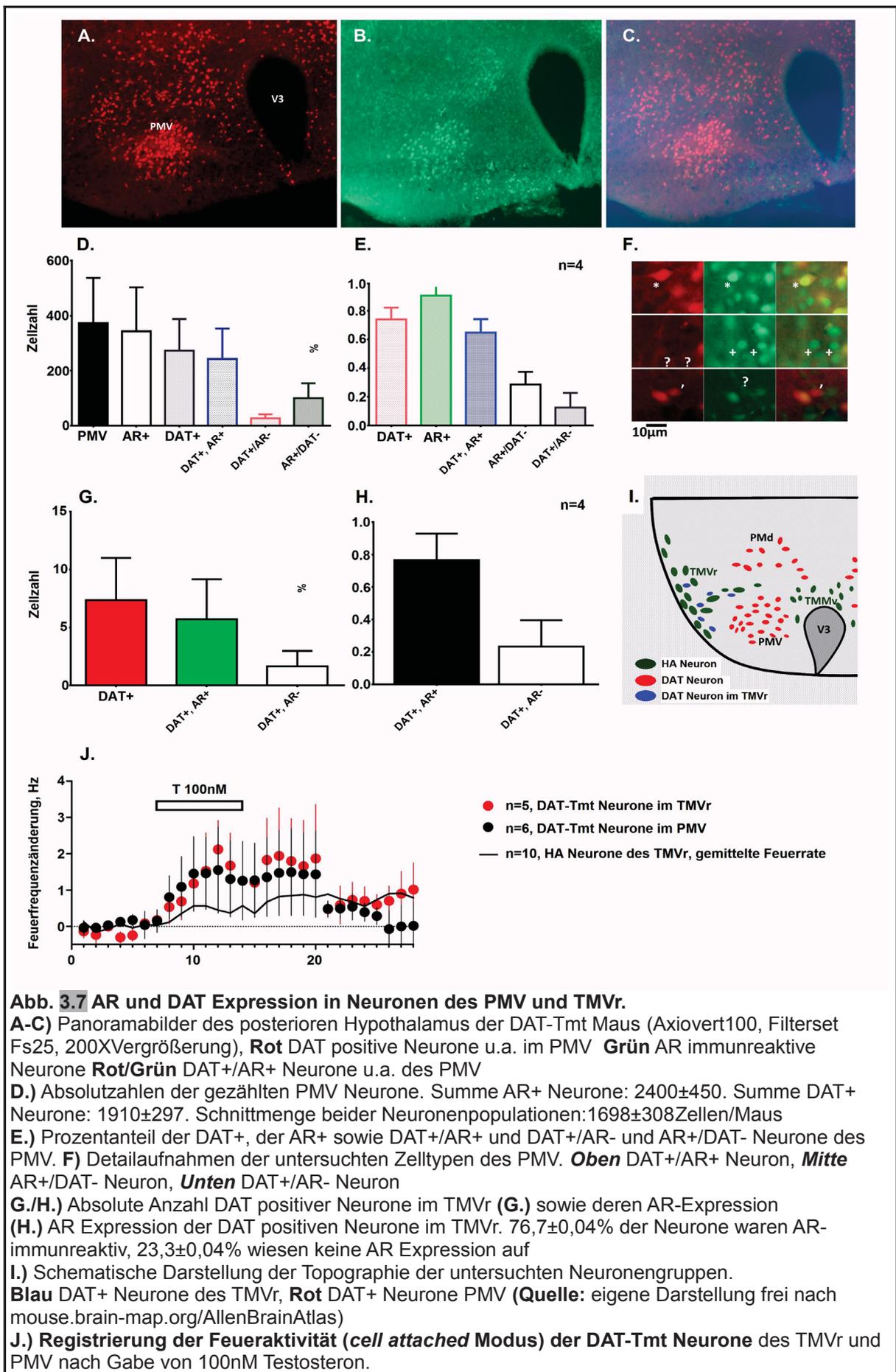
In der Altersgruppe der adolescent-adulten Mäuse konnte für den gesamten TMN ein Anteil der HDC-Tmt Neurone mit AR-Kernimmunreaktivität von etwa  $17,58 \pm 1,93\%$  festgestellt werden. Der Anteil der HDC-Tmt Neurone mit AR-Somaimmunreaktivität belief sich auf  $82 \pm 1,77\%$ . Für die genaue Verteilung der AR-Immunreaktivitätsmuster in den Untergruppen des TMN siehe Abbildung 3.6.2.1a. Weder für die Gruppe der Zellen mit AR-Kern- noch für die HDC-Tmt Neurone mit AR-Somaimmunreaktivität konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Untergruppen des TMN gefunden werden ( $F(3,16) = 0,19$ ,  $p = 0,9$ , OWA).

In der Altersgruppe der juvenilen Mäuse belief sich der Anteil der HDC-Tmt Neurone mit AR-Kernimmunreaktivität auf  $59,47 \pm 3,3\%$  gegenüber  $40,53 \pm 3,3\%$  der Zellen mit AR-Somaimmunreaktivität (Abb. 3.6.2.2b). Im Bezug auf die einzelnen Untergruppen des TMN gibt Abbildung 3.6.2.1b weiteren Aufschluss. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen konnte für keine Form der AR-Immunreaktivitätsmuster festgestellt werden ( $F(3,16) = 0,06$ ,  $p = 0,98$ , OWA).

Alles in allem konnte ein Unterschied im AR-Expressionsmuster der HDC-Tmt Neurone zwischen den beiden Altersgruppen gefunden werden. Bei den adolescent-adulten Mäusen zeigten etwa 18% der AR positiven HDC-Tmt Neurone eine Kernimmunreaktivität und 82% eine Somaimmunreaktivität. Die Altersgruppe der juvenilen Mäuse wies eine Verteilung von zirka 60% der AR immunreaktiven HDC-Tmt Zellen mit AR-Kernimmunreaktivität und 40% mit Somaimmunreaktivität auf. Zwischen den Untergruppen des TMN ließ sich unabhängig von der Altersgruppe kein signifikanter Unterschied im Anteil der AR-Expressionsmuster feststellen.

### **3.7 Expression des Androgenrezeptor in DAT positiven Neuronen des PMV und TMVr und Feuerfrequenzanstieg dieser Neuronenpopulation durch Testosteron**

In direkter Nachbarschaft zum TMN liegen weitere Neuronengruppen, die sich durch das Vorhandensein einer AR-Immunreaktivität auszeichnen, wie beispielsweise der PMV (vgl. Simerly et al., 1980). Bei den vorliegenden, immunhistochemischen Färbungen des TMN fielen immer wieder die Neurone des PMV mit deutlich erkennbarer, überwiegend Zellkern basierter AR-Immunreaktivität auf. Mithilfe der Kreuzung aus DAT/Cre-Maus (Parlato et al., 2006) mit der Reporter-Mauslinie B6J/N(Cg-Gt(ROSA)26Sortm14 (CAGtdTomato)) konnte die Expression des Dopamintransporter (DAT) im PMV nachgewiesen werden.



**Abb. 3.7 AR und DAT Expression in Neuronen des PMV und TMVr.**

**A-C)** Panoramabilder des posterioren Hypothalamus der DAT-Tmt Maus (Axiovert100, Filterset Fs25, 200XVergrößerung), **Rot** DAT positive Neurone u.a. im PMV **Grün** AR immunreaktive Neurone **Rot/Grün** DAT+/AR+ Neurone u.a. des PMV

**D.)** Absolutzahlen der gezählten PMV Neurone. Summe AR+ Neurone: 2400±450. Summe DAT+ Neurone: 1910±297. Schnittmenge beider Neuronenpopulationen: 1698±308 Zellen/Maus

**E.)** Prozentanteil der DAT+, der AR+ sowie DAT+/AR+ und DAT+/AR- und AR+/DAT- Neurone des PMV. **F)** Detailaufnahmen der untersuchten Zelltypen des PMV. **Oben** DAT+/AR+ Neuron, **Mitte** AR+/DAT- Neuron, **Unten** DAT+/AR- Neuron

**G./H.)** Absolute Anzahl DAT positiver Neurone im TMVr (**G.**) sowie deren AR-Expression

**(H.)** AR Expression der DAT positiven Neurone im TMVr. 76,7±0,04% der Neurone waren AR-immunreaktiv, 23,3±0,04% wiesen keine AR Expression auf

**I.)** Schematische Darstellung der Topographie der untersuchten Neuronengruppen.

**Blau** DAT+ Neurone des TMVr, **Rot** DAT+ Neurone PMV (**Quelle:** eigene Darstellung frei nach mouse.brain-map.org/AllenBrainAtlas)

**J.)** **Registrierung der Feueraktivität (cell attached Modus) der DAT-Tmt Neurone des TMVr und PMV nach Gabe von 100nM Testosteron.**

Es wurden die Neuronengruppen des PMV bezüglich der Expression des Androgenrezeptor und des Dopamintransporter sowie einer möglichen Überschneidung beider Neuronenpopulationen untersucht. Dazu dienten  $n = 4$  männliche DAT-Tmt Mäuse mit einem durchschnittlichen Alter von  $P = 22$  Tagen. Alle Daten beziehen sich auf die Halbseite eines  $25\mu\text{m}$ -Schnittes. Es wurden durchschnittlich jeweils  $273\pm 21$  DAT positive Neurone ipsi- und kontralateral des dritten Ventrikels gezählt. Die Zahl der AR immunreaktiven Neurone belief sich auf  $343\pm 30$  Zellen. Die Summe aller, im Bereich des PMV pro Halbseite gezählten DAT positiven und AR positiven Neurone abzüglich der Schnittmenge beider Neuronenpopulationen (AR+/DAT+) betrug im Mittel  $373\pm 31$  Zellen und wurde als 100% der PMV Neurone definiert (vgl. Abb. 3.7.D). Abbildung 3.7.E zeigt die Prozentanteile der Expression des AR und DAT im PMV. Etwa  $74,1\pm 0,02\%$  der PMV Neurone erwiesen sich als DAT immunopositiv. Der Anteil AR immunreaktiver PMV Neurone belief sich auf  $90,7\pm 0,02\%$ . Das Vorliegen einer Expression des Dopamintransporter und Androgenrezeptor konnte bei zirka  $64,8\pm 0,02\%$  der Neurone des PMV nachgewiesen werden. Etwa  $12,4\pm 0,02\%$  der DAT positiven Neurone wiesen keine AR-Immunreaktivität auf. Genauso zeigten ungefähr  $28,5\pm 0,02\%$  der AR immunopositiven Neurone keine DAT-Tmt Fluoreszenz (vgl. Abb. 3.7. E). Entsprechend wurden die in De Luca et al., 2016 beschriebenen, konditionellen Dopaminneurone im rostralen Anteil des ventralen TMN (TMVr) auf eine Expression des Androgenrezeptor untersucht. Diese Neurone unterscheiden sich elektrophysiologisch und pharmakologisch von den HA Neuronen des TMN. Sie exprimieren neben der L-Dopa-Decarboxylase, den vesikulären Monoamintransporter Typ 2 (VMAT2) und den Dopamintransporter (DAT), aber nicht die Tyrosinhydroxylase (TH). Daher sind sie zur Dopaminsynthese ausschließlich über die Aufnahme von Vorstufen wie L-DOPA fähig. Es wurden  $n = 4$  männliche DAT-Tmt Mäuse in einem durchschnittlichen Alter von  $P = 22$  Tagen ausgezählt. Die Daten beziehen sich auf den TMVr einer Halbseite eines  $25\mu\text{m}$  Schnitts. Pro Halbseite wurden im Mittel  $7,4\pm 1$  DAT immunopositive Neurone im TMVr gezählt. Durchschnittlich waren  $5,7\pm 1$  DAT immunopositive Neurone AR immunreaktiv und  $1,6\pm 0,4$  der DAT positiven Neurone ohne AR-Immunreaktivität. Dies entspricht einer Expressionsrate des AR von  $76,7\%$  (vgl. Abbildung 3.7.H). Zusammengefasst verfügen der PMV und der TMVr über eine Population DAT immunopositiver Neurone, die zu einem vergleichbaren Anteil den Androgenrezeptor exprimieren.

An dieser Stelle kommt die Frage auf, ob diese Androgenrezeptor exprimierenden Neurone beider Zellgruppen ebenso wie die HA Neurone des TMN mit einer Veränderung ihrer Feueraktivität nach Testosteronapplikation reagieren. Dazu wurden Spannungsklemmversuche im *cell attached* Modus an Hirnschnitten durchgeführt. Sowohl die DAT-Tmt Neurone des TMVr als auch die entsprechenden Neurone des PMV zeigten eine signifikante Zunahme ihrer Feueraktivität nach Testosteron ( $100\text{nM}$ ) (vgl. Abb. 3.7.J).

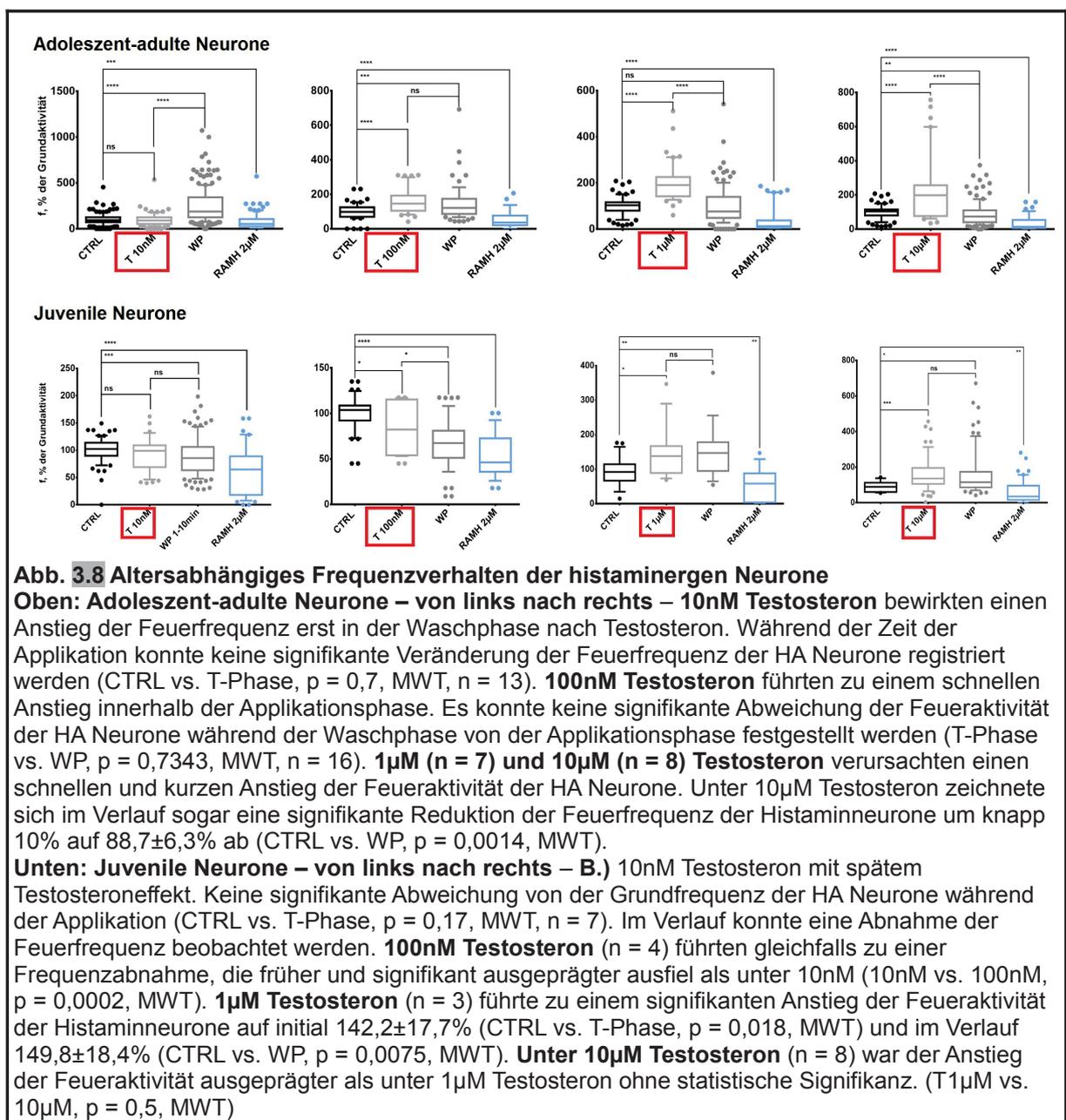
Das Frequenzverhalten beider Neuronengruppen zeigte sich nahezu identisch. Im Vergleich zu der Zunahme der Feueraktivität der HA Neurone des TMN konnte ein beinahe doppelt so hoher Frequenzanstieg in den DAT immunopositiven Neuronen beobachtet werden. Alles in allem konnte in der hier vorliegenden Arbeit neben der AR immunreaktiven Population der HA Neurone des TMN, eine AR immunopositive Population von DAT-Tmt Neuronen im TMN und PMV gefunden werden, die wie die HA Neurone des TMN mit einer Zunahme ihrer Feueraktivität nach Testosteronapplikation reagieren.

### **3.8 Das Alter ist von Bedeutung: Testosteroneffekt auf kultivierte TMN Neurone in Abhängigkeit von Konzentration und Alter**

Die Testosteronspiegel sind nicht konstant. Schon Borst und Mulligan, 2007 konnten zeigen, dass die Testosteronkonzentrationen gewissen Schwankungen unterworfen sind, die durch die Tageszeit (circadiane Rhythmik), die Jahreszeit sowie das Alter der entsprechenden, männlichen Organismen beeinflusst werden. So unterscheidet man drei Konzentrationsgipfel der Hormonkurve. Zum einen den intrauterinen Hormonexzess, in erster Linie durch Östrogen getragen, zum anderen den postpartalen Testosteronanstieg durch den plötzlichen Östrogenentzug sowie die Zunahme der Testosteronspiegel in der Pubertät im Rahmen der Aktivierung der GnRH-Neurone im Hypothalamus (vgl. Borst und Mulligan, 2007 und Quigley et al., 2002). Bei dieser Dynamik der Testosteronspiegel stellt sich die Frage nach Unterschieden im Antwortverhalten der histaminergen Nervenzellen auf Testosteron in Abhängigkeit vom Alter und des sexuellen Entwicklungsstadiums der Mäuse. Produziert Testosteron eine stereotype Antwort der HA Neurone oder reagieren Testosteron naive Neurone anders als Testosteron adaptierte Nervenzellen?

Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurden Kulturen von HA Neuronen des TMN auf Mikroelektrodenarrays in Abhängigkeit vom Alter in Kultur abgeleitet. Die Gruppe der juvenilen Zellen wurde mit einem Durchschnittsalter von  $10 \pm 3$  Tagen in Kultur definiert. Für die Gruppe der adoleszenten Zellen wurden  $19 \pm 4$  Tage in Kultur festgesetzt. Zur Detektion der histaminergen Zellen diente erneut R- $\alpha$ -Methylhistamin ( $2 \mu\text{M}$ ). In der Altersgruppe der adoleszenten, histaminergen Neurone konnten folgende Beobachtungen gemacht werden, die in Abbildung 3.8 Oben aufgeführt sind. In der Konzentration von  $10 \text{ nM}$  führte Testosteron zu einem starken Anstieg der Feueraktivität der HA Neurone auf durchschnittlich  $244,6 \pm 12,8\%$  (CTRL vs. WP,  $p < 0,0001$ , paired t-test) mit einer Latenzzeit von über 7 Minuten nach T-Applikation.  $100 \text{ nM}$  Testosteron verursachten einen schnellen Anstieg der Feueraktivität der

histaminergen Neurone unmittelbar nach Applikation (Latenzzeit < 7min) mit durchschnittlichen Frequenzen um  $158,3 \pm 11,1\%$  (CTRL vs. T-Phase,  $p < 0,0001$ ) und  $150,6 \pm 11,2\%$  (CTRL vs. WP,  $p = 0,0001$ , paired t-test) im Verlauf (Abb. 3.8 Oben). Bei  $1\mu\text{M}$  Testosteron zeigte sich ebenfalls ein schneller, aber nur kurz anhaltender Anstieg der Feueraktivität der HA Neurone auf durchschnittlich  $198,2 \pm 11,5\%$  ( $p < 0,0001$ , paired t-test) innerhalb der ersten 7 Minuten der Ableitung. Mit Eintritt der Waschphase zeichnete sich ein unmittelbarer Rückgang des Anstiegs auf Ausgangsaktivitätsniveau ab. Mit  $10\mu\text{M}$  Testosteron zeigte sich ähnliches Verhalten der Feueraktivität der histaminergen Neurone. Nach Anstieg der Feuerfrequenzen auf etwa  $224,6 \pm 29\%$  ( $p < 0,001$ , paired t-test) unmittelbar nach Testosteronapplikation, konnte ein sofortiger Rückgang des Anstiegs bis hin zur Abnahme der Feueraktivität unter Ausgangsniveau beobachtet werden (Abb. 3.8 Oben).



Alles in allem führte Testosteron in der Altersgruppe der adoleszenten, histaminergen Neurone in physiologischen bis hoch physiologischen Konzentrationen (10-100nM) zu einem deutlichen Anstieg der Feueraktivität der HA Neurone auf 3-5Hz (150-250%).

In unphysiologischen Konzentrationen (1-10 $\mu$ M) zeigte Testosteron nach initialem Anstieg der Feueraktivität auf 4 bis 5Hz einen neutralen bis hemmenden Effekt auf die Feuerfrequenz der histaminergen Neurone. Somit konnte für das Alter der adoleszenten Mäuse ein, vor allem in physiologischen Konzentrationen exzitatorischer Effekt von Testosteron nachgewiesen werden.

Die Daten für die Gruppe die juvenilen Zellen zeigt Abbildung 3.8 Unten. Details sind dem Subtext zu entnehmen. In Zusammenschau der Daten für diese Altersgruppe der Testosteron-naiv/juvenilen, histaminergen Neurone führte Testosteron in physiologisch bis hoch physiologischen Konzentrationen (10-100nM) zu einer Abnahme der Feuerfrequenz der HA Neurone um etwa 10-30% der Ausgangsaktivität. Erst unphysiologisch hohe Testosteronkonzentrationen (110 $\mu$ M) bewirkten einen Anstieg der Feueraktivität der HA Neurone um zirka 40-60% (3Hz) der Grundfrequenz. Testosteron scheint demnach auf juvenile HA Neurone in physiologischen Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt zu haben.

# Kapitel 4. Diskussion

## 4.1 Überblick

Diese Arbeit beschreibt erstmals einen direkten Effekt von Testosteron auf die Feueraktivität der HA Neurone des tuberomamillären Kerns. Testosteron führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der Feueraktivität akut isolierter HA Neurone der Maus sowie von Neuronen in Hirnschnitt-Präparaten in Spannungsklemmversuchen im *cell attached* Modus. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen unter Verwendung von chemischen (Fluo-4-AM) sowie genetisch kodierten Kalziumindikatoren (GECIs) konnte zudem ein transients Kalziumionenstrom als Antwort der HA Neurone auf Testosteron nachgewiesen werden. Die Zucht und Verwendung einer neuen, transgenen Mauslinie, die das GCaMP6f-Gen in den histaminergen Zellen unter dem HDC-Promoter exprimiert, wurde eingeführt. Eine Beteiligung der Kalziumionenströme am Frequenzanstieg der HA Neurone konnte jedoch nicht festgestellt werden. Der Androgenrezeptorantagonist Flutamid hingegen blockierte den Testosteron bedingten Frequenzanstieg der HA Neurone. In immunhistochemischen Färbungsreihen konnte nachgewiesen werden, dass über 80% der HA Neurone im HDC-Tmt Mausmodell eine Androgenrezeptor(AR)-Expression aufwiesen. Hierbei zeigte sich, dass die Zellkernfärbung signifikant häufiger bei juvenilen als bei adoleszenten Neuronen vorkommt, was auf eine Altersdynamik der Testosteronkonzentrationen im Blutplasma schließen lässt. Entsprechend konnte ein altersabhängiges Feuerverhalten kultivierter Neurone auf Testosteron beobachtet werden.

Eine neue Gruppe konditionell dopaminergener Neurone im TMN mit, von den HA Neuronen unterschiedlichen, elektrophysiologischen Eigenschaften konnte entdeckt werden (De Luca et al, 2016). Es zeigte sich, dass diese dopaminergen Neurone ebenso häufig wie die HA Neurone des TMN den AR exprimieren. Als Referenz diente eine bekannte, dopaminerge Neuronengruppe aus der benachbarten Region des TMN, der PMV, die sich durch einen entsprechend hohen Anteil an AR-Expression auszeichnet. Darüber hinaus konnte bei den dopaminergen Neuronen des TMN und PMV ein, dem der HA Neurone entsprechendes Feuerverhalten nach Testosteronapplikation beobachtet werden.

Zusammengefasst aktiviert Testosteron nicht nur HA Neurone, sondern auch konditionell dopaminerge Neurone des TMN und PMV, welche durch erregende Verbindungen zu den HA Neuronen die Vigilanz fördernde Wirkung von Testosteron verstärken können. Im Folgenden werden oben aufgeführte Befunde im Detail diskutiert.

## 4.2 Testosteron erhöht die Feueraktivität der Histaminneurone des TMN dosisabhängig

Erstmals konnte ein direkter Effekt von Testosteron auf die Feueraktivität der HA Neurone des tuberomamillären Kerns in männlichen Mäusen nachgewiesen werden.

Spannungsklemmversuche an akut dissoziierten Neuronen des TMN ergaben eine Zunahme der Feueraktivität der Neurone auf das Zwei- bis Dreifache (4-6Hz) der Spontanaktivität.

Der Effekt von 1µM Testosteron setzte innerhalb von 2-3 Minuten ein und dauerte mindestens 15 Minuten. Die Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen von Pfaff und Pfaffmann, 1969 überein: systemische und lokale Applikation von Testosteron erhöhte die Spontanaktivität von Neuronen der *Area praeoptica* und des *Bulbus olfactorius*.

Einen ebenfalls exzitatorischen Effekt auf die Feueraktivität von Neuronen publizierte Yamada, 1979 an Nervenzellen im Bereich des *Nucleus septi lateralis* und des anterioren Hypothalamus. Typisches Zielgewebe der Untersuchungen waren stets Kerngebiete, deren Beteiligung im Zusammenhang mit Sexualverhalten bekannt war.

Eine Verbindung zwischen Testosteron und dem TMN konnte nun zum ersten Mal beschreiben werden, ausgehend von einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um JS Lin, zur Beteiligung histaminerger und orexinerger Neurone am *sexual arousal* männlicher Mäuse. In diesem Zusammenhang kam die Frage auf, ob Testosteron einen Wachheit vermittelnden Effekt über die HA Neurone herstellt.

Punkt zur Diskussion gibt die Übertragbarkeit der Versuche ins physiologische *Setting*.

Die Wahl einer Testosteronkonzentration von 1µM ist anfechtbar. Physiologische Testosteronkonzentrationen sind abhängig von der jeweiligen Spezies und dem betrachteten Kompartiment wie Testosteron abhängiges Gewebe oder Plasma. Weitere Einflussfaktoren sind das Alter mit dem Ausmaß der geschlechtlichen Entwicklung sowie Tages- und Jahreszeit (vgl. Borst und Mulligan, 2007). Repräsentative Testosteronspiegel bei Nagetieren wie zum Beispiel Ratten liegen bei 200-800nM in Testosteron abhängigen Geweben und etwa 20-80nM im Blutserum (Walker, 2009). Beim Menschen belaufen sich die Werte laut Borst und Mulligan auf durchschnittlich 22,6nM im Plasma (15,6-34,7nM).

Androgen abhängige Gewebe wie Hodengewebe bei geschlechtsreifen Männern sind jedoch in der Lage das Sexualhormon in höheren Konzentrationen von 340-2000nM Testosteron anzureichern. Die Konzentration von 1µM Testosteron ist somit am ehesten in den Bereich hoch normaler Werte in Geweben bzw. grenzwertig unphysiologischer Plasmaspiegel anzusiedeln. Es gibt jedoch zu bedenken, dass das Gehirn in Abhängigkeit vom Zustand des Organismus (Stress, sexuelle Stimulation) die Sexualhormone aus der Peripherie aufnehmen und akkumulieren sowie zusätzlich endogen aus Cholesterol oder Vorstufen synthetisieren kann (Birzniece et al., 2006). So konnten Barbaccia et al., 1997 beispielsweise

zeigen, dass pharmakologisch bzw. physiologisch induzierter Stress die Konzentration des Neurosteroids Allopregnanolon signifikant erhöht. Eine durch sexuelle Stimulation ausgelöste Zunahme der Testosteronspiegel im zentralen Nervensystem über die physiologischen Werte hinaus, ist daher denkbar. Grenzen bei der Wahl der entsprechenden Testosteronkonzentration sind zu berücksichtigen. Estrada et al., 2006 beschrieben, dass mikromolare Testosteronkonzentrationen ein neurotoxisches Potential haben können. In Kulturen von Neuroblastomzellen konnten sie zeigen, dass in nanomolaren Testosteronkonzentrationen die Anzahl vitaler Zellen nach 24h unverändert, jedoch unter mikromolaren Konzentrationen von Testosteron eine signifikante Abnahme vitaler Zellen zu beobachten war. Wie in der Übersichtsarbeit von Michels und Hoppe, 2008 zusammengefasst, sind Konzentrationen oberhalb  $1\mu\text{M}$  als unphysiologisch anzusehen und deren Effekte im physiologischen Kontext kritisch zu beurteilen.

Bei jedem potentiellen Effekt von Testosteron stellt sich die Frage nach einer direkten Testosteron abhängigen Antwort bzw. der Möglichkeit einer Beteiligung von Neurosteroiden. Neurosteroide sind endogen vom Hirngewebe aus Cholesterol bzw. Vorstufen wie Pregnenolon oder Testosteron synthetisierte Steroidhormonderivate. Die Hauptproduktionsorte im zentralen Nervensystem sind Myelin bildende Gliazellen, aber auch die Nervenzellen selbst. Die möglichen Synthesewege von Testosteron sind die Aromatisierung zu Estradiol oder die Reduktion zu Androstandiol (Baulieu, 1998, Reddy, 2003).

Bezüglich der Expression der Aromatase in HA Neuronen konnten Roselli, et al., 2001 in Javaneraffen zeigen, dass der tuberomamilläre Kern über keine Expression der Aromatase verfügt. In einer weiteren Publikation von Roselli an Ratten (Roselli, et al., 1985) sowie in einer neueren, umfangreichen Arbeit über die Koexpression der Aromatase, des Androgen- und Estrogenrezeptor adulter Mäuse blieb der Nachweis einer Aromataseexpression ebenfalls aus (Stanic et al., 2014). Von einer Östrogenwirkung auf die HA Neurone ist daher nicht auszugehen. Die Umwandlung in Androstandiol scheint weiterhin möglich. Genauere Ausführungen finden sich im Abschnitt 4.4. Die Durchführung entsprechender Spannungsklemmversuche mit Antagonisten des Synthesewegs dieses Neurosteroids des Testosteron, wie die Vorinkubation mit Finasterid ( $5\alpha$ -Reduktase) oder Indomethacin ( $3\alpha\text{HSD}$ ) ist zu genaueren Differenzierung anzustreben (Reddy, 2003). Um diesem, oben beschriebenen möglichen Einfluss der Gliazellen zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode des akuten Isolierens der Zellen angewandt. Auf diese Weise wurden möglichst „nackte“ Nervenzellen gewonnen. Nachteil dieser Methodik ist die geringere Membranstabilität der Neurone, was ein Ableiten über 15 Minuten sowie das Untersuchen einer Zellprobe länger als 30-45 Minuten unmöglich macht. Aus diesem Grund ist eine genaue Aussage bezüglich der Dauer des Testosteroneffekts nicht zu treffen. Zudem kann eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Testosteron und dem

Frequenzverhalten der HA Neurone angenommen werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nur für die Waschphase nachweisen. In der Applikationsphase konnte, unter Ausschluss der Dosis von 0,1nM Testosteron, kein Unterschied im Frequenzverhalten der HA Neurone bei den untersuchten Testosterondosierungen (0,1, 10, 100, 300nM, 1µM, 10µM) beobachtet werden. Eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte sich auch für die Latenzzeit der Testosteron Antwort nach Applikation. Hier scheint eine reziproke Beziehung zu bestehen: mit steigenden Konzentrationen nimmt die Latenzzeit ab. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Testosteron beschrieben auch Estrada et al. 2006 im Zusammenhang mit der Kalziumionenfreisetzung in Neuroblastomzellen. Hier zeigte sich eine Zunahme der Amplitude des Kalziumionenstroms mit zunehmender Testosteronkonzentration von 0,1nM bis 1000nM. Eine, den hier vorliegenden Untersuchungen entsprechende Versuchsreihe existiert zudem für Estradiol an GnRH-Neuronen. Chu et al., 2009 konnten für Estradiol in den Konzentrationen von 0,1nM bis 100nM eine dosisabhängige Zunahme der Feueraktivität der GnRH-Neurone zeigen. Außerdem konnte auch mit steigender Konzentration eine Zunahme der Anzahl aktiver Zellen beobachtet werden. Veränderungen der Latenzzeit in Abhängigkeit der Estradiolkonzentrationen wurden in dieser wie auch in den meisten Arbeiten zu elektrophysiologischen Eigenschaften von Steroidhormonen/Testosteron (Orsini et al., 1985, Pfaff und Pfaffmann, 1969) nicht berücksichtigt. Dem gegenüber steht die Arbeit von Shakil et al., 2002, an GT1-7-GnRHNeuronen, die weder für Testosteron noch für Dihydrotestosteron eine Dosis-Wirkungs-Beziehung finden konnten. Die hier beschriebenen Daten zum Feuerverhalten der HA Neurone, der Latenzzeit des Frequenzanstiegs und der verwendeten Testosteronkonzentrationen stehen im Einklang. Lediglich in mikromolaren Dosierungen konnte eine signifikante Frequenzzunahme bereits in der Applikationsphase (Dauer 5 Minuten) beobachtet werden. Erst in diesen hohen Konzentrationen liegt die Latenzzeit unter 5 Minuten und damit in der Applikationsphase. Entsprechend ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung während der Applikationsphase fragwürdig. Eindeutig wird dieser Zusammenhang erst in der Waschphase (ab Minute 5) bei entsprechend signifikanten Feuerfrequenzanstiegen unabhängig der verwendeten Konzentrationen von Testosteron. Die HA Neurone des TMN reagieren mit einer Zunahme der Feueraktivität auf Testosteron und zwar dosisabhängig und je schneller, je höher die gewählte Testosteronkonzentration ist.

### 4.3 Testosteron erhöht den intrazellulären Kalziumspiegel in Kulturen von TMN Neuronen

Was in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist, dass es sich bei dem hier beschriebenen Testosteroneffekt um einen schnellen, nach heutigem Wissensstand, nicht genomischen Effekt, handeln muss, der laut Walker, 2009 die typischen Eigenschaften wie kurze Latenzzeit (< 30-40min) und hohe benötigte Testosteronkonzentrationen erfüllt. Es stellt sich die Frage nach der zugrunde liegenden Signalkaskade. Ein weitverbreiteter und für Testosteron bisher relativ gut untersuchter *second messenger* sind die Kalziumionen ( $Ca^{2+}$ -Ionen). Es existieren Studien von Testosteron an einer Vielzahl von Zell- und Gewebetypen wie Zellen der Genitalorgane (Prostata-Karzinom-Zellen (Steinsapir et al., 1991; Sun et al., 2006), humane Granulosa-Lutein-Zellen (Machelon et al., 1998), Sertoli-Zellen von Ratten (Lyng et al., 2000)), Immunzellen (Osteoblasten (Lieberherr und Grosse 1994), Makrophagen (Benten et al., 1999; Guo et al., 2002), murinen T-Zellen (Benten et al., 1997), Muskelzellen (Skelettmuskelzellen (Estrada et al., 2003), Herzmuskelzellen von Ratten (Vicencio et al., 2006), glatte Gefäßmuskelzellen (Hall et al., 2006)), Neuroblastomzellen (Estrada, 2006) und Nierenzellen von Ratten (Couchourel et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden Kalziumfluoreszenzmessungen an Kulturen akut dissoziierter Nervenzellen des posterioren Hypothalamus sowie an HA Neuronen der GCaMP6f-Maus in Abhängigkeit von Testosteron (1  $\mu$ M) durchgeführt. Dabei wurde ein langsamer, transienter Kalziumionenstrom gemessen, der zu einer Zunahme des intrazellulären Kalziumspiegels um 1-4% des Ausgangsniveaus führte. Im Bezug auf den Effekt von Kaliumchlorid als Referenzsubstanz eines stereotypen, parabelförmigen Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration belief sich die Testosteronwirkung auf ein Zehntel bis ein Fünftel des Kaliumchlorideffekts. Die Latenzzeit betrug 8 Minuten. Der Effekt lag außerhalb der Applikationsphase und erstreckte sich über einen Zeitraum von knapp 25 Minuten. Es konnten ebenfalls vereinzelte, oszillative Elemente beobachtet werden. Die Vergleichbarkeit mit existierenden Daten gestaltet sich schwierig, da der Kalziumeffekt zellspezifisch zu sein scheint und es sich nicht um ein redundantes Signal handelt. Des Weiteren sind die unterschiedlichen Versuchsregime zu berücksichtigen, wie beispielsweise das Verwenden akut dissoziierter Neurone (Gorczynska und Handelsman, 1995) gegenüber Neuronen aus Kulturen (Estrada et al., 2006, Steinsapir et al., 1991, Shakil et al., 2002) oder die Inkubationszeit mit dem Fluoreszenz-farbstoff Fura2AM und dessen neueren Derivaten. Die beste Vergleichslage besteht zu den Studien von Estrada et al., 2006 an Neuroblastomzellen und Shakil et al., 2002 an GT1-7-Neuronen, einem Nervenzellmodell für die GnRH-Neurone. Beide nutzten Neuronenkulturen, die in vergleichbaren Nährmedien gehalten wurden. Bei der Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff verwendeten beide eine

Inkubationszeit von 30 Minuten in Gegensatz zu 60 Minuten in den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit. Als Fluoreszenzfarbstoff kam Fura2AM (Shakil et al.) oder Fura4AM (Estrada et al.) zur Verwendung. Estrada et al. konnten einen schnellen Testosteroneffekt nach knapp 30 Sekunden mit einer Zunahme des intrazellulären Kalziumspiegels um 200-300% beobachten. Der Effekt hatte einen überwiegend oszillativen Charakter und zeigte Konzentrationsabhängigkeit mit einem maximalen Ausmaß bei 100nM Testosteron. Im Gegensatz dazu beobachteten Shakil et al. einen überwiegend transienten Testosteroneffekt, der sich nach etwa 200 Sekunden (3-4 Minuten) einstellte und einen signifikanten Anstieg um 200-600% des Ausgangsspiegels umfasste. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht festgestellt werden. Die verwendeten Testosteronkonzentrationen lagen zwischen 10nM und 400nM. Der, in den hier zugrunde liegenden Versuchen an den Neuronen des posterioren Hypothalamus oder an den HA Neuronen der GCaMP6f-Maus beobachtete Effekt deckt sich nicht mit den Ergebnissen der oben beschriebenen Studien. Der Ausmaß des Testosteron bedingten Kalziumionenstroms entspricht nur einem Bruchteil dessen bei Estrada et al. und Shakil et al. Ähnlich Shakil et al. dominiert ein transienter Kalziumionenstrom. Weiterhin inkongruent zu den genannten Studien ist die erheblich längere Latenzzeit, aber auch die deutlich längere Wirkungsdauer (25 Minuten vs. 10 Minuten). Frappierend ist die Übereinstimmung der Ergebnisse der hier vorliegenden Versuchsreihe zwischen den nicht spezifizierten Neuronen der Kulturen des posterioren Hypothalamus und den histaminergen Neuronen des GCaMP6f-Mausmodells. Entsprechend der Divergenz der hier vorliegenden Daten mit denen der angeführten Studien, stellt sich die Frage, ob dieser langsame und schwache transiente Kalziumionenstrom als Auslöser des Feuerfrequenzanstiegs der HA Neurone nach Exposition von Testosteron fungiert. Nach Stevens et al., 2001 existiert eine Reihe von Kalziumionenkanälen (L-, T-, N- und P/Q-Typ) in der Membran der histaminergen Neurone, die an der Entstehung der Aktionspotentiale dieser Neurone beteiligt sind. Eine Testosteron bedingte Aktivierung dieser Kalziumionenkanäle, wie es beispielsweise für die L-Typ-Kalziumionenkanäle in Kardiomyozyten (Michels et al., 2006) oder Skelettmuskelzellen (Estrada et al., 2003) oder Sertoli-Zellen (Lyng et al., 2000) beschrieben wurde, ist prinzipiell möglich. Zur Klärung dieses Zusammenhangs wurden Spannungsklemmversuche im *cell attached* Modus in Kalzium freiem Medium und Kontrollmedium durchgeführt. Dabei zeigte sich kein Unterschied im Feuerverhalten der HA Neurone zwischen den beiden Medien. Lediglich in der späten Waschphase konnte im Kalziumhaltigen Medium im Gegensatz zur Kalzium freien Lösung eine Fortführung des Frequenzanstiegs beobachtet werden. Damit scheiden die Kalziumionen als Träger des Testosteron bedingten Anstiegs der Feuerfrequenz der HA Neurone aus.

## 4.4 Der Androgenrezeptor ist Bestandteil der Signalkaskade des Testosteroneffekts: Flutamid-Wirkung und Expression des Androgenrezeptor

Eine zentrale Frage bei der Analyse der Signalkaskade eines nicht genomischen Testosteroneffekts ist die Beteiligung des klassischen Androgenrezeptor.

In der umfangreichen Literatur hierzu erfolgt eine Einteilung der nicht genomischen Testosteron Signalwege in Androgenrezeptor abhängig oder Androgenrezeptor unabhängig. Zusammenfassend gelten apoptotische Signale in Krebszelllinien (Prostata-Krebszellen, Papadopoulou et al., 2009) oder Signalwege unter Beteiligung des *second messenger* Kalzium in Skelettmuskelzellen (Estrada et al., 2003), glatten Gefäßmuskelzellen (Jones et al., 2004) oder Sertoli-Zellen (Walker, 2010) als Androgenrezeptor unabhängige Signalkaskaden. Eine Beteiligung des Androgenrezeptor konnte hingegen für die nicht genomischen Signalkaskaden mitotischer und antiapoptotischer Signale in Krebszelllinien (Sun, M, et al., 2003) oder Sertoli-Zellen (Walker, 2009) sowie für die NO-Produktion in Endothelzellen (Yu et al., 2010/2012) nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis einer Androgenrezeptor Beteiligung an der Feuerfrequenzsteigerung der HA Neurone einerseits durch Spannungsklemmversuche unter Verwendung des Androgenrezeptorantagonisten Flutamid und andererseits durch immunhistochemische Färbungen bezüglich der Expression des Androgenrezeptor in den HA Neuronen. Die Spannungsklemmversuche zeigten, dass unter 10µM Flutamid eine signifikant niedrigere Feueraktivität der HA Neurone im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden konnte. Der Effekt entsprach einer Reduktion des Frequenzanstiegs um 29% während der Applikationsphase und 41% während der Waschphase. Zudem konnte in den immunhistochemischen Untersuchungen am HDC-Tmt Modell der HA Neurone nachgewiesen werden, dass unabhängig vom Alter der Maus oder der Subgruppe des TMN 80-83% der Neurone eine AR-Immunreaktivität aufwiesen und damit den Androgenrezeptor exprimierten.

Die Datenlage zur AR Beteiligung an nicht genomischen Testosteronsignalwegen in Nervenzellen ist dünn und diese Arbeit die erste, die diesen Zusammenhang an den HA Neuronen des tuberomamillären Kerns beschreibt. Darüber hinaus ist diese Arbeit auch die erste, die eine derart detaillierte Darstellung der Expression des Androgenrezeptor im tuberomamillären Kern sowie dessen Anatomie anhand der HDC-Tmt Modellmaus darbietet. Mit der Verwendung des nichtsteroidalen Antiandrogens Flutamid zum Nachweis einer Beteiligung des Androgenrezeptor stehen die hier beschriebenen Untersuchungen im Einklang mit den meisten Arbeitsgruppen. Beispielsweise verwendeten Campelo et al., 2012 an Endothelzellen Flutamid in der Konzentration von 50nM über 60 Minuten.

Jones et al., 2004 verwendeten dagegen 10µM Flutamid über 30 Minuten Vorinkubation. Bei Shakil et al., 2002 kam in den Versuchen an den GnRH-Zelllinien Hydroxyflutamid in der Konzentration von 10µM über 60 Minuten zur Anwendung. Erkenntnisse bezüglich der AR Beteiligung an nicht genomischen Testosteroneffekten an Nervenzellen stammen zum Beispiel von Shakil et al., 2002. Sie konnten für die GnRH-Nervenzelllinien GT1-7 eine Abhängigkeit der Signalkaskade des beobachteten Androgeneffekts vom klassischen AR sowohl durch die pharmakologische Hemmung mittels Hydroxyflutamid als auch durch den immunhistochemischen Nachweis einer Plasmamembran bezogenen Population des Androgenrezeptor nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten Estrada et al., 2006 an Neuroblastomzellen keinen Einfluss des klassischen Androgenrezeptor auf den Kalziumionenstrom zeigen. Weder die genetische via siRNA noch die pharmakologische Hemmung des AR via Cyproteronacetat konnten den Effekt auf den Kalziumionenstrom unterbinden. Der immunhistochemische Nachweis der Existenz des Androgenrezeptor konnte jedoch initial erbracht werden. Auch hier scheinen die Testosteron bedingten Signalkaskaden einem strengen Zelltropismus zu unterliegen.

Es stellt sich nun die Frage nach der Effektivität und Spezifität des Flutamid als zuverlässigen Androgenrezeptorantagonisten für den Nachweis einer Beteiligung des Androgenrezeptor an der entsprechenden Signalkaskade. Wie es im Review von Singh et al., 2000 beschrieben ist, handelt es sich beim Flutamid um den ersten Vertreter der Gruppe nichtsteroidaler Androgenrezeptorantagonisten, deren ein reiner antagonistischer Effekt ohne umfangreiche Nebenwirkungen und zusätzliche Hormonwirkungen nachgesagt wird. Diese Betrachtung scheint jedoch einer Revision würdig: wie in dieser Arbeit zu sehen ist, bewirkt Flutamid ein signifikantes Absinken der Feueraktivität der HA Neurone, aber keine vollständige Blockade dieses Effekts. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Ilagan et al., 2005, die den Zusammenhang zwischen dem Androgenrezeptor und der Flutamid-Therapie an Prostatakrebszellen untersuchten. Dabei konnten sie zeigen, dass Flutamid zwar als potenter Inhibitor des Androgenrezeptor fungiert, dieser Effekt jedoch nur etwa einem Drittel dem, der medikamentösen Kastrierung entspricht. Zudem konnten sie unter Flutamid-Therapie eine Zunahme des intranukleären AR-Pools beobachten.

Erklärung dieses Phänomens können eventuell die Ergebnisse von Nyugen et al., 2007 liefern, die für Cyproteronacetat und Flutamid einen agonistischen Effekt unter Beteiligung des Androgenrezeptor im Rahmen neuroprotektiver Signale hippocampaler Neurone beobachten konnten. Signale, die über die klassischen AR-Signalwege vermittelt werden, wie beispielsweise die Expression der 5α-Reduktase, unterlagen ihren Beobachtungen nach einer vollständigen Inhibierung durch beide Antagonisten. Die über einen nicht genomischen Weg vermittelte Neuroprotektion konnte aber von keinem der beiden Antagonisten unterbunden werden, sondern es konnte im Gegenteil eine agonistische Wirkung für beide

AR-Antagonisten nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass Flutamid über ein intrinsisches, agonistisches Potential verfügt. So konnten Camins et al., 1992 zeigen, dass Flutamid mit peripheren Benzodiazepinrezeptoren interagieren kann und somit eine analgetische Wirkung hat. Des Weiteren berichteten Ahmadiani et al., 2003 von einem antiepileptischen Potential des Flutamid durch die Interaktion mit der Benzodiazepin Bindungsstelle der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aufgrund einer Strukturähnlichkeit der beiden Substanzgruppen. Das antiandrogene Potential der AR-Antagonisten wie Flutamid scheint demnach vom entsprechenden Signalweg abzuhängen. Klassische Androgensignale wie die Expression Androgen abhängiger Gene werden vollständig antagonisiert. Nicht genomische Signalwege unter Beteiligung des AR können sowohl antagonisiert aber auch im Sinne eines Agonisten verstärkt werden. Der inhibitorische Effekt von Flutamid auf die Testosteron abhängige Frequenzsteigerung der HA Neurone lässt sich in Zusammenschau der angeführten Studien neben der kompetitiven Blockierung des Androgenrezeptor durch die Rekrutierung des AR in den Zellkern erklären, wodurch der Pool der zytoplasmatischen Androgenrezeptoren, der für den Effekt auf das Membranpotential notwendig ist, abnimmt. Ein intrinsischer, agonistischer Effekt von Flutamid ist nicht vollständig auszuschließen. Detaillierte Daten zur Expression des Androgenrezeptor in den Neuronen des TMN gibt es ebenfalls nur spärlich. Immunhistochemische Untersuchungen fehlen. Lediglich als Randbemerkung in den großen In-situ-Hybridisierungsstudien (Roselli et al., 2001) findet der TMN als AR exprimierendes Kerngebiet Erwähnung. Vergleichbare Studien zu der vorliegenden Arbeit beschäftigen sich nur mit der Expression des Estrogenrezeptor (ER $\alpha/\beta$ ) im TMN. So beschrieb Fekete, 1999 an weiblichen Ratten mittels immunhistochemischer Färbungen den Nachweis von ER $\alpha$ -Immunreaktivität in allen Subgruppen des TMN ohne signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Fraktionen des TMN. Die Werte lagen zwischen 66-81% und im Mittel bei etwa 76%, einem Expressionslevel vergleichbar mit den, in dieser Arbeit angeführten Daten für den Androgenrezeptor in der männlichen HDC-Tmt Maus. Ähnliches konnten Gotoh et al., 2009 an weiblichen Ratten nachweisen. Sie fanden eine ER $\alpha$ -Immunreaktivität bei etwa 78% der TMN Neurone. Als Kritikpunkt der vorliegenden Ergebnisse gilt an dieser Stelle zum einen die Verwendung des HDC-Tmt Modells zur Erfassung der Population histaminerger Neurone im ZNS. Bei der bekannten Kreuzung aus der HDC-Cre-Maus und der Tomatoprotein-Reporter-Mauslinie sind laut Yanovsky et al., 2012 fast alle (95%) Tmt positiven Neurone im ventralen TMN histaminerg. Jedoch scheint der Pool histaminerger, HDC positiver Neurone größer zu sein, als der der HDC-Tmt positiven Nervenzellen. Nach Yanovsky et al. sind etwa 26% der HA Neurone Tmt negativ. Entsprechend sind zirka 74 % der HA Neurone auch Tmt positiv. Zu beachten ist, dass Yanovsky et al. nur die rostrale Gruppe des ventralen TMN betrachteten (TMVr). Die Arbeitsgruppe um Walker (Walker et al., 2013) erweiterten ihre

Untersuchung auf alle Subgruppen des TMN. Nach ihren Untersuchungen sind im Pool der Tmt positiven Neurone unabhängig von der Subgruppe des TMN über 90% HDC positiv, also histaminerge Zellen. Anders steht es für den Pool der histaminergen Neurone.

Je nach Subgruppe des TMN liegt der Anteil Tmt positiver HA Neurone zwischen 40-80%. Aufgrund der fehlenden Kongruenz des Pools der HA Neurone mit dem, der Tmt positiven HA Neurone in dieser Mauslinie, ist keine Aussage über die AR-Expression der gesamten Fraktion der HA Neurone möglich. Etwa 10% der ausgewerteten Tmt positiven Zellen sind nicht histaminerg (Falsch-Positiv-Rate 10%) und etwa 30% der histaminergen Neurone wurden nicht mit erfasst (Falsch-Negativ-Rate: 30%).

Alternativ wäre ein *Costaining* mit einem polyklonalen Anti-HDC- oder Anti-Histamin-Antikörper denkbar, wie es beispielsweise in Gotoh et al. umgesetzt wurde. Problem an dieser Stelle ist jedoch, dass die meisten Anti-HDC-Antikörper (Gotoh et al., 2009, Walker et al., 2013, Internetseiten der Anbieter) ebenso wie die Anti-AR-Antikörper aus Kaninchenserum stammen, so dass Kreuzreaktionen möglich sind. Ein Versuch eines *Costainings* zwischen dem Anti-Histamin-Antikörper aus Kaninchenserum (*rabbit-anti-histamine-ab5885*, Millipore) und einem Anti-AR-Antikörper aus Ziegen Serum (AR (G13): sc-816 G, santa cruz biotechnologies) wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, blieb aber ohne erfolgversprechende Ergebnisse. In keiner der Versuchsreihen konnte eine suffiziente AR-Färbung erzielt werden. Im Rahmen der Arbeit von Gotoh et al. war ein *Costaining* aufgrund der getrennten Kompartimente der beiden Zielstrukturen in Zellkern (ER $\alpha/\beta$ ) und Zytoplasma (HDC) möglich. Eine zytoplasmatische Population des ER bzw. AR bleibt auf diese Weise unentdeckt.

Zweiter wesentlicher Kritikpunkt der immunhistochemischen Versuche ist die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers. Mit der Verwendung eines polyklonalen Anti-AR-Antikörpers aus Kaninchenserum schließt sich die vorliegende Arbeit erst ein Mal einer langen Tradition der AR-Immunfärbung an. Die meisten Publikationen wie Fernandez-Guasti et al. oder Kashon et al. verwendeten einen polyklonalen Anti-AR-Antikörper, meist den PG21 von Dr. Gail Prins und Dr. Geoffrey Greene (Institut für Pathologie an der Universität von Illinois, Chicago) oder den PA1-110 der Firma Affinity Bioreagents. Vorteile sind zum einen die hohe Treffsicherheit der polyklonalen Antikörper, vor allem in Geweben mit noch unbekanntem Rezeptorstatus, aufgrund deren hoher Spezifität und zum anderen die gute Vergleichbarkeit der Daten mit der gängigen Literatur. Für den monoklonalen Antikörper spricht zum einen die höhere Antikörperkonzentration pro  $\mu\text{l}$ , die geringere Kreuzreaktivität und das geringere Hintergrundsignal (Lipman et al., 2005). Es existieren Daten zur Verwendung polyklonaler und monoklonaler Anti-AR-Antikörper. So konnten beispielsweise Takeda et al., 1990 zeigen, dass monoklonale und polyklonale Anti-AR-Antikörper zum gleichen Färbungsergebnis führten. Aufgrund der eingestellten Produktion des hier verwendeten polyklonalen Anti-AR-

Antikörpers AR (N20) ist daher an die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers zu denken. Da dieser auch zum Beispiel Mausserum (AR (441): sc-7305, santacruz biotechnologies) verfügbar ist, sind weitere Färbungsreihen als Doppelfärbungen mit dem gut etablierten Anti-Histamin-Antikörper (*rabbit-anti-histamine-ab5885*, Millipore) oder einem Anti-HDC-Antikörper aus Kaninchenserum denkbar.

Neben dem Androgenrezeptor ist eine Beteiligung der Aromatase an dem Testosteroneffekt auf die HA Neurone zu diskutieren. Aus umfangreicher, wissenschaftlicher Literatur ist bekannt, dass in einer Vielzahl Androgen abhängiger Gewebe die Androgensignale indirekt nach Aromatisierung zu Estradiol vermittelt werden (Kendrik und Drewitt, 1980, Chu et al., 2010, Robichaud et al., 2005). Da die Expression der Aromatase im posterioren Hypothalamus nicht nachgewiesen wurde (Roselli et al., 2001, Stanic et al., 2014), bleibt eine Rolle der Aromatase an der Testosteron bedingten Frequenzsteigerung der HA Neurone fraglich. Eine Klärung über die Existenz der Aromatase in den HA Neuronen der hier verwendeten Mäuse würde die immunhistochemische Färbung der entsprechenden Neurone mit Anti-Aromatase-Antikörpern erbringen. Zudem ist über Spannungsklemmversuche nach Vorinkubation mit einem Aromatasehemmer wie Letrozol oder Anastrozol sowie die Kombination von Aromatase- und Androgenrezeptorantagonisten nachzudenken. Ebenfalls ist noch eine mögliche Reduktion von Testosteron über Dihydrotestosteron zu Androstandiol bei dem hier vorliegenden Testosteroneffekt zu bedenken. Androstandiol ist ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonist mit antiepileptischem Potential (Reddy et al. 2003/2004). Dementsprechend führt es zu einer Zunahme GABAerger und damit inhibitorischer Ströme. Es ist bekannt (Posterpräsentation Baumgärtel und Sergeeva, Mainz 2014), dass Testosteron in Spannungsklemmversuchen im *whole cell* Modus an akut dissoziierten, histaminergen Neuronen eine Abnahme der Amplitude GABAerger Ströme bewirkt. Dies entspricht dem genauen Gegenteil des, unter Androstandiol zu erwartenden Effekts auf die GABAergen Ströme, was eine Beteiligung des Neurosteroids an dem Frequenzanstieg der HA Neurone unwahrscheinlich macht. Weitere Versuchsreihen unter Verwendung des 5 $\alpha$ -Reduktase-Hemmers Finasterid oder des 3 $\alpha$ -Hydroxsteroid-Dehydrogenase-Inhibitors Indomethacin sind mögliche Fortsetzungen zur Aufklärung des Signalwegs des Testosteron abhängigen Frequenzanstiegs der HA Neurone. Zudem sollte eine mögliche Beteiligung des SHBG-Rezeptors am Testosteroneffekt untersucht werden (Hryb et al., 1990). Zum einen ist ein möglicher *crossstalk* zwischen der SHBG-Rezeptor-cAMP-PKA Signalkaskade und dem klassischen Androgenrezeptor zum Beispiel in der Initiierung von Kalziumionenströmen denkbar. Auch eine direkte Beeinflussung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen kann eine Beteiligung des SHBG-Rezeptors an der Testosteron bedingten Zunahme der Feueraktivität und transientser Kalziumionenströme erklären und sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

## 4.5 Konditionelle Dopaminneurone in TMN und PMV: AR Expression und Testosteronwirkung

Konditionell dopaminerge Neurone sind nach De Luca et al. oder Jaeger, et al. Neurone, die aus Vorstufen, wie L-DOPA, Dopamin synthetisieren können und somit Dopamin immunopositiv sind. Der Nachweis einer solchen Neuronengruppe im TMN ist bereits in De Luca et al., 2016 publiziert. Laut Jaeger et al. gehört auch der, in unmittelbarer Nachbarschaft zum TMN gelegene PMV zur Gruppe dieser akzessorischen Dopaminneurone (D-System nach Jaeger, s.u.). Für diese Neuronengruppe konnte in der vorliegenden Studie anhand des DAT-Tmt Mausmodells ein hohes Maß an AR-Expression nachgewiesen werden. Die verwendete transgene Reporter Mauslinie DAT-Tmt zeichnet sich dadurch aus, dass Zellen mit der Expression des Dopamintransporter rot leuchten. Der PMV dieser transgenen DAT-Tmt Mauslinie zeigte eine große Population DAT positiver Neurone. Nach Färbung für den AR konnten zwei weitere Neuronenpopulationen im PMV definiert werden: eine Fraktion AR-immunreaktiver/Tmt negativer Neurone und eine weitere Population mit DAT- und AR-Immunreaktivität. Von den gezählten Neuronen des PMV betrug der Anteil der DAT exprimierenden Zellen  $74,1 \pm 0,02\%$ , der AR positiven Zellen  $90,7 \pm 0,02\%$  und die Schnittmenge beider Gruppen  $64,8 \pm 0,02\%$  (AR+/DAT+). Des Weiteren konnte gezeigt werden (De Luca et al., 2016), dass die DAT immunopositiven Neurone im ventralen TMN zu  $76,7\%$  AR-immunreaktiv sind. Darüber hinaus zeigen diese, konditionell dopaminergen Neurone beider Kerngebiete einen, mit den HA Neuronen vergleichbaren Anstieg der Feuerfrequenz nach Testosteron Exposition.

Die Expression des Dopamintransporter in Neuronen des PMV ist bereits seit längerem bekannt. Jaeger et al., 1983/1984 konnten zeigen, dass neben den klassischen Dopaminneuronen, die durch die Expression der Tyrosinhydroxylase (TH) charakterisiert sind, TH negative Neurone existieren, die über andere Enzyme der Katecholamin- bzw. Dopaminbiosynthese verfügen, wie die Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AADC). Für dieses, nach Jaeger als D-System bezeichnete, akzessorische Dopamin-System, zu dem auch der PMV gehört, konnten Zoli et al., 1993 nachweisen, dass sie nach Exposition von L-DOPA Dopamin immunreaktiv wurden.

Laut der hier vorliegenden Daten verfügt eine große Neuronengruppe des PMV über eine Expression des Dopamintransporter. Dies steht im Einklang mit Daten der Arbeitsgruppe um Bellefontaine, die in ihrer Arbeit ebenfalls eine TH negative, DAT positive Population von PMV Neuronen finden konnten (Bellefontaine et al., 2016, Posterbeitrag). Somit sind diese Neurone in der Lage L-DOPA vom Extrazellulärraum aufzunehmen und via AADC in Dopamin umzuwandeln. Gleiches Potential besitzt ein verstreuter Nervenzellpool in der

ventralen Untergruppe des TMN. Zusätzlich konnte hier demonstriert werden, dass diese Neuronenpopulationen in TMN und PMV in hohem Maße den Androgenrezeptor exprimieren. Eine Expression des Androgenrezeptor in Neuronen des PMV beschrieben bereits Simerly et al. für die Ratte, Wood und Newman, 1999 für den Hamster, Iqbal et al., 1995 für das Opossum, Kashon et al., 1996 für Frettchen und Michael et al., 1995 für Affen. Die fehlenden Daten zum Expressionslevel des Androgenrezeptor im PMV der Maus trägt die vorliegende Arbeit bei. Die physiologische Bedeutung dieser AR/DAT immunpositiven Neurone der beiden hypothalamischen Kerngebiete gilt es in zukünftigen Untersuchungen näher zu beleuchten. Eine Skizze möglicher Interaktionen wird weiter unten diskutiert.

#### **4.6 Das Alter ist von Bedeutung: Der Testosteroneffekt auf die Histaminneurone ist altersabhängig und verbunden mit einer entsprechenden Dynamik der intrazellulären Lokalisation des Androgenrezeptor**

Durch Arbeiten wie die von Lee et al., 1975 über die zeitliche Entwicklung der Testosteronspiegel männlicher Ratten oder Dabbs, 1990 über diesen Zusammenhang im menschlichen Organismus, ist bekannt, dass es Zeiten unterschiedlich hoher Testosteronkonzentrationen im Lebenszyklus eines männlichen Organismus gibt. Aus diesem Grund ist im Sinne der Publikation von McCutcheon und Marinelli, 2009, die den Einfluss des Alters auf Studienergebnisse thematisierten, von einer möglichen altersabhängigen Dynamik des Testosteroneffekts auf das Membranpotential der HA Neurone auszugehen. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Testosteron in physiologischen und unphysiologischen Konzentrationen (s.o.) an zwei Altersgruppen von Neuronenkulturen untersucht, den juvenil-Testosteron-naiven versus den adolescent Testosteron-adaptierten Neuronen.

Die Einteilung der Altersgruppen erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Brust et al., 2015 über den Lebenszyklus einer Hausmaus. Hier wird das juvenile Alter einer Maus zwischen 0 und 20-22 Tagen post partum definiert, ein Kriterium, was die hier verwendeten Neuronenkulturen mit einem Durchschnittsalter von  $10 \pm 3$  Tagen gut erfüllten. Schwieriger wird es mit der Altersgruppe der adolescenten Mäuse, die zwischen 20-25 und 60 Tagen post partum beginnt. Hier liegen die Neuronenkulturen an der unteren Grenze mit  $19 \pm 4$  Tagen und eine deutliche Abgrenzbarkeit zur Gruppe der juvenilen Tiere ist somit in Frage zu stellen. Jedoch liegt in dieser Arbeit das Alter der Mäuse mit im Mittel 19 bis maximal 23 Tagen in einer Zeit der beginnenden Spermatogenese der männlichen Tiere und damit steigender Testosteronspiegel (vgl. Brust et al., 2015).

In der Gruppe der juvenilen Neurone zeigten physiologische T-Konzentrationen keinen oder einen hemmenden Effekt auf die Feueraktivität der HA Neurone. Erst unphysiologisch hohe Konzentrationen von 1-10 $\mu$ M Testosteron vermochten einen Anstieg der Feuerfrequenz um den Faktor 1,5 zu bewirken. Anders in der Gruppe der adoleszenten Neurone. Hier zeigten physiologische Konzentrationen von 10-100nM einen schnellen Anstieg der Feuerfrequenz der HA Neurone um den Faktor 1,5-2,5. Unphysiologische Konzentrationen wie 1-10 $\mu$ M hatten nach initialem Frequenzanstieg keinen (1 $\mu$ M) oder sogar einen hemmenden Effekt auf die Feueraktivität.

Mit diesen Daten für Testosteron reiht sich die Arbeit in die Studien zur Altersabhängigkeit von Effekten neuromodulativer Substanzen ein. Es konnte zum ersten Mal für die histaminergen Neurone des TMN und Testosteron ein solcher altersabhängiger Effekt beschreiben werden. Verantwortliche Mechanismen sollten in Folgestudien untersucht werden. Das Versuchsmodell lässt sich kritisieren. Das Verwenden von 0-3 Tage alten Neuronen für die Kultur und das Simulieren des Alterns allein über die Kulturzeit ist anfechtbar. Problem ist die bessere Kultivierbarkeit junger Neuronenpopulationen. Das vorliegende Versuchsregime steht in Einklang mit den Untersuchungen von Chen et al., 1996 über GABAerge Effekte auf das Membranpotential hypothalamischer Neuronenkulturen. Hier wurde sogar das Gewebe aus ungeborenen Feten entnommen und das Altern der Neuronen über die Zeit in Kultur definiert. Dagegen wurde von Ben Ari et al. das Alter der Ratten berücksichtigt, indem sie Zellkulturen der entsprechend alten Tiere (P0-P9 vs. P9-P18) anlegten. Sie konnten dabei genauso wie Chen et al. den, von Depolarisation nach Hyperpolarisation wechselnden Effekt von GABA im Verlauf des Alterns der Neuronenkulturen nachweisen. Dadurch bleibt das Infragestellen der hier angeführten Daten offen. Für eine zukünftige, den physiologischen Verhältnissen näher kommende Versuchsreihe sollte, unter Berücksichtigung der dreiphasigen Entwicklung der Testosteronspiegel (Lee et al.) sowie der Entwicklungsphasen der Mäuse (Brust et al.), die Altersgruppe der unmittelbar postpartalen Neurone (P0-P5), neben einer juvenilen Gruppe (P10-15) und einer eindeutig adoleszenten Gruppe (P30-40) betrachtet werden. In diesem Fall eines Pilotversuchs sind diese Einwände für weitere Forschungsschritte umzusetzen.

Zur Unterstützung der, auf elektrophysiologischen Daten beruhenden These über die Altersabhängigkeit des Testosteroneffekts auf die HA Neurone kommen folgende Beobachtungen aus den immunhistochemischen Untersuchungen zur AR-Expression der TMN Neurone hinzu. Genauso wie schon Clancy et al., 1994 in Versuchen an kastrierten, männlichen und weiblichen, syrischen Hamstern beschrieben, konnte in dieser Arbeit mithilfe der Konfokalmikroskopie in der Gruppe der AR immunreaktiven HDC-Tmt Neurone zwei Neuronenpopulationen unterscheiden werden: die eine mit überwiegend

AR-Kernimmunreaktivität und die andere mit einer zusätzlich, deutlichen AR-Immunreaktivität im Zytoplasma (AR-Somaimmunreaktivität). Basierend auf der Annahme einer möglichen, altersabhängigen Dynamik in der Verteilung beider AR-Poole wurden Zählungen bezüglich dieser Unterscheidung an den Männchen unserer Mauslinie durchgeführt. Dabei wurde für die Altersgruppe „Juvenil“ unter den HDC-Tmt Zellen mit AR-Immunreaktivität ein Anteil von etwa 60% mit AR-Kernimmunreaktivität und ungefähr 40% mit Somaimmunreaktivität gefunden. Für die Altersgruppe der adoleszent-adulten Mäuse konnte eine Verteilung von 18%:82% AR-Kernimmunreaktivität vs. AR-Somaimmunreaktivität beobachtet werden.

Damit schließt sich die vorliegende Arbeit an die gängige wissenschaftliche Literatur zur AR-Immunreaktivität an, die die Existenz zweier AR-Pools postuliert, einen zytoplasmatischen und einen karyoplasmatischen. Als Ursache der unterschiedlichen Ausprägung der beiden Pools wird die Höhe der Androgenspiegel angesehen. Wood und Newmann beobachteten beispielsweise das vermehrte Auftreten der Zytoplasma-AR-Immunreaktivität nach Kastration der Tiere. Fernandez-Guasti et al. konnten selbiges Phänomen eher in den entsprechenden Zellgruppen von Frauen finden und kamen zu ähnlichem Schluss. In bisher nicht publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe konnten wir nach Testosteronexposition keine signifikante Zunahme der AR-Kernimmunreaktivität nachweisen. Shakil et al. konnten an den GT1-7-GnRH-Neuronen mittels Westernblott eine geringe Zunahme der zytoplasmatischen AR-Fraktion nach Exposition von Dihydrotestosteron feststellen. Die Existenz der zwei AR-Poole kann somit als bestätigt angesehen werden. Deren Dynamik und Bedeutung in Abhängigkeit der Androgenspiegel gilt es weiter zu beleuchten.

Eine mögliche Erklärung für das altersabhängige Feuerverhalten der HA Neurone in Abhängigkeit von Testosteron lässt sich vielleicht von diesen immunhistochemischen Daten ableiten. In der Gruppe der juvenilen Mäuse ist der AR Pool eher Zellkern basiert.

Dementsprechend ist der Effekt auf das Membranpotential, das vom zytoplasmatischen AR-Pool auszugehen scheint (vgl. Shakil et al., 2002), geringer oder fehlend oder hemmend, je nach verwendeter Konzentration. Erst bei Übersättigung unter unphysiologisch hohen Konzentrationen ist ein stimulierender Effekt messbar.

Bei den adoleszent-adulten Mäusen ist der AR-Pool eher Zytoplasma basiert. Entsprechend kann schon mit niedrigen Konzentrationen ein deutlicher Anstieg der Feueraktivität erreicht werden. In unphysiologisch hohen Konzentrationen ist der Effekt nur vorübergehend exzitatorisch, da, unter Berücksichtigung einer Beteiligung des *second messenger* Kalzium, bereits apoptotische bzw. neurotoxische Signale im Rahmen einer Überdosierung des Androgens eingeleitet werden können (Estrada et al., 2006).

## 4.7 Schlussfolgerung und physiologischer Ausblick

Die HA Neurone des TMN übernehmen eine Vielzahl von Funktionen (Haas et al., 2008). Im Zentrum steht deren wachheitsvermittelnder Effekt. Durch den Nachweis der AR-Expression und der Beeinflussbarkeit der Feueraktivität durch Testosteron ist eine Beteiligung an Androgen abhängigen Prozessen wie Sexualverhalten, Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, Stoffwechselregulation oder *sexual arousal* denkbar. Letzteres ist Thema der gemeinsamen Arbeit mit der Arbeitsgruppe von JS Lin (Zhao et al., 2018, EHRS Kongress-Beitrag). In Verhaltensstudien konnte gezeigt werden, dass der Wachheitszustand geschlechtsreifer, männlicher Mäuse in Anwesenheit weiblicher Artgenossen, unabhängig von der Tageszeit und damit vom Schlaf-Wach-Rhythmus, signifikant zunahm. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Flutamid diesen als *sexual arousal* definierten Zuwachs an Wachheit unterbinden konnte, ein Argument für die Beteiligung von Testosteron am Wachheitszustand der Tiere.

Nimmt man die Daten der hier vorliegenden Arbeit über den exzitatorischen Einfluss von Testosteron auf die Feueraktivität der HA Neurone, die auch in der Arbeit von Zhao et al. angeführt werden, hinzu, ist eine Testosteron getriggerte Aktivierung der HA Neurone und damit eine Zunahme der Wachheit im Rahmen des Fortpflanzungsverhaltens anzunehmen. Unterstützend hinzu kommt die Beobachtung, dass die akute Applikation eines Histaminsyntheseinhibitors ( $\alpha$ FMH, alpha Fluoromethylhistidin) zu einem Ausbleiben des Wachheitsanstiegs führt (Zhao et al., 2018, EHRS Kongress-Beitrag). Das Phänomen der sexuellen Erregtheit scheint aber nicht durch das HA-System allein getragen zu werden. Zhao et al. konnten zeigen, dass die Gruppe der Orexinneurone ebenfalls beteiligt sein muss. Sie reagieren ähnlich wie die HA Neurone auf eine Testosteron Exposition, exprimieren den Androgenrezeptor und nur die gleichzeitige Ausschaltung beider Gene (Orexin/Histamin) in der *Histamin/Orexin-double-Knock-out* (HO-dKO) Maus führt zu einem vollständigen Ausbleiben des *sexual arousal* (Zhao et al., 2018, EHRS Kongress-Beitrag). Das, durch Weibchen ausgelöste *sexual arousal* ist ein klassisches und weitverbreitetes Modell zur Untersuchung des männlichen Sexualverhaltens. Die Datenlage zu dieser Form des Auslösens von *sexual arousal* ist umfangreich und existiert vor allem über Nagetiere wie Ratte und Maus (Amstislavskaya und Popova, 2004; James und Nyby, 2002), aber auch für das Verhalten von Menschen (Escasa et al., 2011; Welling et al., 2008). Amstislavskaya et al. konnten neben der Zunahme der Aufmerksamkeit der männlichen Nager zeigen, dass die Exposition zyklischer, weiblicher Artgenossen zu einem Anstieg der Plasmatestosteronspiegel führt. Dies erfolgt jedoch mit einer Latenz von 20 bis 40 Minuten je nach Saison. Der *sexual arousal* beginnt jedoch schon in den ersten 10 Minuten nach Kontakt der Nagetiere. Dies stellt die direkte Beteiligung von Testosteron an der initialen

Zunahme des Wachheitszustands in Frage. Wichtiger scheint die Rolle der, von den Weibchen ausgesendeten Substanzen wie Sexualpheromone, also olfaktorischer und bei höher entwickelten Spezies auch visueller Signale zu sein.

Die Notwendigkeit von Testosteron für die sexuelle Rezeptivität ist klar. Hull und Dominguez, 2007 konnten an Ratten zeigen, dass Kastrierung zum Verlust des Sexualverhaltens innerhalb von Tagen bis Wochen führt und Testosteron- bzw. Estradiolsubstitution eine Wiederherstellung bewirkt. Die direkte Beteiligung von Histamin und Orexin am *sexual arousal* gilt ebenfalls als gesichert. Contreras et al., 2016 konnten zeigen, dass die Exposition männlicher Ratten gegenüber ovulierenden Weibchen zu einem Anstieg der Expression von c-Fos, einem Marker für die Aktivität der Zellen, in den histaminergen Neuronen des TMN führt. Gleiches konnten sie für Orexinneurone und weitere Neurone des aufsteigenden *Arousal* Systems des Hirnstamms nachweisen.

Eine Läsion des TMN führt zur Abnahme der Aktivität der entsprechenden Neurone.

Vergleichbares beschrieben Valdes et al., 2010 für die Motivation zur Nahrungsaufnahme hungriger Ratten. Di Sebastiano et al., 2010, konnten für Orexin eine Beteiligung am *sexual arousal* sicherstellen. Die Beeinflussung an weiterem Sexualverhalten scheint aber außerhalb des Wirkungsspektrums dieser Neurone zu liegen. Der TMN und die Orexinneurone sind somit an motivierten Verhaltensweisen wie Sexualverhalten beteiligt. Nach Anstieg der Testosteronspiegel übernimmt Testosteron die Wachheit stimulierende Funktion und die Initiierung sexueller Verhaltensweisen über die Beeinflussbarkeit beider Neurotransmittersysteme. Über diese wachheitsvermittelnde Wirkung hinaus scheint Testosteron auch die circadiane Rhythmik über den *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) zu beeinflussen. Dieses hypothalamische Kerngebiet gilt als Zeitgeber des Organismus, der vielfältige Körperprozesse wie körperliche Aktivität, Stoffwechselforgänge oder Wach- und Schlaf-Phasen an den Tag-Nacht- und Jahreszeitenwechsel anpasst. Genauso wie der TMN verfügt der SCN über eine ausgeprägte Expression des Androgenrezeptor, die einem Geschlechtsdimorphismus unterliegt (Iwahana et al., 2008). Eine Gonadektomie männlicher Mäuse bewirkt eine Abnahme des Expressionslevel des Androgenrezeptor und eine Abnahme des Aktivitätsniveaus der entsprechenden Tiere. Die Hormonersatztherapie mit Testosteronpropionat, aber auch mit dem nicht aromatisierbaren Dihydrotestosteron führt zu einer Wiederherstellung dieses Verlustes (Model et al., 2015).

Ebenfalls ist eine Beteiligung des PMV an dem Zusammenspiel von Testosteron und dem TMN anzunehmen. Dieser fungiert als Relaiskern, der metabolische mit sexuellen Informationen integriert. So konnten Donato und Elias, 2011 beschreiben, dass Neurone des PMV Leptin vermittelte Signale über den Fettgehalt und Energiezustand des Organismus an die GnRH-Neurone der *Area praeoptica*, der *Eminentia mediana* sowie den Kisspeptidneuronen des anteroventralen periventriculären Kerns (AVPV) weiterleiten und so

die GnRH-Sekretion beeinflussen. Auf diese Weise kommt es beispielsweise zur Initiierung des GnRH-Pulsgenerators mit Beginn der weiblichen Geschlechtsreife (Ross et al., 2018). Des Weiteren konnten Cavalcante et al., 2006 zeigen, dass die Exposition weiblicher Sexualgeruchsstoffe bei männlichen, sexuell unerfahrenen Ratten zu einer Zunahme der FOS-Expression im PMV, in erster Linie in den CART-Neuronen und weiterhin zu einer Zunahme der CART-Expression im PMV führt. Durch seine Expression des Androgenrezeptor, den Verbindungen zum histaminergen System und der Fähigkeit vieler seiner Neurone zur Synthese von Dopamin aus Vorstufen stellt der PMV eine wichtige Relais- und Integrationsstation im Hypothalamus dar.

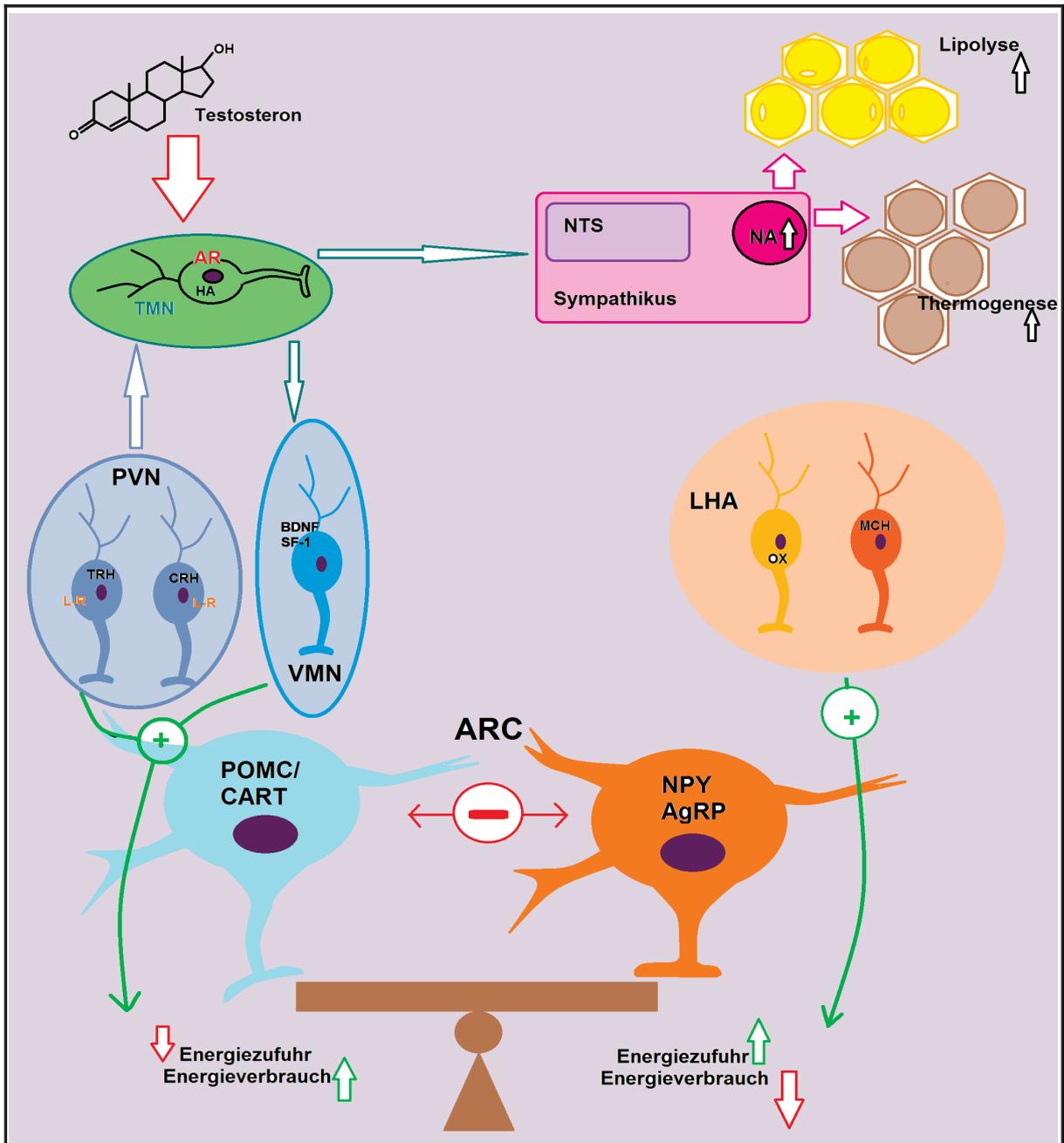
In diesem Sinne ist eine Rolle der Histaminneurone in der Regulation des Stoffwechsel- und Energiehaushalts durch Testosteron denkbar. Sowohl der Neurotransmitter Histamin als auch Testosteron vermitteln anorektische Signale. Die Applikation von Histamin in die Zerebrospinalflüssigkeit des dritten Ventrikels bzw. eines H3-Rezeptorantagonisten, der als Verstärker des histaminergen *Output* fungiert, führt zu einer Hemmung der Nahrungsaufnahme und einer Steigerung des Energieverbrauchs. Im Gegensatz bewirkt die zentrale Gabe von  $\alpha$ -Fluoromethylhistidin ( $\alpha$ FMH), einem irreversiblen Antagonisten der Histidindecarboxylase (HDC), der einen Verlust an synaptischen Histamin verursacht, zu einer Zunahme der Kalorienzufuhr sowie des Körpergewichts. Der, an der Wirkung des Histamins auf Kerngebiete aus dem Schaltkreis der Kontrolle der Energiehomöostase (VMN/PVN) beteiligte Rezeptor ist in erster Linie der H1-Rezeptor (Fukagawa et al., 1989). Neue Aufmerksamkeit, insbesondere im Zusammenhang mit der Therapie der schweren Adipositas, gilt dem H3-Rezeptor, dessen Beteiligung an den anorektischen Effekten des Histamins noch nicht eindeutig beschrieben werden kann (Passani et al., 2011). Typische anorektische Effekte des Histamin sind die Aktivierung der VMN Neurone, dem Sättigungszentrum des Hypothalamus (Sakata et al., 1995), die Aktivierung der Glykogenolyse in Astrozyten und Mikrogliazellen im Zustand der Hypoglykämie des ZNS sowie eine synergistische Wirkung zum Leptin. Durch die Verbindung zu Leptinrezeptor tragenden TRH Neuronen des PVN vermittelt Histamin die anorektischen Signale des Leptin (Parmentier et al., 2009). Masaki et al. konnten zeigen, dass Histamin zum einen die Thermogenese des braunen Fettgewebes über die Induktion der Expression des *Uncoupling Protein 1* (UCP1) durch Aktivierung präganglionärer sympathischer Neurone im *Nucleus tractus solitarii* steigert. Zum anderen fördert es die Freisetzung von Katecholaminen, deren lipolytische Wirkung auf das weiße Fettgewebe zusammen mit der Hemmung der Expression des Leptin-Gens (ob-Gen) Energiereserven mobilisiert und die Ausdehnung der Fettdepots einschränkt (Masaki et al., 2001/2003/2004).

Für Testosteron ist neben seiner anabolen Wirkung auf die Skelettmuskulatur und das Knochengewebe eine hemmende Wirkung auf die Ausdehnung viszeraler Fettdepots

bekannt. Vor allem im klinischen Rahmen des metabolischen Syndroms obliegt dem Testosteron eine präventive Rolle. Das metabolische Syndrom ist definiert als Symptomkomplex kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Adipositas, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie und Insulinresistenz. Aufgrund seiner hohen Prävalenz, insbesondere in den westlichen Industrienationen, gilt es als einer der großen Herausforderungen der modernen Medizin. Das metabolische Syndrom steht im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzkrankheit (KHK), der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NASH, nichtalkoholische Steatohepatitis), dem *Diabetes mellitus* Typ 2 und weiteren mehr (Muraleedharan und Jones, 2010). Testosteron scheint dem metabolischen Syndrom antizipierend gegenüber zu stehen. Hohe Testosteronspiegel korrelieren mit niedrigem Körperfettgehalt und vice versa. Demgegenüber geht das metabolische Syndrom mit niedrigen Testosteronspiegeln betroffener Männer einher (Lapauw et al., 2010; Wang et al., 2011). Ähnliches gilt für die Gruppe der Typ-2-Diabetiker, bei denen die Häufigkeit niedriger Testosteronspiegel signifikant höher ist als bei Nicht-Diabetikern (Dhindsa et al., 2004). Darüber hinaus haben niedrige Konzentrationen von Testosteron und SHBG einen Vorhersagewert für das Auftreten von *Diabetes mellitus* Typ 2 und dem metabolischen Syndrom in der Altersgruppe 40-60jähriger Männer (Laaksonen et al., 2004). Testosteron macht demnach satt und schlank durch antidiabetische und antiadipöse Signale. Dies erreicht Testosteron in erster Linie durch die Stimulation der Insulinwirkung in Fett-, Muskel- und Leberzellen sowie durch die Beeinflussung des Glucose- und Fettstoffwechsels der quergestreiften Skelettmuskulatur (Kelly und Jones 2013; Wang et al., 2011; Saad und Gooren, 2009). Andererseits erhöht Testosteron die Expression  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren sympathischer Nervenfasern, die lipolytische Signale vermitteln (Muraleedharan und Jones, 2010). Über ein zentralnervöses Korrelat auf der Ebene der hypothalamischen Kerngebiete der Energiehomöostase für die antiadipösen Wirkungen des Testosteron ist derzeit nur wenig bekannt. So beschrieben beispielsweise Nuez et al., 1980 an männlichen, kastrierten Ratten eine Abnahme der Kalorienzufuhr nach direkter Applikation von Testosteron in den VMN, der als wichtiger Kern anorektischer Signale im entsprechenden Neuronenschaltkreis der Energiehomöostase des Hypothalamus gilt. Estradiol zeigte sich in den Versuchsreihen sogar noch wirksamer als Testosteron, was als Hinweis einer Beteiligung der Aromatase und einer indirekten Wirkung von Testosteron via Estradiol zu deuten ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten einen Beitrag zum Schließen dieser Wissenslücke liefern. Aus dem *knock out* Mausmodell der Histaminrezeptoren (H1R, H2R) ist auch für Histamin bekannt, dass die entsprechenden Tiere unter hochkalorischem Futtermittel an übermäßiger Nahrungsaufnahme, ausgeprägter, viszeraler Fettleibigkeit, Leptinresistenz und Glucosetoleranz, kurz dem metabolischen Syndrom, leiden (Masaki, T, et al, 2001/2003/2004, Wang et al., 2010).

Zudem konnten Wang et al. 2010 an der H1R<sup>-/-</sup>- und der H2R<sup>-/-</sup>-Maus einen gestörten Glucose- und Fettstoffwechsel nachweisen, der im Falle der letzteren *knock out* Maus sogar zu dem klinischen Bild einer nichtalkoholischen Steatohepatitis führte. Die Erhöhung der Feueraktivität der HA Neurone des TMN durch Testosteron könnte durch die histaminergen



**Abb. 4.7** Regulation des Energiehaushalts auf Ebene des Hypothalamus und mögliche Rolle der HA Neurone des TMN unter Wirkung von Testosteron

Erläuterungen siehe Text, Abkürzungen AgRP Aguti related peptide, ARC Nucleus arcuatus, AR Androgenrezeptor, BDNF brain derived neurotrophic factor, CART Cocain amphetamine related transcript, CRH Corticotropin releasing hormone, HA Histaminneurone, LHA laterale hypothalamische Area, L-R Leptinrezeptor, MCH Melanozyten stimulierendes Hormon, NA Noradrenalin, NPY Neuropeptid Y, NTS Nucleus tractus solitarius, OX Orexin, POMC Proopiomelanocortin, PVN Nucleus paraventricularis, SF-1 Steroidfaktor 1, TMN Nucleus tuberomammillaris, TRH Thyreotropin releasing hormone, VMN Nucleus ventromedialis,

Quelle eigene Darstellung frei nach Horvath et al., 2004

Verbindungen zum *Nucleus tractus solitarii*, dem Sättigungszentrum der Energiehomöostase, sympathische Fasern aktivieren, die im weißen Fettgewebe die Lipolyse und im braunen Fettgewebe die Thermogenese aktivieren, was zur Abnahme viszeraler Fettdepots und zur Steigerung des Energieumsatzes führt (vgl. Abb. 4.7).

Zusammenfassend könnte der TMN das zentralnervöse, Testosteron sensitive System sein, welches anorektische Stoffwechselsignale integriert und umsetzt. Weitere Forschung an Maus-Modellen ist jedoch notwendig, um die Rolle histaminergere und dopaminergere Neurone des TMN und PMV, sowie deren Interaktionen für die Regulation des Metabolismus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu klären.

# Kapitel 5. Literaturverzeichnis

## 5.1 Publikationen

Ahima, Rexford S.; Antwi, Daniel A. (2008): Brain Regulation of Appetite and Satiety. In: *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 37 (4), S. 811–823. DOI: 10.1016/j.ecl.2008.08.005.

Airaksinen, Matti S.; Alanen, Sari; Szabat, Ewa; Visser, Theo J.; Panula, Pertti (1992): Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: Comparison of rat, mouse, and guinea pig. In: *J. Comp. Neurol.* 323 (1), S. 103–116. DOI: 10.1002/cne.903230109.

Amano, T. (1985): The study of serum testosterone level during childhood i. growth and circadian rhythm. In: *Journal of Kyoto Prefectural University of Medicine* 94(12), S. 1325–1338.

Amstislavskaya, Tamara G.; Popova, Nina K. (2004): Female-induced sexual arousal in male mice and rats: behavioral and testosterone response. In: *Hormones and Behavior* 46 (5), S. 544–550. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2004.05.010.

Anaclet, C.; Parmentier, R.; Ouk, K.; Guidon, G.; Buda, C.; Sastre, J.-P. et al. (2009): Orexin/Hypocretin and Histamine: Distinct Roles in the Control of Wakefulness Demonstrated Using Knock-Out Mouse Models. In: *Journal of Neuroscience* 29 (46), S. 14423–14438. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2604-09.2009.

Barbaccia, M. L.; Roscetti, G.; Trabucchi, M.; Purdy, R. H.; Mostallino, M. C.; Concas, A.; Biggio, G. (1997): The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations. In: *British Journal of Pharmacology* 120 (8), S. 1582–1588. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701046.

Barreto-Chang, Odmara L.; Dolmetsch, Ricardo E. (2009): Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. In: *JoVE* (23). DOI: 10.3791/1067.

Baulieu, E. E. (1998): Neurosteroids: a novel function of the brain. In: *Psychoneuroendocrinology* 23 (8), S. 963–987.

Ben-Ari, Y.; Cherubini, E.; Corradetti, R.; Gaiarsa, J. L. (1989): Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. In: *The Journal of Physiology* 416 (1), S. 303–325. DOI: 10.1113/jphysiol.1989.sp017762.

Bennett, Nigel C.; Gardiner, Robert A.; Hooper, John D.; Johnson, David W.; Gobe, Glenda C. (2010): Molecular cell biology of androgen receptor signalling. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (6), S. 813–827. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.11.013.

Benten, W.Peter M.; Lieberherr, Michèle; Sekeris, Constantin E.; Wunderlich, Frank (1997): Testosterone induces Ca<sup>2+</sup> influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. In: *FEBS Letters* 407 (2), S. 211–214. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00346-3.

Benten, W. Peter M.; Lieberherr, Michèle; Stamm, Olaf; Wrehlke, Christian; Guo, Zhiyong; Wunderlich, Frank; Yamamoto, Keith R. (1999): Testosterone Signaling through Internalizable Surface Receptors in Androgen Receptor-free Macrophages. In: *MBoC* 10 (10), S. 3113–3123. DOI: 10.1091/mbc.10.10.3113.

- Birzniece, Vita; Bäckström, Torbjörn; Johansson, Inga-Maj; Lindblad, Charlotte; Lundgren, Per; Löfgren, Magnus et al. (2006): Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. In: *Brain research reviews* 51 (2), S. 212–239. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2005.11.001.
- Björklund, Anders; Dunnett, Stephen B. (2007): Dopamine neuron systems in the brain: an update. In: *Trends in Neurosciences* 30 (5), S. 194–202. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.006.
- Borst, Stephen E.; Mulligan, Thomas (2007): Testosterone replacement therapy for older men. In: *Clinical interventions in aging* 2 (4), S. 561–566.
- Brown-Sequard, FRS (1889): The effects produced on man by subcutaneous injections of a liquid obtained from the testicles of animals. In: *The Lancet*, S. 103–107
- Broussard, Gerard J.; Liang, Ruqiang; Tian, Lin (2014): Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. In: *Front. Mol. Neurosci.* 7 (15), S. 910. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00097.
- Brown, R. E.; Stevens, D. R.; Haas, H. L. (2001): The physiology of brain histamine. In: *Progress in neurobiology* 63 (6), S. 637–672.
- Brust, Vera; Schindler, Philipp M.; Lewejohann, Lars (2015): Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). In: *Front Zool* 12 (Suppl 1), S. S17. DOI: 10.1186/1742-9994-12-S1-S17.
- Butenandt, Adolf und Hanisch, Günter (1935): Über die Umwandlung des Dehydroandrosterons in Delta4-Androstenol(17)-on-(3) (Testosteron); ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin (Vorläuf. Mitteil.) 68, S. 1859–1862
- Canteras, N. S.; Simerly, R. B.; Swanson, L. W. (1992): Projections of the ventral premammillary nucleus. In: *J. Comp. Neurol.* 324 (2), S. 195–212. DOI: 10.1002/cne.903240205.
- Camins, A.; Sureda, F. X.; Camarasa, J.; Escubedo, E. (1992): Specific binding sites for [3H]Ro 5-4864 in rat prostate and seminal vesicle. In: *General pharmacology* 23 (3), S. 381–384.
- Campelo, Adrián E.; Cutini, Pablo H.; Massheimer, Virginia L. (2012): Cellular actions of testosterone in vascular cells: Mechanism independent of aromatization to estradiol. In: *Steroids* 77 (11), S. 1033–1040. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.05.008.
- Cavalcante, Judney Cley; Bittencourt, Jackson Cioni; Elias, Carol Fuzeti (2014): Distribution of the neuronal inputs to the ventral premammillary nucleus of male and female rats. In: *Brain research* 1582, S. 77–90. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.07.034.
- Chang, C.; Kokontis, J.; Liao, S. (1988): Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. In: *Science* 240 (4850), S. 324–326. DOI: 10.1126/science.3353726.
- Chattopadhyaya, R.; Meador, W. E.; Means, A. R.; Quijcho, F. A. (1992): Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. In: *Journal of molecular biology* 228 (4), S. 1177–1192.
- Chen, Y.; Lee, N. K. L.; Zajac, J. D.; MacLean, H. E. (2008): Generation and analysis of an androgen-responsive myoblast cell line indicates that androgens regulate myotube protein accretion. In: *J Endocrinol Invest* 31 (10), S. 910–918. DOI: 10.1007/BF03346441.

- Chen, G.; Trombley, P. Q.; van den Pol, A N (1996): Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. In: *The Journal of Physiology* 494 (2), S. 451–464. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021505.
- Chen, Tsai-Wen; Wardill, Trevor J.; Sun, Yi; Pulver, Stefan R.; Renninger, Sabine L.; Baohan, Amy et al. (2013): Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. In: *Nature* 499 (7458), S. 295–300. DOI: 10.1038/nature12354.
- Chu, Z.; Andrade, J.; Shupnik, M. A.; Moenter, S. M. (2009): Differential Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Membrane Properties by Acutely Applied Estradiol: Dependence on Dose and Estrogen Receptor Subtype. In: *Journal of Neuroscience* 29 (17), S. 5616–5627. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.035209.2009.
- Chu, Z.; Takagi, H.; Moenter, S. M. (2010): Hyperpolarization-Activated Currents in Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons Contribute to Intrinsic Excitability and Are Regulated by Gonadal Steroid Feedback. In: *Journal of Neuroscience* 30 (40), S. 13373–13383. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1687-10.2010.
- Clancy, A. N.; Bonsall, R. W.; Michael, R. P. (1992): Immunohistochemical labeling of androgen receptors in the brain of rat and monkey. In: *Life sciences* 50 (6), S. 409–417.
- Clancy, Andrew N., et al. (1994): Distribution of androgen receptor-like immunoreactivity in the brains of intact and castrated male hamsters. In: *Brain research bulletin* 33.3, S. 325–332.
- Clapham, David E. (2007): Calcium Signaling. In: *Cell* 131 (6), S. 1047–1058. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.028.
- Coolen, L. M.; Wood, R. I. (1999): Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: redundancy without amplification. In: *Behavioural brain research* 98 (1), S. 143–153.
- Couchourel, Denis; Leclerc, Marie; Filep, Janos; Brunette, Michèle G. (2004): Testosterone enhances calcium reabsorption by the kidney. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 222 (1-2), S. 71–81. DOI: 10.1016/j.mce.2004.05.001.
- Contreras, Marco; Riveros, María E.; Quispe, Maricel; Sánchez, Cristián; Perdomo, Guayec; Torrealba, Fernando et al. (2016): The Histaminergic Tuberomammillary Nucleus Is Involved in Appetite for Sex, Water and Amphetamine. In: *PLoS ONE* 11 (2), S. e0148484. DOI: 10.1371/journal.pone.0148484.
- Corfield, Jeremy R.; Harada, Nobuhiro; Iwaniuk, Andrew N. (2013): Aromatase expression in the brain of the ruffed grouse (*Bonasa umbellus*) and comparisons with other galliform birds (Aves, Galliformes). In: *Journal of Chemical Neuroanatomy* 47, S. 15–27. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2012.12.001.
- Dabbs, James M. (1990): Salivary testosterone measurements: Reliability across hours, days, and weeks. In: *Physiology & Behavior* 48 (1), S. 83–86. DOI: 10.1016/0031-9384(90)90265-6.
- David, K.; Dingemans, E.; Freud, J.; Laqueur, Ernst (1935): Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 233 (5-6), S. 281–283. DOI: 10.1515/bchm2.1935.233.5-6.281.

- Dhindsa, Sandeep; Prabhakar, Sathyavani; Sethi, Manak; Bandyopadhyay, Arindam; Chaudhuri, Ajay; Dandona, Paresh (2004): Frequent Occurrence of Hypogonadotropic Hypogonadism in Type 2 Diabetes. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (11), S. 5462–5468. DOI: 10.1210/jc.2004-0804.
- Diotel, Nicolas; Le Page, Yann; Mouriec, Karen; Tong, Sok-Keng; Pellegrini, Elisabeth; Vaillant, Colette et al. (2010): Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* 31 (2), S. 172–192. DOI: 10.1016/j.yfrne.2010.01.003.
- Di Sebastiano, Andrea R.; Yong-Yow, Sabrina; Wagner, Lauren; Lehman, Michael N.; Coolen, Lique M. (2010): Orexin mediates initiation of sexual behavior in sexually naive male rats, but is not critical for sexual performance. In: *Hormones and Behavior* 58 (3), S. 397–404. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2010.06.004.
- Donato, Jose; Elias, Carol Fuzeti (2011): The Ventral Premammillary Nucleus Links Metabolic Cues and Reproduction. In: *Front. Endocrin.* 2. DOI: 10.3389/fendo.2011.00057.
- Duke, Sally Anne; Balzer, Ben W.R.; Steinbeck, Katharine S. (2014): Testosterone and Its Effects on Human Male Adolescent Mood and Behavior: A Systematic Review. In: *Journal of Adolescent Health* 55 (3), S. 315–322. DOI: 10.1016/j.jadohealth.2014.05.007.
- Dunn, James F.; Nisula, Bruce C.; Rodbard, David (1981): Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 Endogenous Steroids to Both Testosterone-Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 53 (1), S. 58–68. DOI: 10.1210/jcem-53-1-58.
- Dupre, C.; Lovett-Barron, M.; Pfaff, D. W.; Kow, L.-M. (2010): Histaminergic responses by hypothalamic neurons that regulate lordosis and their modulation by estradiol. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (27), S. 12311–12316. DOI: 10.1073/pnas.1006049107.
- Durdiakova, Jaroslava; Ostatnikova, Daniela; Celec, Peter (2011): Testosterone and its metabolites--modulators of brain functions. In: *Acta neurobiologiae experimentalis* 71 (4), S. 434–454.
- Ericson, H.; Watanabe, T.; Köhler, C. (1987): Morphological analysis of the tuberomammillary nucleus in the rat brain: Delineation of subgroups with antibody again L-histidine decarboxylase as a marker. In: *J. Comp. Neurol.* 263 (1), S. 1–24. DOI: 10.1002/cne.902630102.
- Er, Fikret; Michels, Guido; Brandt, Mathias C.; Khan, Ismail; Haase, Hannelore; Eicks, Michael et al. (2007): Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca<sup>2+</sup> sparks: Acute actions antagonize chronic effects. In: *Cell Calcium* 41 (5), S. 467–477. DOI: 10.1016/j.ceca.2006.09.003.
- Escasa, Michelle J.; Casey, Jacqueline F.; Gray, Peter B. (2011): Salivary Testosterone Levels in Men at a U.S. Sex Club. In: *Arch Sex Behav* 40 (5), S. 921–926. DOI: 10.1007/s10508-010-9711-3.
- Estrada, Manuel; Espinosa, Alejandra; Müller, Marioly; Jaimovich, Enrique (2003): Testosterone Stimulates Intracellular Calcium Release and Mitogen-Activated Protein Kinases Via a G Protein-Coupled Receptor in Skeletal Muscle Cells. In: *Endocrinology* 144 (8), S. 3586–3597. DOI: 10.1210/en.2002-0164.

- Estrada, Manuel (2006): Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. In: *Journal of Cell Science* 119 (4), S. 733–743. DOI: 10.1242/jcs.02775.
- Fekete, Cs. (1999): Estrogen Receptor Immunoreactivity Is Present in the Majority of Central Histaminergic Neurons: Evidence for a New Neuroendocrine Pathway Associated with Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-Synthesizing Neurons in Rats and Humans. In: *Endocrinology* 140 (9), S. 4335–4341. DOI: 10.1210/en.140.9.4335.
- Fernández-Guasti, A.; Kruijver, F. P.; Fodor, M.; Swaab, D. F. (2000): Sex differences in the distribution of androgen receptors in the human hypothalamus. In: *The Journal of comparative neurology* 425 (3), S. 422–435.
- Foradori, C. D.; Weiser, M. J.; Handa, R. J. (2008): Non-genomic actions of androgens. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* 29 (2), S. 169–181. DOI: 10.1016/j.yfrne.2007.10.005.
- Fujita, Akie; Bonnavion, Patricia; Wilson, Miryam H.; Mickelsen, Laura E.; Bloit, Julien; Lecea, Luis de; Jackson, Alexander C. (2017): Hypothalamic Tuberomammillary Nucleus Neurons: Electrophysiological Diversity and Essential Role in Arousal Stability. In: *J. Neurosci.* 37 (39), S. 9574–9592. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0580-17.2017.
- Fukagawa, K.; Sakata, T.; Shiraishi, T.; Yoshimatsu, H.; Fujimoto, K.; Ookuma, K.; Wada, H. (1989): Neuronal histamine modulates feeding behavior through H1-receptor in rat hypothalamus. In: *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 256 (3), S. R605. DOI: 10.1152/ajpregu.1989.256.3.R605.
- Garcia-Segura, L. M. (2008): Aromatase in the Brain: Not Just for Reproduction Anymore. In: *Journal of Neuroendocrinology* 20 (6), S. 705–712. DOI: 10.1111/j.13652826.2008.01713.x.
- Gelmann, Edward P. (2002): Molecular Biology of the Androgen Receptor. In: *JCO* 20 (13), S. 3001–3015. DOI: 10.1200/JCO.2002.10.018.
- Gendrel, D.; Chaussain, J. L.; Roger, M.; Job, J. C. (1980): Simultaneous postnatal rise of plasma LH and testosterone in male infants. In: *The Journal of pediatrics* 97 (4), S. 600–602.
- Gorczyńska, E.; Handelsman, D. J. (1995): Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. In: *Endocrinology* 136 (5), S. 2052–2059. DOI: 10.1210/endo.136.5.7720654.
- Gotoh, Koro; Masaki, Takayuki; Chiba, Seiichi; Higuchi, Keiko; Kakuma, Tetsuya; Shimizu, Hiroyuki et al. (2009): Hypothalamic neuronal histamine signaling in the estrogen deficiency induced obesity. In: *Journal of neurochemistry* 110 (6), S. 1796–1805. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06272.x.
- Grienberger, Christine; Konnerth, Arthur (2012): Imaging Calcium in Neurons. In: *Neuron* 73 (5), S. 862–885. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.02.011.
- Guo, Zhiyong; Benten, W. Peter M.; Krücken, Jürgen; Wunderlich, Frank (2002): Nongenomic Testosterone Calcium Signaling. In: *J. Biol. Chem.* 277 (33), S. 29600–29607. DOI: 10.1074/jbc.M202997200.
- Gurdjian, E. S. (1927): The diencephalon of the albino rat. Studies on the brain of the rat. No. 2. In: *J. Comp. Neurol.* 43 (1), S. 86. DOI: 10.1002/cne.900430102.

- Haas, Helmut L.; Panula, Pertti (2003): The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. In: *Nat Rev Neurosci* 4 (2), S. 121–130. DOI: 10.1038/nrn1034.
- Haas, Helmut L.; Sergeeva, Olga A.; Selbach, Oliver (2008): Histamine in the Nervous System. In: *Physiological Reviews* 88 (3), S. 1183–1241. DOI: 10.1152/physrev.00043.2007.
- Haas, Helmut L.; Sergeeva, Olga A. (2012): Warm and awake with histamine. In: *Neuropharmacology* 63 (2), S. 169–170. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.03.015.
- Hall, J.; Jones, R. D.; Jones, T. H.; Channer, K. S.; Peers, C. (2006): Selective Inhibition of L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in A7r5 Cells by Physiological Levels of Testosterone. In: *Endocrinology* 147 (6), S. 2675–2680. DOI: 10.1210/en.2005-1243.
- Handa, R. J.; Kerr, J. E.; DonCarlos, L. L.; McGivern, R. F.; Hejna, G. (1996): Hormonal regulation of androgen receptor messenger RNA in the medial preoptic area of the male rat. In: *Brain research. Molecular brain research* 39 (1-2), S. 57–67.
- Hemmings, Brian A.; Restuccia, David F. (2015): The PI3K-PKB/Akt Pathway. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (4), S. a026609. DOI: 10.1101/cshperspect.a026609.
- Horvath, Tamas L.; Diano, Sabrina; Tschöp, Matthias (2016): Brain Circuits Regulating Energy Homeostasis. In: *Neuroscientist* 10 (3), S. 235–246. DOI: 10.1177/1073858403262151.
- Hryb, D. J.; Khan, M. S.; Romas, N. A.; Rosner, W. (1990): The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (11), S. 6048–6054.
- Huang, Z.-L.; Mochizuki, T.; Qu, W.-M.; Hong, Z.-Y.; Watanabe, T.; Urade, Y.; Hayaishi, O. (2006): Altered sleep-wake characteristics and lack of arousal response to H3 receptor antagonist in histamine H1 receptor knockout mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (12), S. 4687–4692. DOI: 10.1073/pnas.0600451103.
- Huang, Z.-L.; Qu, W.-M.; Li, W.-D.; Mochizuki, T.; Eguchi, N.; Watanabe, T. et al. (2001): Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (17), S. 9965–9970. DOI: 10.1073/pnas.181330998.
- Hull, Elaine M.; Du, J.; Lorrain, D. S.; Matuszewich, L. (1997): Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. In: *Brain research bulletin* 44 (4), S. 327–333.
- Hull, Elaine M.; Dominguez, Juan M. (2007): Sexual behavior in male rodents. In: *Hormones and Behavior* 52 (1), S. 45–55. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.030.
- Hull, Elaine M.; Meisel, Robert L.; Sachs, Benjamin D. (2002): Male Sexual Behavior. In: *Hormones, Brain and Behavior*: Elsevier, S. 3–137.
- Ilagan, R.; Zhang, L. J.; Pottratz, J.; Le, K.; Salas, S.; Iyer, M. et al. (2005): Imaging androgen receptor function during flutamide treatment in the LAPC9 xenograft model. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 4 (11), S. 1662–1669. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0197.

Inagaki, N.; Toda, K.; Taniuchi, I.; Panula, P.; Yamatodani, A.; Tohyama, M. et al. (1990): An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. In: *Exp Brain Res* 80 (2). DOI: 10.1007/BF00228164.

Iqbal, J.; Swanson, J. J.; Prins, G. S.; Jacobson, C. D. (1995): Androgen receptor-like immunoreactivity in the Brazilian opossum brain and pituitary: distribution and effects of castration and testosterone replacement in the adult male. In: *Brain research* 703 (1-2), S. 1–18.

Iwahana, E., Karatsoreos, I., Shibata, S., & Silver, R. (2008). Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Hormones and behavior*, 53(3), 422-430. DOI: [10.1016/j.yhbeh.2007.11.014](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.014)

Jaeger, C. B.; Teitelman, G.; Joh, T. H.; Albert, V. R.; Park, D. H.; Reis, D. J. (1983): Some neurons of the rat central nervous system contain aromatic-L-amino-acid decarboxylase but not monoamines. In: *Science (New York, N.Y.)* 219 (4589), S. 1233–1235.

Jaeger, C. B.; Ruggiero, D. A.; Albert, V. R.; Park, D. H.; Joh, T. H.; Reis, D. J. (1984): Aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat brain: immunocytochemical localization in neurons of the brain stem. In: *Neuroscience* 11 (3), S. 691–713.

James, Peter J.; Nyby, John G. (2002): Testosterone rapidly affects the expression of copulatory behavior in house mice (*Mus musculus*). In: *Physiology & Behavior* 75 (3), S. 287–294.

James, Peter J.; Nyby, John G.; Saviolakis, George A. (2006): Sexually stimulated testosterone release in male mice (*Mus musculus*): Roles of genotype and sexual arousal. In: *Hormones and Behavior* 50 (3), S. 424–431. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2006.05.004.

Janssen, Erick (2011): Sexual arousal in men: A review and conceptual analysis. In: *Hormones and Behavior* 59 (5), S. 708–716. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2011.03.004.

Jones, Richard D.; English, Kate M.; Jones, T. Hugh; Channer, Kevin S. (2004): Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. In: *Clin. Sci.* 107 (2), S. 149–158. DOI: 10.1042/CS20030386.

Karasawa, Nobuyuki; Arai, Ryohachi; Isomura, Genzoh; Yamada, Keiki; Sakai, Kazuyoshi; Sakai, Masao et al. (1994): Phenotypic changes of AADC-only immunopositive premammillary neurons in the brain of laboratory shrew *Suncus murinus* by systemic administration of monoamine precursors. In: *Neuroscience Letters* 179 (1-2), S. 65–70. DOI: 10.1016/0304-3940(94)90936-9.

Kashon, M. L.; Arbogast, J. A.; Sisk, C. L. (1996): Distribution and hormonal regulation of androgen receptor immunoreactivity in the forebrain of the male European ferret. In: *The Journal of comparative neurology* 376 (4), S. 567–586. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<567::AID-CNE6>3.0.CO;2-#.

Kelly, Daniel M.; Jones, T. Hugh (2013): Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. In: *Journal of Endocrinology* 217 (3), S. R25. DOI: 10.1530/JOE-12-0455.

Kendrick, K. M.; Drewett, R. F. (1979): Testosterone reduces refractory period of stria terminalis neurons in the rat brain. In: *Science (New York, N.Y.)* 204 (4395), S. 877–879.

- Kendrick, K. M.; Drewett, R. F. (1980): Testosterone-sensitive neurones respond to oestradiol but not to dihydrotestosterone. In: *Nature* 286 (5768), S. 67–68. DOI: 10.1038/286067a0.
- Koenig, Harold; Goldstone, Alfred; Lu, Chung Y. (1982): Testosterone induces a rapid stimulation of endocytosis, amino acid and hexose transport in mouse kidney cortex. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 106 (2), S. 346–353. DOI: 10.1016/0006-291X(82)91116-0.
- Köhler, C.; Swanson, L. W.; Haglund, L.; J-Yen, Wu (1985): The cytoarchitecture, histochemistry and projections of the tuberomammillary nucleus in the rat. In: *Neuroscience* 16 (1), S. 85–110. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90049-1.
- Köhrle, J, Petrides PE (2007), Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe, In: *Biochemie & Pathobiochemie*, 8.Auflage, Hrsg. Löffler, G, Petrides, PE, Heinrich PC, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Kow, L.-M.; Easton, A.; Pfaff, D. W. (2005): Acute estrogen potentiates excitatory responses of neurons in rat hypothalamic ventromedial nucleus. In: *Brain Research* 1043 (1-2), S. 124–131. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.02.068.
- Laaksonen, D. E.; Niskanen, L.; Punnonen, K.; Nyyssonen, K.; Tuomainen, T.-P.; Valkonen, V.-P. et al. (2004): Testosterone and Sex Hormone-Binding Globulin Predict the Metabolic Syndrome and Diabetes in Middle-Aged Men. In: *Diabetes Care* 27 (5), S. 1036–1041. DOI: 10.2337/diacare.27.5.1036.
- Lacerda, Luiz D. E.; Kowarski, Avinoam; Johanson, A. J.N.N.; Athanasiou, Robert; Migeon, Claude J. (1973): Integrated Concentration and Circadian Variation of Plasma Testosterone in Normal Men. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 37 (3), S. 366–371. DOI: 10.1210/jcem-37-3-366.
- Lapauw, B.; Ouwens, M.; 't Hart, L. M.; Wuyts, B.; Holst, J. J.; T'Sjoen, G. et al. (2010): Sex Steroids Affect Triglyceride Handling, Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide, and Insulin Sensitivity: A 1-week randomized clinical trial in healthy young men. In: *Diabetes Care* 33 (8), S. 1831–1833. DOI: 10.2337/dc10-0515.
- Lee, V. W.; de Kretser, D M; Hudson, B.; Wang, C. (1975): Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. In: *Journal of reproduction and fertility* 42 (1), S. 121–126.
- Leonard, C. S.; Kukkonen, J. P. (2014): Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. In: *Br J Pharmacol* 171 (2), S. 314–331. DOI: 10.1111/bph.12324.
- Lieberherr, M.; Grosse, B. (1994): Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (10), S. 7217–7223.
- Lin, Jian-Sheng; Sakai, K.; Jouvett, M. (1988): Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. In: *Neuropharmacology* 27 (2), S. 111–122. DOI: 10.1016/0028-3908(88)90159-1.
- Lin, Jian-Sheng; Anaclet, Christelle; Sergeeva, Olga A.; Haas, Helmut L. (2011): The waking brain: an update. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (15), S. 2499–2512. DOI: 10.1007/s00018-011-0631-8.

- Lipman, Neil S.; Jackson, Lynn R.; Trudel, Laura J.; Weis-Garcia, Frances (2005): Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. In: *ILAR journal* 46 (3), S. 258–268.
- Loss, E. S.; Jacobsen, M.; Costa, Z. S.; Jacobus, A. P.; Borelli, F.; Wassermann, G. F. (2004): Testosterone Modulates K<sup>+</sup>ATP Channels in Sertoli Cell Membrane via the PLC-PIP<sub>2</sub> Pathway. In: *Horm Metab Res* 36 (8), S. 519–525. DOI: 10.1055/s-2004-825753.
- Lu, Shi-Fang; McKenna, Suzanne E.; Cologer-Clifford, Athena; Nau, Eugene A.; Simon, Neal G. (1998): Androgen Receptor in Mouse Brain: Sex Differences and Similarities in Autoregulation 1. In: *Endocrinology* 139 (4), S. 1594–1601. DOI: 10.1210/endo.139.4.5863.
- Lubahn, Dennis B.; Joseph, David R.; Sar, Madhabananda; Tan, Jiann-an; Higgs, Henry N.; Larson, Robert E. et al. (1988): The Human Androgen Receptor: Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning, Sequence Analysis and Gene Expression in Prostate. In: *Molecular Endocrinology* 2 (12), S. 1265–1275. DOI: 10.1210/mend-2-12-1265.
- Luca, Roberto de, (2016): Interactions of dopaminergic and histaminergic systems in health and disease, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, URL <https://docserv.uniduesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=41395>, URN urn:nbn:de:hbz:061-20180411092609-2
- Luca, Roberto de; Suvorava, Tatsiana; Yang, Danqing; Baumgärtel, Wilhelm; Kojda, Georg; Haas, Helmut L.; Sergeeva, Olga A. (2016): Identification of histaminergic neurons through histamine 3 receptor-mediated autoinhibition. In: *Neuropharmacology* 106, S. 102–115. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.025.
- Lyng, F. M.; Jones, G. R.; Rommerts, F. F. (2000): Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. In: *Biology of reproduction* 63 (3), S. 736–747.
- Machelon, Véronique; Nomé, Françoise; Tesarik, Jan (1998): Nongenomic Effects of Androstenedione on Human Granulosa Luteinizing Cells. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83 (1), S. 263–269. DOI: 10.1210/jcem.83.1.4523.
- Manni, Andrea; M, William; Cefalu, William; Nisula, Bruce C.; Bardin, C. Wayne; Santner, Steven J.; Santen, Richard J. (1985): Bioavailability of Albumin-Bound Testosterone. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 61 (4), S. 705–710. DOI: 10.1210/jcem-61-4-705.
- Masaki, T.; Yoshimatsu, H.; Chiba, S.; Watanabe, T.; Sakata, T. (2001): Targeted Disruption of Histamine H1-Receptor Attenuates Regulatory Effects of Leptin on Feeding, Adiposity, and UCP Family in Mice. In: *Diabetes* 50 (2), S. 385–391. DOI: 10.2337/diabetes.50.2.385.
- Masaki, Takayuki; Chiba, Seiichi; Yoshimichi, Go; Yasuda, Tohru; Noguchi, Hitoshi; Kakuma, Tetsuya et al. (2003): Neuronal Histamine Regulates Food Intake, Adiposity, and Uncoupling Protein Expression in Agouti Yellow (Ay / a) Obese Mice. In: *Endocrinology* 144 (6), S. 2741–2748. DOI: 10.1210/en.2003-0031.
- Masaki, Takayuki; Chiba, Seiichi; Yasuda, Tohru; Noguchi, Hitoshi; Kakuma, Tetsuya; Watanabe, Takeshi et al. (2004): Involvement of hypothalamic histamine H1 receptor in the regulation of feeding rhythm and obesity. In: *Diabetes* 53 (9), S. 2250–2260.

Matsumoto, A. M. (2002): Andropause: Clinical Implications of the Decline in Serum Testosterone Levels With Aging in Men. In: *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 57 (2), S. M76. DOI: 10.1093/gerona/57.2.M76.

McCutcheon, James Edgar; Marinelli, Michela (2009): Age matters. In: *European Journal of Neuroscience* 29 (5), S. 997–1014. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06648.x.

Michael, R. P.; Clancy, A. N.; Zumpe, D. (1995): Distribution of androgen receptor-like immunoreactivity in the brains of cynomolgus monkeys. In: *Journal of neuroendocrinology* 7 (9), S. 713–719.

Michels, Guido; Er, Fikret; Eicks, Michael; Herzig, Stefan; Hoppe, Uta C. (2006): Long-Term and Immediate Effect of Testosterone on Single T-Type Calcium Channel in Neonatal Rat Cardiomyocytes. In: *Endocrinology* 147 (11), S. 5160–5169. DOI: 10.1210/en.2006-0186.

Michels, Guido; Hoppe, Uta C. (2008): Rapid actions of androgens. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* 29 (2), S. 182–198. DOI: 10.1016/j.yfrne.2007.08.004.

Model, Z., Butler, M. P., LeSauter, J., & Silver, R. (2015). Suprachiasmatic nucleus as the site of androgen action on circadian rhythms. *Hormones and behavior*, 73, 1-7. DOI: [10.1016/j.yhbeh.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.007)

Moya-García, A. A.; Pino-Ángeles, A.; Gil-Redondo, R.; Morreale, A.; Sánchez-Jiménez, F. (2009): Structural features of mammalian histidine decarboxylase reveal the basis for specific inhibition. In: *British Journal of Pharmacology* 157 (1), S. 4–13. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00219.x.

Muraleedharan, V., & Jones, T. H. (2010). Testosterone and the metabolic syndrome. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 1(5), 207-223. DOI: <https://doi.org/10.1177/2042018810390258>

Nguyen, Thuy-Vi V.; Yao, Mingzhong; Pike, Christian J. (2007): Flutamide and Cyproterone Acetate Exert Agonist Effects: Induction of Androgen Receptor-Dependent Neuroprotection. In: *Endocrinology* 148 (6), S. 2936–2943. DOI: 10.1210/en.2006-1469.

Nishino, Seiji; Ripley, Beth; Overeem, Sebastiaan; Lammers, Gert Jan; Mignot, Emmanuel (2000): Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. In: *The Lancet* 355 (9197), S. 39–40. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)05582-8.

Nunez, Antonio A.; Siegel, Linda I.; Wade, George N. (1980): Central effects of testosterone on food intake in male rats. In: *Physiology & Behavior* 24 (3), S. 469–472. DOI: 10.1016/0031-9384(80)90238-3.

Obukhov, Alexander G.; Nowycky, Martha C. (2002): TRPC4 Can Be Activated by G-protein coupled Receptors and Provides Sufficient Ca<sup>2+</sup> to Trigger Exocytosis in Neuroendocrine Cells. In: *J. Biol. Chem.* 277 (18), S. 16172–16178. DOI: 10.1074/jbc.M111664200.

Orsini, J. C. (1985): Direct effects of androgens on lateral hypothalamic neuronal activity in the male rat: II. A pressure ejection study. In: *Brain research bulletin* 15 (6), S. 547–552.

Panula, P.; Pirvola, U.; Auvinen, S.; Airaksinen, M. S. (1989): Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. In: *Neuroscience* 28 (3), S. 585–610.

- Papadopoulou, Natalia; Papakonstanti, Evangelia A.; Kallergi, Galatea; Alevizopoulos, Konstantinos; Stournaras, Christos (2009): Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: Molecular signaling and clinical impact. In: *IUBMB Life* 61 (1), S. 56–61. DOI: 10.1002/iub.150.
- Parlato, R.; Rieker, C.; Turiault, M.; Tronche, F.; Schütz, G. (2006): Survival of DA neurons is independent of CREM upregulation in absence of CREB. In: *genesis* 44 (10), S. 454–464. DOI: 10.1002/dvg.20236.
- Parmentier, R.; Kolbaev, S.; Klyuch, B. P.; Vandael, D.; Lin, J.-S.; Selbach, O. et al. (2009): Excitation of Histaminergic Tuberoamillary Neurons by Thyrotropin-Releasing Hormone. In: *Journal of Neuroscience* 29 (14), S. 4471–4483. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.297608.2009.
- Passani, M. B.; Blandina, P.; Torrealba, F. (2010): The Histamine H3 Receptor and Eating Behavior. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336 (1), S. 24–29. DOI: 10.1124/jpet.110.171306.
- Payne, Anita H.; Hales, Dale B. (2004): Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. In: *Endocrine Reviews* 25 (6), S. 947–970. DOI: 10.1210/er.2003-0030.
- Peitsaro, Nina; Anichtchik, Oleg V.; Panula, Pertti (2000): Identification of a Histamine H3-like Receptor in the Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. In: *Journal of Neurochemistry* 75 (2), S. 718–724. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750718.x.
- Pfaff, Donald W.; Pfaffmann, Carl (1969): Olfactory and hormonal influences on the basal forebrain of the male rat. In: *Brain Research* 15 (1), S. 137–156. DOI: 10.1016/0006-8993(69)90315-1.
- Quigley, Charmian A. (2002): The Postnatal Gonadotropin and Sex Steroid Surge—Insights from the Androgen Insensitivity Syndrome. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87 (1), S. 24–28. DOI: 10.1210/jcem.87.1.8265.
- Rahman, Faisal; Christian, Helen C. (2007): Non-classical actions of testosterone: an update. In: *Trends in Endocrinology & Metabolism* 18 (10), S. 371–378. DOI: 10.1016/j.tem.2007.09.004.
- Ratz, Paul H.; Berg, Krystina M.; Urban, Nicole H.; Miner, Amy S. (2005): Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. In: *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288 (4), S. C769. DOI: 10.1152/ajpcell.00529.2004.
- Reddy, Doodipala Samba (2003): Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. In: *Critical reviews in neurobiology* 15 (3-4), S. 197–234.
- Reddy, Doodipala S. (2004): Anticonvulsant activity of the testosterone-derived neurosteroid 3alpha-androstanediol. In: *Neuroreport* 15 (3), S. 515–518.
- Robichaud, M.; Debonnel, G. (2005): Oestrogen and Testosterone Modulate the Firing Activity of Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurones in Both Male and Female Rats. In: *J Neuroendocrinol* 17 (3), S. 179–185. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2005.01292.x.

- Roselli, Charles E.; Horton, Linda E.; Resko, John A. (1985): Distribution and Regulation of Aromatase Activity in the Rat Hypothalamus and Limbic System\*. In: *Endocrinology* 117 (6), S. 2471–2477. DOI: 10.1210/endo-117-6-2471.
- Roselli, Charles E.; Klosterman, S.; Resko, J. A. (2001): Anatomic relationships between aromatase and androgen receptor mRNA expression in the hypothalamus and amygdala of adult male cynomolgus monkeys. In: *The Journal of comparative neurology* 439 (2), S. 208–223. DOI: 10.1002/cne.1343.
- Roselli, Charles E.; Liu, Mingyue; Hurn, Patricia D. (2009): Brain aromatization: classic roles and new perspectives. In: *Seminars in reproductive medicine* 27 (3), S. 207–217. DOI: 10.1055/s-0029-1216274.
- Rosner, William; Hryb, Daniel J.; Saeed Khan, M.; Nakhla, Atif M.; Romas, Nicholas A. (1991): Sex hormone-binding globulin: Anatomy and physiology of a new regulatory system. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 40 (4-6), S. 813–820. DOI: 10.1016/0960-0760(91)90307-Q.
- Rosner, W.; Hryb, D. J.; Khan, M. S.; Nakhla, A. M.; Romas, N. A. (1999): Sex hormone binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69 (1-6), S.481–485.
- Ross, Rachel A.; Leon, Silvia; Madara, Joseph C.; Schafer, Danielle; Fergani, Chrysanthi; Maguire, Caroline A. et al. (2018): PACAP neurons in the ventral premammillary nucleus regulate reproductive function in the female mouse. In: *eLife* 7, S. 250. DOI: 10.7554/eLife.35960.
- Ruzicka, L. und Wettstein, A. (1935): 161. Sexualhormone VII. Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten-3-on-17-ol) 31. VIII., S. 1264–1275
- Saad, Farid; Gooren, Louis (2009): The role of testosterone in the metabolic syndrome: A review. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 114 (1-2), S. 40–43. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2008.12.022.
- Sakata, Toshiie (1995): Histamine Receptor and its Regulation of Energy Metabolism. In: *Obesity Research* 3 (S4), S. 541S. DOI: 10.1002/j.1550-8528.1995.tb00225.x.
- Saper, C. B.; Chou, T. C.; Scammell, T. E. (2001): The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. In: *Trends in Neurosciences* 24 (12), S. 726–731.
- Saper, Clifford B.; Scammell, Thomas E.; Lu, Jun (2005): Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. In: *Nature* 437 (7063), S. 1257–1263. DOI: 10.1038/nature04284.
- Sasano, H.; Takashashi, K.; Satoh, F.; Nagura, H.; Harada, N. (1998): Aromatase in the human central nervous system. In: *Clinical endocrinology* 48 (3), S. 325–329.
- Schubring, S. R.; Fleischer, W.; Lin, J. S.; Haas, H. L.; Sergeeva, O. A. (2012): The bile steroid chenodeoxycholate is a potent antagonist at NMDA and GABAA receptors. In: *Neuroscience Letters* 506 (2), S. 322–326. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.11.036.
- Sergeeva, Olga A.; Amberger, B. T.; Eriksson, K. S.; Scherer, A.; Haas, H. L. (2003): Coordinated expression of 5-HT<sub>2C</sub> receptors with the NCX1 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in histaminergic neurones. In: *Journal of neurochemistry* 87 (3), S. 657–664.

- Sergeeva, Olga A.; Kletke, Olaf; Kragler, Andrea; Poppek, Anja; Fleischer, Wiebke; Schubring, Stephan R. et al. (2010): Fragrant Dioxane Derivatives Identify  $\beta$ 1-Subunit-containing GABAA Receptors. In: *J. Biol. Chem.* 285 (31), S. 23985–23993. DOI: 10.1074/jbc.M110.103309.
- Shakil, Tarranum; Hoque, A. N. Ehsanul; Husain, Mansoor; Belsham, Denise D. (2002): Differential Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion and Gene Expression by Androgen: Membrane Versus Nuclear Receptor Activation. In: *Molecular Endocrinology* 16 (11), S. 2592–2602. DOI: 10.1210/me.2002-0011.
- Shulman, Leanne M.; Spritzer, Mark D. (2014): Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. In: *Physiology & Behavior* 133, S. 8–13. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.05.001.
- Simerly, R. B.; Swanson, L. W.; Chang, C.; Muramatsu, M. (1990): Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. In: *J. Comp. Neurol.* 294 (1), S. 76–95. DOI: 10.1002/cne.902940107.
- Singh, S. M.; Gauthier, S.; Labrie, F. (2000): Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. In: *Current medicinal chemistry* 7 (2), S. 211–247.
- Sipos, M. L.; Nyby, J. G. (1996): Concurrent androgenic stimulation of the ventral tegmental area and medial preoptic area: synergistic effects on male-typical reproductive behaviors in house mice. In: *Brain research* 729 (1), S. 29–44.
- Stanic, Davor; Dubois, Sydney; Chua, Hui Kheng; Tonge, Bruce; Rinehart, Nicole; Horne, Malcolm K. et al. (2014): Characterization of Aromatase Expression in the Adult Male and Female Mouse Brain. I. Coexistence with Oestrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and Androgen Receptors. In: *PLoS ONE* 9 (3), S. e90451. DOI: 10.1371/journal.pone.0090451.
- Steinsapir, J.; Mora, G.; Muldoon, T. G. (1991): Effects of steroidal and non-steroidal antiandrogens on the androgen binding properties of the rat ventral prostate androgen receptor. In: *Biochimica et biophysica acta* 1094 (1), S. 103–112.
- Stevens, D. R.; Eriksson, K. S.; Brown, R. E.; Haas, H. L. (2001): The mechanism of spontaneous firing in histamine neurons. In: *Behavioural brain research* 124 (2), S. 105–112.
- Stocco, Douglas M.; Clark, Barbara J. (1996): Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells\*. In: *Endocrine Reviews* 17 (3), S. 221–244. DOI: 10.1210/edrv-17-3-221.
- Stoléru, Serge, and Harold Mouras (2007): Brain functional imaging studies of sexual desire and arousal in human males. In: *The psychophysiology of sex*, ed. E. Janssen, Indiana University Press. [HM].
- Sun, Mei; Yang, Lin; Feldman, Richard I.; Sun, Xia-meng; Bhalla, Kapil N.; Jove, Richard et al. (2003): Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway by Androgen through Interaction of p85 $\alpha$ , Androgen Receptor, and Src. In: *J. Biol. Chem.* 278 (44), S. 42992–43000. DOI: 10.1074/jbc.M306295200.
- Sun, Y.-H. (2006): Androgens Induce Increases in Intracellular Calcium Via a G Protein Coupled Receptor in LNCaP Prostate Cancer Cells. In: *Journal of Andrology* 27 (5), S. 671–678. DOI: 10.2164/jandrol.106.000554.

Szego, C. M.; Davis, J. S. (1967): Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (4), S. 1711–1718.

Takeda, Noriaki; Inagaki, Shinobu; Taguchi, Yoshitaka; Tohyama, Masaya; Watanabe, Takehiko; Wada, Hiroshi (1984): Origins of histamine-containing fibers in the cerebral cortex of rats studied by immunohistochemistry with histidine decarboxylase as a marker and transection. In: *Brain Research* 323 (1), S. 55–63. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90264-6.

Takeda, H.; Chodak, G.; Mutchnik, S.; Nakamoto, T.; Chang, C. (1990): Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. In: *Journal of Endocrinology* 126 (1), S. 17–NP. DOI: 10.1677/joe.0.1260017.

Tasaka, K.; Chung, Y. H.; Sawada, K.; Mio, M. (1989): Excitatory effect of histamine on the arousal system and its inhibition by H1 blockers. In: *Brain research bulletin* 22 (2), S. 271–275. DOI: 10.1016/0361-9230(89)90053-1.

Tashiro, Manabu; Mochizuki, Hideki; Iwabuchi, Kentaro; Sakurada, Yumiko; Itoh, Masatoshi; Watanabe, Takehiko; Yanai, Kazuhiko (2002): Roles of histamine in regulation of arousal and cognition: functional neuroimaging of histamine H1 receptors in human brain. In: *Life sciences* 72 (4-5), S. 409–414.

Tenover, Joyce S.; Matsumoto, Alvin M.; Plymate, Stephen R.; Bremner, William J. (1987): The Effects of Aging in Normal Men on Bioavailable Testosterone and Luteinizing Hormone Secretion: Response to Clomiphene Citrate\*. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 65 (6), S. 1118–1126. DOI: 10.1210/jcem-65-6-1118.

Tian, Lin; Hires, S. Andrew; Mao, Tianyi; Huber, Daniel; Chiappe, M. Eugenia; Chalasani, Sreekanth H. et al. (2009): Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. In: *Nat Methods* 6 (12), S. 875–881. DOI: 10.1038/nmeth.1398.

Valdés, José Luis; Sánchez, Cristián; Riveros, María Eugenia; Blandina, Patrizio; Contreras, Marco; Farías, Paula; Torrealba, Fernando (2010): The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. In: *European Journal of Neuroscience* 31 (11), S. 2073–2085. DOI: 10.1111/j.14609568.2010.07241.x.

Vicencio, Jose Miguel; Ibarra, Cristian; Estrada, Manuel; Chiong, Mario; Soto, Dagoberto; Parra, Valentina et al. (2006): Testosterone Induces an Intracellular Calcium Increase by a Nongenomic Mechanism in Cultured Rat Cardiac Myocytes. In: *Endocrinology* 147 (3), S. 1386–1395. DOI: 10.1210/en.2005-1139.

Vivanco, Igor; Sawyers, Charles L. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. In: *Nat Rev Cancer* 2 (7), S. 489–501. DOI: 10.1038/nrc839.

Von Ledeber, E. I. C. F.; Almeida, J. P.; Loss, E. S.; Wassermann, G. F. (2002): Rapid Effect of Testosterone on Rat Sertoli Cell Membrane Potential. Relationship with K<sup>+</sup>ATP Channels. In: *Horm Metab Res* 34 (10), S. 550–555. DOI: 10.1055/s-2002-35426.

Vorobjev, Vladimir S.; Sharonova, Irina N.; Sergeeva, Olga A.; Haas, Helmut L. (2003): Modulation of ATP-induced currents by zinc in acutely isolated hypothalamic neurons of the rat. In: *British Journal of Pharmacology* 139 (5), S. 919–926. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705321.

- Walker, William H. (2009): Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis . In: *Steroids* 74 (7), S. 602–607. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.11.017.
- Walker, William H. (2010): Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. In: *Phil. Trans. R. Soc. B* 365 (1546), S. 1557–1569. DOI: 10.1098/rstb.2009.0258.
- Walker, Angela K.; Park, Won-Mee; Chuang, Jen-Chieh; Perello, Mario; Sakata, Ichiro; Osborne-Lawrence, Sherri; Zigman, Jeffrey M. (2013): Characterization of gastric and neuronal histaminergic populations using a transgenic mouse model. In: *PloS one* 8 (3), S. e60276. DOI: 10.1371/journal.pone.0060276.
- Wang, C.; Jackson, G.; Jones, T. H.; Matsumoto, A. M.; Nehra, A.; Perelman, M. A. et al. (2011): Low Testosterone Associated With Obesity and the Metabolic Syndrome Contributes to Sexual Dysfunction and Cardiovascular Disease Risk in Men With Type 2 Diabetes. In: *Diabetes Care* 34 (7), S. 1669–1675. DOI: 10.2337/dc10-2339.
- Wang, K. Y., Tanimoto, A., Yamada, S., Guo, X., Ding, Y., Watanabe, T., ... & Sasaguri, Y. (2010). Histamine regulation in glucose and lipid metabolism via histamine receptors: model for nonalcoholic steatohepatitis in mice. *The American journal of pathology*, 177(2), 713-723. DOI: [10.2353/ajpath.2010.091198](https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091198)
- Welling, L.; Jones, B.; Debruine, L.; Smith, F.; Feinberg, D.; Little, A.; Aldujaili, E. (2008): Men Report stronger attraction to femininity in women's faces when their testosterone levels are high. In: *Hormones and Behavior* 54 (5), S. 703–708. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2008.07.012.
- Wood, R.I.; Newman, S.W. (1999): Androgen Receptor Immunoreactivity in the Male and Female Syrian Hamster Brain. In: *J Neurobiol.* Jun 5;39(3), S. 359–370. Online verfügbar unter [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(19990605\)39:3<359::AID-NEU3>3.0.CO;2W](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(19990605)39:3<359::AID-NEU3>3.0.CO;2W).
- Wood, R. I.; Williams, S. J. (2001): Steroidal control of male hamster sexual behavior in Me and MPOA: effects of androgen dose and tamoxifen. In: *Physiology & Behavior* 72 (5), S. 727–733.
- Wouterlood, F. G.; Gaykema, R. P.A.; Steinbusch, H. W.; Watanabe, T.; Wada, H. (1988a): The connections between the septum-diagonal band complex and histaminergic neurons in the posterior hypothalamus of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase. In: *Neuroscience* 26 (3), S. 827–845.
- Wouterlood, F. G.; Gaykema, R.P.A. (1988b): Innervation of histaminergic neurons in the posterior hypothalamic region by medial preoptic neurons. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase in the rat. In: *Brain Research* 455 (1), S. 170–176. DOI: 10.1016/0006-8993(88)90129-1.
- Wu, Melody V.; Manoli, Devanand S.; Fraser, Eleanor J.; Coats, Jennifer K.; Tollkuhn, Jessica; Honda, Shin-Ichiro et al. (2009): Estrogen Masculinizes Neural Pathways and Sex Specific Behaviors. In: *Cell* 139 (1), S. 61–72. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.036.
- Yamada, Yasuyuki (1979): Effects of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. In: *Brain Research* 172 (1), S. 165–168. DOI: 10.1016/0006-8993(79)90906-5.

Yanovsky, Yevgenij; Li, Sha; Klyuch, Boris P.; Yao, Qiaoling; Blandina, Patrizio; Passani, M. Beatrice et al. (2011): I-Dopa activates histaminergic neurons. In: *The Journal of Physiology* 589 (6), S. 1349–1366. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.203257.

Yanovsky, Yevgenij; Zigman, Jeffrey M.; Kernder, Anna; Bein, Alisa; Sakata, Ichiro; Osborne Lawrence, Sherri et al. (2012): Proton- and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness. In: *Front. Syst. Neurosci.* 6. DOI: 10.3389/fnsys.2012.00023.

Ye, Leping; Su, Zhi-Jian; Ge, Ren-Shan (2011): Inhibitors of Testosterone Biosynthetic and Metabolic Activation Enzymes. In: *Molecules* 16 (12), S. 9983–10001. DOI: 10.3390/molecules16129983.

Yu, Jing; Akishita, Masahiro; Eto, Masato; Ogawa, Sumito; Son, Bo-Kyung; Kato, Shigeaki et al. (2010): Androgen Receptor-Dependent Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Endothelial Cells: Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. In: *Endocrinology* 151 (4), S. 1822–1828. DOI: 10.1210/en.2009-1048.

Yu, Jing; Akishita, Masahiro; Eto, Masato; Koizumi, Hideki; Hashimoto, Ryo; Ogawa, Sumito et al. (2012): Src kinase-mediates androgen receptor-dependent non-genomic activation of signaling cascade leading to endothelial nitric oxide synthase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 424 (3), S. 538–543. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.151.

Zhao Y., Anaclet C., Perrier M., Buda C., Wang T.H., Lin J.-S. “Sexual arousal, a role of histamine and orexins?” (2012) *Inflamm.Res.*61 (Suppl 2): S63, EHRS, 41 Annual Meeting, Belfast, Ireland.

Zhao Y., De Luca R., Baumgärtel W., Xie X., Haas H.L., Lin J.-S., Sergeeva O.A. „Activation of histaminergic and orexinergic neurons by testosterone“ (2018) *Inflamm.Res.* 67 ( Suppl) S35, EHRS, 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Dublin, Ireland.

Zoli, M.; Agnati, L. F.; Tinner, B.; Steinbusch, H.W.M.; Fuxe, K. (1993): Distribution of dopamine-immunoreactive neurons and their relationships to transmitter and hypothalamic hormone-immunoreactive neuronal systems in the rat mediobasal hypothalamus. A morphometric and microdensitometric analysis. In: *Journal of Chemical Neuroanatomy* 6 (5), S. 293–310. DOI: 10.1016/08910618(93)90034-2.

## 5.2 Internetseiten

Wayne Rasband/National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin), Image J, <https://imagej.nih.gov/ij/>, (letzter Stand: 09/2020)

Wikipedia, D'Agostino's  $K$ -squared test, [https://en.wikipedia.org/wiki/D%27Agostino%27s\\_Ksquared\\_test](https://en.wikipedia.org/wiki/D%27Agostino%27s_Ksquared_test), (letzter Stand: 09/2020)

Wikipedia, one-way analysis of variance, [https://en.wikipedia.org/wiki/Oneway\\_analysis\\_of\\_variance](https://en.wikipedia.org/wiki/Oneway_analysis_of_variance), (letzter Stand: 09/2020)

Hochschule Luzern, Mann-Whitney-U-Test, <https://www.empiricalmethods.hslu.ch/entscheidbaum/unterschiede/zentrale-tendenz/mann-whitney-u/>, (letzter Stand: 09/2020)

Hemmerich, W.A., t-Test, <https://matheguru.com/stochastik/t-test.html>, (letzter Stand: 09/2020)

Allen Institute, Allen Brain Atlas, [http://search.brain-map.org/related/matches.html?gene=364&referring\\_products=17](http://search.brain-map.org/related/matches.html?gene=364&referring_products=17), (letzter Stand: 09/2020)

Allen Institute, Mouse Brain, AR-Rp\_Baylor\_102633-coronal, <http://mouse.brainmap.org/experiment/show?id=2039>, (letzter Stand: 09/2020)

Universität Zürich, t-test für unabhängige Stichproben, [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html), (letzter Stand: 09/2020)

## Danksagung

Ich möchte allen voran Frau Professor Dr. Sergeeva und Herrn Professor Dr. Haas für das Anvertrauen des Projektes und ihre großartige Betreuung im Labor sowie die Unterstützung beim Verfassen der Doktorarbeit danken.

Besonderen Dank gilt auch Anette Scherer für die unbeschreibliche Unterstützung im Labor und bei der Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie die netten Gespräche, die mir die Zeit aufs Besondere versüßt haben.

Des Weiteren will ich mich bei Roberto De Luca und Danqing Yang bedanken, die mir die Zeit im Labor zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank den Veranstaltern der Seminare, Blockkurse und Vorlesungen von iBrain (*Interdisciplinary Graduate School for Brain Research and Translational Neuroscience*, Sprecher Prof. G. Reifenberger) im Wintersemester 2013/2014.

Ganz aufrichtig bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir Studium und die Zeit für das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht haben und mir zur Seite standen.