Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Zur Wirkung von Reelin auf die Mikrotubuli-Dynamik in Neuronen

Veränderungen am Mikrotubuli-Zytoskelett durch Reelin

Dissertation

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

vorgelegt von:

Ersin Çavuş aus Bremen

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.12.2016

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter: Prof. Dr. Matthias Kneusel

Inhaltsverzeichnis

Wie	dmung		5
Voi	wort		6
1	Einleit	ung	
1	l Fn	twicklung des Isocorter: Migration & Schichtung	10
1	$\frac{1}{2}$ Da	s Mikrotuhuli-Zvtoskelett-Svstem	
1	.2 Du 3 Mi	gration und Reelin	16
1	.5 MI	r Reelinsianalwea	
1	5 Rh	o-GTPasen cdc42 und Rac1	
1	.6 Eri	krankungen in Zusammenhang mit einer beeinträchtigten Reelinfunktion	20
1	.7 Fre	agestellung dieser Arbeit	
2	Materi	al und Methodik	24
2	P.1 Ma	iterialien	
	2.1.1	Standardpuffer und Stammlösungen	
	2.1.2	Zellkulturmaterial und Kits	
	2.1.3	Plasmide	
	2.1.4	Stimulantien	
	2.1.5	Antikörper	
	2.1.6	Gebrauchsmaterialien	
	2.1.7	Geräte	
	2.1.8	Software	
	2.1.9	Zelllinien & Versuchstiere	
2	2.2 Me	thoden	
	2.2.1	Standardbedingungen der Tierhaltung	
	2.2.2	Sterilisation von Lösungen und Geräten	
	2.2.3	Standardbedingungen und Standardmethoden der Molekularbiologie	
	2.2.4	Anlegen der primären Zellkulturen	
	2.2.5	Stimulation	
	2.2.6	Immunzytochemie	
	2.2.7	Plasmide und Transfektionen	
	2.2.8	Laser-Scanning-Mikroskopie	
	2.2.9	Datenauswertung; Vorgehen bei nicht transfizierten Neuronen	

	2	.2.10 Datenauswertung; Vorgehen bei transfizierten Neuronen	36
3	Er	gebnisse	38
	3.1	Reelin steigert die EB3-Kometen-Dichte im Hauptdendriten von zum Zeitpunkt E18	20
	3.2	Zunahme der Anzahl von EB3-Kometen trotz dominant-negativem cdc42-Plasmid	38
	3.3	Zunahme von EB3-Kometen trotz dnRac1 Expression in hippocampalen Neuronen	45
4	Di	skussion	48
	4.1	Reelin beeinflusst die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts	48
	4.2	Die Orientierung der Neurone hängt von ihrer räumlichen und zeitlichen Exposition	
	gege	enüber Reelin ab	50
	4.3	Reelin erhöht die EB3-Kometen-Dichte am Plus-Ende der Mikrotubuli	51
	4.4	Das Reelinsignal wird über die Rho-GTPasen cdc42 & Rac1 vermittelt	54
	4.5	Bezüge zur Klinik; neurodegenerative & onkologische Erkrankungen	55
5	Zu	sammenfassung / Summary	59
6	Ab	okürzungsverzeichnis	61
7	Li	teraturverzeichnis	63
8	Ta	bellenverzeichnis	73
9	Ab	bildungsverzeichnis	73
D	anks	agung	75
С	urric	ulum Vitae	76
E	idess	tattliche Erklärung	76

Widmung

Diese Doktorarbeit möchte ich zunächst meinen Eltern Cavit und Nevin, meinen Brüdern Seyit und Tayfun und dann meiner ganzen Familie widmen.

Vorwort

Die Hirnentwicklung ist ein komplexer Prozess, der im molekularbiologischen Detail Stück für Stück entziffert wird. Es ist von großem Interesse die Systematik, die hinter den maßgeblichen Prozessen der Hirnentwicklung steckt, aufzudecken, da schon kleinste Abweichungen von der Norm oft schwerwiegende Auswirkungen auf die Funktion des Gehirns haben können. Veränderungen in der Hirnstruktur werden mit Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz, psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen oder Bipolaren Störungen sowie Autismus und Epilepsie in Verbindung gebracht (Gleeson und Walsh, 2000, Durakoglugil et al., 2009, Kocherhans et al., 2010, Folsom und Fatemi, 2013, Dazzo et al., 2015, Reiner et al., 2015). Größere Defekte der Hirnstruktur sind mit dem Leben meist nicht vereinbar.

In der embryonalen Entwicklung kommt es nach einem ganz bestimmten Plan zur Strukturbildung im Gehirn. Diese Struktur ist die Grundlage unserer Hirnleistung. Im Rahmen dieser Strukturbildung laufen molekulare Vorgänge ab, die in ihrem Zusammenspiel von Signalgebern und –empfängern, sowie Verarbeitungswegen verstanden werden. Beispielsweise führt ein bestimmtes Protein, welches zu einer bestimmten Phase der Embryonalentwicklung sezerniert wird, über spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche dazu, dass sich Nervenzellen morphologisch verändern und somit zum Beispiel die Fähigkeit erlangen sich fortzubewegen. Im Allgemeinen kann man sagen, dass eine Vielzahl von intrinsischen sowie extrinsischen Signalen dazu führt, dass sich die Nervenzellen des Gehirns bewegen können. Auf diese Weise erreicht jede einzelne Nervenzelle ihren "Zielort". Nur im ordentlichen Gesamtverbund erbringen die Nervenzellen schließlich ihre für den Organismus lebensnotwendige Leistung.

In der aktuellen Forschung im Bereich der Hirnentwicklung ist man bemüht, die verschiedenen Strukturen einer Zelle zu untersuchen, die es ihr ermöglichen sich gezielt zu bewegen. Bei dieser sogenannten neuronalen Migration spielen die Anteile des Zytoskeletts eine wichtige Rolle. Sie geben der Zelle nicht nur eine feste Struktur, ähnlich wie ein Baugerüst, sondern sind auch Ziel der intra- und extrazellulären Kommunikation. Hierzu befinden sie sich in einem ständigen Auf- und Abbauprozess. Die Dynamik ist von einer Vielzahl von Faktoren auf unterschiedliche Art und Weise abhängig. Die vorliegende Dissertation betrachtet eines der Schlüsselproteine bezüglich des Migrationsverhaltens von Neuronen, nämlich das Protein Reelin.

Reelin ist ein 388 KDa großes, extrazelluläres Matrixprotein, welches in der frühen Embryonalzeit vor allem durch die oberflächlich gelegenen Cajal-Retzius-Zellen sezerniert wird. Es hat über spezifische membranständige Rezeptoren diverse Wirkungen auf die migrierenden Neurone. Reelin ist ein spannendes Forschungsobjekt mit vielen Gesichtern und womöglich ist seine Funktion weitaus vielfältiger, als man es sich bisher vorstellen kann.

Bei dem Entschluss für diese Arbeit bestand auch der Wunsch das molekularbiologische Detailwissen in einen größeren Zusammenhang mit klinischen Krankheitsbildern zu stellen. Meine persönliche Motivation war es, das Phänomen der zellulären Migration während der Hirnentwicklung mit der Metastasierung von Tumoren zu verknüpfen. Denn auch hierbei spielt zelluläre Migration eine wichtige Rolle und es gibt sogar Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der Funktion von Reelin und dem Metastasierungspotential von Tumorzellen.

1 Einleitung

Ein Grundprinzip der Natur ist es, das Struktur und Funktion zusammenhängen. Bezieht man dieses auf die Hirnentwicklung, so sind mustergültige Abläufe erkennbar, die am Ende ein sorgfältig ausgearbeitetes Konstrukt (Struktur) ergeben, welches die Grundlage für unsere Hirnleistung (Funktion) darstellt. Die sogenannte neuronale Migration, mit der sich die vorliegende Dissertation beschäftigt, beginnt damit, dass Neurone aus Neuroblasten (Vorläuferzellen) in der ventrikelnahen sogenannten Proliferationszonen gebildet werden und anschließend zu ihrem Bestimmungsort wandern (Hatten, 1999; Rakic, 1982). Das Erreichen einer bestimmten Hirnrindenschicht ist dabei von dem Zeitpunkt der "Geburt" jedes einzelnen Neurons sowie von Faktoren aus dem Mikroumfeld während der Migration abhängig (Ayala et al., 2007).

Das extrazelluläre Matrixprotein Reelin spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Positionierung der radial migrierenden Neurone (Curran und D'Arcangelo, 1998; Tissir und Goffinet, 2003). Fehlt Reelin, kommt es zu neuronalen Migrationsdefekten und dem Krankheitsbild der Lissenzephalie mit cerebellärer Hypoplasie (LCH). Ist der Phänotyp voll ausgebildet führt dieses zu einer schweren geistigen Behinderung und Verzögerung der Psychomotorik. Generell stehen leichtere Formen von Migrationsdefekten unter Verdacht zu der Entwicklung von psychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel der Alzheimer-Demenz beizutragen (Durakoglugil et al., 2009).

Die Verarbeitung des Reelinsignals durch Neurone wird nach wie vor intensiv erforscht. Bisher wurden verschiedene, zum Teil entgegengesetzte Effekte von Reelin beschrieben. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass migrierende Neurone durch das Reelinsignal dazu angeregt werden ihr Zytoskelett während der Migration anzupassen (Valiente und Marin, 2010). Hierzu wurde der Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett bereits umfassend untersucht. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Reelin über den ApoE-Rezeptor2 für die Phosphorylierung des Aktin-stützenden Proteins n-cofilin im führenden Fortsatz sorgt (Chai et al., 2009). Somit kommt es zu einer Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts und konsekutiv zur Terminierung der Zellbeweglichkeit. Auf der anderen Seite führt Reelin durch Aktivierung von Rho-GTPasen (intrazelluläre Enzyme, durch die die Zelle extrazelluläre Signale umsetzen kann) dazu, dass die Motilität von Wachstumskegeln und die Ausbildung von fingerförmigen Fortsätzen, sogenannten Filopodien, gefördert wird (Leemhuis et al., 2010). Relativ unklar hingegen bleibt der Effekt des Reelins auf Mikrotubuli. Das Mikrotubuli-Gerüst ist, neben Aktin, ein weiterer wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts. Unter anderem sorgt es durch seine stabilen Tubuli zum Ausbau von "Transportstraßen" innerhalb der Zelle und ermöglicht somit den intrazellulären Transport von Vesikeln, die beispielsweise Proteine enthalten, aus Zellkernnähe in die Zellperipherie zur Zellmembran. Mikrotubuli sind ebenso wichtig für die Ausbildung von stabilen Zell-Zell-Interaktionen und folglich für die Kommunikation der Zelle mit ihrem Mikroumfeld. Reelin als wichtigster Koordinator der radialen neuronalen Migration dürfte demzufolge auch das Mikrotubuli-Zytoskelett beeinflussen. Zur übersichtlichen Darstellung des Themas, beginnt der erste Abschnitt dieser Dissertation mit den allgemeinen Grundlagen der Hirnentwicklung. Anschließend werden das Protein Reelin und seine Signalwege genauer betrachtet und schließlich werden die Ergebnisse präsentiert und eingeordnet. Außerdem werden klinische Bezüge erstellt und es wird hinterfragt, ob Reelin neben der Veränderung der neuronalen Zellbeweglichkeit auch Einflüsse auf die Beweglichkeit von Tumorzellen im Rahmen von Metastasierungsprozessen haben könnte.

1.1 Entwicklung des Isocortex; Migration & Schichtung

Die zentralen Anteile des Nervensystems bilden sich aus dem Neuralrohr, welches durch eine Abhebung aus dem Oberflächenektoderm (Neurulation) beim Menschen am 19. Entwicklungstag entsteht. Die kranialen (oberen) Zweidrittel der Pars dorsalis (hinterer Anteil) werden dabei zur Hirnrinde, das kaudale (untere) Drittel zum Rückenmark. Man unterscheidet drei primäre Hirnbläschen nach Verschluss des Neuroporus anterior. Von kaudal nach kranial: Das Rhombenzephalon-Bläschen, das Mesenzephalon-Bläschen und das Prosenzephalon-Bläschen, siehe Abbildung 1.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hirnbläschen. Aus dem Vorderhirn (Prosenzephalon) entsteht das Großhirn (Telenzephalon), dessen Wände die zerebralen Hemisphären bilden. Aus den Hohlräumen des Telenzephalons entstehen die Seitenventrikel, rotes und schwarzes Kästchen. *Modifiziert nach Keith L. Moore, Embryologie, 5.Auflage, Elsevier, Urban&Fischer, S.485.*

Das Telenzephalon (Großhirn) und Dienzephalon (Zwischenhirn) sind zwei der sechs sekundären Hirnbläschen und entwickeln sich aus dem kranialsten Abschnitt des Neuralrohrs, dem Prosenzephalon (Vorderhirn). Dabei wachsen die paarigen Telenzephalonbläschen wie ein Mantel über die restlichen Hirnanteile und bilden die typischen Gyri und Sulci, die Windungen des Großhirns.

Das Großhirn kann vereinfacht in Rinde (Cortex), Marklager und Seitenventrikel unterteilt werden. Ventrikelnah befindet sich im ganzen Nervensystem die sogenannte "Proliferationszone" (Rakic, 1982), in der aus Neuroblasten (Vorläuferzellen) Neurone gebildet werden. Nach ihrer "Geburt" sind die Neurone in der Lage, das mehrere hundertfache ihrer eigenen Zelllänge zu wandern (Rakic, 1971). Dieses geschieht hauptsächlich radial durch das Marklager. Die Neurone finden ihren Bestimmungsort und bilden schließlich den horizontal sechsschichtigen Grundtypus des Isocortex (griech.:

isos=gleich, cortex=Rinde). Neben dem Isocortex gibt es Bereiche, die als Allocortex (griech.: allos = anders) bezeichnet werden. Hierzu gehören Area olfactoria (Riechrinde), der Hippocampus, Gyrus dentatus und Gyrus parahippocampalis (zugehörig zum Limbischen System / Lernprozesse und Gedächtnis). Diese Bereiche zeigen einen dreischichtigen horizontalen Aufbau, der ebenfalls durch neuronale Migration zustande kommt.

Die Großhirnrinde der Säuger ist nach dem "Inside-Out-Prinzip" geschichtet

Unter dem "Inside-Out-Prinzip" versteht man, dass jüngere Neurone, also jene die sich später aus Neuroblasten entwickeln, an den älteren Neuronen vorbei wandern und die nächste, oberflächlichere Schicht bilden. Diese sogenannte "Migration" der Neurone findet größtenteils radial statt (Rakic, 1971, 1972, 1978, Sidman und Rakic, 1972, Gao und Hatten, 1994, Anton et al., 1996, Ayala et al., 2007). Daneben existiert noch eine zweite Art der Migration, die tangentiale Migration (O'Rourke et al., 1997). Hierbei migrieren die Zellen in der Horizontalen entlang der pialen Oberfläche.

Detaillierte Betrachtung der Entstehung der Inside-Out-Schichtung

Die Entwicklung der Zellschichten der sechsschichtigen Hirnrinde findet in Wellen statt (Hatten, 1999). Die frühesten, in der Ventrikulär- bzw. Proliferationszone gebildeten Neurone formen die sogenannte Preplate (PP). Diese Preplate wird später in die pial (zur Pia mater hin) gelegene Marginalzone (MZ) und die ventrikelnah gelegene Subplate (SP) unterteilt. Dazwischen entwickelt sich die Corticalplatte (CP), aus der der Hauptteil des sechsschichtigen Isocortex hervorgeht. Zuerst entstandene Neurone bilden dabei die tiefen (ventrikelnahen) Schichten des Isocortex. Später entstandene Neurone migrieren entlang radial angeordneter Gliafortsätze, auch Radialglia genannt, Richtung Pia mater und bilden jeweils die nächste Schicht (Hatten, 1999, Ayala et al., 2007). Die Radialglia sind zugleich Vorläuferzellen der neugebildeten Neurone (Kriegstein und Noctor, 2004). In der Marginalzone befinden sich die Cajal-Retzius-Zellen, die in der Entwicklung der Hirnrindenschichten eine entscheidende Rolle spielen; Sie sezernieren das extrazelluläre Matrixprotein Reelin (Sheppard und Pearlman, 1997), welches regulierend in den Migrationsprozess der Neurone eingreift (Cooper, 2008). Die Marginalzone wird nach Ausreifung Molekularschicht genannt, da der Großteil der Cajal-Retzius-Zellen im adulten Gehirn zugrunde geht.

Unterhalb der Subplate und der Subventrikulären Zone befindet sich die Proliferationszone, die die Zellkörper der radialen Gliazellen (Neuroblasten) enthält. Hier entsteht aus einer Vorläuferzelle ein Neuron, das zunächst migriert bevor es seine finale Position erreicht und für die Dickenzunahme der Rinde sorgt. Das zweite Neuron, welches bei der mitotischen Teilung entsteht, bleibt als Stammzelle zurück und kann erneut Teilungen vollziehen.



Abbildung 2: Schematische Darstellung des Migrationsprozesses zur Etablierung der Inside-Out-Schichtung. Gelb (A,B,C,D) radial, grün (E,F,G) tangential migrierende Neurone. Die radial migrierenden Neurone entstehen ventrikelnah und wandern dann Richtung Pia mater. Sie durchdringen dabei die Subplate und nehmen in der Kortikalplatte ihren Bestimmungsort ein. Während dieses Wanderungsprozesses befinden sich die Neurone in einem ständigen Signalaustausch ihrem mit

Mikroumfeld. Sie können dabei auf extrazelluläre Signale reagieren und ihre Morphologie anpassen. A Ein aus einem Neuroblasten frisch gebildetes Neuron nimmt eine bipolare Morphologie an. Es bildet meist einen massiven führenden Fortsatz aus. B Diverse extrazelluläre Signale kann die Zelle verwerten und ihre Morphologie anpassen. Hier ist ein Signalaustausch mit einem tangential migrierenden Neuron angedeutet. C Der massive führende Fortsatz sorgt dafür, dass sich das Neuron an den Radialglia entlang "hangeln" kann. Radialglia: graue, radial angeordnete Zellen, deren Fortsätze zum einen in der ventrikulären Zone und zum anderen in der Marginalzone an der Pia mater verankert sind. D Endposition des postmigratorischen Neurons. Nach Erreichen der zugehörigen Schicht, löst sich das Neuron von den Radialglia und vollendet die Migration, in dem es sich in ein Netzwerk von Neuronen eingliedert. In Grün sind tangential migrierende Neurone dargestellt. Wenn diese zur selben Zeit, wie radial migrierenden Neurone gebildet werden, gelangen sie in die gleiche Hirnrindenschicht. E Bipolares Neuron. F Signalaustausch zweier Neurone. G Endposition. Nach zunächst tangentialer Migration, hat auch dieses Neuron über diverse Signalverarbeitungswege seinen Bestimmungsort gefunden. Hier fügt es sich in das Netzwerk der vorbestehenden Neurone ein. In der Marginalzone befinden sich die Cajal-Retzius-Zellen (hellblaue Kugeln), die das Reelin bilden und sezernieren. *Modifiziert nach Ayala et al., 2007.*

Bereits in der frühembryonalen Entwicklung wächst das Gehirn in kürzester Zeit beim Menschen auf eine Zellzahl von etwa 10¹¹ Neurone sowie 10¹² Gliazellen an und nimmt bald seine charakteristische Form mit den zahlreichen Gyri und Sulci an. Die große Anzahl der Neurone wird in zwei Hauptkategorien eingeteilt. Zum einen die exzitatorischen Projektionsneurone (Pyramidenzellen) und zum anderen lokale, hemmende Nicht-

Pyramidenzellen (Körnerzellen, Interneurone). Abbildung 3 stellt schematisch den zytoarchitektonischen Grundaufbau des Isocortex dar. Die Schichten sind durch spezifische Zelltypen charakterisiert:

- 1. Lamina zonalis (Molekularschicht): Cajal-Retzius-Zellen, periphere Dendritenaufzweigungen tiefer liegender Pyramidenzellen
- 2. Lamina granularis externa: Viele Körnerzellen (GABAerg, radial angeordnet), vereinzelt Pyramidenzellen (Glutamaterg)
- Lamina pyramidalis externa: Viele kleinere Pyramidenzellen (überwiegend Assoziations- oder Kommissurenfasern; Zellkörperbasis zum Mark gerichtet, Apikaldendrit zieht bis zur Molekularschicht Richtung Pia mater)
- Lamina granularis interna: Viele Körnerzellen (deutliche tangentiale Faseranordnung, äußere Baillarger-Streifen)
- Lamina pyramidalis interna: große Pyramidenzellen (lange Projektionsfasern; Zellkörperbasis zum Mark gerichtet), tangential angeordnete Fasern (innerer Baillarger-Streifen)
- 6. Lamina multiformis: polymorphkernige Zellen



Die Zytoarchitektur des Gehirns weist weitere Charakteristika auf. So sind bestimmte Hirnarealen für bestimme Funktionen prädisponiert. Zum Beispiel weist die Sehrinde einen granulären Rindentypus auf. Die Körnerzellen der Lamina granularis interna und externa sind vorherrschend, da es sich hier um ein vor allem rezeptives Rindenfeld handelt. Dagegen zeichnen sich motorische Rindenfelder als überwiegend agranulär aus, da verhältnismäßig weniger Körnerzellen vorhanden sind. In diesem Fall sind die Pyramidenzellen vorherrschend.

1.2 Das Mikrotubuli-Zytoskelett-System

Das Zytoskelett gibt der Zelle ihre Struktur. Es stützt die Zelle von innen und steht über assoziierte Proteine sowie Rezeptoren in einem ständigen Kontakt mit der extrazellulären Matrix. Über Adhäsionsmoleküle können zudem Zell-Zell-Interaktionen aufgebaut oder Verankerungen in der Extrazellulärmatrix gebildet werden. Auch für die Ausbildung der Zellpolarität, die entscheidend für das Schicksal einer Nervenzelle ist, spielen Veränderungen des Zytoskeletts eine wichtige Rolle. Für jede Nervenzelle ist eine dynamische Regulierbarkeit des Zytoskeletts essentiell.

Im Wesentlichen besteht das Zytoskelett einer Zelle aus Mikrotubuli-, Aktin- und Intermediärfilamenten, sowie Myosinfilamenten. Diese Strukturen sind Polymere, die aus einer Vielzahl identischer Proteinmoleküle aufgebaut sind und leicht in diese wieder zerfallen können. Je nach Bedarf der Zelle liegt ein angepasstes Gleichgewicht zwischen polymerisiertem und dissoziiertem Zustand vor. Dieses angepasste Gleichgewicht wird durch assoziierte Proteine reguliert, indem extra- und intrazelluläre Signale aufgenommen und über Effektorproteine verarbeitet werden. Auch die Funktion im polymerisierten Zustand ist von assoziierten Proteinen abhängig, sie können zum Beispiel unterstützen und stabilisieren oder zum Abbau markieren (Ubiquitinierung).

Mikrotubuli sind röhrenförmige Elemente des Zytoskeletts, die mehrere Mikrometer lang und etwa 25nm im Durchmesser sein können. Damit sich ein Mikrotubulus bilden kann, müssen sich 13 Protofilamente, aus jeweils mehreren α - und β -Tubulin-Untereinheiten bestehend, zusammenlagern. Sie sind ähnlich wie die Aktinfilamente polar aufgebaut. Sie haben zum einen ein dynamisches Plus-Ende, das größtenteils in die Zellperipherie ausgerichtet ist und schnell wachsen kann. Zum anderen ein Minus-Ende, das meist in Zellkernnähe in Assoziation mit dem MTOC (Mikrotubuli organizing center) liegt und verhältnismäßig stabil bleibt, beziehungsweise nur langsam auf- oder abgebaut wird.



Abbildung 4: Wachstumsprozess eines Mikrotubulus. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten (t=0; 1; 2) wird das Wachstum eines Mikrotubulus am Plus-Ende schematisch dargestellt. Rot-Gelb: Heterodimere aus α - und β -Tubulin, die sich an das Plus-Ende anlagern. Hierbei wird GTP hydrolisiert. Die ROI ("Region of interest") stellt dabei den Messbereich dar, in dem anhand der Fluoreszenz-markierten blauen Tubuline die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt werden kann. *Modifiziert nach Galjart, 2010.*

An den Plus-Enden von wachsenden Mikrotubuli konkurriert eine Vielzahl von kleinen Proteinen um Bindungsstellen. Sie werden als sogenannten +TIPs (plus-end tracking proteins) zusammengefasst (Akhmanova und Steinmetz, 2008, Schuyler und Pellman, 2001). Unter ihnen zählen die sogenannten End-Binding Proteine (EBs) zu den am stärksten konservierten und am weitesten verbreiteten +TIPs (Tirnauer und Bierer, 2000). Die EBs sind kleine dimerische Proteine, die mit dem N-Terminus (CH-Domäne, calponin homology) die Fähigkeit besitzen mit Mikrotubuli zu interagieren. Neben einer weiteren Region mit bisher unbekannter Funktion, weisen die EBs am C-Terminus eine sogenannte coiled coil - Domäne auf, durch die es zur Dimerisierung kommt und somit die EBs die Plus-Enden von Mikrotubuli erkennen können (Slep und Vale, 2007). Außerdem besitzen EBs ein flexibles azides Ende, mit dessen Hilfe sie sich selbst inhibieren, aber auch Verbindungen mit verschieden Proteinen eingehen können (Hayashi et al., 2005, Akhmanova und Steinmetz, 2008). Die Gruppe der EBs besteht aus den drei Proteinen EB1, EB2 und EB3. Letzterer wurde als spezifischer Marker für Neurone ausfindig gemacht (Stepanova et al., 2003). Änderungen an der Dynamik an den Plus-Enden von Mikrotubuli können mithilfe dieser EB3-Proteine aufgezeigt werden.

1.3 Migration und Reelin

Für die neuronale Migration ist eine dynamische Organisation des Zytoskeletts Voraussetzung. Es existieren zwei generelle Arten von Migration. Zum Großteil (80-90%) findet die neuronale Migration radial statt. Im Gegensatz dazu finden nur etwa 10-20% tangential statt. Interessanterweise erreichen gleichzeitig geborene Neurone die gleiche Hirnrindenschicht, unabhängig davon, ob sie tangential oder radial migrieren (Ayala et al., 2007) In ihren Grundzügen ist die neuronale Migration im Mausmodell übertragbar auf die Entwicklung der menschlichen Hirnrinde. Die Auf- und Abbauprozesse am Zytoskelett während der Migration werden durch extrazelluläre Signale koordiniert und durch distinkte intrazelluläre Signalwege umgesetzt. Die Nervenzelle muss für eine korrekte Migration folgende drei Fähigkeiten besitzen:

- 1. Sie muss ihr Mikroumfeld ständig wahrnehmen können
- 2. Sie muss auf die extrazellulären Signale korrekt reagieren können
- 3. Sie muss ihr Zytoskelett verändern können

Nur wenn die Nervenzelle alle Bedingungen erfüllt, durchläuft sie verschiedene Phasen des Migrationsprozesses und findet ihre korrekte Position inmitten eines komplexen Nervengeflechts. Als extrazelluläres, koordinierendes Signal wirkt dabei Reelin, das bereits in der frühen Migration durch die Cajal-Retzius-Zellen der Marginalzone exprimiert wird. Über diverse Rezeptoren (unter anderem VLDLR, ApoER2, etc.) nehmen die migrierenden Neurone das Reelinsignal auf. In den verschieden Phasen der Migration passen sie dann ihre Zellmorphologie und Bewegungsrichtung an die aktuellen molekularen Signale an. Sie entwickeln sich (weiter) und adaptieren ihre Polarität. Dabei sind diese Prozesse nicht nur als zeitliche Abfolge von Ereignissen zu sehen, sondern vielmehr als Prozesse, die parallel und wiederkehrend stattfinden, bis jede einzelne Zelle ihren individuellen Platz gefunden hat. Reelin wirkt dabei kontextabhängig. Es unterstützt zum einen die Entwicklung der Nervenzelle durch Ausbildung von Fortsätzen und Vorantreiben der Polarisierung der Zelle, gewährleistet damit zum anderen, dass die Zelle durch diese Fortsätze ihre Umgebung besser wahrnehmen und weitere Signale aufnehmen kann.

1.4 Der Reelinsignalweg

Reelin wird während der frühen Hirnentwicklungsstadien hauptsächlich durch die sogenannten Cajal-Retzius Zellen der Marginalzone sezerniert (Frotscher, 1998, Marin-Padilla, 1998; Soriano und Del Rio, 2005). Ab dem Embryonaltag E18 beteiligen sich auch die Interneurone an der Reelin-Sekretion im Mäusehirn (Alcantara et al., 1998, Drakew et al., 1998). Das Protein Reelin bindet an membranständige Rezeptoren der Lipoprotein-Rezeptorfamilie. Es interagiert mit dem Apolipoprotein-E-Rezeptor 2 (ApoER2) sowie dem Very-Low-Density Lipoprotein Rezeptor (VLDLR). Beide Rezeptoren sind intrazellulär an das Adapterprotein disabled-1 (Dab1) gekoppelt, welches durch das extrazelluläre Reelinsignal mittels src-Tyrosinkinasen phosphoryliert wird und anschließend diverse intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen kann (Howell et al., 1999, Arnaud et al., 2003, Bock und Herz, 2003). Mausmutanten, denen der ApoER2 und der VLDLR oder nur das Dab1 fehlen, zeigen als Phänotyp vergleichbare Strukturdefekte des Gehirns wie die Reeler-Mausmutante. Interessanterweise gibt es aber einen Unterschied, wenn nur einer der beiden Rezeptoren (ApoER2 oder VLDLR) fehlt. Die Strukturdefekte der Hirnrinde sind dann geringer ausgeprägt als die der Reeler-Mausmutante, sodass den beiden Rezeptoren unterschiedliche Effekte nach Reelinbindung zukommen (Herz und Bock, 2002, Hack et al., 2007).

Die folgende Abbildung soll die Reelinsignalkaskade und ihre, zum Teil unvollständig verstandenen, Interaktionen mit anderen Signalwegen darlegen. Gleichzeitig wird hier auch schon eine Interaktion des Reelinsignalwegs mit dem Mikrotubuli-System und der daran gekoppelten Umlagerung des Golgi-Apparates während der Migration dargestellt.



Abbildung 5 Der Reelinsignalweg und seine Zytoskelettassoziierten Zielproteine. Reelin bindet unter anderem an die Rezeptoren VLDL und ApoER2. Anschließend kommt es mit Hilfe einer src-Tyrosinkinase (SFK) zur Phosphorylierung des Adapterproteins Dab1. Dieses kann wiederum mehrere intrazelluläre Proteine aktivieren wie zum Beispiel PI3K, Lis1 oder EB3. Auch diesen Proteinen sind dann weitere Effektorproteine untergeordnet die letztendlich Veränderungen am Mikrotubuli-Zytoskelett bewirken können. Sodass, wie hier gezeigt, zum Beispiel über PI3K->cdc42/Rac1 die Translokation des Golgi-Apparates in den Apikaldendriten (Hauptdendrit) stattfinden könnte. *Modifiziert nach Förster, 2014.* Die Bindung von Reelin an ApoER2 setzt unter anderem einen Signalweg in Gang der über die Phosphatidylinositid 3-Kinase (PI3K), der Proteinkinase B (PKB/Akt) und der LIM-Kinase-1 (LIMK-1) (Bock et al., 2003) die Phosphorylierung des n-cofilin bewirkt. Hierdurch kommt es zur Inaktivierung von cofilin, welches die Polymerisierungsraten am Aktin senkt und dadurch zu Stabilisierungseffekten am Aktin-Zytoskelett führt (Chai et al. 2009). Dieser Prozess tritt vor allem dann ein, wenn das Neuron dabei ist die Migration zu beenden. Dann nämlich befindet sich das Neuron in der Nähe der Marginalzone, also in einem reelinreichen Areal. Über die vermehrte Expression von ApoER2 wird das Reelinsignal nun dahingehend umgesetzt, dass es zur Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts führt. Die Auswirkung auf die Zelle kann wie eine mechanische Befestigung des Zellkerns an Ort und Stelle mit konsekutivem Migrationsstopp betrachtet werden.

An den VLDL-Rezeptor hingegen bindet intrazellulär unter anderem das Adapterprotein Lis1 (Assadi et al., 2003), das über die Proteine NudE-like (Nudel), NudE und Dynein mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett verlinkt ist (McKenney et al., 2010). Interessanterweise führt auch eine Pafah1b-Mutation (für Lis1 codierendes Gen, Zhang et al., 2007) wie die Dab1-Defizienz oder eine kombinierte VLDLR- und ApoER2-Defizienz zu einer gestörten radialen Migration und hierüber zu dem charakteristischen Phänotyp der Reeler-Mutante bzw. dem schweren Krankheitsbild der Lissenzephalie.

1.5 Rho-GTPasen cdc42 und Rac1

Die Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 stellen regulatorische, intrazelluläre Schlüsselenzyme dar, die essentiell für die neuronale Entwicklung sind (Govek et al., 2005, Kawauchi und Hoshino, 2008). Sie sind an zahlreichen wichtigen Prozessen wie zum Beispiel der Morphogenese, der Zellbeweglichkeit, dem Vesikeltransport sowie der Ausbildung der Zellpolarität beteiligt. Hierdurch spielen sie eine wichtige Rolle für die neuronale Migration (Leemhuis und Bock, 2011). Evolutionsbiologisch sind viele der Rho-GTPasen über Speziesgrenzen hinweg konserviert. Sie kommen unter anderem in Pflanzen, Pilzen und auch in Säugetieren vor und sind überlebensnotwendig. Bei den Säugetieren sind 20 unterschiedliche Rho-GTPasen bekannt, von denen vor allem cdc42 und Rac1 am weitesten verbreitet sind (Heasman et al., 2008). Rho-GTPasen wechseln zwischen einem

aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. Dieser Zyklus wird durch drei verschiedene Enzymgruppen kontrolliert. Die sogenannten GEFs (guanine nucleotide-exchange factors), GAPs (GTPase-activating proteins) und GDIs (guanine nucleotide-dissociation inhibitors). Im GTP-gebundenen Zustand aktivieren die Rho-GTPasen weitere Effektorproteine in spezifischen Downstream-Signalkaskaden (Hakoshima, 2003).

Die Rho-GTPase cdc42 spielt eine große Rolle bei der Ausbildung der Zellpolarität von Neuronen, indem sie unter anderem regulatorisch in die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts eingreift. In vielen Zelltypen ist cdc42 für die Ausbildung von dynamischen, fingerförmigen und aktinreichen Zellausläufern, die Filopodien genannt werden, verantwortlich. Es wird angenommen, dass diese Filopodien wichtig sind, damit die Zelle ihr Mikroumfeld wahrnehmen kann (Gupton und Gertler, 2007) und somit beispielsweise die Wachstumskegel während des neuronalen Migrationsprozesses extrazelluläre Signale gezielt aufnehmen können (Koleske, 2003). Die Nervenzelle kann über die Filopodien auch Zell-Zell-Kontakte etablieren. Ferner trägt das cdc42-Enzym neben der Ausbildung von Zellfortsätzen auch zur Spezifizierung eines Fortsatzes zum Axon bei (Govek et al., 2005). Cdc42-defiziente-Nervenzellen zeigen eine Erhöhung des phosphorylierten (inaktivierten) n-cofilin. Da n-cofilin ein Effektorprotein des Aktin-Zytoskeletts darstellt, kann es durch dessen Inaktivierung zum Beispiel zu Polarisierungsstörungen der Nervenzellen kommen. Im Gegensatz hierzu befinden sich in Wildtyp-Nervenzellen, vor allem während der neuronalen Migration durch die corticale Platte, im Bereich der Dendriten und des Axons erhöhte Anreicherungen von unphosphoryliertem (aktivem) ncofilin (Garvalov et al., 2007). Dieses ermöglicht der Nervenzelle eine ständige, dynamische Genese von neuen Fortsätzen. Die enorme Wichtigkeit dieser Rho-GTPase wird auch deutlich wenn man cdc42-knockout-Mäuse betrachtet. Diese versterben bereits vor dem Embryonaltag 7.5, da sie ohne cdc42 nicht überlebensfähig sind (Chen, F. et al. 2000).

Rac1 gehört zusammen mit Rac2, Rac3 und RhoG zu einer weiteren Subgruppe der Rho-GTPasen. Trotz breiter sequenzieller Übereinstimmung der Aminosäuren, zeigen diese Rac-Isoformen zellabhängig unterschiedliche Funktionen. Unter ihnen ist das Rac1 am weitesten untersucht. Zum einen, da es ubiquitär exprimiert wird und zum anderen, da es während der Embryogenese essentiell ist. Rac1-Knockout-Mäuse weisen erhebliche Defekte während des Gastrulationsprozesses mit Fehlern bei der Schichtbildung der Keimblätter auf, sodass sich dieses letal auf die Mauseembryos auswirkt (Sugihara et al., 1998). Ähnlich wie cdc42 trägt auch Rac1 zur Bildung von zellulären Fortsätzen und des Axons bei (Govek et al., 2005). Genauer betrachtet scheint Rac1 allerdings bedeutender für die Orientierung des ausgebildeten Axons bzw. der Fortsätze zu sein, als für ihr Wachstum. Studien an Rac1-Knockout-Neuronen aus dem Telenzephalon von Ratten zeigen ein normales Axon-Wachstum bei fehlerhafter Ausrichtung (Chen, L. et al., 2007).

Die Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 sind für die neuronale Migration so wichtig, weil sie entscheidend zu Umbauprozessen an den Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelettanteilen, entsprechend der Erfordernisse für die weitere Entwicklung der Nervenzelle, beitragen. So vermitteln cdc42 und Rac1 unter anderem über die Adapterproteine IQGap-1 und CLIP-170 Veränderungen an Mikrotubuli (Fukata et al., 2002). Die Rho-GTPasen tragen essentiell zur Polarisierung der sich stetig weiterentwickelnden Nervenzellen bei und koordinieren den komplexen Ablauf der neuronalen Migration.

1.6 Erkrankungen in Zusammenhang mit einer beeinträchtigten Reelinfunktion

sind einige Verknüpfungen zwischen Veränderung In der Fachliteratur der Reelinexpression, der Reelinrezeptoren oder homozygoten // heterozygoten Mutationen am Reelin-Gen (RELN) und diversen psychiatrischen, neurologischen, neurodegenerativen und onkologischen Erkrankungen beschrieben. Die Zusammenhänge sind Gegenstand aktueller Forschung. Betroffene psychiatrische Erkrankungen sind hierbei unter anderem Psychosen (Li, M. et al., 2015), Bipolare Störungen (Drago et al., 2015), Depressionen (Fenton et al., 2015) Schizophrenie (Li, W. et al., 2015) und Autismus (Reiner et al., 2015). Auch bei bestimmten Formen von Epilepsie spielen Veränderungen der Reelinexpression eine Rolle. Die sogenannte autosomal-dominante, lateral-temporale Epilepsie (ADLTE) bezeichnet ein genetisches Epilepsie-Syndrom mit typischerweise fokalen Anfällen sowie akustischen Halluzinationen. Verursacht wird die Erkrankung durch eine Mutation am Reelin-Gen (Dazzo et al., 2015). Interessanterweise sind bei den Betroffenen niedrige Reelinspiegel im Blut nachweisbar. Eine weitere, epidemiologisch bedeutende Erkrankung, die mit veränderter Reelinexpression in Verbindung gebracht wird, ist die Alzheimer Demenz. Sie ist die häufigste Ursache der Demenz im Alter. Charakteristisch für diese Erkrankung sind die sogenannten B-Amyloid-Plaques (auch senile Plaques genannt), Neurofibrillenablagerungen, der Verlust von synaptischen

Verbindungen sowie das verstärkte Absterben von Nervenzellen. Reelin scheint bei der Alzheimer Demenz einen direkten Einfluss auf die Pathogenese zu haben. Eine zunehmende Anzahl an Publikationen zeigen, dass die Reelinsignalkaskade bei der Entstehung der ß-Amyloid-Plaques und Neurofibrillen verändert wird.

Reelin kommt im Körper nicht nur im sich entwickelnden und adulten Gehirn vor, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben, wie der weiblichen Brustdrüse, im Magen-Darm-Trakt inklusive Pankreas oder in der Prostata. Vor diesem Gesichtspunkt werden zunehmend Wirkungen von Reelin auf unterschiedliche Prozesse in verschiedenen Geweben des Körpers untersucht. So auch auf die Tumorentstehung und das Verhalten von Tumorzellen, vor allem in Hinblick auf ihr Migrations-/ Metastasierungspotential, also der Fähigkeit sich vom Primärtumor zu lösen und in andere Gewebe einzuwandern. Das Metastasierungspotential eines malignen Tumors stellt häufig die lebensbegrenzende Eigenschaft dar.

Diverse Publikationen zeigen, dass Veränderungen der Reelinexpression Auswirkungen auf das Tumorverhalten haben können. Während zum Beispiel eine normale Reelinexpression in Ösophagus-Karzinomzellen die Zellmotilität weitgehend hemmen kann (Yuan et al.,2012), scheinen genetisch bedingt niedrige Reelinspiegel beim Magenoder Pankreaskarzinom die Beweglichkeit von Tumorzellen zu steigern (Sato et al., 2006, Dohi et al., 2010). Beim Brustkrebs wurden ähnliche Beobachtungen gemacht; Eine Herunterregulierung der Reelinexpression erhöht die Zellmotilität von Tumorzellen, konsekutiv das Metastasierungspotential und verschlechtert damit die Prognose der Patienten (Stein et al., 2010). Beim HER2-positiven (human epidermal growth factor receptor 2) Brustkrebs dagegen, kann eine Koexpression von Reelin und HER2 im Gehirn sogar zu einer vereinfachten Ausbildung von Hirnmetastasen führen (Neman et al.,2014).

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Reelin ist ein sezerniertes Protein, das während der Hirnentwicklung die radiale Migration kontrolliert (Curran und D'Arcangelo, 1998, Tissir und Goffinet, 2003) und somit den strukturierten Aufbau der Hirnrinde ermöglicht. Es laufen hierbei komplexe Prozesse ab, die als ein Zusammenspiel von Signalgebern und -empfängern zu verstehen sind (Ayala et al., 2007). Migrierende Neurone exprimieren unter anderem die Rezeptoren VLDLR und ApoER2 (Hiesberger et al., 1999). Die Bindung von Reelin an diese Rezeptoren führt zur intrazellulären Tyrosin-Phosphorylierung des Adapter-Proteins Dab1 (Howell et al., 1999) und konsekutiv zur Modulation verschiedener Signalwege. Zu den beteiligten Signal-Proteinen gehören beispielsweise die PI-3-Kinase (Bock et al., 2003) und Lis1 (Assadi et al.,2003)). Durch das Reelinsignal kommt es unter anderem zu Veränderungen im Zytoskelett der Neurone. Die Bindung an ApoER2 beispielweise induziert eine Phosphorylierung des Proteins n-cofilin, dies senkt damit den Aktin-turnover und stabilisiert dadurch das Aktin-Zytoskelett (Chai et al., 2009). Auf der anderen Seite kann Reelin vermutlich kontextabhängig über die Aktivierung der Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 die Formation von Wachstumskegeln und fingerförmigen Fortsätzen, den Filopodien, beschleunigen (Leemhuis et al. 2010), also das Aktin-Zytoskelett wieder dynamisieren. Die Filopodien befähigen die Zelle ihre Umgebung wahrzunehmen und auf extrazelluläre Signale zu reagieren. In jeder Zelle des Körpers, einschließlich der Nervenzellen, sind Aktin- und Mikrotubuli-System eng aneinander gekoppelt und arbeiten synergistisch. Wie also könnte Reelin neben dem Aktin-Zytoskelett das Mikrotubuli-Zytoskelett beeinflussen? Zahlreiche Hinweise zeigen, dass durch die oben genannten Reelin-Signalkaskaden auch Adapter-Proteine des Mikrotubuli-Zytoskelett reguliert werden. Die Bindung von Reelin an den VLDL-Rezeptor beispielweise aktiviert über das phosphorylierte Dab1 das Protein Lis1. Lis1 wiederum interagiert mit einer Reihe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wie NudE-like (Nudel), NudE und Dynein (McKenney et al., 2010). Es bleibt dennoch unklar, wie Reelin spezifisch die Mikrotubuli verändert und welchen Stellenwert dies für die korrekte radiale Migration hat. Wie lassen sich also mögliche Reelineffekte auf Mikrotubuli in das aktuell noch unvollständige Mosaik unterschiedlicher Reelinwirkungen auf migrierende Neurone der Hirnentwicklung integrieren?

Zur Annäherung an diese Fragen wurde folgende Arbeitshypothese formuliert:

Reelin beeinflusst die Polymerisierung der Mikrotubuli und trägt somit zur Anpassung der Nervenzellen an ihr Mikroumfeld bei.

Im Laufe der Arbeit entwickelte sich zudem die Frage, wie sich das intrazelluläre Reelinsignal in Anwesenheit von dominant-negativen Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 verändern könnte. Die Funktionen der Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 sind essentiell für die neuronale Entwicklung. Sie tragen unter anderem zur Ausbildung der Zellpolarität, zur korrekten neuronalen Migration und damit zur Morphogenese bei. Es stellte sich somit die Frage, ob sie auch entscheidend sind für die Umsetzung des Reelinsignals.

Die zweite Arbeitshypothese, den Reelin-Signalweg betreffend, lautete deswegen wie folgt:

Am Reelinsignalweg, der Veränderungen des Mikrotubuli-Zytoskeletts vermittelt, sind die Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 beteiligt.

Zuletzt stellte ich mir die Frage, ob die Modellvorstellung zum physiologischen Migrationsprozess übertragen werden könnte auf malignes Tumorverhalten im Sinne der Metastasierungsfähigkeit von Tumoren. Hierfür sollen Ergebnisse dieser Dissertation onkologisch eingeordnet werden.

2 Material und Methodik

2.1 Materialien

Alle Versuche wurden in einem SI-Labor durchgeführt. Die gebrauchten Reagenzien wurden den jeweiligen Erfordernissen und den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

2.1.1 Standardpuffer und Stammlösungen

Name	Inhalt
BSA	Bovine-Serum-Albumine
0,4 M PBS	Phosphat buffered saline, 71,2g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O gelöst in 11 H ₂ O wurden mit einer zweiten Lösung (16,5g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O gelöst in 300ml H ₂ O) auf pH=7,4 eingestellt
PFA 4%	Paraformaldehyde

2.1.2 Zellkulturmaterial und Kits

Name	Hersteller
B27 Serumfreies Supplement 2%	GIBCO, Life Technologies Corporation, Carlsbad California, USA
HBSS HANKS 1x Hank's Balanced Salt Solution	GIBCO, Life Technologies Corporation, Carlsbad California, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
NB Neurobasal®Medium	GIBCO, Life Technologies Corporation, Carlsbad California, USA
PS Penicillin-Streptomycin	GIBCO, Life Technologies Corporation, Carlsbad California, USA
Trypsin-EDTA	GIBCO, Life Technologies Corporation, Carlsbad California, USA
Zellkulturschalen und	FALCON, Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich
-flaschen	
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Plasmide

Name	Hersteller
Ivanic	Terstener
apix GEE	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
ul IX_OLI minus	Life Teenhologies, Darmstadt, Deutsemand
apix WT	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
	Life Teenhologies, Darmstaat, Deutsemand
dnRac1	geschenkt von Dr. Kenneth Vamada, NIH, Bethesda USA
unitaen	gesenenkt von D1. Keineth Tanada, 1011, Dettesda 05/A
dnede/2	geschenkt von Dr. Kenneth Vamada, NIH, Bethesda USA
uncuc+2	gesenenkt von D1. Kenneth Tanlada, 1411. Detresda USA

2.1.4 Stimulantien

Name	Hersteller
Mit rekombinantem Reelin angereichtertes Medium	Hergestellt nach D'Arcangelo et al. 1997; Förster et al. 2002, siehe unten
Mock-Medium (Reelin-frei)	Hergestellt nach D'Arcangelo et al. 1997; Förster et al. 2002, siehe unten

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Name	Antigen	Тур	Konzentration	Referenz	Hersteller
α-EB3	End- Binding- Protein 3	Polyklonal anti-Rabbit	1/1000	Straube, A. et al 2007, Curr Biol. 17(15): 1318-1325	Millipore, California,USA
GM130	Golgi- Matrix- Protein 130	Monoklonal anti-Maus	1/500	Ireton, RC et al. <i>J Cell Biol.</i> 2002; 159(3):465- 476.	BD Transduction Laboratories, New York,USA
VSV-G	Vesicular- Stomatitus- Virus- Glykoprotein	Monoklonal- Anti-Maus	1/1000		Abcam plc, Cambridge, Großbritannien

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Name	Hersteller	Erstantikörper
Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-	Jackson	α-EB3
	ImmnunoResearch,	

Rabbit IgG (H+L)	Baltimore, USA	
Alexa 555	Jackson ImmnunoResearch, Baltimore, USA	VSV-G
Cy5 TM -conjugated AffiniPure Rat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmnunoResearch, Baltimore, USA	GM130

2.1.6 Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Anästhesie Avertin	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DAPI	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.7 Geräte

Name	Hersteller
Axioskop 2	ZEISS, Jena, Deutschland
Inkubator HERA®cell150	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf, Deutschland
LSM510 Meta confocal microscope	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop ZEISS, Jena, Deutschland
Objektiv 40er Oil	ZEISS, Jena, Deutschland
Objektiv 63er Oil	ZEISS, Jena, Deutschland
Schüttler	Celloshaker, Chemetron Italien
Sterilbank(CleanBench)	Gelaire Flowlaboratorie BSB4A, Opera, Italien
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Vortex	Jahnke&Kunkel, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.8 Software

Name	Information
AxioCam und Axiovision3.1 Software	Axioskop 2, ZEISS, Jena, Deutschland
Image J	Open Source; http://rsb.info.nih.gov/ij/
ZEN-2011	Laser-Scanning-Mikroskop Software 2011
Microsoft Office Exel	Tabellenkalkulation
Adobe Photoshop	Bildverarbeitung

2.1.9 Zelllinien & Versuchstiere

Name	Information
R59	Stabil mit einer full-length-Reelin-cDNA transfizierte HEK293- Zellen (nach D'Arcangelo et al 1997, Förster et al., 2002, Chai et al., 2009)
GFP	Stabil mit GFP-codierendem Plasmid transfizierte HEK293- Zellen (nach D'Arcangelo et al 1997, Förster et al., 2002, Chai et al., 2009)

Die mit dem full length Reelin-Plasmid transfizierten HK293-Zellen (R59-Zellklon) wurden genutzt, um rekombinantes Reelin zu produzieren, während die HEK293-Zellen der GFP-Zelllinie das Kontrollmedium, später als MOCK-Medium bezeichnet, lieferten. Zur Transfektion wurde jeweils das gleiche Plasmid verwendet, jedoch einmal für GFP und einmal für Reelin kodierend.

Für die Untersuchung der Cortices und Hippocampi wurden Embryonen (E18) von Wistar-Ratten verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Standardbedingungen der Tierhaltung

Die Versuche wurden im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften der Bundesrepublik Deutschland und dem Land Hamburg durchgeführt. Alle Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und vom veterinärmedizinischen Dienst des Universitätsklinikums Hamburg betreut.

2.2.2 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Für die Methode der Zellkultur und sonstige Arbeitsschritte, die steriles Arbeiten erforderten, wurden die verwendeten Glaswaren, Werkzeuge (z.B. Präparationsbestecke), hitzestabile Lösungen und Puffer bei 134° C bei einem Dampfdruck von 2,2 bar für 20 Minuten autoklaviert. Nicht hitzestabile Lösungen, Puffer oder Medien wurden sterilfiltriert.

2.2.3 Standardbedingungen und Standardmethoden der Molekularbiologie

Die verwendeten Medien, Puffer oder sonstigen Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Gentechnologische Standardverfahren wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach (oder in Anlehnung an) den Standardprotokollen der Methodenbücher "Molecular Cloning" (Sambrook et al., 1989) und "Current Protokolls in Molecular Biology" (Ausubel et al., 1992) durchgeführt.

2.2.4 Anlegen der primären Zellkulturen

2.2.4.1 Präparation und Ausplattierung von Neuronen

Die Embryos(E18) wurden nach dem durch Chai et al. 2009 beschriebenen Prinzip aus einer trächtigen Wistar-Ratte entnommen (intraperitoneale Anästhesie 10ml/Kg Avertin; Sigma Aldrich). Die Hemisphären wurden in eiskaltem HBSS (Gibco) in einer Petrischale freigelegt. Der Cortex oder die Hippocampi wurden unter einem Mikroskop abgetragen. Das Präparat wurde einmal mit HBSS gewaschen, wobei das Medium anschließend vollständig abgesaugt wurde. Danach wurde das Präparat in ein 15ml FALCON (BD Biosciences) mit 2ml 0,5%iger Trypsinlösung und 8ml 0,53mM EDTAx4Na (Gibco) bei 37°C, 5%CO₂ für 15 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit eiskaltem HBSS gewaschen (zwischendurch das Gewebe 2-5 Minuten absinken lassen). Nach dem letzten Waschvorgang wurden 2ml Neurobasal®Medium (Gibco) hinzugegeben, um zunächst mit einer feuerpolierten Glas-Pasteurpipette mittleren Lumens per Hand die Zellen aus Ihrem Zellverband zu lösen, indem sie ca. 4-6mal resuspendiert wurden. Nachfolgend wurde eine Pasteurpipette kleinen Lumens genommen und das oben beschrieben Prinzip wiederholt bis eine homogene Suspension entstand (ca. 5-10mal). Die Zellsuspension wurde danach durch ein 40µm Zellsieb gegeben und mit ca. 3ml Neurobasal®Medium gespült. In einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt, damit im Anschluss jeweils 110.000 bis 150.000 Zellen/ml Medium in einer 24-Well-Platte auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen und vorinkubiertem Kulturmedium ausplattiert werden konnten. Nach ca. 1h wurde das Kulturmedium, welches aus 50ml Neurobasal®Medium, 500µl B27 (Gibco), 125µl 200mM L-Glutamin (Sigma) und 500µl 100U/mlPenicillin-100g/mlStreptomycin (Gibco) besteht, gewechselt.

2.2.5 Stimulation

Corticale bzw. hippocampale E18er-Neurone wurden unter der Sterilbank entweder mit 30µl Reelin oder mit 30µl Mock-Medium pro Well versetzt und für 30 Minuten bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert.

2.2.6 Immunzytochemie

Nach der Stimulation wurden alle Zellen mit 500µl 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) pro Well für 10 Minuten fixiert. Die Fixation fand, falls nicht anders beschrieben, an Tag 4 nach der Aussaat statt (DIV 4). Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 10 Minuten mit 1000µl des Phosphatpuffers (0,1M PBS, pH=7,4) gewaschen und dann mit 3%igem Bovine-Serum-Albumin (BSA) für 1 x 10 Minuten geblockt. Nach erneutem, dreimaligem Auswaschen mit 0,1M PBS waren die Zellen bereit zur Antikörper-Behandlung.

Die 24-Well-Platte wurde in zwei Abschnitte unterteilt. Links sind, wie in Abbildung 6 zu sehen, die mit Reelin stimulierten Wells, während sich rechts die Zellen im Mock-Medium befinden. Als nächstes wurden über Nacht alle Zellen mit dem oben genannten primären Antikörper gegen das End-Binding-Proteine3 (α -EB3) bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden alle Zellen erneut dreimal für je 10 Minuten mit dem

Phosphatpuffer PBS gewaschen und für mindestens drei Stunden mit dem oben genannten sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 488) zur Detektion des primären Antikörpers bestückt. Zur mehrfachen Markierung mit verschiedenen Antikörpern, wurde dieser Prozess mit den jeweiligen oben genannten spezifischen Antikörpern wiederholt. Nach dem Abziehen des sekundären Antikörpers, wurden alle Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit DAPI behandelt. Alle spezifischen Antikörperbezeichnungen und Konzentrationen sind den Tabellen im Teil "Materialien" zu entnehmen.



Abbildung 6: Reelin- und Mock-Stimulation auf 24-Well-Platte. 12 Wells sind für 30 Minuten mit Reelin stimuliert (ROT). 12 Wells als Vergleich mit Mock-Medium behandelt (GRAU). Alle Zellen in den Wells sind mit dem primären Antikörper gegen EB3(α-EB3) und dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 488) markiert (SCHWARZ). Außerdem sind alle Zellkerne mit DAPI angefärbt (BLAUE-Schrift).

Nach der DAPI-Behandlung wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit DAKO Fluorescent Mounting Medium auf Objektträger übertragen. Zur direkten Vergleichbarkeit wurde immer ein Glasplättchen mit einer Probe aus dem Reelin-Ansatz neben einer Probe aus dem Mock-Medium platziert. Die Lagerung bis zur Analyse unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop fand bei 4°C statt.

2.2.7 Plasmide und Transfektionen

Zur Untersuchung der Reelinwirkung auf einzelne Komponenten von intrazellulären Signalkaskaden wurden neocorticale bzw. hippocampale E18-Neurone mithilfe des Effectene-Transfektions-Kits von Qiagen transfiziert. Hierzu wurden die Neurone (vor der Stimulation und Immunzytochemie nach oben beschriebenem Schema) mit Plasmiden zur Expression folgender Proteine an DIV 1 transfiziert:

- $\alpha PIX WT$
- αPIX_GEF_{minus}

- dnRac1
- dncdc42

Zusatzinformation zu den Plasmiden, die freundlicherweise von PD Dr. Rosenberger aus der Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (siehe auch Meseke et al. 2013b) zu Verfügung gestellt wurden: α PIXcDNA (KIAA0006) wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend per Topoisomerase-Reaktion in pENTR/D-TOPO (Life Technoligies) kloniert. Das Vorgehen richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers. Nach Sequenzierung wurde das Insert in das Plasmid pcDNA-DEST47 (Life Technologies) mittels LR-Reaktion übertragen. Das α PIX_GEF- (GEF-Defizient) [L386R;L387S] wurde durch PCR-mediated mutagenesis erstellt. Hierzu wurden zwei sich überlappende cDNA-Fragmente mit Mutationen amplifiziert und die megaprime PCR angewandt. Anschließend wurde das PCR-Produkt purifiziert und in pENTR/D-TOPO mittels Topoisomerase-Reaktion kloniert. Danach folgten wieder Sequenzierung und Transfer in das Plasmid pcDNA-DEST47 via LR-Reaktion.

Die dominant-negativen Rac1 und Cdc42 Plasmide wurden mit dem VesicularStomatitisVirus Glykoprotein (VSV-G) getaggt. Im Kontrollexperiment wurde der pEGFP-N1-Vektor (Clontech) genutzt.

Die Transfektion fand nach Vorgabe des Herstellers für den Vierfachansatz (4 Wells auf 24-Well-Platte) statt. 1,5µg der jeweiligen Plasmid-DNA wurden in 150µl Puffer EC gelöst und mit 10µl Enhancer-Flüssigkeit versetzt. Das Gemisch wurde für 4-5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden 14µl Effectene hinzugefügt und dieses neue Gemisch um weitere 7-10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden frisch angesetztes 400µl Kulturmedium (NB+B27+L-GLU+PS) im erwärmten Zustand (37°C Wasserbad) dazu gegeben. Jeweils 137,5µl dieser Mischung wurden dann tröpfchenweise pro Well auf die spezifisch beschrifteten 24-Well-Platten übertragen, siehe Abbildung 2. Diese Platten wurden dann für 1,5 h im Brutschrank bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Hiernach wurden die Ansätze zweimal mit PBS gewaschen indem das PBS in die Wells gegeben und direkt wieder abgesaugt wurde. In der Folge wurden die Zellen bis zu weiteren Verarbeitung für fünf Tage in 1000µl Kulturmedium aufbewahrt.

Nach der Transfektion wurde zunächst die Hälfte aller Ansätze mit 30µl Reelin pro Well stimuliert, während die andere Hälfte 30µl Mock-Medium pro Well bestückt wurde. Nach der Stimulation und Fixierung an DIV6 mit PFA für 10 Minuten sowie nach dreifachem Waschvorgang mit PBS, wurden alle Zellen über Nacht mit dem primären Antikörper gegen das End-Binding-Protein3 (α -EB3) versetzt. Am nächsten Tag wurde dieser entfernt und für 3h der sekundäre Antikörper hinzugefügt (Alexa Fluor® 488). Während der Antikörperbehandlung wurden die 24-Well-Platten auf dem Schüttler bei RT gelagert. Bei den α PIX_WT und α PIX_GEF_{minus} -Ansätzen wurde mithilfe des primären Antikörper GM130 und des sekundären Antikörpers Cy5TM (Immunzytochemie-Schema nach obigem Vorbild) zusätzlich der Golgi-Apparat gefärbt. Bei den dnRac1- und dncdc42-Ansätzen wurde, (ebenfalls nach obigen Muster angesetzt) durch den primären Antikörper VSV-G und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 555 die grüne Fluoreszenz der transfizierten Zellen verstärkt.

Abschließend wurden alle Zellen in allen Ansätzen für 10 Minuten mit DAPI behandelt, um die Zellkerne zu färben. Nach Auswaschen mit PBS wurde jeweils ein Reelinstimuliertes Glasplättchen neben eins aus dem Mock-Medium auf einen Objektträger mithilfe des Dako Fluorescent Mounting Mediums fixiert. Alle spezifischen Antikörperbezeichnungen und Konzentrationen sind der Tabellen im Teil "Materialien" zu entnehmen.

Im Rahmen dieser Dissertation fließen die Untersuchungen an den α PIX_WT und α PIX_GEF_{minus} –Ansätzen nicht in den Ergebnisteil ein. Diese wurden zwar in die laborchemischen Arbeiten mit integriert, sollen aber getrennt betrachtet werden. Vielmehr wurde sich auf die Effekte des Reelin auf dncdc42 und dnRac1 konzentriert.



Abbildung 7: Transfektion der Neurone. Schematische Darstellung der Vierfachansätze nach Transfektion mit Effectene Transfection Reagent von Qiagen. Dunkelgrün (1. Ansatz von links) stellt die mit αPIX_WT transfizierten Zellen dar. Die oberen Wells sind jeweils mit Reelin stimuliert (ROT), die unteren Wells beinhalten Mock-Medium (GRAU). Zweite Spalte αPIX_GEF_{Minus} (Hellgrün), dritte Spalte dnRac1 (Lila) und vierte Spalte dncdc42 (Flieder).

2.2.8 Laser-Scanning-Mikroskopie

Alle Aufnahmen mit dem Laser-Scanning-Mikroskop wurden mit folgenden Parametern gemacht:

Channel 1: Rhodamin, Pinhole 122,0; Master Gain 791; Digital Gain 1,00; λ 543; Int 35,0

Channel 2: FITC, Pinhole 120,0; Master Gain 731; Digital Gain -0,04; λ488; Int 5-40,0

Channel 3: DAPI, Pinhole 69,0; Master Gain 740; Digital Gain 1,01; λ364; Int 16,0

Channel 4: Cy5, Pinhole 122,0; Master Gain 511; Digital Gain 1,00; λ633; Int 20,0

Nicht transfizierte Neurone wurden direkt in der 63er-Vergrößerung (Öl-Objektiv) aufgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass morphologisch möglichst ähnliche Zellen ausgesucht werden, die zudem bereits einen Hauptdendriten ausgebildet hatten. Außerdem ist die Aufnahme von Neuronen, die alleine liegen von Vorteil, da sich dadurch Überlagerungen und somit Signalverstärkungen vermeiden lassen. Die Zellen wurden in zwei Kategorien unterteilt: **1. Mock-Neurone, 2. Reelin-Neurone**.

Die transfizierten Zellen wurden aufgrund der grünen Floureszenz durch das Abfahren der Glasplättchen mit dem 40er Öl-Objektiv detektiert. Sobald eine Zelle entdeckt wurde, sollte der Laserstrahl kurzfristig unterbrochen werden, um schonend auf die 63er-Vergrößerung (Öl-Objektiv) umzuschalten. Mit dem 63er Öl-Objektiv wurden zu jeder Zelle eine Übersichtsaufnahme sowie eine Aufnahme mit dreifachem Zoom vom Hauptdendriten gemacht. Die Zellen wurden in vier Kategorien unterteilt: **1. Mock-Kontrollneurone, 2. Reelin-Kontrollneurone, 3. Mock-Transfektionen, 4. Reelin-Transfektionen**. Dabei wurden die Kontrollneurone im unmittelbaren Umfeld der grün fluoreszierenden, transfizierten Zellen aufgenommen.

Die Auflösung der Bilder wurde ubiquitär mit 1024 x 1024 Pixel festgelegt. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 6 μ m/sec, die Farbtiefe 8 Bit. Übersichtsaufnahmen haben die Maße von 142,7 μ m x 142,7 μ m, Aufnahmen im dreifachen Zoom die von 47,62 μ m x 47,62 μ m. Wichtig beim Aufnehmen ist ein zügiges Arbeiten, da ansonsten die Färbungen je nach Laserintensität ausgeblichen werden können.

2.2.9 Datenauswertung; Vorgehen bei nicht transfizierten Neuronen

Die Auswertung der Daten wurde zum einen anhand der ZEN 2011 Software von ZEISS und zum anderen mithilfe des open source Programms Image J vorgenommen. Die folgende Screenshotserie soll dabei die Vorgehensweise verdeutlichen:

Edit mage Process Analyze Plugins Window Help Car Type • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	agel	-		States and Designation	×)
Q Q Type Image: Construction of the second seco	ile Edit	Image Process	Analyze Plugins	Window Help	
ngie teel Adjust Show Info Strg+I Properties Strg+Umschalt+P Coor Stacks Merge Channels Stacks Crop Strg+Umschalt+C Crop Strg+Umschalt+C Duplicate Strg+Umschalt+C Crop Strg+Umschalt+C Scale Strg+E Color Picker Strg+Umschalt+C Color Picker Strg+Umschalt+C Color Picker Strg+Umschalt+C Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust Adjust	<u>10</u>	Туре	•	Dev Stk 0 8	3 >>
Show Info Strg-H Properties Strg-Winschatt-P Color Strg+Umschatt-P Stacks • Merge Channels Hyperstacks • Channels Tool Crop Strg+Umschatt-X Duplicate Strg+Umschatt-X Rename Scale Strg+Umschatt-X Scale Strg+E Edit LUT Transform • Color Picker Strg+Umschatt Zoom • Overlay • Lookup Tables •	Angle tool	Adjust	•		
ProperliesStrg+Umschalt+P Color Strg+Umschalt+P Stacks Merge Channels Hyperstacks Channels Tool Crop Strg+Umschalt+X DuplicateStrg+Umschalt+D Rename ScaleStrg+E Edit LUT Transform Color PickerStrg+Umschalt- Zoom Color PickerStrg+Umschalt- Zoom Color PickerStrg+Umschalt- Zoom File Edit Font Results File Edit Font Results		Show Info	Strg+I		
Color • Split Channels Stacks • Merge Channels Hyperstacks • Channels Tool Crop Strg+UmschaltxX Stack to RGB Duplicate Strg+Umschalt+D Make Composite Scale Strg+E Show LUT Scale Strg+E Color Picker Zoom • Color Picker Overlay • Edit LUT File Edit Font Results • Area Maan Min Max IntDen		Properties	Strg+Umschalt+P		
Stacks Hyperstacks Crop Strg+Umschall+X Crop Strg+Umschall+X Rename Strg+E Edit LUT Transform Coor Picker Strg+E Edit LUT Solution Coor Picker Strg+Umschalt Coor Picker Strg+Umschalt File Edit Font Results File E		Color	•	Split Channels	
Hyperstacks Channels Tool Crop Strg+Umschalt+X Duplicate Strg+Umschalt+X Rename Strg+Umschalt+D Make Composite Show LUT Scale Strg+E Edit LUT Transform Zoom Overlay Lookup Tables File File Edit Font Results Area Mean Min Max		Stacks	•	Merge Channels	
Crop Strg+Umschalt+X Duplicate Strg+Umschalt+D Rename Scale Strg+E Transform + Color Picker Strg+Umschalt Zoom + Overlay + Lookup Tables +		Hyperstacks	•	Channels Tool	
Duplicate Strg+Umschalt+D Rename Scale Strg+E Transform + Color Picker Strg+Umschalt Zoom + Overlay + Lookup Tables +		Crop	Strg+Umschalt+X	Stack to RGB	
Rename ScaleStrg+E Transform • Color PickerStrg+Umschalt Coor PickerStrg+Umschalt Lookup Tables • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		Duplicate	Strg+Umschalt+D	Make Composite	
Scale Strg+E Transform Color Picker Strg+Umschalt Zoom Overlay Lookup Tables File Edit Font Results File Edit Font Results File Edit Font Results		Rename		Show LUT	
Transform Color Picker Strg+Umschalt Zoom + Uookup Tables + File Edit Font Results File Edit Font Results		Scale	Strg+E	Edit LUT	
Zoom Overlay Lookup Tables		Transform	•	Color Picker	Strg+Umschalt+
Overlay		Zoom	•		
Lookup Tables		Overlay	•		
File Edit Font Results		Lookup Tables			
Results - X	L			_	
File Edit Font Results Area Mean Min Max IntDen RawIntD	d Results				1
Area Mean Min Max IntDen RawintD	File Edit	Font Results			
	Area	Mean Min	Max IntDen	RawintD ^	
Į.					
				= *	
-					
				-	

Abbildung 8a: Trennung der Farbkanäle. Die ersten Arbeitsschritte der Auswertung am Beispiel von zwei unterschiedlichen Zellen: "Split channels", Trennung der Farbkanäle.



Abbildung 8b: Aufhebung der 8 Bit Farbtiefe. Die ersten Arbeitsschritte der Auswertung am Beispiel von zwei unterschiedlichen Zellen: Aufhebung der 8Bit Farbtiefe vom ersten Kanal (C1).

Oben, anhand des mit "RB7.2_apkd_3zm_2704.lsm" bezeichneten Neurons in Abbildung 8a, soll gezeigt werden, dass zuerst die verschiedenen Kanäle voneinander getrennt werden müssen. In einem zweiten Schritt wird im ersten Kanal die Farbtiefe von 8 Bit aufgehoben, siehe Abbildung 8b "C1-GB10.2_apkd_3zm_1804.lsm". Im Hintergrund beider Bilder sind der ROI-Manager (ROI = Region Of Interest) und das Results-Fenster (Ergebnisse) geöffnet. Im ROI-Manager ist das Rechteck, welches zur Quantifizierung genutzt werden soll vorgespeichert, sodass auf allen Bildern dasselbe Rechteck angewendet werden konnte. Die Maße des Rechtseckes betragen 13,8 µm x 6,5 µm.

Bevor dieses Rechteck auf den Hauptdendriten des E18-Neurons gelegt werden konnte, wurde noch ein Threshold (Grenzwert) von Min100 – Max 255 für den Anzeigebereich eingestellt. Außerdem wurde der Parameter "Unit of length" (Einheit der Länge) unter "Set Scale" auf "Pixel" umgestellt, siehe Abbildung 9a mit dem Neuron "RB7.2_apkd_3zm_2704.lsm". Anschließend wurde über den Befehl "measure", siehe Abbildung 9b, die Anzahl der Pixel in dem vorbestimmten Rechteck quantifiziert. Die Werte konnten dann in dem Results-Fenster abgelesen und in eine Exel-Tabelle zur statistischen Ausarbeitung (Mittelwerte, Signifikanztestung etc.) übertragen werden. Insgesamt wurden auf diese Weise n=73 Neurone aus dem Mock-Medium und n=80 Reelin stimulierte Neurone ausgewertet.



Abbildung 9a: Parameter- und Region of Interest-Auswahl bei der Auswertung. Vorgehen bei der Auswertung: Einstellung der Parameter und Platzierung des Rechtecks und somit Bestimmung des Region of Interest.



Abbildung 9b: Messung der EB3-Kometen im Region of Interest. Weiteres Vorgehen bei der Auswertung: Messung der Rotfärbung (EB3-Kometen) innerhalb der Rechteckfläche (Region of Interest).

2.2.10 Datenauswertung; Vorgehen bei transfizierten Neuronen

Das Prinzip der Auswertung der transfizierten Neurone entspricht in großen Teilen dem unter 2.2.7 beschrieben Vorgehen bei den nicht transfizierten Neuronen. Zu den "transfizierten Zellen" gehören diejenigen, die mit den Plasmiden αPIX_WT und αPIX_GEF_{minus} sowie dnCdc42 und dnRac1 behandelt wurden, sowie diejenigen, die als Kontrollzellen auf den selben Glasplättchen aufgenommen wurden. Da die Plasmide deutliche Auswirkungen auf die Morphologie der Neurone haben, war es nicht möglich einen Hauptdendriten zu identifizieren. So wurde jetzt die ganze Zelle in den Messbereich mit eingeschlossen. Hierfür wurde in Image J nach Trennung der einzelnen Kanäle, Aufhebung der 8Bit-Farbtiefe, "Polygon selection" gewählt und eine spezifische Umrandung um jede einzelne Zelle gezogen. Große Fortsätze wurden bis maximal ³/₄ ihrer Länge mit eingeschlossen, um die kleinen, dünnen Fortsätze wurde keine Linie gelegt, siehe Abbildung 10.


Abbildung 10: "C1-GB8.2_apkd_Rac1_0706TF.lsm", eine Zelle aus der Kategorie *Mock-Transfektion*. Beispielhafte Darstellung eines Neurons mit individuellem Messbereich (gelbe Umrandung). Im Fenster "Results" sind die dazugehörigen Werte markiert.

Die Einheit der Länge (Unit of Length) wurde wieder auf "Pixel" gestellt. Pro Zelle wurden zwei Messungen bei unterschiedlichen Grenzbereichen gemacht;

- 1.Messung, Grenzbereich Min 0 Max 255
- 2.Messung, Grenzbereich Min 100 Max 255

Über einen Dreisatz konnte somit der Anteil der EB3-Färbung in dem gewünschten Grenzwertbereich (2. Messung) bestimmt und von der Färbung der gesamten, umschlossen Fläche (1.Messung) abgegrenzt werden, siehe Tabelle1. Festgelegt wurde der Grenzwertbereich von 100-255 aus Erfahrungswerten in unserem Labor, um möglichst genau den Effekt von Reelin darstellbar zu machen und gleichzeitig Artefakte zu minimieren.

Tabelle 1: Auszug aus der Datenbank. Berechnung der Relation von EB3-Färbung im gewünschten Grenzwertbereich zu EB3-Färbung in gesamtem Messbereich, Mock-Kontrollzelle "C1-GB.1.2_apkd_dnRac1_0606K". Berechnung: Anteil= (2.Messung x100) / 1.Messung

06.06.2012 Objektträger 1					
E18HC_040512_DIV6_30m_EB3_VSV-					Anteil in
G_Dapi		Area	Min	Max	%
Mock-Kontrollzellen					
C1-GB1.2_apkd_dnRac1_0606K	1.Messung	117606	3	255	
	2.Messung	4448	100	255	3,78

3 Ergebnisse

3.1 Reelin steigert die EB3-Kometen-Dichte im Hauptdendriten von zum Zeitpunkt E18 präparierten corticalen Neuronen

Das Protein Reelin ist von entscheidender Bedeutung für die korrekte Entwicklung und Strukturierung des Gehirns (Curran und D'Arcangelo 1998, Tissir und Goffinet 2003). Es wurden bereits viele Effekte des Reelins beschrieben: Zum Bespiel stabilisiert es das Aktin-Zytoskelett sobald das Neuron die Marginalzone erreicht (Chai et al. 2009) oder aber es steigert die Beweglichkeit von Wachstumskegeln über die Aktivierung der Rho GTPase Cdc42 (Leemhuis et al. 2010). Zudem trägt es zur Organisierung und Translokation des Golgi-Apparates bei (Hehnly et al. 2010, Meseke et al. 2013b) und beeinflusst somit die Ausbildung eines Axons sowie eines führenden Hauptdendriten (Zellpolarisierung). Diese Genese der Fortsätze ist wie viele andere intrazelluläre Prozesse eng mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett verbunden. Unklar bleibt allerdings, welcher Mechanismus dieser Mikrotubuli-assoziierten Rolle von Reelin zugrunde liegt. Wie genau wird die Dynamik des Mikrotubuli-Systems verändert?

Wir konnten zunächst einmal zeigen, dass Reelin einen Einfluss auf die Dynamik der Polymerisierung der Mikrotubuli hat (Meseke et al. 2013a). Die den Befunden und Auswertungen zugrunde liegenden Experimente, welche zum Teil vor dieser Dissertation in unserem Labor durchgeführt wurden, werden im Folgenden mit dargestellt: Es wurden hierfür drei Tage alte Primärzellkulturen von Hippocampus-Neuronen für 120 Minuten mit 8µM Nocodazol behandelt, dann ausgewaschen und anschließend entweder mit Mockmedium oder Reelin stimuliert. Danach wurden die Neurone zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert (nach 0,15,30 und 60 Minuten). Die immunzytochemische Färbung mit einem α -Tubulin-Antikörper detektiert vor allem das in polymerisierter Form vorliegende α -Tubulin und erlaubt es somit, die Länge der Mikrotubuli gut darzustellen. Da Nocodazol die Polymerisierung stört, waren zum Zeitpunkt 0 Minuten nach Behandlung mit Nocodazol überwiegend zerstörte, kurze Mikrotubuli-Stücke vorhanden. Bereits nach 15minütiger Behandlung mit Reelin oder Mockmedium zeigten sich dann Repolymerisierungen in beiden Versuchsansätzen. Letztendlich konnte festgehalten werden, dass die Neurone unter Stimulation mit Reelin nach der gleichen Zeiteinheit signifikant längere Mikrotubuli ausgebildet hatten, als die Neurone aus dem Mockmedium. Unter der Reelinwirkung war die Polymerisierung von Mikrotubuli offensichtlich beschleunigt.

Wie konnte nun die Beschleunigung auf molekularer Ebene aussehen? Was genau könnte die Aktivierung des Reelinsignalweges am Mikrotubuli-Zytoskelett bewirken?

Mikrotubuli sind polare Zytoskelett-Filamente, die ein Plus- und ein Minus-Ende besitzen. An den Plus-Enden finden, vermittelt durch sogenannte +TIPs, plus-Enden-spezifische Wachstumsprozesse statt. Eines dieser +TIPS, das EB3, wurde als besonders geeigneter Marker für Neurone charakterisiert (Stepanova et al., 2003). Änderungen der Dynamik an den Plus-Enden können mithilfe dieser EB3-Proteine aufgezeigt werden.

Um der Fragen nachzugehen, was nach Aktivierung der Reelinsignalkaskade an den Mikrotubuli passiert, haben wir einen Versuchsansatz mit Primärzellkulturen von E18-Cortexneuronen angelegt. Diese Cortexneurone wurden entweder im Mockmedium oder unter Reelinstimulation kultiviert und anschließend zur Antikörper-Behandlung fixiert. Zielproteine der Immunzytochemie waren in diesem Fall die EB3-Proteine an den Plus-Enden der Mikrotubuli. Diese +TIP-Proteine, die sich immunzytochemisch bei Verwendung rot-fluoreszierender Zweitantikörper als rote Pünktchen darstellen lassen, werden auch "EB3-Kometen" (Stepanova et al., 2003) genannt und visualisieren die dynamischen Prozesse an den Plus-Enden wachsender Mikrotubuli. Je mehr EB3-Kometen nachweisbar sind, desto reger die Aktivität an den Plus-Enden.

Vor dem Hintergrund dieser Methodik konnte gezeigt werden, dass nach 30 minütiger Stimulation der Cortexneurone mit Reelin ein signifikanter Anstieg der EB3-Kometen-Dichte, im Vergleich zu den E18- Neuronen aus dem Mock-Medium, messbar wurde (p= 0,0143, siehe Abbildung 11). Hierzu wurden Aufnahmen von insgesamt 153 Zellen angefertigt, von denen 73 aus dem Mock-Medium und 80 aus dem Medium mit Reelin-Zusatz stammten.

Der Fokus der Messungen wurde dabei auf den größten Fortsatz der Neurone gelegt, der dem Apikaldendriten *in vivo* entspricht, (s. Abschnitt 2.2.7 aus Material und Methoden). Es zeigte sich ein positiver Effekt des Reelins auf die Zunahme der EB3-Kometen, was für eine Zunahme der Polymerisierung am Plus-Ende der Mikrotubuli spricht.



Abbildung 11: EB3-Kometen in E18-Cortexneuronen. In hellgrau ist gezeigt, dass in Neuronen aus dem Mock-Medium im Durchschnitt (Mittelwert) 6380 Pixel pro Fläche messbar waren, während Reelin stimulierte Neurone (dunkelgrau) 8800 Pixel pro Fläche aufwiesen. Da die Pixel für Anhäufungen EB3-Kometen stehen. von repräsentieren sie hier die EB3-Kometen-Relation zwischen den beiden Versuchsansätzen. Unter Stimulation mit Reelin gab es 27,5% mehr detektierbare Pixel im Grenzwertbereich und somit merklich mehr EB3-Kometen am Plus-Ende der wachsenden Mikrotubuli von migrierenden Neuronen. Die bemessene Fläche des Rechtecks betrug 13,8µm x 6,5µm. Das Rechteck wurde stets auf den führenden Fortsatz (Hauptdendriten) gelegt (Meseke et al., 2013a).

In Abbildung 12 sind zwei morphologisch ähnliche E18–Cortexneurone aus den beiden Versuchsansätzen nebeneinander dargestellt. In der linken Spalte (1,3) ist das Neuron aus dem Mock-Medium zu sehen. Die rechte Spalte (2,4) zeigt das mit Reelin stimulierte Neuron. In der unteren Zeile (3,4) ist der DAPI-Kanal (blaue Zellkernfärbung) ausgeschaltet. Deutlich zu sehen ist, dass die roten Pünktchen (EB3-Kometen) rechts überwiegen bzw. im vorgegebenen Grenzwertbereich verstärkt detektierbar sind. Außerdem ist in beiden Zellen eine Zunahme der Pünktchen im führenden Fortsatz erkennbar, welches die Vorstellung einer verstärkten Polymerisierung von Mikrotubuli im sich differenzierenden Hauptdendriten von E18-Cortexneuronen unterstützt. Von der Intensität der Blaufärbung des Zellkerns kann man die Beleuchtungszeit der Zellen gut abschätzen. In Abbildung 12 haben beide Zellen eine ähnlich lange Beleuchtungszeit, sodass der Effekt der EB3-Kometen-Dichtezunahme hauptsächlich auf die Reelinwirkung zurückgeführt werden kann.



Abbildung 12: Vergleich E18-Neuron aus Mock-Medium (links) mit E18-Neuron nach Reelin-Stimulation (rechts). Bild 1 und 2 weisen eine blaue Zellkernfärbung (DAPI) auf. In Bild 3 und 4 ist dieser Kanal zur besseren Sicht ausgeschaltet. EB3-Proteine sind durch α -EB3-Antikörper wie rote Kometen dargestellt, daher die Bezeichnung "EB3-Kometen". Die Anzahl der EB3-Kometen ist nach Stimulation mit Reelin (rechts, Bild 2 und 4) deutlich erhöht. Die EB3-Kometen in migrierenden E18-Neuronen konzentrieren sich vor allem auf den Hauptdendriten. Aufgrund der ähnlich intensiven Blaufärbung des Zellkerns, kann von einer ähnlich langen Beleuchtungszeit ausgegangen werden. Insbesondere Bild 4 impliziert eine Steigerung der Dynamik an Mikrotubuli-Plus-Enden durch Reelin (modifiziert nach Meseke et al., 2013a). *Maßstab 10µm*.

3.2 Zunahme der Anzahl von EB3-Kometen nach Reelinstimulation trotz Expression von dominant-negativem cdc42

E18-Neurone aus dem Cortex wurden mit Plasmiden transfiziert, die für eine dominantnegative Form der Rho-GTPase cdc42 kodieren. Cdc42 ist ein wichtiges Schlüsselenzym für zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Polarisierung der Zelle, Migration, Vesikeltransport und Zytokinese (Heasman und Ridlej, 2008). Es vermittelt die intrazelluläre Verarbeitung des extrazellulären Reelin-Signals und trägt damit unter anderem zur Beweglichkeit der Wachstumskegel (Leemhuis et al., 2010) und der Golgi-Translokation bei (Meseke et al., 2013b). Die Überexpression der dominant-negativen Form des cdc42 führt zur starken kompetitiven Hemmung des nativen Proteins.

Die Untersuchung der Kontrollneurone in diesem Ansatz (siehe 2.2.8) bekräftigte zunächst das Ergebnis aus Punkt 3.1. Auch hier konnte eine signifikante EB3-Kometen-Dichtezunahme beim Vergleich der Mock-Kontrollneurone (6,73% der gemessenen Fläche ist bedeckt) mit den Reelin-Kontrollneuronen (17,49% bedeckt) gezeigt werden (p<0,05), siehe Abbildung 13, links; "Kontrollen" *(Kontrollneurone sind untransfiziert)*. Die Betrachtung der transfizierten Neurone (Abbildung 13, rechts; "Transfektionen") hingegen zeigte, dass hier nach Transfektion zunächst einmal ein wesentlich kleinerer Anteil der gemessenen Fläche mit EB3-Kometen bedeckt war (Mock-Transfektionen 2,36%). Der Unterschied zwischen den einzelnen 0,44%, Reelin-Transfektionen Untergruppen bezogen auf den EB3-Kometen-Anteil blieb stets signifikant: Mock-Transfektionen (MTF) unterschieden sich mit einem p-Wert von 0,003 von Mock-Kontrollneuronen (MK), Reelin-Transfektionen (RTF) mit einem p-Wert von 0,014 von Reelin-Kontrollneuronen (RK). Ebenso zeigte sich, dass die Stimulation mit Reelin auch nach Transfektion mit dem dominant-negativen-cdc42-Plasmiden einen Effekt auf die Dynamik am Plus-Ende der Mikrotubuli beibehält. Obwohl die Transfektion die pro Fläche detektierbaren EB3-Kometen stark reduzierte, enthielten die durch Reelin stimulierten Neurone mit durchschnittlich 2,36% bedeckter Fläche circa sechsmal mehr EB3-Kometen, die Mock-Transfektionen (0,44%; p<0,05), siehe Abbildung 13, rechts; als "Transfektionen".



Abbildung 13: Auswertung der EB3-Kometen in dncdc42 transfizierten E18-Cortexneuronen. Im linken Teil der Abbildung sind die Kontrollneurone und rechts die transfizierten Neurone aus den jeweiligen Medien (Mock oder Reelin) gezeigt. Auf der Ordinaten-achse wird angegeben wie viel Prozent aller Pixel innerhalb der gemessenen Fläche im Grenzwertbereich von 100-255 liegen. Je höher die Prozentzahl, desto mehr EB3-Kometen pro Fläche waren messbar. Unter Kontrollneuronen zeigte sich den ein signifikanter Unterschied zwischen Mock- und Reelin-Behandlung. Die Reelin-Behandlung der Neurone steigert den Anteil der detektierbaren EB3-Kometen deutlich. Die Transfektion mit dem dncdc42-Plasmiden reduziert die detektierbaren Kometen erheblich, siehe MTF 0,44% (Mock-Transfektion) und RTF 2,36% (Reelin-Transfektion). Trotz Transfektion ist ein positiver Effekt des Reelins auf wachsenden

Mikrotubuli zu sehen (Vergleich MTF und RTF; p<0,05, p-Wert der übersichthalber in Abbildung 13 nicht dargestellt). In Reelin-Transfektionsneuronen sind etwa sechsmal mehr EB3-Kometen messbar als in Mock-Transfektionsneuronen (2,36% RTF, 0,44% MTF). Die Ergebnisse sollen mithilfe der folgenden Abbildungen weiter veranschaulicht werden. Abbildung 14 zeigt zwei morphologisch ähnliche E18-Kontrollneurone aus dem Cortex mit rot gefärbten EB3-Kometen und blauem Zellkern (DAPI, 1 und 2). Der Hauptdendrit enthält nach Reelinbehandlung (2 und 4) mehr EB3-Kometen.



Abbildung 14: Vergleich der EB3-Kometen von Kontrollneuronen aus dem dncdc42-Transfektions-Experiment. Zwei morphologisch ähnliche E18-Neurone aus dem Cortex, die als Kontrollen aus dem unmittelbaren Umfeld der transfizierten Neurone aufgenommen wurden, werden gezeigt. 1 und 3 stellen dabei ein Neuron aus dem Mock-Medium dar. 2 und 4 ist ein Neuron, das mit Reelin behandelt wurde. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt (in der unteren Reihe ist der DAPI-Kanal ausgeschaltet). Das mit Reelin behandelte Neuron (2 und 4) zeigt augenscheinlich mehr EB3-Kometen als das Neuron aus dem Mock-Medium. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse aus dem Teil 3.1, vergleichbar mit Abbildung 12. Maßstab 10µm.

Die Abbildung 15 vergleicht Neurone innerhalb der Mock-Medium-Gruppe. In der oberen Reihe (1,2 und 3) ist ein mit dncdc42-Plasmiden transfiziertes Neuron in Dreifach-Färbung (1) zu sehen. Dabei steht die Farbe Grün für den Nachweis der Transfektion (Green-Fluorescent- Protein), Blau für die Zellkernfärbung (DAPI) und in Rot sind die EB3-Kometen (α -EB3) am Plus-Ende der wachsenden Mikrotubuli dargestellt. Die untere Reihe zeigt ein Kontrollneuron mit und ohne Zellkernfärbung. Im Zytoplasma des Mock-Kontrollneurons (untere Reihe) zeigt sich eine vermehrte Anreicherungen von EB3-Kometen im Vergleich zum Zytoplasma der transfizierten Zelle (obere Reihe). Außerdem sind diese EB3-Kometen verstärkt im Hauptdendriten zu finden, während sie im Zytoplasma des transfizierten Neurons unspezifisch verteilt erscheinen.



Abbildung Vergleich 15: von Cortexneuronen innerhalb der Mock-Medium Gruppe nach Transfektion mit dncdc42-Plasmiden. Mock-Kontrollneuron (unten) zeigt deutlich mehr EB3-Kometen als Mock-Transfektionsneuron (oben). Des Weiteren sind die EB3-Kometen des Kontrollneurons hauptsächlich im Hauptdendriten vorzufinden, während sie nach Transfektion unspezifisch verteilt erscheinen. Von links nach rechts sind einzelne Farbkanäle ausgeschaltet. Maßstab 10µm.

In Abbildung 16 sind Neurone innerhalb der Reelin-behandelten Gruppe dargestellt und werden miteinander verglichen. Auch hier zeigt sich, dass der positive Effekt des Reelins auf die EB3- Dynamik am Plus-Ende der Mikrotubuli trotz der Transfektion mittels dncdc42-Plasmiden anhält. Insgesamt wirkt es zudem auch beim Vergleich von Abbildung 15 und 16 so, als würden durch die Reelinbehandlung mehr EB3-Kometen mit Hilfe des Konfokalmikroskop im vorgegebenen Grenzwertbereich detektierbar werden.



Abbildung 16: Vergleich von Cortexneuronen innerhalb der Reelin-behandelten Gruppe nach Transfektion mit dncdc42-Plasmiden.

Das Reelin-behandelte Kontrollneuron (unten) zeigt deutlich mehr EB3-Kometen als das Reelin -behandelte transfizierte Neuron (oben). Insgesamt wirkt die Zellstruktur nach Transfektion deutlich gestört. Von links nach rechts sind einzelne Farbkanäle ausgeschaltet. *Maßstab 10µm*.

3.3 Zunahme von EB3-Kometen nach Reelinstimulation trotz dnRac1 Expression in hippocampalen Neuronen

E18-Neurone aus dem Hippocampus wurden mit dominant-negativen Plasmiden für Rac1 transfiziert. Hippocampale Neurone gehören zum Allocortex. Dieser zeigt eine einfachere Zytoarchitektur als der Neocortex und wird als leicht zugängliches Modell zum Studium der neuronalen Migration genutzt.

Rac1 ist ebenso wie cdc42 eine wichtige zelluläre Rho-GTPase und spielt unter anderem eine entscheidende Rolle bei Migrations- uns Polarisationsprozessen der Zelle. Abbildung 17 zeigt welchen Einfluss die Transfektion auf die Neurone hat und vor allem wie sich die Zelle nach Reelinbehandlung verhält. Hier konnten drei Ergebnisse festgehalten werden:

- Reelin-Kontrollneurone (RK) wiesen mit 8,43% Pixel/Fläche innerhalb des vorgegebenen Grenzwertbereiches, etwa doppelt so hohe Werte auf wie die Mock-Kontrollneurone (MK) mit 4,12% und unterstützten somit ebenso die Ergebnisse aus 3.1 und 3.2, p=0,036. Die Pixel pro Fläche stehen repräsentativ für die EB3-Kometen-Dichte.
- 2. Die Transfektion verursachte erhebliche Verminderungen am Anteil der messbaren Pixel/Fläche, also der EB3-Kometen an den Plus-Enden der Mikrotubuli. In den Mock-Transfektionsneuronen (MTF) waren gerade einmal 0,53% Pixel/Fläche messbar, während im Vergleich MK 4,12% Pixel/Fläche aufwiesen, p=0,007. Die Reelin-Transfektionsneurone (RTF) zeigten mit durchschnittlich 1,79% Pixel/Fläche ebenfalls deutlich niedrigere Werte auf als die RK mit 8,43% Pixel/Fläche, p=0,003.
- Reelin hat trotz Transfektion mit dnRac1-Plasmiden einen positiven Effekt auf die Plus-Enden der wachsenden Mikrotubuli, wenn man die MTF mit durchschnittlich 0,53% Pixel/Fläche mit den RTF mit 1,79% Pixel/Fläche vergleichend betrachtet, p=0,036.



Abbildung 17: **EB3-Kometen** in dnRac1 transfizierten E18-Hippocampusneuronen. Im linken Teil der Abbildung sind die Kontrollneurone und rechts die transfizierten Neurone aus den jeweiligen Medien (Mock oder Reelin) gezeigt. Auf der Ordinatenachse wird angegeben wie viel Prozent aller Pixel innerhalb der gemessenen Fläche im Grenzwertbereich von 100-255 liegen. Je höher die Prozentzahl, desto mehr EB3-Kometen waren nachweisbar. Unter den Kontrollneuronen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Mock-Gruppe (4,12%) und Reelin-Gruppe (8,43%, p<0,05). Die Transfektion mit dem dnRac1-Plasmiden reduziert die detektierbaren EB3-Kometen erheblich, siehe MTF (0,53%) und RTF (1,79%). Trotz Transfektion ist ein positiver

Effekt des Reelins auf die Anzahl der EB3-Kometen zu beobachten. In Reelin-Transfektionsneuronen sind mehr als dreimal so viele EB3-Kometen im Zielgrenzwertbereich detektierbar als in Mock-Transfektionsneuronen.

Die Abbildungen 18 und 19 soll beispielhaft jeweils den Einfluss der Transfektion auf die Hippocampusneurone innerhalb der Mock- bzw. der Reelin-Gruppe darstellen. In Abbildung 18 sind Neurone aus dem Mock-Ansatz zu sehen. In der oberen Reihe befindet sich ein Mock-Transfektionsneuron (MTF) während unten ein Mock-Kontrollneuron MK abgebildet ist. Die grüne Floreszenz unter 1 verdeutlicht, dass die Transfektion erfolgreich war, da das Plasmid an ein Green-Fluorescent-Protein (GFP) gekoppelt ist. Die roten Pünktchen entsprechen den EB3-Kometen, die technisch als Pixel/Fläche gemessen wurden. Diese EB3-Kometen sind in dem MTF im Vergleich zu dem MK wesentlich geringer nachweisbar. Außerdem scheint es so, als wären die Plus-Enden der Mikrotubuli mit den EB3-Kometen deutlich in den Apikaldendriten verlagert worden, während bei dem MTF der Apikaldendrit ohne GFP kaum auszumachen wäre.



Abbildung 18: Vergleich von Hippocampusneuronen innerhalb der Mock-Gruppe nach Transfektion mit dnRac1.

Obere Reihe; ein mit dnRac1 transfiziertes Neuron (1-3). Unten Mock-Kontrollneuron mit deutlich mehr nachweisbaren EB3-Kometen im Zielgrenzwertbereich als im transfizierten Neuron oben. *Maßstab 10µm*.

In Abbildung 19 sind exemplarisch ein Reelin-Transfektionsneuron (RTF, obere Reihe) und ein Reelin-Kontrollneuron (RK, untere Reihe) gegenübergestellt. Interessanterweise zeigen beide Neurone zunächst eine intensivere Färbung der EB3-Kometen im Vergleich zu den beiden Neuronen aus dem Mock-Ansatz in Abbildung 18.



19: Abbildung Vergleich von Hippocampusneuronen innerhalb der **Reelin-Gruppe nach Transfektion** mit dnRac1. Das Neuron in der oberen Reihe ist mit dominant-negativen-Rac1-Plasmiden transfiziert (1-3). Unten ist ein Reelinkontrollneuron dargestellt, welches wesentlich konzentrierter EB3-Kometen im Hauptdendriten aufzeigt als das transfizierte Neuron oben. Eine insgesamt vergleichende Betrachtung zu Abbildung 18 stellt klar, dass unter Reelineinfluss mehr EB3-Kometen detektierbar werden. Maßstab 10µm.

4 Diskussion

Das extrazelluläre Matrixprotein Reelin ist notwendig für die korrekte Positionierung von Neuronen im sich entwickelnden Gehirn. Es kann zu verschiedenen Stadien der Hirnentwicklung kontextabhängig sowohl als migrationsförderndes Signal, im Sinne eines Anreizes für Neurone sich fortzubewegen, als auch als Stoppsignal fungieren, zum Beispiel sobald das Neuron die richtige Cortexschicht erreicht hat.

Diese unterschiedlichen, teilweise gar entgegengesetzten Wirkungen erreicht das Reelin unter anderem durch Bindung an verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche (VLDLR, ApoER2, etc.). Es setzt wahrscheinlich je nach Entwicklungsstadium der Nervenzelle spezifische Signalkaskaden in Gang (zum Beispiel ApoER2 -> Dab1 -> PI3K -> PKB -> LIMK1 oder VLDLR -> Dab1 -> Lis1 -> NudE und Dynein // Dab1 -> GTPasen (cdc42, Rac1)) und bewirkt dadurch intrazelluläre Umbauprozesse des Zytoskeletts, die es der Nervenzelle ermöglichen sich zum einen weiterzuentwickeln und zum anderen nach diesen Signalen des Mikroumfeldes sich auszurichten, sich morphologisch anzupassen. Durch die Phosphorylierung des Proteins n-cofilin kommt es beispielsweise zur Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts und folglich zur Fixierung des Zellkerns und Verringerung der Beweglichkeit des Neurons sobald die Marginalzone erreicht wird. Innerhalb der Zelle sind die Anteile des Zytoskeletts eng miteinander verflochten, und gegenseitige Regulaturmechanismen sind bekannt. So stellte sich für uns die Frage nach der Reelinwirkung auf das Mikrotubuli-System, welches eng mit dem Aktin-Zytoskelett über linker-Proteine verbunden ist und ebenso ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts darstellt.

Das Mikrotubuli-System ist unter anderem für den Stofftransport innerhalb der Neurone (Vesikeltransport) von großer Bedeutung. Außerdem sind die Mikrotubuli entscheidend bei der Ausbildung von Fortsätzen. Sie sind beteiligt an der Verlagerung des Golgi-Apparates, was zur Festlegung von Axon und Hauptdendrit, also den beiden Polen der Nervenzelle, maßgeblich beiträgt. Die Bestimmung des Hauptdendriten (auch Apikaldendriten) ist für das weitere Schicksal der Nervenzelle von immenser Wichtigkeit, denn durch diesen ist sie in der Orientierung ihrer Polaritätsachse in der Hirnrinde festgelegt.

4.1 Reelin beeinflusst die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Mikrotubuli sind polare Zytoskelettanteile, die vor allem am Plus-Ende wachsen. Diese Plus-Enden sind hauptsächlich Richtung Zellperipherie gerichtet und durch sogenannte +TIPs belagert. EB3-Proteine stellen dabei eine neuronenspezifische Untergruppe dieser Proteine dar, die wie eine "nano-Plattform", die Wachstumsprozesse am Plus-Ende der Mikrotubuli katalysieren (N. Galjart, 2010). Wie oben beschrieben, sind mehrere Signalwege des Reelins bereits bekannt. Dennoch bleibt bisher weitgehend unklar, welchen Effekte Reelin auf das Mikrotubuli-Zytoskelett ausübt. Zerstört man lange Mikrotubuli mittels Nocodazol und beobachtet anschließend die Repolymerisierung, so zeigt sich an primären Zellkulturen im In-Vitro-Versuch, dass die Repolymerisierung bei Inkubation mit Reelin beschleunigt abläuft. So wurden in unserem Labor über einen α -Tubulin-Antikörper die Längen der Mikrotubuli bestimmt und zwischen Reelin-Ansatz und Mock-Ansatz verglichen. In der Tat polymerisierten die Neurone durch die Stimulation mit Reelin in der gleichen Zeit signifikant längere Mikrotubuli.



Abbildung 20: Repolymerisierung von Mikrotubuli nach Nocodazol-Behandlung. a) Obere Reihe von links nach rechts: Darstellung polymerisierter Mikrotubuli mittels α-Tubulin-Antikörper als konfokalmikroskopische Aufnahme, sowie in schematischer Zeichnung bezüglich des Hauptdendriten daneben. Mitte: Darstellung nach Behandlung mit Nocodazol und konsekutiv verkürzten Mikrotubuli. Rechts: Darstellung der Mikrotubuli nach dem Auswaschen von Nocodazol. b) Vergleich der Mikrotubuli-Längen von unbehandelten Neuronen (rot) gegenüber Neuronen, die mit Nocodazol behandelt wurden (schwarz). c) Vergleich der Mikrotubuli-Längen nach dem Auswaschen von Nocodazol und Behandlung mit Reelin- oder Mockmedium für 15 Minuten. d) Vergleich der Mikrotubuli-Längen nach dem Auswaschen von Nocodazol und Behandlung mit Reelin- oder Mockmedium für 30 Minuten. Die Abbildung 20 stellt unter a) zunächst die Wirkung von Nocodazol sowie die Reaktion der Mikrotubuli der Nervenzellen nach dem Auswaschen von Nocodazol dar. Unter b), c) und d) wird deutlich, dass nach 15 bzw. 30 Minuten unter Reelinbehandlung längere Mikrotubuli polymerisiert werden, als im Mockmedium. *Modifiziert nach Meseke et al.*, 2013a.

Stellt nun diese Beobachtung nur einen unspezifisch positiven Effekt auf die Polymerisierung der Mikrotubuli dar, steigert Reelin möglicherweise die EB3-Expression generell oder beeinflusst Reelin die Neurone in ihrem Migrationsverhalten gezielter?

4.2 Die Orientierung der Neurone hängt von ihrer räumlichen und zeitlichen Exposition gegenüber Reelin ab

Den sogenannten Reeler-Mäusen fehlt das exkretorische Protein Reelin. Sie entwickeln einen Cortex ohne typische Schichtung der Neurone. Um zunächst den Effekt von Reelin auf das Mikrotubuli-Zytoskelett fehlpositionierter Neurone im Cortex von Reeler-Mäusen darzustellen, wurden in unserem Labor immunhistochemische Färbungen von sagittalen Hirnschnitten mittels spezifischer Antikörper gegen α -Tubulin durchgeführt. Anschließend wurde Wildtyp- gegen Reeler-Maus verglichen. Während im Wildtyp die langen Hauptdendriten der Neurone Richtung Marginalzone, und damit in Richtung der Reelin-Quelle während der Cortexentwicklung ausgerichtet sind und der Hauptanteil der Dendriten parallel angeordnet ist,-können im Cortex der Reelermutante hingegen korrekt orientierte Hauptdendriten kaum ausfindig gemacht werden.





Reelin beeinflusst nicht nur die Mikrotubulidynamik, sondern auch die Ausrichtung migrierender Neurone. Eindrücklich zeigt sich dieses Charakteristikum auch, wenn Neurone im sich entwickelnden Neocortex einer ektopen Reelin-Quelle ausgesetzt werden. Dann nämlich richten sie ihre Hauptdendriten in Richtung dieser neuen Quelle aus und orientieren sich augenscheinlich neu (Kubo et al., 2010).

Zusätzlich zu dieser lokalisationsabhängigen Wirkung, spielt auch der Zeitpunkt der Exposition der Neurone zum Reelin-Signal eine wichtige Rolle. Nach einem frühen Beginn der Migration, der offenbar weitgehend Reelin-unabhängig ist, polarisieren sich die zunächst multipolaren Neurone innerhalb der Corticalplatte unter Kontrolle des Reelins (Jossin & Cooper, 2011). Sie werden zu bipolaren Neuronen. Diese Polarisierung erfolgt durch Umbauprozesse innerhalb des Zytoskeletts. Der Golgi-Apparat wird vom Axon in den sich nun etablierenden Hauptdendriten verlagert (Meseke et al., 2013b). Dieser ist, wie oben bereits beschrieben, in Richtung der Reelin-Quelle (apikal) ausgerichtet.

Diese Abfolge von zellulären Umbauprozessen zur radialen Migration wird maßgeblich über den bekannten Signaltransduktionsweg mit den Rezeptoren VLDLR und ApoER2, sowie dem Adapterprotein Dab1 beeinflusst. Denn, wird zum Beispiel das Adapterprotein Dab1 nicht exprimiert, bleibt die Migration in frühen Stadien zwar unverändert (da wahrscheinlich unabhängig von Reelin), in späteren Stadien aber zeigt sich ein Reelerähnlicher Phänotyp (Franco et al., 2011).

Reelin ist demzufolge essentiell für die physiologische Schichtbildung des Gehirns, da es den korrekten Ablauf der Migrationsprozesse über die Beeinflussung der Polymerisierung von Mikrotubuli jeder einzelnen Nervenzelle koordiniert. Offen bleibt dennoch, was genau das Reelinsignal durch Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden am Mikrotubuli-Zytoskelett verändert und welchen Anteil diese Veränderung an dem Migrationsprozess haben könnte.

4.3 Reelin erhöht die EB3-Kometen-Dichte am Plus-Ende der Mikrotubuli

Stepanova et al. (2003) haben gezeigt, dass das neuronenspezifische End-Binding-Protein-3 (EB3) die Dynamik am Plus-Ende von wachsenden Mikrotubuli korrelativ wiederspiegelt. Ein Anstieg der Polymerisierungsrate der Mikrotubuli kann über die Dichtezunahme von sogenannten EB3-Kometen veranschaulicht werden. Die Arbeitsgruppe um Komorova et al. (2009) konnte sogar mithilfe von Live-Cell-Imaging das Wachstum von Mikrotubuli anhand der EB3-Kometen im Zeitraffer darstellen. Mit unserer konventionelleren Methodik mittels Konfokalmikroskopie und quantitativer Auswertung ließ sich der Einfluss von Reelin auf die Dynamik am Plus-Ende von Mikrotubuli jedoch ebenfalls reproduzierbar untersuchen. An Primärzellkulturen, die entweder im Mock-behandelten oder im Reelin angereicherten Medium kultiviert wurden und anschließend per α -EB3-Antikörper immunzytochemisch gefärbt wurden, konnte der Effekt des Reelins auf die Mikrotubuli dargestellt werden. Hierzu wurden insgesamt 238 Neurone, von denen 197 aus dem Cortex- und 41 aus dem Hippocampus stammten, unter dem Konfokalmikroskop untersucht.

Die Wirkung von Reelin steigerte die EB3-Kometen-Dichte am Plus-Ende der Mikrotubuli. Dieser positive Effekt ließ sich vor allem in den Hauptdendriten beobachten. Interessanterweise blieben unter Reelinstimulation die EB3-Expressionslevel sowohl im Wildtyp als auch in der Reeler-Maus auf einem vergleichbaren Niveau. Untersuchungen per Western-Blot konnten keinen quantitativen Unterschied im End-Binding-Protein3-Gehalt ausmachen (Meseke et al., 2013a), sodass man in der Zusammenschau annehmen könnte, dass das Reelinsignal unter anderem zu einer Umverteilung bzw. Konzentrierung der Mikrotubuli-Polymerisierung auf den Hauptdendriten führt. Ferner könnte das Reelinsignal möglicherweise Formationen von größeren Konglomeraten von +TIPs induzieren, inklusive des EB3. Erst durch diese erhöhte Konglomeratbildung an den Plussich vorstellen, werden die EB3-Kometen durch Enden. könnte man die Konfokalmikroskopie gegen EB3 immunzytochemisch gefärbter Neurone in einem bestimmten Grenzwertbereich detektierbar. Dies war auch der Grund für die Heraufsetzung des Grenzwertes auf 100-255. So konnten zum einen Artefakte minimiert und zum anderen der Effekt des Reelins hervorgehoben werden.

Die konzentrierte Anreicherung von EB3 hat einen stabilisierenden Effekt und verhindert den Mikrotubuluszerfall (Komorova et al., 2009). Folglich würde eine erleichterte und somit beschleunigte Polymerisierung an den Plus-Enden eine plausible Konsequenz der Reelinwirkung darstellen. Vereinfacht könnte man folgende Hypothese formulieren: Das Neuron empfängt während der Durchwanderung der Corticalplatte das Reelinsignal, vor allem über aus der Marginalzone (MZ) stammendes Reelin. Nach Bindung an seine Rezeptoren kommt es zur Stabilisierung von Mikrotubuli-Zytoskelettanteilen, die Richtung MZ ausgerichtet sind, während MZ-ferne Mikrotubuli weniger stabil sind und somit schneller zerfallen. Intrazelluläre Druck- und Zugkräfte (Rakic, 1996, Förster, 2014) führen zur Umlagerung des Golgi-Apparates in den Fortsatz (Meseke et al., 2013b), der sich schließlich als führender Fortsatz (später Apikaldendrit) auszeichnet (Horton et al., 2005). Hierdurch schafft das extrazelluläre Reelinsignal die Voraussetzungen für die weitere Entwicklung des Neurons, indem es intrazellulär sowohl Zytoskelettelemente, als auch die Organellen, hier am Beispiel des Golgi-Apparates umverlagert und in Richtung des Apikaldendriten konzentriert. Somit dürfte beispielsweise die Versorgung eines äußerst aktiven Wachstumskegels am Apikaldendriten über verkürzte Wege für Vesikeltransporte optimierter ablaufen.

Nichtsdestotrotz sind die Möglichkeiten mittels Konfokalmikroskopie und quantitativer Auswertung begrenzt. Ein Problem zum Beispiel stellte die Beleuchtungszeit dar. Um möglichst die Objektträger unter dem Mikroskop so kurz wie möglich zu beleuchten, wurde die Suche nach transfizierten Zellen zeitlich begrenzt. Dieses wiederum hatte zur Folge, dass nicht auf jedem Objektträger in der Kürze der Zeit passende Zellen gefunden wurden und somit sehr viele Objektträger für eine ausreichend große Anzahl von Zellen angefertigt werden mussten. Letztendlich kann die vergleichende Betrachtung der Zellkerne und die Intensität der Blaufärbung (DAPI) des Zellkerns eine Orientierung über die Beleuchtungszeit geben. Die Abbildungen im Ergebnisteil zeigen jeweils ähnliche Intensitäten der Zellkernfärbungen auf und sollen das Archiv der aufgenommen Neurone repräsentativ darstellen.

Unsere Methodik bewies sich als zuverlässig, da sich die Ergebnisse, die einen Anstieg der EB3-Kometen-Dynamik am Plus-Ende von Mikrotubuli aufzeigten, wie oben zu sehen ist, in jedem Ansatz reproduzieren ließen. Um zukünftig genauere Aussagen über das EB3-Verhalten am Plus-Ende von Mikrotubuli treffen zu können, bieten voraussichtlich Live-Cell-Imaging Untersuchungen ein größeres Potential. Sie könnten die Dynamik von Anund Abdiffundieren an das Mikrotubuli-Plus-Ende besser darstellen und ließen sich bestenfalls sogar zeitlich mit dem Reelinsignal koppeln. Zusätzlich könnte man versuchen Downstream-Elemente der Reelinsignalkaskade auszuschalten um mögliche Unterschiede auszumachen. Die Reelinsignalkaskade wurde auch im Rahmen dieser Dissertation untersucht. Anhand der etablierten Methodik untersuchten wir die Effekte von Reelin nach Transfektion von Neuronen mit dominant-negativen Plasmiden, die für die Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 kodierten.

4.4 Das Reelinsignal wird über die Rho-GTPasen cdc42 & Rac1 vermittelt

Das extrazelluläre Reelinsignal kann eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden in Gang setzen. Diese durch Reelin aktivierten Signalwege spielen bei essentiellen Vorgängen während der Migration der Neurone eine große Rolle. So wird der Umbau des Zytoskeletts, der Vesikeltransport, die Polarisierung der Zelle und die Zellmigration koordiniert. Die Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 sind an der Vermittlung dieser Signale beteiligt (Leemhuis et al. 2010, Heasman, S.J. und Ridley, A.J., 2008). Die Frage, ob die zuvor gemachte Beobachtung, nämlich der positive Effekt des Reelins auf die Polymerisierung am Plus-Ende von Mikrotubuli, über die Achse Lipoproteinrezeptoren (VLDLR und ApoER2), Dab1- Adapterprotein und anschließend cdc42 oder Rac1 führt, beschäftigte mich im weiteren Verlauf dieser Dissertation.

Durch Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien erlangen migrierende Neurone die Möglichkeit ihr Mikroumfeld quasi zu ertasten. Sie können Zell-Zell- Interaktionen eingehen oder aber auf extrazelluläre Signale über die Rezeptoren an der Oberfläche reagieren. Die Ergebnisse aus 3.2. und 3.3. zeigen, dass sowohl cdc42 als auch Rac1 an der Koordination der EB3-Dynamik am Plus-Ende von Mikrotubuli beteiligt sind, da bei Transfektion mit einer dominant-negativen Form der Rho-GTPasen eine signifikante Abnahme der messbaren EB3-Kometen zu verzeichnen ist. Dass hierbei auch Reelin vermittelte Signalwege betroffen sind, zeigt sich dadurch, dass sowohl bei dncdc42-Transfektion, als auch bei dnRac1-Transfektion nach Reelinstimulation zwar ein deutlicher (drei- bis sechsfacher) Anstieg der EB3-Kometen nachweisbar war, dennoch die Zunahme der Dynamik am Plus-Ende der Mikrotubuli vergleichsweise gering ausfiel und das Niveau der EB3-Kometen in den Kontrollneuronen des Reelin-Ansätzen nicht erreicht wurde (RTF dncdc42: 2,36% Pixel/Fläche, RK dncdc42: 17.49% Pixel/Fläche, p=0,014, RTF dnRac1: 1,79%, RK dnRac1: 8,43%, p=0,003). Zum einen zeigt dies, dass das Fehlen der physiologischen cdc42-Funktion nicht durch Rac1 ersetzt werden kann und vice versa. Zum anderen zeigt es die Wichtigkeit der Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 für die Wirkung des Reelin auf die Mikrotubuli. Es ist demnach anzunehmen, dass die Effekte des Reelin auf das Mikrotubuli-System hauptsächlich über die Rho-GTPasen cdc-42 und Rac1 vermittelt werden. Unterstützend zu dieser Annahme zeigte die Arbeit von Meseke et al. (2013b), dass die Translokation des Golgi-Apparates von dem Reelinsignal und der Verarbeitung dieses Signals über die Rho-GTPasen cdc42 und Rac1 abhängig ist. Die

Translokation findet dabei in den Fortsatz statt, der zuerst mit der Reelinquelle Kontakt hat (Meseke et al.,2013b).

4.5 Bezüge zur Klinik; neurodegenerative & onkologische Erkrankungen

In der Fachliteratur sind Zusammenhänge zwischen Fehlmigration während der Hirnentwicklung und neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der Alzheimer Demenz beschrieben.

Der klassische Morbus Alzheimer stellt mit etwa 60% den größten Anteil aller Demenzerkrankungen dar. Er tritt vor allem im höheren Lebensalter auf und charakterisiert sich durch den Untergang von Neuronen. Pathognomonisch sind dabei die sogenannten senilen Plaques in der extrazellulären Matrix, sowie die intrazellulären Neurofibrillenablagerungen. Die senilen Plaques entstehen infolge einer fehlerhaften Abspaltung des
ß-Amyloids vom
ß-Amyloid-Precursor-Protein (APP) durch die Gamma-Sekretase. Die Akkumulation von ß-Amyloid stört die Funktion von AMPA- und NMDA-Rezeptoren und konsekutiv die Langzeitpotenzierungskapazität des Gehirns. Unter Langzeitpotenzierung versteht man langandauernde Verstärkungen von synaptischen Verschaltungen, die wichtig sind für eine Reihe von kognitiven Prozessen wie dem Lernen, dem Ausführen komplexer Handlungen und dem Abrufen von Gedächtnisinhalten. Die Langzeitpotenzierung findet durch den Prozess der Konsolidierung statt, der auch als synaptische Plastizität bezeichnet wird. Überschreiten die senilen Plaques ein bestimmtes Ausmaß, können die AMPA- und NMDA-Rezeptoren ihren Funktionen nicht mehr nachkommen und die synaptischen Verbindungen gehen zu Grunde. Durakoglugil et al. (2009) konnten allerdings in Mausmodellen zeigen, dass Reelin gegen den frühzeitigen Verlust der Langzeitpotenzierung durch eine Steigerung der NMDA-Rezeptor-Expression entgegenwirken kann.

Ähnlich positive Effekte gegen den Krankheitsprogress bewirkte Reelin auch bezüglich der Neurofibrillenablagerungen (NFT). Die NFTs bestehen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein, weswegen die Alzheimer-Erkrankung auch Tauopathie genannt wird. Das Tau-Protein fungiert intrazellulär als Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) und stabilisiert mit weiteren MAPs das Mikrotubuli-Gerüst. Wird das Tau-Protein hyperphosphoryliert, dissoziiert es und die Mikrotubuli zerfallen. Passiert dies in größerem, unkontrolliertem Ausmaß wie bei M. Alzheimer, kommt es zum Absterben der betroffenen Neurone. Reelin hingegen inhibiert die Hyperphosphorylierung vom Tau-Protein (Deutsch et al., 2006). Ob Reelin eines Tages als Prophylaxe oder Therapie der Alzheimer Demenz eingesetzt werden kann bleibt offen und ist zumindest nicht abwegig.

In der Onkologie, spielt das Thema der Zellwanderung ebenfalls eine wichtige Rolle. Beim Versuch das Tumorverhalten zu entschlüsseln ist neben der Tumorgenese und Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten auch die Motilität der Zellen ein Aspekt. Beispielsweise bilden einige extrakranielle, maligne Tumoren wie das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Maligne Melanom oder das Mammakarzinom Hirnmetastasen, indem sich Absiedler vom Primärtumor bilden. Diese Zellen können theoretisch über den Blutweg oder über die Lymphe in alle Bereiche des Körpers gelangen. Typischerweise aber reichern sie sich unter anderem bevorzugt im Großhirn an. Doch wie schafft es zum Beispiel eine Brusttumorzelle, die aus einem anderen Mikroumfeld entstammt, sich vom Primärtumor zu lösen und sich dann in dem Geflecht der Nervenzellen des Großhirns festzusetzen und zu überleben?

Studien zeigen, dass nach 24h lediglich 0,1% der Tumorzellen, die in die Blutbahn gelangten, noch vital sind und von diesen Tumorzellen statistisch gesehen gerade einmal 1 von 10.000 fähig ist Metastasen zu bilden (Fidler, 2003). Nach der sogenannten "Seed and Soil"- Theorie aus dem Jahre 1889 vom englischen Chirurgen Stephen Paget, die heute noch anerkannt ist, kommt es bei der Metastasierung neben der Krebszelle (Seed), die sich vom Primärtumor löst und in die Blutbahn eindringt, auch auf das Mikroumfeld des Empfängergewebes (Soil) an (Paget, 1889). Die Metastasierung ist also kein Zufallsprodukt, sondern vielmehr das Ergebnis einer Interaktion zwischen der Tumorzelle und dem Mikroumfeld des Zielorgans.

Interessanterweise wird Reelin nun nicht nur im Gehirn, sondern auch in weiteren Geweben wie zum Beispiel dem Pankreas, dem Ösophagus und Magen oder der Brustdrüse exprimiert. Es existieren auch bereits Hinweise auf eine Wechselbeziehung zwischen Reelin und Tumorzellen. Es konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass bei Frauen mit Mammakarzinom oder bei Patienten mit Lungenkarzinom bei denen die Reelinexpression herunterreguliert ist, dieses mit einem schlechteren Outcome sowie positivem Lymphknotenbefall korreliert (Stein et al., 2010, Castellano et al., 2016). Bei Magen- und Pankreas-Karzinomen wurden ebenfalls Zusammenhänge gefunden. Hier führt eine epigenetische Herunterregulierung der Reelinexpression ebenfalls zu einem schlechteren Outcome des Tumorleidens (Sato et al., 2006, Dohi et al., 2010). Allen drei

Beispielen liegt zu Grunde, dass über erniedrigte Reelinspiegel die Tumorzellen ein höheres Migrationspotential aufzeigen. Hier könnten womöglich Parallelen aufgezeigt werden zum Migrationsmodell, das anhand der neuronalen Zellwanderung zunehmend besser verstanden wird.

Man könnte sich vorstellen, dass die Tumorzellen, die es schaffen die Reelinspiegel in ihrem Mikroumfeld herunter zu regulieren und neuronenähnliche Zelleigenschaften ausbilden, das Potential besitzen, Metastasen im Gehirn zu setzen. Hierfür müssten sie sich zunächst vom Primärtumor lösen. Dies könnte möglicherweise unter Reelinmangel erleichtert ablaufen. Damit sich eine Tumorzelle lösen kann, ist sie gezwungen die sogenannte Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) zu vollziehen (Chambers et al., 2002, Thiery, 2009,). Dies bedeutet, dass die Tumorzelle ihre Zell-Zell-Verbindungen trennt, um sich aus dem epithelial organisierten Primärtumorkonglomerat zu lösen. Anschließend nimmt sie Eigenschaften an, die an eine mesenchymale Zelle erinnern. Dazu gehört vor allem das erhöhte Migrationspotential. Intrazellulär laufen hierbei eine Reihe von essentiellen Signalkaskaden ab, von denen der PI3-Kinase-Signalweg eine zentrale Rolle einnimmt (Larue und Bellacosa, 2005). Dieser Signalweg, über den auch das Reelinsignal vermittelt wird. könnte ein wichtige Verknüpfung zwischen Tumorzellmotilität und Reelinexpression darstellen und dafür sorgen, dass durch Veränderungen am Reelinspiegel, hervorgerufen durch Tumorzellen mit besonderen Eigenschaften, das Metastasierungspotential steigt.

Nachdem dann die Tumorzellen über den Blutweg im Gehirn angekommen sind, könnten sie sich aufgrund ihrer neuronenähnlichen Eigenschaften (zum Beispiel die Fähigkeit, das Reelinsignal zu erkennen und umzusetzen) im Hirngewebe ausbreiten und schließlich Zell-Zell-Verbindungen ausbilden. Die Tumorzellen vom HER2+ Brustkrebs zeigen, dass durch eine Koexpression von Reelin und HER2+ der Signalaustausch im zerebralen Mikroumfeld erleichtert abläuft (Neman et al., 2014). Dieses könnte eines der Gründe darstellen, wodurch die Tumorzellen es schaffen in dem zunächst fremden Mikroumfeld zu überleben. Andersherum könnte man sich vorstellen, dass normale Reelinspiegel womöglich die Tumorzellen über den bekannten Signalweg am ApoE2-Rezeptor (-> Dab-1-> PI3K->PKB->LIMK-1-> Phosphorylierung von n-cofilin) daran hindern könnten ein erhöhtes Migrationspotential auszubilden. Im Prinzip würde Reelin über die Stabilisierung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts wie ein Stoppsignal wirken. Ähnlich wie am Ende der neuronalen Migration. Diese und weitere Zusammenhänge von Reelin und

Tumorverhalten machen Reelin zu einem vielversprechenden Forschungsziel und potentiellem Therapieansatz in der Tumorbehandlung. Gerade vor dem Hintergrund, dass 90% der Krebspatienten nicht durch den Primärtumor, sondern durch die Metastasierung versterben, stellt eine mögliche Beeinflussung des Metastasierungspotentials von Tumorzellen einen immens wichtigen Ansatzpunkt in einer modernen multimodalen Tumortherapie dar. Ein mögliches Target könnte die Unterdrückung der EMT darstellen.

5 Zusammenfassung / Summary

Reelin beschleunigt die Polymerisierung der Mikrotubuli

Reelin, ein extrazelluläres Matrixprotein, kontrolliert über Modulationen am Zytoskelett die radiale Migration von kortikalen Neuronen im sich entwickelnden Gehirn. Bisher konnten stabilisierende Effekte auf das Aktin-Zytoskelett beschrieben werden, während die Wirkung auf das Mikrotubuli-Zytoskelett weitgehend unbekannt blieb.

Nach Ansetzen von Primärzellkulturen wurden in dieser Dissertation per Immunzytochemie und konfokaler Lasermikroskopie spezifisch EB3-Proteine angefärbt und untersucht. EB3-Proteine sind neuronenspezifische, sogenannte Plus-End-Tracking Proteine, die Auf- und Abbauprozesse an den Plus-Enden von Mikrotubuli darstellen können. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass Reelin die Plus-Enden-Dynamik an wachsenden Mikrotubuli in migrierenden Neuronen steigert, um möglicherweise über diese dynamische Organisation der Mikrotubuli zur richtigen Positionierung der Neurone im sich entwickelnden Isocortex beizutragen.

Die intrazelluläre Signalkaskade nach Reelin-Stimulation ist bisher nur unvollständig verstanden. Involviert sind unter anderem der Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2), der Very Low Density Lipoprotein Rezeptor (vldlR), sowie das intrazelluläre Protein Disabled1 (Dab1), welches über nicht-rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen der Fyn-und SRC-Familie aktiviert werden kann. Im weiteren Downstream-Mechanismus sind eine Reihe von Rho-GTPasen eingebunden von denen cdc42 und Rac1 als Vermittler des Reelin-Signals bereits bekannt sind. Um den Zusammenhang zwischen cdc42 / Rac1 und der Mikrotubuli-Dynamik zu untersuchen, wurden Plasmide, die für dominant-negatives cdc42 oder Rac1 codieren, genutzt. Wenngleich der Effekt des Reelin-Signals abgeschwächt wurde, konnte gezeigt werde, dass die Dynamik an den Plus-Ende weiter beeinflusst wird. Zuletzt wird in dieser Dissertation das Wissen über neuronales Migrationsverhalten zusammengefasst und Metastasierungspotential von Krebszellen untersucht.

Reelin increases microtubule assembly

The extracellular matrix protein reelin controls radial migration by modulation of the cytoskeleton. A stabilizing effect on the actin cytoskeleton has been described earlier, while an influence on microtubules remains unclear.

In this doctoral thesis EB3 immunostaining in primary neuronal cultures was performed and confocal laser scanning microscopy was used to detect microtubule growth. EB3 is a plus-end-tracking protein that represents activity at the plus ends of microtubules. The results show that reelin increases microtubule assembly by promoting EB3-dynamics at the plus ends of processes of migrating neurons. By influencing the neuronal microtubule system reelin could contribute to the correct positioning of the neurons in the developing isocortex.

Intracellular signal cascades of reelin consist of Apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2), very low-density lipoprotein receptor (vldlr) and Disabled1 (Dab1), that can be activated by tyrosine kinases like Fyn and SRC. Further downstream proteins are rho-GTPases of whom cdc42 and Rac1 are already known as transmitter of the reelin signal. Exploring the context of cdc42 / Rac1 to the microtubule dynamics plasmids encoding a dominant negative form of cdc42 or Rac1 were used. Although the effect of reelin on microtubule plus end activity decreased, there was still a significant difference between reelin stimulation and controls. Lastly my goal was to summarize knowledge of the different aspects of the neuronal migration and to transfer this knowledge to the migrational behavior of cancer cells and their ability to form metastases.

6 Abkürzungsverzeichnis

αPix	PAK-Interactive-Exchange-Factor
AMPA-Rezeptor	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-
	Isoxazolepropionic-Acid-Receptor
ApoER2	Apolipoprotein-E-Rezeptor 2
APP	ß-Amyloid-Precursor-Protein
Cdc42	Cell-Division-Control Protein 42
CLIP-170	Cytoplasmatic-Linker Protein 170
CNR	Cannabinoid-Rezeptor
Dab-1	Disabled -1
EB	End-Binding-Protein
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
GAP	GTPase-Activating-Protein
GDI	Guanine-Nucleotide-Dissociation-
	Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	GTPasen sind kleine Proteine, die
	durch die alternierende Bindung von
	GDP oder GTP als molekulare
	"Schalter" in Signaltransduktionsketten
	fungieren
HER2	Human-Epidermal-Growth-Factor-
	Receptor 2
IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein
LIMK-1	LIM-Kinase-1
MAP	Mikrotubuli-Associated-Protein
MK	Mock-Kontrollneuron, ohne Plasmid
MTF	Mock-Transfektionen; Neurone, die
	Plasmide aufgenommen haben und aus
	dem Mockmedium stammen
МТОС	Mikrotubuli-Organizing-Centre

NFT	Neurofibrillenablagerungen		
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat – Rezeptor		
PAK	P21-Activated-Kinase		
	(ein Cdc42/Rac Target)		
PI3K	Phosphatidylinositid-3-Kinase		
PKB/Akt	Proteinkinase B		
Rac 1	Ras-related C3 botulinum toxin		
	substrat 1		
Rho	Ras-Homolog		
RK	Reelin-Kontrollneuron, ohne Plasmid		
ROI	Region-of-Interest		
RTF	Reelin-Transfektionen; Neurone, die		
	Plasmide aufgenommen haben und		
	zusätzlich mit Reelin stimuliert wurden		
+TIP	Plus-End-Tracking-Protein		
VLDLR	Very-Low-Density-Lipoprotein-		
	Rezeptor		

7 Literaturverzeichnis

AKHMANOVA, A. & STEINMETZ, M. O. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 309-22.

ALCÁNTARA, S., RUIZ, M., D'ARCANGELO, G., EZAN, F., DE LECEA, L., CURRAN, T., SOTELO, C. & SORIANO, E. 1998. Regional and Cellular Patterns of reelin mRNA Expression in the Forebrain of the Developing and Adult Mouse. *The Journal of Neuroscience*, 18, 7779-7799.

ANTON, E. S., CAMERON, R. S. & RAKIC, P. 1996. Role of Neuron-Glial Junction Domain Proteins in the Maintenance and Termination of Neuronal Migration across the Embryonic Cerebral Wall. *The Journal of Neuroscience*, 16, 2283-2293.

ARNAUD, L., BALLIF, B. A. & COOPER, J. A. 2003. Regulation of Protein Tyrosine Kinase Signaling by Substrate Degradation during Brain Development. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 9293-9302.

ASSADI, A. H., ZHANG, G., BEFFERT, U., MCNEIL, R. S., RENFRO, A. L., NIU, S., QUATTROCCHI, C. C., ANTALFFY, B. A., SHELDON, M., ARMSTRONG, D. D., WYNSHAW-BORIS, A., HERZ, J., D'ARCANGELO, G. & CLARK, G. D. 2003. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet*, 35, 270-6.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMANN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., 1992. Current Protocolls. In: John Wiley and Sons (Hrsg.) Molecular Biology. New York.

AYALA, R., SHU, T. & TSAI, L. H. 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, 128, 29-43.

BARNES, A. P. & POLLEUX, F. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci*, 32, 347-81.

BOCK, H. H. & HERZ, J. 2003. Reelin Activates Src Family Tyrosine Kinases in Neurons. *Current Biology*, 13, 18-26.

BOCK, H. H., JOSSIN, Y., LIU, P., FÖRSTER, E., MAY, P., GOFFINET, A. M. & HERZ, J. 2003. Phosphatidylinositol 3-Kinase Interacts with the Adaptor Protein Dab1 in Response to Reelin Signaling and Is Required for Normal Cortical Lamination. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38772-38779.

CAYRE, M., CANOLL, P. & GOLDMAN, J. E. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 88, 41-63.

CASTELLANO, E. MOLINA-ARCAS, M., KRYGOWSKA, A. A., EAST, P., WARNE, P., NICOL, A. DOWNWARD, J., 2016. RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. Nature communications,(7:11245).

CHAI, X., FORSTER, E., ZHAO, S., BOCK, H. H. & FROTSCHER, M. 2009. Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J Neurosci*, 29, 288-99.

CHAMBERS, A. F., GROOM, A. C. & MACDONALD, I. C. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2, 563-72.

CHEN, F., MA, L., PARRINI, M. C., MAO, X., LOPEZ, M., WU, C., MARKS, P. W., DAVIDSON, L., KWIATKOWSKI, D. J., KIRCHHAUSEN, T., ORKIN, S. H., ROSEN, F. S., MAYER, B. J., KIRSCHNER, M. W. & ALT, F. W. 2000. Cdc42 is required for PIP2-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Current Biology*, 10, 758-765.

CHEN, L., LIAO, G., WACLAW, R. R., BURNS, K. A., LINQUIST, D., CAMPBELL, K., ZHENG, Y. & KUAN, C. Y. 2007. Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci*, 27, 3884-93.

COOPER, J. A. 2008. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci*, 31, 113-9.

CURRAN, T. & D'ARCANGELO, G. 1998. Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res Brain Res Rev*, 26, 285-94.

D'ARCANGELO, G., NAKAJIMA, K., MIYATA, T., OGAWA, M., MIKOSHIBA, K. & CURRAN, T. 1997. Reelin Is a Secreted Glykoprotein Recognized by the CR-50 Monoclonal Antibody. *The Journal of Neuroscience*, 17, 23-31.

DAZZO, E., FANCIULLI, M., SERIOLI, E., MINERVINI, G., PULITANO, P., BINELLI, S., DI BONAVENTURA, C., LUISI, C., PASINI, E., STRIANO, S., STRIANO, P., COPPOLA, G., CHIAVEGATO, A., RADOVIC, S., SPADOTTO, A., UZZAU, S., LA NEVE, A., GIALLONARDO, A. T., MECARELLI, O., TOSATTO, S. C., OTTMAN, R., MICHELUCCI, R. & NOBILE, C. 2015. Heterozygous reelin mutations cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy. *Am J Hum Genet*, 96, 992-1000.

DE ANDA, F. C., MELETIS, K., GE, X., REI, D. & TSAI, L. H. 2010. Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex. *J Neurosci*, 30, 10391-406.

DE GROOT, C. O., JELESAROV, I., DAMBERGER, F. F., BJELIC, S., SCHARER, M. A., BHAVESH, N. S., GRIGORIEV, I., BUEY, R. M., WUTHRICH, K., CAPITANI, G., AKHMANOVA, A. & STEINMETZ, M. O. 2010. Molecular insights into mammalian end-binding protein heterodimerization. *J Biol Chem*, 285, 5802-14.

DEUTSCH, S. I., ROSSE, R. B. & DEUTSCH, L. H. 2006. Faulty regulation of tau phosphorylation by the reelin signal transduction pathway is a potential mechanism of pathogenesis and therapeutic target in Alzheimer's disease. *Eur Neuropsychopharmacol*, 16, 547-51.

DOERKS, T., COPLEY, R. R., SCHULTZ, J., PONTING, C. P. & BORK, P. 2002. Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res*, 12, 47-56.

DOHI, O., TAKADA, H., WAKABAYASHI, N., YASUI, K., SAKAKURA, C., MITSUFUJI, S., NAITO, Y., TANIWAKI, M. & YOSHIKAWA, T. 2010. Epigenetic silencing of RELN in gastric cancer. *Int J Oncol*, 36, 85-92.

DRAGO, A., CRISAFULLI, C., SIDOTI, A., CALABRO, M. & SERRETTI, A. 2016. The microtubule-associated molecular pathways may be genetically disrupted in patients with Bipolar Disorder. Insights from the molecular cascades. *J Affect Disord*, 190, 429-38.

DRAKEW, A., FROTSCHER, M., DELLER, T., OGAWA, M. & HEIMRICH, B. 1998. Developmental distribution of a Reeler Gen-Related Antigen in the rat hippocampal formation visualized by CR-50 immunocytochemistry. *Neuroscience* 82, 1079-1086.

DURAKOGLUGIL, M. S., CHEN, Y., WHITE, C. L., KAVALALI, E. T. & HERZ, J. 2009. Reelin signaling antagonizes *B*-amyloid at the synapse. *PNAS*, 106, 15938-15943.

FENTON, E. Y., FOURNIER, N. M., LUSSIER, A. L., ROMAY-TALLON, R., CARUNCHO, H. J. & KALYNCHUK, L. E. 2015. Imipramine protects against the deleterious effects of chronic corticosterone on depression-like behavior, hippocampal reelin expression, and neuronal maturation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 60, 52-9.

FIDLER, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-8.

FOLSOM, T. D. & FATEMI, S. H. 2013. The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, 68, 122-35.

FÖRSTER, E. 2014. Reelin, neuronal polarity and process orientation of cortical neurons. *Neuroscience*, 269, 102-11.

FÖRSTER, E., BOCK, H. H., HERZ, J., CHAI, X., FROTSCHER, M. & ZHAO, S. 2010. Emerging topics in Reelin function. *Eur J Neurosci*, 31, 1511-8.

FÖRSTER, E., KALTSCHMIDT, C., DENG, J., CREMER, H., DELLER, T. & FROTSCHER, M. 1998. Lamina-specific cell adhesion on living slices of hippocampus. *Development*, 125, 3399-3410.

FÖRSTER, E., TIELSCH, A., SAUM, B., WEISS, K. H., JOHANSSEN, C., GRAUS-PORTA, D., MULLER, U. & FROTSCHER, M. 2002. Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13178-83.

FRANCO, S. J., MARTINEZ-GARAY, I., GIL-SANZ, C., HARKINS-PERRY, S. R. & MULLER, U. 2011. Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron*, 69, 482-97.

FROTSCHER, M. 1998. Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 570-575.

FUKATA, M., WATANABE, T., NORITAKE, J., NAKAGAWA, M., YAMAGA, M., KURODA, S., MATSUURA, Y., IWAMATSU, A., PEREZ, F. & KAIBUCHI, K. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*, 109, 873-85.

GALJART, N. 2010. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol*, 20, R528-37.

GAO, W.-Q. & HATTEN, M. E. 1993. Neuronal Differentiation Rescued by Implantation of Weaver Granule Cell Precursors into Wild-Type Cerebellar Cortex. *Science*, 260.

GAO, W.-Q. & HATTEN, M. E. 1994. Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development*, 120, 1059-1070.

GARVALOV, B. K., FLYNN, K. C., NEUKIRCHEN, D., MEYN, L., TEUSCH, N., WU, X., BRAKEBUSCH, C., BAMBURG, J. R. & BRADKE, F. 2007. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci*, 27, 13117-29.

GESCHWIND, D. H. & RAKIC, P. 2013. Cortical evolution: judge the brain by its cover. *Neuron*, 80, 633-47.

GLEESON, J. G. 2001. Neuronal Migration Disorders. *MRDD Research Reviews*, 7, 167-171.

GLEESON, J. G. & WALSH, C. A. 2000. Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neuroscience*, 23, 352-359.

GOLDSTEIN, L. S. & YANG, Z. 2000. Microtubule-Based Transport Systems in Neurons: The Roles of Kinesins and Dyneins. *Annu Rev Neuroscience*, 23, 39-71.

GONZALEZ-BILLAULT, C., DEL RIO, J. A., URENA, J. M., JIMENEZ-MATEOS, E. M., BARALLOBRE, M. J., PASCUAL, M., PUJADAS, L., SIMO, S., TORRE, A. L., GAVIN, R., WANDOSELL, F., SORIANO, E. & AVILA, J. 2005. A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex*, 15, 1134-45.

GOVEK, E.-E., NEWEY, S. E. & VAN AELST, L. 2005. The Role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development*, 19, 1-49.

GUARINO, M., RUBINO, B. & BALLABIO, G. 2007. The role of epithelialmesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*, 39, 305-18.

GUPTON, S. L. & GERTLER, F. B. 2007. Filopodia: The Fingers that do the Walking. *Science Signaling*, 400.

GUZIK, B. W. & GOLDSTEIN, L. S. 2004. Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 443-50.

HACK, I., HELLWIG, S., JUNGHANS, D., BRUNNE, B., BOCK, H. H., ZHAO, S. & FROTSCHER, M. 2007. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development*, 134, 3883-91.

HAKOSHIMA, T. 2003. Structural Basis of the Rho GTPase Signaling. *Journal of Biochemistry*, 134, 327-331.

HATTEN, M. E. 1999. Central Nervous System Neuronal Migration. Annu Rev Neuroscience, 22, 511-539.

HAYASHI, I., WILDE, A., MAL, T. K. & IKURA, M. 2005. Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150Glued complex. *Mol Cell*, 19, 449-60.

HEASMAN, S. J. & RIDLEY, A. J. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 690-701.

HEHNLY, H., XU, W., CHEN, J. L. & STAMNES, M. 2010. Cdc42 regulates microtubule-dependent Golgi positioning. *Traffic*, 11, 1067-78.

HERZ, J. & BOCK, H. H. 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. Annu Rev Biochem, 71, 405-34.

HIESBERGER, T., TROMMSDORFF, M., HOWELL, B. W., GOFFINET, A., MUMBY, M. C., COOPER, J. A. & HERZ, J. 1999. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, 24, 481-9.

HIPPENMEYER, S. 2014. Molecular pathways controlling the sequential steps of cortical projection neuron migration. *Adv Exp Med Biol*, 800, 1-24.

HORTON, A. C., RACZ, B., MONSON, E. E., LIN, A. L., WEINBERG, R. J. & EHLERS, M. D. 2005. Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron*, 48, 757-71.

HOWELL, B. W., HAWKES, R., SORIANO, P. & COOPER, J. A. 1997. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*, 389, 733-739.

HOWELL, B. W., HERRICK, T. M. & COOPER, J. A. 1999. Reelin-induced tyrosine phosphorylation of Disabled 1 during neuronal positioning. *Genes & Development*, 13, 643-648.

JACKSON, E. L. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2008. Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. *Cells Tissues Organs*, 188, 212-24.

JOSSIN, Y. & COOPER, J. A. 2011. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat Neurosci*, 14, 697-703.

KAWAUCHI, T. & HOSHINO, M. 2008. Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons. *Dev Neurosci*, 30, 36-46.

KELLY, T. A., KATAGIRI, Y., VARTANIAN, K. B., KUMAR, P., CHEN, II, ROSOFF, W. J., URBACH, J. S. & GELLER, H. M. 2010. Localized alteration of microtubule polymerization in response to guidance cues. *J Neurosci Res*, 88, 3024-33.

KHOLMANSKIKH, S. S., KOELLER, H. B., WYNSHAW-BORIS, A., GOMEZ, T., LETOURNEAU, P. C. & ROSS, M. E. 2006. Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat Neurosci*, 9, 50-7.

KOCHERHANS, S., MADHUSUDAN, A., DOEHNER, J., BREU, K. S., NITSCH, R. M., FRITSCHY, J. M. & KNUESEL, I. 2010. Reduced Reelin expression accelerates amyloidbeta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*, 30, 9228-40.

KOLESKE, A. J. 2003. Do filopodia enable the growth cone to find its way? *Science Signaling*, 183.

KOMAROVA, Y., DE GROOT, C. O., GRIGORIEV, I., GOUVEIA, S. M., MUNTEANU, E. L., SCHOBER, J. M., HONNAPPA, S., BUEY, R. M., HOOGENRAAD, C. C., DOGTEROM, M., BORISY, G. G., STEINMETZ, M. O. & AKHMANOVA, A. 2009. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol*, 184, 691-706.

KOMAROVA, Y., LANSBERGEN, G., GALJART, N., GROSVELD, F., BORISY, G. G. & AKHMANOVA, A. 2005. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol Biol Cell*, 16, 5334-45.

KRIEGSTEIN, A. R. & NOCTOR, S. C. 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci*, 27, 392-9.

KUBO, K., HONDA, T., TOMITA, K., SEKINE, K., ISHII, K., UTO, A., KOBAYASHI, K., TABATA, H. & NAKAJIMA, K. 2010. Ectopic Reelin induces neuronal aggregation with a normal birthdate-dependent "inside-out" alignment in the developing neocortex. *J Neurosci*, 30, 10953-66.

LAKATOSOVA, S. & OSTATNIKOVA, D. 2012. Reelin and its complex involvement in brain development and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1501-4.

LAMBERT DE ROUVROIT, C. & GOFFINET, A. M. 2001. Neuronal migration. *Mechanisms of Development*, 105, 47-56.

LARUE, L. & BELLACOSA, A. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24, 7443-54.

LEEMHUIS, J. & BOCK, H. H. 2011. Reelin modulates cytoskeletal organization by regulating Rho GTPases. *Commun Integr Biol*, 4, 254-7.

LEEMHUIS, J., BOUCHE, E., FROTSCHER, M., HENLE, F., HEIN, L., HERZ, J., MEYER, D. K., PICHLER, M., ROTH, G., SCHWAN, C. & BOCK, H. H. 2010. Reelin signals through apolipoprotein E receptor 2 and Cdc42 to increase growth cone motility and filopodia formation. *J Neurosci*, 30, 14759-72.

LI, M., HUANG, L., GRIGOROIU-SERBANESCU, M., BERGEN, S. E., LANDEN, M., HULTMAN, C. M., FORSTNER, A. J., STROHMAIER, J., HECKER, J., SCHULZE, T. G., MULLER-MYHSOK, B., REIF, A., MITCHELL, P. B., MARTIN, N. G., CICHON, S., NOTHEN, M. M., ALKELAI, A., LERER, B., JAMAIN, S., LEBOYER, M., BELLIVIER, F., ETAIN, B., KAHN, J. P., HENRY, C. & RIETSCHEL, M. 2015. Convergent Lines of Evidence Support LRP8 as a Susceptibility Gene for Psychosis. *Mol Neurobiol.*

LI, W., GUO, X. & XIAO, S. 2015. Evaluating the relationship between reelin gene variants (rs7341475 and rs262355) and schizophrenia: A meta-analysis. *Neurosci Lett*, 609, 42-7.

LUO, L. 2000. RHO GTPases in Neuronal Morphogenesis. Nature Reviews 1, 173-180.

MARIN-PADILLA, M. 1998. Cajal-Retzius cells and the development of neocortex. *Trend Neuroscience*, 21, 64-71.

MATSUKI, T., MATTHEWS, R. T., COOPER, J. A., VAN DER BRUG, M. P., COOKSON, M. R., HARDY, J. A., OLSON, E. C. & HOWELL, B. W. 2010. Reelin and stk25 have opposing roles in neuronal polarization and dendritic Golgi deployment. *Cell*, 143, 826-36.

MCKENNEY, R. J., VERSHININ, M., KUNWAR, A., VALLEE, R. B. & GROSS, S. P. 2010. LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell*, 141, 304-14.

MCMANUS, D. Q. & BREWER, G. J. 1997. Culture of neurons from postmortem rat brain. *Neuroscience Letters*, 224, 193-196.

MESEKE, M., CAVUS, E. & FÖRSTER, E. 2013a. Reelin promotes microtubule dynamics in processes of developing neurons. *Histochem Cell Biol*, 139, 283-97.

MESEKE, M., ROSENBERGER, G. & FÖRSTER, E. 2013b. Reelin and the Cdc42/Rac1 guanine nucleotide exchange factor αPIX/Arhgef6 promote dendritic Golgi translocation in hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 37, 1404-1412.

MOHAN, R. & JOHN, A. 2015. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life*, 67, 395-403.

Moore, K.L., Persaud, T.V.N., Viebahn, C. (2007) Schematische Darstellung der Hirnbläschen. In: Embryologie: Entwicklungsstadien – Frühentwicklung – Organogenese – Klinik. 5. Deutsche Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München, Seite 485.

MOTA, S. I., FERREIRA, I. L., VALERO, J., FERREIRO, E., CARVALHO, A. L., OLIVEIRA, C. R. & REGO, A. C. 2014. Impaired Src signaling and post-synaptic actin polymerization in Alzheimer's disease mice hippocampus--linking NMDA receptors and the reelin pathway. *Exp Neurol*, 261, 698-709.

NEMAN, J., TERMINI, J., WILCZYNSKI, S., VAIDEHI, N., CHOY, C., KOWOLIK, C. M., LI, H., HAMBRECHT, A. C., ROBERTS, E. & JANDIAL, R. 2014. Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *PNAS*, 111, 984-989.

O'ROURKE, N. A., CHENN, A. & MCCONNELL, S. K. 1997. Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development*, 124, 997-1005.

OHSHIMA, T. 2014. Neuronal migration and protein kinases. Front Neurosci, 8, 458.

OLSON, E. C. & WALSH, C. A. 2002. Smooth, rough and upside-down neocortical development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12, 320-327.

PAGET, S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1, 571-573.

POLLEUX, F. & SNIDER, W. 2010. Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a001925.

RAKIC, P. 1971. Guidance of Neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Research*, 33, 471-476.

RAKIC, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*, 145, 61-83.

RAKIC, P. 1978. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgrad Med J*, 54 Suppl 1, 25-40.

RAKIC, P., KNYIHAR-CSILLIK, E. & CSILLIK, B. 1996. Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9218-22.

RAKIC, P. & SIDMAN, R. L. 1972. Weaver Mutant Mouse Cerebellum: Defective Neuronal Migration Secondary to Abnormality of Bergmann Glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 240-244.

REINER, O., KARZBURN, E., KSHIRSAGAR, A. & KAIBUCHI, K. 2015. Regulation of Neuronal Migration, an Emerging Topic in Autism Spectrum Disorders (ASD). *J Neurochem*.

SATO, N., FUKUSHIMA, N., CHANG, R., MATSUBAYASHI, H. & GOGGINS, M. 2006. Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology*, 130, 548-65.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 1,2,3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHRODER, J. M., LARSEN, J., KOMAROVA, Y., AKHMANOVA, A., THORSTELNSSON, R. I., GRIGORIEV, I., MANGUSO, R., CHRISTENSEN, S. T., PEDERSON, S. F., GELMER, S. & PEDERSEN, L. B. 2011. EB1 and EB3 promote cilia biogenesis by several centrosome-related mechanisms. *Journal of Cell Science*, 124, 2539-2551.

SCHUYLER, S. C. & PELLMAN, D. 2001. Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell*, 105, 421-4.

SHAH, B. & PÜSCHEL, A. W. 2013. In vivo functions of small GTPases in neocortical development. *Biological Chemistry*.

SHELDON, M., RICE, D. S., D'ARCANGELO, G., YONESHIMA, H., NAKAJIMA, K., MIKOSHIBA, K., HOWELL, B. W., COOPER, J. A., GOLDOWITZ, D. & CURRAN, T. 1997. Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature*, 389, 730-733.

SHEPPARD, A. M. & PEARLMAN, A. L. 1997. Abnormal Reorganization of Preplate Neurons and Their Associated Extracellular Matrix: An Early Manifestation of Altered Neocortical Development in the Reeler Mutant Mouce. *The Journal of Comparative Neurology*, 378, 173-179.

SLEP, K. C. & VALE, R. D. 2007. Structural Basis of Microtubule Plus End Tracking by XMAP215, CLIP-170 and EB1 *Molecular Cell*, 27, 976-991.

SORIANO, E. & DEL RIO, J. A. 2005. The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron*, 46, 389-94.

STEIN, T., COSIMO, E., YU, X., SMITH, P. R., SIMON, R., COTTRELL, L., PRINGLE, M. A., BELL, A. K., LATTANZIO, L., SAUTER, G., LO NIGRO, C., CROOK, T., MACHESKY, L. M. & GUSTERSON, B. A. 2010. Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *Am J Pathol*, 177, 2323-33.

STEPANOVA, T., SLEMMER, J., HOOGENRAAD, C. C., LANSBERGEN, G., DORTLAND, B., DE ZEEUW, C. I., GROSVELD, F., VAN CAPPELLEN, G., AKHMANOVA, A. & GALJART, N. 2003. Visualization of Microtubule Growth in Cultured Neurons via the Use of EB3-GFP. *The Journal of Neuroscience*, 23, 2655-2664.

SUGIHARA, K., NAKATSUJI, N., NAKAMURA, K., NAKAO, K., HASHIMOTO, R., OTANI, H., SAKAGAMI, H., KONDO, H., NOZAWA, S., AIBA, A. & KATSUKI, M. 1998. Rac1 ist required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene*, 17, 3427-3433.

THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelialmesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.

TIRNAUER, J. S. & BIERER, B. E. 2000. EB1 Proteins Regulate Microtubule Dynamics, Cell Polarity, and Chromosome Stability. *The Journal of Cell Biology*, 149, 761-766.

TISSIR, F. & GOFFINET, A. M. 2003. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci,* 4, 496-505.

TYMANSKYJ, S. R., SCALES, T. M. & GORDON-WEEKS, P. R. 2012. MAP1B enhances microtubule assembly rates and axon extension rates in developing neurons. *Mol Cell Neurosci*, 49, 110-9.

VALIENTE, M. & MARIN, O. 2010. Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 20, 68-78.

WANG, W., EDDY, R. & CONDEELIS, J. 2007. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 7, 429-40.

WESTPHAL, M. & LAMSZUS, K. 2011. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci*, 12, 495-508.

YUAN, Y., CHEN, H., MA, G., CAO, X. & LIU, Z. 2012. Reelin is involved in transforming growth factor-beta1-induced cell migration in esophageal carcinoma cells. *PLoS One*, 7, e31802.

ZHANG, G., ASSADI, A. H., MCNEIL, R. S., BEFFERT, U., WYNSHAW-BORIS, A., HERZ, J., CLARK, G. D. & D'ARCANGELO, G. 2007. The Pafah1b Complex interacts with the Reelin Receptor VLDLR. *PLoS One*, 2.
8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug aus der Datenbank.	
--------------------------------------	--

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hirnbläschen. Modifiziert nach Keith L.
Moore, Embryologie, 5. Auflage, Elsevier, Urban&Fischer, München, S. 485 10
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Migrationsprozesses zur Etablierung der Inside-Out-Schichtung. <i>Modifiziert nach Ayala et al., 2007.</i>
Abbildung 3: Zytoarchitektur des sechsschichtigen Neocortex. <i>Modifiziert nach Originalzeichnung von Cajal.</i>
Abbildung 4: Wachstumsprozess eines Mikrotubulus. Modifiziert nach Galjart, 2010 15
Abbildung 5: Der Reelinsignalweg und seine Zytoskelett-assoziierten Zielproteine. Modifiziert nach Förster, 2014
Abbildung 6: Reelin- und Mock-Stimulation auf 24-Well-Platte
Abbildung 7: Transfektion der Neurone
Abbildung 8a: Trennung der Farbkanäle
Abbildung 8b: Aufhebung der 8 Bit Farbtiefe
Abbildung 9a: Parameter- und Region of Interest-Auswahl bei der Auswertung
Abbildung 9b: Messung der EB3-Kometen im Region of interest
Abbildung 10: "C1-GB8.2_apkd_Rac1_0706TF.lsm", eine Zelle aus der Kategorie Mock- Transfektion
Abbildung 11: EB3-Kometen in E18-Cortexneuronen
Abbildung 12: Vergleich E18 Neuron aus Mock-Medium (links) und nach Stimulation mit
A1

Abbildung	14:	Vergleich	der	EB3-Kometen	von	Kontrollneuronen	aus	dem	dncdc42-
Ansatz									

Abbildung16:VergleichvonCortexneuroneninnerhalbderReelin-GruppenachTransfektion mit dncdc42-Plasmiden.44

Abbildung 17: EB3-Kometen in dnRac1 transfizierten E18er Hippo-campusneuronen. .. 46

Abbildung	18:	Vergleich	von	Hippocampusneurone	n innerhalb	der	Mock-Gruppe	nach
Transfektio	n mi	t dnRac1						47

Abbildung 2	1:	Immunhistochemische	Färbung	von	sagittalen	Cortexschnitten	von	P0
adulter Wildt	yp-	Maus (a) sowie Reeler-	Maus (b).					50

Danksagung

Insbesondere geht mein Dank an Herdis Hamann, Dr. Maurice Meseke und Herrn Professor Eckart Förster. Ohne deren umfassende und stets freundliche Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Ich danke vor allem Frau Hamann und Herrn Dr. Meseke für die Einführung in die Methoden der Immunzytochemie und Immunhistochemie, der Anlage von Primärzellkulturen u.v.m. sowie dem angenehmen Arbeitsumfeld im Institut für Neuroanatomie I. Trotz diverser fachbezogener und nicht-fachbezogener Schwierigkeiten, ermöglichten Sie ein stets fokussiertes und zielorientiertes Arbeiten im Labor. Außerdem geht mein Dank an Herrn PD Dr. Rosenberger, der die Plasmide (dncdc42, dnRac1, aPix_WT und aPix_GEF-) zur Verfügung gestellt hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Eckart Förster bedanken. Nicht nur für die Bereitstellung des Themas und die unermüdlichen Diskussionsrunden bezüglich der Funktion von Reelin mit erkenntnisreichen, neuen Ansätzen, die dieser Dissertation stetig aktuellen Input gaben. Sondern auch dafür, dass er trotz neuer Professur an der Ruhr-Universität Bochum die Betreuung meiner Dissertation weiterhin fortführte und stets an meiner Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich noch einmal bei meinen liebsten Menschen, meiner Familie und meiner Freundin Mina für die mentale Unterstützung bedanken.

Curriculum Vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

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: