UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Untersuchungen zum Einfluss von Reelin auf die Aromatase-Transkription sowie zum Nachweis von Reelin in Gonaden

Dissertation

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

vorgelegt von:

Katja Kankowski aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20. Februar 2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Felicitas Pröls

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Rune

Inhaltsverzeichnis

A	bkürz	ung	sverzeichnis	. 8
1		Ein	leitung	. 9
	1.1	Ree	elin	. 9
	1.1	.1	Die Bedeutung von Reelin im zentralen Nervensystem	10
	1.1	.2	Vorkommen von Reelin außerhalb des Gehirns	12
	1.1	.3	Reelin Rezeptoren VLDLR und ApoER2	12
	1.1	.4	Mögliche klinische Bedeutungen von Reelin	15
	1.2	Die	Aromatase	15
	1.3	Ge\ Aro	webespezifische Aromatase-Promotoren/ Regulation der matase Transkription	17
	1.4	Hyp mär	oothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse im weiblichen und nnlichen Organismus	18
	1.5	Est	rogen und Aromatase im Gehirn	19
	1.6	Ree	elin und Estradiol	20
	1.7	Fra	gestellung und Zielsetzung	21
2		Mat	terial	22
	2.1	Arb	eitsmaterialien, Geräte, Software	22
	2.2	Che	emikalien	24
3		Met	thoden	27
	3.1	Zell	kultur (Zellbiologische Methoden)	27
	3.1	.1	Verwendete Zelllinien	27
	3.1	.2	Kultivierung der Zelllinien	29
	3.1	.3	Gewinnung von Reelin- und GFP-konditionierten Überständen von HEK Zellen	31
	3.1	.4	Vorbereitungen für den Radioimmunassay	32

	3.1	.5	Optimierung der Transfektionsbedingungen mit GFP	32
	3.2	Luc	ciferase Assay	34
	3.2	2.1	Herstellung der Vektoren für den Luciferase Assay	35
	3.2	2.2	Transfektion von Neuro2A Zellen	40
	3.2	2.3	Transfektion von primären hippocampalen Zellen	40
	3.2	2.4	Stimulierung der Zellen für den Luciferase Assay	41
	3.3	Sei	miquantitative PCR Analyse zum Nachweis von Reelin mRNA in	
		Go	naden	41
	3.4	In S	Situ Hybridisierung	42
	3.4	1.1	Materialien für die In Situ Hybridisierung	43
	3.4	1.2	Dot Blot	45
	3.4	1.3	Durchführung In Situ Hybridisierung	46
	3.5	In S	Situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	50
4		Erç	gebnisse	53
	4.1	Re	elin Expression in den Gonaden	53
	4.1	.1	Altersabhängige Reelin mRNA Expression im Nebenhoden	53
	4.1	.2	Altersabhängige Reelin mRNA Expression im Hoden	54
	4.1	.3	Reelin Expression in verschiedenen Zyklusphasen in Gonaden der	
			weiblichen Maus	54
	4.1	.4	Zyklusabhängige Reelin Expression im Ovar	55
	4.1	.5	Zyklusabhängige Reelin Expression im Uterus	57
	4.2	Ra	dioimmunassay	57
	4.2	2.1	Radioimmunassay in den Zelllinien KGN und Neuro2A	58
	4.2	2.2	Radioimmunassay in gemischt weiblicher und männlicher primärer hippocampaler Zellkultur	59
	4.2	2.3	Radioimmunassay in getrennt weiblicher und männlicher primärer hippocampaler Zellkultur	60
	4.0	Un	tersuchung der Wirkung von Reelin auf die Aromatase-Transkription	61

	4.	3.1	Tra	ansfektionseffizienz in Neuro2A Zellen	62
	4.	3.2	Lu	ciferase Assay	63
		4.3.	2.1	Promotorstudien in Neuro2A Zellen	64
		4.3.	2.2	Einfluss von Reelin auf die Aromatase Transkription in	
				Neuro2A Zellen	65
		4.3.	2.3	Renilla Luciferase als interner Standard in Neuro2A Zellen	67
		4.3.	2.4	Promotorstudien in Zellen des Rattenhippocampus	68
		4.3.	2.5	Einfluss von Reelin auf die Aromatase Transkription in hippocampalen Zellen	70
		4.3.	2.6	Renilla Luciferase als interner Standard in hippocampalen	71
	1 1	Ide	ontifi	izierung der Peelin produzierenden Zellen	71
	4.4	100			74
	4.	4.1	111 1 1		74
		4.4.	4.0		75
		4.4.	1.2	Deelin im Nebenbeden	70
		4.4.	.1.3		.79
	4.	4.2	ка	Idioaktive in Situ Hybridisierung	83
		4.4.	2.1		83
		4.4.	2.2	Reelin im Ovar	85
		4.4.	2.3	Reelin im Uterus	87
5		Di	skus	ssion	88
	5.1	Be	einf	lussung der Aromatase Aktivität durch Reelin	88
	5.2	Ei	nflus	s von Reelin auf die Aromatase Transkription	89
	5.3	Re	eguli	ert Reelin Estradiol möglicherweise auf posttranslationaler	
		Eb	ene	?	94
	5.4	Be	edeu	tung von Reelin für die männliche Fertilität	96
	5.5	Re	elin	im Nebenhoden	98
	5.6	Es	trog	ene und männliche Fertilität	101

11	Eidesstattliche Erklärung	127
10	Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen	126
9	Danksagung	125
8.2	Tabellen	124
8.1	Abbildungen	122
8	Darstellungsverzeichnis	122
7	Literaturverzeichnis	110
6	Zusammenfassung	109
5.9	Relevanz und Ausblick	106
5.8	Reelin und Aromatase in weiblichen Gonaden - zyklusabhängig?	104
5.7	Reelin in den weiblichen Gonaden	102

Abkürzungsverzeichnis

ApoER2	Apolipoproteinrezeptor E Rezeptor 2
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cpm	Counts per Minute
Dab-1	Disabled-1
DIV	Days in Vitro
E1	Estron
E18	Embryonaltag 18
E2	Estradiol
E3	Estrion
EGF	Epidermal Growth Factor
ERα	Estrogenrezeptor a
ERβ	Estrogenrezeptor β
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
g	Erdbeschleunigung
ĞFP	Green Fluorescent Protein
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HEK293	"Human-Embryonic-Kidney"-Zellen
lf	Gehirn-spezifischer Aromatase Promotor
If TATA	Gehirn-spezifischer Aromatase Promotor mit
	deletiertem Exon 1
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL-6	Interleukin 6
ISH	In Situ Hybridisierung
kb	Kilobasen
KGN	Humane Granulosazelllinie
LH	Luteinisierendes Hormon
LRP8	Lipoprotein Related Protein 8
LTP	Langzeitpotenzierung
MAPK8IP1	Mitogen-activated Protein Kinase 8 Interacting Protein 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Neuro2A	Murine Neuroblastomazelllinie
P0	Postnatal 0, (für neugeborene Ratten/Mäuse)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PII	Ovar-spezifischer Aromatase Promotor
Reln	Reelin-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
ŚtAr	steroidogenic acute regulatory protein
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TPA	Tissue Plasminogen Aktivator
VLDLR	Very Low Density Lipoproteinrezeptor

1 Einleitung

1.1 Reelin

Reelin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Ausbildung der Plastizität des Gehirns einnimmt. Es handelt sich um ein Glykoprotein mit einer Größe von 385 kDA. Das Reelin-Gen (Reln) befindet sich im menschlichen Organismus auf Chromosom 7q22 (D'Arcangelo et al. 1995).

Der Begriff Reelin stammt von dem abnorm schwankenden ("reeling") Bewegungsablauf der Reeler-Maus, einer Maus-Mutante, die eine homozygote Mutation im Reelin-Gen und einen Mangel an dem Protein Reelin aufweist (D'Arcangelo et al. 1995). Die Reeler-Maus wurde erstmals 1951 von D.S. Falconer beschrieben. Der Phänotyp dieser autosomal rezessiv vererbten Mutation äußert sich durch eingeschränkte motorische Koordination, Ataxie und Tremor (Falconer 1951).

Reelin wird von Cajal-Retzius Zellen synthetisiert und sezerniert (Ogawa et al. 1995; D'Arcangelo et al. 1995). Dieser Zelltypus wurde bereits 1891 von Cajal in Nagetiergehirnen entdeckt und kurz darauf von Retzius auch in Gehirnen von Menschen und anderen Säugern beschrieben (Retzius 1893; Retzius 1984) (siehe Abb. 1). Diese Zellen befinden sich vorzugsweise in Lamina I der Marginalzone des embryonalen Neocortex und zeichnen sich durch einen ovalen Zellkörper und einen langen Dendriten aus, der parallel zur Oberfläche der Pia Mater (*pial surface*) verläuft. Während der postnatalen Reifung des Cortex degenerieren die Cajal-Retzius Zellen (Derer & Derer 1990).



Abbildung 1 Cajal-Retzius Zellen im Nagergehirn, Zeichung von Cajal 1891, Golgi Imprägnation

Cajal-Retzius Zellen kommen darüber hinaus in der Marginalzone des Hippocampus vor und synthetisieren auch dort Reelin (Soriano et al. 1997; D'Arcangelo et al. 1995;

Ikeda & Terashima 1997). In adulten Ratten wird Reelin durch GABAerge Interneurone des Cortex und Hippocampus sowie durch glutamaterge Neurone des Cerebellums produziert (Pesold et al. 1998).

1.1.1 Die Bedeutung von Reelin im zentralen Nervensystem

Durch histopathologische Analyse der Gehirne von Reeler-Mäusen wurde gezeigt, dass deren kortikale Organisation sowohl im Kleinhirn, im Großhirn als auch im Hippocampus gestört ist (Hamburgh 1963; Caviness et al. 1972; D'Arcangelo 2006). Die Entwicklung von Neuronen im Neocortex während der Embryonalperiode beginnt in der sogenannten germinativen Zone und scheint sich initial nicht zwischen Reelerund Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden (Tissir & Goffinet 2003). Jedoch sind die Neurone in den Reeler-Mäusen nicht in der Lage, die passende zelluläre Architektur auszubilden. Normalerweise migrieren nacheinander gebildete Neurone entlang radialer Gliafasern und siedeln sich in einer inside-out Ordnung im sich entwickelnden Cortex an (Rakic 1972; Rakic 1988). Das heißt, dass jedes nachfolgend gebildete Neuron zunächst seine Vorläuferzellen passieren muss, bevor es sich an den äußersten Bereich der kortikalen Platte direkt unterhalb der Marginalzone ansiedelt. Die Neurone in der Reeler-Mutante hingegen sind nicht in der Lage, ihre passende Anordnung im Cortex anzunehmen. Sie sind genau umgekehrt angeordnet und zudem dichter gepackt (Caviness et al. 1972; Caviness et al.; Goffinet 1979). Die erste Generation von Neuronen, die in den Cortex einwandert, übertritt eine unsichtbare Barriere an der Marginalzone, in der normalerweise die Cajal-Retzius Zellen sitzen und Reelin synthetisieren. Neu generierte Neurone wandern nun nicht mehr an ihren Vorläufern vorbei, sondern siedeln sich in Reihenfolge ihrer Ankunft nacheinander im Cortex an (Caviness 1982; Pinto-Lord et al. 1982; Rakic & Caviness 1995) (Siehe Abb. 2).



Migration Abbildung 2 Modell der von Neuronen im Neocortex der Wildtyp Maus (+/+) und der homozygoten Reeler-Maus (rl/rl) (entnommen aus Rakic & Caviness 1995, S.1102) Dargestellt sind die fünf zellulären Basiszonen des Cortex während der Embryonalentwicklung von der ventrikulären Oberfläche (ganz unten) bis zur Pia Mater (ganz oben): Ventrikuläre Zone (VZ), (IZ), Intermediärzone "subplate" Zone (SP), Corticale Platte (CP) und Marginalzone (MZ). In der Marginalzone befinden sich die Reelin-synthetisierenden Cajal-Retzius Zellen (CR)

Einer gängigen Hypothese zufolge fungiert Reelin in Wildtyp-Mäusen normalerweise als Stop-Signal für migrierende Neurone und hindert sie daran, in die Marginalzone einzudringen (Frotscher 1997; Chai et al. 2009). Dieses Signal ist bei fehlender Reelin Expression aufgehoben, was zu der abnormalen Architektur im Reeler-Gehirn führt.

Auch im Hippocampus nimmt Reelin eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der richtigen Positionierung von migrierenden Neuronen ein. Im Gyrus Dentatus des Hippocampus von Reeler-Mäusen sind die Körnerzellen nicht als kompakte Schicht angeordnet, sondern locker über den gesamten Gyrus Dentatus verstreut. Weiterhin führt eine Fehlanordnung von hippocampalen Pyramidenzellen zu einer charakteristischen Duplikatur der Pyramidenzellschicht (Hamburgh 1963; Stanfield & Cowan 1979; Zhao et al. 2004; Förster et al. 2006).

Doch nicht nur während der Embryonalentwicklung sondern auch im adulten Gehirn erfüllt Reelin wichtige Funktionen. So wurde gezeigt, dass dieses Protein in synaptischen Kontakten gebildet wird und dass Neurone, denen die Reelin Rezeptoren VLDLR und ApoER2 fehlen, über eine verminderte Langzeitpotenzierung verfügen (Weeber 2002; Beffert et al. 2005; Herz & Chen 2006). Weiterhin moduliert Reelin die synaptische Plastizität, ist an der Ausbildung und Komplexität von Dendriten im Hippocampus beteiligt und fördert die Ausbildung von dendritischen Spines (Niu et al. 2004; Niu et al. 2008; Beffert et al. 2005; Matsuki et al. 2008). All diese Studien implizieren, dass Reelin bei der Ausbildung und dem Erhalt von Synapsen von großer Bedeutung ist.

1.1.2 Vorkommen von Reelin außerhalb des Gehirns

Neben der bedeutenden Rolle für die Plastizität und Entwicklung des Gehirns, scheint Reelin auch in anderen Organen wichtige Funktionen zu haben. So wurde Reelin sowohl in embryonalen als auch in adulten Organen wie Leber, Ovar, Testis, Nieren, Blut, Blutgefäßen, Augen, Nervenfasern oder chromaffinen Zellen der Nebenniere nachgewiesen (Ikeda & Terashima 1997, Smalheiser 1999). In der Leber wurde Reelin in den Kupffer-Sternzellen nachgewiesen (Samama & Boehm 2005). Die Expression von Reelin stieg hier bei Schädigungen des Gewebes an und sank nach Reparaturprozessen wieder auf ein normales Niveau (Kobold et al. 2002). Ähnliche Prozesse ließen sich im retinalen und kornealen Gewebe des Auges beobachten (Pulido et al. 2007).

Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass Reelin sowohl für die Entwicklung verschiedener Organe und Strukturen als auch für die spätere Stabilität der Zytoarchitektur sowie für Umbauprozesse innerhalb des Gewebes ("Remodelling") eine Bedeutung hat.

1.1.3 Reelin Rezeptoren VLDLR und ApoER2

Im Mausmodell wurden zwei Rezeptoren als Reelin Rezeptoren identifiziert: der Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2) und der Very Low Density Lipoproteinrezeptor (VLDLR) (Trommsdorff et al. 1999; D'Arcangelo et al. 1999; Hiesberger et al. 1999). VLDLR und ApoER2 gehören zur LDL Rezeptor Familie, einer Gruppe von Rezeptoren, die an der Endozytose und Signaltransduktion beteiligt sind (Beffert et al. 2004). Hiesberger und Mitarbeiter (1999) haben zunächst gezeigt, dass Disabled 1 (Dab1) an beide Rezeptoren bindet. Das zytosolische Adapter-Protein Dab 1 aktiviert Tyrosinkinasen und ist ebenso wie Reelin an der neuronalen Migration beteiligt (Howell et al. 1997). Das Binden von Reelin an seine Membranrezeptoren ApoER2 und VLDLR führt zu einer Phosphorylierung von Dab1 und damit zur Weiterleitung des Reelin-Signals an die intrazelluläre Signalkette (Howell et al. 1997; Arnaud et al. 2003; Kuo et al. 2005). In Knockout-Mäusen, in denen sowohl ApoER2 als auch VLDLR fehlten, zeigte sich eine Hochregulation von Dab1 und ein ähnlicher Phänotyp wie der der Reeler-Mäuse mit Defekten in der neuronalen Migration. Die Defekte fallen weniger schwer aus wenn in einer Mausmutante nur einer der beiden Rezeptoren fehlt, was darauf hinweist, dass die beiden Rezeptoren unterschiedliche Rollen bei der neuronalen Positionierung übernehmen (Trommsdorff et al. 1999; Benhayon et al. 2003; Drakew et al. 2002). Die weitere Analyse von Rezeptormutanten, das heißt Mäusen, denen einer der beiden Rezeptoren fehlte, zeigte zusätzliche Unterschiede zwischen den beiden Rezeptoren: ApoER2 weist eine höhere Affinität zu Reelin auf als VLDLR, außerdem treten bei alleinigem Verlust von ApoER2 schwerere Abnormalitäten auf als bei alleinigem Verlust von VLDLR (Benhayon et al. 2003). Hack und Mitarbeiter (2007) zeigten zudem, dass VLDLR eine Art Stop-Signal bei der Migration von kortikalen Neuronen vermittelt während ApoER2 essentiell für die Migration von spät generierten kortikalen Neuronen zu sein scheint.

VLDLR und ApoER2 scheinen nicht nur im Gehirn eine Rolle zu spielen, denn sie ließen sich auch in anderen Organen der Maus nachweisen (Kim et al. 1996) (siehe Tabelle 1). VLDLR mRNA-Transkripte zeigen die höchste Expression im Gehirn, weiterhin jedoch auch eine hohe Expression im Herz- und Skelettmuskel. Innerhalb des Gehirns lässt sich VLDLR mRNA in fast allen Regionen nachweisen, mit der höchsten Expression im Cortex und im Cerebellum.

ApoER2 mRNA lässt sich bisher im Gehirn, in der Plazenta, im Hoden und im Nebenhoden nachweisen (Andersen et al. 2003; Kim et al. 1996) (siehe Tabelle 1). Innerhalb des Gehirns wird ApoER2 in kortikalen Neuronen, im Neocortex, im Cerebellum, im Bulbus Olfactorius, und im Hippocampus exprimiert (Clatworthy et al. 1999; Perez-Garcia et al. 2004) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 1	Ex (üb +/- Apo	pression pernom , +, uno oER2	on von \ men aus d ++ repr	/LDLR Reddy äsentie	und Ap et al. 2 eren erh	ooER2 in 2011, S.3 öhte Spie	Maus-O r) egel der E	r ganen Expressio	on von VL	_DLR bzw.	
	Gehirn	Herz	Hoden	Ovar	Niere	Muskel	Plazenta	Lunge	Fett- gewebe	Dünndarm	Lebe
VLDLR	++	++	++	+	++	++	-	+	+	+/-	+/-
AnoFR2	++	-	++	+/-	-	-	+	-	-	-	-

	(übe + rep	rnommen präsentier	aus Reddy erhöhte S	v 2011, S.3 piegel der	3) Expression	von VLDLR	bzw. Apo	ER2	
	Thalamus	Cortex Cerebri	Striatum	Hippo- campus	Hypo- thalamus	Cerebellum	Hirn- stamm	Bulbus Olfactorius	Septum
VLDLR	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ApoER2	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Tabelle 2 Regionale Expression von VLDLR und ApoER2 im Gehirn der adulten Maus

Den Nachweis von ApoER2 im Nebenhoden erbrachten Stockinger und Mitarbeiter (2000), die den Rezeptor per Immunhistochemie streng apikal in den Hauptzellen des Ductus Epididymis der Maus darstellen konnten. Später konnte eine essentielle Rolle des Rezeptors in der Spermienentwicklung gezeigt werden (Andersen et al. 2003). Dabei gelang die Darstellung von ApoER2 im initialen Segment des Nebenhodens, nicht jedoch in den Ductuli efferentes, Caput, Corpus oder Cauda (Abb. 3).



Abbildung 3 Expression von ApoER2 im Nebenhoden der Maus (entnommen aus Andersen et al. 2003, S. 23991) Immunhistochemie mit anti-ApoER2-Antikörpern (rabbit). Proximale (A) und distale (B) Abschnitte des Nebenhodens. Expression von ApoER2 wurde ausschließlich im initialen Segment (in) des Nebenhodens nachgewiesen, nicht im Ductus efferentes (ef), Caput (cp), Corpus (cr) oder Cauda (cd)

1.1.4 Mögliche klinische Bedeutungen von Reelin

Ein vollständiges Fehlen von Reelin durch Mutationen im Reelin-Gen (Reln) führt bei Menschen zur Lissenzephalie, einer schweren Entwicklungsstörung, bei der das Gehirn durch fehlende Gyrierungen glatt erscheint (Hong et al. 2000; Crino 2001). Auch in der Pathogenese des Morbus Alzheimer scheint Reelin einen wichtigen Stellenwert zu haben (Botella-Lopez et al. 2006; Seripa et al. 2008; Baloyannis 2005; Herring et al. 2012). Beispielsweise sind VLDLR und ApoER2 beide auch Rezeptoren für Apolipoprotein E, dem führenden genetischen Risikofaktor für Morbus Alzheimer (Strittmater 2000).

Weiterhin gibt es Forschungsergebnisse, die darauf hindeuten, dass Reelin auch an der Entstehung von Schizophrenie (Impagnatiello et al. 1998; Guidotti et al. 2000), bipolaren Störungen (Fatemi et al. 2005), Epilepsie (Frotscher et al. 2003; Förster et al. 2006; Kobow et al. 2009) und einigen malignen Tumoren, wie etwa dem Prostatacarcinom oder dem Retinoblastom, beteiligt ist (Perrone et al. 2007; Seigel et al. 2007).

1.2 Die Aromatase

Die Aromatase, das Produkt des CYP19A1 Gens, ist das Enzym, welches Estrogen aus den Androgen-Vorstufen Androstendion und Testosteron synthetisiert und damit das zentrale Enzym in der Estrogensynthese darstellt. Abbildung 4 zeigt die drei möglichen Reaktionen, die von der Aromatase katalysiert werden. In diesen Reaktionen werden C-19 Atom Vorstufen oxidiert, hydroxyliert und schließlich zum 18 C Atom Estrogen demethyliert. Die drei natürlich vorkommenden Estrogene Estron (E1), 17β-Estradiol (E2) und Estriol (E3) sind C-18-Steroidderivate von Cholesterol. Der initiale Schritt der eigentlichen Östrogensynthese ist zunächst der Transfer von Cholesterol aus dem Zytosol zur inneren Mitochondrienmembran. Dabei nimmt das Transportprotein *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) eine entscheidende Rolle ein (Arakane et al. 1996; Kallen et al. 1998). Die Regulation der Aromatase Transkription erfolgt über gewebespezifische Promotoren (siehe unten), während die Aktivität der Aromatase nach erfolgter Synthese durch Phosphorylierung über Proteinkinase A und Tyrosinkinase reguliert wird (Balthazart et al. 2001).

Estrogen, wobei es sehr viel potenter ist als Estriol und Estron (Leidenberger et al.

2009). Estrogene übernehmen wichtige Funktionen in der Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale, im Menstruationszyklus oder während der Schwangerschaft sowie zahlreiche Aufgaben in verschiedenen anderen Organen wie dem Gehirn. Die Aromatase wird demnach in einer Vielzahl von Geweben synthetisiert. Hauptsächlich findet sich die Aromatase in Granulosazellen und im Corpus Luteum des Ovars (McNatty et al. 1974), weiterhin auch in Leydig Zellen, im Nebenhoden, in Synzytiotrophoblasten, im Fettgewebe und in weiten Teilen des Gehirns.

Die Rezeptoren der Estrogene sind nukleäre Steroidrezeptoren und gehören zur Familie der ligandengesteuerten Transkriptionsfaktoren. Sobald Estrogen in die Zelle gelangt ist, bildet es mit den spezifischen Rezeptoren Steroid-Rezeptorkomplexe aus und bindet an die DNA an sogenannte *estrogen responsive elements* in den Promotoren der Zielgene. Damit aktiviert oder unterdrückt Estrogen die Transkription bestimmter Gene (Levin 2001). Es sind zwei Subtypen des Rezeptors bekannt: Estrogenrezeptor ER α (Green et al. 1986) und Estrogenrezeptor ER β (Kuiper et al. 1996; Tremblay et al. 1997). Die Rezeptoren werden in der Regel in denselben Geweben exprimiert, in denen auch Aromatase gebildet wird.

Neben dem Weg über nukleäre Rezeptoren, die durch eine Latenzzeit von Stunden bis Tagen gekennzeichnet ist, wurden auch schnelle Estrogeneffekte über membranständige Rezeptoren gezeigt (Toran-Allerand et al. 1999; Lee & McEwen 2001).

Die Regulation von Estradiol erfolgt unter anderem über die pulsatile Freisetzung von Gonadotropin-Releasing-Hormon aus GnRH Neuronen, über die Aromatase-Aktivität und über die Estradiol-Synthese selbst.



Abbildung 4 Aromatisierung von Androgenvorstufen durch das Enzym Aromatase (CYP19A1 Gen) (entnommen aus Azcoitia et al. 2011, S. 140) Reaktive Gruppen sind in blau dargestellt. In rot ist der resultierende Phenolring, welcher charakteristisch für Estrogen ist, dargestellt.

1.3 Gewebespezifische Aromatase-Promotoren/ Regulation der Aromatase Transkription

Das menschliche Aromatase (CYP19A1) Gen ist auf Chromosom 15q21.1 lokalisiert und besteht aus neun codierenden Exons (II-X) und einer 5'untranslatierten Region (Bulun et al. 2003). Insgesamt hat das Gen eine Länge von 123 kb, wobei die kodierenden Exons 30 kb einnehmen und die restlichen 93 kb von alternativen Promotoren, untranslatierten Exons und Introns eingenommen werden. Es sind 11 verschiedene gewebespezifische Promotoren bekannt (siehe Abb. 5): I.1 (Plazenta Major), 2a (Plazenta Minor 2), I.4 (Haut), I.5 (Fetales Gewebe), I.7 (Endothel), If (Gehirn), I.2 (Plazenta Minor 1), I.6 (Knochen), I.3 (Fettgewebe und Brustkrebs), Promotor II/ Exon PII (Gonaden) und I.8 (Placenta, Multiple Gewebe).



Abbildung 5 Das Humane Aromatase (CYP19A1) Gen (entnommen aus Boon et al. 2010, S. 214) Eine schematische Darstellung der CYP19A1 gewebespezifischen Promotoren und 5´untranslatierten Exons. "Simpson" und "Harada" stellen unterschiedliche Nomenklaturen der Promotoren dar.

Je nach Art des Gewebes kann mit Hilfe dieser Promotoren die Expression von CYP19A1 reguliert werden. So wird beispielsweise der Promotor If hauptsächlich zur Aromatase Expression im Gehirn genutzt (Honda et al. 1994a) und Promotor II zur Aromatase Expression in den Ovarien (Adams et al. 2001; Michael et al. 1995). Die unterschiedliche Aktivierung der Promotoren kommt durch die spezifischen Transkriptionsfaktoren in den Geweben zustande, auf die die einzelnen Promotoren reagieren (Simpson 1993). Zu den Regulatoren der Aromatase Expression zählen bisher Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1), Zytokine und Hormone (z.B. FSH, Androgene und Östrogene) (Mahendroo et al. 1993; Simpson 2004).

1.4 Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse im weiblichen und männlichen Organismus

Sowohl im männlichen als auch im weiblichen Geschlecht wird die Funktion der Gonaden durch die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse reguliert. In GnRH-Neuronen des Hypothalamus wird pulsatil GnRH seznerniert. Über axonalen Transport gelangt GnRH zur Adenohypohyse, wo es die Biosynthese und Sekretion der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) stimuliert. Über den Blutkreislauf erreichen FSH und LH ihre Zielgewebe. Im männlichen Geschlecht sind dies die Hoden. in denen FSH die Spermatozoenproduktion in den Keimzellen anregt und LH die Androgensynthese in den Leydigzellen stimuliert. Testosteron wiederum hemmt über eine negative Rückkopplung die LH-Freisetzung in der Hypophyse und die GnRH Freisetzung im Hypothalamus (Löffler et al. 2007). Über eine Aromataseaktivität können Leydigzellen und zu einem geringen Anteil auch Sertolizellen Androgene in Estrogene umwandeln (Hess 2003; Carreau et al. 2003). Außerhalb des Hodens wird Aromatase auch im Nebenhoden von Spermatozoen und Epithel des Ductus epididymis exprimiert (Andersen et al. 2003; Carreau & Hess 2010). Die durch die Aromatase synthetisierten Estrogene haben im Nebenhoden wahrscheinlich eine wichtige Bedeutung für die Motilität der Spermien (Lambard et al. 2003; Lambard et al. 2005).

Im weiblichen Organismus stellen die Theca Interna Zellen, das Corpus Luteum und die Granulosazellen des Ovars die Zielgewebe der Gondatropine dar. Unter Einfluss von LH werden in den Theca Interna Zellen und im Corpus Luteum Progesteron und Androgene synthetisert. FSH stimuliert in den Granulosazellen die Synthese von Estrogenen aus Androgenen durch die Aromatase. Durch eine negative Rückkopplung wirken die Estrogene hemmend auf die Synthese von LH und FSH in der Hypophyse und auf die Synthese von GnRH im Hypothalamus. Unter Einfluss von FSH wachsen und reifen die Follikel heran. Bis zum Eisprung durchlaufen die Follikel charakteristische Stadien (Follikulogenese). Ausgangspunkt sind die Primordialfollikel, ruhende Follikel, die noch ein flaches Epithel besitzen. Im Primärfollikel ist das Epithel einschichtig iso- bis hochprismatisch und der Oozyt nimmt an Größe zu. Bei den Sekundärfollikeln proliferiert das Epithel weiter zur Granulosazellschicht, in der eine starke Aromataseaktivität besteht (McNatty et al.

1974). Weiterhin entsteht zwischen Follikelepithel und Oozyt die Zona pellucida, eine Schicht aus Glykoproteinen. Im Tertiärfollikel bildet sich eine Follikelhöhle (Antrum folliculi) aus, die mit einer klaren Flüssigkeit gefüllt ist. Der Oozyt liegt nun randständig in einer Verdickung des Epithels, dem Cumulus oophorus. Tertiärfollikel besitzen FSH Rezeptoren und wachsen in Abhängigkeit von LH und FSH. Der Tertiärfollikel ist umgeben von einer bindegewebigen Schicht, der Theca folliculi, die sich in Theca interna und externa gliedert. Der dominante Tertiärfollikel reift schließlich zum sprungreifen Graaf-Follikel heran (Welsch 2006; Löffler et al. 2007).

1.5 Estrogen und Aromatase im Gehirn

Neben der Bedeutung als eines der zentralen Geschlechtshormone erfüllt Estrogen zahlreiche Aufgaben im ZNS, wobei diese Effekte hauptsächlich im Hippocampus untersucht worden sind. So reguliert Estrogen einerseits die Bildung und die Dichte von Spine Synapsen im Hippocampus (Rune et al. 2002; Segal & Murphy 2001), zum anderen reguliert es die Expression von synaptischem Protein (Kretz et al. 2004; Prange-Kiel et al. 2006). Estrogen moduliert weiterhin die synaptische Plastizität (Warren et al. 1995) und hat eine neuroprotektive Funktion (Garcia-Segura et al. 2001). Auch die Langzeitpotenzierung (LTP) im Gehirn wird unter anderem durch Estrogen reguliert (Warren et al. 1995; Foy et al. 1999; Mukai et al. 2007). Darüber hinaus ist Estrogen an der Proliferation und Apoptose von Körnerzellen im Hippocampus beteiligt (Fester et al. 2006). Eine weitere Rolle spielt Estrogen in der Pathogenese der Epilepsie (Reddy 2009). Ursprünglich wurden diese Effekte dem gonadalen Estradiol zugeschrieben, das möglicherweise den Hippocampus über die Blut-Hirn-Schranke erreicht (Woolley & McEwen 1992). Jedoch konnte die Arbeitsgruppe um Prange-Kiel eine *de-novo* Synthese von Estradiol im Hippocampus nachweisen (Prange-Kiel et al. 2003) und schließlich eine Regulation von lokalem E2 durch Gonadotropin-Releasing-Hormon zeigen (Prange-Kiel et al. 2008).

Die Aktivität der Aromatase im menschlichen Gehirn wurde erstmals von Naftolin und Mitarbeitern im fetalen Hypothalamus (Naftolin et al. 1971b) und im limbischen System (Naftolin et al. 1971a) nachgewiesen, später konnte das Vorhandensein von Aromatase unter anderem auch im Cerebellum (Sakamoto et al. 2003), Neocortex (Stoffel-Wagner et al. 1999) und im Hippocampus gezeigt werden (Wehrenberg et al. 2001; Hojo et al. 2004). Zudem wurden in zahlreichen Regionen des Gehirns die E2 Rezeptoren ER α und ER β nachgewiesen (Azcoitia et al. 1999; Gonzalez et al. 2008;

Mitra & et al. 2003). In Aromatase Knockout-Mäusen konnte unter anderem eine vermehrte Apoptose im frontalen Cortex (Hill et al. 2009) und eine verminderte Synaptogenese festgestellt werden (Sasahara et al. 2007). Als klinisches Beispiel zeigte sich, verglichen mit Kontrollen, eine Herunterregulation der Aromatase-Transkription im Hippocampus bei Morbus Alzheimer (Ishunina et al. 2007).

1.6 Reelin und Estradiol

Reelin und Estradiol zeigen interessante Überschneidungen in den Effekten auf die synaptische Plastizität, wie Spinedichte, Spinebildung und synaptische Proteine, außerdem zeigen beide Auswirkungen auf das LTP.

Die Frage nach Zusammenhängen und nach gegenseitiger Beeinflussung von Estrogen und Reelin ist naheliegend und ist Gegenstand aktueller Forschung. Einen ersten Hinweis einer Regulation lieferten Biamonte und Mitarbeiter (2009), die nach Applikation von E2 erhöhte Reelin RNA und Protein Spiegel im Cerebellum männlicher heterozygoter Reeler-Mäuse nachweisen konnten. Die These dieser Regulation wird durch die Arbeit von Bender und Mitarbeitern (2010) bestätigt, die eine starke Expression des Estrogenrezeptors ERα in Cajal-Retzius Zellen des Hippocampus zeigen konnten. Die daraufhin durchgeführte exogene Applikation von E2 auf Schnitt-Kulturen des Hippocampus führte zu einer Erhöhung der Reelin Expression in den Cajal-Retzius Zellen. Die Inhibition der Aromatase führte umgekehrt zu einer reduzierten Reelin Expression. Hier kann vermutet werden, dass lokales E2 aus dem Hippocampus an der Regulation von Reelin beteiligt ist.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Reelin und Estrogen lässt sich möglichweise anhand der eingeschränkten Fertilität der Reeler Maus beobachten. Zunächst wurde die verminderte Fertilität vor allem dem Phänotyp und dem abnormen Verhalten dieser Mutante zugeschrieben (Caviness et al. 1972). Neuere Erkenntnisse sprechen jedoch für Mechanismen auf zellulärer Ebene als Ursache für eine eingeschränkte Reproduktion. Cariboni und Mitarbeiter beschrieben 2005 eine Migrationsstörung von GnRH-Neuronen in Gehirnen von Reeler-Mäusen. GnRH Neurone sind involviert in die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse und steuern die Sekretion von FSH und LH, die wiederum wichtige Faktoren für die Estrogensynthese in den Gonaden darstellen. Eine gestörte Migration von GnRH-Neuronen könnte ein Grund für eine Störung in dieser empfindlichen Achse sein. In einer vorangegangenen Arbeit wurde zudem eine verminderte Aromataseexpression in Tertiärfollikeln im Ovar der Reeler-Maus im Vergleich zum Wildtyp gezeigt (Schmahl 2012).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Die Synthese von Estradiol wird unter anderem von GnRH-Neuronen und der Aromatase reguliert. Bender und Mitarbeiter (2010) konnten zeigen, dass die exogene Applikation von E2 auf hippocampale Schnitt-Kulturen in einer erhöhten Expression von Reelin in Cajal-Retzius Zellen resultierte. E2 scheint also die Expression von Reelin zu regulieren. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Reelin im Umkehrschluss einen Effekt auf die Expression von E2 hat. Dafür soll zunächst die Aromatase Transkription unter Einfluss von Reelin untersucht werden. In einem Reportergen Assay mit Luciferase werden die Gehirn- und Ovarspezifischen Aromatasepromotoren in Neuro2A Zellen und hippocampale Zellen kloniert und dann die Aktivität der Aromatase in An- und Abwesenheit von Reelin gemessen.

Weiterhin soll mittels PCR das Expressionsprofil von Reelin in Abhängigkeit vom Alter (bei männlichen Tieren) beziehungsweise vom Ovarialzyklus (bei weiblichen Tieren) und mittels in situ Hybridisierungen die genaue gonadale Lokalisation von Reelin mRNA ermittelt werden.

2 Material

2.1 Arbeitsmaterialien, Geräte, Software

Materialien/ Geräte/ Software	Hersteller
Autoklav	Integra BioSciences
Bio Photometer	Eppendorf
CO ₂ Inkubator Function Line	HERAEUS
Dampfsterilisator Varioklav	H+P
Deckgläser 24x60 mm	Roth
Disposable Cell Scraper	Greiner bio one
Entwickler Kodak D 19	Kodak
Gelelektrophorese Kammer SUB-Cell GT	BIO-RAD
Heizblock A.J.H. 1559	Medax
Kodak Emulsion	Kodak
Kodak Unifix	Kodak
Kryostat "HM 560"	MicromGmbH
Küvetten 10x2x45 mm	Sarstedt
Laborwaage	Sartorius
Mikrowelle	Sharp
Objektträger SuperFrost/Plus 75x25 mm	Assistent
PCR Gerät Mastercycler gradient	eppendorf
Röntgenfilm Kodak Biomax MR	Kodak
Schüttelinkubator	Edmund Bühler
Spannungsquelle	PeqLab
Ultraviolett Crosslinker	Amersham LIFE Science
UV-Lampe	Vilber
Vortex	Scientific Industries
Wärmeschrank "Function Line"	Heraeus Instruments

Werkbank	HERAsafe
Werkbank steril HERAsafe	Heraeus
Mikroskope:	
Axioskop 2	Zeiss
Axiovert 100	Zeiss
Axiovert 25	Zeiss
Axiovert S 100	Zeiss
Kamera für Axioskop AxioCam HRc	Zeiss
UV-Gerät für Axioskop ebq 100 ISOLATED	LEJ
Pipetten:	
Einmalpipetten 5-25 ml	Falcon
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf Research
Pipettenspitzen, Tip One 0,1-10 μl	Starlab GmbH
Pipettenspitzen, Tip One, 101-1000 μl	Starlab GmbH
Pipettenspitzen, Tip One, 1-20 μl	Starlab GmbH
Pipettierhelfer accujet	Brand
Zellkulturgefäße:	
Multiwell Platten steril verpackt; 12, 24, 48, 96 Well	Falcon
Tissue Culture Dish 100x20mm	Sarstedt
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415C	Eppendorf
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Universal 32 R	Hettich Zentrifugen
Software:	
AxioVision	Zeiss
Excel 2007	Microsoft
ImageJ	NIH
Powerpoint 2007	Microsoft
SPSS 20.0 für Windows	SPSS GmbH Software
Word 2007	Microsoft

2.2 Chemikalien

Lösungen/ Chemikalien	Hersteller
Agarose ultra pure	Invitrogen
Ampicillin 100 mg/ml	Sigma Aldrich
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche
Anti-Digoxigenin-POD, Fab Fragments	Roche
Antifluorescein-AP Conjugate (für TSA)	PerkinElmer
B27 Supplement	GIBCO
BCIP	Roche
Blocking Reagent	Roche
Denhardt's Lösung	Invitrogen
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dnTPS)	Fermentas
Dextran sulfate sodium salt from Leuconostoc spp	SIGMA
Diethylpyrocarbonat	SIGMA
Dig RNA Labeling Kit	Roche
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	SIGMA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
DMEM/F-12 (1:1) (Ham)	GIBCO
Dulbecco´s PBS (1x), Steril	PAA
Einbettmedium Tissue-Tek	SAKURA
Essigsäureanhydrid	Merck
Ethanol	J.T Baker
Ethidium Bromid Solution 0,07%	Genaxxon
Fast digest Green Buffer	Fermentas
First Strand Buffer (FS-Buffer)	Invitrogen
Formamid (molekul.)	SIGMA
Gel Extraction Kit (50), QIAquick	Qiagen

H ₂ O endotoxinfrei	PAA
Hering Sperm DNA	SIGMA
Hexamer Random Primer	Invitrogen
Isopentan	Roth
LB Agar Ultrapure	USB
LB Broth (für LB-Medium)	SIGMA LifeScience
L-Glutamine 200 MM	Sigma-Aldrich
Luciferase Assay System, Dual-Glo®	Promega
Luciferase Assay System, One-Glo®	Promega
Mayers Hämalaun	Sigma Aldrich
Metafectene Pro Transfektionsreagenz	Biontex
Methanol	J.T Baker
Miniprep Kit (250), QIAprep Spin	QIAGEN
Mounting Medium (fluoreszierend)	Dako
NBT	Roche
Neurobasal-A Medium (ohne Phenolrot)	GIBCO
Paraformaldehyd	Merck
PCR Mastermix	Genaxxon
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS Tablets)	GIBCO
Plasmid Maxi Kit (10), EndoFree	Qiagen
Plasmid Midi Kit (25), HiSpeed	Qiagen
Poly-dT-Primer	Invitrogen
Protein Assay Reagenz	BIO-RAD
Proteinase K	Sigma-Aldrich
RNA-Aufreinigungskit, Rneasy Mini Kit	Qiagen
RNase A	Fermentas
Saccharose	Roth
Salmon Sperm DNA	Invitrogen
SDS ultra pure (Natriumlaurylsulfat)	Rpth

SSC (Saline-Sodium Citrat Buffer)	Invitrogen
Super Script II Reverse Transkriptase (SSII-RT)	Invitrogen
TBE Puffer Ultrapure (10x)	USB
Triethanolamin	Merck
tRNA, Ribonucleid acid, transfer, from Baker's Yeast	SIGMA
Trypsin/EDTA solution 0,25% / 0,02% (w/v)	BIOCHROM AG
TSA Fluorescein Plus Evaluation Kit	Perkin Elmer
Wasserstoffperoxid 30%	Merck
Xylol	Roth
Restriktionsenzyme (Fast digest):	
EcoRI	Fermentas
HindIII	Fermentas
	rementas
Nhel	Fermentas
Nhel Xhol	Fermentas Fermentas
Nhel Xhol Vektoren:	Fermentas Fermentas
Nhel Xhol Vektoren: pCMS-EGFP	Fermentas Fermentas Promega
Nhel Xhol Vektoren: pCMS-EGFP pGL3 basic	Fermentas Fermentas Promega Promega

3 Methoden

3.1 Zellkultur (Zellbiologische Methoden)

3.1.1 Verwendete Zelllinien

HEK293 Zellen

Die HEK293 ("Human Embryonic Kidney") Zellen sind aus humanen embryonalen Nierenzellen hervorgegangen, die mit Adenovirus Typ 5 transformiert wurden (Graham et al. 1977). Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer in den verwendeten Zellkulturgefäßen (Abb. 6). Die in dieser Arbeit verwendeten HEK293 Zellen sind entweder stabil mit GFP transfiziert worden und sezernieren GFP ins Kulturmedium oder sind stabil mit dem Reelin Klon pCrl transfiziert worden und sezernieren Reelin in den Zellüberstand (Förster et al. 2002).



Abbildung 6 HEK 293 Zellen in Kultur mit DMEM/F-12 Entnommen von: http://www.pan-biotech.com/content/images/stories/serumfreiesysteme/panexinnt/ntahek.jpg, am 29.9.2012

Neuro2A Zellen

Diese neuronalen Zellen entstammen einem spontanen Neuroblastom einer Albino-Maus (Olmsted et al. 1970). Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer und bilden in Kultur längliche Ausläufer (Neuriten) aus (Abb. 7).



Abbildung 7 Neuro2A Zellen in Kultur mit DMEM und 10% FCS (entnommen aus Huang et al. 2009, S. 4)

KGN Zellen

Die KGN Zelllinie entstammt dem Rezidiv eines invasiven ovariellen Granulosazelltumor einer 63jährigen Frau und wurde von der Arbeitsgruppe um Nishi etabliert (Nishi 2001). Die kultivierten Zellen wachsen adhäsiv in einem Monolayer. In niedriger Zelldichte weisen sie eine spindelartige Form auf, während sie in einer hohen Zelldichte epithelartig wachsen (Abb. 8). Die von Nishi und Mitarbeitern ermittelte Verdopplungszeit beträgt in etwa 46,4 Stunden *in vitro.*



Abbildung 8 KGN Zellen in Kultur mit DMEM/F-12 und 10% FCS (entnommen aus Nishi 2001)

Primäre hippocampale Zellkultur

Die verwendeten primären Zellen entstammten dem Hippocampus von Ratten des Stammes Wistar am Embryonaltag 18 (E18). Für die Präparation wurden die Embryonen den Uteri der Muttertiere entnommen, decapitiert und die Gehirne isoliert. Die Hippocampi wurden sorgfältig herauspräpariert. Die Aufbereitung des Gewebes und die Anfertigung der Zellkultur erfolgten abgewandelt nach Protokoll von Kretz et al. (2004) und wurden freundlicherweise von Frau Dr. Nicola Brandt für die hier durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung gestellt.



Abbildung 9 Primäre hippocampale Zellkultur (entnommen aus Manelli et al. 1997, S.190)

3.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Sämtliche Arbeitsschritte der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich Materialen verwendet, die explizit für die sterilen Bedingungen der Zellkultur ausgewiesen waren. Alle für die Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden zunächst im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Für die Kultivierung der verwendeten Zelllinien HEK293, KGN und Neuro2A wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12) der Firma Gibco genutzt. Um eine bakterielle Besiedelung zu vermeiden, wurde diesem Medium in einer Endkonzentration von 1 % Penicillin und Streptomycin hinzugefügt. Weiterhin wurde Fötales Kälberserum (FCS) in einer Konzentration von 5% für die Kultivierung der Neuro2A Zellen und in einer Konzentration von 10% für die Kultivierung der HEK Zellen hinzugefügt.

Die Zellen wurden in 100x20 mm großen sterilen Petrischalen der Firma BD Falcon kultiviert und wuchsen in 10 bis 20 ml Medium. Die Schalen wurden im CO_2 Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Ansetzten neuer Kulturen

Das Institut für Neuroanatomie (UKE) verfügt über einen Vorrat an verschiedenen in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Zelllinien. Um neue Kulturen anzusetzen, wurden die Zellen dem Stickstoffbehältnis entnommen und zum Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt. Ein solches Tube enthielt einen Milliliter konserviertes Zellsuspension, welches auf zwei Petrischalen mit je 10 ml Kulturmedium aufgeteilt wurde. Nach 24 Stunden wurde bereits ein Mediumwechsel durchgeführt, da durch den Auftauprozess reichlich Zelltrümmer im Kulturmedium vorhanden waren.

Passagieren der Zellen

Je nach Zelllinie und Zelldichte mussten die Zellen etwa alle 2-3 Tage passagiert oder für anstehende Transfektionen in definierten Zellzahlen ausgesät werden. Dafür wurde zunächst das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Schale zu lösen, wurde 1 ml 0,25% Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach etwa zwei Minuten konnte die Aktivität des Trypsins durch eine erneute Zugabe von 9 ml Medium gestoppt werden. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren konnten die Zellen nun im Medium suspendiert, dem Kulturgefäß entnommen und in verschiedenen Verdünnungen in neue Schalen überführt werden. Um definierte Zellzahlen auszusäen, wurde ein Tropfen der Suspension auf eine Neubauer Zählkammer gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Unter dem Mikroskop konnte somit die Zellzahl bestimmt werden, wodurch anschließend die gewünschte Anzahl an Zellen in neue Kulturgefäße pipettiert werden konnte. Nach folgender Formel wurde die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension bestimmt:

Zellzahl in einem Quadranten (16 Felder) x 10 000 = Zellzahl / Milliliter

Kultivierung der primäreren hippocampalen Zellkulturen

Soweit nicht anders angegeben, wurden diese Zellen in einem 12 Well Zellkultur Gefäß zu 180.000 Zellen und einem Milliliter Medium je Well kultiviert. Als Kulturmedium wurde Neurobasal A Medium (Gibco, ohne Phenolrot) verwendet. Dem Medium wurde vor Verwendung 0,5 x B27 Supplement (Gibco), 0,5 mM Glutamin und 1 % Penicillin und Streptomycin hinzugefügt.

3.1.3 Gewinnung von Reelin- und GFP-konditionierten Überständen von HEK Zellen

Für anstehende Versuche wurde Reelin bzw. GFP (grün fluoreszierendes Protein) benötigt. Spezifisch stabil transfizierte HEK Zellen sind in der Lage, Reelin bzw. GFP zu exprimieren und in das Kulturmedium, in dem sie wachsen, abzugeben (Förster et al. 2002).

Wie oben beschrieben, wurden die Zellen kultiviert und passagiert. Sobald die Zellen unter dem Mikroskop subkonfluent erschienen, wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und durch 10 ml serumfreies DMEM-F12 mit 1% Penicillin und Streptomycin ersetzt. Nach 24 Stunden konnte der nun Reelin- bzw. GFP-konditionierte Überstand abgenommen werden. Die Überstände mehrerer Zellkulturschalen wurden in Zellkulturflaschen gesammelt, durchmischt und anschließend in 40 ml Portionen in Falcon Röhrchen überführt. Diese Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Aufkonzentrierung der Überstände der HEK Zellen

Da die verwendeten primären hippocampalen Zellkulturen in Neurobasal A Medium statt in DMEM-F12 wachsen, war es notwendig, die gesammelten HEK Zell-Überstände zunächst aufzukonzentrieren und danach in Neurobasal A Medium zu verdünnen. Um eventuelle Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Röhrchen, welches das Reelin bzw. GFP konditionierte Medium enthielt, zunächst 5 Minuten bei Raumtemperatur und 5000 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Unter der sterilen Werkbank wurden anschließend 4 ml des Überstands in ein speziell gefertigtes Amicon Ultra Tube der Firma Millipore überführt und dann 6 Minuten lang bei 10 °C und 4000 g zentrifugiert. In einem Einsatz in dem Tube sammelte sich dann der aufkonzentrierte Überstand. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang einige Male wiederholt. Das eingesetzte Volumen wurde im Anschluss ins Verhältnis zu dem Volumen des aufkonzentrierten Überstandes gesetzt, wodurch dessen Konzentration berechnet werden konnte. Üblicherweise wurden 20fach konzentrierte überstände hergestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Konzentrate aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.1.4 Vorbereitungen für den Radioimmunassay

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die verwendeten Zelllinien sowie die primären hippocampalen Zellkulturen unter dem Einfluss von Reelin Estrogen synthetisieren. Mittels eines Radioimmunassays, welcher freundlicherweise von der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt wurde, sollte vorhandenes Estrogen in Zellkulturmedium detektiert werden. Dafür wurden die subkonfluent gewachsenen KGN Zellen und Neuro2A Zellen mit 5 ml von den zuvor aus den HEK Zellen gewonnenen Reelin-konditionierten Überständen versetzt. Nach definierten Zeitpunkten wurden diese Überstände abgenommen, in Röhrchen überführt und bis zum Versand der Proben bei -20°C eingefroren. Als Kontrolle dienten die mit GFP versetzten Überstände.

Ahnlich wurde mit den primären hippocampalen Zellen verfahren. Für diesen Versuch wurden die Zellen in einem 12 Well Format kultiviert. Nach 16 Tagen in Kultur (DIV = Days in Vitro) wurde das Kulturmedium vorsichtig von den Zellen abgesaugt und je Well 1 ml neues Medium hinzugefügt, das entweder mit GFP oder Reelin versetzt war. Äquivalent zu den Zelllinien wurde nun auch hier nach definierten Zeitpunkten der Überstand wieder entnommen und bis zum Versand der Proben bei -20°C eingefroren.

3.1.5 Optimierung der Transfektionsbedingungen mit GFP

Für die anstehenden Versuche mit dem Luciferase Assay musste zunächst die optimale Transfektionseffizienz der Neuro2A Zellen ermittelt werden. Dies gelang unter Einsatz eines Vektors, der die DNA Sequenz für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) trägt. Bei GFP handelt es sich um ein Protein, welches bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Dieses Protein wurde erstmals von Shimomura et al. (1962) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe isolierte das Protein aus der Qualle *Aequorea victoria,* wobei auch weitere Tierarten, wie *Renilla reniformis*, ein GFP exprimieren. Die Primärstruktur des Proteins besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 26,9 kDa. Douglas Prasher gelang es, die cDNA von GFP zu isolieren und später als Marker für die Genexpression anderer Proteine zu benutzen (Prasher et al. 1992; Chalfie et al. 1994). Die GFP-DNA kann nun mit der DNA des zu untersuchenden Proteins fusioniert werden und als Vektor in eine Zelle eingebracht werden, sodass sie das Fusionsprotein selbstständig herstellt.

Mit dem Vektor pEGFP als Reportergen konnte in diesem Versuch die Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Als Transfektionsreagenz wurde Metafectene Pro (Biontex) verwendet. Dieses Optimierungsprotokoll stammt aus dem mitgelieferten Manual der Firma Biontex.

In eine 12 Well Zellkultur Platte wurden je Well 30.000 Neuro2A Zellen ausplattiert und in einem Milliliter DMEM/F12 (+ P/S, + Serum) kultiviert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO_2 waren die Zellen zu etwa 90% konfluent. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und erneut ein Milliliter DMEM/F12

(+ P/S, + Serum) auf die Zellen gegeben.

In einer 96 Well Platte wurden nun die Transfektionsansätze hergestellt. In jedes unten angegebene Well wurde zunächst 50 µl endotoxinfreies PBS pipettiert. Anschließend addiert und durch einmaliges Auf und Abpipettieren vorsichtig vermischt:

0,5 μg DNA in A1-A4 1,0 μg DNA in B1-B4 1,5 μg DNA in C1-C4 1, 2,4,6, μl Metafectene Pro in D1-D4 2,4,8,12 μl Metafectene Pro in E1-E4 4,8,12,16 μl Metafectene Pro in F1-F4

Beide Lösungen (A1+D1, A2+D2 etc., B1+E1, B2+E2 etc., C1+F1, C2+F2 etc.) durch einmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Dabei ist unbedingt zu beachten gewesen, dass die DNA Lösung zur Metafectene Pro Lösung gegeben wurde und nicht umgekehrt. Die so angesetzte Lösung wurde 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die nun gebildeten DNA-Lipid-Komplexe zu den Zellen gegeben und das Zellkulturgefäß vorsichtig geschwenkt. Nach 3 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ konnte der Test auf Reportergenaktivität durchgeführt werden, das heißt in diesem Falle die Begutachtung der Zellen unter dem UV-Fluoreszenzmikroskop.

3.2 Luciferase Assay

In dieser Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob die Aromatase Transkription durch Reelin beeinflusst wird. Mit Hilfe eines Reportergen-Assays wurden Promotorstudien durchgeführt. Promotoren sind bestimmte Bereiche der DNA, die die Transkription regulieren. Um die Regulation von Genprodukten zu messen, kann man das Reportergen als "Stellvertreter" für die Gene nutzen, die durch diesen Promoter reguliert werden.

Als Reportergene wurden Firefly und Renilla Luciferasen verwendet. Luciferasen sind Enzyme, die bestimmte Reaktionen katalysieren, bei denen unter anderem Licht entsteht und die natürlicherweise bei verschiedenen Tierarten wie z.B. dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (Firefly Luciferase) oder der Seefeder *Renilla reniformis* vorkommen und sie zu deren Biolumineszenz befähigen. Da Luciferase in Säugerzellen nicht exprimiert wird, sind nur geringe Hintergrundwerte im Assay zu erwarten.

Die Firefly Luciferase katalysiert in Gegenwart von ATP und Mg2+ die oxidative Decarboxylierung von Luciferin. Abbildung 10 veranschaulicht diese Reaktionen.



Abbildung 10 Darstellung der durch Firefly bzw. Renilla Luciferase katalysierten Reaktionen (Promega Technical Manual Dual-Glo® 4/2011)

Für die nachfolgenden Promotorstudien wurden die gewebsspezifischen Aromatase-Promotoren für das Gehirn und das Ovar vor das Reportergen Luciferase kloniert, um später deren Aktivität in Lumineszenz-Assays in An- und Abwesenheit von Reelin zu bestimmen. Die Firma Promega bietet neben dem Assay System mit nur einem Reportergen (Firefly Luciferase) auch einen dualen Reportergen-Assay an, bei dem zusätzlich die Renilla Luciferase eingesetzt wird. Der Einsatz eines zweiten Reportergens dient als interne Kontrolle und kann experimentelle Schwankungen wie Pipettierungenauigkeiten oder Unterschiede in der Transfektionseffizienz und Zelllyseeffizienz ausgleichen.

3.2.1 Herstellung der Vektoren für den Luciferase Assay

Zur Herstellung der Vektoren für den Luciferase Assay wurde vorliegende genomische DNA genutzt, die zuvor aus KGN Zellen isoliert worden war. Zur Amplifikation der DNA wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) nach dem Protokoll von Genaxxon® durchgeführt mit 1µg DNA als Template, 2µl Primer, 25µl Mastermixx und 21µl H₂O. Folgende Primer wurden zur Amplifikation der Gehirnbzw. Ovar-spezifischen Aromatase Promotorsequenzen verwendet:

Promotor	Primer-Sequenz	Richtung	Basen- paare
Brain Aromatase human	5' GCTAGCTATCCCAAAATATAAGCCACAAAGA3'	forward	
Brain Aromatase human	5′CTCGAGTGGGTCTGCTGGTCACTTCTAGT3′	reverse	1694
Ovar Aromatase human	5′GCTAGCTGAGCTTTATTTCTTATAATTTGGC3′	forward	
Ovar Aromatase human	5′CTCGAGCTGTGGAAATCAAAGGGACAGAA 3′	reverse	341
Brain TATA Aromatase	5' GCTAGCTATCCCAAAATATAAGCCACAAAGA3'	forward	
Brain TATA Aromatase	5′CTCGAGTAAAAAAATATATATGTCAGGGGCCAACA3′	reverse	1521

 Tabelle 3
 Primer Sequenzen der verwendeten Gehirn- bzw. Ovar-spezifischen Aromatase

 Promotoren
 Promotoren

Für spätere Versuche wurde der Gehirn-spezifische Aromatase Promotor mit deletierten Exon 1 aus humaner genomischer DNA (KGN Zellen) isoliert und äquivalent durch eine PCR amplifiziert. Die forward Primer für den Gehirn- und Ovarspezifischen Aromatase Promotor verfügen über eine Nhel Schnittstelle, die reverse Primer über eine Xhol Schnittstelle.

Klonierung von PCR Produkten in den Vektor pDrive

Die PCR Produkte wurden nach vorherigem Restriktionsverdau in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Mit Hilfe des Kits QIAquick Gel Extraction wurde die DNA aus dem Gel extrahiert und konnte anschließend nach dem Protokoll von Qiagen als blunt End Fragment in den pDrive-Vektor (Abb. 11) kloniert werden. Die Produkte der Ligation wurden in kompetenten Stämmen von *E.coli* transformiert. (Siehe unten)



Abbildung 11 Darstellung des pDrive Cloning Vektors http://www.qiagen.com/products/cloning/pcrcloningsystem/qiagenpcrcloningkit.aspx#T abs=t1, 18.07.2012, 14:03 Uhr)

Klonierung von DNA Fragmenten in den Vektor pGL3

Mittels den Nhel und der Xhol Schnittstellen wurde das PCR Fragment in den pGL3 basic Vektor umkloniert (Abb. 12, Abb. 13). Anschließend wurde eine Sequenzanalyse mit den Primern RV Primer2 und GLPrimer2 durchgeführt um die Identität des Klons zu überprüfen (Tabelle 4).


Abbildung 12 pGL3-Basic Vektor luc+ codiert für die modfizierte Firefly-Luciferase (http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgl3-luciferasereporter-vectors-protocol/ 18.07.2012, 14:26 Uhr)



Abbildung 13 Multiple Klonierungsregionen im pGL3 Basic Vektor

Gezeigt sind die upstream und downstream Klonierungsregionen der Primer GLprimer 2, RVprimer3 und RVprimer4) (http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgl3-luciferase-reporter-vectors-protocol/ 18.07.2012, 14:26 Uhr)

Primer	Primer-Sequenz
RV Primer3	5´ CTAGCAAAATAGGCTGTCCC 3´
GL Primer2	5'CTGCTATCAGTACGGGGCGCG 3'

Tabelle 4 Sequenzen der Primer RV Primer3 und GL Primer2

Amplifikation von Plasmid DNA

Zur Amplifikation wurden die Promotor-tragenden Plasmide in kompetente Bakterien des Stammes XL1 Blue kloniert.

Hierzu wurde ein Reaktionsgefäß mit 100 µl Bakterien aus der -80°C Kühlung entnommen und 10 Minuten lang vorsichtig unter mehrmaligen Schwenken auf Eis aufgetaut. Der jeweilige Vektor wurde auf 10 ng/µl verdünnt und auf die Bakterien gegeben, was meist einem Volumen von 0,5 bis 1 µl entsprach. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die Bakterien für 90 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt wurden und nachfolgend nochmals weitere 2 Minuten auf Eis gestellt.

Anschließend wurden die Bakterien mit 900 µl LB Medium versetzt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und dabei bei 220 rpm (Umdrehungen pro Minute) geschüttelt. Danach wurden sie eine Minute lang bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun bis auf 150 µl abgenommen und das Zellpellet in dem verbleibenden Volumen gelöst.

Auf je eine mit LB Agar + Ampicillin (100 mg/ml) (Ampicillin:LB Agar=1:1000) beschichtete Petrischale wurden einmal 20µl bzw. einmal 100 µl der Lösung gegeben und möglichst gleichmäßig mit einem sterilen Spatel auf dem Agar verteilt. Die so mit Bakterien benetzten Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Ampicillin, ein antibiotisch wirksamer Stoff aus der Gruppe der β-Lactam Antibiotika, diente als Selektionsmedium für nicht transformierte Zellen. Der Vektor pGL3 basic trägt zusätzlich die Information für eine Ampicillin Resistenz, sodass am Ende nur diejenigen Zellen überlebten, die den Vektor und damit die Resistenz aufgenommen haben.

Nach Ablauf dieser Zeit hatten sich einzelne Bakterienkolonien gebildet. Drei einzelne Kolonien wurden nun mit einer Pipettenspitze entnommen und in je 5 ml LB Medium mit 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) in ein 10 ml Falcon Röhrchen gegeben und dann über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

Anschließend wurden von einer Vorkultur 200 µl in einen Erlenmeyer Kolben mit 100 ml ampicillinhaltigen LB Medium gegeben. Dieser Kolben wurde nun ein weiteres Mal über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Der Inhalt des Kolbens wurde nun in zwei 50 ml Röhrchen gegeben und 15 Minuten lang bei 5000 Umdrehungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die verbliebenden Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C eingefroren.

Um die DNA endotoxinfrei zu isolieren, wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet und genau nach dem mitgelieferten Protokoll gearbeitet. Die Konzentration der DNA in der Lösung wurde anschließend im Photometer bestimmt.

Restriktionsenzymverdau

Nach Beendigung der Isolierung der DNA wurde mit Hilfe eines Enzymverdaus der Klonierungserfolg überprüft. Bestimmte Restriktionsenzyme zerschneiden den jeweiligen Vektor an definierten Stellen. Die so entstandenen Fragmente müssen nun im Fall einer erfolgreichen Klonierung mit denen der Ausgangsvektoren übereinstimmen. Die Größe der Fragmente konnte mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht und mit Hilfe eines 1 kb Markers bestimmt werden.

Als Restriktionsenzyme für die drei klonierten Vektoren wurden verwendet:

- Nhel und Xhol für den Gehirn-spezifischen sowie Ovar-spezifischen Aromatase Promotor
- Xhol und BamHl für den pGL3 basic Vektor

Je 0,5 μ I der Enzyme, außerdem 1 μ I der isolierten DNA, 2 μ I fast digest buffer (10 x FastDigest® Green Buffer, Fermentas) und 16 μ I H₂O wurden zusammen pipettiert und 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse der geschnittenen Plasmide wurden Gele mit 1% Agarose hergestellt. Das Agarosepulver wurde unter Aufkochen in der entsprechenden Menge TBE Puffer gelöst und anschließend in einer geringen Konzentration von 1:120 000 Ethidiumbromid hinzugegeben. Ethidiumbromid ist eine Substanz, die zwischen den Basen von DNA bzw. RNA interkaliert und zur Darstellung von Nukleinsäuren in der Gelelektrophorese verwendet wird.

Nach Erstarren des Gels in einer Gelkammer wurden die Proben, sowie ein 1 kb Referenzmarker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion und Dokumentation erfolgte unter ultraviolettem Licht.

3.2.2 Transfektion von Neuro2A Zellen

Ausgehend von den Vorversuchen mit dem pEGFP Vektor wurden die Neuro2A Zellen mit den Luciferase-Vektoren transfiziert. In einem 6 Well Kulturgefäß wurden 750.000 Zellen je Well ausplattiert und in 3ml Kulturmedium DMEM- F12 bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden waren die Platten etwa 80-90% konfluent und konnten mit den verschiedenen Vektoren transfiziert werden. Der Transfektionsansatz für ein Well bestand aus:

3,2 µg DNA in 450 µl endotoxinfreiem PBS

13 µl Metafectene Pro in 450 µl endotoxinfreiem PBS

und wurde nach Protokoll der Firma Biontex angefertigt. Nach 3 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Transfektion mit zwei Reportergenen (Firefly- und Renilla-Luciferase) wurde zunächst eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der unterschiedliche Verhältnisse von Firefly- zu Renilla-DNA von 50:50 bis 90:10 ausgetestet wurden (siehe Ergebnisteil).

Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in weiße 96 Well Platten zu 75 000 Zellen je Well in 100 µl Medium (nur Firefly Luciferase) oder 75 µl Medium (Firefly und Renilla Luciferase) umplattiert. Direkt in den Wells konnten die Zellen nun für unterschiedliche Zeitdauern mit Reelin stimuliert werden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen nach Protokoll von One Glo® bzw. Dual Glo® (Promega) lysiert und im Luminometer die Aktivität der Luciferase gemessen.

3.2.3 Transfektion von primären hippocampalen Zellen

Die primären hippocampalen Zellen wurden ebenfalls mit Metafectene Pro (Biontex) als Transfektionsreagenz transfiziert. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen, sofern nicht anders angegeben, 7 Tage in Kultur. Das Transfektionsprotokoll für die hippocampalen Zellen wurde freundlicherweise von Herrn Dipl. Biolog. Philipp Imholz zur Verfügung gestellt. In einem 12 Well Format, in dem die Zellen in einem Milliliter Neurobasal A Medium kultiviert wurden, wurde für ein Well folgender Transfektionsansatz hergestellt:

1 µg DNA in 50 µl PBS

4 µl Metafectene Pro in 50 µl PBS.

Hier erfolgte ebenfalls nach 3 Stunden ein Mediumwechsel. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitdauern stimuliert. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und 400 µl (One Glo®-Assay) bzw. 300 µl (Dual Glo® Assay) mit Reelin versetztes Neurobasal A Medium wieder auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Lyse nach Protokoll von Promega direkt in den Zellkulturgefäßen. Erst dann wurde das Zelllysat zu 100 µl bzw. 75 µl je Well in eine 96 Well Platte mit weißem Boden pipettiert, um die Luciferase-Aktivität im Lumineszenzgerät zu bestimmen.

3.2.4 Stimulierung der Zellen für den Luciferase Assay

Für die Luciferase Assay Versuche wurden die Zellen mit dem 20-fach aufkonzentrierten Reelin stimuliert, das aus den Überständen der transformierten HEK293 Zellen stammte. Das konzentrierte Reelin wurde für die Stimulation in Kulturmedium auf eine 1-fache Konzentration herunterverdünnt.

3.3 Semiquantitative PCR Analyse zum Nachweis von Reelin mRNA in Gonaden

Um die Menge an Reelin mRNA in verschiedenen Geweben von Ratte und Maus (Hoden, Nebenhoden, Ovar und Uterus) zu bestimmen, wurden semiquantitative PCRs durchgeführt. Dafür wurde zunächst mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) aus dem stickstoff-gefrorenen Gewebe die RNA extrahiert und ein DNase Verdau durchgeführt, um eventuell vorhandene genomische DNA zu eliminieren. Die reverse Transkription erfolgte mit einem Primer-Mix aus "Hexamer Random Primer" und "Poly-dT-Primer" in Gegenwart von 10 mM dNTPs, 5x FS-Buffer, 0,1 M DTT und SSII-RT. Die anschließende Amplifikation der Reelin-cDNA mittels PCR erfolgte in Gegenwart von 2µl cDNA, 6µl H₂O je 1 µl Primer (100 µmol) und 10 µl 2x Genaxxon-Master-Mix. Als interner Standard wurde entweder 18S, 13S oder Aktin in einem parallelen Ansatz amplifiziert. Die Primersequenzen sind in Tabelle 5 und 6 aufgelistet. Nach Ablauf der PCR für 27 (Reelin Primer) bzw. 20 (13S, 18S, Aktin) Zyklen wurden die Proben mit 4 µl 6x Loading Dye versetzt und auf ein 1,5% Agarose-Gel aufgetragen. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele dokumentiert und die Banden mit Hilfe des ImageJ Programms quantifiziert.

-

Primer Ratte	Sequenz	Richtung	Basenpaare
rat 18S	5´ GTGCCTACCATGGTGACCACGGG 3´	forward	400
rat 18S	5'GGACACTCAGCTAAGAGCATCGAG 3'	reverse	
rat reelin	5'GGGCTCCTGAGGAGGACTCGGCC 3'	forward	659
rat reelin	5'GCCATCCTCATTGAAGAAGAGGTTGT 3'	reverse	

Tabelle 5	Primersequenzen für die semiquantitative PCR Analyse (Ratte	e)
-----------	---	----

Primersequenzen für die semiquantitative PCR Analyse (Maus) Tabelle 6

Primer Maus	Sequenz	Richtung	Basenpaare
mu b-actin	5'CAGCCATGTACGTAGCCATCCAG 3'	forward	640
mu b-actin	5'GCCACCGATCCACACAGAGTACT 3'	reverse	
mu ribosom S13	5' TCATGGGTCGCATGCACGCTCC 3'	forward	475
mu ribosom S13	5'GCTTGTGCACACAACAGCATTTATGC 3'	reverse	
mu reelin	5'GTATGCAGTGACTCATGACCTGAC 3'	forward	510
mu reelin	5'CCTTCCAAGGACATCCATAAGTCAG 3'	reverse	
mu aromatase	5'GATGTATGGAGAGTTCATGAGAGT 3'	forward	685
mu aromatase	5'GCAATCAGCATCTCCAGTATGCAC 3'	reverse	

3.4 In Situ Hybridisierung

Mit der In Situ Hybridisierung können spezifische Nukleinsäuresequenzen in morphologisch fixierten Gewebeschnitten, Zellen oder Chromosomen detektiert werden. Dafür wird eine DNA- oder RNA-Sonde verwendet, die gegen die zu untersuchende Sequenz gerichtet ist.

3.4.1 Materialien für die In Situ Hybridisierung

Substanzen :		
Tyramide Signal	Stocklösung nach Protokoll (PerkinElmer) mit 0,15 ml Dimethyl	
Amplification (TSA)	Sulfoxid ansetzen, vor Verwendung in 1x Plus Amplification Diluent (im Kit enthalten) verdünnen.	
Proteinase K	Stocklösung nach Protokoll in Wasser (1mg/ml) ansetzen.	
BCIP und NBT	Zum Ansetzen der Färbelösung je 1:333 in DIG II Puffer verdünnen.	
Antikörper:		
Anti-Digoxigenin-AP,	Fab-Fragmente vom Anti-Digoxigenin-Antikörper (Schaf),	
Fab Fragments (Roche)	konjugiert mit Alkalischer Phosphatase)	
Anti-Digoxigenin-POD,	Fab-Fragmente vom Anti-Digoxigenin-Antikörper (Schaf),	
Fab Fragments (Roche)	konjugiert mit Meerrettichperoxidase (horse-radish peroxidase,	
	POD oder HRP)	

Sonden :

Digoxigenin-markierte Reelin mRNA-Antisense Sonde (synthetisiert mit T7 Polymerase Promotor) Digoxigenin-markierte Reelin mRNA- Sense Sonde (synthetisiert mit T3 Polymerase Promotor)

Lösungen:

DEPC Wasser 500 ml H2O 500 µl Diethylpyrocarbonat Über Nacht stehen lassen, autoklavieren

PBS (in DEPC Wasser)

1 Tablette PBS ("PBS Tablets" Gibco) in 500 ml DEPC Wasser lösen

Hybridisierungslösung

4x SSC 50% Formamid (molekularbiol. Grade) 5% Dextransulfalt 1x Denhardt´s Lösung 250µg/ml Heringsperm DNA 100 µg/ml E.coli tRNA

Blockierungslösung 3%

3g Blocking Reagent (Roche) ad 100 ml DIG I Puffer

TNB-Blockierungslösung

145,5 ml Blockierungslösung 3% (Roche) 4,5 ml NaCl 5 M

DIG I Puffer

100 mM Tris pH 7,5 150mM NaCL

DIG II Puffer

100 mM Tris pH 9,5 100 mM NaCl 50 MgCl2

20x SSC

3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat In DEPC Wasser lösen. Den pH mit HCl auf 7,0 einstellen, autoklavieren.

Herstellung der Sonden durch Alkalische Hydrolyse

Mittels der Alkalischen Hydrolyse wurden die bereitstehenden gegen Reelin gerichteten Digoxigenin-markierten Sonden, welche eine Länge von 1,278 kb aufwiesen, in Fragmente von je 400 bp Länge zerteilt. Dafür wurde zunächst die benötigte Inkubationszeit nach folgender Formel (Angerer et al. 1987) berechnet:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k \cdot L_0 \cdot L_f} = \frac{1,278 - 0,4}{0,11 \cdot 1,278 \cdot 0,4} = 15,6 min$$

mit

k= 0,11 cuts/kb/min L₀ Ausgangslänge in kb L_f gewünschte Länge in kb

Daraus ergab sich eine Inkubationszeit von 15,6 Minuten.

50 µl der Digoxigenin-markierten Probe wurde in 30 µl H₂O-DEPC, 10µl 0,4 M NaHCO₃ und 10µl 0,6 M Na₂CO₃ bei 60°C im Wasserbad für die genannte Inkubationszeit inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und durch Zugabe von 0,65 µl Eisessig und 3,3 µl 3 M NaAc pH 5,2 neutralisiert. Unter Zugabe von 3 Volumen absolutem Ethanol erfolgte die Fällung des Ansatzes über Nacht bei -20°C. Nach zweimaligem Waschen der RNA-Pellets mit 80% Ethanol und 15 minütigem Zentrifugieren bei 14000 rpm wurde die RNA bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 100 µl H₂O-DEPC aufgenommen. Mit dieser Methode wurden sowohl eine Sense- als auch eine Antisense-Sonde hergestellt.

3.4.2 Dot Blot

Mit einem Dot Blot können Proteine, in diesem Fall die verwendete RNA, mittels eines Antikörpers detektiert werden. Dafür wird die Probe punktförmig ("Dot") auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen ("Blot"). Ein primärer Antikörper bindet spezifisch an das zu detektierende Antigen, ein sekundärer Antikörper bindet dann an den primären und kann durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des Dot Blots sollte in diesem Fall die Konzentration der Sense- und Antisense-Proben für die In Situ Hybdridisierung ermittelt werden. Als Kontrolle wurde Digoxigenin markierte RNA aus dem DIG RNA Labeling Kit (Vial 5, 100 ng/µl) der Firma Roche verwendet. Mit RNAse freiem H₂O wurde mit dieser RNA zunächst eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10.000 erstellt. Die Sense- und Antisense Proben wurden je 1:10 und 1:100 verdünnt. Je 1 µl der verdünnten Kontrolle bzw. Proben wurde auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen. In einem Crosslinker Gerät (Ultraviolett Crosslinker "Amersham LIFE SCIENCE") wurde die Membran mit 1200 kJ/cm² inkubiert. Anschließend wurde sie 10 Minuten in DIG I Puffer gewaschen und dann für 30 Minuten in 1% Blockinglösung inkubiert, wodurch freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden. Nun wurde der Blockinglösung Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase in der Endverdünnung 1:5000 zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Membran erneut in DIG I Puffer gewaschen, 2 mal für 10 Minuten und dann nochmals für 5 Minuten in DIG II Puffer. Für die anschließende Färbereaktion wurden 66 µl NBT und 67 µl BCIP in 20 ml DIG II Puffer gelöst. Für etwa 20 Minuten wurde die Membran in die Färbelösung gelegt und sobald eine deutlich sichtbare Färbereaktion eintrat, mit *Aqua dest.* gespült und auf Filterpapier getrocknet.

3.4.3 Durchführung In Situ Hybridisierung

Gewebe

Für die Versuche wurden insgesamt zwei männliche Ratten im Alter von 12 Wochen und eine neugeborene männliche Ratte (P0) des Stammes Wistar verwendet. Nach Narkotisierung der Tiere wurden die Organe mit 4% PFA Lösung (Paraformaldehyd) perfusionsfixiert und die benötigten Organe, Gehirn und Nebenhoden, entnommen. Für eventuelle spätere Versuche wurden außerdem die Hoden entnommen. Nach Entnahme wurde das Gewebe bei 4 °C weiterfixiert und nach 24 Stunden in 25 % Succrose/PBS überführt. Sobald das Gewebe abgesunken war, hierzu musste es zunächst möglichst vollständig von Fett frei präpariert werden, wurde es in Isopentan eingefroren, welches zuvor auf Trockeneis heruntergekühlt wurde. Nach kurzem Durchfrieren konnte das Gewebe dem Isopentan entnommen werden und dann bei -80 °C verwahrt bzw. direkt auf dem Kryostat geschnitten werden.

Gewebeschnitte

Am Kryostat wurde das Gewebe in Schnitte von 16-22 µm geschnitten, wobei die Schnitte möglichst dünn sein sollten. Als geeignete Temperaturen zum Herstellen der Schnitte erwiesen sich -19°C für das Gewebe der 12 Wochen alten Ratten und -22°C

für das Gewebe der neugeborenen Ratten. Die Schnitte wurden direkt auf Objektträger aufgebracht und vor Verwendung mindestens 1,5 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Objektträger wurden nach dem Trocknen des Gewebes in eine Feuchtkammer gelegt. Am ersten Tag der In Situ Hybridisierung muss komplett frei von Ribonukleasen (RNasen) gearbeitet werden, d.h. alle verwendeten Lösungen und Materialien müssen zuvor entsprechend behandelt und vorbereitet werden. RNasen sind bestimmte Nukleasen, die die Spaltung von RNA in kleinere Fragmente katalysieren, ein Vorgang, der bei der in situ Hybdridisierung möglichst auszuschließen ist. Waschschritte finden entsprechend in Küvetten statt, die vorher bei 220°C gebacken und mit Alufolie abgedeckt wurden.

Quenchen der endogenen Peroxidase-Aktivität

Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu quenchen, wurden die Schnitte mit 1 % H₂O₂ in MeOH beträufelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 5 Minuten lang in PBS getaucht.

Permeabilisierung des Gewebes

Mit Proteinase K, einer Serinprotease welche usprünglich aus dem Schimmelpilz *Tritirachium album* isoliert wurde, wurde das Gewebe permeabilisiert. Die Arbeitslösung der Proteinase K wurde aus der Stocklösung (1mg/ml) 1:150 in PBS (DEPC) hergestellt und musste stets frisch angesetzt werden. Um die Aktivität der Proteinase K zu steigern, wurde der Arbeitslösung noch 0,5% Natriumlaurylsulfat (SDS) zugegeben. Die Proteinase K-Lösung wurde auf die Schnitte getropft, etwa 300 µl pro Objektträger, und verschiedene Inkubationszeiten zwischen 7 Minuten und 60 Minuten ausgetestet. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Schnitte in frischem PBS (DEPC) gewaschen und anschließend auf dem Heizblock bei 85 °C für 2 Minuten inkubiert. Nacheinander wurden die Schnitte dann für 5 Minuten in PBS (DEPC), für 2 Minuten in H2O (DEPC) und für 3 Minuten in 2x SSC (in H₂O DEPC) gewaschen.

Vorhybridisierung und Hybridisierung

Nach der Proteinase K Behandlung wurden die Schnitte in der Feuchtekammer zunächst mit 2x SSC/Hybridisierungspuffer (1:1) und nach kurzem Abtropfen mit

reinem Hybridisierungspuffer beträufelt, um dann für 60 Minuten bei 45°C inkubiert zu werden. Währenddessen wurden die Digoxygenin-markierten RNA-Sonden, **Reelin-Sense** und -Antisense. vorbereitet. Diese wurden thermisch in Hybridisierungspuffer bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz auf der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proben wurden 1:700 in auf 45°C erwärmten Hybridisierungspuffer verdünnt und je 300 µl pro Schnitt aufgetragen. Die Schnitte wurden mit einem Deckgläschen bedeckt und bei 45°C über Nacht inkubiert. Unspezifisch und überflüssig gebundene Sonden wurden anschließend durch aufeinanderfolgende Waschschritte entfernt, zunächst 20 min bei Raumtemperatur 2x in SSC. Die weiteren Waschschritte erfolgten bei 10°C über Hybridisierungstemperatur, also bei 55 °C: 25 min in 2x SSC/ 50% Formamid, 25 min in 0,2 x SSC/ 50 % Formamid, 25 min in 0,1 x SSC.

Antikörperbindung ohne TSA

Die Schnitte wurden für 60 min mit 3% Blockierungslösung in einer feuchten Kammer (Kunststoffschale ausgelegt mit *Aqua dest.* getränktem Filterpapier) inkubiert. Der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde 1:1500 in DIG I Puffer (pH 7,5) verdünnt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur, alternativ bei 4°C über Nacht, inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch 2 x 10 min Waschen bei Raumtemperatur in DIG I Puffer und 15 min Waschen in DIG II Puffer (pH 9,5) entfernt.

Visualisierung

Die erfolgte Hybridisierung wurde chromogen sichtbar gemacht und konnte unter dem Durchlichtmikroskop beurteilt werden. Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte somit durch die Bindung markierter Antikörper an das Digoxigenin der Sonde. Als Substrat für die an den anti-Digoxigenin-Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase diente der Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat, 4-toluidine Salz (BCIP). BCIP reagiert spontan mit Sauerstoff, wodurch eine wasserunlösliche violett-indigo artige Färbung eintritt. Anstatt von Sauerstoff können auch andere Elektronenakzeptoren zum Einsatz kommen, wie etwa der Stoff Nitro Blue Tetrazolium Chlorid (NBT), der auch in dieser Arbeit benutzt wurde. BCIP und NBT wurden je 1:333 in DIG II verdünnt und die Schnitte in Küvetten in die Färbelösung gestellt. Nach 2-4 Stunden war die Färbereaktion abgeschlossen und die überschüssige Lösung wurde mit *Aqua dest*. entfernt. An den Stellen, an denen die Sonde im Gewebe gebunden hatte, war eine Blaufärbung zu erkennen.

Antikörperbindung mit TSA

Bei TSA (engl.: Tyramide Signal Amplification) handelt es sich um eine von NEN Life Science patentierte Substanz, die sowohl chromogene als auch fluoreszierende Signale verstärkt. Das System ist angewiesen auf die Anwesenheit von HRP (engl.: Horseradish Peroxidase), welche die Anlagerung von Fluoreszenz-markiertem Tyramid Reagenz an Gewebeschnitte katalysiert. Die Reaktion erfolgt sehr schnell und führt dazu, dass mehrere Substratmoleküle von der HRP umgesetzt werden und ein Fluoreszenzsignal in der unmittelbaren Umgebung der Antikörperbindung erzielt wird. Mit Hilfe dieses Systems kann eine höhere Sensitivität des Fluoreszenzsignals, auch bei schwach exprimierten Proteinen, erreicht werden. Die Schnitte wurden für 60 min mit TNB-Blockierungslösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Ein mit HRP konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde in TNB-Puffer 1:100 verdünnt, zu 300µl je Schnitt aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte 3 x 5 min in TNT-Puffer gewaschen. Die TSA Stocklösung wurde 1:50 in 1x Plus Amplification Diluent verdünnt, zu 300 µl je Schnitt aufgetragen und 7 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschvorgang von 3 x 5 min in TNT-Puffer.

Visualisierung

Die mit TSA versetzten Schnitte konnten durch das mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierte Tyramid direkt in Mounting Medium eingedeckt und mit einem Floureszenz-Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss) dokumentiert werden.

Alternativ konnte eine chromogene Visualisierung für das Durchlichtmikroskop mittels NBC und BCIP, analog zu den Schnitten, die nicht mit TSA behandelt wurden, durchgeführt werden. Dafür musste die Alkalische Phosphatase wieder in das System eingebracht werden, was mittels einer Antifluorescein-Alkalischen Phosphatase erfolgte. Diese wurde 1:100 in TNB-Blockinglösung verdünnt, zu 300 µl je Schnitt aufgetragen und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssige Antifluorescein-Alkalische Phosphatase wurde durch 3x5 min Waschen in TNT-Puffer entfernt. Nun erfolgte die Färbereaktion wieder durch Umsetzung von BCIP und NBT durch die Alkalische Phosphatase.

3.5 In Situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Als sensitiverer Nachweis von Reelin im Gewebeschnitt wurde eine In Situ Hybridisierung mit einer mit ³⁵S UTP markierten Reelin-cRNA Sonde als radioaktivem Marker durchgeführt. Die Zusammenarbeit für diese In Situ Hybridisierung erfolgte mit Frau Dr. Susanne Fehr (ZMNH/ UKE) und Frau Prof. Dr. Felicitas Pröls.

Gewebe und Gewebeschnitte

Für die In Situ Hybridisierung mit radioaktivmarkierten Sonden wurde ebenfalls Nebenhodengewebe einer drei Monate alten Ratte des Stammes Wistar verwendet. Darüber hinaus wurden Gewebeschnitte von Maus-Uteri und -Ovarien angefertigt. Das Gewebe wurde direkt nach dem Präparieren in Trockeneispulver eingefroren und bei -70 °C gelagert. Am Kryostat wurden 16 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen auf -20°C gekühlten Superfrost Objektträger aufgebracht und anschließend wieder bei -70°C gelagert.

Fixieren der Schnitte

Die angefertigten Schnitte wurden in 4% Paraformaldehyd in PBS 10 Minuten lang bei 4°C fixiert und dann 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Acetylierung

Nach dem Fixieren wurden die Schnitte für 10 Minuten in Acetylierungspuffer acetyliert.

Acetylierunsgpuffer

Triethanolamin	0,1M
NaCl	0,9%
Essigsäureanhydrid	2,5 ml/l

Danach wurden die Schnitte für je 5 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben (60%, 80%, 90%, 100%), dann für 5 Minuten in Chlorform, nochmals in 100% Alkohol und daraufhin luftgetrocknet.

Vorhybridisierung

Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer gelegt und je 0,5-1 ml Vorhybridisierungspuffer aufpipettiert und 2-3 Stunden bei 50°C inkubiert.

Hybridierungspuffer

Entionisiertes Formamid	50%
20x Hybrdisierungssalze	5x
100 Denhardt´s Lösung	5x
10% SDS	0,2%
1 M DTT	10mM
Dextransulfat	10%
Heringsperm DNA	250 µg/ml
Hefe tRNA	250 µg/ml

20x Hybridisierungssalze

3 M NaCl, 0,1 M PIPES, 0,1 M EDTA, pH 6,8

100x Denhardt's Lösung

2% Ficoll, 2% Polyvinylpirrolidon, 2% BSA

Der Vorhybridisierungspuffer enthält die gleichen Bestandteile ohne Dextransulfat.

Hybridisierung

Nach der Inkubationszeit wurde der Vorhybridisierungspuffer vorsichtig ablaufen gelassen und dann je Objektträger 100 µl Hybridisierungspuffer mit 2x 10⁶ cpm (counts per minute) radioaktiv markierter Probe aufpipettiert. Die Schnitte wurden mit einem Deckgläschen bedeckt und bei 50 °C über Nacht inkubiert.

Waschen und RNase-Behandlung

Zum Waschen wurden die Objektträger in 4x SSC gehalten und die Deckgläser vorsichtig mit einer Pipette abgeschoben und dann 3 x 5 Minuten in 4x SSC gehalten, anschließend 30 Minuten in einem Puffer aus 0,5 M NaCl, 10mM Tris-HCL

pH 7,5, 1 mM EDTA und 40 µg RNase A/ml bei 37°C und nochmals 30 Minuten im gleichen Puffer ohne RNase bei 37°C gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger 2 x 15 Minuten in 2x SSC bei 50°C gewaschen.

Autoradiografie

Die Schnitte wurden nach dem Waschvorgang durch eine Alkoholreihe dehydriert und auf einen Röntgenfilm gelegt (Kodak Biomax MR). Die Exposition dauerte über Nacht bis mehrere Tage an. Danach erfolgte eine Beschichtung mit Kodak Emulsion, in dem die Objektträger in bei 42 °C geschmolzene Emulsion getaucht wurden und über drei Stunden getrocknet wurden. Die anschließende Exposition erfolgte für mehrere Tage bei 4°C in einem Kasten, der mit Trockenmitteln versehen war.

Entwickeln und Färben

Das Entwickeln der Bilder erfolgte bei 16 °C durch 5 Minuten Kodak D 19 Entwickler, 1 Min H2O, 2x 5 Minuten Kodak Unifix, 3x5 Minuten H2O, 5 Minuten Mayers Hämalaun. Dann wurden die Objektträger gespült, in 1% HCl/ 70% Äthanol entfärbt bis die Emulsion farblos war. Abschließend wurden die Schnitte durch Alkohol dehydriert, 2x 10 Minuten in Xylol gegeben und dann in Mounting Medium eingebettet.

4 Ergebnisse

4.1 Reelin Expression in den Gonaden

Mit Hilfe von semiquantitativen RT-PCR Reaktionen wurden in den Geweben vorhandene Mengen an Reelin mRNA amplifiziert und anhand eines internen Standards ("Housekeeping-" Gene 13 S, 18 S oder Aktin) quantifiziert. Für diese Analysen wurden Hoden- und Nebenhodengewebe von Tieren verschiedenen Alters (bei männlichen Tieren) oder Ovar- und Uterusgewebe verschiedener Zyklusphasen (bei weiblichen Tieren) isoliert.

4.1.1 Altersabhängige Reelin mRNA Expression im Nebenhoden

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse aus den PCRs mit Nebenhodengewebe von Ratten unterschiedlichen Alters von 2 bis 12 Wochen postnatal. Nach 10 und 12 Wochen sind die Reelin mRNA Mengen im Nebenhoden deutlich höher als in jüngeren Tieren (2 bis 8 Wochen).



Abbildung 14 Semiquantitative PCR Analyse: Altersabhängige Reelin mRNA Expression in Nebenhodengewebe der Ratte, n=1

A: Agarosegelelektrophorese mit Proben der jeweiligen PCR, Kontrollwert 18S B: Quantifizierung der in A dargestellten Banden mit Hilfe des Software Programms ImageJ. Die Reelin mRNA Banden wurden auf die jeweiligen 18S Mengen normiert.

4.1.2 Altersabhängige Reelin mRNA Expression im Hoden

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse aus den PCRs mit Hodengewebe von Ratten im Alter von 2 bis 12 Wochen dargestellt. Im Gegensatz zum Nebenhodengewebe zeigt sich hier klar eine mit zunehmenden Alter abnehmende Menge an Reelin RNA. Besonders deutlich sinkt die die Reelinexpression zwischen den Alterszeitpunkten 2 und 4 Wochen.



 Abbildung 15 Semiquantitative PCR Analyse: Altersabhängige Reelin mRNA Expression in Hodengewebe der Ratte, n=1

 A: Agarosegelelektrophorese mit Proben der jeweiligen PCR, Kontrollwert 18S
 B: Quantifizierung der in A dargestellten Banden mit Hilfe des Software Programms ImageJ. Die Reelin mRNA Banden wurden auf die jeweiligen 18S

4.1.3 Reelin Expression in verschiedenen Zyklusphasen in Gonaden der weiblichen Maus

Mengen normiert

Ebenfalls mittels semiquantitativer PCR sollte analysiert werden, ob es im Ovar und im Uterus weiblicher Mäuse zyklusabhängige Schwankungen in der Reelin mRNA Expression gibt. Der gonadale Zyklus der weiblichen Maus dauert 4 bis 5 Tage an und gliedert sich in die Phasen Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus. Diestrus dauert etwa 55 bis 57 Stunden (je nach Autor auch in Diestrus 1 und 2 aufgeteilt), Proestrus 12-14 Stunden, Estrus 25-27 Stunden, Metestrus 6-8 Stunden (Westwood 2008). Die Proestrus-Phase ist äquivalent zu der Follikularphase im menschlichen Menstruationszyklus und durch einen hohen Estrogenspiegel charakterisiert. Weiterhin sind auch LH, FSH, Prolaktin und Progesteron während des Proestrus erhöht. Die Ovulation findet während des Estrus statt, diese Phase ist äquivalent zur Lutealphase des Menschen. Metestrus und Diestrus-1 sind späte Lutealphasen, Diestrus-2 entspricht der Menstruationsphase (Schedin et al. 2000). Das Vaginalepithel der Maus unterliegt typischen morphologischen Schwankungen während der einzelnen Zyklusphasen. Mittels Vaginalabstrich und anschließender Beurteilung des Zellmaterials unter dem Mikroskop konnte die Zuordnung zu den Zyklusphasen erfolgen. Abbildung 16 zeigt hormonelle Veränderungen des Ratten-Zyklus. Vereinfacht wird in dieser Arbeit von der Vergleichbarkeit von weiblichen Maus- und Rattengonaden ausgegangen.



Abbildung 16 Relative Veränderungen der Serumhormonspiegel von Estrogen, Progesteron und Luteinisierenden Hormon (LH) während eines normalen 4 Tages Zyklus der Ratte (entnommen aus Schedin et al. 2000, S. 212)

4.1.4 Zyklusabhängige Reelin Expression im Ovar

Abbildung 17 zeigt die relative Menge von Reelin mRNA zu Aktin im Ovar der Maus während der einzelnen Zyklusphasen in geschlechtsreifen Mäusen. Die Menge an Reelin mRNA nimmt von Diestrus über Proestrus bis Estrus leicht zu und erreicht dann im Metestrus wieder das Ausgangsniveau.





Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Menge an Reelin mRNA und Aromatase mRNA im Ovar zu überprüfen, wurde ebenfalls eine semiquantitative PCR Analyse für Aromatase mRNA durchgeführt (Abb 18). Im Proestrus lässt sich gegenüber den übrigen Zyklusphasen ein Anstieg der Aromatase mRNA Menge erkennen, ein deutlicher Zusammenhang zwischen zyklusabhängiger Reelin und Aromatase Expression kann hier jedoch nicht gezeigt werden.



Abbildung 18 Semiquantitative PCR Analyse: Aromatase mRNA Expression im Ovar der Maus in verschiedenen Zyklusphasen Normierung mit Aktin

Quantifizierung der Banden aus der durchgeführten Gelelektrophorese mit Hilfe des Software Programms ImageJ, die Reelin mRNA Banden wurden auf die jeweiligen Aktin Mengen normiert, n=Anzahl durchgeführter Versuche

4.1.5 Zyklusabhängige Reelin Expression im Uterus

Abbildung 19 veranschaulicht die relative Menge an Reelin mRNA normiert auf S13 im Uterus der Maus. Im Diestrus ist die höchste Reelin mRNA Menge nachzuweisen, im Metestrus fällt die Reelin mRNA Menge etwa auf die Hälfte der Diestrus Menge ab. Im Proestrus zeigt sich hier eine deutlich geringere Reelin mRNA Expression als in den übrigen Zyklusphasen. Die parallel durchgeführten PCR-Analysen zum Nachweis von Aromatase ergaben, dass Aromatase zu keiner Zyklusphase im Uterus transkribiert wird.



Abbildung 19 Semiquantitative PCR Analyse: Reelin mRNA Expression im Uterus der Maus in verschiedenen Zyklusphasen Quantifizierung der Banden aus der durchgeführten Gelelektrophorese mit Hilfe des

Software Programms ImageJ, Reelin mRNA Banden wurden auf die jeweiligen 13S Mengen normiert, n=Anzahl durchgeführter Versuche

4.2 Radioimmunassay

Estradiol, das von Zellen synthetisiert wird, wird bei kultivierten Zellen in das umgebende Medium sezerniert. Mit Hilfe eines Radioimmunassays, mit dem auch kleinste Mengen an Hormonen detektiert werden können, sollte überprüft werden, ob die Zugabe von Reelin-haltigem Zellüberstand die Estradiolsekretion ins Medium moduliert. Als Kontrollstimulus wurde GFP-konditioniertes Medium verwendet. KGN Zellen, Neuro2A Zellen und primäre hippocampale Zellen wurden für verschiedene Zeitdauern mit GFP- bzw. Reelin-konditionierten Medium versetzt und die Zellüberstände nach entsprechender Inkubationszeit gesammelt. Da vorhandenes Serum den Radioimmunassay verfälschen kann, wurde auf die Zugabe von Serum in das Medium verzichtet. Mittels eines Radioimmunassays, der in Zusammenarbeit mit der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt wurde, wurde die vorhandene

Estradiolmenge aufgrund von internen Einflüssen wie unterschiedliche Zellvitalität zwischen einzelnen Versuchsreihen schwanken konnte, wurde hier zur besseren Übersicht stets das Verhältnis zwischen E2 im GFP-haltigen Medium (=Control) und E2 Gehalt im Reelin-haltigen Medium abgebildet. An diesem Verhältnis kann die relative Auswirkung von Reelin auf die Menge an sezerniertem Estradiol abgelesen werden. Es wurden stets die Mittelwerte der Kontrollgruppe (=GFP) mit den Mittelwerten der Testgruppen (=Reelin) der jeweilgen Stimulationszeiten verglichen. Als Fehlerbalken ist die Standardabweichung (\pm SEM) dargestellt. Mittels *Student's t-Test* wurde überprüft, ob sich die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (8h, 24h, 48h) signifikant vom Kontrollwert unterscheiden. Das Signifikanzniveau wurde auf α=0,05 festgelegt. Die Auswertung erfolgte mit dem Software Programm Excel. Da die Kontrollen (=GFP) in den Säulendiagrammen für jeden Zeitpunkt 100% entsprechen, ist zur besseren Übersicht in jedem Diagramm nur eine Säule als Kontrollwert dargestellt.

4.2.1 Radioimmunassay in den Zelllinien KGN und Neuro2A

Zunächst wurde der Assay an den Überständen von den Zelllinien KGN und Neuro2A durchgeführt. Bei beiden Zelllinien zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit GFP oder Reelin hinsichtlich der sezernierten E2 Mengen ins Medium (Abb. 20).



Abbildung 20 Radioimmunassay: Estradiol (E2)-Bestimmung in Überständen von KGN Zellen (A) und Neuro2A Zellen (B) nach Stimulation mit Reelin

Abgebildet ist die Ratio zwischen E2 Gehalt im GFP- konditionierten Medium (Control) und E2 Gehalt im Reelin- konditionierten Medium. A: KGN Zellen (n=2) B: Neuro2A Zellen (n=2), n=Anzahl durchgeführter Versuche

4.2.2 Radioimmunassay in gemischt weiblicher und männlicher primärer hippocampaler Zellkultur

Bei den Messungen der E2 Konzentration in den Überständen der primären hippocampalen Zellen zeigten sich uneinheitliche Ergebnisse. Zunächst wurden die Versuche an Zellkulturen durchgeführt, in denen Zellen ohne Berücksichtigung des Geschlechts isoliert und kultiviert worden waren. In der ersten durchgeführten Versuchsreihe konnte dabei ein signifikanter Unterschied zwischen der E2 Konzentration in der Kontrolle und der mit Reelin inkubierten Testgruppe nach 24 Stunden ermittelt werden (Abb. 21).



Abbildung 21 Radioimmunassay: Estradiol (E2)-Bestimmung in Überständen primärer hippocampaler Dispersionskulturen, gemischt weiblich und männlich, nach Stimulation mit Reelin (Versuch 1) Abgebildet ist die Ratio zwischen E2 Gehalt im GFP-konditionierten Medium (Control)

und E2 Gehalt im Reelin-konditionierten Medium (n=2), Stern=signifikanter Unterschied bei p<0,05, n=Anzahl durchgeführter Versuche

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die Versuchsreihe nur unter Berücksichtigung des 24h Wertes mehrfach wiederholt. Das deutliche Ergebnis aus Abbildung 21 war jedoch nicht reproduzierbar. Obwohl methodische Einflüsse konstant geblieben sind, zeigt sich in Abbildung 22 keine Beeinflussung der Estradiolkonzentration durch Reelin.





4.2.3 Radioimmunassay in getrennt weiblicher und männlicher primärer hippocampaler Zellkultur

Aufgrund der inhomogenen Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.2 wurde der Assay nochmals mit getrennt weiblichen und männlichen primären hippocampalen Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich tatsächlich ein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Zellen: Während es in den weiblichen Zellen keinen Unterschied zum Kontrollwert gibt (Abb. 23), zeigt sich in den männlichen Zellen eine signifikante Herunterregulation der Estradiolmenge bei Zugabe von Reelin.

An dieser Stelle kann jedoch bereits angemerkt werden, dass die großen Schwankungen möglicherweise unter anderem auch auf unterschiedlichen Zyklusphasen beruhen könnten, die hier nicht berücksichtigt wurden.





Abgebildet ist die Ratio zwischen E2 Gehalt im GFP- konditionierten Medium (Control) und E2 Gehalt im Reelin-konditionierten Medium (n=3), Stern=signifikanter Unterschied bei p<0,05, n=Anzahl durchgeführter Versuche

4.3 Untersuchung der Wirkung von Reelin auf die Aromatase-Transkription

Bender et al. (2010) haben gezeigt, dass die exogene Applikation von Estradiol auf hippocampale Schnitt Kulturen signifikant die Expression von Reelin in Cajal Retzius Zellen erhöht. Die Inhibition der Aromatase-Aktivität durch Letrozol verringerte hingegen die Expression von Reelin.

Es soll hier untersucht werden, ob Reelin im Umkehrschluss einen Effekt auf die Expression von Estradiol hat. Die lokale Estradiolsynthese wird durch mehrere Faktoren bestimmt, wie z.B. durch GnRH, die Estradiol-Konzentration selbst und die Aromatase-Aktivität. Aromatase ist ein wichtiges Enzym, das aus den Vorstufen Testosteron und Androstendion die Synthese von Estradiol katalysiert.

Mit Hilfe eines Luciferase Assays wurde zunächst untersucht, ob Reelin einen Effekt auf die Aromatase Transkription zeigt. Dafür wurden die im Folgenden beschriebenen Promotorstudien durchgeführt, bei denen die gewebespezifischen Aromatase-Promotoren für Gehirn (If) und Ovar (PII) vor das Reportergen Luciferase kloniert wurden und deren Aktivität in Lumineszenz-Assays in An- und Abwesenheit von Reelin bestimmt wurden. Die Versuche wurden an Neuro2A Zellen sowie an primären hippocampalen Zellkulturen durchgeführt.

4.3.1 Transfektionseffizienz in Neuro2A Zellen

Um die Neuro2A Zellen möglichst optimal mit den bereitstehenden Plasmiden zu transfizieren, wurde wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben zunächst anhand eines Optimierungsprotokolls das am besten geeignete Verhältnis von dem eingesetzten Transfektionsreagenz Metafectene Pro zur DNA überprüft (Abb. 24).



Abbildung 24 Transfektionseffizienz in Neuro2A Zellen mit Green fluorescent Protein (GFP)Mittels eines Optimierungsprotokolls wurden verschiedene Verhältnisse zwischenMetafectene Pro und DNA (Vektor eGFP) verglichen. 3x10⁴ Zellen je Well in einem 12Well Format (3,9 cm² Wachstumsfläche je Well)A: 1 µg DNA + 2 µl Metafectene Pro,B: 1 µg DNA + 4 µl Metafectene Pro,C: 1 µg DNA + 8 µl Metafectene Pro,D: 0,5 µg DNA + 1 µl Metafectene Pro,

Das Mengenverhältnis von DNA zu Metafectene Pro aus B und C wurde als optimal beurteilt und für die Luciferase Versuche verwendet. Dafür wurden die Verhältnisse für ein 6 Well Format mit 9,6 cm² Wachstumsfläche je Well umgerechnet (siehe Abschnitt 3.2.2).

Nach demselben Optimierungs-Protokoll wurde wiederholt eine Transfektion von KGN Zellen (humane Granulosazellen) versucht, allerdings ließ sich bei dieser Zelllinie keine nennenswerte Transfektionsrate erzielen, sodass in dieser Arbeit auf die Überprüfung der Promotoren in dieser Zelllinie verzichtet wurde.

4.3.2 Luciferase Assay

Nach Transfektion der Zellen mit den verschiedenen Vektoren und Stimulation mit Reelin wurden die Zellen in spezielle weiße 96 Well Platten umplattiert und dann im Luminometer gemessen (Abschnitt 3.2). Die Lichtemission wurde in jedem Well für 10 Sekunden detektiert. Für jeden Wert erfolgte eine Triplet-Bestimmung um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

Bei jedem Versuch wurden parallel Werte von Zellen gemessen, die nur mit dem Basisvektor pGL3 basic transfiziert wurden. In diesen Vektor wurden keine Promotoren hineinkloniert, sodass durch den Vergleich mit dem pGL3 basic Vektor alleinige Effekte durch den Klonierungsvektor ermittelt werden konnten. Weiterhin wurden stets Kontrollwerte mit nicht stimulierten Zellen gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte zunächst anhand eines Streudiagramms. Um mögliche Effekte von Reelin zu ermitteln, wurde für jede Versuchsreihe, für jeden Vektor und jeden Zeitpunkt einzeln das Verhältnis zu den jeweiligen Kontrollwerten (=ohne Stimulation) gebildet. Dann wurden für diese normierten Daten die jeweiligen Mittelwerte der Zeitpunkte gebildet. So konnte statistisch überprüft werden, ob sowohl zwischen den einzelnen Mittelwerten als auch zwischen den Mittelwerten und dem Kontrollwert signifikante Unterschiede bestehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 20.0 für Windows. Als statistisches Verfahren wurde eine Univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Adjustierung durchgeführt. Als Fehlerbalken ist stets die Standardabweichung der Mittelwerte (\pm SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf α =0,05 festgelegt.

4.3.2.1 Promotorstudien in Neuro2A Zellen

Etablieren der Vektoren in Neuro2A Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob sich in den Neuro2A Zellen bei definierten Zeitpunkten nach Stimulation mit Reelin Effekte in der Luciferase-Aktivität ergaben. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen nach einer Verweildauer von mehr als 24 Stunden in den 96 Wells vermehrt abstarben, sodass hier nicht länger als 24 Stunden stimuliert wurde.

Abbildung 25 zeigt ein Streudiagramm, welches die Streuung der gemessenen Lumineszenz über alle neun durchgeführten Versuche zeigt. Die Lumineszenz wird durch den Luminometer in RLU (*=Relative Luminescence Units*) angegeben. Die y-Achse ist zur besseren Übersicht logarithmisch skaliert. Es sind die Werte für alle vier eingesetzten Vektoren dargestellt: pGL3 basic ohne zusätzliche Sequenzen, pGL3 basic mit Gehirn-spezifischem Aromatase-Promotor (If), mit Ovar-spezifischen Aromatase Promotor (PII) und mit If mit deletiertem Exon 1 (If TATA).

In der Abbildung wird deutlich, dass die Werte für If deutlich unterhalb des pGL3 basic Vektors lagen. Darüber hinaus lag das Verhältnis der Lumineszenz von If zu PII in allen Versuchen mit Neuro 2A Zellen bei etwa 1:90 bis 1:100. Hier stellte sich die Vermutung über eine eventuelle Silencer Sequenz innerhalb des If Promotors, die für die geringere Expression der Luciferase und damit der Aromatase verantwortlich sein könnte. Eine solche Silencer Region wurde innerhalb des Exon 1, welches gewebespezifisch transkribiert wird, vermutet. Somit wurde ein neuer Vektor ohne das Exon 1 konstruiert, bei dem die Sequenz für das Aromatase Gen direkt auf die TATA-Box innerhalb des Vektors folgt (If TATA, siehe Abschnitt 3.2). Die RLU lag dennoch auch nach der Transfektion mit dem neuen If TATA Vektor auf demselben Niveau wie nach der Transfektion mit If (siehe Abb. 25).





Stimulationszeit (Reelin): 0= ohne Reelin, 1=1,5h, 2=3h, 3=24h RLU=Relative Luminscence Units; y-Achse logarithmisch skaliert

4.3.2.2 Einfluss von Reelin auf die Aromatase Transkription in Neuro2A Zellen

Die Absolutwerte der Lumineszenz zwischen den einzelnen Versuchen schwankten relativ stark (Abb. 25), was durch unterschiedliche Zellvitalitäten oder unterschiedliche Chargen der verwendeten Chemikalien und Substrate zu erklären ist. Um jedoch alle Versuche vergleichen zu können, war es sinnvoll, die relative Auswirkung von Reelin nach den unterschiedlichen Stimulationszeiten (1,5 h, 3 h, 24 h) ins Verhältnis zum Kontrollwert zu setzen. So kann in Abbildung 26 die Auswirkung von Reelin nach unterschiedlichen Stimulationszeiten in Prozent zum

Kontrollwert abgelesen werden. Es sind die Mittelwerte über alle durchgeführten Versuche dargestellt, jeweils für pGL3 basic, If, PII und If TATA. Es zeigt sich bei keinem der vier Vektoren ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Stimulationszeiten.



Abbildung 26Neuro2AZellentransfiziertmitFireflyLuciferaseVektoren(pGL3basic,Promotor If, Promotor PII, Promotor If TATA), stimuliert mit ReelinRelative Luciferase Aktivität in % des Control-Wertes, Control= unstimulierte Zellen75x10⁴ Zellen in einem 6 Well Format transfiziert mit 3,2 μg DNA, umplattiert nach 3Tagen in Kultur in 96 Well Luminometer-Platte zu 7,5 x10⁴ Zellen in 100 μl DMEM-F12(+5%FBS, Penicillin/Streptomycin), stimuliert mit3,75 μl20-fach konzentriertemReelin(konditionierterÜberstandvonReelin-transformiertenHEK-Zellen),Verwendung des OneGlo® Systems (Promega), Lichtemission über 10s gemessen,statistische Analyse mit ANOVA, n=Anzahl durchgeführter Versuche

Es konnte in den Neuro2A Zellen mittels Luciferase Assay zu den gemessenen Stimulationszeitdauern keine signifikante Regulation der Luciferase Aktivität und damit der Aromatase Transkription durch Reelin gezeigt werden. Die Werte lagen in allen gemessenen Zeitunkten bei allen verwendeten Vektoren auf dem Niveau des Kontrollwertes.

4.3.2.3 Renilla Luciferase als interner Standard in Neuro2A Zellen

Um zuverlässigere Werte zu erhalten und die Standardabweichungen innerhalb der Messungen möglichst klein zu halten, können die Zellen zur internen Kontrolle gleichzeitig mit einem Vektor transfiziert werden, der die Sequenz für Renilla Luciferase enthält. Durch Bildung des Verhältnisses zu Firefly Luciferase können nun Streuungen durch Zelltod oder verminderte Transfektionsraten gering gehalten werden. Diese Normierung ist insbesondere für sehr empfindliche Zellen, wie primäre Zellkulturen, sinnvoll. Aufgrund geringer Verfügbarkeit von primären Zellen wurde das System zunächst in Neuro2A Zellen etabliert. Abbildung 27 zeigt eine Reihe von verschiedenen Verhältnissen zwischen Firefly und Renilla Luciferase, mit denen Neuro2A Zellen transfiziert wurden und die jeweils resultierende Lumineszenz.



Abbildung 27 Neuro2A Zellen Verhältnisoptimierung Firefly /Renilla Luciferase

75x10⁴ Zellen in einem 6 Well Format transfiziert mit 3,2 μg DNA (verschiedene Verhältnisse von Renilla: Firefly Luciferase), umplattiert nach 3 Tagen in Kultur in 96 Well Luminometer-Platte zu 7,5 x10⁴ Zellen in 75 μl DMEM-F12 (+5%FBS, Penicillin/Streptomycin), Verwendung des Dual Glo® Systems (Promega), Lichtemission über 10s gemessen RLU= Relative Luminescence Units

Die höchste Lumineszenz ergab sich bei einem Verhältnis von Firefly zu Renilla von 90:10. Durch die ohnehin hohe Transfektionseffizienz in den Neuro2A Zellen und die Unempfindlichkeit dieser Zelllinie war kein großer Effekt durch den Einsatz von Renilla zu erwarten, was Abbildung 28 für das Beispiel von mit PII transfizierten Zellen zeigt. Es wurde zunächst die Ratio Firefly/Renilla gebildet und dann wieder auf den Kontrollwert normiert. Es zeigt sich bei diesen Verhältnissen kein Unterschied zwischen dem ausschließlichen Einsatz von Firefly Luciferase oder dem Einsatz von Firefly und Renilla Luciferase.



Abbildung 28 Neuro2A Zellen Vergleich Firefly und Firefly/Renilla (90:10) in Pll

Relative Luciferase Aktivität in % des Control-Wertes, Control= unstimulierte Zellen 75x10⁴ Zellen in einem 6 Well Format transfiziert mit 3,2 µg DNA, umplattiert nach 3 Tagen in Kultur in 96 Well Luminometer-Platte zu 7,5 x10⁴ Zellen in 75 µl DMEM-F12 (+5% FBS, Penicillin/Streptomycin), Verwendung des Dual Glo® Systems (Promega), Lichtemission über 10s gemessen, n=1 (beispielhafte Darstellung eines Versuches), Standardabweichungen entstehen durch Triplet-Messung RLU= Relative Luminescence Units, n=Anzahl durchgeführter Versuche

4.3.2.4 Promotorstudien in Zellen des Rattenhippocampus

Ein möglicher Effekt von Reelin auf die Aromatase Transkription sollte zusätzlich in primären Zellen überprüft werden. Es wurden Hippocampuszellen von Ratten (Wistar) vom Embryonaltag 18 (E18) verwendet, wobei in den Kulturen sowohl weibliche als auch männliche Zellen enthalten waren.

Etablieren der Vektoren in hippocampalen Zellen

Auch für die Versuche mit den hippocampalen Zellen wurde ein Streudiagramm erstellt, welches die Höhe der RLU für die einzelnen Vektoren veranschaulicht sowie einen Vergleich zwischen den Vektoren ermöglicht (Abb. 29). Während in den Neuro2A Zellen das Verhältnis der Lumineszenz zwischen If und PII bei etwa 1:100 lag, ist die relative Lumineszenz zwischen beiden Vektoren in den hippocampalen Zellen auf vergleichbar hohem Niveau. Wichtig anzumerken ist weiterhin, dass der Einsatz des Vektors If in den hippocampalen Zellen im Gegensatz zu den Neuro2A Zellen immer Werte deutlich oberhalb des pGL3 basic Vektors ergab. Unter If TATA konnte nur eine sehr geringe Lumineszenz deutlich unterhalb von pGL3 basic erzielt werden.

Insgesamt wurde in den hippocampalen Zellen absolut eine niedrigere Lumineszenz erzielt, was mit der schlechteren Transfektionseffizienz primärer Zellen einhergeht. Aufgrund von geringerer Verfügbarkeit von primären Zellen wurden zunächst nur Stimulationszeiten mit Reelin von 1,5 und 3 Stunden gemessen.



Abbildung 29 Streudiagramm: Streuung der gemessenen Firefly RLU in primären hippocampalen Zellen nach Stimulation mit Reelin Stimulationszeit (Reelin): 0= ohne Reelin, 1=1,5h, 2=3h RLU=Relative Luminscence Units; y-Achse logarithmisch skaliert

4.3.2.5 Einfluss von Reelin auf die Aromatase Transkription in hippocampalen Zellen

In Abbildung 30 ist die Auswirkung von Reelin auf die Luciferase Aktivität in hippocampalen Zellen dargestellt. Um mehrere Messreihen vergleichen zu können, wurde ebenso wie in den Neuro2A Zellen auf den Kontrollwert (=ohne Stimulation) standardisiert. Es kann nun in Prozent die relative Auswirkung von Reelin abgelesen werden. Signifikante Unterschiede bestehen bei pGL3 basic zwischen Control und 1,5 Stunden Reelin Stimulation. Weiterhin ist bei PII die Luciferase Aktivität nach 3 Stunden signifikant höher als der Kontrollwert, bei If TATA ist die Luciferase Aktivität



nach 1,5 Stunden signifikant höher als der Kontrollwert. Bei If zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 30 Hippocampale Zellen transfiziert mit Firefly Luciferase Vektoren (pGL3 basic, Promotor If, Promotor PII, Promotor If TATA), stimuliert mit Reelin

RLU=Relative Luminescence Units, Control= unstimulierte Zellen,

statistische Analyse mit ANOVA, Stern=signifikanter Unterschied bei p<0,05

4.3.2.6 Renilla Luciferase als interner Standard in hippocampalen Zellen

Aufgrund der im Vergleich zu den Neuro2A Zellen schlechteren Transfektionseffizienz der primären hippocampalen Zellen und einer höheren Empfindlichkeit wurde zusätzlich Renilla Luciferase als interner Standard eingesetzt, was zuvor in den Neuro2A Zellen etabliert wurde. Abbildung 31 zeigt eine Verhältnisoptimierung zwischen eingesetztem Firefly und Renilla Luciferase Vektor in den hippocampalen Zellen. Durch geringere Verfügbarkeit von primären Zellen wurde hier auf ein größeres Optimierungsprotokoll verzichtet und lediglich die Verhältnisse 50:50, 90:10 und nur die Renilla Aktivität überprüft. Dabei ergab das Verhältnis 90:10 zwischen Firefly und Renilla Luciferase die höchste Luciferase Aktivität. Dieses Verhältnis wurde für die Transfektion in Folgeversuchen eingesetzt.



Abbildung 31 Verhältnisoptimierung Firefly : Renilla Luciferase in Primären Hippocampalen Zellen

Hippocampale Zellen, Ratte Wistar∂ und ♀, E18, 7 Tage in Kultur, 48 Well Format, 6x10⁴ Zellen je Well in 0,5 ml Neurobasal A Medium , nach Lysieren mit Dual Glo® System Überführung in 96 Well Luminometer Platten, Lichtemission über 10s gemessen

RLU=Relative Luminescence Units

In Abbildung 32 sind für zwei Versuchsdurchführungen die normierten Firefly/Renilla Werte dargestellt, wieder bezogen auf den Kontrollwert. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden, allerdings sei dabei auch auf die geringe Anzahl von Versuchen von n=2 hingewiesen.


Abbildung 32 Hippocampale Zellen transfiziert mit Firefly Luciferase Vektoren (pGL3 basic, Promotor If, Promotor PII, Promotor If TATA) und Renilla Luciferase (90:10), stimuliert mit Reelin

Hippocampale Zellen, Ratte Wistar \circlearrowleft und \bigcirc , E18, 7 Tage in Kultur, 24 Well Format, $12x10^4$ Zellen je Well in 1 ml Neurobasal A Medium, stimuliert mit 20fach konzentriertem Reelin aus transformierten HEK-Zellen, nach Lysieren mit DualGlo® System Überführung in 96 Well Luminometer Platten, Lichtemission über 10s gemessen, standardisiert auf pGL3 und Control

RLU=Relative Luminescence Units, Control=unstimulierte Zellen,

statistische Analyse mit ANOVA, n=Anzahl durchgeführter Versuche

4.4 Identifizierung der Reelin-produzierenden Zellen

4.4.1 In Situ Hybridisierung

Wie in Abschnitt 4.1. beschrieben, ließ sich durch semiquantitative PCR Analyse ein deutlicher Anstieg von Reelin RNA im Nebenhoden einer 12 Wochen alten Ratte nachweisen. Um das regionale Verteilungsmuster der Reelin mRNA im Nebenhoden zu untersuchen, wurde Nebenhodengewebe von 12 Wochen alten Ratten mit Hilfe der Methode der In Situ Hybridisierung analysiert. Als Sonde wurde eine mit Digoxigenin markierte RNA-Sonde angefertigt, die gegen die mRNA von Reelin gerichtet war. Die Visualisierung erfolgte sowohl chromogen mit NBT und BCIP (siehe Abschnitt 3.4) als auch fluoreszierend. Als Positivkontrolle diente das Gewebe vom Gehirn neugeborener Ratten (P0), in deren Cortices aufgrund der noch vorhandenen Cajal-Retzius-Zellen Reelin nachzuweisen war (D'Arcangelo et al. 1995; Derer & Derer 1990). Es wurde durchgehend mit Antisense- und Sense-Sonden gearbeitet, um echte Signale von eventuell auftretender Hintergrundfärbung unterscheiden zu können.

Dot Blot

Mit Hilfe eines Dot Blots (siehe Abschnitt 3.4.2) wurde die Markierungseffizienz der jeweiligen Sense- und Antisense-Sonde ermittelt. Anhand der chromogenen Intensität der Proben auf dem Filterpapier konnte die Sondenmarkierung abgeschätzt und insbesondere das Verhältnis von Sense zu Antisense bestimmt werden. Dabei ergab sich, dass die Sense Probe deutlich besser markiert war als die Antisense Probe (etwa im Verhältnis 10:1, siehe Abb. 33). Da die Sense Proben im behandelten Gewebe trotz erheblich besserer Markierung kein Signal ergaben, stellen sie in jedem Fall eine gültige Kontrolle dar.



Abbildung 33 Dot Blot mit Sense- (T3) und Antisense- (T7) Sonde

4.4.1.1 Reelin im Gehirn

In den Gewebeschnitten aus den Gehirnen der P0 Ratten ließen sich deutlich Zellen über den gesamten Cortex anfärben. In diesen Bereichen hatte die Antikörperbindung an Reelin mRNA stattgefunden. Die Visualisierung von Reelin mRNA erfolgte nur in den mit T7 behandelten Schnitten und blieb in den mit T3 behandelten Schnitten aus, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die verwendeten Sonden ein gutes Signal ermöglichen (siehe Abb. 34). Das Signal in dem P0 Gehirn war bereits in einer 10-fachen Vergrößerung deutlich unter dem Mikroskop zu erkennen.



Abbildung 34: Reelin mRNA lässt sich durch In situ Hybridisierung im Rattengehirn darstellen, Funktionsfähigkeit der verwendeten Sonden,

Standardprotokoll (siehe Abschnitt 3.4.3)

Die Aufnahmen zeigen 20 µm dicke Gewebeschnitte aus einem P0 Rattengehirn, männlich, Visualisierung mit NBT und BCIP. Die T7 Probe (Antisense-Sonde) weist eine deutliche Anfärbung von Reelin mRNA in Zellen des Cortex auf (Pfeile) während die T3 Probe (Sense-Sonde) keine spezifischen Anfärbungen zeigt. Balken=500 µm

4.4.1.2 Optimierung des Signals in der In Situ Hybridisierung

Im gonadalen Gewebe konnte mit Hilfe des Standardprotokolls jedoch kein Signal erhalten werden. Um ein optimales Signal zu Hintergrund Verhältnis bei größtmöglicher Sensitivität zu erzielen, wurde der Versuchsaufbau mit verschiedenen Parametern optimiert, welche hier anhand von Bildern (Abb. 35) aus dem Gehirn exemplarisch dargestellt werden sollen. Die Optimierung erfolgte parallel ebenso in den Präparaten des Nebenhodens. Zunächst wurde mit der Serinprotease Proteinase K gearbeitet, um ungewollte RNA-Nukleasen zu eliminieren (Lizardi & Engelberg 1979).

In den ersten Durchläufen wurde zunächst die optimale Inkubationszeit der Gewebeschnitte mit Proteinase K ermittelt. Dafür wurden Inkubationszeiten von 0 min (=ohne Proteinase K), 3,5 min, 7 min, 15 min, 30 min und 60 min gewählt.

Bis zur 15 minütigen Inkubationszeit ließ sich das Signal verstärkt darstellen, eine Inkubationszeit darüber hinaus ergab keine weitere Verstärkung des Signals, sodass in Folgeversuchen stets ein 15 minütiger Proteinase K Verdau durchgeführt wurde (siehe Abb. 35).



Abbildung 35 In Situ Hybridisierung, Optimale Inkubationszeit mit Proteinase K 20 µm dicke Gewebeschnitte aus einem P0 Rattengehirn, männlich, Visualisierung mit NBT und BCIP, alle Schnitte mit T7 (Antisense) behandelt. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten mit Proteinase K überprüft. Nach 15 Minuten Inkubationszeit erscheint das Signal im Cortex am deutlichsten. Balken= 500µm

Um die Aktivität der Proteinase K zu optimieren, wurde der Arbeitslösung im weiteren Verlauf 0,5 % SDS hinzugefügt (Hilz et al. 1975). Abbildung 36 zeigt das Ergebnis der hierdurch erzielten Verbesserung.

Im Folgenden wurde dann wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben mit der Verstärkersubstanz TSA gearbeitet, um eventuell schwache Signale verstärkt sichtbar machen zu können (van Gijlswijk et al. 1996). In den P0 Gehirnen ließ sich das bisherige Signal im Cortex verstärkt darstellen, wobei allerdings zusätzlich auch eine stärkere Hintergrundfärbung zu beschreiben ist (Abb. 36).

Zusätzlich wurde bei einigen Schnitten die Fluoreszenz-Farbstoff Markierung des eingesetzten Tyramids genutzt, um das Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellen zu können.

An dieser Stelle kann festgehalten werden, dass die Visualisierung des Reelin Signals im Gehirn in sämtlichen Schritten gelang und durch die eingesetzten Optimierungsparameter zusätzlich verbessert werden konnte.



Abbildung 36 In Situ Hybridisierung: Optimierung mit SDS, TSA und Fluoreszenz-Farbstoff 18 µm dicke Gewebeschnitte aus einem P0 Rattengehirn, männlich, jeweils T7 und T3 Proben im Vergleich, Balken jeweils= 500µm

- A Inkubation zusätzlich mit SDS, Visualisierung mit NBT und BCIP
- B Inkubation zusätzlich mit TSA, Visualisierung mit NBT und BCIP
- C Visualisierung mittels Fluoreszenz-Markierung des verwendeten Tyramids

4.4.1.3 Reelin im Nebenhoden

Der Nachweis und die Visualisierung von Reelin mRNA durch In Situ Hybridisierung stellte sich im Nebenhoden sehr viel schwieriger dar als im Gehirn, da die Signale insgesamt schwächer ausfielen und in feineren Gewebestrukturen auszumachen waren. Es wurden dieselben Optimierungen, die an den P0 Gehirnschnitten erfolgten, parallel auch im Nebenhoden vorgenommen. Diese werden an dieser Stelle jedoch nicht separat dargestellt, da die verbesserte Darstellung des Signals durch die eingesetzten Parameter im Gehirn eindeutiger zu erkennen war.

Abbildung 37 zeigt Beispiele von Gewebeschnitten, an denen Signale im Nebenhoden zu erkennen sind. Sofern in den Versuchen ein Signal im Nebenhoden zu erkennen war, stellte sich dieses im basalen Anteil des Epithels als dunkel gefärbtes Areal dar. In einer Versuchsreihe konnte ein Signal in den Spermien innerhalb des Ductus gezeigt werden. Die jeweiligen T3 Kontrollen zeigten in den vorliegenden Beispielen kein oder nur ein schwaches Signal.

In einer fluoreszierenden Aufnahme (Abb. 38) konnte ebenfalls ein Signal in der T7 Probe gezeigt werden. Das Signal zeigt sich in Form von fluoreszierenden Punkten, verteilt über das gesamte Epithel.

Insgesamt muss jedoch an dieser Stelle festgehalten werden, dass die Darstellung eines Signals im Nebenhoden nicht zu jedem Zeitpunkt in dieser Eindeutigkeit reproduzierbar war, wie in diesen Beispielen gezeigt. Wiederholt gab es Schnitte, bei denen weder in T7 noch in T3 ein eindeutiges Signal zu erkennen war.

Interessant war weiterhin, dass es häufig innerhalb eines Präparates positive und negative Areale gegeben hat, das heißt, es lagen mehrere Anschnitte des Ductus epididymis vor, in denen eine Färbung im Epithel oder in den Spermatozoen stattgefunden hat neben einer Gruppe von Anschnitten, in denen überhaupt keine Färbung stattgefunden hat. Dabei war es nicht der Fall, dass es einen fließenden Übergang von gefärbten über weniger gefärbte zu ungefärbten Anschnitten gab. Vielmehr gab es stets eine scharfe Begrenzung und einen abrupten Wechsel zwischen gefärbten und ungefärbten Arealen. Zudem gab es wiederholt Bereiche, in denen entweder nur im Epithel oder nur in den Spermatozoen ein Signal auszumachen war. Abbildung 39 zeigt ein typisches Beispiel dieser Beobachtung. Auf der rechten Bildhälfte sind Ductusanschnitte zu erkennen, in denen deutlich eine violette Färbung im Nebenhodenepithel stattgefunden hat, in der linken Bildhälfte ist bis auf eine helle, gleichmäßige Hintergrundfärbung keine spezifische Färbung bestimmter Strukturen zu erkennen. Die Begrenzung zwischen diesen Arealen ist scharf und zusätzlich durch eine gestrichelte Linie kenntlich gemacht. Dieser Sachverhalt wird sich an späterer Stelle in der radioaktiven ISH wiederholen.



Abbildung 37 In Situ Hybridisierung Reelin im Nebenhoden, Anschnitte des Ductus Epididymis

25 μm dicke Gewebeschnitte, Nebenhoden einer 12 Wochen alten Ratte, jeweils T7 und T3 im Vergleich

A Gewebeschnitte inkubiert mit Proteinase K 15 Minuten, Visualisierung mit NBT und BCIP, Balken=200 μm

B Ausschnittvergrößerung von A, Pfeile deuten auf die basalen angefärbten Areale des Ductus Epididymis

C Gewebeschnitte inkubiert mit Proteinase K 15 Minuten+SDS+TSA, Visualisierung mit NBT und BCIP, innerhalb der Ductuli sind Signale im Bereich der Spermatozoen zu erkennen (weiße Pfeile)

Α

В



Fluoreszenz-Markierung, Balken=50 µm B Ausschnittvergrößerung von A



Abbildung 39

In Situ Hybridisierung im Nebenhoden, Anschnitte des Ductus Epididymis, inhomogenes Signal 25 µm dicke Gewebeschnitte, Nebenhoden einer 12 Wochen alten Ratte, männlich. In der rechten Bildhälfte erkennt man deutlich angefärbte Areale im basalen Bereich des Epithels, während in der linken Bildhälfte nur eine schwache Hintergrundfärbung zu erkennen ist (Bereiche durch Markierung getrennt), Balken = 200 µm

im

4.4.2 Radioaktive In Situ Hybridisierung

Parallel zu den Optimierungsversuchen der nicht-radioaktiven In Situ Hybridisierung wurde auch die hochsensitive radioaktive In Situ Hybridisierung durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte jeweils parallel mit einer Dunkelfeld- und einer Hellfeldaufnahme der Präparate. Unter Durchführung dieses Protokolls konnte nun zweifelsfrei Reelin im Nebenhoden visualisiert werden. Das Signal bildet in diesem Fall eine Ansammlung von Punkten, die in der Dunkelfeldaufnahme hell und in der Hellfeldaufnahme schwarz erscheinen.

Zur Veranschaulichung sind in den unten stehenden Abbildungen jeweils die zusammengehörigen Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahmen gegenübergestellt.

Zusätzlich zum Nebenhoden wurde die Reelin mRNA im Uterus und im Ovar von 12 Wochen alten weiblichen Ratten lokalisiert.

4.4.2.1 Reelin im Nebenhoden

Tendenziell fanden sich die Signale eher am apikalen Pol des Epithels und im Lumen des Ductus epididymis und weiterhin erneut sehr eindrücklich in den Spermatozoen. Die T3 Kontrolle wies keinerlei Signal auf. Abbildung 40 veranschaulicht diese Befunde. Ähnlich wie in der In Situ Hybridisierung unter Abschnitt 4.4.1.3 beschrieben, ließen sich auch in der radioaktiven In Situ Hybridisierung Bereiche darstellen, in denen signalreiche Ductusabschnitte scharf begrenzt neben Abschnitten ohne Signal zu finden waren (siehe Abb. 41). In der Dunkelfeldaufnahme ist dieser Unterschied deutlicher zu erkennen als in der Hellfeldaufnahme. Weiterhin lassen Abbildung 40 und 41 erkennen, dass es, ähnlich wie in der chromogenen In Situ Hybridisierung wiederum Bereiche gab, in denen nur eine Anfärbung im Bereich des Epithels beziehungsweise nur eine Anfärbung in den Spermatozoen stattgefunden hat.



Abbildung 40 Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im Nebenhoden. Nebenhoden einer 12 Wochen alten Ratte, jeweils eine Dunkelfeldaufnahme (=DF) und eine Hellfeldaufnahme (=HF) im Vergleich. A) Antisense-Sonde, Die Pfeile deuten auf die schwarzen Punkte, hauptsächlich im Bereich des apikalen Bereich des Epithels der Ductuli hin, die in diesem Fall das Signal darstellen. B) Antisense-Sonde, In dieser Probe weisen die Spermatozoen innerhalb des Lumens ein positives Signal auf (Pfeile). C) Antisense-Sonde, Positives Signal in den Spermatozoen. D) Sense-Sonde, Kontrolle. Balken=200µm



Abbildung 41 Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im Nebenhoden, inhomogenes Signal

Nebenhoden einer 12 Wochen alten Ratte, jeweils eine Dunkelfeldaufnahme(=DF) und eine Hellfeldaufnahme (=HF) im Vergleich

A Der rechte Bildbereich zeigt deutlich ein Signal, wohingegen links kein Signal erkennbar ist (Bereiche durch Markierung getrennt) Balken=200µm B Ausschnittvergrößerung von A

4.4.2.2 Reelin im Ovar

Innerhalb des Ovars einer 12 Wochen alten Ratte konnte Reelin mRNA mittels radioaktiver In Situ Hybridisierung in den Granulosazellen von Sekundärfollikeln dargestellt werden (siehe Abb. 42). Weiterhin wurde Reelin mRNA in interstitiellen Zellen nachgewiesen. Das Signal stellt sich auch hier als Ansammlung von hellen Punkten in der Dunkelfeldaufnahme und schwarzen Punkten in der Hellfeldaufnahme dar. Sowohl in der Dunkelfeld- als auch in der Hellfeldaufnahme ist das Signal sehr deutlich zu erkennen.



Abbildung 42 Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im Ovar Ovar einer 12 Wochen alten Ratte, jeweils eine Dunkelfeldaufnahme(=DF) und eine Hellfeldaufnahme (=HF) im Vergleich. Dargestellt sind Sekundärfollikel, in deren Granulosazellschicht deutlich Reelin Signal zu erkennen ist (Pfeile). Signalreiche Bereiche ließen sich auch im Interstitium nachweisen (Sterne), Balken=100µm

4.4.2.3 Reelin im Uterus

Auch im Uterus einer 12 Wochen alten Ratte konnte Reelin mRNA dargestellt werden (siehe Abb. 43). Das Endometrium des vorliegenden Uteruspräparates befand sich in der Proliferationsphase. Das Reelin-Signal ist im Bereich des Oberflächenepithels zu erkennen und ist hier deutlicher in der Dunkelfeldaufnahme zu sehen.



Abbildung 43 Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im Uterus Uterus einer 12 Wochen alten Ratte, Dunkelfeldaufnahme(=DF) und Hellfeldaufnahme (=HF) im Vergleich. Dargestellt ist das Endometrium des Uterus in der Proliferationsphase, die Pfeile zeigen auf Reelin-Signal innerhalb des Oberflächenepithels. Balken=200µm

5 Diskussion

Eine Regulation von Reelin durch E2 wurde bereits nachgewiesen (Bender et al. 2010; Biamonte et al. 2009). Vor diesem Hintergrund sollte geklärt werden, ob Reelin seinerseits regulatorischen Einfluss auf die Freisetzung von Estradiol hat. In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Frage zwei Ansätze parallel durchgeführt: Mittels Radioimmunassay sollte herausgefunden werden, ob die Zugabe von Reelin die Estradiolsynthese ins Zellmedium moduliert und gleichzeitig wurde überprüft, ob Reelin die Transkriptionsrate von Aromatase beeinflusst.

5.1 Beeinflussung der Aromatase Aktivität durch Reelin

In den Zelllinien KGN (humane Granulosazelllinie) und Neuro2A (murine Neuroblastomazelllinie) zeigte sich in den Radioimmunsassays keine Veränderung der E2 Konzentration im Medium nach Zugabe von Reelin. In den hippocampalen Zellen zeichnete sich dagegen ein uneinheitliches Bild ab. In einer ersten Versuchsreihe ließ sich ein deutlicher Anstieg der E2 Mengen nach 24 stündiger Reelin Stimulation verzeichnen, wohingegen in einer zweiten Versuchsreihe kein Effekt durch Reelin zu detektieren war. Aufgrund der höheren Anzahl an Versuchen der zweiten Versuchsreihe von n=5 vs. n=2 in der ersten Versuchsreihe, muss eher zu dem Ergebnis tendiert werden, dass Reelin keinen Effekt hat. Ursache für diese Unterschiede könnten unterschiedliche Zellvitalitäten, die Verwendung von verschiedenen Chargen an Reelin-Konzentraten oder unterschiedliche Verhältnisse von weiblichen zu männlichen hippocampalen Zellen sein. Im Laufe dieser Arbeit konnten in dem eingeschränkten Zeitrahmen nicht all diese Parameter überprüft werden, zumal sich mitunter große zeitliche Abstände zwischen Versand der Proben und Erhalt der Ergebnisse des Radioimmunassays ergaben. Allerdings führte das uneinheitliche Ergebnis dazu, dass in einer nächsten Versuchsreihe weibliche und männliche hippocampale Zellen getrennt betrachtet wurden. Dabei zeigte sich tatsächlich ein geschlechtsspezifischer Unterschied: bei einer Fallzahl von n=4 zeigte sich in den weiblichen Zellen keine Regulation der E2 Menge durch die Zugabe von Reelin, während die männlichen Zellen gegenüber dem Kontrollwert GFP signifikant niedrigere E2 Mengen sezernierten. In diesem Zusammenhang ist nochmals auf die

Arbeit von Biamonte und Mitarbeitern (2009) hinzuweisen. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass die Zugabe von E2 zu einer Hochregulation von Reelin mRNA und Protein im Cerebellum von heterozygoten Reeler Mäusen führte. Eine signifikante Hochregulation war hier nur bei den männlichen Tieren zu erkennen. Zwar sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt mit denen der Arbeitsgruppe von Biamonte vergleichbar, da hier hippocampale Zellen von Wildtyp Ratten verwendet wurden, jedoch könnte dies einen ersten Hinweis auf eine gegenseitige Regulation von Reelin und E2 geben, zumindest in Bezug auf männliche Tiere. Zusammenfassend lässt sich folgende These formulieren: In männlichen Tieren reguliert Estradiol Reelin Protein herauf (Biamonte et al. 2009) und Reelin reguliert Estradiol herunter (siehe Ergebnisse des Radioimmunassays in der vorliegenden Arbeit).

5.2 Einfluss von Reelin auf die Aromatase Transkription

Die Aromatase wird in unterschiedlichen Geweben und Organen exprimiert, wie Gonaden. Gehirn, Fettgewebe, Placenta oder malignen Tumoren. Die gewebespezifische Expression wird durch gewebespezifische Promotoren ermöglicht, beispielsweise Promotor II, der die Aromatase Expression hauptsächlich im Ovar antreibt oder Promotor If, der für die Aromatase Expression im Gehirn verantwortlich ist (Adams et al. 2001; Honda et al. 1994b). Die Aktivierung der gewebespezifischen Promotoren führt zum alternativen Splicing der 5'untranslatierten Exons (vgl. Abb. 5) was zu alternativen Aromatase Transkripten mit spezifischen 5'Enden führt (Simpson 1993). Da die 5'Enden nicht translatiert sind die resultierende codierende Aromatase werden. Sequenz und die Proteinsequez identisch, unabhängig davon, welcher Promotor verwendet wurde (Simpson 1993; Boon et al. 2010). Die Gewebespezifität der Promotoren basiert auf dem Vorliegen unterschiedlicher Bindungsmotive bzw. der An- oder Abwesenheit von gewebsspezifischen Transkriptionsfaktoren. So bindet der gonadale Promotor (Promotor II) die Transkriptionsfaktoren cyclic AMP response element binding protein (CREB) und steroidogenic factor-1 (SF-1), wodurch die Aromatase Expression im Ovar durch zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) und Gondadotropine reguliert werden kann (Michael et al. 1995; Fitzpatrick & Richards 1994). Im Gehirn kommt die Aromatase in unterschiedlichen Regionen wie Amygdala, Nucleus preopticus, Nucleus paraventricularis oder Hippocampus vor. Interessanterweise wurden auch unterschiedliche Aromatase Transkripte in verschiedenen Hirnregionen gefunden. Sowohl Gehirn-spezifische Transkripte des Promotor If, aber auch Transkripte der Promotoren II und I.4 wurden im Gehirn nachgewiesen (Simpson 2004; Sasano et al. 1998), sodass wahrscheinlich je nach Hirnregion verschiedene Regulationsmechanismen stattfinden. Abdelgadir und Mitarbeiter (1994) zeigten, dass die Aromatase Expression im Gehirn durch Androgene erhöht wird und durch cAMP entweder verringert oder gar nicht beeinflusst wird. Auch durch weitere Substanzen wie a1-adrenerge Agonisten, Substanz P, Neurotensin, Cholezystokinin oder cGMP ließ sich eine Erhöhung der Aromatase Expression im Gehirn zeigen (Abe-Dohmae et al. 1997). In neuronalen hypothalamischen Zelllinien wurde kürzlich gezeigt, dass der Promotor If durch Estrogenrezeptor α und durch Progesteron reguliert wird (Yilmaz et al. 2009; Yilmaz et al. 2011). Für maligne Brustkrebszellen ist weiterhin bekannt, dass die Aromatase Transkription durch Prostaglandin E2 und in Gegenwart von Glucocorticoiden auch durch verschiedene Zytokine, wie IL-6, IL-11, TNF- α und IL-1 β reguliert wird (Bulun et al. 2009; Zhao et al. 1996; Shozu et al. 2001).

Zusammengefasst führten diese Ergebnisse zu der Frage, ob Reelin, ähnlich wie oben aufgezählte Substanzen, über bestimmte Signalwege zu einer Beeinflussung der Aromatase Transkription führt. Reelin ist in eine Reihe von Signalwegen involviert, die alle Gegenstand derzeitiger Forschung und noch nicht komplett verstanden sind. Das Binden von Reelin an seine extrazellulären Rezeptoren ApoER2 und VLDLR führt zur Phosphorylierung von Dab-1 durch Kinasen der Src-Familie. Dadurch werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Zu nennen sind beispielswiese die Phosphorylierung von n-Cofilin, der Notch-Signalweg, die Aktivierung von Cdc42 oder die Regulation von Rho GTPasen durch Reelin (Chai et al. 2009; Hashimoto-Torii et al. 2008; Sibbe et al. 2009; Leemhuis & Bock 2011). Wäre Reelin tatsächlich in die Regulation der Aromatase auf transkriptioneller Ebene eingebunden, wäre diese Regulation ebenfalls über intrazelluläre Signalkaskaden denkbar. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Identifizierung der Transkriptionsfaktoren, die durch Reelin aktiviert werden und an der Promotorregion von Target-Genen, wie vielleicht der Aromatase, binden. Derzeit ist hierzu jedoch noch nichts bekannt.

Darüber, ob Reelin Einfluss auf die Genexpression anderer Gene als der Aromatase hat, gibt es bisher kaum Veröffentlichungen. Kürzlich konnten jedoch Tian et al. (2012) einen Zusammenhang zwischen Reelin und dem Transkriptionsfaktor FoxG1 zeigen. FoxG1 ist ebenso wie Reelin in die Entwicklung und Formierung des Hippocampus involviert und wird darüber hinaus auch in Cajal-Retzius Zellen exprimiert. Tian und Mitarbeiter stellten erstmals die Hypothese auf, dass Reelin durch den Transkriptionsfaktor FoxG1 agiert und damit auf die postnatale Entwicklung des Gyrus Dentatus Einfluss hat. Garcia-Miranda et al. (2012) zeigten zudem, dass der Verlust von Reelin einen Einfluss auf die Genexpression im Dünndarm der Maus hat. Von 45.101 untersuchten Genen wiesen 62 in isolierten Epithelzellen und 82 im intakten Dünndarm eine Veränderung der Genexpression in Reeler-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Maus.

Um eine mögliche Beeinflussung der Aromatase Transkription durch Reelin zu detektieren, wurden in dieser Arbeit Luciferase Assays durchgeführt. Dabei wurden die gewebsspezifischen Aromatase Promotoren für Gehirn (If) und Ovar (PII) vor eine Luciferase Sequenz kloniert und dann die Lichtintensität bei Zugabe von Reelin im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Reelin gemessen (siehe Abschnitt 3.2). In der verwendeten Zelllinie Neuro2A ließ sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen weder nach Transfektion mit If noch mit PII ein Effekt durch die Zugabe von Reelin zeigen. Bei den primären hippocampalen Zellkulturen zeigt sich ein uneinheitliches Bild. Während sich unter Verwendung des Promotors If keine signifikanten Unterschiede zeigen lassen, gibt es bei PII nach 3 Stunden Reelin-Stimulation und bei If TATA nach 1,5 Stunden Reelin-Stimulation eine signifikante Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Allerdings ist auch bei Verwendung des Vektors pGL3 basic ein signifikanter Effekt nach 1,5 Stunden Reelin-Stimulation ein Effekt entstanden, was die Effekte in den Vektoren PII und If TATA in Frage stellt. Dabei ist jedoch anzumerken, dass primäre Zellen, anders als die stabilen Zelllinien, eine deutlich geringere Transfektionseffizienz aufweisen und viel stärker äußeren Einflüssen wie Temperatur oder pH-Wert unterliegen. Dies könnte einen scheinbaren Effekt durch Reelin in pGL3 basic erklären. Durch den Einsatz der Renilla Luciferase konnten mögliche Schwankungen in der Transfektionseffizienz und der Vitalität der einzelnen Zellkulturen zwar vermindert, jedoch nicht vollkommen beseitigt werden. Durch die niedrige Fallzahl von n=2 (vergl. Abb. 32) ergaben sich allerdings hohe Standardabweichungen und es konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Eine Wiederholung der Versuche mit mehr Versuchswiederholungen bietet einen Ausblick für weitere Studien.

Nicht nur die geringe Fallzahl, auch andere Faktoren können zu der Entstehung der Unterschiede beitragen. Interessanterweise konnte in hippocampalen Schnitt-Kulturen gezeigt werden, dass die Aromatasexpression im Hippocampus regionale Unterschiede aufweist (Prange-Kiel et al. 2006). Diese regionalen Unterschiede konnten in den hier verwendeten Dispersionskulturen nicht berücksichtigt werden, sodass hier ein zusätzlicher Faktor für die Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsreihen möglicherweise mit hineinspielt.

Möglicherweise resultieren die großen Standardabweichungen aber auch auf Unterschieden zwischen weiblichen und männlichen hippocampalen Zellen; Unterschiede, die bisher durch die Verwendung gemischter Kulturen im Luciferase Assay nicht mit berücksichtigt wurden. Eine weitere Überlegung wäre, dem Testsystem höhere Konzentrationen an Reelin hinzuzugeben. Zwar konnten Sibbe und Mitarbeiter (2009) durch dieselbe Reelin Konzentration wie in dieser Arbeit in hippocampalen Schnitt-Kulturen Effekte auf die Gliafaserdichte erzielen. Dabei wurde allerdings die Interaktion zwischen Notch-Protein und Reelin-Protein untersucht und keine transkriptionale Regulierung wie in dieser Arbeit. Bezogen auf E2 zeigt sich beispielsweise auch erst bei hohen pharmakologischen Dosen ein signifikanter Effekt auf das Wachstum von Axonen (von Schassen et al. 2006). Auch Bender und Mitarbeiter (2010) verwendeten in ihren Versuchen E2 Konzentrationen von 10⁻⁷ M, was deutlich über dem physiologischen Serumgehalt bei weiblichen Tieren von 10⁻¹⁰ M liegt. Es ist daher möglich, dass auch Reelin erst in hohen Dosen auf die Aromatase Transkription *in vitro* wirkt.

Weiterhin wären noch kürzere Stimulationszeiten mit Reelin interessant, etwa 20, 40 und 60 Minuten, um mögliche, schnelle Effekte auf die Transkription zu detektieren. Außer der transkriptionellen Regulation der Aromatase könnte Reelin jedoch auch posttranskriptional, translational oder posttranslational auf die Aromatase wirken.

Da die Transfektion mit dem Gehirn-spezifischen Promotor (If) in den Neuro2A Zellen zu einer 100fach niedrigeren Lumineszenz als mit dem Ovar-spezifischen Promotor (PII) führte, ergab sich der Verdacht auf eine Silencer Sequenz im Gehirnspezifischen Promotor, an die bestimmte Regulatorproteine aus den Neuro2A Zellen binden. Vermutet wurde eine solche Sequenz innerhalb des Exon 1 im If Promotor. Somit wurde eine Variante des If konstruiert, in der das Exon 1 deletiert wurde und die Sequenz der Luciferase cDNA direkt auf die TATA Box folgten (If TATA). Innerhalb der Neuro2A Zellen zeigte sich durch den Einsatz des If TATA keine Besserung des Lumineszenzsignals.

In den hippocampalen Zellen war die Promotoraktivität von PII und If interessanterweise vergleichbar, der Einsatz des deletierten If TATA Promotors zeigte jedoch so gut wie gar keine Aktivität. Diese Ergebnisse führten zu der neuen Hypothese, dass in den hippocampalen Zellen mindestens zwei spezifische Transkriptionsfaktoren (TF1 und TF2) vorhanden sein müssen. Dabei ist die Bindung von TF1 an den Promotor If und die Bindung von TF2 an das Exon 1 für die Aktivierung notwendig. Fehlt Exon 1, wie im If TATA Konstrukt, und damit die Bindung von TF2, kann die Aktivität des Promotors nicht induziert werden. Dieser These entsprechend sind in der Zelllinie Neuro2A beide Transkriptionsfaktoren nicht vorhanden, sodass eine Transkription des Promotors If unterbleibt. Die Hypothese ist in den Abbildungen 44 und 45 schematisch veranschaulicht.



Abbildung 44 Schematische Darstellung der Hypothese (1)

Hippocampale Zellen besitzen Transkriptionsfaktoren (beispielhaft dargestellt als Transkriptionsfaktor 1 und 2 = TF1 und TF2), die an spezifische Motive der DNA binden und für die Aktivität des Promotors If essentiell sind. Die Neuro2A Zellen verfügen nicht über diese Transkriptionsfaktoren, sodass die Aktivität des Promotors unterbleibt und kein Lumineszenzsignal zu detektieren ist.





5.3 Reguliert Reelin Estradiol möglicherweise auf posttranslationaler Ebene?

Viele Regulationsmechanismen der Aromatase wurden in Hinblick auf gynäkologische Neoplasien wie Mamma Carcinom, Endometrium Carcinom oder Endometriose untersucht. Aromatase wird in malignen Tumorzellen der Brust viel stärker exprimiert als in normalen Brustgewebe (Harada 1997). Die Induktion der Aromatase in den Tumorzellen kann zu höheren E2 Spiegeln führen und damit wiederum das Tumorwachstum anregen. Aromatasehemmer als endokrine Therapie werden daher seit einigen Jahren exzessiv erforscht (Santen & Harvey 1999; Altundag& Ibrahim 2006).

Die Regulation der Aromatase auf posttranskriptionaler und translationaler Ebene wird in der Literatur nicht explizit erwähnt, über die Regulation auf posttranslationaler Ebene ist jedoch bereits einiges bekannt.

Balthazart und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Aktivität der Aromatase über Phosphorylierung reguliert wird (Balthazart et al. 2001; Boon et al. 2010). Die Aromataseaktivität konnte von MgCl₂, einem limitierenden Faktor für Kinasen, signifikant herunterreguliert werden. Die Aromatase hat unter anderem Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A, Proteinkinase C und Tyrosinkinase (Balthazart et al. 2001). Verschiedene Studien zeigen weiterhin in unterschiedlichen Zelltypen, dass die Aromatase Aktivität auf posttranslationaler Ebene durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie EGF, TPA und TGF β und Inhibierung von Kinasen reguliert werden kann (Richards et al. 2002; Kinoshita& Chen 2003; Shozu et al. 2001; Catalano et al. 2009).

Zudem scheint es zell- oder speziesspezifische Unterschiede darin zu geben, ob eine Phosphorylierung eher zu einer erhöhten oder einer verminderten Aromatase-Aktivität führt: Miller et al. (2008) zeigten, dass das Aromatase-Serin 118 (S118A) eine potente Phosphorylierungsstelle im murinen Aromatase Protein darstellt. Eine Mutation in S118A in COS7 Zellen führte zur Blockierung der Phosphorylierung der Aromatase und zu einer erhöhten Aromatase Aktivität. Im Gegensatz dazu konnte in einer bestimmten Brustkrebszelllinie (MCF-7) eine schnelle Erhöhung der humanen Aromatase Aktivität durch Phosphorylierung nach Inkubation mit Estradiol gezeigt werden (Catalano et al. 2009). Die Zugabe von Estradiol führte zu einer erhöhten Phosphorylierung eines Tyrosinrestes der Aromatase, wobei die nicht-Rezeptorständige Tyrosinkinase c-Src entscheidend beteiligt war. Die Erhöhung der Tyrosin-Phosphorylierung der Aromatase ist offenbar abhängig von ER α (Catalano et al. 2009).

Interessant ist an dieser Stelle, dass auch Reelin nicht-Rezeptor-ständige Tyrosinkinasen der Src Familie aktiviert (Bock & Herz 2003). Das Binden von Reelin an seine Rezeptoren ApoER2 und VLDLR führt zur Phosphorylierung des intrazellulären Adapterproteins Dab1, was über Tyrosinkinasen der Src Familie geschieht. Würde sich eine Regulation von Estradiol durch Reelin auf postranslationaler Ebene zeigen, wäre eine Regulation über Phosphorylierung durch Reelin-aktivierte Tyrosinkinasen denkbar. Dies würde zu einer Hemmung der Aromatase-Aktivität durch Reelin führen. Ein Befund, der durch Ergebnisse dieser Arbeit, bei hippocampalen Neuronen aus männlichen Tieren, gestützt wird.

Catalano et al. (2009) konnten die Erhöhung der Aromatase Aktivität durch Zugabe von E2 in verschiedenen Zelllinien nachweisen, sodass dies ein Hinweis auf einen generellen Mechanismus ist. Bisher ist der genaue Mechanismus über die Phosphorylierung über Tyrosinkinase c-src jedoch nur für die MCF Zellen gezeigt worden.

Eine Regulation der Aromatase Aktivität, ohne den mRNA Spiegel zu erhöhen, wurde weiterhin durch IGF-1 nachgewiesen. Dieser Wachstumsfaktor erhöht die Aromatase Aktivität in verschiedenen Zelltypen wie Granulosazellen, Brustkrebszellen, Leydigzellen oder Fettzellen, die unterschiedliche Promotoren benutzen (Reed et al. 1993; Steinkampf et al. 1988; Chabrolle et al. 2009).

Eine Untersuchung des Phosphorylierungsgrades der Aromatase muss demzufolge auch die genauen Phosphorylierungsstellen berücksichtigen, da offenbar die Phosphorylierung verschiedener Stellen gegenteilige Effekte auf die Aktivierung der Aromatase haben.

5.4 Bedeutung von Reelin für die männliche Fertilität

Nicht nur im Gehirn, auch in zahlreichen anderen Organen konnte das Vorhandensein und die Bedeutung von Reelin gezeigt werden (vgl. Abschnitt 1.1.2). In der semiquantitativen PCR Analyse in dieser Arbeit konnte das Vorhandensein von Reelin mRNA im Hoden und im Nebenhoden von Wistar Ratten gezeigt werden. Dabei war von besonderem Interesse, dass es eine Altersabhängigkeit der Reelin Expression gibt. Im Hoden zeigte sich die höchste Expression im Alter von 2 Wochen.

Im Nebenhoden zeigte sich im Gegensatz zum Hoden ein starker Anstieg von Reelin mRNA Menge im Alter von 10 und 12 Wochen (70-84 Tage). Diese Ergebnisse führten zu der Frage, welche physiologischen Vorgänge innerhalb der männlichen Gonaden der Ratte zu den entsprechenden Altersstufen ablaufen und ob so mögliche Zusammenhänge für die Bedeutung von Reelin zu erkennen sind.

Nach Robb et al. (1978) erreichen männliche Ratten ihre volle Geschlechtsreife nach 100 Tagen, da erst dann die endgültige Größe des Nebenhodens und die volle Spermienproduktion erreicht ist. Vor dem 45. Lebenstag sind nur wenige Spermatozoen im Nebenhoden enthalten. Ab Lebenstag 50 steigt die Menge an gespeicherten Spermatozoen im Nebenhoden stark an (Robb et al. 1978). Sie erreichen zu diesem Zeitpunkt erstmals die Cauda Epididymis, was Robb und Mitarbeiter als Eintritt in die Pubertät werten. Auch der erste signifikante Anstieg von Plasmatestosteron beginnt um den 40.-50. Lebenstag auf die Konzentration einer erwachsenen Ratte abzusinken. Vergleicht man diese Kinetik mit der von Reelin, so könnte Testosteron die Reelin Transkription induzieren, die unseren Messungen entsprechend an Tag 70 bis 84 auf hohem Expressionsniveau ist. Umgekehrt ist die FSH Konzentration um den 22. Lebenstag hoch, nimmt bis zum 40. Lebenstag weiter zu und fällt vom 76. bis zum 97. Lebenstag auf ein etwas niedrigeres Plateau (Zanato et al. 1994). Nach Short und Woodnott (Short & Woodnott 1969) tritt die Geschlechtsreife männlicher Ratten nach 70-80 Tagen ein, was sowohl mit dem hohen Testosteronspiegel als auch niedrigen FSH-Spiegeln und mit dem Anstieg von Reelin mRNA im Nebenhoden korreliert.

Eine funktionelle Bedeutung von Reelin für die männliche Fertilität scheint naheliegend. Männliche Mäuse, denen der Reelin Rezeptor ApoER2 fehlt, weisen eine eingeschränkte Fertilität auf (Trommsdorff et al. 1999). Stockinger et al. (2000) zeigten eine starke Expression des ApoER2 Rezeptors in den Hauptzellen des Nebenhodens. Andersen et al. (2003) haben schließlich eine starke Expression des Reelin Rezeptors ApoER2 im initialen Segment des Nebenhodens darstellen können, der dort die funktionale Expression von Clusterin und Hydroperoxid Glutathionperoxidase (PHGPx) beeinflusst. Diese beiden Proteine sind wichtig für die Reifung und Beweglichkeit von Spermien (Godeas et al. 1997; Rosenberg & Silkensen 1995). Eine verringerte PHGPx Expression in ApoER2 Knockout-Mäusen führt zu abnormen Morphologien und zu Immobilität der Spermien und somit zur Infertilität.

Im Hoden der Maus übernimmt ApoER2 zudem eine wichtige Rolle für die Aufnahme von Selen durch Endozytose des Selenoproteins P (Sepp1) (Burk & Hill 2005). Knockout-Mäuse für ApoER2 oder Sepp1 zeigen strukturelle Spermiendefekte und Infertilität (Burk & Hill 2005; Valentine et al. 2008). Mehr noch, es wurde eine ApoER2-Mutante gezüchtet, die Mutationen in drei Aminosäuren der zytoplasmatischen intrazellulären Domäne des Rezeptors (ICD) direkt neben dem NPxY motif aufwies (Masiulis et al. 2009). Diese Mutationen hindern den Rezeptor daran, das Adapter Protein Dab-1 zu binden, einem obligatorischen Protein des Reelin Signal Weges, sodass die Transmission des Reelin Signals durch ApoER2 unterbrochen wurde. Diese Knockout-Maus produzierte immotile und fehlgestaltete Spermien, wies jedoch einen normalen Spiegel an Selen auf. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Entwicklung und Motilität der Spermien zwar abhängig ist von ApoER2, jedoch unabhängig von Selen. Darüber hinaus waren die

Spermien dieser Maus in der Cauda epididymis fehl- und unterentwickelt (Masiulis et al. 2009).

Cariboni et al. (2005) wiesen nach, dass Reelin die Migration der GnRH-Neuronen beeinflusst. Sie untersuchten in diesem Zusammenhang auch histologisch die Gonaden auf mögliche morphologische Veränderungen. Dabei wurde in Reeler-Mäusen eine Reduktion der Anzahl und eine Dilatation der Tubuli seminiferi festgestellt. Die Spermatogenese wurde als scheinbar komplett dargestellt, allerdings wurde nicht wie in oben beschriebenen Studien auf die Morphologie und Motilität der Spermien eingegangen.

5.5 Reelin im Nebenhoden

Mit Hilfe der semiquantitativen PCR konnte die relative Menge an Reelin mRNA in homogenisiertem Gewebe von Gonaden ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass mit zunehmendem Alter der Tiere die Reelin-Transkript-Mengen ansteigen. Die Untersuchung über die regionale Verteilung der mRNA im Gewebe erfolgte mittels In Situ Hybridisierung an 12 Wochen alten Ratten. Reelin mRNA konnte im Nebenhoden sowohl im Epithel des Ductus Epididymis als auch in den Spermatozoen innerhalb des Ductus nachgewiesen werden. Bei den In Situ Hybridisierungen (ISH) fiel schnell auf, dass es immer wieder Antisense Gewebeschnitte gab, in denen kein Signal darzustellen war, während in anderen Schnitten signalreiche Ductusabschnitte neben Abschnitten ohne Signal lagen (siehe Abbildungen 41 und 43). Interessant ist an dieser Stelle, dass Andersen et al. (2003) den Reelin Rezeptor Apo ER2 in Wildtypmäusen mittels Immunhistochemie nur im Initialsegment des Epididymis darstellen konnten, nicht aber in Caput, Corpus und Cauda. Diese ungleichmäßige Expression der Rezeptoren im Nebenhoden könnte einen Hinweis auf Heterogenität der Nebenhoden-Ductuli-Abschnitte geben, der sich auch in der Reelin-ISH darstellte. Mehrere Arbeitsgruppen liefern jedoch noch deutlich differenziertere Betrachtung zu den physiologischen Vorgängen im Nebenhoden und vor allem deren regionalen Unterschieden. Das Epithel des Nebenhodens hat je nach Region (Caput, Corpus, Cauda) unterschiedliche Muster in Genexpression und Proteinsynthese (Cornwall & Hann 1995) und darüber hinaus unterschiedliche Funktionen bezogen auf Speicherung und Reifung von Spermatozoen. Jede dieser Regionen ist durch bindegewebige Septen weiter in intraregionale Segmente unterteilt (Abou-Haila & Fain-Maurel 1984), wobei die Anzahl der Segmente je nach Spezies variiert (Abe et al. 1983). Für die Ratte wurden 19 verschiedene morphologische Segmente innerhalb des Nebenhodens beschrieben (Jelinsky et al. 2007). Die funktionelle Bedeutung dieser Segmente wurde durch verschiedene Studien unterstützt, die gezeigt haben, dass die individuelle Gen- oder Proteinexpression scharf durch die Segmentgrenzen getrennt ist (Garrett et al. 1991; Cornwall et al. 1992; Turner et al. 2003). Turner et al. (2003) stellten diese Segmentation beispielsweise für das Markerprotein
ß-Galaktosidase dar und zeigten zudem, dass die bindegewebigen Septen eine Art Barrierefunktion für Moleküle ab einer bestimmten Größe darstellen (Molekülmasse im Bereich von Wachstumsfaktoren und anderer Proteine). Abbildung 46 zeigt die dazugehörige Aufnahme, die auffällige Übereinstimmungen mit der segmentspezifischen Verteilung der Reelin mRNA in den ISHs dieser Arbeit zeigt (siehe Abbildungen 39 und 41). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass sich durch die Septen die "Mikroumgebung" in nebeneinanderliegenden Segmenten unterscheidet und dass die Signalkette zwischen Epithelzellen und Stroma dadurch ebenso segmentspezifisch ist. Jelinsky et al. (2007) befassten sich darüber hinaus mit dem Transkriptom im Ratten Epididymis. Sie fanden insgesamt 16.360 Transkripte und Transkripte den einzelnen Segmenten ordneten die zu. Die lokal sehr unterschiedliche Nachweisbarkeit von Reelin mRNA im Nebenhoden in der vorliegenden Arbeit zeigt deutliche Übereinstimmungen in Hinblick auf die umfangreichen Erkenntnisse zur segmentspezifischen Verteilung von Gen- und Proteinexpression im Nebenhoden. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die signalreichen Abschnitte einem der 19 Segmente zuzuordnen, da es dazu kompletter, unversehrter Längsschnitte bedarf und diese zudem beispielsweise mit Haematoxylin-Eosin gegengefärbt werden müssten, um das Bindewebe darzustellen. Dies kann jedoch einen Anreiz für Folgestudien bieten.



Abbildung 46Färbung von β-Galactosidase im Ratten Epididymis (Caput)
(entnommen aus Turner et al. 2003, S. 875)
Das Epithel in Segment 4 ist positiv für das Protein (rechte Bildseite), während
Segment 5 negativ ist (linke Bildseite). Die Trennung der Bereiche erfolgt durch das
Bindegewebe, welches die Segmente voneinander trennt (durch Markierung
gekennzeichnet),Balken=350 µm

Für die Reifung der Spermatozoen innerhalb des Lumens ist ein spezielles Milieu notwendig, welches von den verschiedenen epithelialen Zellen durch Endozytose und Sekretion verschiedener Stoffe und Moleküle aufrechterhalten wird. Unter anderem wird eine Vielzahl an Glykoproteinen an der apikalen Seite des Epithels sezerniert, die an Spermatozoen binden können und dort am Umbau der Plasmamembran beteiligt sind (Sun et al. 2000; Eccleston et al. 1994; Flickinger et al. 1988).

Neben dem Nachweis in Epithelzellen konnte in dieser Arbeit Reelin mRNA in den Spermatozoen innerhalb des Lumens des Ductus epididymis nachgewiesen werden, sowohl durch Färbung als auch durch radioaktiven Nachweis. Bisher wurde noch kein Reelin Rezeptor innerhalb der Spermatozoen nachgewiesen, jedoch unterstreicht das Vorhandensein von Reelin mRNA sowohl im Epithel als auch den Spermatozoen weiterhin die mögliche Bedeutung von Reelin für die Reifung und Entwicklung der Spermien. Interessant wäre an dieser Stelle zusätzlich, in welchen Kompartimenten der Spermatozoen Reelin vorhanden ist, was in Zukunft noch einmal durch Protein-Nachweis mittels Immunogold-Färbung nachgewiesen werden könnte.

Zu weiteren Überlegungen führt die Beobachtung, dass in einigen Arealen des Nebenhodens nur Signale innerhalb des Epithels beziehungsweise nur Signale innerhalb der Spermatozoen gezeigt werden konnten. Für eine genaue Deutung dieses Ergebnisses wäre die Zuordnung der angeschnittenen Ductusabschnitte zu verschiedenen Abschnitten des Epididymis sinnvoll, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Die Spermatozoen erreichen auf Grundlage von verschiedenen Studien ihr Fertilitätspotential in unterschiedlichen Abschnitten des Epdidymis. Über 90% der Spermatozoen bleiben im Caput epididmyis immotil, während der Anteil der motilen Spermatozoen im Corpus rapide ansteigt (Dacheux et al. 1987). Die Mehrheit der Spermatozoen erlangen ihr Potential zur Fertilität nachdem sie Corpus und Cauda epididymis passiert haben (Moore 1998; Liu et al. 2000).

Das Erlangen der Fertilität der Spermatozoen kann in Zukunft sicher noch differenzierter den segmentspezifischen Gegebenheiten zugeordnet werden, die von Jelinsky et al. (2007) beschrieben worden sind (siehe oben). Durch Zuordnung der Areale, in denen Reelin mRNA entweder im Epithel oder innerhalb der Spermatozoen nachgewiesen wurde, könnte gemutmaßt werden, ob und an welcher Stelle eher die Sekretion von Reelin aus dem Epithel oder aus den Spermatozoen für die Reifung der Spermatozoen von Bedeutung ist. Interessant wäre dabei auch, ob eine von Reelin induzierte Signalkaskade im Nebenhoden eher auf autokrinem oder parakrinem Weg verläuft.

5.6 Estrogene und männliche Fertilität

Lange Zeit wurde der Existenz von Estrogen im männlichen Organismus keine große Bedeutung zugeschrieben, was sich spätestens mit der Entdeckung der Aromatase im Hoden änderte (Weniger & Zeis 1983; Rommerts et al. 1982; Carreau & Hess 2010, Papadopoulos et al. 1986). Im Hoden kommt die Aromatase hauptsächlich in den Keimzellen und den Leydigzellen vor, wobei es speziesabhängige Unterschiede dahingehend gibt, in welchem Zelltyp die Aromatase hauptsächlich exprimiert wird. Weiteres Vorkommen von Aromatase im männlichen Genitaltrakt gibt es in den Spermatozoen im Nebenhoden, im sogenannten zytoplasmatischen Tröpfchen, und in Epithelzellen des Nebenhodens (Janulis et al. 1998; Carreau et al. 2011; Wiszniewska 2002). Estrogenrezeptoren sind in spezifischen Zellen des Hodens, im Ductus efferentes und im Nebenhoden vorhanden, jedoch sind auch hier beachtliche Unterschiede zwischen einzelnen Spezies zu finden (Hess 2003; Carreau & Hess 2010). Die Charakterisierung von Knockout-Mäusen für das Aromatase Gen oder für die Estrogenrezeptoren ER α und ER β erbrachte weitere Erkenntnisse über die Funktion von Estrogen für die Fertilität und Spermiogenese. ERα-Knockout Mäuse sind steril und zeigen ein abnormes Sexualverhalten sowie eine reduzierte Anzahl und Motilität von Spermatozoen innerhalb des Nebenhodens (Eddy et al. 1996; Ogawa et al. 1997). ERβ-Knockout Mäuse weisen eine normale Histologie von Hoden und Nebenhoden sowie mobile Spermatozoen auf, sind jedoch trotzdem aus bisher ungeklärtem Grund steril (Couse & Korach 1999). Die männlichen Aromatase-Knockout Maus (ArKO) weist zwar ebenfalls eine normale Anatomie auf, entwickelt aber ab dem ersten Lebensjahr eine abnormale Spermiogenese über die Blockade der Keimzellausreifung und eine erhöhte Rate an Apoptose (Robertson et al. 1999; Carreau et al. 2010).

Es gibt nicht nur hinsichtlich der Lokalisation sondern auch funktionell (während der Spermiogenese) Überschneidungen zwischen der Aromatase und Reelin. In dieser Arbeit wurde sowohl im Epithel, als auch in den Spermatozoen im Nebenhoden der Nachweis von Reelin mRNA erbracht. Außerdem weisen Reeler-Mäuse eine deutlich eingeschränkte Fertilität auf und das Fehlen des ApoER2 Rezeptors führt zu immotilen, abnorm geformten Spermien.

5.7 Reelin in den weiblichen Gonaden

Unterschiede Obwohl natürlich speziesabhängige zwischen Mausund Rattengonaden vorhanden sind, wird in dieser Arbeit zur Vereinfachung von einer Vergleichbarkeit zwischen den Gonaden von Mäusen und Ratten ausgegangen. Für die In Situ Hybridisierung wurde Gonadengewebe von 12 Wochen alten weiblichen Ratten verwendet, um einen ersten Eindruck vom regionalen Verteilungsmuster von Reelin mRNA in den weiblichen Gonaden zu erhalten. In der radioaktiven In Situ Hybridisierung konnte Reelin mRNA sehr eindrücklich in den Granulosazellen von Sekundärfollikeln und in Interstitialzellen gezeigt werden. Ikeda und Mitarbeiter (Ikeda & Terashima 1997) befassten sich mit der Darstellung von Reelin mRNA in embryonalen und adulten Organen von Mäusen. Im Ovar konnte die Arbeitsgruppe Reelin mRNA mittels ³⁵S markierter Reelin Antisense-Sonden nur im Interstitium und nicht in den Follikeln darstellen. Argov und Sklan (2004) haben in bovinen Thecaund Granulosazellen in frühen und präovulatorischen Follikeln und im Corpus Luteum mittels PCR erstmals mRNA von VLDLR nachweisen können. Weiterhin wurde mRNA von LRP8 in Thecazellen von mittelgroßen und großen Follikeln sowie in Granulosazellen von Follikeln jeglicher Größe gefunden. Ein anderer Name für LRP8 ist ApoER2 (Mouse Genome Informatics), was bedeutet, dass beide bekannten Reelin Rezeptortypen, ApoER2 und VLDLR, in den Granulosazellen des Ovars exprimiert werden. Dies bekräftigt den Nachweis von Reelin mRNA in den Granulosazellen aus der vorliegenden Arbeit. In der Arbeit von Argov und Sklan (2004) wurde das Vorhandensein der Lipoproteinrezeptoren in den Follikeln eher in Hinblick auf die Steroidsynthese gesehen. Lipoproteine aus dem Plasma sind die Hauptquellen für Cholesterol, welches von den Thecazellen und Granulosazellen für die Steroidsynthese benötigt werden (Wiltbank et al. 1990). Mit Hilfe von bestimmten Transport- und Endozytosemechanismen, wie das Binden an Lipoproteinrezeptoren, gelangen Cholesterin-Ester aus den Lipoproteinen in die Zelle (Schneider et al. 1982). Zwar besitzen ApoER2 und VLDLR eine Vielzahl von Liganden, doch das gleichzeitige Vorhandensein von Reelin mRNA und Reelin Rezeptoren lässt die Überlegung zu, dass Reelin im Ovar ebenso wie Steroide eine Bedeutung für das Wachstum und die Differenzierung der Follikel hat.

Eine andere Arbeitsgruppe hat weiterhin mittels RT-PCR und Immunoblot Analysen nachgewiesen, dass LRP8/ApoER2 verglichen mit anderen Follikeln sehr viel stärker in (bovinen) Granulosazellen dominanter Follikel exprimiert wird (Fayad et al. 2007). Die Expression von anderen Lipoproteinrezeporen, wie LDLR und VLDLR zeigte dabei keine Unterschiede. Mittels Immunhistochemie hat diese Arbeitsgruppe Lokalisation darüber die zelluläre LRP8/ApoER2 hinaus von in der Granulosazellschicht, dort vor allem in der zytoplasmatischen Membran, nicht aber in den Thecazellen oder dem Stroma zeigen können. Zumindest das Vorhandensein von ApoER2 in den Thecazellen bleibt fraglich, wenn man die Arbeiten von Fayad (2007) und Argov (2004) vergleicht, das Vorhandensein von ApoER2 in den Granulosazellen wurde jedoch bestätigt. Mit Hilfe von semiguantitativen PCR Analysen hat die Arbeitsgruppe um Fayad nun untersucht, ob sowohl Reelin als bekannter Ligand für ApoER2 als auch Dab-1, MAPK8IP1 und MAPK8IP2 als bekannte intrazelluläre Segmente von ApoER2 im Reelin Signalweg im dominanten Follikel co-exprimiert werden. Dabei konnte Reelin mRNA vor allem in den Thecazellen von sprungreifen Follikeln, nicht aber im Corpus Luteum oder in den Granulosazellen nachgewiesen werden. Dies widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 4.4.2.2), in der Reelin mRNA in den Granulosazellen von Sekundärfollikeln nachgewiesen wurde. Jedoch sei an dieser Stelle auf die unterschiedliche Methodik, RT-PCR vs. In Situ Hybridisierung und die

andere Spezies hingewiesen (Rind vs. Ratte). Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz von ApoER2 zwischen verschiedenen Spezies werden bei Fayad (2007) zumindest nur für Rind, Mensch und Maus angegeben. MAPK8IP1 mRNA wurde in Granulosazellen nachgewiesen, während MAPK8IP2 und Dab-1 mRNA nicht in Granulosazellen nachgewiesen werden konnten. Die Arbeitsgruppe schließt aus diesen Beobachtungen eine Interaktion von Theca- und Granulosazellschicht durch Reelin, ApoER2 und MAPK8IP1 und eine mögliche Rolle dieser Interaktion im Follikelwachstum.

Neben dem Vorhandensein im Ovar konnte in dieser Arbeit mittels radioaktiv markierter Sonden ein Vorhandensein von Reelin mRNA im Stratum functionale eines Rattenuterus in der Proliferationsphase nachgewiesen werden. Es existieren in der derzeitigen Literatur bisher keine Daten, die auf das Vorhandensein von Reelin mRNA oder Protein im Uterus hinweisen.

5.8 Reelin und Aromatase in weiblichen Gonaden - zyklusabhängig?

Die Aktivität der Aromatase in den weiblichen Gonaden ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Zyklus.

Mittels semiquantitativer PCR Analyse konnte das Vorhandensein von Reelin mRNA im Ovar gezeigt und dieses später in der radioaktiven ISH bestätigt werden. Von Interesse war dabei eine mögliche zyklusabhängige Schwankung der Reelin mRNA Menge in den Geweben. Die Reelin mRNA Menge stieg im Ovar von Diestrus über Proestrus nach Estrus etwas an und fiel dann im Metestrus wieder etwas ab. Ob dies eine tatsächliche zyklusabhängige Schwankung darstellt, ist bisher nicht zweifelsfrei geklärt, zumindest wäre diese nicht so deutlich wie für den Uterus gezeigt (im nächsten Absatz beschrieben). Der Nachweis von zyklusabhängiger Aromatase mRNA im Ovar deckte sich weitestgehend mit den Ergebnissen gängiger Literatur, mit höchsten Estradiol Serum Spiegeln während des Proestrus (Schedin et al. 2000) was mit hohen Aromatase Transkript Spiegeln korreliert. Folglich müsste in dieser Phase die höchste Aromatase-Aktivität vorherrschen. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die höchste Aromatase mRNA Menge im Proestrus nachzuweisen war. Zumindest auf Grundlage der PCR Analysen konnte an diesem Punkt jedoch kein Zusammenhang zwischen der Menge an Reelin bzw. Aromatase mRNA festgestellt werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass in den In Situ Hybridisierungen in den Granulosazellen des Ovars das höchste Reelin mRNA Signal dargestellt wurde, in jenen Zellen, in denen auch hauptsächlich Aromatase vorkommt (McNatty et al. 1974). Im Zusammenhang mit der reduzierten Fertilität von Reeler-Mäusen wurde in einer vorangehenden Doktorarbeit eine reduzierte Aromatase Aktivität in Ovarien von homozygoten Reeler Mutante gezeigt (Schmahl 2012). Weiterhin wurden verlängerte Zyklusphasen und eine unvollständige Zyklusentwicklung gezeigt. Die Hinweise für ein Zusammenwirken von Reelin und Aromatase im Ovar bezogen auf Estrogensynthese, Follikelreifung und Beeinflussung anderer Organe wie dem Uterus, häufen sich. Eine eindeutige Aussage über eine zyklusabhängige Regulation steht für das Ovar derzeit jedoch noch aus.

Bezogen auf eine mögliche zyklusabhängige Reelin Expression zeigte sich im Uterus ein vollkommen anderes Muster als im Ovar. Die höchste Reelin mRNA Expression wurde im Diestrus nachgewiesen und eine auffallend niedrige Menge von etwa 1/5 der Diestrus Menge ist im Proestrus nachgewiesen worden. Im Proestrus kann während des Zyklus die höchste Menge an Serum Estrogen nachgewiesen werden (Schedin et al. 2000). Aromatase mRNA konnte in der PCR zum Zeitpunkt dieser Arbeit im Uterus nicht nachgewiesen werden, was sich jedoch mit dem gegenwärtigen Stand der Forschung deckt. Die Datenlage, ob Estrogene im Uterus überhaupt de novo durch die Aromatase synthetisiert werden, ist noch lückenhaft. Das und Mitarbeiter (2009) haben die Expression von Aromatase mRNA zunächst nur in den Dezidualzellen des Maus Uterus ab Tag 5 und 6 der Schwangerschaft nachweisen können und schreiben den uteruseigenen Estrogenen eine wichtige Bedeutung für die Implantation des Embryos zu. Vor Tag 4 der Schwangerschaft konnte die Arbeitsgruppe keine Aromatase mRNA im Uterus nachweisen. Uteruseigene Aromatase mRNA und Protein wurden außerhalb der Schwangerschaft bisher sonst nur in pathologisch verändertem Uterusgewebe, wie bei Endometriose, Leiomyomen oder Adenomyosis nachgewiesen, wobei vermutet wird, dass die lokal synthetisierten Estrogene einen Einfluss auf das Wachstum dieser Tumoren haben (Olmos Grings et al. 2012; Velasco et al. 2006; Bulun et al. 2005; Burney & Giudice 2012). In gesundem, unveränderten Uterusgewebe gelang der Nachweis bisher noch nicht. Unumstritten ist dagegen die Bedeutung von ovariellen Estrogenen z.B für die normale, zyklische Endometriumproliferation (Leidenberger et al. 2009). Der Uterus

scheint somit eines der Gewebe zu sein, in denen Reelin, aber nicht Aromatase exprimiert werden.

Der beschriebene Uterus in Abschnitt 4.4.2.3 befand sich in der Proliferationsphase, die bekannterweise estrogenabhängig ist und die Phase vor der Ovulation beschreibt. In dieser Phase konnte Reelin mRNA in der In Situ Hybridisierung gezeigt werden. In der PCR Analyse wurde jedoch im Proestrus, die Phase die durch ein hohes Serum E2 gekennzeichnet ist, am wenigsten Reelin mRNA nachgewiesen. Da keine Uteri in anderen Phasen als der Proliferationsphase in der In Situ Hybridisierung untersucht wurden, kann auf Grundlage der PCRs davon ausgegangen werden, dass in anderen Zyklusphasen mehr Reelin mRNA im Uterusgewebe vorliegt. Verglichen mit dem Reelin Signal im ovariellen Sekundärfollikel war im Uterus zudem weniger Reelin mRNA vorhanden. In Folgestudien sollten diese Sachverhalte noch einmal überprüft werden. Zusammengefasst zeigt sich hier jedoch, dass ein hoher E2 Spiegel im Serum mit einer niedrigen Reelin mRNA Expression im Uterus korreliert. Dies führt zu der Frage, ob exogenes Estrogen aus anderen Organen, wie etwa Ovar oder Fettgewebe, einen regulatorischen Einfluss auf die Reelin Synthese im Uterus hat und falls ja, worin der Sinn dieser Regulation besteht. Da bisher weder Daten zu dem Vorhandensein von Reelin im Uterus noch zu Reelin-assoziierten Rezeptoren oder Adaptermolekülen vorhanden sind, bleibt diese Frage zunächst offen. Rein hypothetisch könnte über die Bedeutung einer niedrigen Reelin Menge für eine eventuell anstehende Schwangerschaft gemutmaßt werden. Allerdings wurde wiederum für die Placenta der Reelin Rezeptor ApoER2 nachgewiesen (Kim et al. 1996; Brandes et al. 2001), sodass die Bedeutung und die Zyklusabhängigkeit von Reelin im Uterus zunächst ungeklärt bleiben.

5.9 Relevanz und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen gängige Thesen, dass Reelin auch außerhalb des zentralen Nervensystems wichtige funktionelle Aufgaben in Organen übernimmt. Hier wurde der Fokus auf weibliche und männliche Gonaden gelegt. Durch In Situ Hybridisierung konnte Reelin mRNA in den Gonaden beider Geschlechter nachgewiesen werden. Im Ovar wurde Reelin mRNA vorrangig in den Granulosazellen detektiert, in der Zellschicht also, in der auch hauptsächlich die Aromatase exprimiert wird. Eine zyklusabhängige Reelin mRNA Expression konnte für das Ovar in der PCR nicht eindeutig geklärt werden. Im Uterus konnte Reelin mRNA im Epithel während der Proliferationsphase nachgewiesen werden, die semiquantitativen PCRs zeigten darüber hinaus im Gegensatz zum Ovar eine deutliche Zyklusabhängigkeit von der Reelin mRNA Menge im Uterus. Um diese Ergebnisse zu vervollständigen und deutlicher zu verstehen, wäre es für Folgestudien beispielsweise sinnvoll, die In situ Hybridisierungen mit gonadalen Gewebe von gestageten Tieren durchzuführen, sodass auch Informationen über die zyklusabhängige Expression von Reelin mRNA im Gewebeschnitt vorliegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit wie auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (siehe Abschnitt 5.7) implizieren jedoch, dass Reelin und die Reelin Rezeptoren ApoER2 und VLDLR möglicherweise eine Bedeutung für die Ausdifferenzierung und das Wachstum von Follikeln haben. Im Nebenhoden konnte Reelin mRNA sowohl im Epithel als auch innerhalb der Spermien detektiert werden, weiterhin zeigte sich in der semiquantitativen PCR die höchste Menge an Reelin mRNA zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife. Bezogen auf die männlichen Gonaden häufen sich die Hinweise, dass Reelin und Reelin-Rezeptoren essenzielle Bedeutungen für die Ausreifung und Motilität von Spermien haben, sodass sie ein mögliches Ziel für die Behandlung von männlicher Infertilität darstellen. Morphologische Unterschiede zwischen männlichen Gonaden von Reeler- und Wildtyp-Mäusen sind zudem Gegenstand derzeitiger Forschungen.

E2 und Reelin sind beide in männlichen und weiblichen Gonaden vorhanden. Die Bedeutung von E2 für Wachstum und Regulierung gonadaler Funktionen in beiden Geschlechtern ist gesichert. Es mehren sich die Daten, die in diesem Zusammenhang auch auf eine entsprechende Bedeutung von Reelin hinweisen. Ob tatsächlich eine gegenseitige Beeinflussung von Reelin und E2 in den Gonaden stattfindet und falls sie vorhanden ist, ob sie auf autokrinen oder parakrinen Weg erfolgt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Diese Frage bietet jedoch einen Anreiz für weitere Studien. Dabei wäre auch interessant, in wie fern sich die Aromatase Expression in Gonaden von Reeler- und Wildtyp-Mäusen unterscheidet. Für das Ovar wurde bereits ein signifikanter Unterschied gezeigt (Schmahl, 2012), für die männlichen Gonaden stehen diese Untersuchungen jedoch noch aus. Auf Grundlage der Arbeiten von Bender et al. (2010) und Biamonte et al. (2009) wurde der Frage nachgegangen, ob Reelin regulatorischen Einfluss auf E2 hat. Dabei ergaben sich bezogen auf hippocampale Zellkulturen in dieser Arbeit Hinweise auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied. Nach Behandlung mit Reelin wurde in männlicher Zellkultur deutlich weniger E2 im Medium nachgewiesen als nach der Kontrollbehandlung mit GFP, bei weiblichen Zellkulturen hingegen ergab sich kein Unterschied. Auch bei der Untersuchung einer möglichen Regulation der Aromatase Transkription ergaben sich indirekt Überlegungen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden. Während in der Zelllinie Neuro2A keine Regulation der Aromatase-Promotoraktivität nachzuweisen war, zeigten erste Versuche mit hippocampalen Zellkulturen deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Versuchen. Äquivalent zu den E2 Messungen im Medium ergab sich hier die dringende Überlegung, dass auch hier geschlechtsspezifische Unterschiede vorhanden sind und die gegensätzlichen Messwerte durch unterschiedliche Verhältnisse von männlichen zu weiblichen Zellen zustande kamen. Als Ausblick für zukünftige Projekte wäre hier eine getrennte Betrachtung von weiblichen und männlichen hippocampalen Zellen interessant, weiterhin auch die Betrachtung von Zellen anderer Hirnregionen, wie kortikale Neurone, in denen Reelin synthetisiert wird.

Abschließend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die Hypothese einer Regulation von Estradiol durch Reelin zunächst bestehen bleiben kann. Auf transkriptioneller Ebene konnte eine Regulation der Aromatase durch Reelin nicht zweifelsfrei geklärt werden, jedoch besteht immer noch die Möglichkeit einer Regulation auf posttranskriptioneller, translationeller oder posttranslationeller Ebene. Estradiol und Reelin werden in denselben Geweben exprimiert und zeigen Übereinstimmungen bei der Verwendung von Rezeptoren und Interaktionspartnern von intrazellulären Signalwegen. Die Untersuchung einer gegenseitigen Regulation von Reelin und Estradiol auf verschiedenen Ebenen bietet weiterhin viel Potential für die zukünftige Forschung.
6 Zusammenfassung

Reelin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches in Cajal-Retzius Zellen synthetisiert wird. Reeler-Mäuse haben einen Defekt in der Reelin-Synthese und zeichnen sich durch motorische Defizite aus. Histologische Analysen haben gezeigt, dass deren kortikale Organisation sowohl im Kleinhirn, Großhirn als auch im Hippocampus gestört ist. Reeler-Mäuse verfügen darüber hinaus über eine eingeschränkte Fertilität und zeigen eine gestörte Migration von GnRH Neuronen. Weibliche Reeler-Mäuse zeigen zudem eine verminderte Aromataseexpression in Tertiärfollikeln des Ovars. In männlichen heterozygoten Reeler-Mäusen wurden nach Applikation von Estradiol (E2) erhöhte Reelin RNA und Protein Spiegel nachgewiesen, umgekehrt konnte nach Inhibition der Aromatase eine reduzierte Reelin Expression im Hippocampus gezeigt werden. Die lokale Estradiolsynthese wird durch mehrere Faktoren bestimmt, wie z.B. durch GnRH, die E2-Konzentration selbst und die Aromatase-Aktivität. Aromatase ist ein wichtiges Enzym, das aus den Vorstufen Testosteron und Androstendion die Synthese von Estradiol katalysiert.

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob Reelin die Aromatase Transkription moduliert. Dafür wurde der Aromatase-Promotor vor ein Reportergen (Luciferase) kloniert und dessen Aktivität in Lumineszenz-Assays in An- und Abwesenheit von Reelin bestimmt. In hippocampalen Zellkulturen konnte auf Transkriptionsebene keine eindeutige Regulation gezeigt werden, es konnte jedoch die Hypothese aufgestellt werden, dass bei einer möglichen Regulation Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Zellen vorhanden sind. In männlichen hippocampalen Zellkulturen wurde zudem nach Reelin-Zugabe eine Herunterregulation der in das Medium sezernierten E2-Menge nachgewiesen. Mittels semiguantitativer PCR konnte ein deutlicher Anstieg von Reelin mRNA im Nebenhoden von 12 Wochen alten Ratten gezeigt werden. In Situ Hybridisierungen zeigten darüber hinaus die zelluläre Lokalisation von Reelin in Gonaden: Im Nebenhoden ließen sich interessanterweise deutliche regionale Unterschiede in der Reelin mRNA Expression beobachten. Reelin scheint auch in Gonaden von großer Wichtigkeit zu sein und trägt möglicherweise sowohl zur Follikelreifung als auch zur Ausdifferenzierung und Mobilität von Spermatozoen bei.

7 Literaturverzeichnis

Wissenschaftliche Artikel

- Abdelgadir SE, Resko JA, Ojeda SR, Lephart ED, McPhaul MJ, Roselli CE. 1994. Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 135 (1):395–401
- Abe K, Takano H, Ito T. 1983. Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. *Japanese Archives of Histology* 46 (1):51–68
- Abe-Dohmae S, Takagi Y, Harada N. 1997. Autonomous expression of aromatase during development of mouse brain is modulated by neurotransmitters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61:299–306
- Abou-Haila A, Fain-Maurel M. 1984. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: Morphological and histochemical characterization. *Anatomical Record.* 209 (2):197–208
- Adams MM, Oung T, Morrison JH, Gore AC. 2001. Length of Postovariectomy Interval and Age, but Not Estrogen Replacement, Regulate N-Methyl-d-Aspartate Receptor mRNA Levels in the Hippocampus of Female Rats. *Experimental Neurology* 170 (2):345–56
- Altundag K, Ibrahim NK. 2006. Aromatase Inhibitors in Breast Cancer: An Overview. *The Oncologist* 11 (6):553–62
- Andersen OM, Yeung CH, Wellner M, Andreassen TK, Erdmann B, et al. 2003. Essential Role of the Apolipoprotein E Receptor-2 in Sperm Development. *Journal of Biological Chemistry* 278 (26):23989–95
- Angerer LM, Cox KH, Angerer RC. 1987. Demonstration of tissue-specific gene expression by in situ hybridization. *Methods in Enzymology* 152:649–61
- Arakane F, Sugarawa T, Nishinu H, Zhiming L, Holt JA, et al. 1996. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13731–36
- Argov N, Sklan D. 2004. Expression of mRNA of lipoprotein receptor related protein 8, low density lipoprotein receptor, and very low density lipoprotein receptor in bovine ovarian cells during follicular development and corpus luteum formation and regression. *Molecular Reproduction and Development*. 68 (2):169–75
- Arnaud L, Ballif BA, Cooper JA. 2003. Regulation of Protein Tyrosine Kinase Signaling by Substrate Degradation during Brain Development. *Molecular and Cellular Biology* 23 (24):9293–302
- Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. 1999. Localization of estrogen receptor β-immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain *Glia* 3 (26):260–67
- Azcoitia I, Yague J G, Garcia-Segura LM. 2011. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* 119:139–47
- Baloyannis SJ. 2005. Morphological and Morphometric Alterations of Cajal-Retzius Cells in early Cases of Alzheimer's Disease:a Golgi and Electron Microscope Study. *Int Journal of Neuroscience* 115:965–80
- Balthazart J, Baillien M, Ball GF. 2001. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 79:261–77
- Beffert U, Stolt PC, Herz J. 2004. Functions of lipoprotein receptors in neurons. *The Journal of Lipid Research* 45 (3):403–09

- Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qui S, Masiulis I, et al. 2005. Modulation of Synaptic Plasticity and Memory by Reelin Involves Differential Splicing of the Lipoprotein Receptor Apoer2. *Neuron* 47:567–79
- Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski J, et al. 2010. Roles of 17 -Estradiol Involve Regulation of Reelin Expression and Synaptogenesis in the Dentate Gyrus. *Cerebral Cortex* 20 (12):2985–95
- Benhayon D, Magdaleno S, Curran T. 2003. Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Molecular Brain Research* 112:33–45
- Biamonte F, Assenza G, Marino R, D'Amelio M, Panteri R, et al. 2009. Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival. *Neurobiology of Diseases* 36:103–15
- Bock HH, Herz J. 2003. Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Current Biology* 13 (1):18–26
- Boon WC, Chow JDY, Simpson ER. 2010. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. *Progress in Brain Research*, 181:209–31
- Botella-Lopez A, Burgaya F, Gavin R, García-Ayllón MS, Gómez-Tortosa E, et al. 2006. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (14):5573–78
- Brandes C, Kahr L, Stockinger W, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J. 2001. Alternative Splicing in the Ligand Binding Domain of Mouse ApoE Receptor-2 Produces Receptor Variants Binding Reelin but Not alpha 2-Macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 276 (25):22160–69
- Bulun S, Lin Z, Zhao H, Lu M, Amin S, Reierstad S, Chen D. 2009. Regulation of Aromatase Expression in Breast Cancer Tissue. Annals of the New York Academy of Sciences 1155 (1):121– 31
- Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, et al. 2005. Regulation of Aromatase Expression in Estrogen-Responsive Breast and Uterine Disease: From Bench to Treatment. *Pharmacological Reviews* 57 (3):359–83
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuk T, Sasano H, Shozu M. 2003. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86:219–24.
- Burk RF, Hill KE. 2005. Selenoprotein P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis. *Annual Review of Nutrition.* 25 (1):215–35
- Burney RO, Giudice LC. 2012. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility* 98 (3):511–19
- Cariboni A, Rakic S, Liapi A, Maggi R, Goffinet A, Parnavelas JG. 2005. Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Development* 132 (21):4709–18
- Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. 2011. Estrogens: new players in spermatogenesis. *Reproductive Biology* 11 (3):171–93
- Carreau S, Hess RA. 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1546):1517–35
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reproductive Biology and Endocrinoly* 1 (1):3

- Catalano S, Barone I, Giordano C, Rizza P, Qi H, et al. 2009. Rapid Estradiol/ER Signaling Enhances Aromatase Enzymatic Activity in Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology* 23 (10):1634–45
- Caviness VJ. 1982. Development of neocortical afferent systems: studies in the reeler mouse. *Neurosciences Research Program bulletin* 4 (20):560–69
- Caviness VJ, Crandall JE, Edwards MA. The Reeler Malformation. Implications for neocortical histogenesis. *Cerebral Cortex* 7:59–89

Caviness VJ, So D, Sidman R. 1972. The Hybrid Reeler Mouse. The Journal of Heredity:241-46

- Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. 2009. Adiponectin increases insulinlike growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertility and Sterility* 92 (6):1988–96
- Chai X, Förster E, Zhao S, Bock HH, Michael F. 2009. Reelin acts as a stop signal for radially migrating neurons by inducing phosphorylation of n-cofilin at the leading edge. *Communicative & Integrative Biology* 2:4:375–77
- Chalfie M, Tu Y, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* (263):802–05
- Clatworthy AE, Stockinger W, Christie RH, Schneider WJ, Nimpf J, Hyman BT, Rebeck GW. 1999. Expression And Alternate Splicing Of Apolipoprotein E Receptor 2 in Brain. *Neuroscience* 90 (3):903–11
- Cornwall GA, Hann SR. 1995. Specialized gene expression in the epididymis. *Journal of Andrology* 16 (5):379–83
- Cornwall GA, Orgebin-Crist MC, Hann SR. 1992. The CRES gene: a unique testis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. *Molecular Endocrinology* 6 (10):1653–64
- Couse JF, Korach KS. 1999. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocrine Reviews* 20 (3):358–417
- Crino P. 2001. New RELN Mutation Associated with Lissencephaly and Epilepsy. *Epilepsy Currents* 1 (2):72
- D'Arcangelo G. 2006. Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy & Behavior* 8:81–90
- D'Arcangelo G, Homayoun R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. 1999. Reelin Is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron* 24:471–79
- Dacheux JL, Chevrier C, Lanson Y. 1987. Motility and Surface Transformations of Human Spermatozoa during Epidiymal Transit. *Annals of the New York Academy of Science* 513 (1 Cell Biology):560–63
- D'Arcangelo G, G. Miao G, Chen S, Scares HD, Morgan JI, Curran T. 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374 (6524):719–23
- Das A, Mantena SR, Kannan A, Evans DB, Bagchi MK, Bagchi IC. 2009. De novo synthesis of estrogen in pregnant uterus is critical for stromal decidualization and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (30):12542–47
- Derer P, Derer M. 1990. Cajal-Retzius Cell Ontogenesis and Death in Mouse Brain visualized with Horseradish Peroxidase and Electron Mikroskopy. *Neuroscience* 36:839–56.
- Drakew A, Deller T, Heimrich B, Gebhardt C, Del Turco D, et al. 2002. Dentate Granule Cells in Reeler Mutants and VLDLR and ApoER2 Knockout Mice. *Experimental Neurology* 76:12–24

- Eccleston ED, White TW, Howard JB, Hamilton DW. 1994. Characterization of a cell surface glycoprotein associated with maturation of rat spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development.* 37 (1):110–19
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137 (11):4796–805
- Falconer DS. 1951. Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological actions in the house mouse (Mus musculus L.). *Journal of Genetics* 50 (2):192–205
- Fatemi SH, Stary JM, Earle JA, Araghi-Niknam M, Eagan E. 2005. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum 72 *Schizophrenia Research*:109– 22.
- Fayad T, Lefebvre R, Nimpf J, Silversides DW, Lussier JG. 2007. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 8 (LRP8) Is Upregulated in Granulosa Cells of Bovine Dominant Follicle: Molecular Characterization and Spatio-Temporal Expression Studies. *Biology of Reproduction* 76 (3):466–75
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, Schassen C von, Bottner M, Jarry H, Rune GM. 2006. Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *Journal* of *Neurochemistry* 97 (4):1136–44
- Fitzpatrick SL, Richards JS. 1994. Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *Molecular Endocrinology* 8 (10):1309–19
- Flickinger CJ, Herr JC, Klotz KL. 1988. Immunocytochemical localization of the major glycoprotein of epididymal fluid from the cauda in the epithelium of the mouse epididymis. *Cell and Tissue Research* 251 (3):603–10
- Förster E, Jossin Y, Zhao S, Chai X, Frotscher M, Goffinet AM. 2006. Recent progress in understanding the role of Reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience* 23 (4):901–09
- Förster E, Tielsch A, Saum B, Weiss K, Johanssen C, et al. 2002. Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proceedings* of the National Academy of Sciences 99 (20):13178–83
- Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. 1999. 17b-Estradiol Enhances NMDA Receptor-Mediated EPSPs and Long-Term Potentiation. *Journal of Neurophysiology* 81 (2):925– 29
- Frotscher M. 1997. Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell and Tissue Research* 290 (2):315–22
- Frotscher M, Haas CA, Förster E. 2003. Reelin Controls Granule Cell Migration in the Dentate Gyrus by Acting on the Radial Glial Scaffold. *Cerebral Cortex* 13 (6):634–40
- García-Miranda P, Vázquez-Carretero MD, Gutiérrez G, Peral MJ, Ilundáin AA. 2012. Lack of reelin modifies the gene expression in the small intestine of mice. *Journal of Physiology and Biochemistry* 68 (2):205–18
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology* 63:29–60
- Garrett SH, Garrett JE, Douglass J. 1991. In situ histochemical analysis of region-specific gene expression in the adult rat epididymis. *Molecular Reproduction and Development* 30 (1):1–17

- Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G, Panfili E. 1997. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 57 (6):1502–08
- Goffinet AM. 1979. An early development defect in the cerebral cortex of the reeler mouse. *Anatomy and Embryology* 157 (2):205–16
- Gonzalez M, Reyes R, Damas C, Alonso R, Bello AR. 2008. Oestrogen receptor α and β in female rat pituitary cells: An immunochemical study. *General and Comparative Endocrinology* 3 (155):857–68
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology* 36 (1):59–72
- Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, et al. 1986. Clonig of the Human Oestrogen Receptor cDNA. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 24:71–83
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, DiGiorgi Gerevini V, Yogesh D, et al. 2000. Decrease in Reelin and Glutamic Acid Decarboxylase67 (GAD67) Expression in Schizophrenia and Bipolar Disorder: A Postmortem Brain Study. *Archives of General Psychiatry* 57:1061–69
- Hack I, Hellwig S, Junghans D, Brunne B, Bock HH, Zhao S, Frotscher M. 2007. Divergent roles of ApoER2 and VIdIr in the migration of cortical neurons. *Development* 134 (21):3883–91
- Hamburgh M. 1963. Analysis of the Postnatal Developmental Effects of "Reeler," a Neurological Mutation in Mice. A Study in Developmental Genetics. *Developmental Biology* 8:165–85
- Harada N. 1997. Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61 (3-6):175–84
- Hashimoto-Torii K, Torii M, Sarkisian MR, Bartley CM, Shen J, et al. 2008. Interaction between Reelin and Notch Signaling Regulates Neuronal Migration in the Cerebral Cortex. *Neuron* 60 (2):273–84
- Herring A, Donath A, Steinera KM, Widera MP, Hamzehiana S, et al. 2012. Reelin Depletion is an Early Phenomenon of Alzheimer's Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease* 30:963–79
- Herz J, Chen Y. 2006. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 7 (11):850–59
- Hess RA. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinoly* 1 (1):52
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, 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* 24:481–89
- Hill RA, Chua HK, Jones ME, Simpson ER, Boon WC. 2009. Estrogen deficiency results in apoptosis in the frontal cortex of adult female aromatase knockout mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 1 (41):1–7
- Hilz H, Wiegers U, Adamietz P. 1975. Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of 'Masked' Proteins. *European Journal of Biochemistry* 56 (1):103–08
- Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, et al. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (3):865–70
- Honda S, Harada N, Tagaki Y. 1994a. Novel Exon 1 of the Aromatase Gene Specific for Aromatase Transcripts in Human Brain. *Biochemical And Biological Research Communications* 198 (3):1153– 60

- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, et al. 2000. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genetics* 26 (1):93–96
- Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. 1997. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389 (6652):733–37
- Huang H, Chang P, Chang K, Chen C, Lin C, et al. 2009. Formulation of novel lipid-coated magnetic nanoparticles as the probe for in vivo imaging. *Journal of Biomedical Science* 16 (1):86
- Ikeda Y, Terashima T. 1997. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Development Dynamics* 210:157–72
- Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, et al. 1998. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (26):15718–23
- Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF. 2007. Estrogen receptor α and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 11 (28):1670–81
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bunick D. 1998. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *Journal of Andrology* 19 (1):65–71
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, et al. 2007. The Rat Epididymal Transcriptome: Comparison of Segmental Gene Expression in the Rat and Mouse Epididymides. *Biology of Reproduction* 76 (4):561–70
- Kallen CB, Arakane F, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Strauss JF. 1998. Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145:39–45
- Kim D, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, et al. 1996. Human Apolipoprotein E Receptor 2.A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *Journal of Biological Chemistry* 271 (14):8373–80
- Kinoshita Y, Chen S. 2003. Induction of Aromatase (CYP19) Expression in Breast Cancer Cells through a Nongenomic Action of Estrogen Receptor α. *Cancer Research* 63 (13):3546–55
- Kobold D, Grundmann A, Piscaglia F, Eisenbach C, Neubauer K, et al. 2002. Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts. *Journal of Hepatology* 36:607–13
- Kobow K, Jeske I, Hildebrandt M, Hauke J, Hahnen E, et al. 2009. Increased Reelin Promoter Methylation Is Associated With Granule Cell Dispersion in Human Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68 (4):356–64
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, et al. 2004. Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *Journal of Neuroscience* 24 (26):5913–21
- Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 93:5925–30
- Kuo G, Arnaud L, Kronstad-O'Brien P, Cooper JA. 2005. Absence of Fyn and Src Causes a Reeler-Like Phenotype. *Journal of Neuroscience* 25 (37):8578–86
- Lambard S, Galeraud-Denis I, Bouraima H, Bourguiba S, Chocat A, Carreau S. 2003. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. *Molecular Human Reproduction* 9 (3):117–24

- Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S, Carreau S. 2005. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1-6 (95):63–69
- Lee SJ, McEwen BS. 2001. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41 (1):569–91
- Leemhuis J, Bock HH. 2011. Reelin modulates cytoskeletal organization by regulating Rho GTPases. Communicative & Integrative Biology 4 (3):254–57
- Levin ER. 2001. Genome and Hormones: Gender Differences in Physiology Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *Journal of Applied Physiology* 91:1860–67.
- Liu H, Lin YC, Chao CF, Chang SY, Sun GH. 2000. GP-83 and GP-39, two glycoproteins secreted by human epididymis are conjugated to spermatozoa during maturation. *Molecular Human Reproduction* 6 (5):422–28
- Lizardi PM, Engelberg A. 1979. Rapid Isolation of RNA Using Proteinase K and Sodium Perchlorate. *Analytical Biochemistry* 98:116–22.
- Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER. 1993. Tissue-specific and Hormonally Controlled Alternative Promoters Regulate Aromatase CytochromPe 450 Gene Expression in Human Adipose Tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 268:19463–70
- Manelli AM, Cadman ED, Shiosaki K, Puttfarcken PS. 1997. The Presence of the Complement Cascade Does Not Lead to Neuronal Cell Death in Primary Hippocampal Cultures. *Brain Research Bulletin* 42 (3):187–93
- Masiulis I, Quill TA, Burk RF, Herz J. 2009. Differential functions of the Apoer2 intracellular domain in selenium uptake and cell signaling. *Biological Chemistry* 390 (1):67-73
- Matsuki T, Pramatarova A, Howell BW. 2008. Reduction of Crk and CrkL expression blocks reelininduced dendritogenesis. *Journal of Cell Science* 121 (11):1869–75
- McNatty KP, Sawers RS, McNeilly AS. 1974. A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature* 250:653–55
- Michael MD, Kilgore MW, Morohashi K, Simpson ER. 1995. Ad4BP/SF-1 Regulates Cyclic AMPinduced Transcription from the Proximal Promoter (PII) of the Human Aromatase P450 (CYP19) Gene in the Ovary. *Journal of Biological Chemistry* 270 (22):13561–66
- Miller TW, Shin I, Kagawa N, Evans DB, Waterman MR, Arteaga CL. 2008. Aromatase is phosphorylated in situ at serine-118. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 112 (1-3):95–101
- Mitra SW, et al. 2003. Immunolocalization of Estrogen Receptor beta in the Mouse Brain: Comparison with Estrogen Receptor alpha. *Endocrinology* 144 (5):2055–67
- Moore HDM. 1998. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *Andrologia* 30 (4-5):233–39
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, et al. 2007. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *Journal of Neurochemistry* 100 (4):950–67
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. 1971a. Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human foetuses. *Journal of Endocrinology* 51 (4):795–96
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. 1971b. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2 (33):368–70

- Nishi Y, 2001. Establishment and Characterization of a Steroidogenic Human Granulosa-Like Tumor Cell Line, KGN, That Expresses Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Endocrinology* 142 (1):437–45
- Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, 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. *Journal of Neuroscience* 28 (41):10339–48
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, et al. 1995. The reeler Gene-Associated Antigen on Cajal-Retzius Neurons Is a Crucial Molecule for Laminar Organization of Cortical Neurons. *Neuron* 12:899–912.
- Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. 1997. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 94 (4):1476–81
- Olmos Grings A, Lora V, Dias Ferreira G, Simoni Brum I, Eye Corleta H von, Capp E. 2012. Protein Expression of Estrogen Receptors α and β and Aromatase in Myometrium and Uterine Leiomyoma. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 73 (2):113–17
- Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J. 1970. Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1 (65):129-136,
- Papadopoulos V, Carreau S, Szerman-Joly E, Drosdowsky MA, Dehennin L, Scholler R. 1986. Rat testis 17β-estradiol: Identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. *Journal of Steroid Biochemistry* 24 (6):1211–16
- Perez-Garcia CG, Tissir F, Goffinet AM, Meyer G. 2004. Reelin receptors in developing laminated brain structures of mouse and human. *European Journal of Neuroscience* 20 (10):2827–32
- Perrone G, Vincenzi B, Zagami M, Santini D, Panteri R, et al. 2007. Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade. *Modern Pathology* 20 (3):344–51
- Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ. 1998. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing g-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3221–26
- Pinto-Lord MC, Evrard P, Caviness VJ. 1982. Obstructed neuronal migration along radial glial fibers in the neocortex of the reeler mouse: a Golgi-EM analysis. *Brain Research* 256 (4):379–93
- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune GM. 2006. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16 (5):464–71
- Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM. 2008. Gonadotropinreleasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *The Journal of Cell Biology* 180 (2):417–26
- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13 (2):226–34
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *General and Comparative Endocrinology* 111 (2):229–33
- Pulido JS, Sugaya I, Comstock J, Sugaya K. 2007. Reelin expression is upregulated following ocular tissue injury. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 245 (6):889–93

- Rakic P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. The *Journal* of Comparative Neurology 145 (1):61–83
- Rakic P. 1988. Specification of Cerebral Cortical Areas. Science 241:170-76.
- Rakic P, Caviness VJ. 1995. Cortical Development: View from Neurological Mutants Two Decades Later. *Neuron* (14):1101–04
- Reddy DS. 2009. The role of neurosteroids in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. *Epilepsy Research* 85 (1):1–30
- Reddy SS, Connor TE, Weeber EJ, Rebeck W. 2011. Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. *Molecular Neurodegeneration* 6 (1):30
- Reed MJ, Topping L, Coldham NG, Purohit A, Ghilchik MW, James VH. 1993. Control of aromatase activity in breast cancer cells: The role of cytokines and growth factors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 44 (4-6):589–96
- Retzius G. 1893. Die Cajalschen Zellen der Großhirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren. *Biol Unters* 5:1–9
- Retzius G. 1984. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Cajalschen Zellen der Großhirnrinde des Menschen. *Biol Unters* 6:29–34
- Richards JA, Petrel TA, Brueggemeier RW. 2002. Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80 (2):203–12
- Robb GW, Amann RP, Killian GJ. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Reproduction* 54 (1):103–07
- Robertson KM, O´Donnel L, Jones MEE, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional Aromatase (cyp 19) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 7986-91
- Rommerts FFG, Jong FH de, Brinkmann AO, van der Molen HJ. 1982. Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *Reproduction* 65 (2):281–88
- Rosenberg ME, Silkensen J. 1995. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 27 (7):633–45
- Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelmann G, Frotscher M. 2002. Estrogen upregulates Estrogen Receptor alpha and Synaptophysin in Slice Cultures of Rat Hippocampus. *Neuroscience* 113:167–75
- Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K. 2003. Dendritic Growth and Spine Formation in Response to Estrogen in the Developing Purkinje Cell. *Endocrinology* 144 (10):4466–77
- Samama B, Boehm N. 2005. Reelin immunoreactivity in lymphatics and liver during development and adult life. *Anatomical Record* 285 (1):595–99
- Santen R, Harvey HA. 1999. Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocrine Related Cancer* 6 (1):75–92
- Sasahara K, Shikimi H, Haraguchi S, Sakamoto H, Honda S, Harada N, Tsutsui K. 2007. Mode of Action and Functional Significance of Estrogen-Inducing Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis in the Developing Purkinje Cell. *Journal of Neuroscience* 27 (28):7408–17
- Sasano H, Takahashi K, Satoh F, Nagura H, Harada N. 1998. Aromatase in the human central nervous system. *Clinical Endocrinology* 48 (3):325–29

- Schedin P, Mitrenga T, Kaeck M. 2000. Estrous Cycle Regulation of Mammary Epithelial Cell Proliferation, Differentiation, and Death in the Sprague- Dawley Rat: A Model for Investigating the Role of Estrous Cycling in Mammary Carcinogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5 (2):211–25
- Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, Brown MS. 1982. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *The Journal of Biological Chemistry* 257 (5):2667–73
- Segal M, Murphy D. 2001. Estradiol Induces Formation of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons: Functional Correlates. *Hormones and Behavior* 40:156–59
- Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, Gonzalez-Fernandez F. 2007. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Molecular Vision* 13:823–32
- Seripa D, Matera MG, Franceschi M, Daniele A, Alessandra B, et al. 2008. The RELN Locus in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 14:335–44.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular Physiology* 59:223–39
- Short DJ, Woodnott DP. 1969. *The I.A.T. Manual of Laboratory Animal Practice and Techniques*. Sprinfiled, Illinois: C.H. Thomas
- Shozu M, Sumitani H, Murakami K, Segawa T, Yang HJ, Inoue M. 2001. Regulation of aromatase activity in bone-derived cells: possible role of mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 79 (1-5):61–65
- Sibbe M, Forster E, Basak O, Taylor V, Frotscher M. 2009. Reelin and Notch1 Cooperate in the Development of the Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience* 29 (26):8578–85
- Simpson ER. 1993. Tissue-Specific Promotors regulate Aromatase Cytochrome P450 Expression. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 44:321–30
- Simpson ER. 2004. Aromatase: Biologic Relevance of Tissue-Specific Expression. Seminars in Reproductive Medicine 22 (1):11–23
- Smalheiser NR. 1999. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*:1281–86
- Soriano E, Alvardo-Mallart RM, Dumesnil N, Del Rìo JA, Sotelo C. 1997. Cajal-Retzius Cells Regulate the Radial Glia Phenotype in the Adult and Developing Cerebellum and Alter Granule Cell Migration. *Neuron* 18:563–77.
- Stanfield BB, Cowan WM. 1979. The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *Journal of Comparative Neurology* 185 (3):393–422
- Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER. 1988. Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 59 (1-2):93–99
- Stockinger W, Brandes C, Fasching D, Herman M, Gotthard M, et al. 2000. The Reelin Receptor ApoER2 Recruits JNK-interacting Proteins-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry* 275 (33):25625–32
- Stoffel-Wagner B, Watzka M, Schramm J, Bidlingmaier F, Klingmüller D. 1999. Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in different areas of the human brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 70 (4-6):237–41
- Strittmater WJ. 2000. Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. Annals of the New York Academy of Sciences 924 (1):91–92

- Sun G, Lin YC, Gou YW, Chang SY, Liu HW. 2000. Purification of GP-83, a glycoprotein secreted by the human epididymis and conjugated to mature spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 6 (5):429–34
- Tian C, Gong Y, Yang Y, Shen W, Wang K, et al. 2012. Foxg1 Has an Essential Role in Postnatal Development of the Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience* 32 (9):2931–49
- Tissir F, Goffinet AM. 2003. Reelin and brain development. *Nature Review Neuroscience* 4 (6):496– 505
- Toran-Allerand CD, Singh M, György S, Jr. 1999. Novel Mechanisms of Estrogen Action in the Brain: New Players in an Old Story. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20:97–121
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins, NA, Labrie F, Giguère V. 1997. Cloning, Chromosomal Localization, and Functional Analysis of the Murine Estrogen Receptor. *Molecular Endocrinology* 11 (3):353–65
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, et al. 1999. Reeler/Disabled-like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell and Tissue Research* 97:689–701
- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QA. 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125 (6):871–78
- Valentine WM, Abel TW, Hill KE, Austin LM, Burk RF. 2008. Neurodegeneration in Mice Resulting From Loss of Functional Selenoprotein P or Its Receptor Apolipoprotein E Receptor 2. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 67 (1):68–77
- van Gijlswijk R, Wiegant J, Vervenne R, Lasan R, Tanke H, Raap A. 1996. Horseradish peroxidaselabeled oligonucleotides and fluorescent tyramides for rapid detection of chromosome-specific repeat sequences. *Cytogenetics and Cell Genetics* 75 (4):258–62
- Velasco I, Rueda J, Acién P. 2006. Aromatase expression in endometriotic tissues and cell cultures of patients with endometriosis. *Molecular Human Reproduction* 12 (6):377–81
- von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner G, Rune GM. 2006. Oestrogen Synthesis in the Hippocampus: Role in Axon Outgrowth. *Journal of Neuroendocrinology* 18 (11):847–56
- Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT. 1995. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Research* 703:26–30
- Weeber EJ. 2002. Reelin and ApoE Receptors Cooperate to Enhance Hippocampal Synaptic Plasticity and Learning. *Journal of Biological Chemistry* 277 (42):39944–52
- Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM. 2001. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *Journal of Neurochemistry* 76 (6):1879–86
- Weniger JP, Zeis A. 1983. [Aromatization of testosterone by the rat embryo testis]. *C R Seances Acad Sci III* 296 (6):293–96
- Westwood FR. 2008. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology* 36 (3):375–84
- Wiltbank MC, Diskin MG, Flores JA, Niswender GD. 1990. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F2 alpha. *Biology* of Reproduction 42 (2):239–45

- Wiszniewska B. 2002. Primary culture of the rat epididymal epithelial cells as a source of oestrogen. *Andrologia* 34 (3):180–87
- Woolley CS, McEwen BS. 1992. Estradiol Mediates Fluctuation in Hippocampal Synapse Density during the Estrous Cycle in the Adult Rat. *The Journal of Neuroscience* 12:3642–50
- Yilmaz MB, Wolfe A, Cheng Y, Glidewell-Kenney C, Jameson JL, Bulun SE. 2009. Aromatase Promoter I.f is Regulated by Estrogen Receptor Alpha (ESR1) in Mouse Hypothalamic Neuronal Cell Lines. *Biology of Reproduction* 81 (5):956–65
- Yilmaz MB, Wolfe A, Zhao H, Brooks DC, Bulun SE. 2011. Aromatase promoter I.f is regulated by progesterone receptor in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *Journal of Molecular Endocrinology* 47 (1):69–80
- Zanato VF, Martins MP, Anselmo-Franci JA, Petenusci SO, Lamano-Carvalho TL. 1994. Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27 (5):1273–80
- Zhao S, Chai X, Förster E, Frotscher M. 2004. Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* 131 (20):5117–25
- Zhao Y, Argawal VR, Mendelson CR, Simpson ER. 1996. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 137 (12):5739–42

Bücher

- Leidenberger F, Ortmann O, Strowitzki T, 2009. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Heidelberg: Springer Verlag. 4th ed. :29-35
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 8th ed.
- Welsch U, 2006. Lehrbuch Histologie. München: Urban und Fischer Verlag. 2nd ed.

Dissertationen

Schmahl C, 2012. Der ovarielle Phänotyp der Reelermaus. Medizinische Dissertation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Internetquellen

http://www.informatics.jax.org/searchtool/Search.do?query=apoer2&submit=Quick+Search, (am 03.11.2012, 11:05 Uhr)

http://www.pan-biotech.com/content/images/stories/serumfreiesysteme/panexinnt/nta-hek.jpg, (am 29.9.2012, 12:19 Uhr)

http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgl3-luciferase-reporter-vectors-protocol/, (am 18.07.2012, 14:26 Uhr)

http://www.qiagen.com/products/cloning/pcrcloningsystem/qiagenpcrcloningkit.aspx#Tabs=t1, (am 18.07.2012, 14:03 Uhr)

8 Darstellungsverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abbildung 1	Cajal-Retzius Zellen im Nagergehirn, Zeichung von Cajal 18919
Abbildung 2	Modell der Migration von Neuronen im Neocortex der Wildtyp Maus (+/+)
	und der homozygoten Reeler-Maus (rl/rl)11
Abbildung 3	Expression von ApoER2 im Nebenhoden der Maus14
Abbildung 4	Aromatisierung von Androgenvorstufen durch das Enzym Aromatase
	(CYP19A1 Gen)16
Abbildung 5	Das Humane Aromatase (CYP19A1) Gen17
Abbildung 6	HEK 293 Zellen in Kultur mit DMEM/F-1227
Abbildung 7	Neuro2A Zellen in Kultur mit DMEM und 10% FCS28
Abbildung 8	KGN Zellen in Kultur mit DMEM/F-12 und 10% FCS
Abbildung 9	Primäre hippocampale Zellkultur29
Abbildung 10	Darstellung der durch Firefly bzw. Renilla Luciferase katalysierten
	Reaktionen
Abbildung 11	Darstellung des pDrive Cloning Vektors
Abbildung 12	pGL3-Basic Vektor luc+ codiert für die modfizierte Firefly-Luciferase37
Abbildung 13	Multiple Klonierungsregionen im pGL3 Basic Vektor
Abbildung 14	Semiquantitative PCR Analyse: Altersabhängige Reelin mRNA Expression
	in Nebenhodengewebe der Ratte53
Abbildung 15	Semiquantitative PCR Analyse: Altersabhängige Reelin mRNA Expression
	in Hodengewebe der Ratte54
Abbildung 16	Relative Veränderungen der Serumhormonspiegel von Estrogen,
	Progesteron und Luteinisierenden Hormon (LH) während eines normalen 4
	Tages Zyklus der Ratte55
Abbildung 17	Semiquantitative PCR Analyse: Reelin mRNA Expression im Ovar der Maus
	in verschiedenen Zyklusphasen56
Abbildung 18	Semiquantitative PCR Analyse: Aromatase mRNA Expression im Ovar der
	Maus in verschiedenen Zyklusphasen56
Abbildung 19	Semiquantitative PCR Analyse: Reelin mRNA Expression im Uterus der
	Maus in verschiedenen Zyklusphasen57
Abbildung 20	Radioimmunassay: Estradiol (E2)-Bestimmung in Überständen von KGN
	Zellen (A) und Neuro2A Zellen (B) nach Stimulation mit Reelin

Abbildung 21	Radioimmunassay: Estradiol (E2)-Bestimmung in Überständen primärer
	hippocampaler Dispersionskulturen, gemischt weiblich und männlich, nach
	Stimulation mit Reelin (Versuch 1)59
Abbildung 22	Radioimmunassay: Estradiol (E2)-Bestimmung in Überständen primärer
	hippocampaler Dispersionskulturen, gemischt weiblich und männlich, nach
	Stimulation mit Reelin (Versuch 2)60
Abbildung 23	Radioimmunassay: Estradiol (E2)-Bestimmung in Überständen primärer
	hippocampaler Dispersionskulturen, nur weibliche / nur männliche
	Hippocampi, nach Stimulation mit Reelin61
Abbildung 24	Transfektionseffizienz in Neuro2A Zellen mit Green fluorescent Protein
	(GFP)62
Abbildung 25	Streudiagramm: Streuung der gemessenen Firefly RLU in Neuro2A Zellen
	nach Stimulation mit Reelin65
Abbildung 26	Neuro2A Zellen transfiziert mit Firefly Luciferase Vektoren (pGL3 basic,
	Promotor If, Promotor PII, Promotor If TATA), stimuliert mit Reelin66
Abbildung 27	Neuro2A Zellen Verhältnisoptimierung Firefly /Renilla Luciferase67
Abbildung 28	Neuro2A Zellen Vergleich Firefly und Firefly/Renilla (90:10) in PII68
Abbildung 29	Streudiagramm: Streuung der gemessenen Firefly RLU in primären
	hippocampalen Zellen nach Stimulation mit Reelin70
Abbildung 30	Hippocampale Zellen transfiziert mit Firefly Luciferase Vektoren (pGL3
	basic, Promotor If, Promotor PII, Promotor If TATA), stimuliert mit Reelin .71
Abbildung 31	Verhältnisoptimierung Firefly : Renilla Luciferase in Primären
	Hippocampalen Zellen72
Abbildung 32	Hippocampale Zellen transfiziert mit Firefly Luciferase Vektoren (pGL3
-	basic, Promotor If, Promotor PII, Promotor If TATA) und Renilla Luciferase
	(90:10), stimuliert mit Reelin73
Abbildung 33	Dot Blot mit Sense- (T3) und Antisense- (T7) Sonde75
Abbildung 34	Reelin mRNA lässt sich durch In situ Hybridisierung im Rattengehirn
	darstellen, Funktionsfähigkeit der verwendeten Sonden,
Abbildung 35	In Situ Hybridisierung, Optimale Inkubationszeit mit Proteinase K
Abbildung 36	In Situ Hybridisierung: Optimierung mit SDS, TSA und Fluoreszenz-
	Farbstoff78
Abbildung 37	In Situ Hybridisierung Reelin im Nebenhoden,81
Abbildung 38	In Situ Hybridisierung Reelin im Nebenhoden, Anschnitte des Ductus
	Epididymis, Fluoreszierend82
Abbildung 39	In Situ Hybridisierung im Nebenhoden, Anschnitte des Ductus Epididymis,
	inhomogenes Signal82

Abbildung 40	Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im Nebenhode	en84
Abbildung 41	Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im	Nebenhoden,
	inhomogenes Signal	85
Abbildung 42	Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im Ovar	86
Abbildung 43	Radioaktive In Situ Hybridisierung gegen Reelin im Uterus	87
Abbildung 44	Schematische Darstellung der Hypothese (1)	93
Abbildung 45	Schematische Darstellung der Hypothese (2)	94
Abbildung 46	Färbung von β-Galactosidase im Ratten Epididymis (Caput)	100

8.2 Tabellen

Tabelle 1	Expression von VLDLR und ApoER2 in Maus-Organen1:
Tabelle 2	Regionale Expression von VLDLR und ApoER2 im Gehirn der adulten Maus14
Tabelle 3	Primer Sequenzen der verwendeten Gehirn- bzw. Ovar-spezifischer
	Aromatase Promotoren
Tabelle 4	Sequenzen der Primer RV Primer3 und GL Primer2
Tabelle 5	Primersequenzen für die semiquantitative PCR Analyse (Ratte)42
Tabelle 6	Primersequenzen für die semiquantitative PCR Analyse (Maus)42

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die maßgeblich zu Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Gabriele Rune für die Überlassung des spannenden Themas und die Ermöglichung des experimentellen Arbeitens im Institut für Neuroanatomie danken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Felicitas Pröls für die fortwährende Unterstützung, ihre stetig offene Tür und dafür, dass sie nie einen Zweifel an der Fertigstellung dieser Arbeit hatte.

Christiane Birkner-Schröder danke ich herzlich für die gründliche Einführung in das Arbeiten mit Zellkulturen und diversen anderen Methoden im Labor sowie für ihre Geduld und ihre ständige Bereitschaft, mir alle meine Fragen zu beantworten.

Auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken und dafür, stets hilfreiche Antworten auf meine Fragen erhalten zu haben. Insbesondere bedanke ich mich noch einmal bei Helga Herbort für ihre wertvollen Tipps und Anregungen für die In Situ Hybridisierungen, bei Dr. Lars Fester vor allem für die sorgfältige Einführung in die AxioVision Software, Dr. Nicola Brandt für die Bereitstellung von zahlreichen Wells mit primären hippocampalen Zellen und der Arbeitsgruppe Förster für die Überlassung von konzentriertem Reelin für meine Versuche.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Maria Metten aus dem Department für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Durchführung der Radioimmunassays danken, die zu wichtigen Erkenntnissen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Dr. Hans Pinnschmidt aus dem Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie gilt mein Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten. 10 Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift:

.....