

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Anatomie I: Zelluläre Neurobiologie

Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Über den Einfluss von Reelin auf die Fortsatzdifferenzierung hippocampaler Neurone

Dissertation

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

vorgelegt von:

Christiane Katia Huber
aus Regensburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 03.06.2014**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Eckart Förster

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Roland Bender

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Aufbau des Hippocampus.....	1
1.2 Neuronale Migration	3
1.2.1 Prinzipien der neuronalen Migration	3
1.2.2 Die Schichtenbildung im Neokortex.....	3
1.2.3 Die Entwicklung des Gyrus dentatus	4
1.3 Reelin und die Reeler-Maus.....	5
1.4 Morphologische Defekte bei Reelin-defizienten Mäusen.....	6
1.5 Die Reelin-Signalkaskade	7
1.6 Der Reelin-Effekt auf Neurone	8
1.6.1 Die Entwicklung der axodendritischen Polaritätsachse radial migrierender Neurone <i>in vivo</i>	8
1.6.2 Die Entwicklung der axodendritischen Polarität radial migrierender Neurone <i>in vitro</i>	10
1.6.3 Der Reelin-Effekt auf die neuronale Polarisierung.....	11
1.6.4 Der Reelin-Effekt auf radial migrierende Neurone: „Go or Stop“?	13
1.6.5 Zur Rolle der Reelin-Rezeptoren	15
1.7 Reelin und radiale Gliazellen.....	17
1.8 Der Reelin-Effekt über den Notch-Signalweg	18
1.9 Der Reelin-Effekt im adulten Gehirn.....	19
1.10 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Arbeitsmaterialien und Geräte	21
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Software	23
2.1.4 Antikörper	24
2.1.4.1 Primärantikörper	24
2.1.4.2 Sekundärantikörper.....	24
2.1.5 Lösungen.....	24

2.1.6	Kulturmedium	25
2.1.7	Zelllinien für den Reelin- bzw. Kontrollüberstand	26
2.1.8	Versuchstiere.....	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Hippocampale Dispersionskultur.....	27
2.2.1.1	Beschichtung der Glasplättchen.....	27
2.2.1.2	Präparation der Hippocampi	27
2.2.1.3	Dissoziation der Hippocampi.....	28
2.2.1.4	Kultivierung der Neurone	28
2.2.1.5	Reelin- bzw. Kontrollmedium-Gewinnung und Konzentrierung zur Stimulation der neuronalen Kulturen.....	29
2.2.1.6	Stimulation der neuronalen Dispersionskulturen.....	29
2.2.1.7	Fixierung.....	30
2.2.1.8	Immunzytochemie	30
2.2.1.9	Mikroskopie und Auswertung	31
2.2.1.10	Einteilung der Zellen in Kategorien und Zellzählung	32
2.2.1.11	Erstellung einer Intensitätsskala	34
2.2.1.12	Statistische Auswertung.....	35
2.2.2	Lebendmikroskopie.....	36
2.2.3	Gehirnschnitte	37
2.2.3.1	Perfusion und Schock-Gefrieren der Gehirne.....	37
2.2.3.2	Herstellen von Gefrierschnitten am Kryostat	37
2.2.3.3	Immunhistochemie.....	38
2.2.3.4	Bildanalyse.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Ergebnisse der Dispersionskulturen.....	40
3.1.1	Die p-Cofilin-Immunreaktivität dissoziierter hippocampaler Neurone in verschiedenen Differenzierungsstadien	40
3.1.2	Das p-Cofilin-Färbemuster von 24 Stunden alten hippocampalen Neuronen <i>in vitro</i> (P5)	40
3.1.3	Das p-Cofilin-Färbemuster von 7 Tagen alten hippocampalen Neuronen <i>in vitro</i> (E18 und P5).....	42
3.1.3.1	Hippocampale Dispersionskultur des Stadiums E18.....	42
3.1.3.2	Hippocampale Dispersionskultur des Stadiums P5	43

3.1.4	Zellkategorien mit unterschiedlicher p-Cofilin-Immunreaktivität in 24 Stunden alten hippocampalen Dispersionskulturen (P5)	44
3.1.4.1	Anteil der beiden Hauptkategorien in der Dispersionskultur	45
3.1.4.2	Der Reelin-Effekt auf den Anteil der beiden Hauptkategorien	46
3.1.4.3	Anteil der Subgruppen in der Dispersionskultur	47
3.1.4.4	Reelin versus Kontrollmedium: „Shift“ der beiden Subgruppen...	49
3.1.4.5	Mehrfachvergleiche der vier Gruppen.....	51
3.1.4.6	Analyse der unbehandelten Kulturen.....	52
3.2	Ergebnisse der Lebendmikroskopie mit 24 Stunden alten hippocampalen Dispersionskulturen (P5).....	53
3.2.1	Bipolare Zellen ohne Zugabe von Reelin	53
3.2.2	Bipolare Zellen unter Reelin-Stimulation.....	54
3.3	Ergebnisse der Immunhistochemie an Gehirnschnitten: Die p-Cofilin-Immunreaktivität hippocampaler Neurone <i>in vivo</i>	55
3.3.1	Die p-Cofilin-Immunfärbung im Gyrus dentatus der Ratte verschiedener Entwicklungsstadien	55
3.3.2	Die p-Cofilin-Immunfärbung im Gyrus dentatus von adulten Ratten (P11 und P32)	56
3.3.3	Körnerzellen <i>in vivo</i> mit p-Cofilin-immunpositivem apikalem Fortsatz.....	58
4	Diskussion.....	59
4.1	Zur verwendeten Zellkulturmethode.....	59
4.2	Interpretation der Ergebnisse	60
4.2.1	Der Einfluss von Reelin auf die p-Cofilin-Immunfärbung von 7 Tagen alten Dispersionskulturen.....	60
4.2.2	Der Einfluss von Reelin auf die n-Cofilin-Phosphorylierung bipolarer Neurone.....	61
4.2.3	Der Einfluss von Reelin auf Neurone mit bereits polarisierter Verteilung der n-Cofilin-Phosphorylierung	62
4.3	Hypothese zur Reelin-Wirkung auf die axodendritische Fortsatzspezifizierung bipolarer Neurone.....	64
4.3.1	Die stabilisierende Wirkung von Reelin auf das Zytoskelett bipolarer Neurone: 2 Hypothesen.....	64
4.3.2	Crosstalk der Reelin-Signalkaskade: Fortsatzstabilisierung durch die Reelin-Notch-Interaktion	67

4.3.3	Zelladhäsionsmoleküle als Ziel der Reelin-Signalkaskade: Der Reelin-Effekt auf die Cadherin-Funktion	67
4.4	Ausblick	68
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Danksagung.....	82
8	Lebenslauf	83
9	Eidesstattliche Versicherung	84

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
<i>ad libitum</i>	nach Belieben
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
Aqua dest	destilliertes Wasser
Blbp	<i>brain lipid binding protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	lat. <i>carbo</i> (Kohlenstoff)
CA	Cornu ammonis (Ammonshorn)
CA 1-3	Cornu ammonis Region 1-3
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cdc42	<i>cell division control protein 42</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	<i>cortical plate</i> (Kortexplatte)
CR	Cajal-Retzius-Zellen
Cy3	Carbocyanin 3
d	engl. <i>day</i> (Tag)
d.h.	das heißt
Dab1	<i>Disabled-1</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DG	<i>dentate gyrus</i> (Gyrus dentatus)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E18	Embryonaltag 18
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> (und andere)
F-Aktin	Aktinfilamente
g	<i>granule cell layer</i> (Stratum granulosum, Körnerzellband)
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM130	<i>golgi matrix protein 130</i>
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
h	Hilus
h	lat. <i>hora</i> (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
HeNe	Helium-Neon
hf	<i>hippocampal fissure</i> (hippocampale Fissur)
iml	<i>inner molecular layer</i>
<i>in vitro</i>	lat. „im Glas“
<i>in vivo</i>	lat. „im Lebendigen“
IZ	intermediäre Zone
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
l	Liter
LIMK1	LIM-Kinase1
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
LP	<i>leading process</i>
M	Molar
m	Meter
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Stratum moleculare
ml	Milliliter

VII

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol (1mol = 6,023 * 10 ²³ Moleküle)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ms	Millisekunde
MZ	Marginalzone
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCad	Neuronale Cadherine
n-Cofilin	<i>non-muscle cofilin/cofilin1</i>
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
nm	Nanometer
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartat</i>
oml	<i>outer molecular layer</i>
p	Signifikanzniveau
P11	postnataler Tag 11
P32	postnataler Tag 32
P5	postnataler Tag 5
Par	<i>partitioning defective</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PO	postnataler Tag 0
PP	<i>preplate</i>
Rap1	<i>Ras-proximate-1</i>
RG	radiale Gliazellen
sec	Sekunde
sl	Stratum lucidum
sp	<i>pyramidal cell layer</i> (Stratum pyramidale, Pyramidenzellband)
SP	<i>subplate</i>
SRC	<i>sarcoma</i>

VIII

Stk25	<i>serin-/threonine-protein kinase 25</i>
SVZ	subventrikuläre Zone
Tab.	Tabelle
tif	<i>tagged image file</i>
TP	<i>trailing process</i>
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen/Minute
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
vgl.	vergleiche
VLDLR	<i>very low-density</i> Lipoproteinrezeptor
VZ	Ventrikulärzone

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hippocampus mit Gyrus dentatus, Cornu ammonis und Subiculum (Förster et al., 2006b).....	2
Abbildung 2: Schichtenentwicklung des Neokortex nach dem „Inside-out“-Prinzip (Honda et al., 2011).....	4
Abbildung 3: Die Reelin-Signalkaskade (Chai et al., 2009).....	8
Abbildung 4: Die Ausbildung der Polaritätsachse von kortikalen Neuronen <i>in vivo</i> (Barnes and Polleux, 2009).....	9
Abbildung 5: Die Entwicklungsstadien hippocampaler Neurone <i>in vitro</i> (Calderon de Anda et al., 2008).....	10
Abbildung 6: Immunfärbung des Neokortex von Ratten des Stadiums E17.5 (Chai et al., 2009).....	12
Abbildung 7a-b: 24 Stunden alte Dispersionskultur hippocampaler Neurone (P5).....	32
Abbildung 8: Zellkategorien bipolarer hippocampaler Neurone (P5)	33
Abbildung 9: Intensitätsskala zur quantitativen Erfassung der Färbungsintensität von bipolaren Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Immunfärbung.....	35
Abbildung 10 a-b: 24 Stunden alte Dispersionskultur hippocampaler Neurone (P5).....	40
Abbildung 11: Bipolare Zelle (P5) mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher Intensität.....	41
Abbildung 12: Dispersionskultur hippocampaler Neurone (E18) nach 7 Tagen <i>in vitro</i> zur Demonstration der p-Cofilin-Immunfärbung der Fortsätze	42
Abbildung 13: Dispersionskultur hippocampaler Neurone (E18) nach 7 Tagen <i>in vitro</i> zur Demonstration von p-Cofilin-positiven Zellkontakten.	43
Abbildung 14: Dispersionskultur hippocampaler Neurone (P5) nach 7 Tagen <i>in vitro</i> zur Demonstration der p-Cofilin-Immunfärbung der Fortsätze.	43
Abbildung 15: Zellkategorien bipolarer hippocampaler Neurone (P5).....	44
Abbildung 16: Kreisdiagramm zur Darstellung des prozentualen Anteils der beiden Hauptkategorien I bzw. II von p-Cofilin-immungefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl	45
Abbildung 17: Säulendiagramm zur Darstellung des Reelin-Effekts auf die beiden Hauptkategorien I bzw. II von p-Cofilin-immungefärbten Zellen.....	46
Abbildung 18: Punktdiagramm zur Demonstration des Reelin-Effekts auf den prozentualen Anteil der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb	48
Abbildung 19: Punktdiagramm zur Demonstration des Kontrollmedium-Effekts auf den Anteil der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb	48
Abbildung 20: Säulendiagramm „Shift“ der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb	49

Abbildung 21: Mehrfachvergleiche der vier Gruppen von bipolaren Neuronen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Intensität.....	51
Abbildung 22: Säulendiagramm der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb der unbehandelten Kulturen.....	52
Abbildung 23 a-d (Time Lapse): Aufnahmen eines Neurons im bipolaren Stadium (ohne Reelin-Behandlung) im Zeitverlauf (min).....	53
Abbildung 24 a-f (Time Lapse): Aufnahmen einer bipolaren Zelle (a) nach Zugabe von Reelin (b) im Zeitverlauf (c-f).	54
Abbildung 25: Ratten-Gehirnschnitte verschiedener Entwicklungsstadien nach p-Cofilin-Immunfärbung (rot).....	55
Abbildung 26 a-d: Körnerzellband des Gyrus dentatus (P11 und P32).....	57
Abbildung 27a-b: Körnerzellen nach p-Cofilin-Immunfärbung mit p-Cofilin-immunpositivem apikalen Fortsatz	58
Abbildung 28: Interpretation der Reelin-Wirkung auf bipolare Neurone, Hypothese a) gemäß Chai <i>et al.</i> (2009), b) gemäß Leemhuis <i>et al.</i> (2010)	66

1 Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau des Hippocampus

Der Hippocampus gilt zusammen mit dem Gyrus cinguli, dem Gyrus parahippocampalis mit der Area entorhinalis, dem Corpus amygdaloideum und dem Corpus mamillare als Bestandteil des limbischen Systems.

Dessen Bezeichnung geht auf Broca zurück, der 1878 zwei parallel liegende Ringsysteme an der medialen Hemisphärenwand als „grand lobe limbique“ beschrieb, die sich wie ein „Saum“ um Balken und Zwischenhirn legten (Broca, 1878).

Es wird angenommen, dass das limbische System eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Emotionen, dem Affektverhalten und der vegetativen Modulation spielt (Papez, 1937, Maclean, 1955).

Die Bedeutung des Hippocampus liegt vor allem in der räumlichen Orientierung (Milner et al., 1997) und in der Gedächtniskonsolidierung, d.h. dem Überführen von Kurzzeitgedächtnisinhalten in das Langzeitgedächtnis.

Menschen mit Hippocampus-Defekten weisen somit eine anterograde Amnesie auf (Scoville and Milner, 1957, Zola-Morgan et al., 1986).

Anatomisch befindet sich der Hippocampus größtenteils im Lobus temporalis medial des Seitenventrikels. Wegen seines annäherungsweise dreischichtigen Aufbaus wird er als Anteil des phylogenetisch älteren Archikortex angesehen, der dem sechsschichtigen, phylogenetisch jüngeren Neokortex gegenübergestellt wird (Brodmann, 1909, Vogt and Vogt, 1919).

Man unterscheidet drei Regionen des Hippocampus voneinander (vgl. Abb.1): Das Ammonshorn (Cornu ammonis) und den Gyrus dentatus (Fascia dentata), welche C-förmig ineinandergreifen, und das Subiculum als Übergang zum entorhinalen Kortex des Gyrus parahippocampalis.

Der Gyrus dentatus stellt die Eingangsstation für kortikale Afferenzen dar. Die Zellkörper der glutamatergen Prinzipalzellen befinden sich im Stratum granulosum (Körnerzellband); ihre Dendriten weisen in das zellarme Stratum molekulare (Molekularschicht), welches in eine äußere (*oml*; *outer molecular layer*) und eine innere (*iml*; *inner molecular layer*) Schicht untergliedert wird. An der äußeren Schicht enden die Afferenzen von Projektionsneuronen des entorhinalen Kortex, an der inneren Schicht die Afferenzen aus Assoziations- und Kommissurenfasern der Mooszellen von ipsi- und kontralateralen Hilusbereichen (Blackstad, 1958).

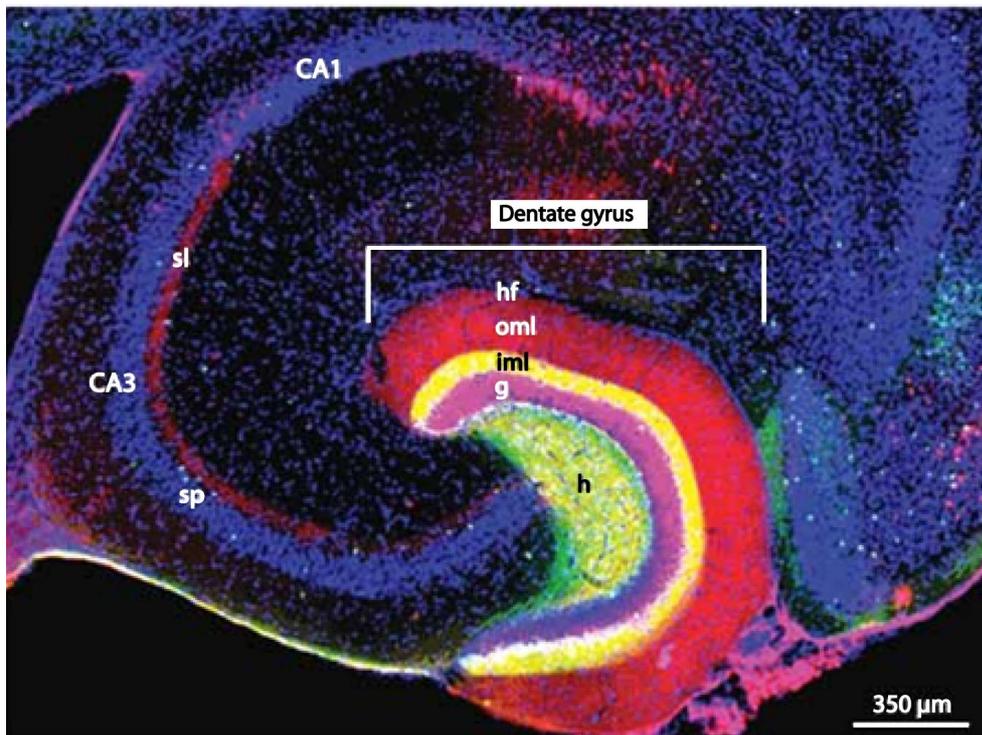


Abbildung 1: Hippocampus mit Gyrus dentatus, Cornu ammonis und Subiculum (Förster et al., 2006b). Neurone und Faserprojektionen im Hippocampus sind in Schichten organisiert, in der vorliegenden Abbildung sichtbar gemacht durch immunzytochemische Färbungen gegen zellspezifische Markerproteine und unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper.

Abkürzungen:

- h:** Hilus mit Mooszellen; grün: Antikörper gegen Calretinin
- g:** *granule cell layer* (Körnerzellband); rot: Antikörper gegen Calbindin, blau: DAPI (Kernfärbung). Die Dendriten reichen bis zur hippocampalen Fissur, die Axone bis ins Stratum lucidum.
- iml:** *inner molecular layer* (innere Molekularschicht): Projektion der Assoziations- und Kommissurenfasern der Mooszellen
- oml:** *outer molecular layer* (äußere Molekularschicht): Afferenzen des entorhinalen Kortex
- hf:** *hippocampal fissure* (hippocampale Fissur)
- sp:** *pyramidal cell layer* (Pyramidenzellband) mit Region CA1-CA3; blau: DAPI (Kernfärbung)
- sl:** Stratum lucidum: Axone der Körnerzellen (Moosfasern) im Bereich CA3

Zwischen dem bogenförmigen Gyrus dentatus und dem CA3-Sektor des Cornu ammonis befindet sich der Hilus mit Axonen der Körnerzellen, welche als Moosfasern bezeichnet werden. Somit liegt eine strenge räumliche Trennung von Afferenzen und Efferenzen vor (Stanfield and Cowan, 1979b).

Das Cornu ammonis, welches traditionellerweise in verschiedene Sektoren (CA1 bis CA4) untergliedert wird (Cajal, 1883, Lorente de N6, 1934), weist ebenfalls einen dreischichtigen Aufbau auf, wobei die glutamatergen Prinzipalzellen hier als Pyramidenzellen bezeichnet werden.

An der dem Gyrus dentatus zugewandten Seite des Pyramidenzellbandes befindet sich das Stratum radiatum, welches den Eingangsbereich der afferenten Moosfasern aus dem Gyrus dentatus darstellt und sich nach innen in das Stratum molekulare-lacunosum fortsetzt. Im Bereich CA3 liegt zwischen dem Pyramidenzellband und dem Stratum radiatum das

sogenannte Stratum lucidum, welches die Faserprojektionen der Körnerzellen in das Stratum pyramidale enthält (Amaral et al., 2007).

Zwischen der ventrikelnah gelegenen Faserschicht (Alveus) und dem Pyramidenzellband findet man das Stratum oriens mit inhibitorischen Korbzellen (Ribak and Seress, 1983).

Die Dendritenbäume der Pyramidenzellen sind sowohl nach innen als auch nach außen gerichtet, während die Axone zentrifugal in Richtung Alveus verlaufen. Hippocampale Efferenzen enden vor allem in den Corpora mamillaria, im Septum und im kontralateralen Hippocampus.

Weitere hippocampale Zelltypen sind Mooszellen im Bereich des Hilus (Ribak et al., 1985), und eine heterogene Gruppe von GABAergen Interneuronen, die nicht auf eine bestimmte Schicht begrenzt sind (Freund and Buzsaki, 1996).

1.2 Neuronale Migration

1.2.1 Prinzipien der neuronalen Migration

Es werden drei Hauptprinzipien der neuronalen Migration unterschieden, die sowohl für den Neokortex als auch den Hippocampus gelten (Nadarajah and Parnavelas, 2002):

Während exzitatorische Prinzipalneurone (Körnerzellen und Pyramidenzellen) von der Ventrikulärzone radial in Richtung Pia migrieren, wandern inhibitorische Interneurone tangential vom basalen Telencephalon zu ihrem Endziel im Neokortex und Hippocampus (Anderson et al., 1997, Anderson et al., 2001).

Bei der radialen Migration der Prinzipalzellen können weiterhin zwei Fortbewegungstypen differenziert werden:

Zum einen existiert eine Migrationsform durch Somatranslokation entlang des führenden neuronalen Fortsatzes (*leading process*), welche zur Bewältigung kurzer Distanzen im frühen embryonalen Kortex dient, und zum anderen eine Migrationsform entlang radialer Gliazellen, die im späteren embryonalen Kortex zur Bewältigung weiterer Wegstrecken vorherrscht (Nadarajah and Parnavelas, 2002).

1.2.2 Die Schichtenbildung im Neokortex

Ein wesentliches histologisches Charakteristikum sowohl von Hippocampus als auch Neokortex ist die klare Trennung der Zell- und Faserschichten. Neuronale Migration als auch neuronale Zellproliferation tragen entscheidend zu der Entstehung dieser Architektur bei (vgl. Abb. 2).

Neokortikale Neurone gehen aus Progenitorzellen einer teilungsaktiven Zone (Ventrikulärzone) hervor, die sich nahe der Seitenventrikel befindet.

Die Entwicklung des Rattenneokortex beginnt am 12. embryonalen Tag (E12) mit der Entstehung der *preplate*, einer zellreichen Schicht aus Reelin produzierenden Cajal-Retzius (CR)-Zellen und *subplate* (SP)-Neuronen (Valverde et al., 1995).

Durch die Invasion von neu entstandenen Neuronen aus der Ventrikulärzone wird die *preplate* im Stadium E16 in Marginalzone (MZ) und *subplate* aufgespalten. Dabei passieren die Neurone auf ihrem Weg in Richtung Pia sowohl die *subplate* als auch die vorher entstandene Zellschicht, um die Grenze zur Marginalzone zu erreichen (Bayer et al., 1991).

Dadurch ergibt sich ein sogenanntes „inside-out“-Schema für die Schichtenbildung des Neokortex.

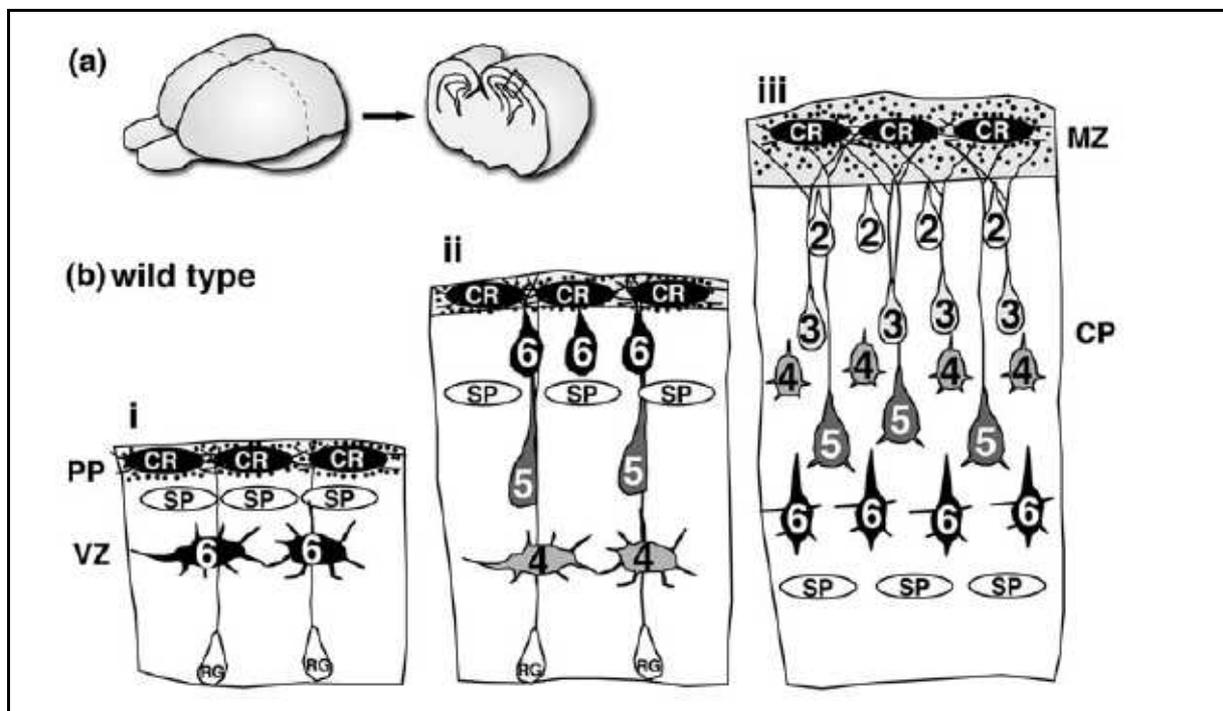


Abbildung 2: Schichtenentwicklung des Neokortex nach dem „Inside-out“-Prinzip (Honda et al., 2011).

i: Entstehung der *preplate* aus Cajal-Retzius-Zellen und *subplate*-Neuronen

ii: Aufspaltung der *preplate* durch Einwanderung von Neuronen aus der Ventrikulärzone

iii: „Inside-Out“-Prinzip des Neokortex: Die jüngsten Neurone befinden sich am weitesten außen

Abkürzungen:

Schichten: PP=*preplate*; VZ=*ventricular zone*; MZ=*marginal zone*, CP=*cortical plate*

Die arabischen Zahlen stehen für die zukünftigen Kortexschichten.

Zellen: CR=Cajal-Retzius-Zellen; RG=radiale Gliazellen; SP=*subplate*-Neurone

1.2.3 Die Entwicklung des Gyrus dentatus

Die Vorläuferzellen des Stratum granulosum (ebenso wie die Vorläuferzellen des Ammonshorns) entstammen dem Neuroepithel der Ventrikulärzone (Altman and Bayer,

1990b). Entlang von radialen Gliafasern migrieren diese Vorläuferzellen in Richtung der pialen Oberfläche des zukünftigen Gyrus dentatus.

Das suprapyramidale Band entsteht dabei vor dem infrapyramidalen Band, dessen Zellen aus einer sekundären Proliferationszone im Bereich des zukünftigen Hilus generiert werden (Altman and Bayer, 1990a).

Einige Precursorzellen behalten ihre Teilungsfähigkeit und bilden auch postnatal weitere Proliferationszonen im Bereich des Hilus (Altman and Das, 1966).

Die adulte Neurogenese des Gyrus dentatus konnte auch am Menschen nachgewiesen werden (Eriksson et al., 1998) und ermöglicht die Untersuchung der Entwicklungsprozesse von Körnerzellen an postnatalen Zellkulturen bzw. adulten Ratten.

Im Gegensatz zum „inside out“-Prinzip des Neokortex und Ammonshorns, bei dem sich die migrierenden Neurone an die Oberfläche einer bereits bestehenden Zellschicht anlagern, besteht im Gyrus dentatus das „outside-in“-Prinzip, wonach sich die migrierenden Zellen unterhalb einer älteren Schicht ansiedeln (Stanfield and Cowan, 1979a).

Sowohl bei der radialen Migration des Neokortex als auch des Hippocampus spielt das extrazelluläre Matrixprotein Reelin eine wichtige Rolle.

1.3 Reelin und die Reeler-Maus

Reelin ist ein 3461 Aminosäuren langes Glycoprotein (D'Arcangelo et al., 1997), dessen Gen 1995 entdeckt wurde (D'Arcangelo et al., 1995). Damals konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion eines Gens, welches für ein extrazelluläres Matrixprotein kodierte, zu dem Phänotyp der sogenannten Reeler-Maus führte.

Bei der Reeler-Maus handelt es sich um eine erstmals spontan aufgetretene Mutante der Hausmaus, die bereits 1951 von Falconer beschrieben wurde (Falconer, 1951). Charakteristisch für den Phänotyp der Reeler-Mutante sind motorische Koordinationsstörungen, Ataxie und Tremor (*to reel* \triangleq taumeln, schwanken). In Anlehnung an die Bezeichnung Reeler-Maus wurde das Gen „RELN“ und das von diesem Gen kodierte Protein „Reelin“ genannt.

Reelin wird in der frühen embryonalen Phase von sogenannten Cajal-Retzius-Zellen sezerniert, die Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt wurden (Cajal, 1891, Retzius, 1893, Retzius, 1894). Im Hippocampus und Neokortex befinden sich diese Zellen in der Marginalzone, einer zellarmen Schicht unterhalb der Pia (D'Arcangelo et al., 1995, Hirotsune et al., 1995, Drakew et al., 1998).

In der pränatalen und adulten Phase erfolgt die Reelin-Sekretion hauptsächlich durch GABAerge Interneurone, während die Sekretion durch die Cajal-Retzius Zellen zurückgeht (Alcantara et al., 1998).

Reelin spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Migration und Schichtenbildung von Neokortex und Hippocampus. Liegt ein Defekt in der Sekretion oder der Signalkaskade vor, kommt es zu schweren Störungen der Schichtenbildung (D'Arcangelo, 2006, Förster et al., 2006a) und zur Fehlorientierung radial migrierender Neurone (Pinto Lord and Caviness, 1979).

1.4 Morphologische Defekte bei Reelin-defizienten Mäusen

Im ZNS der Reeler-Maus weisen zahlreiche Bereiche neuronale Migrationsstörungen auf: Im Neokortex kommt es zu einer Umkehr des „inside-out“-Prinzips, wodurch die neu generierten Neurone unterhalb der zuletzt gebildeten Zellschicht verbleiben.

Ebenso zeigen die Organisation der Purkinje-Zellschicht im Cerebellum als auch der Faltungsprozess der inferioren Olive Defizite, die auf eine gestörte neuronale Migration zurückzuführen sind (Tissir and Goffinet, 2003).

Der Hippocampus der Reeler-Maus weist auf den ersten Blick nur leichte Abweichungen vom Wild-Typ auf. Es bestehen jedoch, im Gegensatz zum longitudinalen und transversalen Ausmaß, erhebliche Veränderungen des radiären Aufbaus (Stanfield and Cowan, 1979b):

Das Ammonshorn weist unscharfe Begrenzungen auf und zeigt im Bereich von CA1 eine Verdopplung des Pyramidenzellbands. Ein Zellband mit korrekt ausgerichteten Dendriten befindet sich nahe der Fissur, während das andere Zellband mit fehlorientierten Fortsätzen nahe dem Stratum oriens gelegen ist (Deller et al., 1999).

Die dicht gepackte, bandförmige Anordnung der Körnerzellen im Gyrus dentatus ist in der Reeler-Maus völlig aufgehoben; stattdessen liegen die Körnerzellen ungeordnet im Bereich des Hilus verteilt vor.

Zudem kommt es zu einer Fehlorientierung der axodendritischen Polaritätsachse, wobei die Zellen scheinbar wahllos Dendriten und Axone in verschiedene Richtungen ausbilden (Stanfield and Cowan, 1979b, Drakew et al., 2002).

Die Abweichungen der Polaritätsachse in verschiedenen Winkeln von der normalen Orientierung wurden sowohl für Neokortex als auch Hippocampus beschrieben (Stanfield and Cowan, 1979b, Terashima et al., 1983).

Dabei kann die Ausrichtung von Dendrit und Axon vollständig invertiert sein, d.h. das Axon tritt aus dem apikalen Zellpol aus, während der Dendrit zum Ventrikel weist (Landrieu and Goffinet, 1981).

Es fanden sich jedoch auch Neurone, bei denen das Axon lateral aus ventrikelwärts gerichteten Dendriten entsprang (Pinto Lord and Caviness, 1979).

1.5 Die Reelin-Signalkaskade

Nachdem das Reelin-Gen 1995 entdeckt wurde, stand in den letzten Jahren die Erforschung der Reelin-Signalkaskade im Vordergrund (vgl. Abb. 3).

Es wurden zwei Reelin-Rezeptoren, Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2) und *very low-density* Lipoproteinrezeptor (VLDLR) identifiziert, deren Stimulation eine Tyrosinphosphorylierung des intrazellulären Signalmoleküls Dab1 induziert (D'Arcangelo et al., 1999, Trommsdorff et al., 1999).

Dies geschieht über verschiedene Kinasen aus der SRC-Familie, insbesondere Fyn und in geringerem Maße Src (Arnaud et al., 2003, Bock and Herz, 2003).

Es wurden bereits mehrere Interaktionspartner von Dab1, wie beispielsweise die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) identifiziert, die eine Phosphorylierung von Akt und GSK-3 β bewirkt (Bock et al., 2003).

Die Interaktion von GSK-3 β mit Tau, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, führt zu einer Hemmung der Tau-Phosphorylierung (Hiesberger et al., 1999, Ohkubo et al., 2003).

Mittlerweile sind mehrere Rezeptoren bekannt, die Einfluss auf die Reelin-Signalkaskade haben. Dazu gehören beispielsweise die α 3 β 1-Integrine (Dulabon et al., 2000, Förster et al., 2002).

Im Gegensatz zu den gut verstandenen Mechanismen der „upstream“-Signaltransduktion, zu denen die Reelin-Wirkung auf membranständige Rezeptoren und das Dab1-Signalmolekül gehören, sind die Komponenten der „downstream“-Signalkaskade und ihr funktioneller Aspekt für die neuronale Migration noch weitgehend unbekannt.

Erst vor drei Jahren wurde n-Cofilin (*non-muscle cofilin*, *cofilin1*), ein F-Aktin-assoziiertes Protein mit regulatorischer Funktion auf die zytoskelettale Stabilität (Bamburg, 1999), als ein Effektormolekül der Reelin-Signalkaskade identifiziert (Chai et al., 2009).

Über das Enzym LIM-Kinase1 (LIMK1) wird n-Cofilin an einem Serinrest phosphoryliert, wodurch seine F-Aktin-depolymerisierende Fähigkeit herabgesetzt wird (Arber et al., 1998).

Der verminderte Aktinturnover führt anschließend zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts.

Die LIMK1-abhängige Phosphorylierung von n-Cofilin setzt ebenfalls die Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) voraus (Bock et al., 2003).

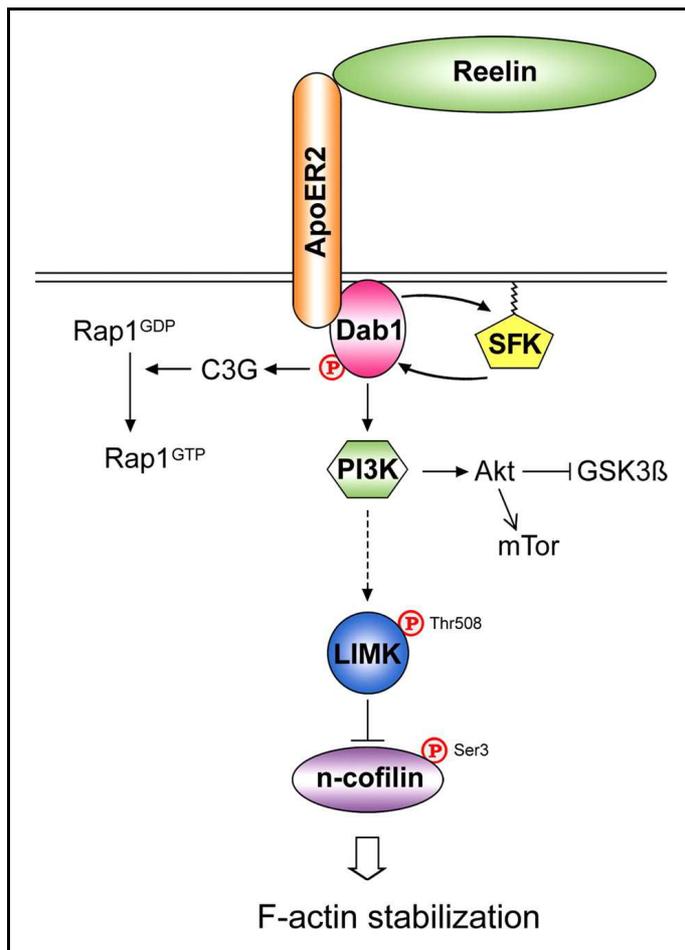


Abbildung 3: Die Reelin-Signalkaskade (Chai et al., 2009)

Die Bindung von Reelin an ApoER2 führt zur Phosphorylierung des Dab1-Signalmoleküls. Über die Interaktion mit der PI3-Kinase wird eine Phosphorylierung der LIM-Kinase herbeigeführt, welche das F-Aktin-assoziierte Protein n-Cofilin phosphoryliert. N-Cofilin hat Einfluss auf die Stabilisierung des Zytoskeletts.

1.6 Der Reelin-Effekt auf Neurone

1.6.1 Die Entwicklung der axodendritischen Polaritätsachse radial migrierender Neurone *in vivo*

Nach ihrer Entstehung in der Ventrikulärzone durch asymmetrische Teilung radialer Gliazellen wandern die Neuroblasten entlang von Gliafasern in Richtung Kortex (Rakic, 1972). Bei Erreichen der subventrikulären Zone lösen sich die Zellen von den Gliafasern und bilden mehrere Fortsätze (multipolares Stadium) aus (LoTurco and Bai, 2006).

Die Migration bis zur intermediären Zone erfolgt gliazellunabhängig (Tabata and Nakajima, 2003).

In der intermediären Zone nehmen die Zellen wieder Kontakt zu den Gliazellen auf und wechseln schließlich in das bipolare Stadium (vgl. Abb. 4).

Während ein Fortsatz in Richtung Pia weist (*leading process*) und später zum Dendriten spezifiziert wird, zeigt der andere Fortsatz (*trailing process*) zur Ventrikulärzone und entwickelt sich später zum Axon (Barnes et al., 2007, Barnes and Polleux, 2009).

Die Fortbewegung bis zur Marginalzone erfolgt über gliazellabhängige Lokomotion (Noctor et al., 2004).

Sobald der *leading process* die Marginalzone erreicht, bildet er zahlreiche Verzweigungen aus. Anschließend lösen sich die Zellen von den Gliafasern und migrieren die letzte Strecke mittels gliazellunabhängiger Somatranslokation (Nadarajah et al., 2001).

Die Verzweigungen des *leading process* stellen eine Art Verankerungshilfe für die Translokation des Zellkörpers dar, der vom *leading process* in die Richtung der Marginalzone gezogen wird (Gupta et al., 2002).

Während der frühen Stadien der Kortikogenese kann die Migration allein durch Somatranslokation bewerkstelligt werden, da die Schichtdicke des Kortex gering ist und die Marginalzone durch Extension des *leading process* erreicht werden kann. Im späteren Verlauf kommt der gliazellabhängigen Lokomotion größere Bedeutung zu, da die migrierenden Neurone eine weitere Wegstrecke zurücklegen müssen (Nadarajah and Parnavelas, 2002).

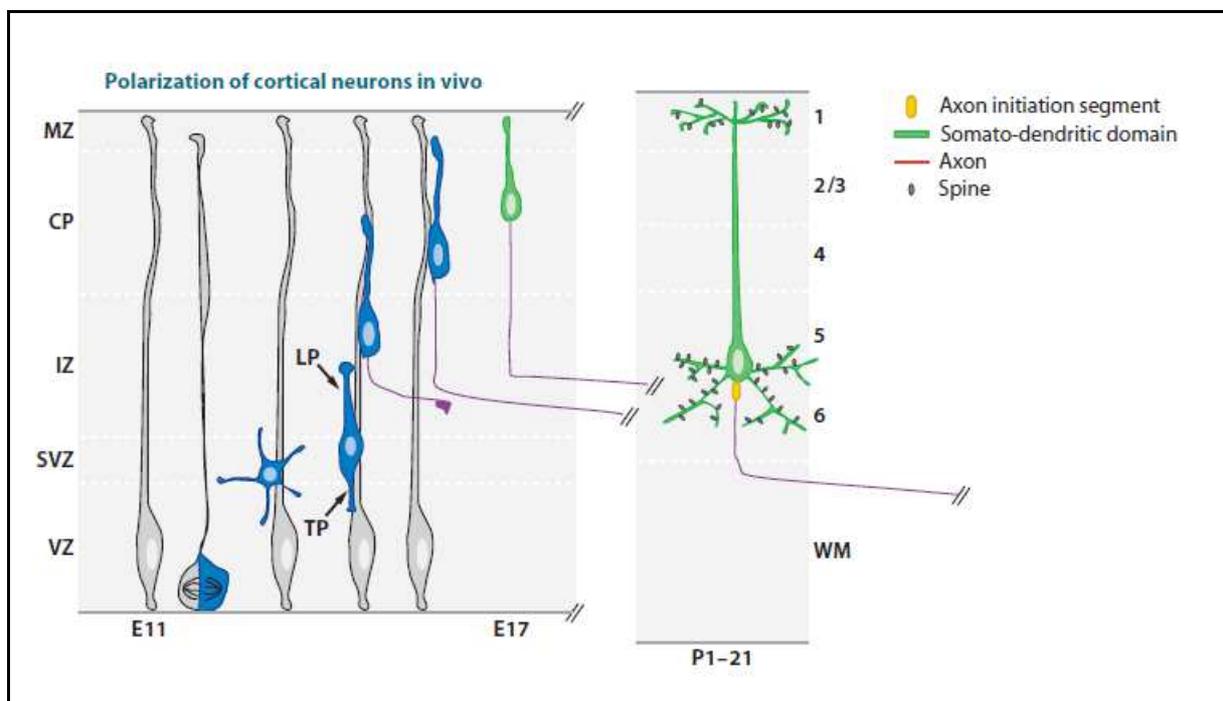


Abbildung 4: Die Ausbildung der Polaritätsachse von kortikalen Neuronen *in vivo* (Barnes and Polleux, 2009)

Nach ihrer Entstehung durch asymmetrische Teilung radialer Gliazellen wandern die Neuroblasten in Richtung Marginalzone. Während des multipolaren Stadiums erfolgt die Migration gliazellunabhängig. Bei Erreichen der intermediären Zone nehmen die Zellen wieder Kontakt zu den radialen Gliazellen auf und bilden *trailing process* bzw. *leading process* aus (bipolares Stadium), die später zu Axon und Dendrit differenziert werden.

Abkürzungen: LP=*leading process*, TP=*trailing process*, VZ=Ventrikulärzone, CP=Kortexplatte, IZ=intermediäre Zone, SVZ=subventrikuläre Zone, WM=ventrikuläre Zone.

Anhand der obigen Charakterisierung des bipolaren Stadiums *in vivo* wird deutlich, dass die Entstehung der axodendritischen Polaritätsachse bereits während der Migration erfolgt.

Im Entwicklungsstadium E18 wird Reelin von GABAergen Interneuronen sezerniert, die ihre Endposition in den Kortexschichten V/VI mittels tangentialer Migration bereits erreicht haben (Alcantara et al., 1998, Soriano and Del Rio, 2005).

Auf ihrem Weg in Richtung Marginalzone müssen die Neurone diese Reelin exprimierenden Zellen passieren. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass Reelin einen Effekt auf die Polarisierung migrierender Neurone haben könnte (Förster et al., 2010).

1.6.2 Die Entwicklung der axodendritischen Polarität radial migrierender Neurone *in vitro*

Die meisten Erkenntnisse zu neuronalen Polarisierungsvorgängen basieren auf Studien an hippocampalen Dispersionskulturen (Craig and Banker, 1994). Im Gegensatz zu Experimenten *in vivo* entwickeln sich die Zellen hierbei in der Abwesenheit von topographisch angeordneten Signalen. Dadurch können vor allem Erkenntnisse zu intrinsischen Mechanismen, die zur Ausbildung der Polarisierung führen, gewonnen werden.

Gemäß früheren Beobachtungen nach Dotti und Kollegen bilden dissoziierte Zellen direkt nach dem Ausplattieren nur einige Lamellipodien (Stadium 1) aus, bevor es zur Entstehung mehrerer Neuriten (multipolares Stadium, Stadium 2) kommt. Der Fortsatz mit dem schnellsten Wachstum wird im folgenden Stadium (Stadium 3) zum Axon differenziert. Während der Entwicklung kommt es zu weiteren Ausreifungsprozessen, wie Dendriten- (Stadium 4), Spine- und Synapsenbildung (Stadium 5).

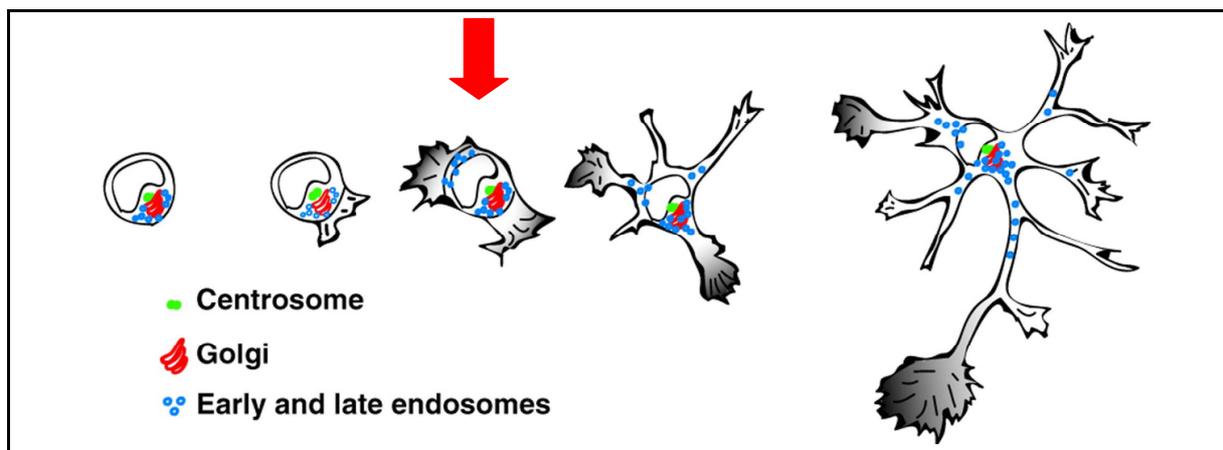


Abbildung 5: Die Entwicklungsstadien hippocampaler Neurone *in vitro* (Calderon de Anda et al., 2008) Die Neurone bilden zunächst nur einen Fortsatz aus (monopolares Stadium). Anschließend wird das bipolare Stadium (roter Pfeil) erreicht, welches für die spätere Axon- und Dendritspezifizierung entscheidend ist.

Die Polarisierung der hippocampalen Neurone findet nach dieser Einteilung im multipolaren Stadium statt (Dotti et al., 1988, Bradke and Dotti, 2000).

Durch eine neuere Charakterisierung der Fortsatzdifferenzierung (vgl. Abb. 5) konnte jedoch gezeigt werden, dass die axodendritische Polaritätsachse bereits im bipolaren Stadium festgelegt wird (Calderon de Anda et al., 2008).

Somit ist das bipolare Stadium *in vitro* ähnlich wie *in vivo* ausschlaggebend für die spätere Spezifizierung des Axons, die Polarisierung wird jedoch aufgrund des Fehlens von extrazellulären Signalmolekülen durch intrinsische Mechanismen gesteuert (Calderon de Anda et al., 2008, Menchon et al., 2011).

1.6.3 Der Reelin-Effekt auf die neuronale Polarisierung

Für die Ausrichtung der axodendritischen Polaritätsachse *in vivo* sind sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren verantwortlich (Arimura and Kaibuchi, 2007).

Beispielsweise scheint die intrazelluläre postmitotische Akkumulation von Molekülen, die Einfluss auf die Polarisierungsvorgänge nehmen können, eine wichtige Rolle zu spielen, wie z.B. das Zentrosom, der Golgi Apparat oder die Endosome (Zmuda and Rivas, 1998, de Anda et al., 2005, de Anda et al., 2010).

Die Entstehung des zukünftigen Axons erfolgt dabei aus dem selben Zellpol, in dem diese Zellorganellen positioniert sind (de Anda and Tsai, 2011).

Später wandert der Golgi-Apparat auf die Seite des apikalen Dendriten und befindet sich somit auf dem gegenseitigen Zellpol (Horton et al., 2005).

Matsuki und Kollegen zeigten, dass Reelin über eine Dab1-vermittelte Signalkaskade Einfluss auf die Verlagerung des Golgi-Apparates in die apikalen Dendriten nimmt. Dabei antagonisiert Reelin die Funktion des *LKB1-Stk25-Golgi matrix protein 130* (GM130), welches die Kondensation des Golgi-Apparates und das Axonwachstum fördert (Matsuki et al., 2010).

Die Serin-Threonin-Kinase LKB1 (*liver kinase B1*) aus der Familie der PAR-Proteine (*partitioning defective*) spielt eine wichtige Rolle für die axodendritische Polarisierung radial migrierender Neurone *in vivo* (Asada et al., 2007, Barnes et al., 2007, Shelly et al., 2007, Shelly and Poo, 2011).

Der Knockdown von LKB1 führt zu fehlender Differenzierung von *leading* bzw. *trailing process* und induziert Migrationsstörungen ähnlich wie in der Reeler-Mutante (Asada et al., 2007).

Im Rahmen der neuronalen Polarisierung treten Veränderungen der Zytoskelett-Dynamik auf, die eine Stabilisierung des *leading process* (Dendrit) und erhöhte Beweglichkeit bzw. Wachstum des *trailing process* (Axon) bewirken.

Bradke und Dotti fanden 1999 heraus, dass bei hippocampalen Neuronen *in vitro* die lokale Aktindepolymerisierung in Wachstumskolben zu deren Differenzierung zum Axon führte, wohingegen ein stabiles Aktinnetzwerk in den übrigen Wachstumskolben die Polymerisierung von Mikrotubuli verhinderte (Bradke and Dotti, 1999).

Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass die Stabilisierung des *leading process* über eine Phosphorylierung von n-Cofilin an Serinrest 3 vermittelt wird, wodurch die F-Aktindepolymerisierung herabgesetzt wird.

Diese Signalkaskade wird durch Reelin über die Aktivierung von ApoER2/Dab1 in Gang gesetzt (Chai et al., 2009). Chai *et al.* konnten mit *in vivo*-Studien demonstrieren, dass die apikalen Fortsätze von kortikalen Neuronen in der Reelin-reichen Marginalzone p-Cofilin-positiv waren (vgl. Abb. 6).

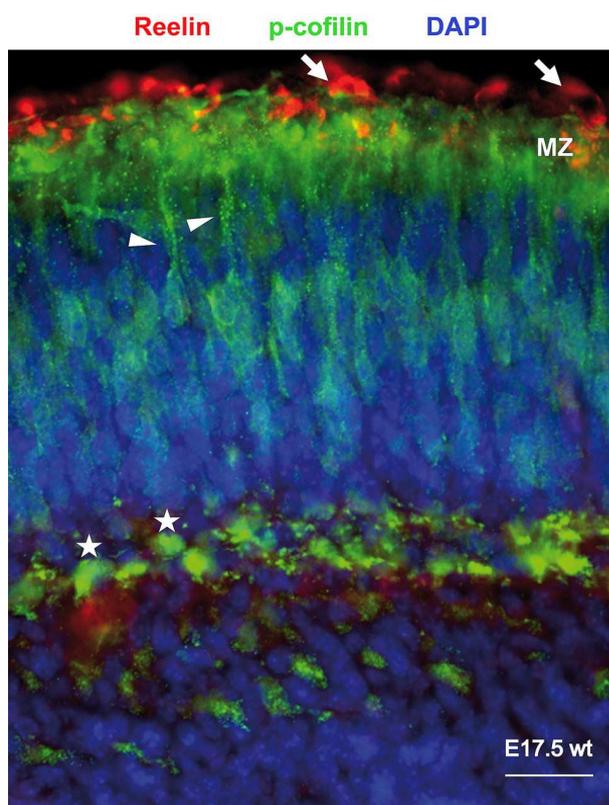


Abbildung 6: Immunfärbung des Neokortex von Ratten des Stadiums E17.5 (Chai et al., 2009)
 Es wurde eine Antikörperfärbung gegen p-Cofilin (grün) und Reelin (rot) sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI (blau) durchgeführt, scale bar $\cong 40\mu\text{m}$. Die Reelin produzierenden Cajal-Retzius-Zellen (weiße Pfeile) in der Marginalzone (MZ) zeigen keine p-Cofilin-Immundefärbung. Die apikalen Fortsätze (weiße Pfeilspitzen) von spät entstandenen Neuronen in den äußeren Zellschichten sind p-Cofilin-positiv sowie die Zellkörper von früh entstandenen Neuronen in den tieferen Zellschichten (weiße Sterne).

Auch das Protein Cdc42 aus der Familie der Rho-GTPasen zeigte regulatorische Funktionen auf die Phosphorylierung von n-Cofilin und das Axonwachstum (Garvalov et al., 2007). Leemhuis und Bock fanden heraus, dass diese Signalkaskade ebenfalls durch Reelin vermittelt wird. Dabei führte jedoch die Bindung von Reelin an ApoER2 bei hippocampalen Neuronen *in vitro* zu einer erhöhten Beweglichkeit der Wachstumskolben, Ausbildung von Filopodien und Fortsatzverzweigungen (Leemhuis et al., 2010, Leemhuis and Bock, 2011).

1.6.4 Der Reelin-Effekt auf radial migrierende Neurone: „Go or Stop“?

Aufgrund der Tatsache dass die normalerweise zellarme Marginalzone im Neokortex der Reeler-Mutante von früh generierten Neurone besiedelt wurde, entstand die Hypothese, dass Reelin als Stoppsignal fungieren könnte (Pearlman and Sheppard, 1996, Frotscher, 1998).

Dulabon und Kollegen beobachteten, dass der Kontakt mit Reelin-haltigem Medium bzw. der Reelin-reichen Marginalzone zur Einstellung der Migration führte (Dulabon et al., 2000).

Passend zu dieser Tatsache kam es nach Zerstörung der Cajal-Retzius-Zellen (Super et al., 2000) oder bei Dab1-Phosphorylierungsstörung in Fyn-Mutanten (Kuo et al., 2005) zu einer Besiedlung der Marginalzone mit radial migrierenden Neuronen.

Da die Migration hippocampaler Körnerzellen in der Reeler-Mutante jedoch bereits im Bereich des Hilus endet und viele Zellen gar nicht erst bis zur Marginalzone des Gyrus dentatus gelangen, könnte diese Hypothese nur bedingt auf den Hippocampus zutreffen.

Die topographisch korrekte Position von Reelin spielt hierbei eine wichtige Rolle, wie Experimente an hippocampalen Reeler- und Wildtyp-Slice-Kulturen zeigten:

Bei Kokultivierung beider Typen wanderten die Körnerzellen in Richtung der Reelin-reichen Marginalzone und bildeten dort das dicht gepackte Körnerzellband, wohingegen die Inkubation mit Reelin-haltigem Medium nicht zur Korrektur der Schichtenbildung führte (Zhao et al., 2004).

Eine ähnliche Wirkung auf die Körnerzellmigration trat beim Einsatz anderer Reelin-reicher Gewebetypen wie dem Bulbus olfactorius auf (Zhao et al., 2006).

Diese Beobachtungen weisen eher auf eine Art attraktiven Effekt von Reelin auf die Körnerzellen hin.

Ebenso scheint bei der neuronalen Migration im Neokortex die Richtung der Fortbewegung vorgegeben oder durch Signalmoleküle vermittelt zu werden. Die Zellen passieren entsprechend dem „inside-out“-Prinzip die älteren Zellschichten und bewegen sich auf die Reelin-reiche Marginalzone zu, wohingegen es in der Reeler-Mutante zu einem invertierten neokortikalen Schichtenaufbau kommt (Rakic and Caviness, 1995, Tissir and Goffinet, 2003).

Ebenso wiesen bei Studien an *Dab1*-Mutaten die Neurone erhebliche Migrationsdefizite auf und ihre *leading processes* reichten nicht bis in die *preplate* (Sanada et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung für den attraktiven Effekt von Reelin wäre die Existenz eines Reelin-Gradienten. Da Reelin in unterschiedlich große Fragmente proteolytisch gespalten wird und kleinere Fragmente leichter durch die extrazelluläre Matrix diffundieren, müsste der Gradient von der Marginalzone zur Ventrikulärzone hin abnehmen (Zhao and Frotscher, 2010). Tatsächlich konnte der Nachweis von Reelin-Fragmenten im Bereich des Kortex mithilfe von Immunfärbung bereits erbracht werden (Jossin et al., 2007).

Interessanterweise demonstrierten „rescue“-Experimente am Kortex von Reeler-Mäusen, bei denen Reelin nicht an topographisch korrekter Position dargeboten wurde, einen permissiven Effekt auf die neuronale Migration.

Magdaleno und Kollegen zeigten anhand von Studien mit ektopter Expression von Reelin in der Ventrikulärzone, dass die Darbietung von Reelin am Ausgangspunkt der Wanderung nicht zu einem Stopp der Migration führte. Obwohl es nicht zu einer normalen Schichtenbildung im Neokortex kam, erfolgte eine regelhafte Aufspaltung der *preplate* und im Phänotyp der Mausmutanten trat keine Ataxie auf (Magdaleno et al., 2002).

Ebenso konnte durch Inkubation mit Reelin-haltigem Medium von Slice-Kulturen ein partieller „rescue“ des Reeler-Phänotyps erreicht werden (Jossin et al., 2004).

Eine Ursache dieses permissiven Effektes, der vor allem während der frühen Kortikogenese und Aufspaltung der *preplate* von Bedeutung zu sein scheint, könnte beispielsweise die unterstützende Funktion von Reelin auf die Somatranslokation sein.

Während den frühen Entwicklungsstadien der Kortikogenese erfolgt die neuronale Migration vor allem über Somatranslokation. Zunächst wächst der *leading process* in Richtung Pia, der bei Erreichen der Marginalzone zahlreiche Verzweigungen ausbildet (Nadarajah et al., 2001). Durch Verkürzung des *leading process* wird das Soma anschließend in die Marginalzone gezogen (Gupta et al., 2002).

Im Neokortex führt das Fehlen von Reelin zu einer Störung der Somatranslokation, wodurch die Migration der früh generierten Neurone misslingt und die *preplate* nicht aufgesplittert wird (Sheppard and Pearlman, 1997). Bei genauerer Betrachtung von *Dab1*- bzw. Reeler-Mutanten scheinen die *leading processes* migrierender Neurone die *preplate* gar nicht zu erreichen, zeigen Fehlorientierungen der Polaritätsachse und weisen deutlich weniger Verzweigungen auf (Sanada et al., 2004, Kuo et al., 2005). Die Tatsache, dass Reelin die Verzweigungen von Nervenzellfortsätzen fördert, wurde durch Studien an Gliazellen (Förster et al., 2002) und Neuronen (Del Rio et al., 1997) bereits unter Beweis gestellt.

Franco und Kollegen zeigten, dass die Stabilisierung des *leading process* und somit die gliazellunabhängige Somatranslokation durch Reelin vermittelt wird, welches über Dab1/Rap1 (GTPase) die Cadherin-Funktion reguliert (Franco et al., 2011).

Zudem wurde durch Studien zur Expression von Reelin-Rezeptoren bewiesen, dass Reelin bereits während der frühen Kortikogenese auf migrierende Neurone wirkt (Uchida et al., 2009).

Zusammengefasst wirkt Reelin fördernd auf die Migration während der frühen Kortikogenese indem es über die Ausbildung von Verzweigungen des *leading process* die Somatranslokation und das Vordringen der Neurone bis in die *preplate* ermöglicht.

1.6.5 Zur Rolle der Reelin-Rezeptoren

Die fehlerhafte Fortsatzspezifizierung migrierender Neurone der Reeler-Mutante *in vivo* lässt zahlreiche Interpretationsmöglichkeiten für die Wirkung des extrazellulären Matrixproteins Reelin zu.

Da die Neurone im Kortex der Reeler-Mutante bis in die Marginalzone wandern, wodurch das „inside-out“ Prinzip der kortikalen Schichtenbildung aufgehoben wird, entstand die Hypothese, dass Reelin für radial migrierende Neurone als Stoppsignal fungieren könnte (Frotscher, 1998).

Auf den Gyrus dentatus der Reeler-Mutante scheint diese Hypothese jedoch nur bedingt zuzutreffen.

Die Körnerzellen, welche normalerweise das dicht gepackte Stratum granulare bilden, sind in der Reeler-Mutante diffus im Bereich des Hilus verteilt. Zudem zeigten Experimente an Slice-Kulturen, dass die Kokultivierung von Reeler- und Wildtyp-Slices die Migration der Körnerzellen in Richtung der Reelin-reichen Marginalzone initiierte, wo sie das dicht gepackte Körnerzellband bildeten (Zhao et al., 2004, Zhao et al., 2006).

Somit scheint Reelin im Gyrus dentatus eher einen attraktiven Effekt auf die Migration der Körnerzellen zu haben (Förster et al., 2006a, Förster et al., 2006b).

Hierbei stellte sich die Frage, wie diese scheinbar paradoxe Wirkung von Reelin auf zellulärer Ebene zustande kommt und welche Komponenten der Reelin-Signalkaskade dafür verantwortlich gemacht werden können.

Studien an Knockout-Mäusen könnten einen Erklärungsansatz für die paradoxe Wirkung von Reelin auf migrierende Neurone geben: Während sich double Knockout-Mutanten für beide Lipoproteinrezeptoren, ApoER2 und VLDLR, phänotypisch nicht von der Reeler-Maus unterscheiden, wiesen Mutanten mit nur einem Rezeptordefekt mildere Ausprägungen des

Reeler-Phänotyps auf. Zudem wurde gezeigt, dass sich die jeweiligen Migrationsdefizite von ApoER2- und VLDLR-Mutanten ebenfalls voneinander unterschieden, was auf eine unterschiedliche Rezeptorfunktion rückschließen lässt (Trommsdorff et al., 1999, Benhayon et al., 2003, Hack et al., 2007).

Die kortikale Schichtenbildung der VLDLR-Mutante war weitestgehend normal, jedoch fanden sich zahlreiche Neurone in der Marginalzone (Hack et al., 2007). Diese Resultate implizieren, dass VLDLR an dem inhibitorischen Effekt von Reelin auf die neuronale Migration beteiligt sein könnte.

Im Kortex der ApoER2-Mutante hingegen war ein Großteil der spät generierten Neurone nicht in der Lage, die Zellschichten zuvor gebildeter Neurone zu durchqueren, was zu einer Inversion im kortikalen Schichtenaufbau und zur Umkehr des „inside-out“-Prinzips führte (Benhayon et al., 2003, Hack et al., 2007). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass ApoER2 eher an der permissiven oder attraktiven Wirkung von Reelin auf migrierende Neurone involviert sein könnte.

Ebenso könnte ein zeitlich unterschiedliches Expressionsmuster der beiden Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Während VLDLR vor allem in migrierenden Neuronen, die kurz vor dem Kontakt mit der Reelin-reichen Marginalzone stehen, zu finden ist, wird ApoER2 ubiquitär während der Entwicklung exprimiert (Trommsdorff et al., 1999).

Auch die Affinität von Reelin zu dem jeweiligen Rezeptor ist von Bedeutung. Es zeigte sich, dass die Bindungsstärke von Reelin und ApoER2 erheblich stärker war als zwischen Reelin und VLDLR. Ebenso war der Anteil des über die Reelin-Signalkaskade phosphorylierten Dab1 in der ApoER2-Mutante stärker reduziert als in der VLDLR-Mutante (Andersen et al., 2003, Benhayon et al., 2003).

Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine unterschiedliche Lokalisation der Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder innerhalb der Zellmembran sein. Duit und Kollegen fanden heraus, dass sich ApoER2 in *raft domains* (cholesterinreiche Mikrodomänen) der Zellmembran befindet, während VLDLR in *non-raft domains* lokalisiert ist (Duit et al., 2010). Zusammengefasst wird ersichtlich, dass die Reelin-Signalkaskade über zwei Rezeptoren aktiviert werden kann, die sich bezüglich ihrer Funktion für die neuronale Migration, ihrem zeitlichen Expressionsmuster, ihrer Affinität für Reelin und ihrer zellulären Lokalisation unterscheiden.

1.7 Reelin und radiale Gliazellen

Reelin spielt sowohl bei der Ausbildung eines regelhaften Gliazellgerüsts als auch beim Fortsatzwachstum der Gliazellen eine wichtige Rolle, wie zahlreiche Studien an Reeler- und Scrambler-Mäusen zeigten.

Radiale Gliazellen können sowohl als neuronale Vorläuferzellen fungieren als auch ein Gerüst für migrierende Neurone darstellen (Seri et al., 2001).

Da die Neurogenese im Gyrus dentatus auch postnatal weiterhin fortbesteht (Altman and Das, 1965, Altman and Das, 1966), müssen spät entstandene Neurone in ein bereits ausgebildetes Netzwerk integriert werden. Daher ist die Persistenz des Gliazellgerüsts für die neuronale Migration des Gyrus dentatus von entscheidender Bedeutung.

Die neuronalen Vorläuferzellen wandern nach ihrer Entstehung in der Ventrikulärzone mithilfe des primär entstandenen Gliazellgerüsts zu einer zweiten Proliferationszone im Bereich des Hilus. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass die Zellen vorübergehend nahe der Pia verbleiben und anschließend unter dem Einfluss von Reelin in Richtung Hilus migrieren. Zum Zeitpunkt der Geburt bilden diese Vorläuferzellen ein sekundäres Gliazellgerüst, welches eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Körnerzellbandes des Gyrus dentatus und der Subgranulärzone spielt. In der Subgranulärzone werden zeitlebens neuronale Vorläuferzellen generiert (Li et al., 2009).

Im Gyrus dentatus der Reeler-Maus oder bei ApoER2/VLDLR-Doppel-Knockout-Mäusen wird das sekundäre Gliafasengerüst nicht ausgebildet, was entscheidend zu den Migrationsdefekten und der fehlerhaften Schichtenbildung beiträgt. Das erste Gliazellgerüst hingegen wurde durch die mangelnde Reelin-Expression nicht beeinträchtigt (Förster et al., 2002, Weiss et al., 2003).

Im Gyrus dentatus zeigten Gliazellen auf Reelin-Streifenassays präferentielles Wachstum und vermehrte Verzweigungen (Förster et al., 2002, Frotscher et al., 2003).

Ebenso wiesen die Gliazellen im Neokortex von Reeler-Mäusen gehemmtes Fortsatzwachstum und einen geringeren Gehalt des Gliazellmarkers Blbp (*brain lipid binding protein*) auf (Hartfuss et al., 2003).

In vivo spielt die topographische Position von Reelin für die Ausrichtung der Gliazellfasern eine wichtige Rolle, da im Gegensatz zur Behandlung mit rekombinantem Reelin nur die Positionierung von Reelin im Bereich der Marginalzone zu der korrekten radialen Orientierung der Gliafasern in Reeler-Slice-Kulturen führte (Zhao et al., 2004).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass Reelin bei der glialen Fortsatzorientierung und Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielt.

Durch Untersuchungen am *Bulbus olfactorius* wurde die Hypothese aufgestellt, dass Reelin für migrierende Neurone als Signal zum Ablösen („detachment“) von den radialen Gliazellen fungieren könnte (Hack et al., 2002, Cooper, 2008).

Durch Experimente an Reeler- (Pinto-Lord et al., 1982) und Scrambler-Mäusen (Sanada et al., 2004), die eine Adhäsion der Neurone an die Gliazellen und gestörte Ablösung am Ende der radialen Migration zeigten, wurde diese Hypothese unterstützt. Diese Funktion als „detachment“-Signal wird vermutlich über die Interaktion mit $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen unterstützt (Dulabon et al., 2000).

1.8 Der Reelin-Effekt über den Notch-Signalweg

„Notch“ ist ein Transmembranrezeptor, der membranständige Liganden anderer Zellen binden kann, wodurch ein multifunktionaler intrazellulärer Signalmechanismus in Gang gesetzt wird. Die Aktivierung von Notch induziert proteolytische Vorgänge, die zur Freisetzung der *Notch intracellular domain* (NICD) führt. Als Bestandteil eines Komplexes mehrerer Transkriptionsfaktoren moduliert NICD die Expression zahlreicher Gene.

Die Notch-Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei kortikalen Entwicklungsprozessen, u.a. der Neurogenese und der Entwicklung von Dendriten (Yoon and Gaiano, 2005, Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006).

Ein Zusammenhang zwischen dem Notch-Signalweg und der Reelin-Signalkaskade wurde schon länger vermutet, da im Hippocampus und Neokortex von Reeler-Mäusen die NICD-Konzentration vermindert war. Zudem führten Störungen im Notch-Signalweg zu Migrationsdefiziten ähnlich wie in der Reeler-Mutante (Hashimoto-Torii et al., 2008, Sibbe et al., 2009).

Mittlerweile konnte die Interaktion zwischen Dab1 und Notch sowohl in *Drosophila* (Giniger, 1998, Le Gall et al., 2008) als auch Säugetieren (Hashimoto-Torii et al., 2008) nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Reelin einen protektiven Effekt auf den Abbau von NICD hat, der vermutlich auf die Dab1-vermittelte Regulation von intrazellulären Transportvorgängen zurückzuführen ist (Hoe et al., 2006, Honda and Nakajima, 2006).

Der Reelin-Effekt über den Notch-Signalweg beschränkt sich jedoch nicht nur auf Neurone, sondern scheint auch bei der Formation des Gliazellgerüsts von Bedeutung zu sein.

Sowohl Reelin-Rezeptoren als auch Notch-Rezeptoren werden in Gliazellen exprimiert (Gaiano et al., 2000, Luque et al., 2003, Luque, 2007).

Zudem wurde gezeigt, dass in menschlichen neuronalen Vorläuferzellen, die bekanntermaßen aus Gliazellen hervorgehen, eine Interaktion zwischen Notch und Dab1 besteht (Noctor et al.,

2001, Keilani and Sugaya, 2008). Die Notch-abhängige neuronale Differenzierung der Vorläuferzellen wird durch den Einfluss von Reelin inhibiert.

Die gliazellabhängige Migration scheint dabei sowohl für den Gyrus dentatus (Sibbe et al., 2009) als auch für den Neokortex (Hartfuss et al., 2003, Gaiano, 2008) durch den Notch-Signalweg moduliert zu werden. Störungen der neuronalen Migration oder Neurogenese in Reeler-Mutanten könnten somit auch auf einen gestörten Notch-Signalweg zurückzuführen sein.

1.9 Der Reelin-Effekt im adulten Gehirn

Da Reelin postnatal nach Abschluss der neuronalen Migration von GABAergen Interneuronen sezerniert wird, scheint es auch im adulten Gehirn von funktionaler Bedeutung zu sein (Alcantara et al., 1998, Ramos-Moreno et al., 2006).

Es gibt Hinweise darauf, dass Reelin eine wichtige Rolle bei Lern- und Erinnerungsprozessen spielt. So wird die Aktivität der Glutamat-Rezeptoren des NMDA- und AMPA-Typs über Reelin moduliert (Qiu et al., 2006). In einer ApoER2-vermittelten Signalkaskade führt Reelin zu einer Verstärkung der sogenannten Langzeitpotenzierung, eine Form der synaptischen Plastizität, die langanhaltende Übertragung zwischen den Synapsen fördert (Beffert et al., 2005).

Zudem antagonisiert Reelin den suppressiven Effekt von β -Amyloid auf die Langzeitpotenzierung, welches eine Hauptkomponente der senilen Alzheimer-Plaques darstellt (Durakoglugil et al., 2009). Mittlerweile konnte sogar gezeigt werden, dass Reelin direkt an β -Amyloid bindet (Hoe et al., 2009).

Daraus wäre zu folgern, dass Störungen des Reelin-Signalwegs sowohl zu Beeinträchtigung des Gedächtnisses als auch zu neuropsychiatrischen Krankheitsbildern führen könnten.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine verminderte Reelin-Expression zur Entstehung von Schizophrenie (Impagnatiello et al., 1998), Autismus (Fatemi, 2002), bipolaren affektiven Störungen, Depression (Fatemi et al., 2000) und der Alzheimer-Krankheit (Botella-Lopez et al., 2006) beitragen kann.

1.10 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Das extrazelluläre Matrixprotein Reelin hat entscheidenden Einfluss auf die neuronale Migration, Schichtenbildung und Fortsatzbildung. Im Kortex und Hippocampus der Reeler-Mutante kommt es zu charakteristischen Abweichungen der korrekten Fortsatzorientierung und Fehlpositionierung der migrierenden Neuronen.

Es wurde gezeigt, dass Reelin über die Phosphorylierung des Zytoskelettregulators n-Cofilin zu einer Stabilisierung des piawärts gerichteten *leading process* von bipolaren, radial migrierenden Neuronen führt.

In Vorexperimenten dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Verteilung von p-Cofilin in hippocampalen Dispersionskulturen, die am Postnataltag 5 (P5) oder am Embryonaltag 18 (E18) präpariert wurden, nach 7 Tagen *in vitro* charakterisiert.

Anschließend wurde das Augenmerk jedoch auf Dispersionskulturen nach 24 Stunden *in vitro* gelegt, da Kulturen dieses Stadiums noch einen relativ hohen Anteil an bipolaren Neuronen aufwiesen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Reelin auf die Fortsatzspezifizierung bipolarer hippocampaler Neurone zu charakterisieren.

Dafür wurden hippocampale Dispersionskulturen mit rekombinantem Reelin oder Reelin-freiem Kontrollmedium unterschiedlich lange (3min, 5min, 15min, 30min) stimuliert oder unbehandelt belassen. Anhand von Immunfärbungen wurde der Reelin-Effekt auf die n-Cofilin-Phosphorylierung bipolarer Neurone untersucht; mit Hilfe der Lebendmikroskopie sollte der Effekt auf die Fortsatzmobilität dargestellt werden.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass sich die bipolaren Neurone im Stadium der axodendritischen Polarisierung nach Calderon de Anda *et al.* (2008) befanden. Es sollte untersucht werden, ob die Stimulation mit Reelin einen Einfluss auf dieses Stadium der neuronalen Differenzierung hat.

Ergänzend zu unseren *in vitro*-Experimenten sollte im Vergleich die Reelin-Wirkung *in situ* anhand von Immunfärbungen des Gyrus dentatus verschiedener Entwicklungsstadien untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

Produkt:

Hersteller:

Axioskop 2, HBO 100	Carl Zeiss
Axiovert 25	Carl Zeiss
Brutschrank	WTC Binder oder Advantage Lab
Cutfix Surgical Disposable Scalpel	Memmert
Deckgläser 24x46, 24x18 (mm ²)	Marienfeld
Falcon Cell Strainer, 40µm Nylon	Becton Dickinson
Falcon Tissue Culture Plate, 24iger <i>well</i> und 6er <i>well</i>	Becton Dickinson
Färbekasten nach Hellendahl (Küvetten)	Roth
Feuchtkammer	Labor Anatomie UKE
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	Liebherr
Handschuhe	Hartmann
Heidemannspatel	Aesculap de
Instrumentenkasten	Merck
Konfokales Mikroskop, LSM Axiovert 510	Carl Zeiss
Kryostat	Microm
Kühlschrank, 4°C	Bosch/Liebherr
Küvetten, Färbekasten nach Helledahl	VWR
Laborflaschen, 0.5l und 1l	Schott
Live Imaging Mikroskop, Axiovert 200	Carl Zeiss
Magnetrührer	Heidolph
Magnetrührstäbchen, Standard	VWR
Neubauer Zählkammer	Brand Germany
Objektiv, 20fache und 40fache Vergrößerung	Zeiss
Objektiv, 60fache Vergrößerung	UPlan Sapo
Objektträger	Marienfeld
Objektträger SuperFrost/Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25cm	Merck
Perfundier-Gerät, Masterflex L/S	Cole Parmer
pH-Meter	Knick
Pinsel	Da Vinci
Pinzette nach Dumont	Merck
Pinzette, fein oder gebogen	FST
Pipetten, diverse	Eppendorf Ag/Gilson
Pipettenspitzen, diverse	Eppendorf Ag/Gilson
Pipetus Akku	Hirschmann Laborger.
Plastik Pipetten, 10ml	Eppendorf Ag
PP-Test-Tubes, 15ml und 50ml	Becton Dickinsons
Reaktionsgefäße, 1.5ml	Eppendorfer Ag
Rüttler	Bühler
Sauger	Millipore
Schere	Aesculap de
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Heraeus
Vortex Genie 2	Scienrific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad mit Schüttler	GFC
Zellstofftücher	Wepa
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

2.1.2 Chemikalien

Albumine, Bovine, BSA Nr. A7906	Sigma
Aqua dest	Baxter
B27 Supplement	Gibco
<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> (bFGF)	Gibco
DAKO Mounting Medium	DAKO Cytomation
DAPI	Sigma
Desinfektionsmittel	Helmut Schröder
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Ethanol, 70% und 96%	Merck

Formaldehydlösung, 37%	Merck
L-Glutamin, 200mM	Gibco
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Neurobasal A Medium	Gibco
Neurobasal A Medium ohne Phenolrot	Gibco
PBS-Tabletten	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phalloidin-Färbung, Alexa Alexa 488	
Poly-D-Lysin	Sigma
Saccharose	Merck
Tissue Tek	Sakura
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Invitrogen
Trockeneis	Humangenetik des UKE
Trypsin/EDTA	Biochrom

2.1.3 Software

Axio Vision LE Rel. 4.4. und 4.6.	Carl Zeiss
Excel 2010	Microsoft
Illustrator CS	Adobe
ImageJ	Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.
Photoshop 7.0	Adobe
Powerpoint 2010	Microsoft
SPSS für Windows	SPSS GmbH Software
Windows 2010	Microsoft
Word 2010	Microsoft

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

Primärantikörper	Herkunft	Verdünnung in PBS	Firma
anti-p-Cofilin	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
anti-tau	Maus	1:200	Chemicon
anti-GFAP	Kaninchen	1:2000	Dako

Der Primärantikörper wurde in folgender Lösung verwendet:

- Primärantikörper in spezifischer Verdünnung
- 0,1% Triton (Detergenz)
- 0,01% Na-Azid (antifungizid und antibakteriell)

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Herkunft	Verdünnung in PBS	Firma
Alexa 568	Ziege (anti Kaninchen)	1:500	Molecular Probes
Cy2 grün	Ziege (anti Maus)	1:200	Dianova

Der Sekundärantikörper wurde in folgender Lösung verwendet:

- Sekundärantikörper in spezifischer Verdünnung
- 0,01% Na-Azid

2.1.5 Lösungen

bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*)

- 5mM Tris in Aqua dest gelöst, pH=7,6; sterilfiltern
- 50µl bFGF in 1000µl Tris-Lösung lösen, vortexen und aliquotieren
- bei -25°C lagern

BSA 3% (*bovine serum albumin*)

- 3g in 100ml PBS lösen, suspendieren

Fixierungslösung

- 5ml Formaldehyd 37%
- 45ml PBS

PBS

- 8g NaCl
- 0.2g KCl
- 1.44g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0.2g Kaliumhydrogenphosphat
- 1l Aqua dest
- pH = 7.4 bei Raumtemperatur

alternativ:

- 500ml Aqua dest
- 1 PBS-Tablette
- Titration bis pH = 7.4 mit NaOH (1mol/l) bzw. HCl (1mol/l)

2.1.6 Kulturmedium

Kulturmedium für neuronale Dispersionskultur

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

Kulturmedium transfizierte 293-Zellen (herkömmliches Medium)

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
- 10% FCS
- 1% Penicillin/Streptomycin
- Pro Petrischale 150µl Geneticin

Kulturmedium zur Gewinnung des Überstandes

- Hybridoma-Medium, Serum-frei

2.1.7 Zelllinien für den Reelin- bzw. Kontrollüberstand

R59	(Förster et al., 2002): 293-Zelllinie, stabil transfiziert mit <i>full length Reelin Clone</i> pCrl.
GFP	(Förster et al., 2002): 293-Zelllinie, stabil transfiziert mit <i>green fluorescent protein</i> (GFP)

2.1.8 Versuchstiere

Für die Experimente wurden Ratten des Zuchtstammes *WISTAR* in diversen Altersstufen verwendet: Die jüngsten Versuchstiere waren Rattenembryos des 18. Schwangerschaftstages (E18); hinzu kamen Ratten, die wenige Stunden alt waren (P0) oder sich im Alter von einem Tag (P1), von fünf Tagen (P5), elf Tagen (P11) oder 32 Tagen (P32) befanden.

Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen in der zentralen Tierhaltung des UKE gehalten, Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Auf eine für die Versuche unwesentliche Unterscheidung von weiblichen und männlichen Ratten wurde verzichtet. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Richtlinien für Tierhaltung und Tierversuche durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Hippocampale Dispersionskultur

Versuche mit dissoziierten Neuronenkulturen haben mittlerweile einen großen Stellenwert bei der Erforschung von neuronaler Entwicklung und Fortsatzdifferenzierung gewonnen. Innerhalb der letzten dreißig Jahre wurde diese Methode ständig optimiert, wodurch zelluläres Wachstum verbessert und die Überlebenszeit der Neurone auf mehrere Wochen verlängert werden konnte. Die im Folgenden präsentierte Dispersionskulturmethode wurde von Brewer (Brewer, 1997) erstmals beschrieben und entsprechend Prange-Kiel (Prange-Kiel et al., 2003) leicht modifiziert.

2.2.1.1 Beschichtung der Glasplättchen

Die Kultivierung der dissoziierten Neurone erfolgte auf runden, beschichteten Glasplättchen in Kulturschalen (24iger *well*). Die Beschichtung der Plättchen fand einen Tag vor der Präparation statt und schuf optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen. Zunächst wurde auf dem Grund jedes *well* ein autoklaviertes Glasplättchen platziert. Anschließend wurden 600µl Poly-D-Lysin (0,1mg/ml Aqua dest) pro *well* pipettiert. Die Kulturschalen wurden bei Raumtemperatur mindestens eine Stunde bzw. über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Poly-D-Lysin vom Rande jedes *well* abgesaugt und 1ml Neurobasal A mit Phenolrot hinzugegeben. Nach kurzem Schwenken wurde das Neurobasal A abgesaugt und die Plättchen wurden anschließend mindestens eine Stunde getrocknet, bevor mit der Präparation begonnen werden konnte.

2.2.1.2 Präparation der Hippocampi

Die Präparation der Ratten-Hippocampi erfolgte unter semisterilen Bedingungen und sollte zusammen mit der anschließenden Dissoziation der Neurone (vgl. 2.2.1.3) nicht länger als zwei Stunden dauern, um hypoxische Schäden des Gewebes zu vermeiden.

In der Regel wurden zehn Ratten des Stadiums P5 für eine Dispersionskultur verwendet.

Zunächst wurden die Tiere durch Dekapitation mit einer scharfen Schere getötet. Durch einen median sagittalen Schnitt wurde die Kopfhaut eröffnet und anschließend mit einer Pinzette zur Seite gezogen. Das zum Vorschein kommende Schädeldach wurde ebenfalls mit der Schere eröffnet. Nun konnte das Gehirn mit Hilfe eines Heidemannspatels herausgenommen und auf einen in PBS getränkten Schwamm platziert werden. Nach Entfernung des Kleinhirns und Hirnstamms mit Hilfe eines Skalpells wurden beide Hemisphären durch einen Mediansagittalschnitt getrennt. Die auf den Innenseiten als „bananenförmige“ Gebilde

sichtbaren Hippocampi wurden vorsichtig heraus präpariert und in eine PBS gefüllte Petrischale überführt.

2.2.1.3 Dissoziation der Hippocampi

Die folgenden Arbeitsschritte fanden bei sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank statt.

Die Hippocampi wurden durch mehrfaches Spülen mit PBS von Geweberesten befreit und dann mit einer Rasierklinge zerkleinert. Der Gewerbebrey wurde in kleinen Mengen in ein Falcon pipettiert, welches mit PBS auf 50ml aufgefüllt wurde. Darauf folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 1000U/min. Nach Verwerfen des Überstandes wurden dem Zellpellet 5ml (pro Tier 0,5ml) 37°C warmes Trypsin/EDTA hinzugegeben, um den Verdau von extrazellulären Proteinen zu initiieren. Das Falconröhrchen wurde für 2.5min in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und alle 30sec geschüttelt. Mit 10ml rotem Neurobasal A wurde der enzymatische Verdauungsprozess gestoppt und die Zellsuspension über ein 40µm-Nylonsieb, das größere Bestandteile aus der Suspension filtert, in ein neues Falcon überführt. Es folgten zwei weitere 10-minütige Zentrifugationszyklen bei 4°C mit 1000U/min, wobei ab dem dritten Vorgang Neurobasal A ohne Phenolrot verwendet wurde. Da dem Phenolrot östrogenähnliche Wirkungsweisen nachgesagt werden (Berthois et al., 1986), könnte dieses die Ergebnisse unserer Versuche beeinflussen.

Das Pellet wurde nun mit einer seiner Größe entsprechenden Menge (ca. 20ml) Neurobasal A suspendiert und mit dem Vortex durchmischt. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl von 100µl Zellsuspension bestimmt und durch Hinzufügen von Neurobasal A konnte eine Zelldichte von 100000 Zellen/ml eingestellt werden. Die Zellsuspension wurde in 1ml-Portionen auf die einzelnen *wells* mit den Poly-D-Lysin beschichteten Glasplättchen verteilt.

2.2.1.4 Kultivierung der Neurone

Entsprechend dem Protokoll (von Schassen et al., 2006) besteht eine Dispersionskultur zu 80% aus neuronalen Zellen, zu 12% aus Astrozyten und zum restlichen Anteil aus Oligodendrozyten und Mikroglia.

Die Kulturplatten wurden eine Stunde bei 37°C, pH=7.4 und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, um optimale Bedingungen für die Anheftung der Neurone an die Glasplättchen zu schaffen. Anschließend wurden die mit Zellen behafteten Glasplättchen in eine neue Kulturplatte überführt, wobei die Astrozyten in der Kavität verblieben. In jedes *well* wurde 1ml 37°C warmes Kulturmedium pipettiert.

Der erste Wechsel des Kulturmediums fand nach 24 Stunden statt und erfolgte anschließend alle zwei Tage. Die Zellen könnten unter oben genannten Bedingungen Wochen bis sogar

Monate kultiviert werden. Bereits unmittelbar nach der Aussaat bildeten die Zellen Fortsätze und konfigurierten sich im Laufe der Zeit zu dichten Zellverbänden.

Das Wachstum sollte regelmäßig mikroskopisch kontrolliert werden, um Kontaminationen mit Schimmelpilzen zu vermeiden.

2.2.1.5 Reelin- bzw. Kontrollmedium-Gewinnung und Konzentrierung zur Stimulation der neuronalen Kulturen

Um die neuronalen Zellen mit Reelin stimulieren zu können, wurde ein Reelin-haltiger Überstand von 293-Zellen, die stabil mit einem *full-length Reelin Clon* (PCr1) transfiziert sind (Förster et al., 2002), gewonnen. Da ein Sekretionssignal in der Reelin-Sequenz enthalten ist, sezernieren die Zellen Reelin in das Medium.

Zunächst erfolgte die Kultivierung der Reelin-transfizierten Zellen in einem herkömmlichen Medium bis kurz vor der Konfluenz für ca. drei Tage ein Serum-freies Hybridoma Medium verwendet wurde. Somit wurde die Verunreinigung des Reelin-haltigen Überstandes durch Proteine des herkömmlichen Serums möglichst gering gehalten.

Die gewonnenen Überstände wurden 5min in 50ml-Falcons bei 3000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Millipore Centriplus Filtrationsröhrchen auf ca. 1/10 seines ursprünglichen Volumens aufkonzentriert. Dafür wurde der Überstand in das obere Kompartiment des Röhrchens gegeben und bei 3000 U/min in der „Labofuge“ Zentrifuge aufkonzentriert, bis ca. 1/10 des Ausgangsvolumens im oberen Kompartiment verblieben war.

Als Kontrollmedium wurde auf dieselbe Weise der Überstand von GFP-transfizierten 293-Zellen (GFP=grün fluoreszierendes Protein) gewonnen. GFP wird nicht in das Medium sezerniert. Auch dieser Überstand wurde mit dem Millipore Centriplus System auf das Zehnfache aufkonzentriert.

2.2.1.6 Stimulation der neuronalen Dispersionskulturen

Zunächst starteten wir ein Screening, um einen Überblick der Reelin-Wirkung auf die Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu gewinnen. Dazu wurden P5-(oder E18-) Dispersionskulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung (1 Tag bis zu 7 Tage) unterschiedliche lange (im Zeitraum von wenigen Minuten, Stunden oder bis zu einer Woche) mit Reelin und analog mit dem Kontrollmedium behandelt. Letztendlich wurde der Focus unserer Untersuchung auf 24 Stunden alte Dispersionskulturen (P5) gelegt, die wir für die Dauer von wenigen Minuten mit Reelin bzw. Kontrollmedium stimulierten.

Für jede Dispersionskultur unterschieden wir drei Subgruppen von Zellkolonien: Reelin behandelte, Kontrollmedium behandelte und unbehandelte Zellpopulationen. Bei den

stimulierten Populationen wurde zudem die Dauer der Behandlung berücksichtigt, d.h. wir unterschieden Behandlungszeiten von 3min, 5min, 15min oder 30min mit Reelin oder Kontrollmedium in 10-facher Konzentration. Während der Stimulation befanden sich die Kulturen im Feuchtrauminkubator bei 5% CO₂ und 37°C.

Die unbehandelten Zellpopulationen wurden nach 24 Stunden fixiert und dienten zur *in vitro*-Untersuchung des Fortsatzdifferenzierungsvorgangs.

2.2.1.7 Fixierung

Die Fixierung der Zellkultur sollte möglichst schnell nach der Entnahme aus dem Feuchtrauminkubator erfolgen. Zunächst wurde das Kulturmedium abgezogen und durch 500µl 4%iges PFA pro *well* ersetzt. Nach 10-minütiger Inkubation erfolgten drei 10-minütige Waschzyklen mit PBS. Anschließend konnten die Kulturen direkt für die Immunzytochemie weiterverwendet werden oder, mit Parafilm versiegelt, bei 4°C im Kühlschrank für mehrere Monate gelagert werden.

2.2.1.8 Immunzytochemie

Die fixierte und gespülte Kultur wurde über Nacht mit 500µl Primärantikörper (vgl. 2.1.4.1) pro *well* bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde die Kultur in drei Zyklen à 10min mit PBS gespült.

Die Inkubation und der Waschvorgang des Sekundärantikörpers erfolgten analog zum Primärantikörper. Bei der Lagerung und Verwendung des Sekundärantikörpers musste auf eine Vorgehensweise im Dunkeln geachtet werden, da dieser sehr lichtempfindlich ist.

Falls eine DAPI-Färbung zur Markierung der Zellkerne erwünscht wurde, erfolgte dies durch 3-minütige Inkubation (Verdünnung mit PBS: 1/100 000; Menge: 250µl pro *well*) und drei 10-minütige Waschzyklen mit PBS.

Einige Kulturen wurden mit einer Phalloidin-Färbung (Phalloidin Alexa Alexa 488 + 0,1% Na-Azid) behandelt, die einen Marker für die Aktin-Polymerisation darstellt und somit die Mobilität der Zellen anzeigt. Die Inkubation erfolgte für 10min und zog drei Waschzyklen à 10min mit PBS nach sich.

Es wurde bei allen Kulturen eine Färbung des Proteins n-Cofilin in phosphorylierter Form durchgeführt (p-Cofilin). Da bei 24h alten Kulturen frisch nach der Aussaat relativ viele Zellen absterben, war die Färbung der Zellkerne mit p-Cofilin aussagekräftiger als die DAPI-Färbung und wurde letztendlich zur Ermittlung der Zellzahlen herangezogen.

Zur Einbettung auf die Objektträger wurde das PBS aus dem *well* abgezogen und das Glasplättchen zum Trocknen vorsichtig mit einer Pinzette geschwenkt. Nach ca. 1min konnte es eingedeckelt werden: Dazu wurde ein Tropfen DAKO-Eindeckmedium auf den

Objektträger gegeben und das Glasplättchen mit der bewachsenen Seite nach unten schräg in den Tropfen getaucht, so dass sich ein blasenfreier Film zwischen Objektträger und Glasplättchen bilden konnte. Erst wenn das Glasplättchen zu $\frac{3}{4}$ seiner Fläche mit Eindeckmedium bedeckt war, konnte es horizontal auf den Objektträger gesenkt werden. Die Präparate wurden nach dem Trocknen in möglichst dunkler und trockener Atmosphäre im Kühlschrank gelagert.

2.2.1.9 Mikroskopie und Auswertung

Die Mikroskopie erfolgte an einem Olympus Fluoreszenzmikroskop. Die 7 Tage alten P5- oder E18-Kulturen wurden zu deskriptiven Zwecken fotografiert, um das p-Cofilin-Färbemuster in diesem Stadium zu demonstrieren. Eine weitere statistische Auswertung wurde jedoch nicht vorgenommen.

Bei den 24 Stunden alten P5-Kulturen wurde eine Unterscheidung in Reelin bzw. Kontrollmedium stimulierte und nicht stimulierte Kulturen getroffen. Bei den stimulierten Kulturen wurden für jeden der vier Inkubationszeiträume (3min, 5min, 15min, 30min) zwei Dispersionskulturen für die Auswertung herangezogen. Dabei wurden pro Dispersionskultur jeweils zwei Objektträger mit Reelin bzw. zwei Objektträger mit Kontrollmedium behandelten Zellpopulationen ausgewählt, die stichprobenhaltig eine Dispersionskultur repräsentierten. Somit wurde gewährleistet, dass die Objektträger von Reelin behandelten Zellen und Kontrollen im Vergleich ähnlich stark bewachsen waren.

Analog dazu wurde für die unbehandelten Dispersionskulturen verfahren: Es wurden zwei Dispersionskulturen mit jeweils zwei Objektträgern ausgewertet.

Nachdem die Voreinstellungen am Mikroskop (Belichtungszeit: 1000ms) für das Scannen der Zellen optimiert waren, wurden die gewählten Parameter nicht mehr abgeändert, um gleiche Bedingungen für alle Versuchsgruppen zu schaffen. Pro Objektträger wurden 25 Fotos mit dem 20iger Objektiv gemacht, d.h. insgesamt standen 900 Fotos, gespeichert als tif-Dateien, für die Auswertung zur Verfügung.

2.2.1.10 Einteilung der Zellen in Kategorien und Zellzählung

Bei der Betrachtung einer 24 Stunden alten Zellkultur wird deutlich, dass nicht nur unterschiedliche Zelltypen auf den Glasplättchen wachsen, sondern die Neurone in Entwicklungszustand und Fortsatzwachstum variieren (vgl. Abb. 7). Um den Effekt von Reelin auf hippocampale Neurone zu untersuchen, galt unser Augenmerk ausschließlich Neuronen mit einem oder zwei p-Cofilin-positiven Fortsätzen.

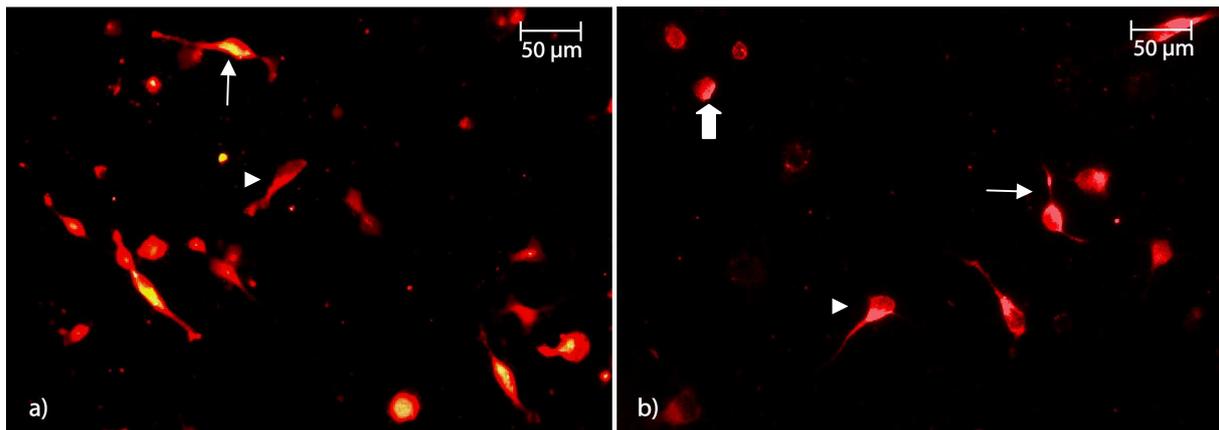


Abbildung 7a-b: 24 Stunden alte Dispersionskultur hippocampaler Neurone (P5)
 Dispersionskultur nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen p-Cofilin (rot). Die Abbildung zeigt Zellen mit unterschiedlicher Verteilung der p-Cofilin-Immunfärbung.
 a), b) Dünner Pfeil: Zellsoma mit zwei p-Cofilin-positiven Fortsätzen (bipolares Stadium)
 a), b) Pfeilspitze: Zellsoma mit einem p-Cofilin-positivem Fortsatz
 b) Blockpfeil: p-Cofilin-positives Zellsoma ohne Fortsatz

Dementsprechend wurden die bipolaren Neurone gemäß ihres p-Cofilin-Färbemusters in unterschiedliche Kategorien eingeteilt (vgl. Abb. 8). Nur diese Kategorien wurden bei der Auswertung der Zellkulturen betrachtet und die Einteilung wurde für alle Versuche beibehalten.

Für jeden Objektträger wurden die Zellzahlen der beiden Hauptkategorien, der zwei Subgruppen und die Gesamtzellzahl der vorherrschenden Population ermittelt.

Der Anteil der einzelnen Zellkategorien an der Gesamtzellzahl wurde in den Reelin stimulierten Kulturen entsprechend der Inkubationszeit (3min, 5min, 15min, 30min) mit den Kontrollmedium behandelten bzw. den unbehandelten Kulturen verglichen.

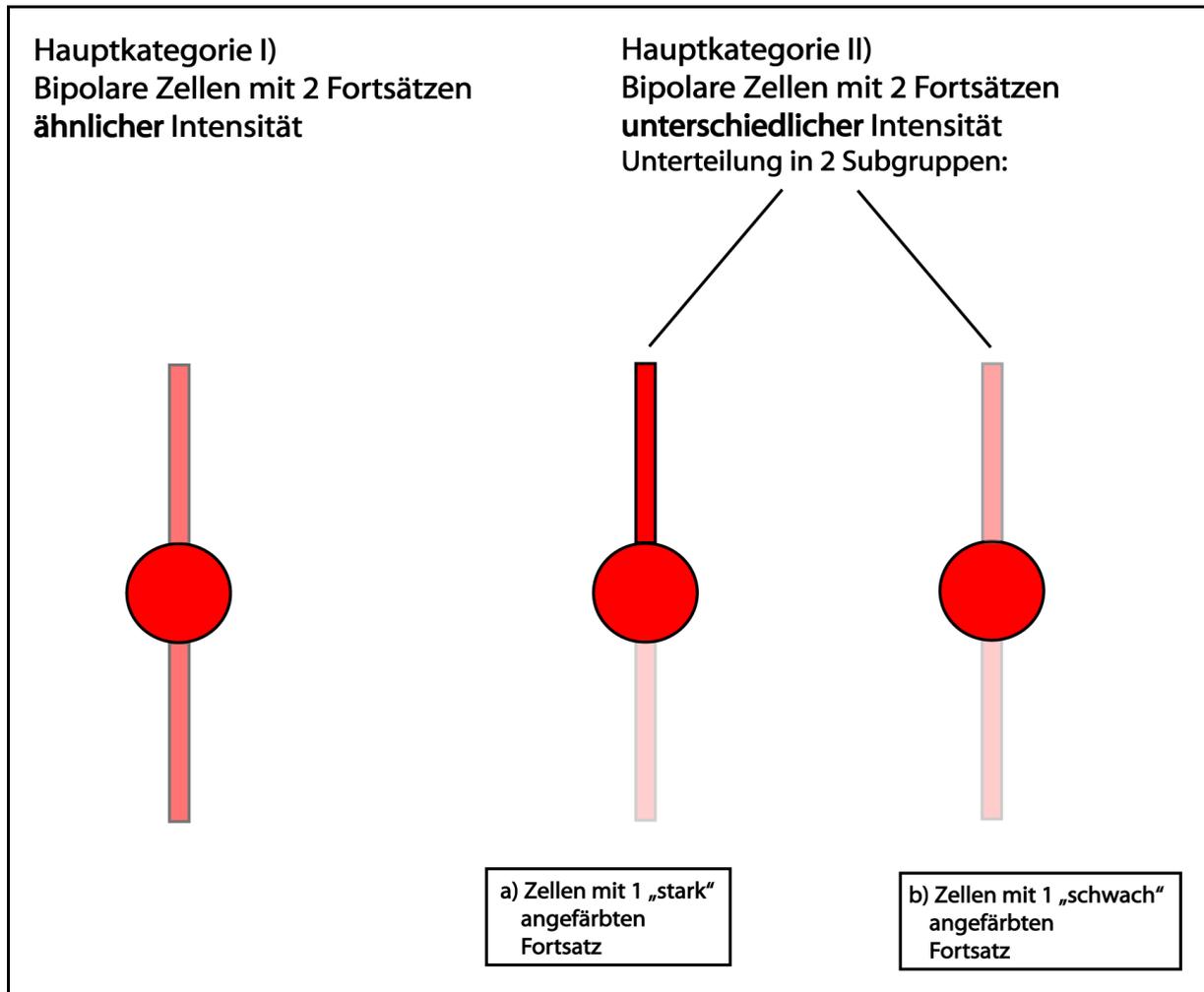


Abbildung 8: Zellkategorien bipolarer hippocampaler Neurone (P5)

Das Schema repräsentiert bipolare Neurone einer 24 Stunden alten Dispersionskultur aus Ratten, die im Entwicklungsstadium P5 präpariert wurden, nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen p-Cofilin (rot). Die bipolaren hippocampalen Neurone wurden gemäß der Intensität der p-Cofilin-Immunreaktivität in die Hauptkategorien I und II sowie die Subgruppen IIa und IIb eingeteilt.

2.2.1.11 Erstellung einer Intensitätsskala

Die Einteilung der Zellen gemäß morphologischen Kriterien erfolgte nach Augenmaß unter dem Mikroskop und mithilfe des Programms ImageJ.

Vor allem für die Einteilung in die zwei Subgruppen „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa) und „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb) war es nötig, eine Intensitätsskala mit Hilfe des Programms ImageJ zu erstellen, um das Problem der subjektiven Einschätzung auf Seiten des Auswertenden zu minimieren (vgl. Abb. 9):

Dazu wurden pro Kategorie 20 bipolare Zellen zufallsgemäß ausgewählt, die nach Augenmaß den einzelnen Kategorien zugeteilt werden.

Mit dem Programm ImageJ wurden für den stärker angefärbten Fortsatz pro Zelle vier Pixelintensitätswerte ausgemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Für jede Kategorie konnte eine eigene Skala erstellt werden, mit Messwerten, die subjektiv als „schwach“ oder „stark“ eingeteilt wurden.

Dieses Verfahren zeigte, dass die einzelnen Kategorien nicht nur subjektiv unterschiedliche, sondern auch messbar voneinander abgrenzbare Intensitätsgruppierungen der Immunfluoreszenz darstellen.

Zellen, deren Fortsatzintensität zwischen diesen beiden Gruppen lag, wurden ebenfalls gezählt, um die Zellzahl der Hauptkategorie II vollständig zu ermitteln.

Aufgrund des deutlichen Unterschieds zwischen „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ und „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (vgl. Abb. 9) wurden bei der statistischen Auswertung nur diese beiden Subgruppen gegenüber gestellt.

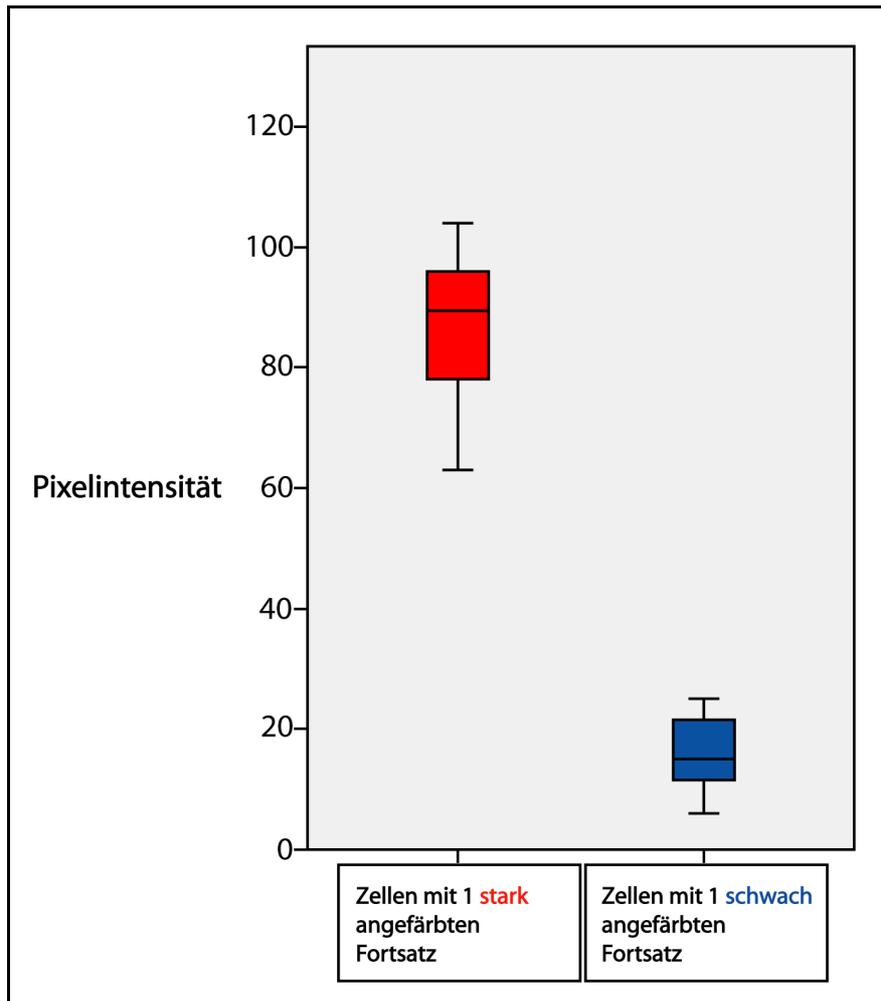


Abbildung 9: Intensitätsskala zur quantitativen Erfassung der Färbungsintensität von bipolaren Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Immunfärbung.

Die einzelnen Kollektive sind als Boxplots dargestellt, d.h. die Fehlerbalken entsprechen Maximum bzw. Minimum des Datensatzes. Der Median liegt auf Höhe des horizontalen Strichs in der Mitte der Box. Die beiden horizontalen Striche am Ende der Box zeigen oberes und unteres Quartil an.

y-Achse: Pixelintensität (relative Werte)

x-Achse: 2 Subgruppen: Zellen mit 1 stark angefärbten Fortsatz (IIa), Zellen mit 1 schwach angefärbten Fortsatz (IIb)

2.2.1.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS. Da neben der Intensität der Fortsatzfärbung bei den Reelin bzw. Kontrollmedium behandelten Zellpopulationen auch die Inkubationsdauer eine Rolle spielte, wurde eine Mehrfaktoren-ANOVA durchgeführt. Da die ANOVA nur Auskunft gibt, ob Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen, erfolgte in einem zweiten Schritt mit einem Post-hoc-Test die Analyse, welche signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im paarweisen Vergleich vorliegen.

2.2.2 Lebendmikroskopie

Mithilfe des Lebendmikroskops können zelluläre Wachstumsprozesse und Fortsatzbeweglichkeit direkt verfolgt und in Form von Filmen bzw. Fotosequenzen festgehalten werden. Die Untersuchungen mit der Lebendmikroskopie sollte die Methode der Zellkultur mit anschließender Immunzytochemie ergänzen.

Verwendet wurden Zellkulturen von P5- oder E18-Ratten. Da die Zellmobilität erfahrungsgemäß einige Stunden nach der Aussaat am höchsten war, wurden die Versuche an maximal 12 Stunden alten Neuronenkulturen durchgeführt.

Zu diesem Zeitpunkt hatten viele Neurone einen oder zwei Fortsätze, was für unsere Fragestellung ausschlaggebend war.

Ein möglichst stark bewachsenes Glasplättchen wurde unter der Sicherheitswerkbank mithilfe von Spatel und Pinzette in eine neue 24iger *well*-Platte überführt. Die Zellen wurden mit 500µl 37°C warmen Kulturmedium und 25µl 10-fach konzentriertem Kontrollmedium eine Stunde im Brutschrank inkubiert, um einen eventuell vorhandenen Reelin-Effekt auszuschalten.

In der Inkubationskammer des Lebendmikroskops herrschten eine Temperatur von 37°C und ein CO₂-Gehalt von 5%, entsprechend den Bedingungen in einem Zellinkubator.

Über eine integrierte Kamera („AxioCam MR“) und das Programm „Axiovision“ (Rel.4.6.) konnten Bildsequenzen erstellt werden. Unter Verwendung eines 60iger Wasserimmersionsobjektivs wurde die Population nach geeigneten Zellen durchsucht und diese wurden anschließend für die Aufnahmedauer (t=30min; Bildfrequenz: 1/15sec; Auflösung:1388x040Standard mono) fest eingestellt.

Nach 15min wurden 25µl 10-fach konzentriertes Reelin hinzu pipettiert und dessen Effekt auf Wachstum und Beweglichkeit der Zellfortsätze beobachtet.

2.2.3 Gehirnschnitte

2.2.3.1 Perfusion und Schock-Gefrieren der Gehirne

Jeweils zwei Ratten des Stadiums P5, P11 und P32 wurden perfundiert, um das Ergebnis der anschließenden Immunzytochemie zu verbessern.

Die perfundierten Gehirne wurden von der Arbeitsgruppe Bender freundlicherweise zur Verfügung gestellt, wobei die Perfusion gemäß Bender *et al.* (2010) erfolgte. Nach Anästhesie der Ratten mit einem Ketamin-Xylazin-Gemisch (Ketamin 12mg/ml, Xylazin 0,16% in Saline) und Eröffnung der Thorax-Höhle wurden die Tiere transkardial mit 4%igem PFA perfundiert. Danach wurden die Gehirne präpariert und für vier Stunden in 4%igem PFA nachfixiert.

Bei E18- und P0-Ratten war eine Perfusion nicht möglich, weswegen die Gehirne nach erfolgter Präparation 24 bis 48 Stunden in einem mit 4%igem PFA gefüllten Eppendorfer Tube gelagert wurden.

Nach der Fixierung erfolgte ein sogenannter „Kryoschutz“, um Gewebsschäden beim Einfrieren bzw. Auftauen zu vermindern: Dazu gab man die Gehirne für 24 bis 48 Stunden in eine 25%ige Saccharose-Lösung. Um einen möglichst schnellen Gefrierprozess zu erzielen, wurden die Gehirne mittels einer Schöpfkelle in flüssiges Isopentan (-50°C) getaucht. Dadurch wurde das Entstehen von interzellulären Kristallen verhindert, welche die Zellmembran schädigen.

Die schockgefrorenen Gehirne konnten im Gefrierschrank bei -80°C in vorgekühlten Eppendorfer Tubes zwischengelagert oder gleich im Anschluss am Kryostat geschnitten werden.

2.2.3.2 Herstellen von Gefrierschnitten am Kryostat

Zuerst wurden die Gehirne durch Festkleben des Hirnstamms mit Tissue-Tek auf einer Halterungsplatte befestigt. Alle Instrumente wie Pinsel, Pinzette etc. mussten im Kryostat vor Gebrauch gekühlt werden. Bei einer Innenraumtemperatur von -18°C im Kryostat wurde das Gehirn zunächst frontal in 12µm dicke Scheiben „angeschnitten“, um die auf das Gewebe einwirkenden Scherkräfte möglichst gering zu halten. Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch kontrolliert, um das Anschneiden des Hippocampus im zweiten Drittel des Großhirns zu bemerken. Der Hippocampus wurde in ca. 30µm dicke Frontalschnitte zerlegt, die von der Ablageplatte mit einer Pinzette in eine PBS gefüllte 6er *well*-Platte überführt wurden.

Da das Gewebe der E18- und P0-Ratten sehr fragil war und durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit beschädigt wurde, wurden die Schnitte dieses Stadiums sofort auf einen angewärmten Objektträger geschmolzen.

2.2.3.3 Immunhistochemie

Im Folgenden wurden die Gehirnschnitte durch sogenanntes „free floating“ angefärbt, was bedeutet, dass die Antikörperbindung durch Schwimmen der Schnitte in der Antikörperlösung erfolgte (Bender et al., 2007).

Alle Schnitte wurden mit einem p-Cofilin-Antikörper (Sekundäantikörper: Alexa 568; „rot“) und mit DAPI behandelt ($t=1\text{min}$; Verdünnung 1:1000 in PBS).

Zur Unterscheidung von Neuronen und Astrozyten konnte bei den Rattenstadien P11 und P32 eine GFAP-Färbung (Sekundäantikörper: Cy2 „grün“) durchgeführt werden. GFAP (*glial fibrillary acid protein*) ist ein Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen und wird als Marker für Astrozyten angesehen.

Um unspezifische Immunreaktionen zu vermeiden, wurden die Schnitte zunächst eine Stunde durch 3%iges BSA geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Primäantikörperlösung über Nacht. Nach zwei Waschzyklen mit PBS à 10min erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für maximal 12 Stunden.

Nach der Färbung wurden die Schnitte einzeln in ein PBS gefülltes 6er *well* überführt und mit Hilfe eines Pinsels auf die Objektträger gezogen. Die Schnitte mussten einige Stunden trocknen, bevor sie mit DAKO-Eindeckmedium eingedeckelt werden konnten.

Die Voraussetzung für das „free floating“ ist eine gewisse Stabilität der Schnitte, weswegen diese Methode bei E18- und P0-Ratten nicht möglich war.

Die Immunzytochemie dieser Stadien erfolgte bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer: Nach Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger wurden die Objektträger nebeneinander in der Feuchtkammer platziert.

Die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte geschah analog zum „free floating“ mit dem Unterschied, dass die Objektträger nach Pipettieren der Lösungen auf die Schnitte mit zurecht geschnittenen Parafilmstücken bedeckt wurden, um das Verdunsten des Flüssigkeitsfilms zu verhindern.

Das Spülen der Objektträger erfolgte mit einer PBS gefüllten Glasküvette.

Die Schnittpräparate wurden nach dem Trocknen im Kühlschrank bei -5°C gelagert.

2.2.3.4 Bildanalyse

Die Schnitte wurden mit dem konfokalen Mikroskop und dem Axioskop fotografiert. Das konfokale Mikroskop beinhaltet drei Laser (Argon: 488nm für Cy2 „grün“, GFAP-Färbung; HeNe1: 543nm für Alexa568 „rot“, p-Cofilin-Färbung; CO₂: 350nm für DAPI „blau“, Zellkerne), wodurch 3-Kanal-Aufnahmen gemacht und anschließend visuell übereinander gelegt wurden. Dadurch konnte eine Differenzierung von Zellkern, p-Cofilin-positiven und GFAP-positiven Zellbestandteilen ermöglicht werden. Die verschiedenen Areale des Hippocampus und die Zellbestandteile wurden hinsichtlich ihres p-Cofilin-Färbemusters untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Dispersionskulturen

3.1.1 Die p-Cofilin-Immunreaktivität dissoziierter hippocampaler Neurone in verschiedenen Differenzierungsstadien

Es sollte untersucht werden, inwieweit sich hippocampale Neurone verschiedener Differenzierungsstadien bezüglich des Verteilungsmusters ihrer p-Cofilin-Immunreaktivität unterscheiden. Zudem sollte in Erfahrung gebracht werden, ob eine Behandlung mit Reelin einen Effekt auf das spezifische p-Cofilin-Färbemuster des jeweiligen Stadiums zeigt.

In Vorexperimenten wurden P5- und E18-Neurone nach 24 Stunden oder 7 Tagen *in vitro* mit Reelin oder Kontrollmedium (5min, 30min, 24h, 48h) behandelt und anschließend immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen p-Cofilin gefärbt.

Bei den 7 Tage alten Kulturen (P5 und E18) konnte jedoch zwischen Reelin stimulierten Kulturen und Kontrollen kein Unterschied des p-Cofilin-Färbemusters nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei 24 Stunden alten Dispersionskulturen (P5) ein Effekt durch die Reelin-Behandlung (3min, 5min, 15min, 30min), weswegen wir unser Augenmerk für die weitere statistische Auswertung vor allem auf dieses Stadium richteten.

Im Folgenden soll durch eine Zeitreihe die spezifische p-Cofilin-Immunreaktivität von hippocampalen Neuronen verschiedener Altersstadien dokumentiert werden.

3.1.2 Das p-Cofilin-Färbemuster von 24 Stunden alten hippocampalen Neuronen *in vitro* (P5)

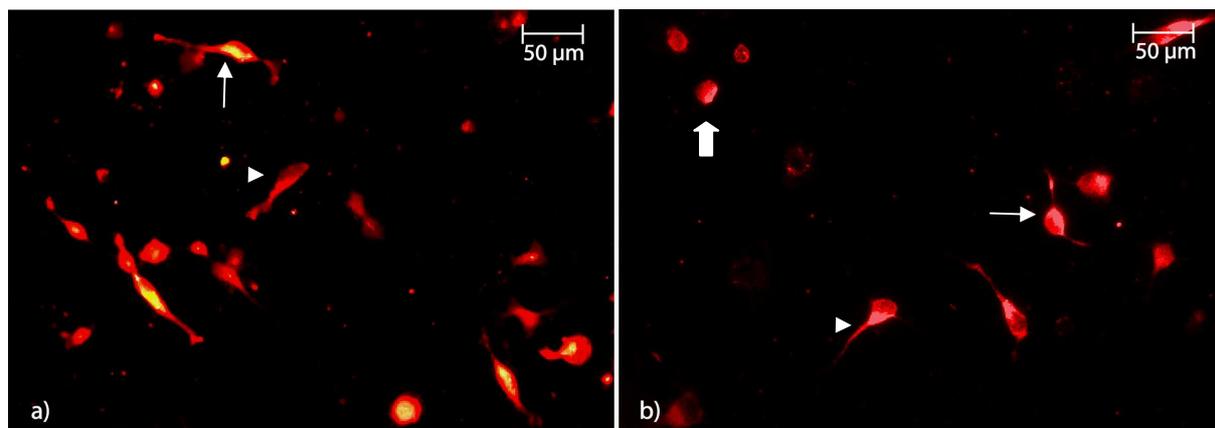


Abbildung 10 a-b: 24 Stunden alte Dispersionskultur hippocampaler Neurone (P5)

Dispersionskultur nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen p-Cofilin (rot). Die Abbildung zeigt Zellen mit unterschiedlicher Verteilung der p-Cofilin-Immunfärbung.

- a), b) Dünner Pfeil: Zellsoma mit zwei p-Cofilin-immunpositiven Fortsätzen (bipolares Stadium)
- a), b) Pfeilspitze: Zellsoma mit einem p-Cofilin-immunpositivem Fortsatz
- c) Blockpfeil: p-Cofilin-immunpositives Zellsoma ohne Fortsatz

Bei 24 Stunden alten Dispersionskulturen fanden sich Neurone im bipolaren Stadium (vgl. Abb. 10).

Es gab aber auch Zellen, die noch keine Fortsätze ausgebildet hatten oder erst einen Fortsatz trugen. Sowohl Soma als auch Zellfortsätze waren p-Cofilin-immunpositiv.

Bei genauerer Betrachtung dieser Dispersionskulturen wurde deutlich, dass die meisten der bipolaren Zellen zwei Fortsätze unterschiedlicher p-Cofilin-Intensität trugen (vgl. Abb. 11). Hippocampale Neurone mit zwei ähnlich angefärbten p-Cofilin-immunpositiven Fortsätzen kamen nur selten vor.

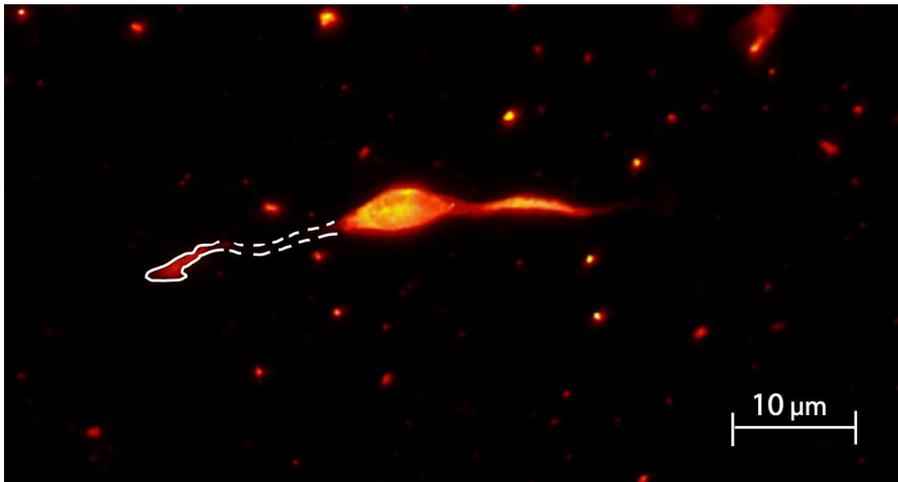


Abbildung 11: Bipolare Zelle (P5) mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher Intensität. Rechts befindet sich der Fortsatz mit hoher p-Cofilin-Immunreaktivität, links (weiß markiert) der Fortsatz mit geringer p-Cofilin-Immunreaktivität.

Die Zellen mit zwei unterschiedlich angefärbten Fortsätzen unterschieden sich zudem in der Intensität des Fortsatzes mit der höheren p-Cofilin-Immunreaktivität.

Dies zeigt zunächst, dass es offenbar zellintrinsische Mechanismen gibt, die eine polarisierte Phosphorylierung von n-Cofilin in neuronalen Fortsätzen des bipolaren Stadiums bewirken und unabhängig von einer Reelin-Wirkung auftreten.

3.1.3 Das p-Cofilin-Färbemuster von 7 Tagen alten hippocampalen Neuronen *in vitro* (E18 und P5)

3.1.3.1 Hippocampale Dispersionskultur des Stadiums E18

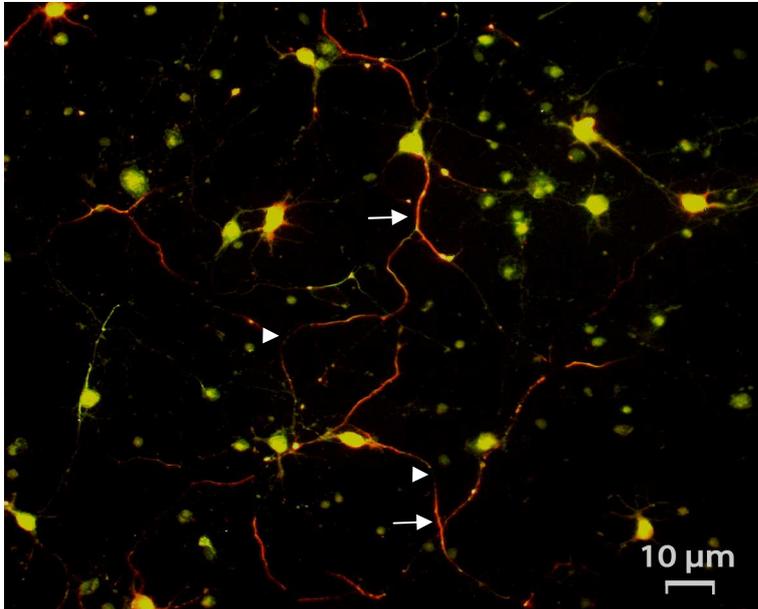


Abbildung 12: Dispersionskultur hippocampaler Neurone (E18) nach 7 Tagen *in vitro* zur Demonstration der p-Cofilin-Immunfärbung der Fortsätze

Dispersionskultur nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen Tau (grün), einem Marker für Axone, und gegen p-Cofilin (rot). Zu beachten ist die diskontinuierliche p-Cofilin-Immunfärbung der Fortsätze

Pfeil: p-Cofilin-immunpositive Fortsatzabschnitte
Pfeilspitze: p-Cofilin-immunnegative Fortsatzabschnitte

Die obige Abbildung zeigt dissoziierte hippocampale Neurone aus Ratten, die zum Zeitpunkt E18 präpariert wurden. Innerhalb von einer Woche bildete sich zwischen den Neuronen ein dichtes Fortsatznetzwerk aus. Die Fortsatzdifferenzierung zu Axon oder Dendrit war bereits erfolgt. Charakteristisch war eine unregelmäßig auftretende p-Cofilin-Immunreaktivität der Fortsätze: Es fanden sich sowohl p-Cofilin-positive als auch p-Cofilin-negative Fortsatzsegmente (vgl. Abb. 12).

Zudem wies das Fortsatznetzwerk punktförmige Zellkontakte mit hoher p-Cofilin-Immunreaktivität auf (vgl. Abb. 13).

Die Kulturen wurden 7 Tage lang mit Reelin behandelt. Im Gegensatz zu den 24 Stunden alten Kulturen war jedoch kein Effekt auf das p-Cofilin-Färbemuster ersichtlich.

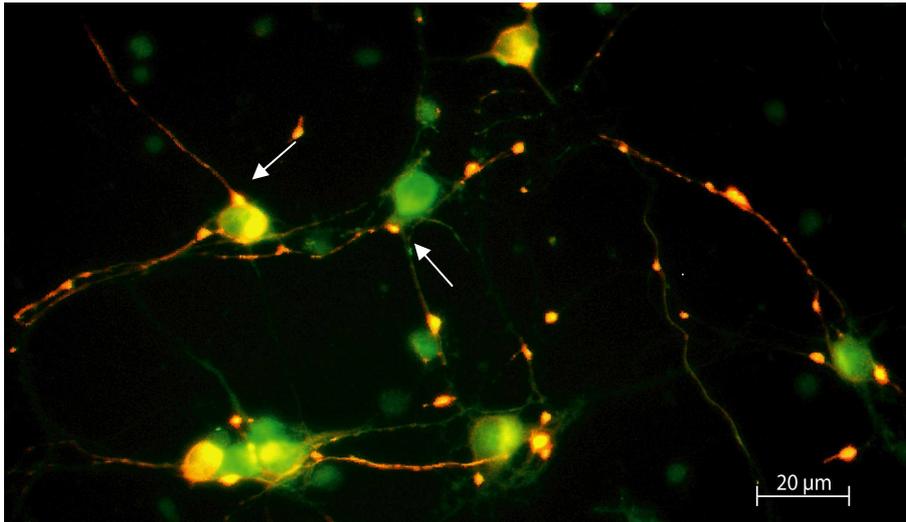


Abbildung 13: Dispersionskultur hippocampaler Neurone (E18) nach 7 Tagen *in vitro* zur Demonstration von p-Cofilin-positiven Zellkontakten.

Dispersionskultur nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen Tau (grün), einem Marker für Axone, und gegen p-Cofilin (rot)

Pfeile: Zellkontakte mit hoher p-Cofilin-Immunreaktivität

3.1.3.2 Hippocampale Dispersionskultur des Stadiums P5

Auch dissoziierte hippocampale Neurone aus Ratten, die im Entwicklungsstadium P5 präpariert wurden, bildeten nach einer Woche *in vitro* ein Fortsatznetzwerk aus. Hier war es ebenfalls charakteristisch, dass nicht alle Fortsätze p-Cofilin-positiv waren oder teilweise nur Fortsatzsegmente (vgl. Abb. 14a) angefärbt wurden.

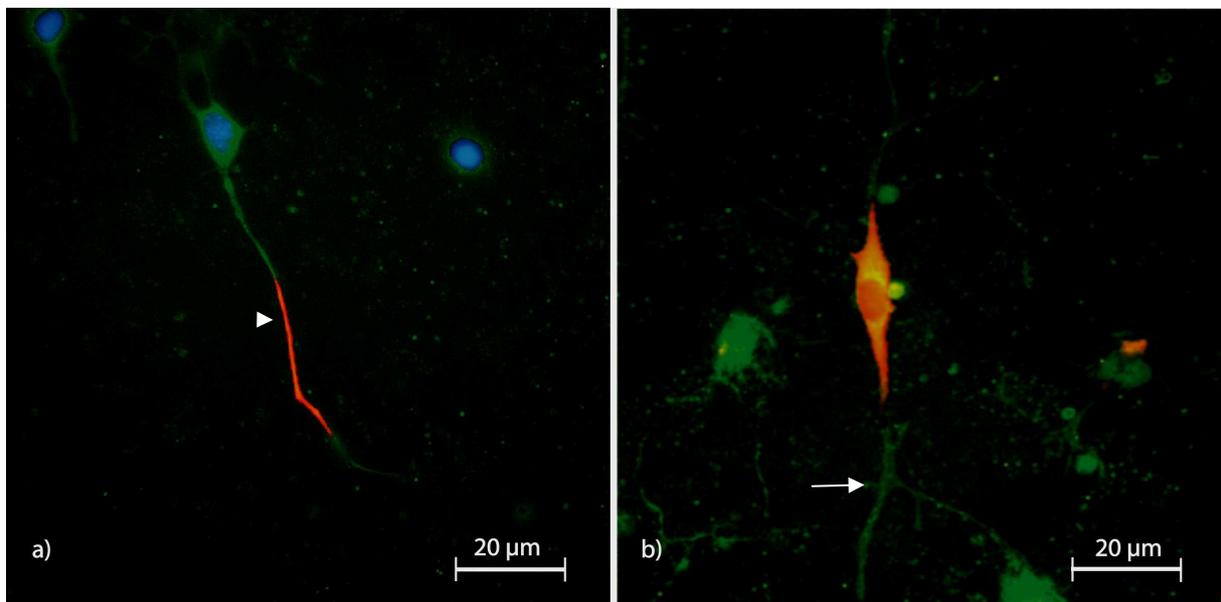


Abbildung 14: Dispersionskultur hippocampaler Neurone (P5) nach 7 Tagen *in vitro* zur Demonstration der p-Cofilin-Immunfärbung der Fortsätze.

Dispersionskultur nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen Tau (grün), einem Marker für Axone, gegen p-Cofilin (rot) und einer DAPI-Färbung (blau) der Zellkerne

a) Pfeilspitze: p-Cofilin-immunpositives Fortsatzsegment

b) Pfeil: p-Cofilin-immunnegatives Fortsatzsegment

Manche Zellen wurden nur im Bereich des Zellkörpers angefärbt, wohingegen die Fortsätze keine Immunreaktivität aufwiesen (vgl. Abb. 14b).

Auch bei diesen Kulturen war kein Unterschied der p-Cofilin-Immunfärbung zwischen Reelin stimulierten Kulturen und Kontrollen erkennbar.

3.1.4 Zellkategorien mit unterschiedlicher p-Cofilin-Immunreaktivität in 24 Stunden alten hippocampalen Dispersionskulturen (P5)

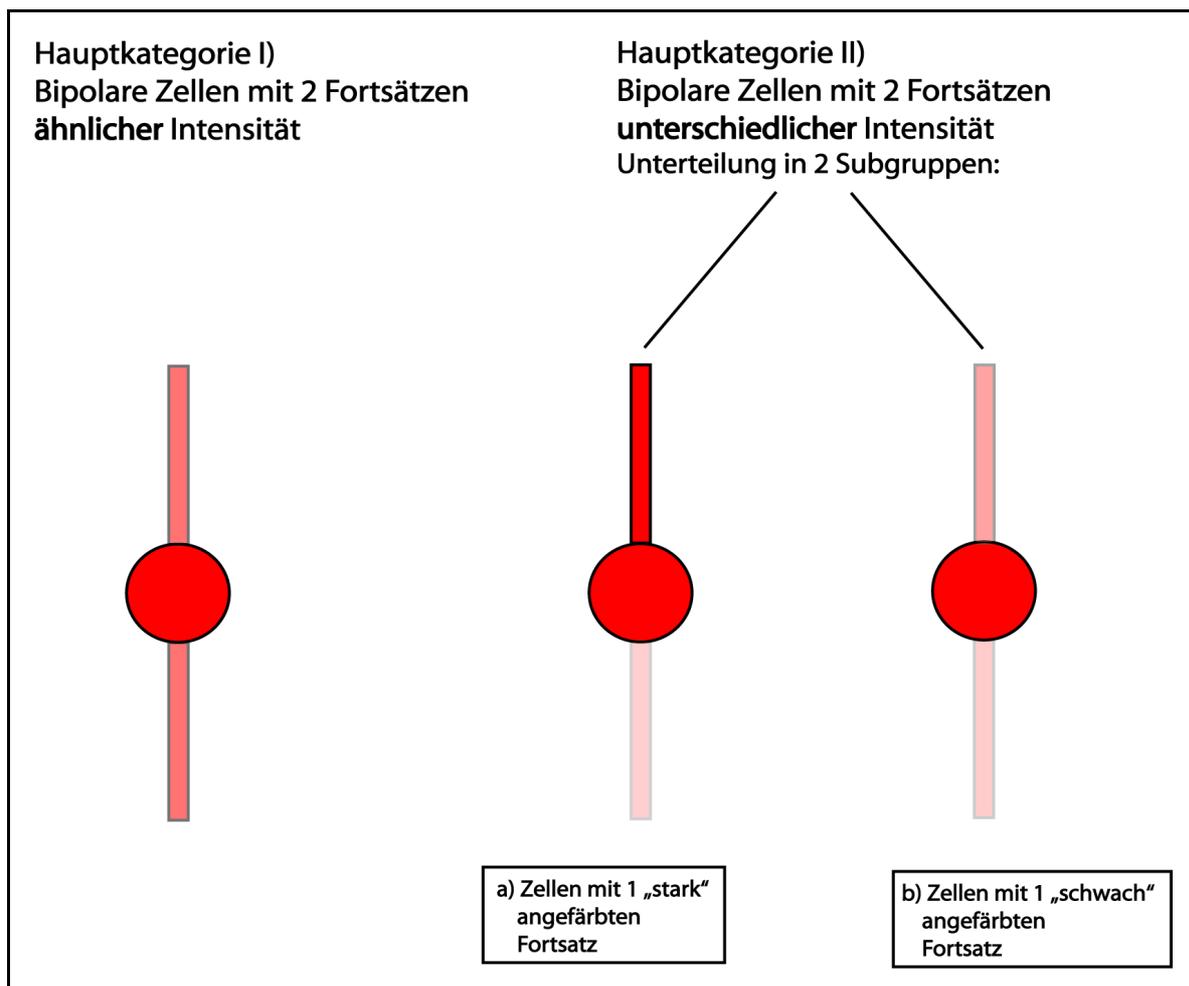


Abbildung 15: Zellkategorien bipolarer hippocampaler Neurone (P5)

Das Schema repräsentiert bipolare Neurone einer 24 Stunden alten Dispersionskultur aus Ratten, die im Entwicklungsstadium P5 präpariert wurden, nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen p-Cofilin (rot). Die bipolaren hippocampalen Neurone wurden gemäß der Intensität der p-Cofilin-Immunreaktivität in die Hauptkategorien I und II sowie die Subgruppen IIa und IIb eingeteilt.

Bei der statistischen Analyse wurde die Auswertung auf 24h alte Dispersionskulturen (P5) beschränkt. Wie bereits erläutert, wurden die Zellen in Kategorien eingeteilt und der Anteil der jeweiligen Zellzahl an der Gesamtzellzahl ermittelt (vgl. 2.2.1.10).

Es sollte untersucht werden, ob Reelin einen Effekt auf den prozentualen Anteil der jeweiligen Kategorie bewirkte.

3.1.4.1 Anteil der beiden Hauptkategorien in der Dispersionskultur

Insgesamt wurden 31010 Zellen gezählt, davon waren 6157 bipolare Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher Intensität und nur 437 bipolare Zellen mit zwei Fortsätzen ähnlicher Intensität. Der restliche Anteil waren Zellen ohne Fortsatz oder mit mindestens drei Fortsätzen.

Da jedes Glasplättchen unterschiedlich dicht mit Zellen bewachsen war, wurde der Anteil der beiden Hauptkategorien ins Verhältnis zur jeweiligen Zellzahl der Population auf dem Glasplättchen gesetzt und anschließend der Mittelwert ermittelt.

Zunächst ging es um den Anteil der beiden Hauptkategorien I/II an der Gesamtzellzahl („Bipolare Zellen mit zwei Fortsätzen ähnlicher Intensität“ und „Bipolare Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher Intensität“). Abbildung 16 verdeutlicht, dass der Anteil von bipolaren Zellen an der Gesamtzellzahl durchschnittlich $\frac{1}{4}$ betrug. Mit 20,1% war der Anteil bipolarer Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher Intensität der p-Cofilin-Immunreaktivität im Durchschnitt deutlich höher als der Anteil bipolarer Zellen mit zwei Fortsätzen ähnlicher Intensität mit 1,4%.

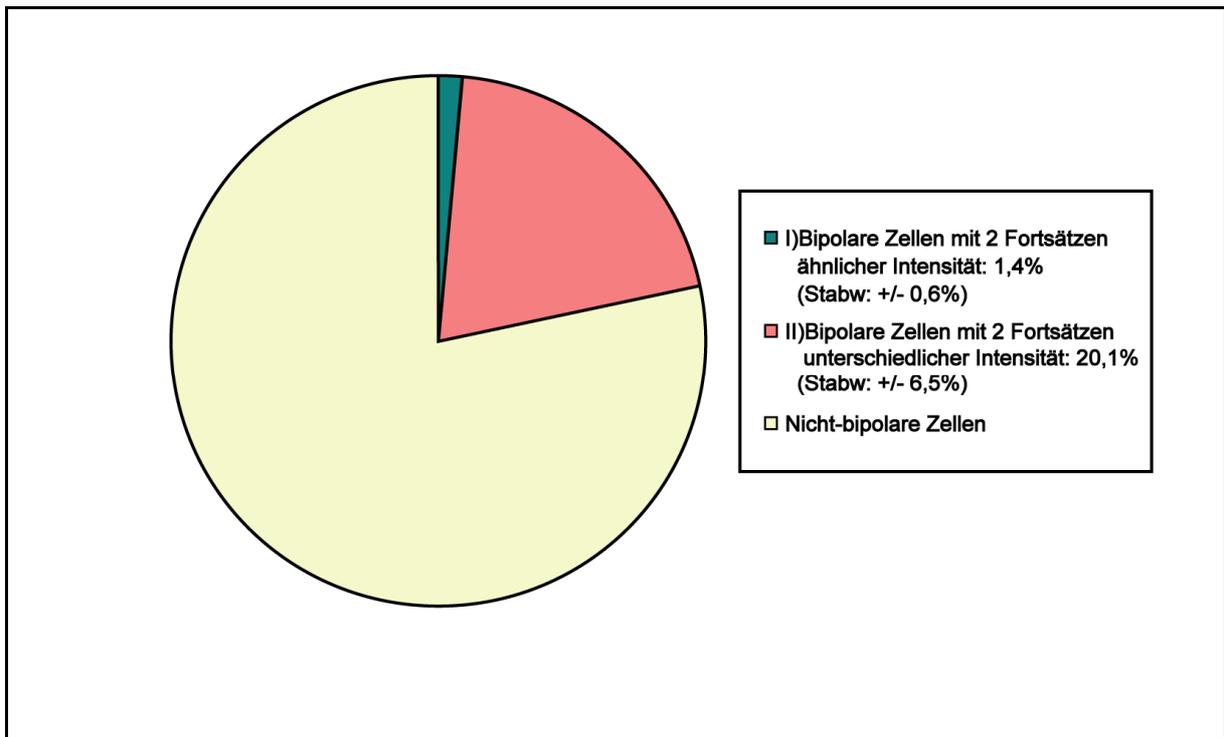


Abbildung 16: Kreisdiagramm zur Darstellung des prozentualen Anteils der beiden Hauptkategorien I bzw. II von p-Cofilin-immungefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl

Es wird der prozentuale Durchschnittsanteil der beiden Hauptkategorien an der Gesamtzellzahl gezeigt. Der Kreis repräsentiert die Gesamtzellzahl ($\cong 100\%$). Der Anteil von bipolaren Zellen in der Zellkultur beträgt ca. $\frac{1}{4}$.

Mit einberechnet wurden die Durchschnittswerte aller Zellkulturen unabhängig vom Stimulationsmodus, d.h. es wurden Reelin stimulierte Kulturen, Kontrollen und unbehandelte Dispersionskulturen berücksichtigt.

3.1.4.2 Der Reelin-Effekt auf den Anteil der beiden Hauptkategorien

Nun stellte sich die Frage, ob sich der Anteil der beiden Hauptkategorien I bzw. II unter der Wirkung von rekombinantem Reelin veränderte.

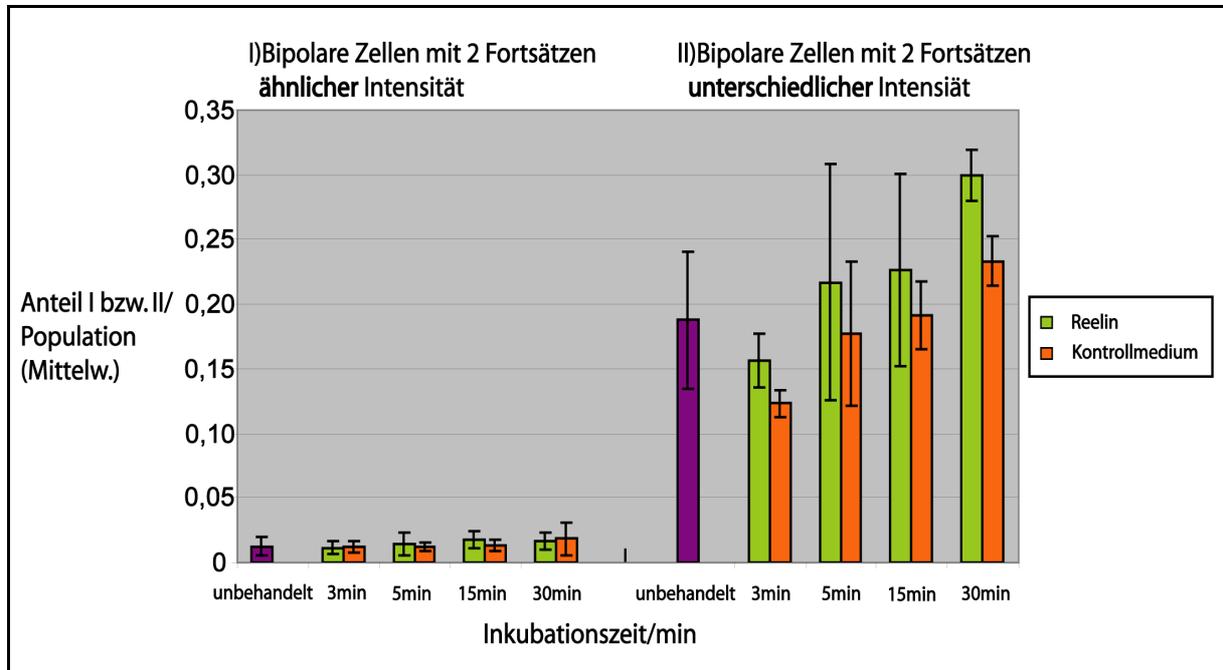


Abbildung 17: Säulendiagramm zur Darstellung des Reelin-Effekts auf die beiden Hauptkategorien I bzw. II von p-Cofilin-immungefärbten Zellen

X-Achse: Inkubationszeit/min, Y-Achse: Anteil I bzw. II/Population ($1 \pm 100\%$). Es wurde der jeweilige Anteil der Hauptkategorien I bzw. II ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl einer Population (Neurone eines Glasplättchens) gesetzt. Für jede Inkubationsdauer wurden zwei Dispersionskulturen und pro Dispersionskultur zwei Populationen verwendet. Jede Säule zeigt somit den Mittelwert aus vier Populationen an.

Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar. Der Anteil bei den Hauptkategorien I bzw. II wird für die Reelin stimulierten Kulturen, Kontrollen und unbehandelte Kulturen entsprechend der Inkubationszeit dargestellt.

Die Anzahl bipolarer Zellen mit zwei Fortsätzen ähnlicher Intensität der p-Cofilin-Immundefärbung blieb trotz Reelin-Stimulation unverändert niedrig. Für die einzelnen Inkubationszeiträume zeigte ein t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen Reelin stimulierten Kulturen und Kontrollen.

Die Anzahl bipolarer Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher Intensität stieg mit zunehmender Inkubationszeit an. Ein t-Test zeigte für die Inkubationsdauer von 30min ein signifikantes Ergebnis zwischen Reelin stimulierten Kulturen und Kontrollen.

3.1.4.3 Anteil der Subgruppen in der Dispersionskultur

Die Hauptkategorie II „Zellen mit zwei unterschiedlich angefärbten Fortsätzen“ wurde entsprechend der Intensität des stärker angefärbten Fortsatzes in zwei Subgruppen untergliedert. Es stellte sich die Frage, ob Reelin einen Effekt auf den prozentualen Anteil der beiden Subgruppen „Zellen mit einem stark (Pixelintensität: 66-130) angefärbten Fortsatz“ (IIa) und „Zellen mit einem schwach (Pixelintensität: 12-20) angefärbten Fortsatz“ (IIb) in einer Dispersionskultur hat.

Alle Zellen mit Pixelintensitäten ≥ 21 und ≤ 65 wurden ebenfalls mitgezählt und der Kategorie „Zellen mit einem mittelstark angefärbten Fortsatz“ zugeteilt, um die vollständige Zellzahl von Hauptkategorie II zu ermitteln.

Da neben der Fortsatzintensität bei den mit Reelin bzw. Kontrollmedium behandelten Zellpopulationen auch die Inkubationsdauer eine Rolle spielte, wurde eine Mehrfaktoren-ANOVA durchgeführt. Alle Kollektive der vier Inkubationszeiträume wurden zusammengefasst, um die Stichprobenanzahl zu erhöhen. Dabei wurde der Test an jeden Zeitpunkt adjustiert, um den Reelin-Effekt im Zeitverlauf zu berechnen.

Bei den sogenannten Tests der Zwischensubjekteffekte wurde untersucht, welche Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Zellzahlen der beiden Subgruppen hatten.

Dabei kam heraus, dass die Behandlung mit Reelin eine zum Kontrollmedium gegenläufige Wirkung auf die Zellzahl der Kategorien zeigte. Der Unterschied nach Reelin-Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit dem Kontrollmedium war statistisch signifikant ($p=0.03$). Abbildung 18 verdeutlicht, dass unter Reelin-Stimulation der prozentuale Anteil der Subgruppe „Zellen mit einem Fortsatz starker Intensität“ zu allen vier Inkubationszeiträumen über dem prozentualen Anteil der Subgruppe „Zellen mit einem Fortsatz schwacher Intensität“ liegt. Genau umgekehrt verhielt es sich bei Behandlung mit dem Kontrollmedium, was Abbildung 19 demonstriert.

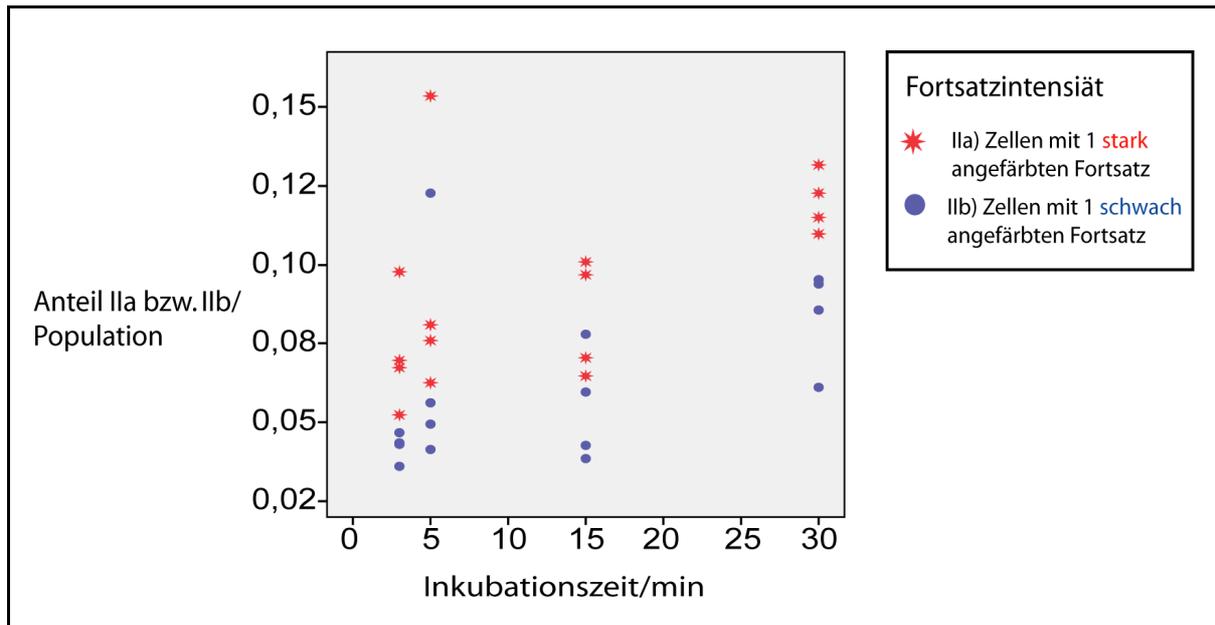


Abbildung 18: Punktdiagramm zur Demonstration des Reelin-Effekts auf den prozentualen Anteil der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb

X-Achse: Inkubationszeit/min, Y-Achse: Anteil Ia bzw. IIb/Population ($1 \hat{=} 100\%$). Der prozentuale Anteil der beiden Subgruppen an der jeweiligen Population ist für die entsprechende Inkubationsdauer dargestellt. Für jede Inkubationsdauer wurden zwei Dispersionskulturen und pro Dispersionskulturen zwei Populationen (Neurone eines Glasplättchens) untersucht.

Der Anteil der Subgruppe „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa) liegt immer im höheren Bereich als der Anteil der Subgruppe „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb).

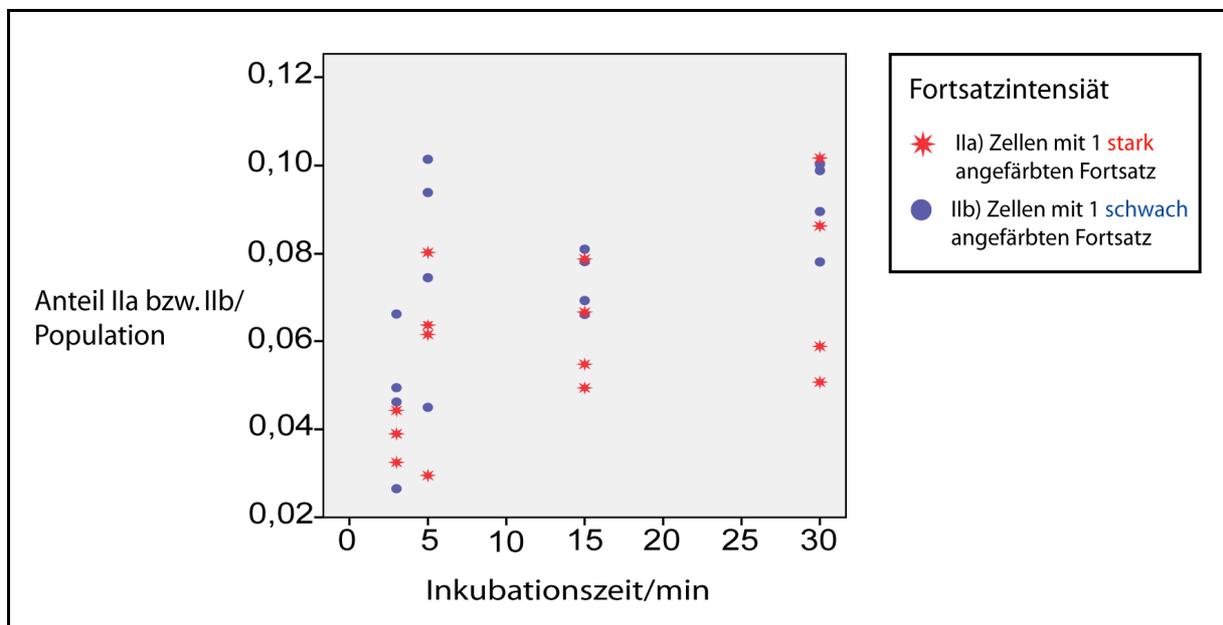


Abbildung 19: Punktdiagramm zur Demonstration des Kontrollmedium-Effekts auf den Anteil der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb

X-Achse: Inkubationszeit/min, Y-Achse: Anteil Ia bzw. IIb/Population ($1 = 100\%$). Der Anteil der beiden Subgruppen an der jeweiligen Population ist für die entsprechende Inkubationsdauer dargestellt. Für jede Inkubationsdauer wurden zwei Dispersionskulturen und pro Dispersionskulturen zwei Populationen (Neurone eines Glasplättchens) untersucht.

Die Subgruppe „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb) liegt immer im höheren Bereich als die Subgruppe „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa).

3.1.4.4 Reelin versus Kontrollmedium: „Shift“ der beiden Subgruppen

Zudem wurde untersucht, ob die Inkubationsdauer mit Reelin oder Kontrollmedium von Bedeutung war. Die statistische Auswertung konnte, über alle Zeitpunkte (3min, 5min, 15min, 30min) gemittelt, einen Reelin-Effekt nachweisen. Dies bedeutet dass mit zunehmender Inkubationsdauer die Subgruppe „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa) im Vergleich zu den Kontrollen signifikant zunahm (vgl. Abb. 20). Im Gegensatz dazu stieg unter Behandlung mit Kontrollmedium der Anteil der Subgruppe „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb) an.

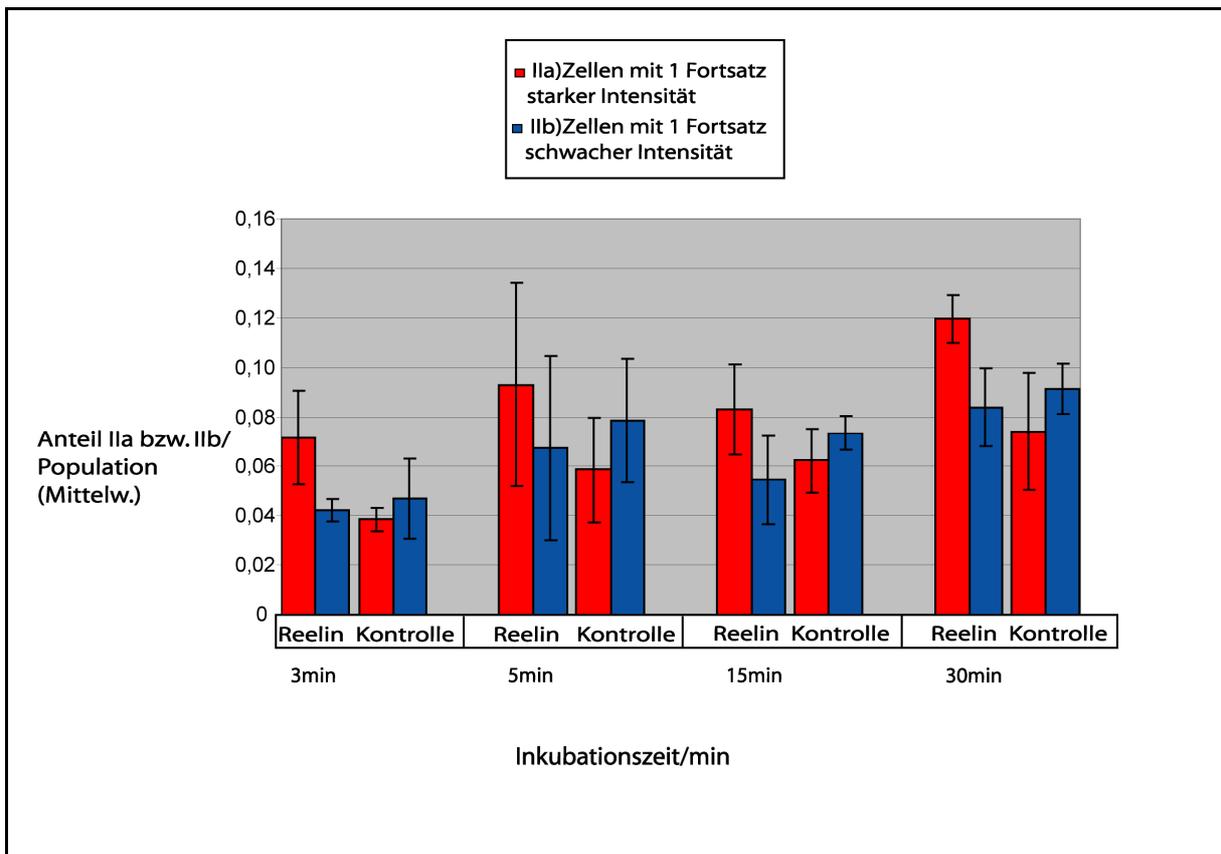


Abbildung 20: Säulendiagramm „Shift“ der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb

X-Achse: Inkubationszeit/min, Y-Achse: Anteil IIa bzw. IIb/Population ($1 \pm 100\%$). Die Graphik demonstriert, dass die Behandlung mit Reelin-haltigem Medium zu einer Zunahme des prozentualen Anteils von Neuronen mit einem stark angefärbten Fortsatz (IIa) führte. Die Behandlung mit Kontrollmedium führte hingegen zu einer Abnahme des prozentualen Anteils von IIa.

Es wurde der jeweilige Anteil der Subgruppen IIa bzw. IIb ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl einer Population (Neurone eines Glasplättchens) gesetzt. Für jede Inkubationsdauer wurden zwei Dispersionskulturen und pro Dispersionskultur zwei Populationen untersucht. Jede Säule zeigt somit den Mittelwert aus vier Populationen an. Die Mittelwerte sind für beide Subgruppen, entsprechend der Behandlung mit Reelin oder Kontrollmedium und entsprechend der Inkubationsdauer, dargestellt. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar.

Betrachtet man jeden Zeitpunkt von Abbildung 20 einzeln, wird deutlich, dass durch die Stimulation mit Reelin und Kontrollmedium ein „Shift“ der Subgruppen stattfand.

In den Reelin behandelten Kulturen wuchs die Subgruppe „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa), während die Subgruppe „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb) kleiner wurde.

In den Kontrollen verhielt es sich genau umgekehrt: Durch Behandlung mit dem Kontrollmedium kam es zu einem Anstieg des prozentualen Anteils der Subgruppe „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb), während der prozentuale Anteil der Subgruppe „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz (IIa) abnahm.

3.1.4.5 Mehrfachvergleiche der vier Gruppen

Im Anschluss daran wurden sogenannte Mehrfachvergleiche für die vier Gruppen von Abbildung 21 durchgeführt, d.h. für den Anteil von Subgruppe „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa) bzw. „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb) in den Reelin behandelten Kulturen und den Kontrollmedium behandelten Kulturen.

Dazu wurden die einzelnen Gruppen paarweise miteinander verglichen und der jeweilige p-Wert ermittelt. Um eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% insgesamt nicht zu überschreiten, wurde bei den Post-Hoc-Tests eine sogenannte Bonferroni-Korrektur für multiples Testen durchgeführt.

Für die Gruppen „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ in den Reelin stimulierten Kulturen und „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ in den Kontrollen zeigte sich mit $p=0,002$ ein signifikanter Unterschied.

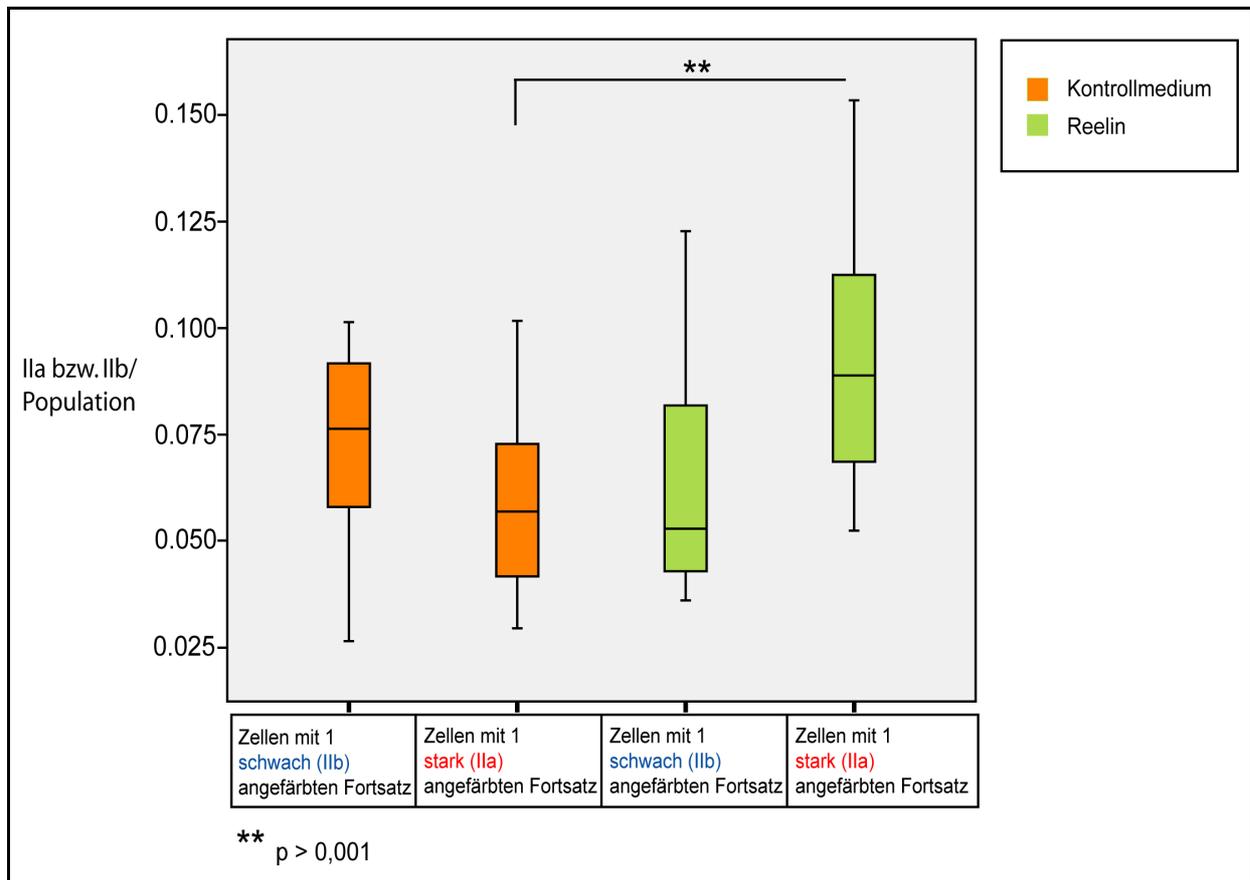


Abbildung 21: Mehrfachvergleiche der vier Gruppen von bipolaren Neuronen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Intensität

X-Achse: Subgruppen IIa bzw. IIb nach Behandlung mit Reelin oder Kontrollmedium, Y-Achse: Anteil IIa bzw. IIb/Population ($1 \pm 100\%$). Es wurden die prozentualen Anteile von Subgruppe IIa bzw. IIb an der Population nach der Behandlung mit Reelin bzw. Kontrollmedium verglichen.

Die einzelnen Kollektive sind als Boxplots dargestellt, d.h. die Fehlerbalken entsprechen Maximum bzw. Minimum des Datensatzes. Der Median liegt auf Höhe des horizontalen Strichs in der Mitte der Box. Die beiden horizontalen Striche am Ende der Box zeigen oberes und unteres Quartil an.

3.1.4.6 Analyse der unbehandelten Kulturen

Für die Analyse der unbehandelten Kulturen wurde eine univariate Varianzanalyse durchgeführt. Mit paarweisen Mehrfachvergleichen wurde getestet, ob zwischen den Anteilen der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb (vgl. Abb. 21) in den unbehandelten Kulturen ein signifikanter Unterschied existiert und ob Unterschiede zu den Gruppen der Reelin bzw. Kontrollmedium behandelten Kulturen (vgl. Abb. 22) nachzuweisen sind. Es fand sich jedoch kein signifikantes Ergebnis.

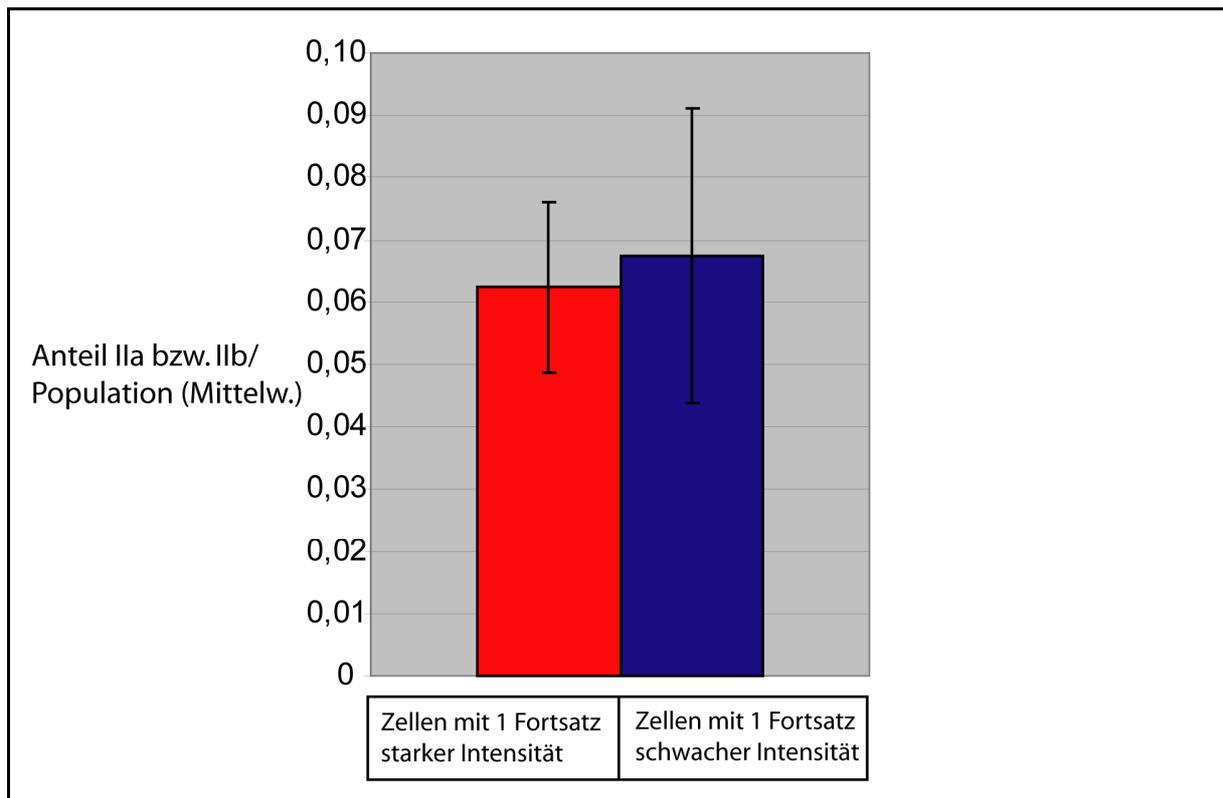


Abbildung 22: Säulendiagramm der beiden Subgruppen IIa bzw. IIb der unbehandelten Kulturen
Es wurde der jeweilige Anteil (Y-Achse: $1 \pm 100\%$) der Subgruppen IIa bzw. IIb ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl einer Population (Neurone eines Glasplättchens) gesetzt. Es wurden zwei Dispersionskulturen und pro Dispersionskultur zwei Populationen verwendet. Jede Säule zeigt somit den Mittelwert aus vier Populationen an.
Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen.

3.2 Ergebnisse der Lebendmikroskopie mit 24 Stunden alten hippocampalen Dispersionskulturen (P5)

3.2.1 Bipolare Zellen ohne Zugabe von Reelin

Durch Beobachtung der Zelldifferenzierung unter dem Lebendmikroskop sollten die Erkenntnisse, die durch die Dispersionskultur gewonnen wurden, ergänzt werden.

Folgende Bildersequenz zeigt, dass bipolare Zellen auch ohne Zugabe von Reelin Fortsätze mit unterschiedlicher Aktivität ausbilden. Die Zelle in Abbildung 23 trägt einen mobilen Fortsatz (grüner Pfeil) und einen unbeweglichen Fortsatz (roter Kreis):

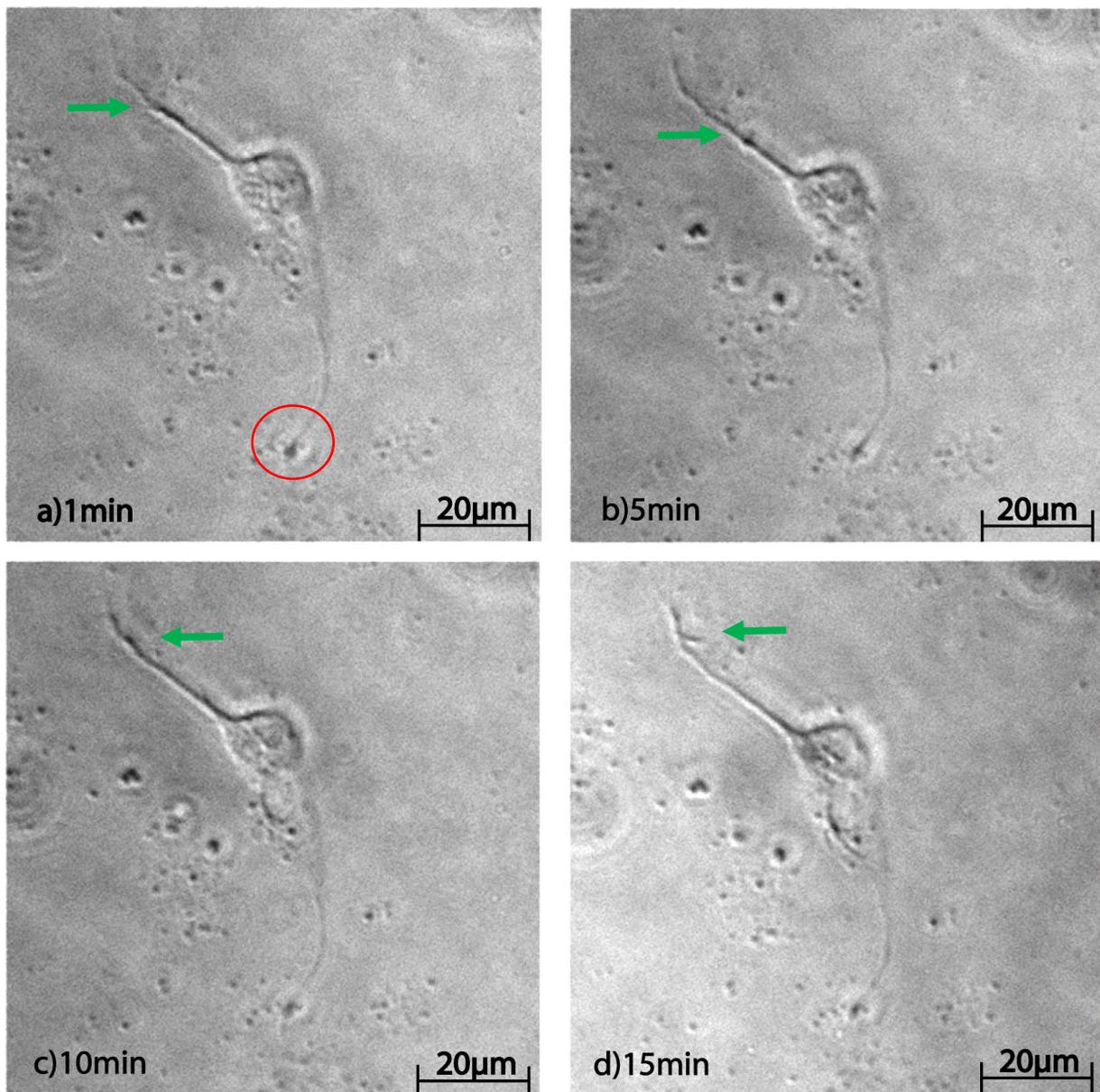


Abbildung 23 a-d (Time Lapse): Aufnahmen eines Neurons im bipolaren Stadium (ohne Reelin-Behandlung) im Zeitverlauf (min)

a) Roter Kreis: Unbeweglicher Fortsatz

a)-d) Grüner Pfeil: Mobiler Fortsatz mit Ausbildung eines Filopodiums in d)

3.2.2 Bipolare Zellen unter Reelin-Stimulation

Es wurde bei einigen Zellen beobachtet, dass die Zugabe von Reelin zu einer Veränderung der Fortsatzbeweglichkeit führte (vgl. Abb. 24). In einem Fortsatz nahm die Mobilität nach Reelin-Stimulation zu, während die Mobilität im anderen Fortsatz abnahm.

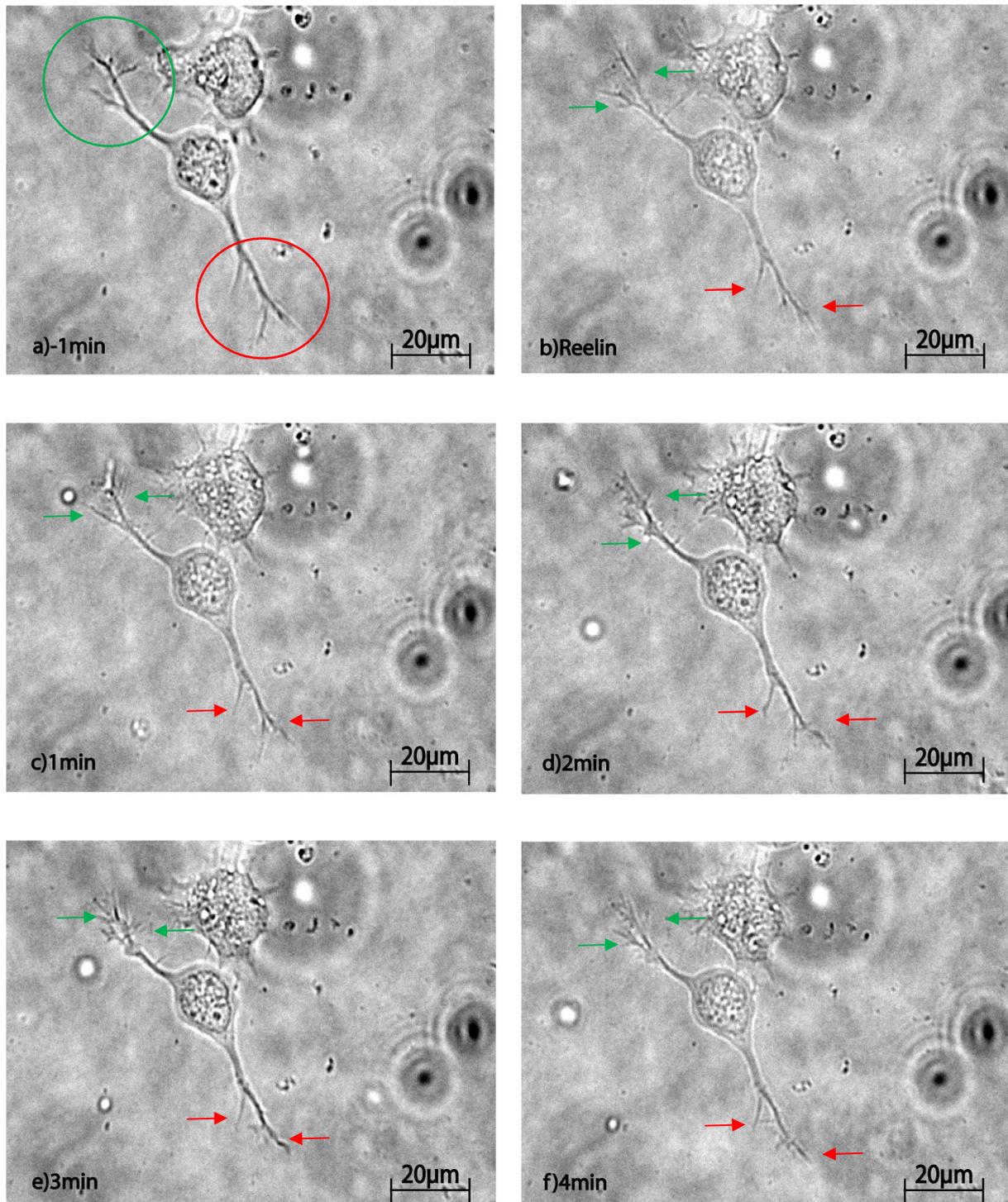


Abbildung 24 a-f (Time Lapse): Aufnahmen einer bipolaren Zelle (a) nach Zugabe von Reelin (b) im Zeitverlauf (c-f).

a)-f) Grüner Pfeil:

Mobiler Fortsatz

a)-f) Roter Kreis/Pfeil:

Unbeweglicher Fortsatz

3.3 Ergebnisse der Immunhistochemie an Gehirnschnitten: Die p-Cofilin-Immunreaktivität hippocampaler Neurone *in vivo*

3.3.1 Die p-Cofilin-Immunfärbung im Gyrus dentatus der Ratte verschiedener Entwicklungsstadien

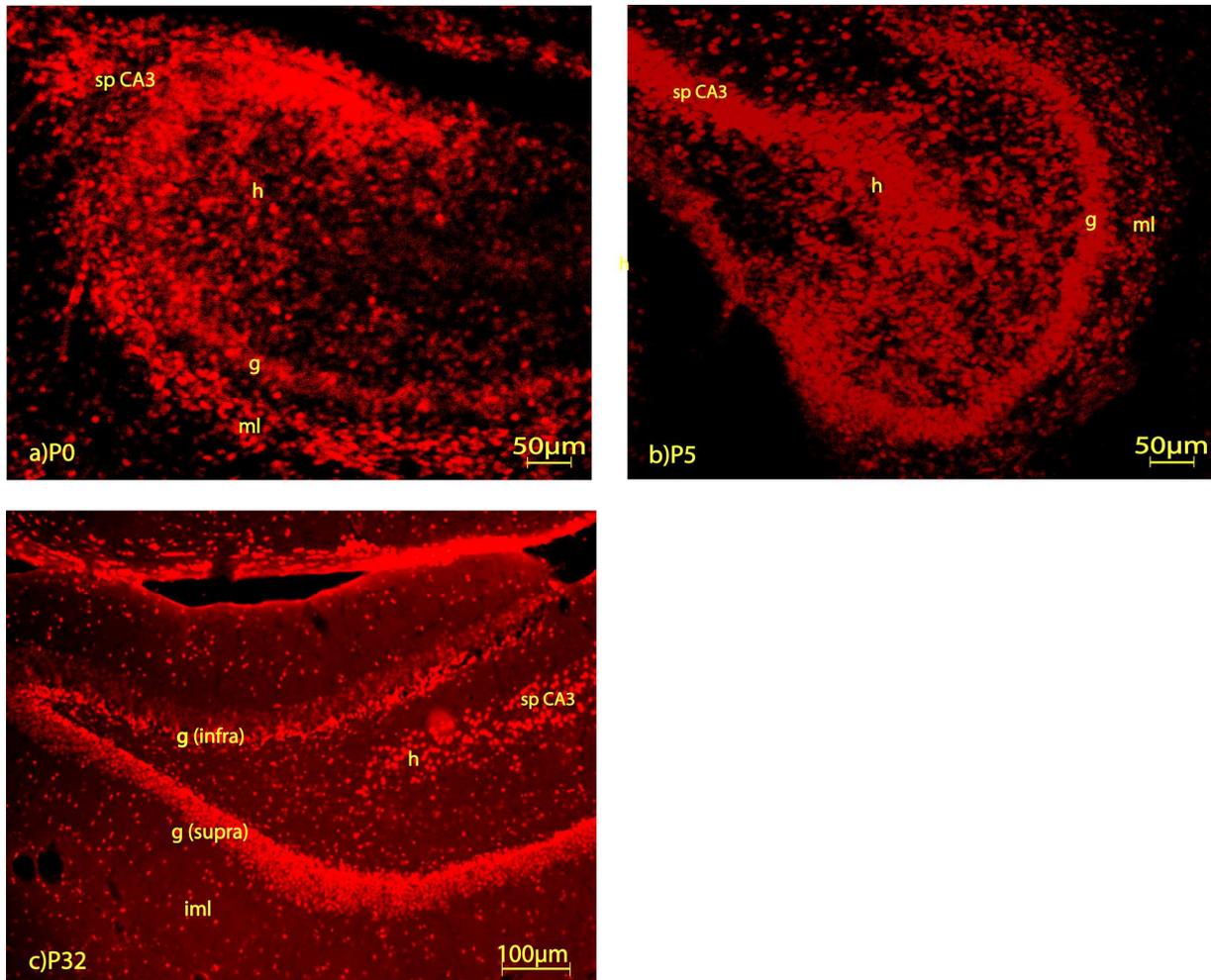


Abbildung 25: Ratten-Gehirnschnitte verschiedener Entwicklungsstadien nach p-Cofilin-Immunfärbung (rot)

Erkennbar ist, dass die Zellsomata junger Körnerzellen des infrapyramidalen Bandes im Bereich des Hilus intensiv angefärbt sind, während die Immunfärbung der Körnerzellen des suprapyramidalen Bandes überall gleichförmig erscheint.

Abkürzungen:

h: Hilus mit Mooszellen

g: granule cell layer (Körnerzellband) mit Pars infrapyramidale (infra) und Pars suprapyramidale (supra)

ml: Stratum moleculare (unterteilt sich in iml und oml)

iml: inner molecular layer (innere Molekularschicht)

oml: outer molecular layer (äußere Molekularschicht)

hf: hippocampal fissure (hippocampale Fissur)

spCA3 pyramidal cell layer mit Region CA3

Die Zeitreihe in Abbildung 25a-c zeigt den Gyrus dentatus von Ratten verschiedener Entwicklungsstadien, die mit einem Antikörper gegen p-Cofilin (rot) gefärbt wurden.

Im Reelin-haltigen Stratum moleculare (ml) des Stadiums PO und P5 fanden sich intensiv angefärbte Zellsomata. Im Unterschied zu den p-Cofilin-Immunfärbungen von neuronalen Fortsätzen *in vitro* war bei den Immunfärbungen der Gehirnschnitte auffällig, dass vor allem neuronale Somata intensiv p-Cofilin-immungefärbt waren.

Zudem zeigte sich eine Ungleichverteilung der p-Cofilin-positiven Zellsomata zwischen Pars suprapyramidale und Pars infrapyramidale des Stadiums P32, was auch in Abbildung 26 deutlich wird.

In allen drei Stadien wies die Hilus-Region, aus der auch in adulten Ratten Körnerzellen gebildet werden, intensiv angefärbte Zellsomata auf.

3.3.2 Die p-Cofilin-Immunfärbung im Gyrus dentatus von adulten Ratten (P11 und P32)

Zudem wurden Gehirnschnitte von adulten Ratten (P11 und P32) nach einer Zellkernfärbung mit DAPI sowohl mit einem Antikörper gegen GFAP (Astrozyten-Marker) und gegen p-Cofilin gefärbt (vgl. Abb. 26).

Dabei konnte das stark ausgebildete Gliafasergerüst dargestellt werden, welches die p-Cofilin-positiven Zellsomata der Körnerzellen umgibt. Die Zellsomata des Körnerzellbandes zeigten in beiden Entwicklungsstadien eine starke p-Cofilin-Immunreaktivität. Vereinzelt fanden sich auch p-Cofilin-positive Fortsätze, die in das Reelin-reiche Stratum moleculare reichten.

Charakteristisch war, dass die GFAP-positiven Fortsätze keine p-Cofilin-Immunfärbung aufwiesen.

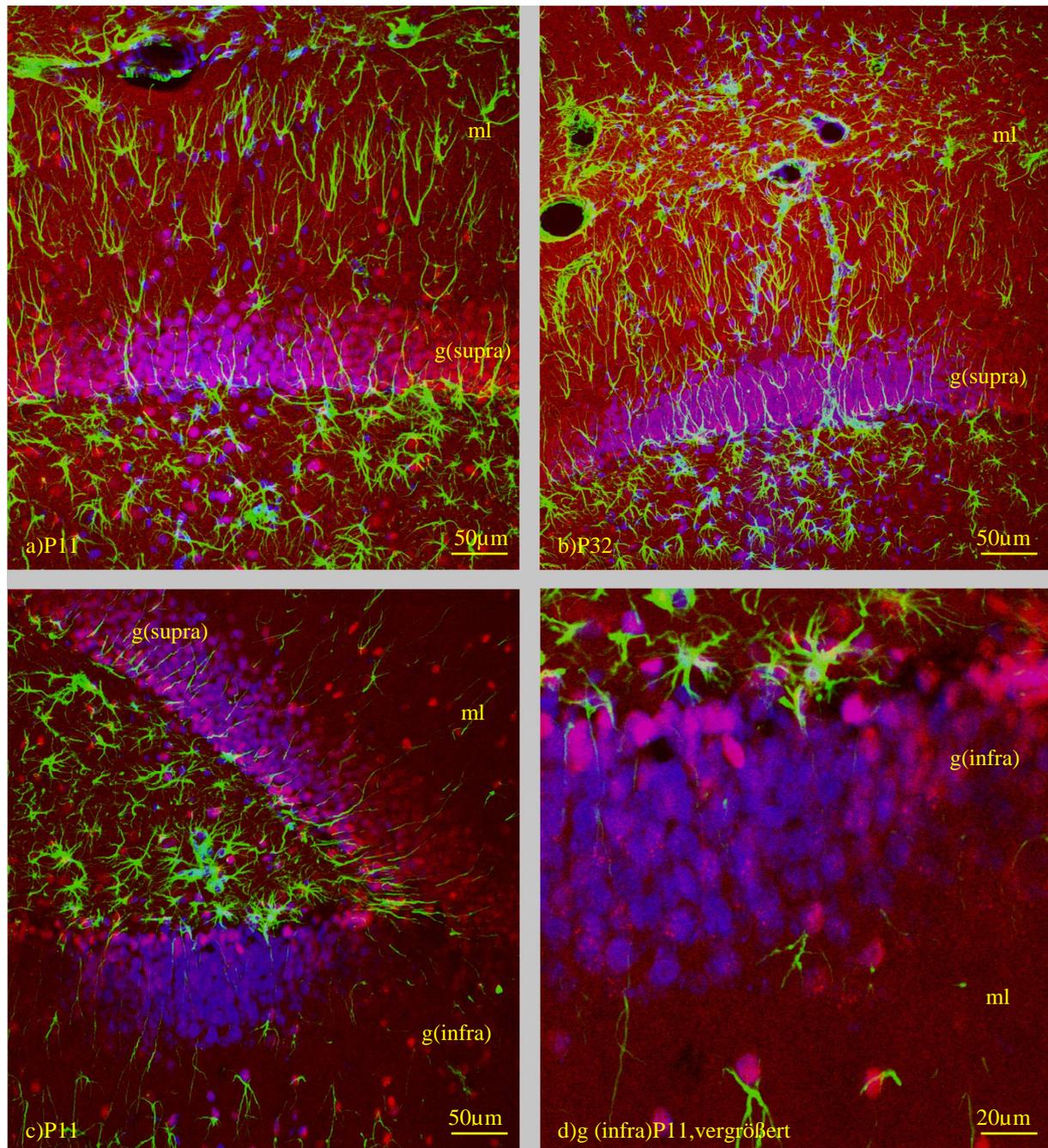


Abbildung 26 a-d: Körnerzellband des Gyrus dentatus (P11 und P32)

Gefrierschnitte nach Immunfärbung gegen GFAP (Astrozytenmarker, grün), p-Cofilin (rot) und Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Erkennbar ist, dass im infrapyramidalen Körnerzellband vor allem die Zellkörper junger Körnerzellen im Bereich des Hilus intensiv p-Cofilin-immungefärbt sind. Im Vergleich dazu erscheint die Immunfärbung des supra- und infrapyramidalen Band gleichförmiger (vgl. Abb. 25).

Abkürzungen:

g (infra) und g (supra): Gyrus dentatus, Pars infrapyramidale und Pars supra- und infrapyramidale

ml: Stratum moleculare

3.3.3 Körnerzellen *in vivo* mit p-Cofilin-immunpositivem apikalem Fortsatz

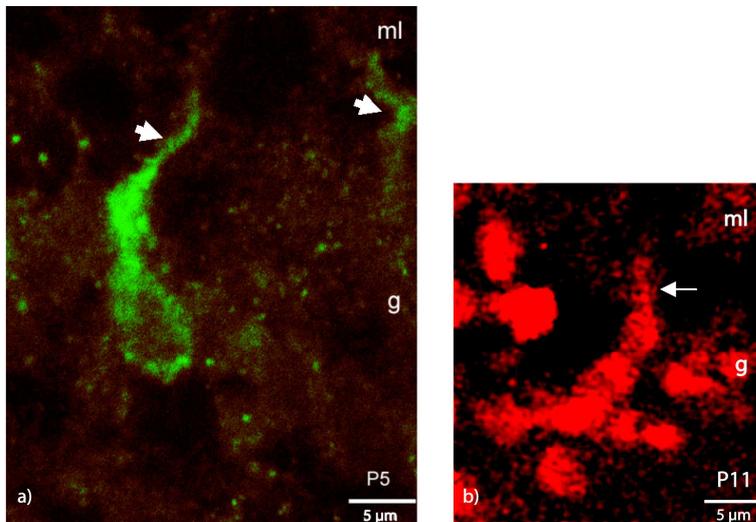


Abbildung 27a-b: Körnerzellen nach p-Cofilin-Immunfärbung mit p-Cofilin-immunpositivem apikalem Fortsatz

In Abbildung 27a (Entwicklungsstadium P5) wurde ein grün-fluoreszierender Sekundärantikörper, in Abbildung 27b (Entwicklungsstadium P11) ein rot-fluoreszierender Sekundärantikörper für p-Cofilin verwendet. Beide Körnerzellen haben einen p-Cofilin-immunpositiven apikalen Fortsatz, der in die Richtung des Reelin-reichen Stratum moleculare weist.

Abkürzungen:

g: *granule cell layer* (Körnerzellband)
 ml: Stratum moleculare mit Cajal-Retzius-Zellen
 weißer Pfeil: p-Cofilin-positiver Fortsatz

Bei genauerer Betrachtung mit dem konfokalen Mikroskop fanden sich im Stadium P5 und P11 auch Körnerzellen mit einem p-Cofilin-immunpositiven Fortsatz (vgl. Abb. 27), der in Richtung der Reelin-reichen Molekularschicht gerichtet war. Dabei könnte es sich um die *leading processes* radial migrierender Körnerzellen handeln.

4 Diskussion

4.1 Zur verwendeten Zellkulturmethode

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche Wirkung das extrazelluläre Matrixprotein Reelin auf die Phosphorylierung von n-Cofilin in hippocampalen Neuronen zeigt. Für die Beantwortung dieser Frage entschieden wir uns für eine Versuchsreihe mit hippocampalen Dispersionskulturen.

Im Gegensatz zu *in vivo*-Studien ist es bei Experimenten an Dispersionskulturen möglich, äußere Einflussfaktoren auf die Fortsatzdifferenzierung hippocampaler Neurone zu kontrollieren. Die Zellen konnten *in vitro* direkt mit rekombinantem Reelin behandelt und das Resultat anschließend entweder mittels Immunzytochemie an fixierten Dispersionskulturen oder mittels Lebendmikroskopie untersucht werden.

Dabei wurde der Reelin-Effekt auf das p-Cofilin-Verteilungsmuster von dissoziierten, an Postnataltag 5 präparierten, hippocampalen Neuronen untersucht. Dispersionskulturen dieses Stadiums enthalten zahlreiche Reelin-responsive Neurone (Körnerzellen und Pyramidenzellen), die unter dem Einfluss von Reelin in den ersten Tagen nach der Geburt zu ihrer endgültigen Position migrieren. Gemäß Studien von Banker und Cowan überleben in einer Dispersionskultur bevorzugt Neurone mit abgeschlossener DNA-Synthesephase (Banker and Cowan, 1977), die sich gerade in der Migrationsphase und somit überwiegend im axodendritischen Polarisierungsstadium befinden.

Zudem war es wichtig für unsere Fragestellung, dass die Zellkulturmethode selektiv neuronales Wachstum förderte, um den direkten Reelin-Effekt auf neuronale Zellen zu untersuchen. Da die Migrationsstörungen im Gyrus dentatus der Reeler-Maus ebenfalls auf einer gestörten Ausbildung des radialen Gliazellgerüsts basieren (Förster et al., 2002, Weiss et al., 2003), stellte sich die Frage, ob die Defizite in der Ausrichtung der neuronalen Polaritätsachse eine sekundäre Folge der fehlenden Reelin-Wirkung auf Gliazellen darstellen oder primär durch den fehlenden Reelin-Einfluss auf Neurone bedingt sind.

Die hier verwendete Zellkulturmethode basiert auf den modifizierten (Prange-Kiel et al., 2003) Protokollen von Brewer (Brewer, 1997). Der Anteil an Neuronen an einer hippocampalen Dispersionskultur beträgt ca. 80%, wohingegen 12% Astrozyten darstellen und der Rest aus Oligodendrozyten und Mikroglia besteht (von Schassen et al., 2006). Somit ist die Methode dazu geeignet, Effekte an hippocampalen Neuronen näherungsweise unabhängig von Gliazellen zu untersuchen.

Des Weiteren ist zu beachten, dass sich ein Reelin-Effekt auch in den mit Kontrollmedium behandelten Kulturen und den unbehandelten Kulturen nicht ausschließen lässt. Da es sich um Dispersionskulturen von Hippocampi aus Wildtyp-Ratten handelt, befinden sich auch Reelin produzierende Cajal-Retzius-Zellen und GABAerge Interneurone unter den dissoziierten Neuronen. Dies bedeutet, dass bei den mit Kontrollmedium stimulierten Kulturen und den unbehandelten Kulturen eine endogene Reelin-Sekretion berücksichtigt werden muss.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 Der Einfluss von Reelin auf die p-Cofilin-Immunfärbung von 7 Tagen alten Dispersionskulturen

Zunächst sollte die p-Cofilin-Immunreaktivität verschiedener Entwicklungsstadien (P5 und E18) nach 24 Stunden oder 7 Tagen *in vitro* untersucht werden. Zudem war von Interesse, ob eine Behandlung mit Reelin einen Effekt auf das entwicklungsstadienspezifische Färbemuster zeigte.

Längere Inkubationszeiten (7 Tage oder länger) führten zur Ausbildung eines Zellverbandes mit einem dichten Fortsatznetzwerk. Charakteristisch für die Immunfärbung dieses Entwicklungsstadiums waren segmentartige, unregelmäßige und punktförmige p-Cofilin-immunpositive Areale, die gleichermaßen in Axon wie Dendriten auftraten und sowohl bei den Reelin stimulierten Kulturen als auch den Kontrollen vorkamen.

Bei Experimenten an embryonalen, hippocampalen Zellkulturen wurde gezeigt, dass Reelin Dab1-vermittelt zu verstärktem Dendritenwachstum führt (Niu et al., 2004). Zudem hat Reelin eine fördernde Wirkung auf die Ausbildung axonaler Verzweigungen, was sowohl Studien an entorhinalen Afferenzen, (Del Rio et al., 1997) die im Stratum moleculare-lacunosum des Hippocampus proper terminieren, als auch Studien an axonalen Wachstumskolben bewiesen (Borrell et al., 2007).

Die punktförmigen Fortsatzareale der 7 Tage alten Neurone stellen vermutlich Vorstufen von Zellkontakten dar. Es ist bekannt dass Reelin fördernd auf die Spine-Ausbildung wirkt, wie kürzlich veröffentlichte Studien *in vivo* (Rogers et al., 2011) und *in vitro* durch „rescue“-Experimente mit Reelin-Inkubation von Reeler-Dispersionskulturen zeigten (Niu et al., 2008). Spines sind kopf- oder pilzförmige Ausstülpungen an der Oberfläche von neuronalen Dendriten und bilden die postsynaptische Struktur von exzitatorischen Synapsen.

Da die Wirkung von Reelin auf die Ausbildung von p-Cofilin-immunpositiven Zellkontakten nicht das Thema der vorliegenden Untersuchung war und sich außerdem in den Vorexperimenten zwischen Reelin behandelten und Kontrollmedium behandelten Kulturen

kein unmittelbar erkennbarer Unterschied bezüglich der Ausbildung von p-Cofilin-immunpositiven Zellkontakten zeigte, wurde dieser Zusammenhang hier nicht weiter verfolgt.

4.2.2 Der Einfluss von Reelin auf die n-Cofilin-Phosphorylierung bipolarer Neurone

Bei 24 Stunden alten Dispersionskulturen fanden sich Neurone im bipolaren Stadium, deren Fortsätze und Soma teilweise p-Cofilin-immunpositiv waren. Der Anteil bipolarer Zellen nahm durchschnittlich ca. $\frac{1}{4}$ der Gesamtzellzahl einer Dispersionskultur ein. Bei genauerer Betrachtung der Kulturen stellte sich heraus, dass sowohl bipolare Zellen mit zwei Fortsätzen ähnlicher p-Cofilin-Immunreaktivität (Hauptkategorie I) als auch bipolare Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Immunreaktivität (Hauptkategorie II) auftraten. Bei bipolaren hippocampalen Neuronen, die sich nach Calderon de Anda *et al.* (2008) gerade in der axodendritischen Polarisierungsphase befanden, wären zwei Fortsätze unterschiedlicher p-Cofilin-Immunreaktivität zu erwarten. *In vivo* weisen bipolare migrierende Neurone zumindest im Neokortex nach Kontakt mit Reelin in der Marginalzone einen stark p-Cofilin-immunreaktiven Fortsatz, den sogenannten *leading process* auf (Chai *et al.*, 2009).

In vitro war in den vorliegenden Untersuchungen der Anteil bipolarer Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher Intensität mit 20,1% bezogen auf die Gesamtzellzahl deutlich höher als der Anteil mit zwei Fortsätzen gleicher Intensität.

Interessanterweise traten bipolare Neurone, die sich nach Calderon de Anda *et al.* (2008) im Stadium der axodendritischen Fortsatzspezifizierung befanden, auch in den Kontrollmedium stimulierten Kulturen und den unbehandelten Kulturen auf.

Daraus kann man folgern, dass intrinsische Mechanismen existieren, die unabhängig von Reelin den Polarisierungsprozess fördern.

Da der Anteil bipolarer Zellen mit zwei Fortsätzen ähnlicher p-Cofilin-Immunreaktivität nur 1,4% in Bezug auf die Gesamtzellzahl betrug, scheint eine Polarisierung der n-Cofilin-Phosphorylierung bei den meisten dissoziierten Neuronen innerhalb von 24 Stunden nach der Aussaat einzusetzen.

Gemäß der Literatur könnten die intrazelluläre Positionierung von gewissen Zellorganellen, wie z.B. das Zentrosom (Zmuda and Rivas, 1998, de Anda *et al.*, 2005, de Anda *et al.*, 2010), oder Faktoren, die Einfluss auf Veränderungen der Zytoskelett-Dynamik nehmen (Bradke and Dotti, 1999, Bradke and Dotti, 2000), eine wichtige Rolle dabei spielen.

Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass bei den verwendeten Wildtyp-Dispersionskulturen Reelin produzierende Zellen in den Kontrollen bzw. den unbehandelten

Kulturen vorhanden sind und möglicherweise für das Auftreten der polarisierten Neurone mitverantwortlich gemacht werden können.

Nun stellte sich die Frage, ob die Inkubation mit rekombinantem Reelin einen Einfluss auf den Anteil der Neurone mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Immunreaktivität in einer Dispersionskultur hatte. Die Zellzahlen der Neurone mit zwei Fortsätzen ähnlicher p-Cofilin-Immunreaktivität blieben sowohl bei Reelin behandelten Kulturen, den Kontrollmedium behandelten Kulturen und den unbehandelten Kulturen unverändert niedrig. Die Zellzahlen der polarisierten Neurone mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Immunreaktivität hingegen nahmen mit der Dauer der Reelin-Stimulation (3min, 5min, 15min, 30min) zu. Offenbar hatte rekombinantes Reelin einen fördernden Einfluss auf die polarisierte Verteilung der n-Cofilin-Phosphorylierung in bipolaren hippocampalen Neuronen. Dabei könnte Reelin eine bereits bestehende, intrinsische Polarisierung verstärken. Ein Beispiel für einen durch Reelin geförderten zellulären Mechanismus, der zur Polarisierung von Neuronen während der Differenzierung beiträgt, ist die transiente Verlagerung des Golgi-Apparates in die apikalen Dendriten (Matsuki et al., 2010).

Eine anderer Interpretationsmöglichkeit wäre die Induktion der bereits bekannten ApoER2- bzw. VLDLR-vermittelten p-Cofilin-Signalkaskade (Chai et al., 2009), die aufgrund der polarisierten Verteilung der Signalmoleküle bevorzugt in einem Fortsatz initiiert wird.

4.2.3 Der Einfluss von Reelin auf Neurone mit bereits polarisierter Verteilung der n-Cofilin-Phosphorylierung

Die Hauptkategorie II „Bipolare Zellen mit zwei Fortsätzen unterschiedlicher p-Cofilin-Intensität“ wurde entsprechend der p-Cofilin-Intensität des stärker angefärbten Fortsatzes in zwei Subgruppen untergliedert. Nun stellte sich die Frage, ob sich unter Reelin-Einfluss der Prozentsatz der beiden Subgruppen „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa; Pixelintensität: 66-130) und „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb; Pixelintensität: 10-23) verändern würde.

Dabei wurde demonstriert, dass sich die Reelin behandelten Kulturen und Kontrollmedium behandelten Kulturen bezüglich des Anteils bipolarer Neurone mit einem stark p-Cofilin-positiven Fortsatz (IIa) signifikant ($p=0,002$) unterschieden.

Zudem stellte sich heraus, dass die Reelin-Stimulation im Vergleich zur Stimulation mit Kontrollmedium eine statistisch signifikante ($p=0,03$) gegenläufige Wirkung hatte. Bei den Reelin behandelten Dispersionskulturen lag die Anzahl der Neurone mit einem stark angefärbten Fortsatz für alle vier Inkubationszeiträume über der Anzahl der Neurone mit

einem schwach angefärbten Fortsatz, während es sich bei den Kontrollen genau umgekehrt verhielt.

Anscheinend führte die Behandlung mit Reelin bzw. Kontrollmedium zu einem „Shift“ innerhalb der Subgruppen, was darauf hinweist, dass der Anteil der Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz unter Reelin-Inkubation im selben Maße zunimmt wie der Anteil der Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz unter Kontrollmedium-Inkubation abnimmt.

Zum einen resultiert daraus, dass ein Reelin-Effekt auf den Zellpol bipolarer, bereits polarisierter hippocampaler Neurone innerhalb der Dispersionskultur existiert.

Die Reelin-abhängige Zunahme von Neuronen mit einem stark angefärbten Fortsatz erfolgt somit aus der Subgruppe der Neurone mit einem schwach angefärbten Fortsatz. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob der Anteil anderer Subgruppen der Dispersionskultur, beispielsweise unipolare oder multipolare Neurone, durch Reelin-Stimulation beeinflusst wird.

Zum anderen wird die bereits oben erwähnte Hypothese gestützt, dass dem Einsetzen des Reelin-Effekts intrinsische Mechanismen vorangehen, die zu einer polarisierten Verteilung der n-Cofilin-Phosphorylierung führen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Inkubationsdauer mit Reelin (3min, 5min, 10min, 30min) einen Effekt auf den Anteil von Neuronen mit einem stark bzw. schwach angefärbten Fortsatz zeigte.

Tatsächlich nahm die Zellzahl der Subgruppe „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (IIa) signifikant mit der Reelin-Inkubationsdauer zu, während die Zellzahl der Subgruppe „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ (IIb) signifikant mit der Kontrollmedium-Inkubationszeit zunahm.

Das Maximum an „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ (Subgruppe IIa) fand sich bei einer Reelin-Inkubationszeit von 30min. Offenbar waren kürzere Inkubationszeiträume nicht ausreichend, um die Reelin-Wirkung auf die Phosphorylierung von n-Cofilin vollständig zu induzieren.

Bisher wurde noch nicht untersucht, ob eine Verlängerung der Inkubationszeit, beispielsweise auf 45min oder 60min, zu einer weiteren Zunahme des prozentualen Anteils dieser Subgruppe führen würde. Vorexperimente an 24 Stunden alten Neuronen mit längeren Inkubationszeiten *in vitro* (1d-2d) hatten jedoch keinen Unterschied zwischen Reelin behandelten Dispersionskulturen und Kontrollen gezeigt.

Ebenso könnte die Inkubationszeit der Dispersionskulturen zwischen Aussaat und Beginn der Reelin-Stimulation (24h) zu lang gewählt worden sein, da zahlreiche Zellen zu diesem

Zeitpunkt bereits das multipolare Stadium erreicht hatten. Eventuell könnte der Anteil von Neuronen mit einem stark angefärbten Fortsatz nach 6-12 Stunden *in vitro* noch höher liegen als nach 24 Stunden und durch Reelin-Stimulation weiterhin vergrößert werden.

4.3 Hypothese zur Reelin-Wirkung auf die axodendritische Fortsatzspezifizierung bipolarer Neurone

4.3.1 Die stabilisierende Wirkung von Reelin auf das Zytoskelett bipolarer Neurone: 2 Hypothesen

Während der Kortikogenese wandern die Neurone entlang der Fortsätze radialer Gliazellen oder mittels Somatranslokation in Richtung der Reelin-reichen Marginalzone (Nadarajah and Parnavelas, 2002).

Bereits während der Migration durchlaufen die Neurone das bipolare Stadium, in dem die Festlegung der axodendritischen Polaritätsachse erfolgt (Calderon de Anda et al., 2008).

Im Kortex der Reeler-Mutante kommt es zu charakteristischen Defiziten der Fortsatzspezifizierung und kortikalen Schichtenbildung, was die Rolle des extrazellulären Matrixproteins Reelin bei diesen Prozessen verdeutlicht (Förster et al., 2006a, Förster et al., 2006b).

Bei der Differenzierung des *trailing process* und des *leading process* zu Axon und Dendrit sind dynamische Veränderungen des Zytoskeletts durch Aktin bindende Proteine wie n-Cofilin von Bedeutung.

Chai *et al.* zeigten, dass der piawwärts gerichtete *leading process* durch Reelin über eine Phosphorylierung von n-Cofilin stabilisiert wird (Chai et al., 2009).

Umgekehrt könnte es zu einer Destabilisierung des *trailing process* kommen, wodurch dessen Differenzierung zum Axon gefördert wird (Bradke and Dotti, 1999).

In vivo stellt die Stabilisierung des *leading process* die Voraussetzung für eine wichtige radiale Migrationsform, die sogenannte Somatranslokation dar, bei der das Zellsoma über den *leading process* in Richtung Marginalzone gezogen wird (Gupta et al., 2002).

Die für die Phosphorylierung von n-Cofilin verantwortliche Reelin induzierte Signalkaskade scheint über den Lipoproteinrezeptor ApoER2 in Gang gesetzt zu werden, da in ApoER2-Knockout-Mäusen im Gegensatz zu VLDLR-Knockout-Mäusen verminderte p-Cofilin-Spiegel zu finden waren (Chai et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das extrazelluläre Matrixprotein Reelin zu einer Förderung und Beschleunigung der polarisierten n-Cofilin-Phosphorylierung in Fortsätzen dissoziierter Neurone *in vitro* führt.

Die Bindung von Reelin an ApoER2 induziert die Aktivierung des intrazellulären Adapterproteins Dab1. Dab1 wiederum aktiviert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), welche die Phosphorylierung des Enzyms LIM Kinase1 (LIMK1) induziert.

Dieses Enzym führt durch Phosphorylierung von n-Cofilin an Serinrest 3 zu dessen herabgesetzten Fähigkeit, F-Akin zu depolymerisieren, woraus die Stabilisierung eines Fortsatzes resultiert, ähnlich der Stabilisierung des *leading process* bei *in vivo*-Experimenten.

Im Gegensatz zu den vorausgehenden *in vivo*-Studien, bei denen die Wirkung des von Cajal-Retzius-Zellen in der Marginalzone sezernierten Reelins untersucht wurde, beschäftigten wir uns mit Dispersionskulturen, die mit gelöstem rekombinantem Reelin stimuliert wurden.

Die Reelin induzierte Phosphorylierung von n-Cofilin trat dennoch bevorzugt nur in einem Fortsatz der bipolaren Neurone auf, obwohl beide Fortsätze in gleicher Weise dem Stimulationsmedium ausgesetzt waren.

Diese Beobachtung führt zu zwei möglichen Hypothesen für den Reelin-Effekt auf hippocampale Neurone *in vitro*:

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Komponenten der Reelin-Signalkaskade durch intrinsische Mechanismen in einem Fortsatz der bipolaren Neurone akkumulieren (vgl. Abb. 28a).

Gemäß Chai *et al.* kommt es in dem piawärts gerichteten Fortsatz zur Aktivierung der Reelin-Signalkaskade mit anschließender Phosphorylierung von n-Cofilin, wobei sich dieser Fortsatz später zum apikalen Dendriten entwickelt. Dieser Fortsatz entspricht dem *leading process* migrierender Neurone *in vivo*, der beim Kontakt mit der Reelin-reichen Marginalzone stabilisiert wird (Chai *et al.*, 2009).

Die Differenzierung des gegenüberliegenden Fortsatzes zum Axon wurde bereits in einer früheren Differenzierungsphase des Neurons durch Prozesse gesteuert, die nicht zwangsläufig durch Reelin induziert werden müssen, beispielsweise durch Destabilisierung des Zytoskeletts (Bradke and Dotti, 1999).

Eine weitere Interpretationsmöglichkeit lieferten Leemhuis und Bock (vgl. Abb. 28b), die eine ebenfalls ApoER2-abhängige Reelin-Signalkaskade in multipolaren Zellen präsentierten, welche jedoch zu einer erhöhten Beweglichkeit von Wachstumskolben, Ausbildung von Filopodien und Fortsatzverzweigungen führte (Leemhuis *et al.*, 2010, Leemhuis and Bock, 2011).

Somit könnte Reelin ApoER2-vermittelt zwei gegenläufige Signalkaskaden in Gang setzen, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten stattfinden. In einem Fortsatz führt die Signalkaskade zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts nach Chai *et al.*, wodurch dieser

Fortsatz zum Dendriten spezifiziert wird (Chai et al., 2009), während im anderen Fortsatz gemäß Leemhuis und Bock das Axonwachstum induziert wird (Leemhuis et al., 2010).

Da die hippocampalen Neurone bei unseren *in vitro*-Versuchen mit beiden Fortsätzen in Kontakt zu rekombinanten Reelin kamen, erscheint diese Erklärung plausibel.

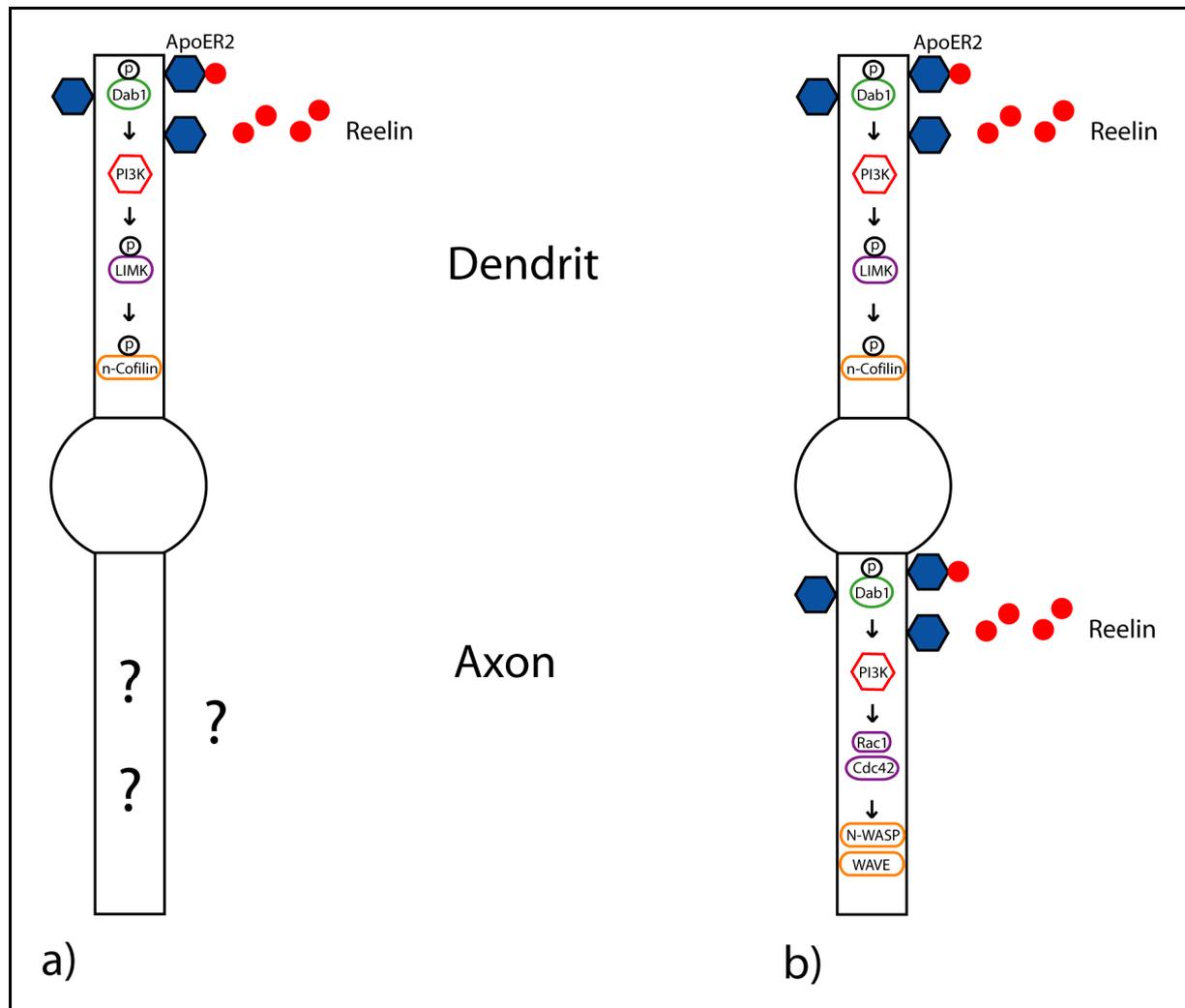


Abbildung 28: Interpretation der Reelin-Wirkung auf bipolare Neurone, Hypothese a) gemäß Chai *et al.* (2009), b) gemäß Leemhuis *et al.* (2010)

a) Im piawwärts gerichteten *leading process* führt die Bindung von Reelin (rot) an ApoER2 (blau) zur Aktivierung von Dab1, wodurch nach Aktivierung von PI3K und LIMK die Phosphorylierung von n-Cofilin an Serinrest 3 induziert wird. Die Differenzierung des *trailing process* zum Axon wird durch Prozesse gesteuert, die nicht zwangsläufig in Zusammenhang mit der Reelin-Signalkaskade stehen müssen.

b) Im Gegensatz zur ersten Hypothese wird die Differenzierung beider Fortsätze durch Reelin induziert. Im Vergleich zur Reelin-abhängigen Signalkaskade des *leading process*, die sich ähnlich wie in Abbildung 28a verhält, führt die Bindung von Reelin (rot) an ApoER2 (blau) im *trailing process* über die Aktivierung von PI3K sowie den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 zu einer erhöhten Fortsatzmobilität.

4.3.2 Crosstalk der Reelin-Signalkaskade: Fortsatzstabilisierung durch die Reelin-Notch-Interaktion

Der Signalweg über den „Notch“-Rezeptor ist in zahlreiche neuronale Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse involviert (Yoon and Gaiano, 2005, Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). Die Bindung der Liganden Delta und Jagged führt zur Translokation der intrazellulären Domäne (NICD) in den Zellkern, welche die Transkription vieler Gene reguliert.

Es wurde gezeigt, dass der Notch-Signalweg zu einer Wachstumsverzögerung von neuronalen Fortsätzen führen und damit zur Stabilisierung des Zytoskeletts beitragen kann.

Bei der Hochregulation von Notch wurde der Stillstand des Neuritenwachstums beobachtet, während die Inhibition der Notch-Signalkaskade das Fortsatzwachstum förderte (Sestan et al., 1999).

Zudem wurde gezeigt, dass eine Interaktion zwischen dem Notch-Signalweg und der Reelin-Signalkaskade existiert, die vermutlich auf dem hemmenden Einfluss von Dab1 auf den NICD-Abbau beruht (Hashimoto-Torii et al., 2008, Sibbe et al., 2009).

Zusammengefasst könnte der Notch-Signalweg eine mögliche Alternative zur Reelin-Signalkaskade mit p-Cofilin-abhängiger Fortsatzstabilisierung sein (Frotscher, 2010).

4.3.3 Zelladhäsionsmoleküle als Ziel der Reelin-Signalkaskade: Der Reelin-Effekt auf die Cadherin-Funktion

Cadherine gehören zur Gruppe der kalziumabhängigen, transmembranen Adhäsionsproteine, die während der Embryogenese für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten und der Signaltransduktion von Bedeutung sind. Neuronale Cadherine (NCad oder Cdh2) spielen bei der durch interzellulären Kontakte stimulierten Migration und Invasion eine wesentliche Rolle (Gumbiner, 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass Reelin über Dab1 bzw. dessen Effektor Rap1 (GTPase) die Funktion von NCad reguliert. Während der neuronalen Migration werden dadurch die *leading processes* bei der gliazellunabhängigen Somatranslokation stabilisiert (Franco et al., 2011).

Ein ähnlicher Wirkmechanismus konnte kürzlich für multipolare Neurone nachgewiesen werden, die kurz vor dem Übergang ins bipolare Stadium standen. Jossin und Cooper zeigten, dass Reelin über die Aktivierung von Rap1 zur Hochregulation von NCad führte, welches eine wichtige Rolle bei der Ausrichtung der Migration in Richtung Marginalzone spielt. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass neuronale Cadherine die Zellen befähigten, Signale aus ihrer Umgebung wahrzunehmen, und ihre Migration in Richtung der intermediären Zone fortzusetzen (Jossin and Cooper, 2011).

Gemäß diesen Untersuchungen scheint Reelin die Fähigkeit zu besitzen, migrierende Neurone für die Wirkung von anderen extrazellulären Signalmolekülen kompetent zu machen, die eine Fortsatzstabilisierung auf noch unbekannte Weise herbeiführen könnten.

4.4 Ausblick

Seit der Entdeckung der Reeler-Maus vor ca. 60 Jahren wurden zahlreiche Funktionen für das extrazelluläre Matrixprotein Reelin während der Gehirnentwicklung nachgewiesen. Trotz intensiver Forschungsbemühungen bleibt der Wirkmechanismus von Reelin auf die neuronale Migration im Detail noch unverstanden. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre verdeutlichen jedoch, dass zum Verständnis der Reelin-Wirkung eine sehr differenzierte Sichtweise nötig ist, da Reelin im Zeitverlauf der Entwicklung unterschiedliche Funktionen hat, auf unterschiedlichen Zelltypen in mehreren Bereichen des zentralen Nervensystems wirkt und über unterschiedliche Signalkaskaden zu teilweise gegensätzlichen Wirkungen führen kann.

Für die neuronale Migration wurden mehrere Hypothesen für die Reelin-Wirkung aufgestellt, beispielsweise als Stoppsignal (Pearlman and Sheppard, 1996, Frotscher, 1998), Locksignal (Förster et al., 2006a, Förster et al., 2006b), permissives Signal (Magdaleno et al., 2002, Jossin et al., 2004) oder Ablösesignal von radialen Gliazellen (Hack et al., 2002, Cooper, 2008).

Im Gyrus dentatus scheint Reelin zunächst einen attraktiven Effekt auf die Migration der Körnerzellen zu haben und dann als Stoppsignal zu wirken: Die Körnerzellen, welche normalerweise das dicht gepackte Stratum granulosum bilden, sind in der Reeler-Mutante diffus im Bereich des Hilus verteilt. Zudem zeigten Experimente an Slice-Kulturen, dass die Kokultivierung von Reeler- und Wildtyp-Slices die Migration der Körnerzellen in Richtung der Reelin-reichen Marginalzone initiierte, wo sie das dicht gepackte Körnerzellband bildeten und nicht über die Marginalzone hinaus wanderten (Zhao et al., 2004, Zhao et al., 2006).

Zur neuronalen Migration der Körnerzellen des Gyrus dentatus liegen im Vergleich zur Migration des Neokortex bisher nur wenige *in vivo*-Studien vor. Es ist noch nicht erwiesen, ob eine Abnahme der Reelin-Expression tatsächlich zu einer herabgesetzten Fortsatzbeweglichkeit und Verzögerung der neuronalen Migration führt. Eine Möglichkeit wäre, die Methode der Real-Time Mikroskopie zu verwenden, um diese Prozesse während der neuronalen Migration anhand von GFP-markierten Neuronen in Reeler- bzw. Wildtyp-Ratten zu untersuchen.

Um die Rolle der Reelin-bedingten p-Cofilin-abhängigen Signalkaskade weiter zu untersuchen, könnten Reeler-Slice-Kulturen mit Wildtyp-Slice-Kulturen verglichen werden.

Oder es könnte ein „rescue“-Experiment durchgeführt werden, bei dem Reeler-Slice-Kulturen Reelin aus Wildtyp-Slice-Kulturen angeboten wird und diese nach Fixierung mit einem Antikörper gegen p-Cofilin gefärbt werden.

Analog zu unseren *in vitro*-Experimenten mit Wildtyp-Dispensionskulturen könnten Reeler-Dispensionskulturen mit rekombinantem Reelin stimuliert werden.

Dies hätte den Vorteil, dass eine mögliche Verfälschung der Versuchsergebnisse durch endogene Reelin-Produktion in den Wildtyp-Kulturen vermieden werden kann. Der Reelin-Effekt auf die Fortsatzstabilisierung könnten dann ebenfalls mittels Lebendmikroskopie oder Immunzytochemie untersucht werden.

Um den genauen Ablauf der Reelin-Signalkaskade im Kontext der embryonalen Entwicklung und im adulten Gehirn zu verstehen, wären Studien zur zeitlichen und örtlichen Expression der beiden Reelin-Rezeptoren, ApoER2 und VLDLR, von Bedeutung.

Dabei wäre interessant, ob ApoER2, über den die Reelin-abhängige n-Cofilin-Phosphorylierung induziert wird, in nur einem Fortsatz (Dendrit) oder in beiden Fortsätzen (Axon und Dendrit) lokalisiert ist.

Im Gegensatz zu Experimenten, die sich mit der Rolle von Reelin während der Entwicklung beschäftigen, ist noch wenig bekannt zu seiner Funktion im adulten Gehirn.

Vermutlich fungiert Reelin auch im adulten Hippocampus als Stabilisator des Zytoskeletts und der Zytoarchitektur, wie Experimente zum Thema „Temporallappenepilepsie“, welche ebenfalls mit einer Körnerzelldispersion einhergehen kann, zeigten (Houser, 1990, Haas et al., 2002).

Mit Kainat-Injektionen und Reelin-neutralisierenden Antikörper konnte eine Abnahme der Reelin-Expression und eine Körnerzelldispersion in adulten Ratten induziert werden (Bouillere et al., 1999, Heinrich et al., 2006).

Dies legt die Vermutung nahe, dass Reelin auf ähnliche Weise wie während der neuronalen Migration über die Phosphorylierung von n-Cofilin zur Stabilisierung des apikalen Dendriten und dessen Verankerung in der Marginalzone führt.

Dabei wird die Existenz eines Reelin-Gradienten, der von der Marginalzone bis zur Molekularschicht abnimmt, angenommen, wodurch das Erscheinungsbild der charakteristischen, dicht gepackten Körnerzellschicht erhalten bleibt (Frotscher, 2010).

Um die genaue Wirkung von Reelin auf die Fortsatzstabilisierung im adulten Gehirn zu untersuchen, werden jedoch weitere Studien benötigt, die den direkten Zusammenhang zwischen einer verminderten Reelin-Expression und der Destabilisierung von neuronalen Fortsätzen demonstrieren.

Im Gegensatz zum kompletten Knockout des Reelin-Gens in der Reeler-Mutante könnte die Methode des Reelin-Gen-Silencing (siRNA, *conditional Reelin knockout*) dazu verwendet werden, Versuchstiere mit normaler Gehirnentwicklung in Anwesenheit von Reelin heranzuzüchten, deren Reelin-Gen im Adultstadium konditional ausgeschaltet wird.

Dadurch ließe sich differenzieren, ob die pathologischen Veränderungen des Reelin-Defizits durch eine fehlgeleitete Entwicklung oder den fehlenden Reelin-Einfluss auf das adulte Gehirn bedingt sind.

Zudem könnten die Tiere für Versuche, die sich mit Verhalten oder Lernprozessen beschäftigen, verwendet werden, die bisher aufgrund der Ataxie der Reeler-Mutante nicht möglich waren.

5 Zusammenfassung

Das extrazelluläre Matrixprotein Reelin, das während der Entwicklung von Cajal-Retzius-Zellen in der Marginalzone sezerniert wird, ist bei der neuronalen Migration und Schichtenbildung des Kortex von entscheidender Bedeutung. Im Hippocampus der sogenannten Reeler-Maus, einer Reelin-defizienten Mausmutante, kommt es zu Störungen der Migration und der Festlegung der axodendritischen Polaritätsachse.

Mittlerweile ist bekannt, dass Reelin auch bei der Ausbildung des radialen Gliafasernetzes, der Synapsen- und Spinebildung, der Langzeitpotenzierung und der synaptischen Plastizität sowie bei der Entstehung neuropsychiatrischer Krankheitsbilder eine wichtige Rolle spielt.

Während der Embryogenese erfolgt die neuronale Migration im Kortex entlang von radialen Gliafasern oder mittels Somatranslokation in Richtung der Reelin-reichen Marginalzone.

Während der Migration wird das bipolare Stadium, in dem die axodendritische Polaritätsachse festgelegt wird, durchlaufen.

Bei der Differenzierung von Axon und Dendrit sind dynamische Veränderungen des Zytoskeletts durch Aktin bindende Proteine wie n-Cofilin von Bedeutung. Im Kortex konnte gezeigt werden, dass der piwärts gerichtete *leading process* bei Erreichen der Reelin-haltigen Marginalzone durch Phosphorylierung von n-Cofilin stabilisiert wird.

Der *leading process* wird zum Dendriten spezifiziert, während der ventrikelwärts gerichtete *trailing process* zum Axon differenziert wird.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden hippocampale Wildtyp-Dispersionskulturen von Ratten, die an Postnataltag 5 präpariert wurden (P5), nach 24 Stunden *in vitro* unterschiedlich lange (3min, 5min, 15min, 30min) mit rekombinantem Reelin oder Kontrollmedium stimuliert.

Der Reelin-Effekt auf die Fortsatzmobilität wurde mittels Live Imaging oder anschließender p-Cofilin-Immunzytochemie untersucht. Zudem wurden p-Cofilin-Immunfärbungen von Gehirnschnitten verschiedener Altersstufen angefertigt, um die Experimente durch *in vivo*-Studien zu ergänzen.

Anhand von Intensitätsmessungen der Immunfluoreszenz von Fortsätzen der bipolaren Neurone, die mit einem Antikörper gegen p-Cofilin und einem fluoreszenzgefärbten Zweitantikörper gefärbt wurden, konnte abgeschätzt werden, inwieweit die p-Cofilin-Phosphorylierung in den Zellen durch die Behandlung mit rekombinantem Reelin beeinflusst wurde.

Mithilfe einer vorher festgesetzten Intensitätsskala wurde eine Unterscheidung zwischen „Zellen mit einem stark angefärbten Fortsatz“ und „Zellen mit einem schwach angefärbten Fortsatz“ getroffen und der jeweilige Anteil dieser Zellen an einer Dispersionskultur ermittelt. Die Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass der Vorgang der p-Cofilin-Phosphorylierung in den Fortsätzen polarisierter Neurone zum einen intrinsisch gesteuert wird, jedoch innerhalb von Minuten durch das extrazelluläre Matrixprotein Reelin beschleunigt werden kann. Die bereits vorher durch intrinsische Mechanismen festgelegte, polarisierte Verteilung der n-Cofilin-Phosphorylierung wird dabei beibehalten.

6 Literaturverzeichnis

- ALCANTARA, S., RUIZ, M., D'ARCANGELO, G., EZAN, F., DE LECEA, L., CURRAN, T., SOTELO, C. & SORIANO, E. 1998. Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci*, 18, 7779-99.
- ALTMAN, J. & BAYER, S. A. 1990a. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*, 301, 365-81.
- ALTMAN, J. & BAYER, S. A. 1990b. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol*, 301, 325-42.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124, 319-35.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*, 126, 337-89.
- AMARAL, D. G., SCHARFMAN, H. E., LAVENEX, P. 2007. The dentate gyrus: Fundamental neuroanatomical organization. *Progress in Brain Research*, 163, 3-22
- ANDERSEN, O. M., BENHAYON, D., CURRAN, T. & WILLNOW, T. E. 2003. Differential binding of ligands to the apolipoprotein E receptor 2. *Biochemistry*, 42, 9355-64.
- ANDERSON, S. A., EISENSTAT, D. D., SHI, L. & RUBENSTEIN, J. L. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science*, 278, 474-6.
- ANDERSON, S. A., MARIN, O., HORN, C., JENNINGS, K. & RUBENSTEIN, J. L. 2001. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*, 128, 353-63.
- ARBER, S., BARBAYANNIS, F. A., HANSER, H., SCHNEIDER, C., STANYON, C. A., BERNARD, O. & CARONI, P. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, 393, 805-9.
- ARIMURA, N. & KAIBUCHI, K. 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 194-205.
- ARNAUD, L., BALLIF, B. A., FÖRSTER, E. & COOPER, J. A. 2003. Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr Biol*, 13, 9-17.
- ASADA, N., SANADA, K. & FUKADA, Y. 2007. LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. *J Neurosci*, 27, 11769-75.
- BAMBURG, J. R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 185-230.
- BANKER, G. A. & COWAN, W. M. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 126, 397-42.
- BARNES, A. P., LILLEY, B. N., PAN, Y. A., PLUMMER, L. J., POWELL, A. W., RAINES, A. N., SANES, J. R. & POLLEUX, F. 2007. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell*, 129, 549-63.
- BARNES, A. P. & POLLEUX, F. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci*, 32, 347-81.

- BAYER, S. A., ALTMAN, J., RUSSO, R. J., DAI, X. F. & SIMMONS, J. A. 1991. Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol*, 307, 499-516.
- BEFFERT, U., WEEBER, E. J., DURUDAS, A., QIU, S., MASIULIS, I., SWEATT, J. D., LI, W. P., ADELMANN, G., FROTSCHER, M., HAMMER, R. E. & HERZ, J. 2005. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor ApoER2. *Neuron*, 47, 567-79.
- BENDER, R. A., KIRSCHSTEIN, T., KRETZ, O., BREWSTER, A. L., RICHICHI, C., RÜSCHENSCHMIDT, C., SHIGEMOTO, R., BECK, H., FROTSCHER, M., BARAM, T. Z. 2007. Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: Novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *J Neurosci*, 27, 4697-4706
- BENDER, R. A., ZHOU, L., WILKARS, W., FESTER, L., LANOWSKI, J. S., PAYSAN, D., KONIG, A. & RONE, G. M. 2010. Roles of 17 β -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex*, 20, 2985-95.
- BENHAYON, D., MAGDALENO, S. & CURRAN, T. 2003. Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Brain Res Mol Brain Res*, 112, 33-45.
- BERTHOIS, Y., KATZENELLENBOGEN, J. A. & KATZENELLENBOGEN, B. S. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 2496-500.
- BLACKSTAD, T. W. 1958. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata; an experimental study in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 35, 202-14.
- BOCK, H. H. & HERZ, J. 2003. Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol*, 13, 18-26.
- BOCK, H. H., JOSSIN, Y., LIU, P., FÖRSTER, E., MAY, P., GOFFINET, A. M. & HERZ, J. 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to Reelin signaling and is required for normal cortical lamination. *J Biol Chem*, 278, 38772-9.
- BORRELL, V., PUJADAS, L., SIMO, S., DURA, D., SOLE, M., COOPER, J. A., DEL RIO, J. A. & SORIANO, E. 2007. Reelin and mDab1 regulate the development of hippocampal connections. *Mol Cell Neurosci*, 36, 158-73.
- BOTELLA-LOPEZ, A., BURGAYA, F., GAVIN, R., GARCIA-AYLLON, M. S., GOMEZ-TORTOSA, E., PENA-CASANOVA, J., URENA, J. M., DEL RIO, J. A., BLESÁ, R., SORIANO, E. & SAEZ-VALERO, J. 2006. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 5573-8.
- BOUILLERET, V., RIDOUX, V., DEPAULIS, A., MARESCAUX, C., NEHLIG, A. & LEGAL LA SALLE, G. 1999. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 89, 717-29.
- BRADKE, F. & DOTTI, C. G. 1999. The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283, 1931-4.
- BRADKE, F. & DOTTI, C. G. 2000. Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 574-81.
- BREWER, G. J. 1997. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods*, 71, 143-55.
- BROCA, P. 1878. Anatomie comparee des circonvolutions cerebrales. Le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la serie des Mammiferes. *Rev. Anthropol*(1), 385-498.
- BRODMANN, K. 1909. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. *Leipzig: J.A.Barth*.

- CAJAL, S. R. Y. 1891. Sur la structure de l'écorce cerebrale de quelques mammiferes. *Cellule*, 7, 123-176.
- CAJAL, S. R. Y. 1893. Estructura del asta de Ammon. *Ann Soc Esp Hist Nat Madr*, 22, 53-114.
- CALDERON DE ANDA, F., GARTNER, A., TSAI, L. H. & DOTTI, C. G. 2008. Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J Cell Sci*, 121, 178-85.
- CHAI, X., FÖRSTER, E., ZHAO, S., BOCK, H. H. & FROTSCHER, M. 2009. Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J Neurosci*, 29, 288-99.
- COOPER, J. A. 2008. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci*, 31, 113-9.
- CRAIG, A. M. & BANKER, G. 1994. Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci*, 17, 267-310.
- D'ARCANGELO, G. 2006. Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav*, 8, 81-90.
- D'ARCANGELO, G., HOMAYOUNI, R., KESHVARA, L., RICE, D. S., SHELDON, M. & CURRAN, T. 1999. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*, 24, 471-9.
- D'ARCANGELO, G., MIAO, G. G., CHEN, S. C., SOARES, H. D., MORGAN, J. I. & CURRAN, T. 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374, 719-23.
- D'ARCANGELO, G., NAKAJIMA, K., MIYATA, T., OGAWA, M., MIKOSHIBA, K. & CURRAN, T. 1997. Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci*, 17, 23-31.
- DE ANDA, F. C., MELETIS, K., GE, X., REI, D. & TSAI, L. H. 2010. Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex. *J Neurosci*, 30, 10391-406.
- DE ANDA, F. C., POLLAROLO, G., DA SILVA, J. S., CAMOLETTO, P. G., FEIGUIN, F. & DOTTI, C. G. 2005. Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*, 436, 704-8.
- DE ANDA, F. C. & TSAI, L. H. 2011. Axon selection: From a polarized cytoplasm to a migrating neuron. *Commun Integr Biol*, 4, 304-7.
- DEL RIO, J. A., HEIMRICH, B., BORRELL, V., FÖRSTER, E., DRAKEW, A., ALCANTARA, S., NAKAJIMA, K., MIYATA, T., OGAWA, M., MIKOSHIBA, K., DERER, P., FROTSCHER, M. & SORIANO, E. 1997. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, 385, 70-4.
- DELLER, T., DRAKEW, A., HEIMRICH, B., FÖRSTER, E., TIELSCH, A. & FROTSCHER, M. 1999. The hippocampus of the reeler mutant mouse: fiber segregation in area CA1 depends on the position of the postsynaptic target cells. *Exp Neurol*, 156, 254-67.
- DOTTI, C. G., SULLIVAN, C. A. & BANKER, G. A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8, 1454-68.
- DRAKEW, A., DELLER, T., HEIMRICH, B., GEBHARDT, C., DEL TURCO, D., TIELSCH, A., FÖRSTER, E., HERZ, J. & FROTSCHER, M. 2002. Dentate granule cells in reeler mutants and VLDLR and ApoER2 knockout mice. *Exp Neurol*, 176, 12-24.
- DRAKEW, A., FROTSCHER, M., DELLER, T., OGAWA, M. & HEIMRICH, B. 1998. Developmental distribution of a reeler gene-related antigen in the rat hippocampal formation visualized by CR-50 immunocytochemistry. *Neuroscience*, 82, 1079-86.
- DUIT, S., MAYER, H., BLAKE, S. M., SCHNEIDER, W. J. & NIMPF, J. 2010. Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in Reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. *J Biol Chem*, 285, 4896-908.

- DULABON, L., OLSON, E. C., TAGLIENTI, M. G., EISENHUTH, S., MCGRATH, B., WALSH, C. A., KREIDBERG, J. A. & ANTON, E. S. 2000. Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, 27, 33-44.
- DURAKOGLUGIL, M. S., CHEN, Y., WHITE, C. L., KAVALALI, E. T. & HERZ, J. 2009. Reelin signaling antagonizes beta-amyloid at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15938-43.
- ERIKSSON, P. S., PERFILIEVA, E., BJORK-ERIKSSON, T., ALBORN, A. M., NORDBORG, C., PETERSON, D. A. & GAGE, F. H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4, 1313-7.
- FALCONER, D. S. 1951. Two new mutants, 'trembler' and 'reeler,' with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Genet*, 50, 192-201.
- FATEMI, S. H. 2002. The role of Reelin in pathology of autism. *Mol Psychiatry*, 7, 919-20.
- FATEMI, S. H., EARLE, J. A. & MCMENOMY, T. 2000. Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol Psychiatry*, 5, 654-63, 571.
- FÖRSTER, E., BOCK, H. H., HERZ, J., CHAI, X., FROTSCHER, M. & ZHAO, S. 2010. Emerging topics in Reelin function. *Eur J Neurosci*, 31, 1511-8.
- FÖRSTER, E., JOSSIN, Y., ZHAO, S., CHAI, X., FROTSCHER, M. & GOFFINET, A. M. 2006a. Recent progress in understanding the role of Reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 23, 901-9.
- FÖRSTER, E., TIELSCH, A., SAUM, B., WEISS, K. H., JOHANSEN, C., GRAUS-PORTA, D., MULLER, U. & FROTSCHER, M. 2002. Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13178-83.
- FÖRSTER, E., ZHAO, S. & FROTSCHER, M. 2006b. Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci*, 7, 259-67.
- FRANCO, S. J., MARTINEZ-GARAY, I., GIL-SANZ, C., HARKINS-PERRY, S. R. & MULLER, U. 2011. Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron*, 69, 482-97.
- FREUND, T. F. & BUZSAKI, G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, 347-470.
- FROTSCHER, M. 1998. Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol*, 8, 570-5.
- FROTSCHER, M. 2010. Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends Neurosci*, 33, 407-14.
- FROTSCHER, M., HAAS, C. A. & FÖRSTER, E. 2003. Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb Cortex*, 13, 634-40.
- GAIANO, N. 2008. Strange bedfellows: Reelin and Notch signaling interact to regulate cell migration in the developing neocortex. *Neuron*, 60, 189-91.
- GAIANO, N., NYE, J. S. & FISHELL, G. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*, 26, 395-404.
- GARVALOV, B. K., FLYNN, K. C., NEUKIRCHEN, D., MEYN, L., TEUSCH, N., WU, X., BRAKEBUSCH, C., BAMBURG, J. R. & BRADKE, F. 2007. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci*, 27, 13117-29.
- GINIGER, E. 1998. A role for Abl in Notch signaling. *Neuron*, 20, 667-81.
- GUMBINER, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84, 345-57.
- GUPTA, A., TSAI, L. H. & WYNshaw-BORIS, A. 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet*, 3, 342-55.

- HAAS, C. A., DUDECK, O., KIRSCH, M., HUSZKA, C., KANN, G., POLLAK, S., ZENTNER, J. & FROTSCHER, M. 2002. Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 22, 5797-802.
- HACK, I., BANCILA, M., LOULIER, K., CARROLL, P. & CREMER, H. 2002. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci*, 5, 939-45.
- HACK, I., HELLWIG, S., JUNGHANS, D., BRUNNE, B., BOCK, H. H., ZHAO, S. & FROTSCHER, M. 2007. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development*, 134, 3883-91.
- HARTFUSS, E., FÖRSTER, E., BOCK, H. H., HACK, M. A., LEPRINCE, P., LUQUE, J. M., HERZ, J., FROTSCHER, M. & GOTZ, M. 2003. Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development*, 130, 4597-609.
- HASHIMOTO-TORII, K., TORII, M., SARKISIAN, M. R., BARTLEY, C. M., SHEN, J., RADTKE, F., GRIDLEY, T., SESTAN, N. & RAKIC, P. 2008. Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron*, 60, 273-84.
- HEINRICH, C., NITTA, N., FLUBACHER, A., MULLER, M., FAHRNER, A., KIRSCH, M., FREIMAN, T., SUZUKI, F., DEPAULIS, A., FROTSCHER, M. & HAAS, C. A. 2006. Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci*, 26, 4701-13.
- HIESBERGER, T., TROMMSDORFF, M., HOWELL, B. W., GOFFINET, A., MUMBY, M. C., COOPER, J. A. & HERZ, J. 1999. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, 24, 481-9.
- HIROTSUNE, S., TAKAHARA, T., SASAKI, N., HIROSE, K., YOSHIKI, A., OHASHI, T., KUSAKABE, M., MURAKAMI, Y., MURAMATSU, M., WATANABE, S. & ET AL. 1995. The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet*, 10, 77-83.
- HOE, H. S., LEE, K. J., CARNEY, R. S., LEE, J., MARKOVA, A., LEE, J. Y., HOWELL, B. W., HYMAN, B. T., PAK, D. T., BU, G. & REBECK, G. W. 2009. Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J Neurosci*, 29, 7459-73.
- HOE, H. S., TRAN, T. S., MATSUOKA, Y., HOWELL, B. W. & REBECK, G. W. 2006. DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. *J Biol Chem*, 281, 35176-85.
- HONDA, T., KOBAYASHI, K., MIKOSHIBA, K. & NAKAJIMA, K. 2011. Regulation of cortical neuron migration by the Reelin signaling pathway. *Neurochem Res*, 36, 1270-9.
- HONDA, T. & NAKAJIMA, K. 2006. Mouse Disabled1 (DAB1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *J Biol Chem*, 281, 38951-65.
- HORTON, A. C., RACZ, B., MONSON, E. E., LIN, A. L., WEINBERG, R. J. & EHLERS, M. D. 2005. Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron*, 48, 757-71.
- HOUSER, C. R. 1990. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res*, 535, 195-204.
- IMPAGNATIELLO, F., GUIDOTTI, A. R., PESOLD, C., DWIVEDI, Y., CARUNCHO, H., PISU, M. G., UZUNOV, D. P., SMALHEISER, N. R., DAVIS, J. M., PANDEY, G. N., PAPPAS, G. D., TUETING, P., SHARMA, R. P. & COSTA, E. 1998. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15718-23.

- JOSSIN, Y. & COOPER, J. A. 2011. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat Neurosci*, 14, 697-703.
- JOSSIN, Y., GUI, L. & GOFFINET, A. M. 2007. Processing of reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons. *Journal of Neuroscience*, 27, 4243-4252.
- JOSSIN, Y., IGNATOVA, N., HIESBERGER, T., HERZ, J., LAMBERT DE ROUVROIT, C. & GOFFINET, A. M. 2004. The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J Neurosci*, 24, 514-21.
- KEILANI, S. & SUGAYA, K. 2008. Reelin induces a radial glial phenotype in human neural progenitor cells by activation of Notch-1. *BMC Dev Biol*, 8, 69.
- KUO, G., ARNAUD, L., KRONSTAD-O'BRIEN, P. & COOPER, J. A. 2005. Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *J Neurosci*, 25, 8578-86.
- LANDRIEU, P. & GOFFINET, A. 1981. Inverted pyramidal neurons and their axons in the neocortex of reeler mutant mice. *Cell Tissue Res*, 218, 293-301.
- LE GALL, M., DE MATTEI, C. & GINIGER, E. 2008. Molecular separation of two signaling pathways for the receptor, Notch. *Dev Biol*, 313, 556-67.
- LEEMHUIS, J. & BOCK, H. H. 2011. Reelin modulates cytoskeletal organization by regulating Rho GTPases. *Commun Integr Biol*, 4, 254-7.
- LEEMHUIS, J., BOUCHE, E., FROTSCHER, M., HENLE, F., HEIN, L., HERZ, J., MEYER, D. K., PICHLER, M., ROTH, G., SCHWAN, C. & BOCK, H. H. 2010. Reelin signals through apolipoprotein E receptor 2 and Cdc42 to increase growth cone motility and filopodia formation. *J Neurosci*, 30, 14759-72.
- LI, G., KATAOKA, H., COUGHLIN, S. R. & PLEASURE, S. J. 2009. Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development*, 136, 327-35.
- LORENT DE NÓ, R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol*, 46, 113-177.
- LOTURCO, J. J. & BAI, J. 2006. The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci*, 29, 407-13.
- LOUVI, A. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 2006. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci*, 7, 93-102.
- LUQUE, J. M. 2007. Puzzling out the reeler brainteaser: does reelin signal to unique neural lineages? *Brain Res*, 1140, 41-50.
- LUQUE, J. M., MORANTE-ORIA, J. & FAIREN, A. 2003. Localization of ApoER2, VLDLR and Dab1 in radial glia: groundwork for a new model of reelin action during cortical development. *Brain Res Dev Brain Res*, 140, 195-203.
- MACLEAN, P. D. 1955. The limbic system ("visceral brain") and emotional behavior. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 73, 130-4.
- MAGDALENO, S., KESHVARA, L. & CURRAN, T. 2002. Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice. *Neuron*, 33, 573-86.
- MATSUKI, T., MATTHEWS, R. T., COOPER, J. A., VAN DER BRUG, M. P., COOKSON, M. R., HARDY, J. A., OLSON, E. C. & HOWELL, B. W. 2010. Reelin and stk25 have opposing roles in neuronal polarization and dendritic Golgi deployment. *Cell*, 143, 826-36.
- MENCHON, S. A., GARTNER, A., ROMAN, P. & DOTTI, C. G. 2011. Neuronal (bi)polarity as a self-organized process enhanced by growing membrane. *PLoS One*, 6, e24190.
- MILNER, B., JOHNSRUDE, I. & CRANE, J. 1997. Right medial temporal-lobe contribution to object-location memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352, 1469-74.

- NADARAJAH, B., BRUNSTROM, J. E., GRUTZENDLER, J., WONG, R. O. & PEARLMAN, A. L. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci*, 4, 143-50.
- NADARAJAH, B. & PARNAVELAS, J. G. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 3, 423-32.
- NIU, S., RENFRO, A., QUATTROCCHI, C. C., SHELDON, M. & D'ARCANGELO, G. 2004. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron*, 41, 71-84.
- NIU, S., YABUT, O. & D'ARCANGELO, G. 2008. The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 28, 10339-48.
- NOCTOR, S. C., FLINT, A. C., WEISSMAN, T. A., DAMMERMAN, R. S. & KRIEGSTEIN, A. R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409, 714-20.
- NOCTOR, S. C., MARTINEZ-CERDENO, V., IVIC, L. & KRIEGSTEIN, A. R. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7, 136-44.
- OHKUBO, N., LEE, Y. D., MORISHIMA, A., TERASHIMA, T., KIKKAWA, S., TOHYAMA, M., SAKANAKA, M., TANAKA, J., MAEDA, N., VITEK, M. P. & MITSUDA, N. 2003. Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3beta cascade. *FASEB J*, 17, 295-7.
- PAPEZ, J. W. 1937. A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7(1), 103-12.
- PEARLMAN, A. L. & SHEPPARD, A. M. 1996. Extracellular matrix in early cortical development. *Prog Brain Res*, 108, 117-34.
- PINTO-LORD, M. C., EVRARD, P. & CAVINESS, V. S., JR. 1982. Obstructed neuronal migration along radial glial fibers in the neocortex of the reeler mouse: a Golgi-EM analysis. *Brain Res*, 256, 379-93.
- PINTO LORD, M. C. & CAVINESS, V. S., JR. 1979. Determinants of cell shape and orientation: a comparative Golgi analysis of cell-axon interrelationships in the developing neocortex of normal and reeler mice. *J Comp Neurol*, 187, 49-69.
- PRANGE-KIEL, J., WEHRENBURG, U., JARRY, H. & RUNE, G. M. 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13, 226-34.
- QIU, S., ZHAO, L. F., KORWEK, K. M. & WEEBER, E. J. 2006. Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 26, 12943-55.
- QUATTROCCHI, C. C., WANNENES, F., PERSICO, A. M., CIAFRE, S. A., D'ARCANGELO, G., FARACE, M. G. & KELLER, F. 2002. Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 277, 303-9.
- RAKIC, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*, 145, 61-83.
- RAKIC, P. & CAVINESS, V. S., JR. 1995. Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron*, 14, 1101-4.
- RAMOS-MORENO, T., GALAZO, M. J., PORRERO, C., MARTINEZ-CERDENO, V. & CLASCA, F. 2006. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *Eur J Neurosci*, 23, 401-22.
- RETZIUS, G. 1893. Die Cajalschen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren. *Biol Unters* 5, 1-9.
- RETZIUS, G. 1894. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Cajalschen Zellen der Grosshirnrinde des Menschen. *Biol Unters* 6, 29-34

- RIBAK, C. E. & SERESS, L. 1983. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol*, 12, 577-97.
- RIBAK, C. E., SERESS, L. & AMARAL, D. G. 1985. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol*, 14, 835-57.
- ROGERS, J. T., RUSIANA, I., TROTTER, J., ZHAO, L., DONALDSON, E., PAK, D. T., BABUS, L. W., PETERS, M., BANKO, J. L., CHAVIS, P., REBECK, G. W., HOE, H. S. & WEEBER, E. J. 2011. Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density. *Learn Mem*, 18, 558-64.
- SANADA, K., GUPTA, A. & TSAI, L. H. 2004. Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron*, 42, 197-211.
- SCOVILLE, W. B. & MILNER, B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20, 11-21.
- SERI, B., GARCIA-VERDUGO, J. M., MCEWEN, B. S. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, 21, 7153-60.
- SESTAN, N., ARTAVANIS-TSAKONAS, S. & RAKIC, P. 1999. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science*, 286, 741-6.
- SHELLY, M., CANCEDDA, L., HEILSHORN, S., SUMBRE, G. & POO, M. M. 2007. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell*, 129, 565-77.
- SHELLY, M. & POO, M. M. 2011. Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization. *Dev Neurobiol*, 71, 508-27.
- SHEPPARD, A. M. & PEARLMAN, A. L. 1997. Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol*, 378, 173-9.
- SIBBE, M., FÖRSTER, E., BASAK, O., TAYLOR, V. & FROTSCHER, M. 2009. Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus. *J Neurosci*, 29, 8578-85.
- SORIANO, E. & DEL RIO, J. A. 2005. The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron*, 46, 389-94.
- STANFIELD, B. B. & COWAN, W. M. 1979a. The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol*, 185, 423-59.
- STANFIELD, B. B. & COWAN, W. M. 1979b. The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol*, 185, 393-422.
- SUPER, H., DEL RIO, J. A., MARTINEZ, A., PEREZ-SUST, P. & SORIANO, E. 2000. Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex*, 10, 602-13.
- TABATA, H. & NAKAJIMA, K. 2003. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, 23, 9996-10001.
- TERASHIMA, T., INOUE, K., INOUE, Y., MIKOSHIBA, K. & TSUKADA, Y. 1983. Distribution and morphology of corticospinal tract neurons in reeler mouse cortex by the retrograde HRP method. *J Comp Neurol*, 218, 314-26.
- TISSIR, F. & GOFFINET, A. M. 2003. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci*, 4, 496-505.
- TROMMSDORFF, M., GOTTHARDT, M., HIESBERGER, T., SHELTON, J., STOCKINGER, W., NIMPF, J., HAMMER, R. E., RICHARDSON, J. A. & HERZ, J. 1999. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, 97, 689-701.
- UCHIDA, T., BABA, A., PEREZ-MARTINEZ, F. J., HIBI, T., MIYATA, T., LUQUE, J. M., NAKAJIMA, K. & HATTORI, M. 2009. Downregulation of functional Reelin

- receptors in projection neurons implies that primary Reelin action occurs at early/premigratory stages. *J Neurosci*, 29, 10653-62.
- VALVERDE, F., DE CARLOS, J. A. & LOPEZ-MASCARAQUE, L. 1995. Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat. *Cereb Cortex*, 5, 483-93.
- VOGT, C. & VOGT, O. 1919. Allgemeinere Ergebnisse unserer Hirnforschung. *J Psychol Neurol.*(25), 279-462.
- VON SCHASSEN, C., FESTER, L., PRANGE-KIEL, J., LOHSE, C., HUBER, C., BOTTNER, M. & RONE, G. M. 2006. Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol*, 18, 847-56.
- WEISS, K. H., JOHANSEN, C., TIELSCH, A., HERZ, J., DELLER, T., FROTSCHER, M. & FÖRSTER, E. 2003. Malformation of the radial glial scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scrambler mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. *J Comp Neurol*, 460, 56-65.
- YOON, K. & GAIANO, N. 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci*, 8, 709-15.
- ZHAO, S., CHAI, X., BOCK, H. H., BRUNNE, B., FÖRSTER, E. & FROTSCHER, M. 2006. Rescue of the reeler phenotype in the dentate gyrus by wild-type coculture is mediated by lipoprotein receptors for Reelin and Disabled 1. *J Comp Neurol*, 495, 1-9.
- ZHAO, S., CHAI, X., FÖRSTER, E. & FROTSCHER, M. 2004. Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development*, 131, 5117-25.
- ZHAO, S. & FROTSCHER, M. 2010. Go or stop? Divergent roles of Reelin in radial neuronal migration. *Neuroscientist*, 16, 421-34.
- ZMUDA, J. F. & RIVAS, R. J. 1998. The Golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton*, 41, 18-38.
- ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L. R. & AMARAL, D. G. 1986. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*, 6, 2950-67.

7 Danksagung

Als Erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. E. Förster für die Vergabe dieser Dissertation und die Möglichkeit, in seiner Forschungsgruppe zu arbeiten, danken. Er leistete durch seine zuverlässige und engagierte Betreuung einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank einem weiteren Mitglied der Forschungsgruppe, Dr. rer. nat. M. Meseke, der mich sowohl bei der Forschung als auch bei der schriftlichen Fertigstellung der Arbeit immer unterstützte.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie, insbesondere Frau Prof. Rune, möchte ich herzlich für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre danken.

Bei der Datenerhebung und statistischen Auswertung stand mir Dr. C. Gräfin zu Eulenburg des Instituts für Biometrie und Epidemiologie beratend zur Seite. Somit gilt auch ihr und dem Institut für Biometrie und Epidemiologie mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung des statistischen Teiles dieser Dissertation.

Keinesfalls möchte ich H. Herbort und H. Hamann vergessen, die mir beim Erlernen von labortechnischen Fertigkeiten eine große Hilfe waren.

Besonders wichtig ist es mir, meinen Freunden zu danken, die mir immer zur Seite standen und auch in schwierigen Phasen Kraft und Motivation gaben, diese Dissertation fertig zu stellen.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium der Humanmedizin und diese Dissertation ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

-entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

9 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: 

Christiane Katia Huber