

# **Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf**

**Institut für Neuroanatomie**

**Prof. Dr. Gabriele M. Rune**

## **Der ovarielle Phänotyp der Reelermaus**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Camilla Schmahl

aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2012

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.09.2012**

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

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof.Dr. Felicitas Pröls**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof.Dr. Petra Arck**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	5
1.1. Überblick	5
1.2. Geno- und Phänotyp der Reeler-Mutante	6
1.3. Reelin und sein Signalweg	11
1.4. Klinik	16
1.5. Reelin inhibiert die Wanderung der GnRH-Neurone	18
1.6. Kallmann-Syndrom	19
1.7. Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse	20
1.8. Estrogen – zerebral und ovariell	22
1.9. Reelin und Estrogen	25
1.10. Fragestellung und Vorgehensweise	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.2. Methoden	27
2.2.1. Genotypisierung	28
2.2.2. Vaginalabstriche	32
2.2.3. Entnahme der Ovarien	34
2.2.4. Immunhistochemie	34
2.2.5. Western Blot	37
2.2.6. ImageJ	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Vaginalzyklus	45
3.2. Aromataseexpression im Ovar	49
3.2.1. Immunhistochemie	50
3.2.2. Western Blot	57
3.3. Weitere Beobachtungen und Zusammenfassung	60

4. Diskussion	61
4.1. Methodische Überlegungen	61
4.2. Reelin und Reproduktion	63
4.2.1. Reelin und Estrogen	63
4.2.2. Reelin und männliche Infertilität	67
4.2.3. Reelin-Estrogen-Crosstalk	70
4.2.3.1. Reelin – direkte vs. indirekte Wirkung auf das Ovar	70
4.2.3.2. Schnittstellen der Estrogen- und Reelin-Signalkette	75
5. Folgen und Auswirkungen	79
6. Fragen und Projekte	80
7. Relevanz	82
8. Zusammenfassung	83
9. Literaturverzeichnis	84
10. Abkürzungsverzeichnis	102
11. Danksagung	105
12. Eidesstattliche Versicherung	106

# 1. Einleitung

## 1.1 Überblick

Die Reeler-Mutante wird erstmals 1951 beschrieben (Falconer et al., 1951). In der Reeler-Maus ist das Gen für das Protein Reelin mutiert und wird dadurch nicht exprimiert (D’Arcangelo et al., 1995). Die Folge ist unter anderem eine gestörte neuronale Migration (Curran und D’Arcangelo, 1998, Förster et al., 2006) und Synaptogenese im Hippocampus (D’Arcangelo et al., 1999, Herz und Chen, 2006, Bender et al., 2010).

Im Zusammenhang mit den neuronalen Migrationsstörungen in der Reeler-Mutante ist in der Literatur auch eine Migrationsstörung von GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) -Neuronen beschrieben worden (Cariboni et al., 2005). Die Dichte der GnRH-Neurone ist im Hypothalamus der Reeler-Mutante gegenüber dem Wildtyp reduziert, so dass eine Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse vorliegen könnte. GnRH-Neurone regulieren über die Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikelstimulierendem Hormon (FSH) die Reproduktion. Weiterhin wird Reelin in den Ovarien der Maus nachgewiesen (bisher unveröffentlicht), sodass eine direkte Interaktion zwischen Reelin und Estrogen im Ovar immer weiter in den Fokus aktueller Untersuchungen gerät. Die bekannte eingeschränkte Fertilität der Reeler-Mäuse (Caviness et al., 1972) ließe sich möglicherweise auf diesem Hintergrund erklären.

Bisher beobachtete Veränderungen in den Gonaden sind dilatierte und in ihrer Dichte reduzierte Tubuli Seminiferi im männlichen Hoden der Reeler-Mutante (Cariboni et al., 2005), sowie ein verändertes Reproduktionsverhalten der Tiere (Caviness et al., 1972).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Markern der Reproduktion der weiblichen Gonaden der homozygoten Reeler-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Untersucht werden der genitale Zyklus, sowie die ovarielle Aromataseexpression.

## 1.2 Geno- und Phänotyp der Reeler-Mutante

Die Reeler-Maus, die durch eine Deletion des Reelin-Gens kein Reelin exprimiert (Hirotsume et al., 1995, D'Arcangelo, 1996, Curran und D'Arcangelo, 1998).), ist eine natürlich auftretende Mutante. Der Defekt wird autosomal-rezessiv vererbt (D'Arcangelo et al., 1995).

Reelin kontrolliert die Migration von Neuronen in verschiedenen Regionen des Zentralen Nervensystems (ZNS): Neocortex, Hippocampus, Cerebellum und Rückenmark (Frotscher, 2010, D'Arcangelo et al., 1995, Rakic und Caviness, 1995, Rice und Curran, 2001, Tessier und Goffinet, 2003, Soriano und Del Rio, 2005, Förster et al., 2006, Yip et al., 2000, Förster et al., 2010).

Die Abwesenheit von Reelin während der embryonalen Entwicklung führt zu einer gestörten Einwanderung der Neurone in diese Areale und damit zu einer gestörten Schichtung des Cortex (Curran und D'Arcangelo, 1998, Förster et al., 2006). Erste Defekte der zerebralen Struktur sind ab Embryonaltag 14 erkennbar (Curran und D'Arcangelo, 1998).

12 Tage nach der Geburt ist der Phänotyp der Reeler-Mutante erkennbar (Curran und D'Arcangelo, 1998). Typisch ist die schwankende Gangart („to reel“ (englisch) = schwanken, taumeln), eine eingeschränkte Motorik, Ataxie und ein Tremor niedriger Amplitude. Caviness et al. studierten 1972 den Phänotyp der Reeler-Mutante. Die Reeler-Mutante kann sich, wenn sie auf die Seite gelegt wird, nicht ohne fremde Hilfe wieder aufzurichten. Wenn die Tiere an der Taille aufgehängt werden, nehmen die Extremitäten meist eine tonisch flexierte Position gegen den Rumpf ein. Während der ersten Wochen der Entwicklung beobachteten Caviness et al. weiter, dass die Tiere zunehmend entkräftet wirkten und sich allein in einen Platz ihres Käfigs zusammenkauerten. Keine der homozygoten Reeler-Pärchen hat sich während der Beobachtungszeit fortgepflanzt.

Die Reeler-Mutante zeigte desweiteren ein niedrigeres Körpergewicht als der Vergleichswildtyp, sowie eine kürzere Lebensdauer. Nur wenige überlebten die Abstillphase. Neben der niedrigen Überlebensrate tolerierten kaum Tiere anästhesiologische oder operative Prozeduren (Caviness et al., 1972).

Reelin wird im Neocortex und im Hippocampus von den Cajal-Retzius-Zellen der Marginalzone unter der Hirnoberfläche synthetisiert (Retzius, 1893). Bei der Wildtyp-Maus ist die Marginalzone zellarm. Bei der Reeler-Mutante hingegen sind zahlreiche Zellen zu finden (Frotscher, 2010). Dies deutet daraufhin, dass Reelin bei der Wanderung von migrierenden Neuronen von Ventrikularzone zur Kortikalplatte als ein Stoppsignal fungiert. Die Neuronen migrieren über ihren eigentlichen Platz hinaus (Frotscher, 2010).

Histologisch ist erkennbar, dass die Schichtung des Neocortex bei der Reeler-Maus aufgehoben bzw. umgekehrt ist (Förster et al., 2006). Bei normaler Entwicklung der Cortexschichtung durchdringen die einwandernden, neuronalen Vorläuferzellen die vorherige Schicht, so dass die früh generierten Neuronen innen und die spät einwandernden oberflächlicher liegen (Marin-Padilla M. und TM., 1982). Dementsprechend bildet sich die typische Sechschichtung des Cortex (Uyanik et al., 2003). Bei der Reeler-Mutante ist dies nicht möglich, die migrierenden Neuronen sind unfähig die vorherige Neuronenschicht zu durchwandern (Frotscher, 2010). Es formt sich dadurch eine inverse Schichtung (Caviness, 1982).

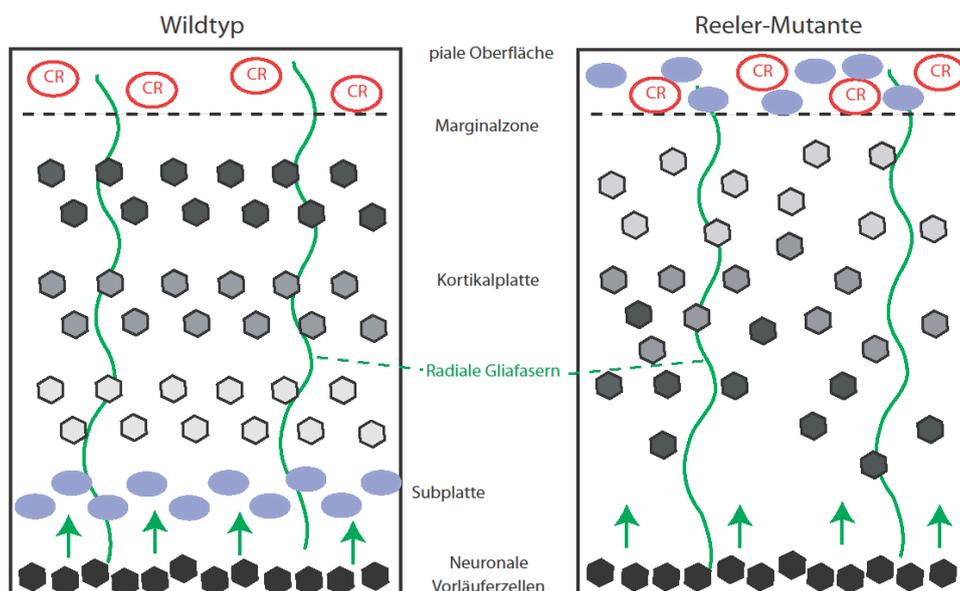


Abbildung 1.2.1 Laminierung des Cortex (Tissir und Goffinet, 2003): Beim Wildtyp (links) kommt die Schichtung des Neocortex dadurch zustande, dass die einwandernden neuronalen Vorläuferzellen entlang der radialen Gliafasern immer die Subplatte und ihre vorherige Schicht durchdringen. Die Schichtung der Kortikalplatte ist dann wie folgt aufgebaut: Innen liegen die früh migrierten Zellen und

die spät migrierten Neuronen liegen oberflächlicher (Marin-Padilla M. und TM., 1982). Dementsprechend bildet sich die typische Sechsschichtung (Uyanik et al., 2003). Bei der Reeler-Mutante (rechts) sind die migrierenden Neuronen unfähig die vorherige Neuronenschicht zu durchwandern (Frotscher, 2010). Es formt sich dadurch eine inverse Schichtung (Caviness, 1982). Bei der Wildtyp-Maus ist die Marginalzone zellarm, bei der Reeler-Mutante hingegen sind zahlreiche Zellen zu finden. Die Neuronen migrieren über ihren eigentlichen Platz hinaus (Frotscher, 2010). Die Cajal-Retzius-Zellen (CR), welche Reelin produzieren, sind oberflächlich gelegen.

Es wurden 2 Hauptarten der Migration für kortikale Neurone beschrieben: die somale Translokation und die Glia-abhängige Lokomotion (Book und Morest, 1990, Yip et al., 2000, Nadarajah et al., 2001, Nadarajah und Parnavelas, 2002). Die Somale Translokation, bei der sich das Soma in Richtung Pia bewegt, wird von frühmigrierenden Neuronen genutzt, welche eine geringe Entfernung zur Ventrikularzone aufweisen (Nadarajah et al., 2001). Später migrierende Neurone nutzen die Fortbewegung entlang der radialen Gliafasern; nur in der terminalen Phase benutzen sie die somale Translokation. Bei der Reeler-Mutante gestaltet sich die neuronale Migration als missorientiert (Frotscher, 2010).

Während der Migration ist eine stetige Veränderung der Zellgestalt zu beobachten. Dies geht auf eine kontinuierliche Neugestaltung des Aktinzytoskeletts zurück (Bamburg, 1999). Rezente Studien belegen, dass Reelin die Phosphorylierung von Cofilin zu p-Cofilin induziert (Frotscher et al., 2009, Chai et al., 2009). Cofilin depolymerisiert F-Aktin, welches Aktin-Monomere für die Formation zu neuen Aktin-Filamenten vorbereitet (Bamburg, 1999). Die Aktivität dieser Proteine ist daher essentiell für die Veränderung der Zellgestalt während des Migrationsprozesses. Durch die Phosphorylierung von Cofilin stabilisiert Reelin das Aktinzytoskelett. Reelin ist konzentriert in der Marginalzone. Vermutlich verankert es dort den terminalen Prozess der neuronalen Migration, die somale Translokation (Chai et al., 2009, Frotscher, 2010).

In den Signalweg von Reelin sind die Transmembranproteine ApoER2 (Apolipoprotein-Rezeptor-2) und VLDLR (Very-Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor) sowie die intrazelluläre Domäne Dab1 (Disabled-1) involviert (Details: S. Abb. 1.3.2). Eine Übermigration von Neuronen in die Marginalzone wurde in der Reeler-Mutante, sowie in ApoER2/VLDLR-Doppel-Knockout-Mutanten und in VLDLR-Single-

Knockout-Mäusen gefunden, jedoch nicht in ApoER2-Single-Knockout-Mäusen (Frotscher, 2010). Ein reduziertes p-Cofilin wurde in Reeler-Mutante, Dab1- und ApoEr2-Mutanten gefunden, nicht jedoch in VLDLR-Knockout-Mäusen (Frotscher, 2010). Die reduzierte p-Cofilin-Konzentration in der Reeler-Mutante konnte durch Hinzugabe von rekombinantem Reelin wiederaufgehoben werden. Eine Übermigration von Neuronen in VLDLR-Knockout-Mäusen ohne eine Reduktion von p-Cofilin demonstriert, dass neben Reelin noch andere Mechanismen in diesen Prozess eingreifen (Frotscher, 2010) oder dass Reelin diesen Prozess über weitere Mechanismen beeinflusst.

Ein Experiment zeigte, dass der Reelin-induzierte p-Cofilin-Spiegel nach Zugabe eines Inhibitors der Src-Kinase-Familie sank (Frotscher, 2010). Mitglieder dieser Familie sind zuständig für die Phosphorylierung von Dab1. Die p-Cofilin-Konzentration sank zusätzlich nach Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), welche mit Dab1 interagiert. (Frotscher, 2010). Die Wirkung von Reelin auf Cofilin könnte auf einer Interaktion mit Dab1 beruhen, welche die PI3- und Src-Kinase involviert.

Die Veränderungen durch eine Reelin-Defizienz im Hippocampus sind im Detail untersucht, da er sich durch seine einfache Schichtung gut als Modell für die Großhirnentwicklung eignet (Förster et al., 2006, Frotscher et al., 2003). Er besteht aus 3 funktionellen Einheiten: dem Gyrus dentatus mit seinen 3 Schichten, bestehend aus Körnerzellschicht, innerer und äußerer Molekularschicht; dem Ammonshorn (Cornu Ammonis = CA), welches geteilt ist in die 4 Abschnitte CA1 bis CA4; sowie dem Subiculum, einem Areal zwischen Cornu Ammonis und dem Entorhinalen Cortex (In: Compact Lehrbuch Anatomie, 2005).

In der Wildtyp-Maus sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus als deutlich abgrenzbare Schicht unterhalb der inneren und äußeren Molekularschicht formiert. Ihre Dendriten bilden zusammen mit den Commissuralen Fasern aus dem gegenseitigen Hippocampus die Innere Molekularschicht und mit Axonen des Entorhinalen Cortex die Äußere Molekularschicht (Förster et al., 2006). Früh in der Morphogenese des Gyrus dentatus migrieren die Cajal-Retzius-Zellen zusammen mit den radialen Glia-Zellen in die primitive Anlage (Retzius, 1893, Del Rio et al., 1997). Die radialen Glia-Zellen leiten die Körnerzellen zu ihrem Platz (Sibbe et al., 2009). Radiale Glia-Zellen exprimieren ApoER2 und VLDLR. Reelin stimuliert und reguliert

ihr Wachstum (Förster et al., 2006, Zhao et al., 2004). In der Reeler-Mutante sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus verstreut und die schichtspezifische Orientierung der Commissuralen Fasern fehlt (Zhao et al., 2004). Das CA1-Band im Ammonshorn der Reeler-Mutante ist in 2 Stränge separiert und CA2 ist subluxiert (Caviness et al., 1972, Zhao et al., 2004). Viele Körnerzellen des Gyrus dentatus sind durch den Hilus verstreut und mit großen CA4-Zellen vermischt.

Das Kleinhirn der Reeler-Mutante ist hypoplastisch und in der anatomischen Organisation verändert (Curran und D'Arcangelo, 1998). Die Proliferation der Vorläuferzellen beginnt normalerweise zwischen Embryonaltag 10 und 14 (E10 - E14). Die Vorläuferzellen wandern von der Ventrikularzone zu tieferen cerebellaren Kernen und Purkinjezellen. Eine andere Population von Zellen proliferiert in der rhombischen Lippe und migriert tangential über die Anlagenoberfläche, wo es die Externe Körnerzellschicht formt (EGL). Die Purkinjezellen wandern radial zur pialen Oberfläche und formen so die Purkinjezellschicht unter der EGL. Nach der Geburt wandern postmitotische Körnerzellen durch die Purkinjezellschicht und formen die Innere Körnerzellschicht (IGL) (Miyata et al., 1997).

Erste neuronale Migrationsdefekte in der Reeler-Mutante sind sichtbar ab E14. Die Purkinjezellen sind nicht in der gewohnten Schicht geformt, sondern liegen verstreut in subkortikalen Regionen (Miyata et al., 1997). Postnatal fällt auf, dass die EGL in der Größe reduziert ist und die Purkinjezellschicht fehlt (Miyata et al., 1997). Dies bedingt eine Reduktion der Kleinhirngröße und eine abnormale Schichtung. Die Ataxie der Reeler-Mutante könnte hiermit erklärt werden.

Strukturelle Änderungen wurden zusätzlich in der unteren Olive und im Bulbus Olfactorius entdeckt (Curran und D'Arcangelo, 1998).

Reelin wurde im embryonalen Rückenmark nachgewiesen (Ikeda und Terashima, 1997, Schiffmann et al., 1997). Yip et al. dokumentierten (2000) durch Messung der Reelin-Expression, sowie durch Blockade der Reelinwirkung mit dem CR-50-Antikörper, dass die Migration der synaptischen präganglionären Neurone von Reelin beeinflusst wird. Auch hier wird von Reelin eine Art Barrierefunktion für die Wanderung der Neuronen vermutet. Eine Reelindefizienz bedingt desweiteren eine Migrationsstörung von Neuronen im Rückenmark, welche in Verbindung stehen mit

einer reduzierten mechanischen Sensitivität und einer ausgeprägten thermischen Hyperalgesie (Villeda et al., 2006), synaptische Vorgänge der Nozizeption.

Sympatische, präganglionäre Neurone haben einen langen Migrationsweg; vom Neuroepithel, anhand der radialen Glia-Fasern zum ventrolateralen Rückenmark, um dann mit somatischen Motorneuronen eine primitive Säule zu bilden (Yip et al., 2000). Danach isolieren sich die präganglionären Neurone von den somatischen Motorneuronen und folgen einer dorsolateralen Migration zur intermediolateralen Säule (IML). Diese zweite Migration steht senkrecht zu den radialen Glia-Fasern und ist von ihnen unabhängig. In der terminalen Migrationsphase ordnen sich die meisten präganglionären Neuronen in der IML an, nur ein kleiner Teil wandert weiter zum Zentralkanal. In der Reeler-Mutante ist der Großteil der präganglionären Neurone im Bereich des Zentralkanals zu finden und nur wenige in der IML (Yip et al., 2000).

Reelin wurde in einigen Orten des ZNS nachgewiesen: im Septumbereich, Striatum, Nuclei habenulares, in mehreren Thalamuskernen, im Corpus geniculatum laterale, der Kortikalplatte, Purkinjezellen, Neuronen der untern Olive und in der Retina. Paradoxerweise wurde kein Reelin in radialen Gliazellen nachgewiesen (Schiffmann et al., 1997).

### **1.3 Reelin und sein Signalweg**

Reelin ist ein 388 kDA großes Glykoprotein (D'Arcangelo et al., 1997, 1999) und eine Serinprotease (Quattrocchi et al., 2001). Das humane Reelin-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 7q22 (Desilva et al., 1997), mit der Information für 3461 Aminosäuren. Das Reelin-Gen der Maus liegt auf Chromosom 5 (Goffinet, 1997, Dernoncourt et al., 1991). Reelin wird von den Cajal-Retzius-Zellen gebildet und sezerniert (D'Arcangelo et al., 1997, Del Rio et al., 1997). Diese Zellen sind unter den ersten, sich einlagernden Zellen in das Stratum Molekulare des sich entwickelnden Cortex (Marin-Padilla M. und TM., 1982, Bradford et al., 1977). Nach der Geburt wird Reelin zudem in einer Gruppe von GABAergen Interneuronen exprimiert (Drakew et al., 1998, Pesold et al., 1998, Alcantara et al., 1998, Ramos-Moreno et al., 2006).

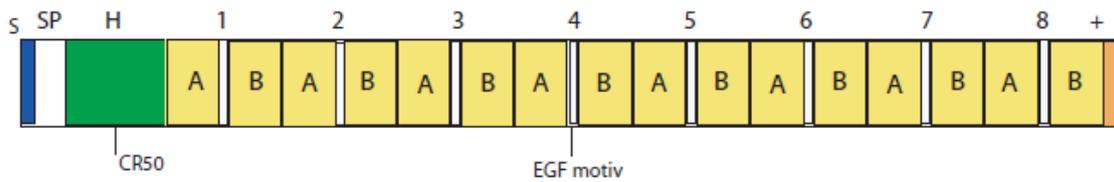


Abbildung 1.3.1 Schema des Reelin-Proteins (Tissir und Goffinet, 2003): Die Sequenz beginnt mit einem Signalpeptid (S), gefolgt von einer Region, welche dem F-Spondin ähnelt und hier mit „SP“ gekennzeichnet ist (SP-Aminosäure: 28-190). Auf das Segment „H“ (Aminosäuren 191 – 500) folgen 8 Wiederholungen mit ca. 300 - 350 Aminosäuren. (WDH 1, Rest 501–860; WDH 2, 861–1220; WDH 3, 1221–1596; WDH 4, 1597–1947; WDH 5, 1948–2314; WDH 6, 2315–2661; WDH 7, 2662–3051; WDH 8, 3052–3428).

Jede Wiederholung enthält im Zentrum ein EGF-(Epidermal-Growth-Faktor)-Sequenzmotiv, welche die Reelin-WDH in 2 Untergruppen teilt, A und B (Nogi et al., 2006). Das Protein schließt mit einer kurzen C-terminalen Region mit 33 Aminosäuren ab (+). Gekennzeichnet ist hier zusätzlich die Stelle an welcher der Reelin-identifizierende CR-50-Antikörper bindet (Nakano et al., 2007).

Es sind mehrere Elemente des Reelin-Signalweges bekannt. Die Signalweiterleitung läuft in einer Vielzahl der Fälle über die Bindung von Reelin an 2 Transmembranproteine: die Lipoprotein-Rezeptoren ApoLipoprotein E-Rezeptor 2 (ApoER2) und Very-Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (VLDLR) (D’Arcangelo et al., 1999, Hiesberger et al., 1999, Trommsdorff et al., 1999). Die Bindung von Reelin induziert die Phosphorylierung von Dab1, ein intrazelluläres Adaptorprotein, welches mit intrazellulären Domänen von ApoER2 und VLDLR interagiert (Niu et al., 2004). Mäuse mit Mutation für VLDLR, ApoER2 und Dab1 (= Scrambler-Maus, Sheldon et al., 1997) besitzen einen Reeler-ähnlichen Phänotyp mit Ataxie, cerebellarer Hypoplasie und anormaler, kortikaler Schichtung (D’Arcangelo et al., 1999). Dab1 interagiert mit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Frotscher et al., 2003) und der LIM Kinase 1 (LIMK1) (Frotscher, 2010). LIMK1 bewirkt die Phosphorylierung von Cofilin am Serin-Rest 3, welches F-Aktin depolymerisierungsunfähig macht (Chai et al., 2009). Dieser Prozess findet auch bei der somalen Translokation, der terminalen Phase der neuronalen Migration statt. Reelin stabilisiert das Aktinzytoskelett und verankert diesen Prozess in der Marginalzone. Bei Reelin-Defizienz bleibt dieser Prozess aus und die neuronale Migration verläuft missorientiert und instabil (Frotscher, 2010). Bei Untersuchung der Zellbewegung wurde desweiteren

herausgefunden, dass Reelin insbesondere die Haptotaxis, nicht aber die Chemotaxis beeinflusst (Cariboni et al., 2005).

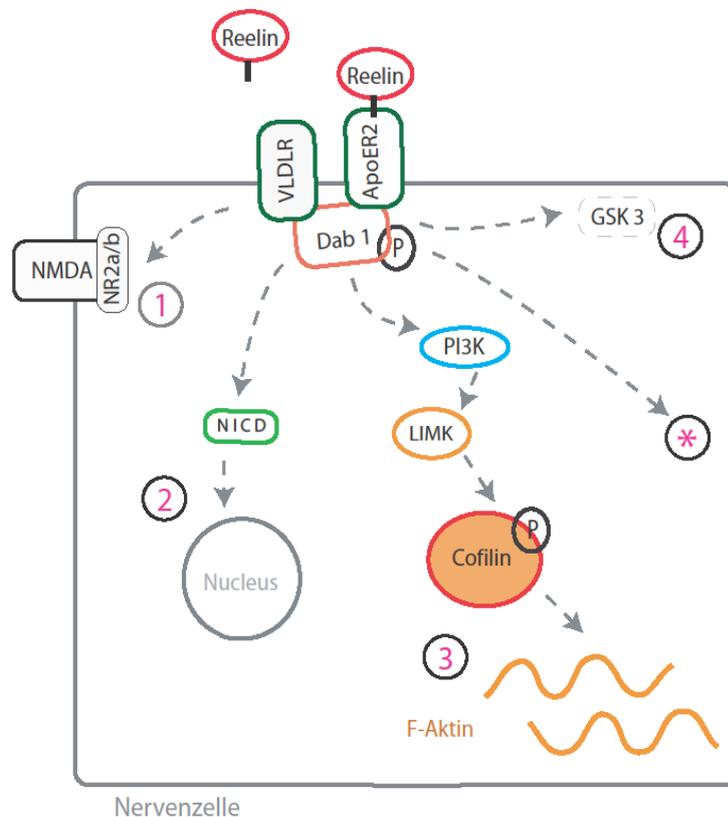


Abbildung 1.3.2 Hauptelemente des neuronalen Reelin-Signalweges: Reelin bindet an den VLDL- oder den ApoE-Rezeptor 2. Dies führt zur Phosphorylierung von dem intrazellulären Adapterprotein Dab1 (D'Arcangelo et al., 1999).

1. Reelin reguliert über ApoER2, VLDLR und Dab1 die Funktion des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors (Bacskai et al., 2000, Qui et al., 2002, 2003, May et al., 2005). Dies geschieht durch Tyrosin-Phosphorylierung der NR2a- und NR2b-Untereinheiten (Chen et al., 2005). Die Phosphorylierung von NR2-Untereinheiten erhöht die Expression von NMDA-Rezeptoren und wirkt ihrer Endozytose entgegen (Snyder et al., 2005, Beffert et al., 2005).
2. Reelin stabilisiert über den Notch-Signalweg das Aktinzytoskelett und wirkt dadurch auf das Neuritenwachstum migrierender Neuronen (Sibbe et al., 2009). Die Verbindung zwischen Notch und Reelin könnte über Dab1 funktionieren. Nach der Phosphorylierung von Dab1 wird die intrazelluläre Domäne des Notch1-Rezeptors (NICD) durch die gamma-Sekretase gespalten und in den Zellkern transloziert. NICD induziert die Transkription zahlreicher Target-Gene (Frotscher, 2010).
3. Dab1 interagiert mit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und der LIM Kinase 1 (LIMK1). LIMK1 bewirkt die Phosphorylierung von Cofilin am Serin-Rest 3 (Chai et al., 2009), welches F-Aktin depolymerisierungsunfähig macht. Cofilin depolymerisiert normalerweise F-Aktin,

welches Aktin-Monomere für die Formation zu neuen Aktin-Filamenten vorbereitet. Die Aktivität dieser Proteine ist demzufolge essentiell für die Veränderung der Zellgestalt während des Migrationsprozesses (Chai et al., 2009).

Ein Experiment demonstrierte, dass der Reelin-induzierte p-Cofilin-Spiegel nach einer Zugabe eines Inhibitors der Src-Kinase-Familie sank (Frotscher, 2010). Mitglieder dieser Familie sind zuständig für die Phosphorylierung von Dab1. Die p-Cofilin-Konzentration sank zudem nach Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), welche mit Dab1 interagiert. (Frotscher, 2010). Die Wirkung von Reelin auf Cofilin könnte demnach über Dab1 verlaufen und PI3K und Src involvieren.

4. Reelin führt über ApoEr2-Rezeptoren zu einer Herunterregulierung der Aktivität von Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). GSK3 $\beta$  ist für die Tau-Phosphorylierung zuständig (Beffert et al., 2002, Ohkubo et al., 2003).

\*Reelin hat intrazellulär noch eine Vielzahl anderer Wirkungen. Es führt unter anderem zu einer veränderten Expression von den Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (noch nicht veröffentlicht). Reelin ist desweiteren ein Ligand von LRP8, welches vermutlich bei der Follikulogenese von Bedeutung ist (Fayad et al., 2007).

Dulabon et al. fanden 2000 eine Verbindung zwischen Dab1 und dem Oberflächen-Adhäsions-Rezeptor A3 $\beta$ 1. Ein Fehlen vom Rezeptor A3 $\beta$ 1 führt zu einer Reduktion von Dab1. Der Gedanke war, dass neuronale Migration durch Bindung von Reelin an A3 $\beta$ 1 reguliert wird, welches die Integrin-vermittelte Zelladhäsion moduliert. Cariboni et al. konnten dies jedoch (2005) im Bezug auf die Reelin-abhängige Lenkung der Migration der GnRH-Neuronen in den Bulbus Olfactorius nicht bestätigen.

Reelin wurde in Interaktion mit Notch-1 beobachtet (Sibbe et al., 2009). Der Notch-Signalweg ist Bestandteil von zahlreichen Entwicklungsprozessen. Es wurde z.B. belegt, dass Notch in das Neuritenwachstum migrierender Neuronen involviert ist. Durch hohe Konzentrationen von Notch konnte ein neuronaler Wachstumsstillstand beobachtet werden und niedrige Konzentrationen bedingten ein fortlaufendes Wachstum. Im Detail geschieht dies durch Bindung der Notch-Liganden Delta und Jagged an den Notch-Rezeptor, woraufhin die intrazelluläre Domäne (NICD) durch die gamma-Sekretase gespalten wird und in den Zellkern transloziert. NICD bildet einen transkriptionalen Komplex mit CBF-1, ein DNA-bindendes Protein der CSL-Familie und induziert die Transkription zahlreicher Target-Gene (Frotscher, 2010).

Arbeiten zur Interaktion zwischen Reelin und Notch zeigen, dass die Inhibition des Notch-Signalweges zu einem Reeler-ähnlichen Bild des Hippocampus führt (Sibbe et

al., 2009). Die Verbindung zwischen Notch und Reelin könnte über Dab1 funktionieren, einem Bestandteil der Reelin-Signalkaskade, welches den Notch-Abbau behindert und mit Notch kolokalisiert (Sibbe et al., 2009).

Reelin hat desweiteren eine Wirkung auf die Aktivität der NMDA-Rezeptoren und dadurch unter anderem Einfluss auf die synaptische Plastizität. ApoER2 und VLDLR regulieren die Funktion des NMDA-Rezeptor (Bacskai et al., 2000, Qui et al., 2003, 2002, May et al., 2005) und zwar durch Tyrosin-Phosphorylierung der NR2a- und NR2b-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors (Chen et al., 2005). NR2-Tyrosin-Phosphorylierung erhöht die Expression von NMDA-Rezeptoren und wirkt ihrer Endozytose entgegen (Snyder et al., 2005, Beffert et al., 2005).

Eine vermehrte Endozytose von NMDA-Rezeptoren, wie es z.B. bei Morbus Alzheimer beobachtet wird, führt zu einem Verlust von Synapsen und damit auch zum Neuronentod (Durakoglugil et al., 2009).

Dab1 interagiert mit intrazellulären Domänen von Amyloid-Precursor-Protein (APP). Durch einen veränderten APP-Metabolisierungsprozess kommt es zur Bildung von  $\beta$ -Amyloidplaques.  $\beta$ -Amyloid induziert eine Synapsendysfunktion, welche eine veränderte Funktion und vermehrte Endozytose von AMPA- und NMDA-Rezeptoren bewirkt. In einer Studie wird dargestellt, dass Reelin die Suppression der LTPs (Long term potentiation) und die Reduktion der NMDA-Rezeptoraktivität verhindert (Durakoglugil et al., 2009). Bei sehr hoher Konzentration von  $\beta$ -Amyloid kann Reelin die Suppression der LTPs jedoch nicht mehr aufhalten. Es folgt eine komplette Blockade der Reelin-abhängigen Phosphorylierung von NR2-Untereinheiten, sowie eine Suppression der NMDA-Aktivität (Durakoglugil et al., 2009).

Reelin führt über ApoEr2-Rezeptoren zu einer Herunterregulierung der Aktivität von der Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), eine der Kinasen, welche für die Tau-Phosphorylierung zuständig sind (Beffert et al., 2002, Ohkubo et al., 2003). Bei einer Reelin-Defizienz kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung von Tau, welches zu einer veränderten Anordnung der Neurofibrillen führt und damit neurodegenerative Veränderung, wie z.B. M. Alzheimer, mitbedingt.

## 1.4 Klinik

Beim Menschen führt die Abwesenheit von Reelin zum Krankheitsbild der Lissenzephalie mit Kleinhirnhypoplasie (LCH) (Chang et al., 2006, Hong et al., 2000, Zaki et al., 2007). Es ist eine autosomal-rezessive Form der Lissenzephalie, welche assoziiert ist mit Veränderungen des Cerebellums, Hippocampus und des Hirnstammes, welche zurückzuverfolgen sind zum Chromosom 7q22 (Hong et al., 2000).

Typisch für Patienten mit LCH ist das Auftreten eines Lymphödems und darüber hinaus mentale Retardierung. Wie bei der Reeler-Mutante ist auch hier eine neuronale Migrationsstörung zu sehen. Die Gyrierung der Gehirnoberfläche kann vollständig fehlen (Agyrie) oder vergrößert sein (Pachygyrie). Ebenfalls typisch ist eine kortikale Verdickung mit pathologischer Schichtung (Uyanik et al., 2003).

Klinisch weisen LCH-Patienten eine Entwicklungsverzögerung, Hypotonie, Ataxie und Anfallsleiden mit teils tonischen Krämpfen auf (Chang et al., 2007). Im EEG wurde eine  $\alpha$ -theta-Hintergrundaktivität und multifokale Spike- und Slow-Wave-Aktivität beobachtet.

Weiter geforscht wird nach der Rolle von Reelin bei der Entstehung von Epilepsie, speziell bei der Temporallappenepilepsie (TLE) (Kobow et al., 2009, Förster et al., 2006, Frotscher et al., 2003). Die TLE ist oft vergesellschaftet mit einer Streuung der Körnerzellen im Gyrus Dentatus, auch Granule Cell Dispersion (GCD) genannt (Haas et al., 2002). Die GCD erinnert an das Bild der verstreuten Körnerzellen im Hippocampus der Reeler-Mutante. Studien veranschaulichen weiter, dass bei TLE-Patienten eine verminderte Reelin-Konzentration vorhanden ist (Haas und Frotscher, 2010). Das Ausmaß der Reelin-Defizienz korreliert mit dem Ausmaß der GCD (Haas et al., 2002, Frotscher et al., 2003). Die Körnerzellmigrationsdefekte von TLE-Patienten korrelieren umgekehrt mit der Anzahl an Cajal-Retzius-Zellen (Haas und Frotscher, 2010).

Um die Entwicklung der GCD nachzustellen, injizierte die Arbeitsgruppe von Heinrich et al. (2006) unilateral Kainat in den Hippocampus (Agonist des exzitatorischen Transmitters Glutamat). Dies führte zu einer Reduktion von Reelin und zur unilateralen Granule Cell Dispersion. Die kontralaterale Seite blieb unbeeinflusst.

Zusätzlich wurde belegt, dass die migrierenden Neuronen voll differenziert waren. Dies bedeutet, dass GCD nicht durch eine Veränderung neu migrierender Neuronen entsteht, sondern ein Prozess differenzierter Körnerzellen beeinflusst wird (Heinrich et al., 2006, Haas und Frotscher, 2010). Ähnliche Ergebnisse über den Einfluss von Reelin auf Prozesse im adulten Hirn kamen auch durch die Injektion eines Reelin-Antikörpers (CR-50-Antikörper) zustande (Heinrich et al., 2006). Darüber hinaus konnte die GCD bei Kainat-Infusion durch gleichzeitige Gabe von rekombinantem Reelin verhindert werden (Frotscher et al., 2010).

Reelin wird mit weiteren Erkrankungen in Verbindung gebracht (Frotscher, 2010). Zu nennen sind hier Schizophrenie (Impagnatiello et al., 1998), Autismus (Fatemi et al., 2002), Bipolare Störungen, Depressionen (Fatemi et al., 2000) und Morbus Alzheimer (Botella-Lopez et al., 2006). Neben der Erkenntnis, dass eine Defizienz von Reelin Störungen in der neuronalen Entwicklung bewirkt, wirkt es auf Prozesse im adulten Gehirn. Reelin wirkt über ApoER2 auf die synaptische Plastizität und das Gedächtnis (Beffert et al., 2005). Die Modulation der Synaptischen Plastizität involviert ein unterschiedliches Spleißen von ApoER2 (Beffert et al., 2005). Dieser Mechanismus ist in den Reelin-abhängigen Anstieg von LTP integriert, eine Form der Synaptischen Plastizität, welche mit Lernen und Gedächtnis assoziiert ist.

Es gibt einige Umstände, welche Alzheimer bedingen können oder mit der Entstehung von Alzheimer assoziiert sind. Reelin ist in mehrere dieser Ereignisse involviert.

Reelin, ApoE und seine Rezeptoren, Cholesterol und  $\beta$ -Amyloid regulieren die synaptische Übertragung und Aktivität von NMDA-Rezeptoren (Herz und Chen, 2006, Bacskai et al., 2000, Qui et al., 2006, 2007). Reelin erhöht die Tyrosin-Phosphorylierung von NR2a und auch NR2b-Untereinheiten. Dies wiederum erhöht die Expression von NMDA-Rezeptoren und wirkt ihrer Endozytose entgegen (Snyder et al., 2005, Beffert et al., 2005). Reelin führt über ApoEr2 zu einer Downregulierung der Aktivität von GSK3 $\beta$ , eine der Kinasen, welche für die Tau-Phosphorylierung zuständig sind (Beffert et al., 2002, Ohkubo et al., 2003). Bei einer Reelin-Defizienz kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung von Tau, gefolgt von einer veränderten Anordnung der Neurofibrillen. Desweiteren wurde herausgefunden, dass Mäuse mit Mutation für Dab1, ApoEr2 und/ oder VLDLR erhöhte Werte an hyperphosphoryliertem Tau im Gehirn aufweisen (Hiesberger et al., 1999).

Morbus Alzheimer wird durch die Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid-Plaques hervorgerufen, sowie vermehrte Tau-Phosphorylierung, welche ein intrazelluläres Neurofibrillengewirr bedingt und die vermehrte Endozytose von NMDA-Rezeptoren. Dies alles führt zu einer Reduktion der synaptischen Plastizität und zu einem vermehrten Synapsen-, wie auch Neuronenverlust. Eine Reduktion von Reelin begünstigt solche Prozesse und könnte möglicherweise als neuronaler Marker für dementielle Prozesse fungieren (Herz und Chen, 2006).

### **1.5 Reelin inhibiert die Wanderung der GnRH-Neurone**

Reelin ist im olfaktorischen Epithel, im Bulbus olfactorius und Bulbus olfactorius accessorius, sowie im Vomeronasalen Organ und deren Nervenendigungen stark exprimiert (Ikeda und Terashima, 1997, Alcantara et al., 1998, Teillon et al., 2002). Demnach ist Reelin auf dem Pfad stark exprimiert, auf welchem die GnRH-Neurone während der Entwicklung ins Gehirn wandern. Die GnRH-Neurone selbst sind jedoch Reelin-negativ (Cariboni et al., 2005).

Die GnRH-Neurone entstehen im nasalen Kompartiment auf Höhe der medialen olfaktorischen Plakode (Dubois et al., 2002). Sie migrieren assoziiert mit den Vomeronasalen Nerven (VNN) und passieren die Lamina cribrosa. Die VNN splitten sich dann auf, wobei die Mehrheit in den Haupt- und Nebenriechkolben ziehen. Der kaudale Anteil der VNN dreht sich nach kaudal und ventral und tritt ins basale Vorderhirn ein (Schwartz et al., 2004). Die GnRH-Neurone folgen den VNN bis zum Hypothalamus, in welchem sie verbleiben. Nur ein kleiner Teil migriert in den zerebralen Cortex (Cariboni et al., 2005).

Reelin inhibiert in der Wildtyp-Maus die Wanderung der GnRH-Neurone und führt damit zu der korrekten Positionierung der Neurone im mediobasalen Anteil des Hypothalamus (In: Biochemie und Pathobiochemie, 2007). In der Reeler-Mutante hingegen sind die GnRH-Neurone im Bulbus olfactorius, sowie im basalen Vorderhirn in ihrer Gesamtzahl signifikant reduziert, während die Zahl der Neurone im Cortex, im Vergleich zum Wildtyp, erhöht ist (Cariboni et al., 2005).

Es wurden jedoch keine Migrationsdefekte oder Anzahlunterschiede der GnRH-Neurone in den Maus-Mutanten festgestellt, welche ApoER2, VLDLR oder Dab1 nicht exprimieren (Cariboni et al., 2005). Hier wird vermutet, dass die Signalweiterleitung von Reelin auf einer anderen Kaskade beruht.

## **1.6 Kallmann-Syndrom**

Beim Menschen führt eine gestörte Migration der GnRH-Neurone zum Kallmann-Syndrom, erstmalig 1856 durch Aureliano Maestre de San Juan beschrieben (Rugarli et al., 1996).

Während der Gehirnentwicklung senden die olfaktorischen Neurone ihre Axone in Richtung des Bulbus olfactorius. Auf selbigem Pfad migrieren auch die GnRH-Neurone durch den Bulbus zum Hypothalamus. Beim Kallmann-Syndrom ist dieser Prozess unvollständig. GnRH-Neurone und die olfaktorischen Axone verbleiben unterhalb der Siebplatte. Das Kallmann-Syndrom ist charakterisiert durch Anosmie und hypogonadotropen Hypogonadismus mit Hoden- bzw. Ovarialhypoplasie (Kallmann et al., 1944).

Es gibt mehrere Formen des Kallmann-Syndroms, wobei die X-chromosomal-bedingte Form die häufigste ist. Bei kompletter GnRH-Defizienz sind die FSH- und LH-Konzentration erniedrigt und es kann kein Nachweis einer sexuellen Reife vorgelegt werden (Rugarli et al., 2011). Bei partieller GnRH-Defizienz ist die sexuelle Reife unvollständig. Das Krankheitsbild wird meist während der Pubertät entdeckt (Rugarli und Ballabio, 1993).

## 1.7 Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Die GnRH-Neurone senden pulsatil GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) aus und bilden die oberste Instanz der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (In: Biochemie und Pathobiochemie, 2007). GnRH wird in der Eminentia mediana ins portale System des Hypophysenstiels abgegeben. Ein wichtiger Pulsationsmodulator von GnRH ist das Kisspeptin. Kisspeptin bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor KISS1R (auch GPR54), welcher von GnRH-Neuronen exprimiert wird und stimuliert dadurch die GnRH-Abgabe (Colledge, 2009). Neurone, die Kisspeptin exprimieren, stehen unter Modulation von Estrogen und sind damit Bestandteil des Feedbackmechanismus der Reproduktionsachse. Der Kisspeptin-GPR54-Signalweg wird als essentiell für die Ovulation und damit für die Fertilität begriffen (Clarkson und Herbison, 2009, Clarkson et al., 2008).

Über das venöse System gelangt GnRH zu den gonadotropen Zellen des Hypophysen-Vorderlappens (Adenohypophyse). Diese Zellen produzieren und sezernieren daraufhin Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-Stimulierendes Hormon (FSH) (Dubois et al., 2002). Diese Gonadotropine regulieren die Produktion der weiblichen sowie männlichen Sexualhormone in den Gonaden und damit die ovarielle Estrogensynthese (In: Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen, 2006). Es gibt jedoch auch einen direkten Einfluss von GnRH auf die Estrogensynthese im Ovar (Parinaud et al., 1988).

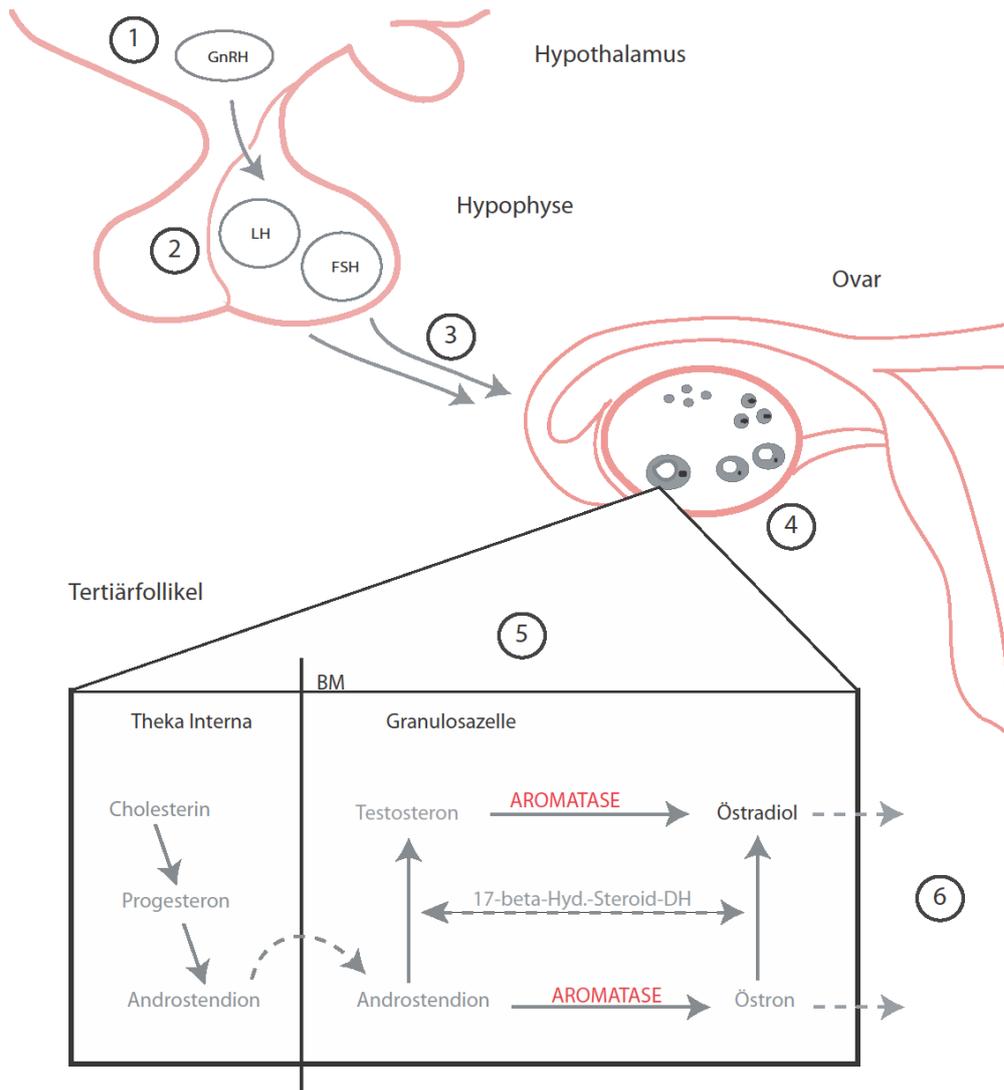


Abbildung 1.7.1 Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (In: Biochemie und Pathobiochemie, 2007):

Im Hypothalamus befinden sich GnRH-Neurone (1), welche GnRH sezernieren. Ihre Axone enden am portalen Gefäßsystem des Hypophysenstiels. Freigesetztes GnRH gelangt zur Adenohypophyse (2), wo es die Freigabe vom Luteinisierenden Hormon (LH) und Follikelstimulierenden Hormon (FSH) reguliert. FSH und LH erreichen über den Blutkreislauf die Gonaden (3). Unter Anderem stimuliert LH im Ovar durch einen starken Konzentrationsanstieg (LH-Peak) die Ovulation. Desweiteren steigert es in den Thekazellen (5) die Androgensynthese, welche in den Granulosazellen zu Estrogen umgewandelt werden. FSH stimuliert die Proliferation der Granulosazellen, die Synthese von LH-Rezeptoren und die Estradiol-Synthese durch Induktion der Aromatase. Aromatase ist verantwortlich für das Follikelwachstum sowie dessen Reifung.

Die Follikulogenese im Ovar (4) beinhaltet mehrere Entwicklungsstufen. Angefangen beim Primordialfollikel, wobei die Eizelle nur von einem flachen Follikelepithel umgeben ist. Dieses Epithel ist beim Primärfollikel bereits zylindrisch und von einer Basalmembran umgeben. Bei der weiteren

Entwicklung wird das Follikelepithel zur mehrschichtigen Granulosazellschicht (Stratum granulosum) und als Sekundärfollikel bezeichnet. In diesem Reifestadium wird die Eizelle von einer Schicht aus Glykoproteinen umgeben, der Zona pellucida, und die umliegenden Granulosazellen ordnen sich radiär zur Corona radiata an. Die nächstfolgende Entwicklungsstufe ist der Tertiärfollikel (Im Detail: Abb. 3.2.1.1.) Der Tertiärfollikel ist gekennzeichnet durch einen mit Follikelflüssigkeit gefüllten Hohlraum: das Antrum folliculare. Die Eizelle ist nun im Eihügel, dem Cumulus oophorus gelegen und das follikelumgebende Bindegewebe ist in die Theka Interna und Externa differenziert. Einer der Tertiärfollikel reift weiter bis zum Graafschen Follikel, welcher bei der Ovulation die Eizelle freigibt.

(5) Estradiol-Synthese im Tertiärfollikel: Stimuliert durch LH wird in den Theka Interna-Zellen Cholesterin über Progesteron zu Androstendion umgesetzt. Nachdem dies durch die Basalmembran (BM) in die Granulosazelle übergetreten ist, kann Androstendion durch das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 $\beta$ -Hyd.-Steroid-DH) zu Testosteron umgesetzt werden und dann weiter durch die Aromatase zu Estradiol. Androstendion kann zusätzlich durch Aromatase zu Östron umgesetzt werden und dann durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Estradiol.

(6) Das produzierte Estradiol tritt über in die Follikelflüssigkeit und ist nun Induktor vieler verschiedener Reaktionen. Eine Wirkung des Hormons ist die Stimulation der Endometriumentwicklung im Uterus und dessen Vaskularisierung, demnach die Vorbereitung für die Einnistung der Eizelle nach Befruchtung. Es ist ebenso verantwortlich für die zyklische Veränderung des Vaginalepithels. Estradiol hemmt, zusammen mit von Granulosazellen gebildetem Inhibin, die FSH-Ausschüttung (negativer Feedbackmechanismus) und fördert wiederum ab Zyklusmitte über Hypothalamus und Hypophyse die LH-Ausschüttung (positiver Feedbackmechanismus).

In dieser Arbeit werden die Reproduktionsorgane der homozygoten Reeler-Mutante mittels vaginaler Abstrich hinsichtlich zyklischer Veränderungen untersucht (6) und die Aromataseexpression gemessen (5).

## **1.8 Estrogen – zerebral und ovariell**

Ein Teil der Estrogensynthese findet in den Follikeln der weiblichen Maus statt. Die Synthese wird katalysiert durch das Enzym Aromatase, welches hauptsächlich in Granulosazellen heranreifender Follikel zu finden ist. Aromatase und ihr Produkt Estrogen sind essentiell für Reifung und Wachstum der ovariellen Follikel. Estrogen ist das entscheidende Hormon, welches verantwortlich ist für die zyklischen Veränderungen der weiblichen Geschlechtsorgane. Es ist für die Fertilität unabdingbar, da sein Anstieg Voraussetzung für die Ausschüttung von LH aus der Hypophyse ist, welches die Ovulation einleitet.

Neben der Funktion als Sexualhormon wurde Estrogen die Rolle als Neurosteroid anerkannt (Prange-Kiel, 2003). Alle Enzyme der Steroidbiosynthese werden auch im Gehirn exprimiert (Prange-Kiel und Rune, 2006). Naftolin et al. fanden 1971 erstmalig Aromataseaktivität im Diencephalon der Ratte (Fester et al., 2007). Bis heute wurden Vorkommen und Aktivität der Aromatase in unterschiedlichen Hirnregionen untersucht (Flores et al., 1973, Roselli et al., 1985, Stoffel-Wagner et al., 1998, Beyer et al., 1994a,b, Yague et al., 2006, 2008). Unter anderem wurde auch eine de novo Estrogensynthese aus Cholesterol im adulten Hippocampus entdeckt, welche sich durch Hinzugabe von einem Aromatasehemmer (Letrozol) inhibieren und durch Cholesterin wieder stimulieren ließ (Prange-Kiel et al., 2003, Hojo et al., 2008, Fester et al., 2009).

Lokalisiert wurde die Aromatase in Perikaryen und in neuronalen Fortsätzen (Roselli et al., 1985, Prange-Kiel et al., 2006, Yague et al., 2006, 2008). Der ultrastrukturelle Nachweis von Aromatase in präsynaptischen Terminalen (Balthazart und Ball, 2006) legte den Gedanken nahe, dass Estradiol als Transmitter fungieren könnte. Die Aromataseaktivität wird glutamaterg moduliert (Hojo et al., 2008).

Die lokale Estrogensynthese reguliert die Expression hippocampaler Estrogenrezeptoren ER  $\alpha$  und ER  $\beta$  (Prange-Kiel et al., 2003). Estrogenrezeptoren fungieren nach Ligandenbindung und Dimerisierung als Transkriptionsfaktoren. Sie binden im Kern an Estrogen-Responsive-Elements (EREs) und verändern die Transkription bestimmter Gene. Neben diesem genomischen, werden vermutlich auch membrangebundene Effekte, so z.B. Signalkaskaden, wie MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase), PI3K, AKT und GSK3, durch Estradiol induziert (Morissette et al., 2008a,b) (S. Abb.4.2.3.2.2).

Estrogen hat lokal in den verschiedenen Hirnarealen auto- und parakrine Funktion (Simpson et al., 2001, Mukai et al., 2005, Prange-Kiel et al., 2006, 2008).

Die Spinesynapsendichte in der CA1-Region im Hippocampus ändert sich im Monatszyklus und ist abhängig von lokaler Aromatase bzw. Estrogen (Prange-Kiel et al., 2008, Kretz et al., 2004). Ein aktuelle Studie (Zhou et al., 2010) konnte die früheren in vitro Erkenntnisse auch in vivo bestätigen. Hier wurde durch die systemische Applikation eines Aromatasehemmers (Letrozol) bei zyklischen und ovariectomierten Mäusen eine signifikante Reduktion der Spinesynapsendichte

beobachtet, sowie ein reduziertes Axonwachstum (von Schassen et al., 2006). Dies deutet daraufhin, dass lokal synthetisiertes, hippocampales Estrogen, nicht gonadales, verantwortlich ist für die zyklische Variation der Synapsendichte.

Auch GnRH hat einen stimulierenden Effekt auf die Synapsendichte im Hippocampus und führt zur Erhöhung des postsynaptischen Markers Spinophilin (postsynaptischer Marker), in beiden Fällen durch die Induktion der Estrogensynthese (Prange-Kiel et al., 2008). Es wurde zusätzlich eine Abhängigkeit der GnRH-Rezeptordichte von lokalem Estradiol festgestellt (Prange-Kiel et al., 2008). Eine Hemmung der Aromatase durch Letrozol führt zur Erhöhung der GnRH-Rezeptoren, welche durch Hinzugabe von Estrogen nicht aufhebbar ist (Prange-Kiel et al., 2008). Neueste, bisher noch unveröffentlichte Ergebnisse zeigen, dass die zyklische Synapsendichteänderung GnRH als Ursprung hat. Die Blockade von GnRH durch GnRH-Antagonisten führte dort zu einem signifikanten Synapsenverlust (Prange-Kiel et al., 2008)

Durch Hinzugabe von GnRH in hippocampale Kulturen wird die Estrogensynthese stimuliert (Prange-Kiel et al., 2008). Mit Regulation der Estrogensynthese durch GnRH wird auch die synaptische Plastizität im Hippocampus reguliert (Prange-Kiel et al., 2008).

Der Aromatase bzw. ihrem Produkt Estradiol wird eine Rolle in der Modulation des affektiven Verhaltens zugesprochen (Dalla et al., 2004, Alejandre-Gomez et al., 2007, Sinopoli et al., 2006). Neueste Ergebnisse belegen zusätzlich eine Beeinflussung der Langzeitpotenzierung durch Gabe eines Aromatasehemmers. LTP sind ein Teil der Prozesse, die mit Lernen und Gedächtnis verbunden sind (Grassi et al., 2009). Vermittelt wird dieser Effekt durch die NR2b- Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Verstärkte LTPs wurden wiederum kurz nach Estradiolbehandlung festgestellt (Smith und McMahon, 2005, 2006).

Der Aromatase wurde zusätzlich eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen, da sich in pathologischen Situationen die Anzahl Aromatasepositiver Astrozyten erhöht (Azcoitia et al., 2001, Garcia-Segura, 2008). Eine protektive Wirkung von Estrogen wurde hinsichtlich Morbus Alzheimer, bei Schizophrenie und Epilepsie bestätigt (Garcia-Segura et al., 2001).

Ob Aromatase oder Estradiol während der neuronalen Entwicklung wichtig sind, ist vorerst noch unklar. Bekannt ist, dass eine Hemmung der Aromataseaktivität die

Proliferation von dissoziierten hippocampalen Neuronen inhibiert (Fester et al., 2006). Eine Aromataseaktivität wurde zudem in radialen Gliazellen nachgewiesen, welche für die neuronale Migration (gliaabhängige Lokomotion) verantwortlich sind (Pellegrini et al., 2007, Garcia-Segura, 2008).

## 1.9 Reelin und Estrogen

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass im Hippocampus der Reeler-Mutante eine verminderte Spinesynapsendichte gefunden wurde (Nlu et al., 2004). Ob dieses Phänomen auch von Estrogen abhängig sind, wird zurzeit an unserem Institut untersucht. Zudem wurde in unserem Institut in einer vorausgegangenen Doktorarbeit herausgefunden, dass die Aromataseaktivität, das finale Enzym der Estrogensynthese, im Hippocampus der Reeler-Mutante inhibiert ist (bisher unveröffentlicht). Wie auch in früheren Ergebnissen bereits dargestellt wurde, ist eine Veränderung in der Expression der Estrogenrezeptoren in der Reeler-Mutante zu beobachten. Wie nach Behandlung mit Letrozol, einem Aromatase-Inhibitor (Prange-Kiel et al., 2003) ist der Estrogenrezeptor (ER)  $\alpha$  herunter reguliert und ER  $\beta$  herauf reguliert

Aktuell gibt es einige Hinweise für eine Verbindung zwischen Reelin und Estrogen. Die Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen kann durch exogenes Estrogen stimuliert werden, während eine Aromatasehemmung durch Letrozol die Reelin-Expression drosselt (Bender et al., 2010). Anders als bei der Reeler-Mutante, stellte sich jedoch nach Letrozolgabe keine gestörte kortikale Schichtung dar, sondern lediglich eine gestörte Synaptogenese (Bender et al., 2010). Desweiteren wurde eine deutliche Expression von ER  $\alpha$  in den Cajal-Retzius-Zellen gefunden.

Wie schon zuvor erwähnt, wurde eine Interaktion von Reelin mit Notch-1 bei der kortikalen Schichtenbildung herausgefunden. Die Reelin-Notch Interaktion ist involviert in das Neuritenwachstum migrierender Neuronen. Interessant ist, dass Notch1 ebenfalls durch Estradiol reguliert wird (Bender et al., 2010).

Zudem ist Estradiol in der Lage Langzeitpotenzierung in CA3-CA1-Synapsen zu induzieren (Foy et al., 1999). Dies ist nach neusten Untersuchungen auf eine Balance zwischen NMDA- und AMPA-Rezeptoren zurückzuführen (Smith und McMahon,

2005). Auch Reelin reguliert die Aktivität von NMDA-Rezeptoren und beeinflusst damit die Langzeitpotenzierung.

Estradiol wirkt außerdem über Cofilin auf das Zytoskelett (Krámar et al., 2009). Estrogen erhöht die Spinesynapsenkonzentration von F-Aktin und fördert seine Polymerisierung, welche mit LTP assoziiert ist. In diesem Zusammenhang wurde dargelegt, dass Estrogen die GTPase RhoA aktiviert und Cofilin phosphoryliert (inaktiviert). Ein Antagonist der RHOA-Kinase (ROCK) blockiert die synaptischen Effekte von Estrogen. Folglich agiert Estrogen als ein positiver Modulator des Signalweges RhoA > LIMKinase1 > Cofilin und beeinflusst damit das synaptische Zytoskelett (Krámar et al., 2009). Die LIMKinase1 ist auch ein wichtiger Bestandteil des Reelin-Wirkungspfads auf das Aktinzytoskelett (Chai et al., 2009).

In dieser Doktorarbeit wird die Verbindung zwischen Reelin und Estrogen, bezüglich der veränderten Fertilität der Reeler-Mutante (Caviness et al., 1972) und ihrer geringeren Nachwuchszahl untersucht.

## **1.10 Fragestellung und Vorgehensweise**

Vor diesem Hintergrund soll folgende Frage beantwortet werden:

Hat die Reelin-Mutation Auswirkungen auf die Reproduktionsorgane der Reeler-Mutante?

In der vorliegenden Arbeit soll diese Frage für das Ovar untersucht werden. Neben der Erfassung des ovariellen Zyklus stehen Untersuchungen zur Aromataseexpression im Fokus. Dies könnte möglicherweise die reduzierte Fertilität erklären.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Wildtyp: Black 6 C 57, Herkunft: Tierstall UK Eppendorf, Deutschland

Homozygote Reeler-Mutante:

Zucht aus der Verpaarung von Wildtyp-Mäusen (Black 6 C57, UK Eppendorf) und homozygoten Reeler-Mäusen (B6 C3 Fe a/a Reelin, Herkunft: Charles River Laboratory, Deutschland)

Verhältnisse im Tierstall:

Lichtrythmus: 7.00 - 19.00 Uhr Lichtphase, 19.00 - 7.00 Uhr Dunkelphase

Temperatur: 19 – 21°C

Luftfeuchte: 50 – 60%

Futtermittel: Trockenfutter Panacur + Ssniff R/M Haltung

Einstreu: Espenholz

Hygienekontrolle: Vierteljährlich

### **2.2 Methoden**

Es wurden 3 Methoden gewählt, um die Reproduktionsorgane der Reeler-Mutante zu untersuchen. Als Erstes wurden die Mäuse mittels PCR genotypisiert, um die homozygoten Reeler-Mutanten von den heterozygoten und den Wildtypmäusen zu unterscheiden.

Bei Beginn der Geschlechtsreife (frühestens 6.-8.Woche) wurde der Zyklus der Mäuse mit Vaginalabstrichen auf Länge und Regelmäßigkeit untersucht.

Diese Zykluskontrolle war zudem Grundvoraussetzung für die Untersuchung der ovariellen Aromataseexpression mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens und der Immunhistochemie.

## 2.2.1 Genotypisierung

Zur Sicherung, ob es sich bei der Maus um einen Wildtyp, eine heterozygote oder homozygote Reeler-Mutante handelt, wurde der Genotyp bestimmt. Die homozygote Reeler-Mutante ist zusätzlich ab der 2.-3. Woche an ihrer schwankenden Gangart zu erkennen.

Die PCR-Methode ist ein Verfahren, mit dem geringe Mengen an DNA amplifiziert und nachgewiesen werden können. Die Genotypisierung besteht aus der Materialgewinnung und -aufbereitung, der Vervielfältigung der DNA durch die PCR und schließlich der Anordnung der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese, wodurch die Zuordnung möglich ist. Alle Untersuchungen wurden von einer Negativkontrolle begleitet.

Für die Genotypisierung wird entweder ein Teil vom Mausschwanz oder vom Ohr als DNA-Quelle benutzt.

Zur Verdauung des Gewebes wird es mit je 200µl Puffer und je 5µl Proteinkinase K (rekombinant, PCR Grade, Firma: Roche) versetzt, anschließend gemischt, kurz zentrifugiert und dann bei 55°C bis zur vollständigen Zersetzung aufbewahrt.

Zur Weiterverarbeitung und Reinigung des Gemisches wird das Röhrchen bei 13 000 rpm für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand (ca. 180µl) wird in einen neues Röhrchen überführt und dort mit 20µl 5M NaCl (Verhältnis 1:10) und 450µl 100% Ethanol (Verhältnis 2,5mal, vorgekühlt auf – 20°C) versetzt. Alle Proben verweilen dann mind. 20 min bei – 25°C. Danach werden sie 15 min bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird nach Entfernen des Überstandes 3mal mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen (Auswaschen des Salzes). Beim letzten Durchgang wird etwas länger zentrifugiert (5min bei 13 000 rpm) und danach wird so viel Flüssigkeit wie möglich abpipettiert, sodass nur noch ein kleines Pellet im Reagenzgefäß verbleibt.

Je nach Temperaturverhältnissen im Labor werden die Proben 20-60min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend in 50µl purem Wasser (RNase und DNase freies Wasser) wieder aufgenommen.

Um die Aktivität der Proteinkinase K zu stoppen, werden die Proben entweder vor oder nach der Reinigungsphase für 10 min auf 95°C erhitzt.

Für die Vervielfältigung der DNA werden 3 Primer benutzt (Firma: Eurofins mwg/operon, Konzentration: 10µM).

**Tabelle 2.2.1.1 Bindungspunkte der verwendeten Primer**

<i>Nr.</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Temp.(°C)</i>
1	Int-for-wt	5' – GGT AGA ATA TAT GAG AGA GC – 3'	53,1
2	Int-rew-wt	5' – CAT AAA AAG AGG AAT GAA GC – 3'	51,2
3	Int-rew-rl	5' – GTC ATT TAA ATT TAA TTG ATG G – 3'	49,1

Zusammengestellt sind die 3 verwendeten Primer (D'Arcangelo et al., 1996, Chai, 2006), nummeriert (Nr.), mit der Bezeichnung (wt-Wildtyp, rl-Reeler), der Bindungssequenz und der spezifischen Wirktemperatur (Temp.) in Grad Celsius.

Der Genort für das humane Reelin-Gen befindet sich auf Chromosom 7 (7q22) (DeSilva et al., 1997, Royaux et al., 1997).

Primer 1 ist ein wildtypspezifischer, aufwärts der Laufrichtung gerichteter Primer. Er bindet an eine Sequenz 79 Basenpaare (bp) unter dem Bruchpunkt. Diese Sequenz fehlt im Genom der Reeler-Mutante.

Primer 2 ist ein zweiter, aufwärts gerichteter Primer. Er bindet eine Sequenz, die 176 Basenpaare abwärts des Bruchpunktes liegt. Diese Sequenz ist im Wildtypgenom vermutlich noch weiter entfernt.

Primer 3 ist ein abwärts der Laufrichtung gerichteter Primer. Er bindet an eine Sequenz, welche 187 Basenpaare aufwärts des Bruchpunktes liegt.

PCR-Amplifikate des Wildtyp-Reelin-Gens enthalten ein 266 Basenpaare großes Fragment und die der homozygoten Reeler-Mutante ein 363 Basenpaare großes Fragment. In heterozygoten Reeler-Mutanten werden beide Fragmente amplifiziert.

Es werden 2 µl Protein-Gemisch mit 6 µl Primer versetzt (3 µl je Primer), je nachdem ob für Wildtyp oder Reeler-Mutante. Damit die folgende Reaktion im Thermocycler

(Firma: Biometra) korrekt abläuft, müssen sich in jedem Reagenzgefäß genau 50 µl befinden. Folgende Rechnungen beziehen sich darauf.

Das PCR-Reaktionsgemisch enthält pro Reagenzgefäß 2µl dNTP (Nukleotidmix, Konzentration 10mM jeweils, Firma: Fermentas), 5µl Puffer (10fach Reaktionspuffer, Firma: Invitrogen), 5µl MgCl<sub>2</sub> (50mM, Firma: Invitrogen) und wird anschließend mit Wasser (H<sub>2</sub>O ultrapure) aufgefüllt, sodass 42 µl pro Röhrchen verbleiben. Erst kurz bevor das Gemisch zu den Proben gegeben wird, werden 0,2µl Taq-DNA-Polymerase (rekombinant, hitzestabil, Konzentration 5U/µl, Firma: Invitrogen) hinzugegeben. Alles wird gründlich vermischt und nun ausschließlich auf Eis transportiert. Das geforderte Reaktionsvolumen von 50µl ist somit erreicht und kann nun in den Thermocycler gegeben werden.

**Tabelle 2.2.1.2 PCR-Reaktionsprofil**

<i>Anzahl Durchläufe</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
1	94°C	60sek
35	94°C Denaturierung	30sek
	49°C Renaturierung	30sek
	72°C Elongation	30sek
1	72°C	600sek
1	4°C	Bis zur Entnahme

Das Schema veranschaulicht die Anzahl der Durchläufe (links) mit der entsprechenden Temperatur in Grad Celsius (Mitte) und Dauer in Sekunden (rechts). Die DNA wird zuerst auf 94°C erhitzt. Im Schritt der Denaturierung trennen sich die DNA-Doppelstränge, so dass nur noch Einzelstränge vorliegen. An diese lagern sich während der Renaturierung (Primerhybridisierungsphase) die Primer an. In der letzten Zyklusphase füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf (Elongation). Die DNA-Polymerase beginnt am 3'Ende des Primers, welcher nun den Anfang des neuen Einzelstranges bildet. Die Phase der Denaturierung, Renaturierung und Elongation wird 35mal wiederholt. Danach werden die Proben für 600 sek auf 72°C temperiert, um dann bis zur Entnahme bei 4°C zu verweilen.

Gelelektrophorese zur Analyse der PCR-amplifizierten DNA-Fragmente:

Die Auftrennung der PCR-Fragmente findet in einem 2%igen Agarosegel statt. Die Agarose wird in 0,5 TBE gelöst und ca. 5 min in der Mikrowelle aufgekocht, bis alles gelöst ist. Anschließend wird Ethidiumbromid (ethidium bromide aqueous solution 1% w/v, Firma: Serva) hinzugegeben und in ein Gelbett gegossen, in das Kämme eingesetzt sind.

Die Röhren aus dem Thermocycler werden mit je 10µl Lade-Puffer (5fach DNA Loading Buffer, blue, Firma: Bioline) bestückt und davon je 20µl pro Lauftasche eingebracht. In jede Lauftasche des Agarosegels kommen zusätzlich 5µl eines DNA-Größen-Markers (Rezept für 3 Taschen: 10µl 0,5 TBE, 2µl 1Kb-Marker (1 Kb Plus DNA Ladder, Firma: Invitrogen) und 3 µl Lade-Puffer. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 120V für ca. 1Stunde.

Durch die Färbung mit Ethidiumbromid werden die aufgetrennten Proteine als Banden im UV-Licht sichtbar. Das fertige Gel wird mittels „Electrophoresis Documentation and Analysis System 120“ von Kodak (UV-Licht) fotografiert.



Abbildung 2.2.1.1 Fotografie einer Genotypisierung unter UV-Licht (Chai, 2006):

Es sind 4 Spalten zu sehen. Links ist der 100bp DNA-Marker (L). Daneben ist die Bande einer Wildtyp-Maus (+/+ ) bei 266 bp. Die homozygote Reeler-Mutante weist eine Bande bei 363bp (-/-) und die heterozygote Reeler-Mutante beide Banden auf (+/-). Rechts ist die Negativkontrolle (C).

### Verwendete Lösungen:

Puffer zum Zersetzen der Mausschwänze/ Ohren:

100mM Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl) pH 8,5  
5mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)  
pH 8,0  
0,2% w/v Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)  
200mM Natriumchlorid (NaCl)

TBE (Rezept für 5faches TBE): 54g Tris Base  
27,5g Borsäure  
20ml 0,5M EDTA (PH 8,0)  
Auffüllen auf 1 Liter mit destilliertem Wasser  
(A.dest.)

Für 0,5faches TBE: 100ml 5faches TBE mit 900ml H<sub>2</sub>O verdünnen.

### **2.2.2 Vaginalabstriche**

Zur Untersuchung des Vaginalzyklus der Maus wurden Vaginalabstriche angefertigt, nach Pappenheim gefärbt und am Lichtmikroskop ausgewertet.

Die Abstriche der Mäuse werden mit ausgedünnten Wattestäbchen angefertigt. Sie werden in steriles PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) getaucht, vaginal eingeführt und schließlich wird der Abstrich auf einen Objektträger aufgebracht. Diese trocknen für mindestens 30 min. Die Abstriche wurden jeden Tag in einem festgelegten Zeitraum angefertigt, um eine Kontinuität zu gewährleisten.

Für die Auswertung der Abstriche wird nach Pappenheim gefärbt. Dafür werden die Objektträger auf eine Färbepbank gelegt und mit Hilfe einer Pipette mit May-Grünwald-Eosin-Methylenblaulösung beträufelt (Firma: Merck). Nach 3 min wird die gleiche Menge destilliertes Wasser dazu getropft. Dies wird nach 1 min abgegossen. Die Objektträger werden kurz in A.dest. abgespült und gelangen dann für 15 bis 20 min in Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (2ml auf 100ml A.dest., Firma: Merck).

Anschließend werden die Präparate in A.dest. abgespült und mit Filter-Papier (Firma: Schleicher & Schüll) abgepresst. Zum weiteren Entwässern werden die Präparate in 100% Ethanol getaucht. Die Präparate können nach 5 min im Xylol-Ersatz (XE-200, Firma: Vogel) mit Eukitt (Firma: O.Kindler) und Deckgläschen eingedeckt werden. Die Auswertung der gefärbten Abstriche findet unter dem Lichtmikroskop (Axiolab, Firma: Zeiss) statt.

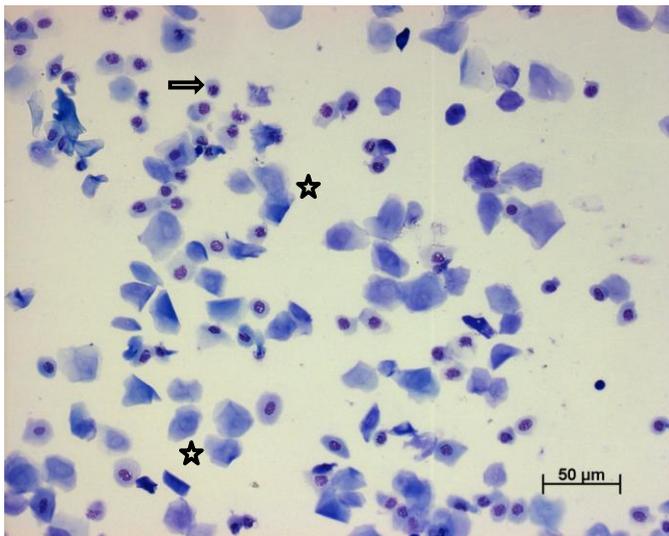


Abbildung 2.2.2.1 Vaginalabstrich gefärbt nach Pappenheim:

Die Zellkerne färben sich rötlich-violett, das Zytoplasma bläulich. Hier zu sehen: Vaginalabstrich in der Zyklusphase Proöstrus, mit vielen blau gefärbten, verhornten Epithelzellen (Stern) und einigen Epithelzellen mit rötlichem Zellkern (Pfeil).

Die Zykluskontrolle diente zum Einen zur Untersuchung der Regelmäßigkeit und der Verteilung der Zyklusphasen. Zum Anderen war sie essentiell für die weitere Untersuchung der Ovarien hinsichtlich der Aromataseexpression. Nur Ovarien der Zyklusphase Proöstrus besaßen ausreichend Proteinmenge um im Western Blot untersucht zu werden. Dies geht auf eine Arbeit von Stocco (2008) zurück. Er untersuchte die zyklusabhängige Aromataseexpression im Ovar der Ratte im Zusammenhang mit der hormonellen und molekularen Regulation. Erkenntnis seiner Arbeit war unter anderem, dass im Proöstrus mehr Aromatase in den präovulatorischen Follikeln vorhanden war, als in anderen Zyklusphasen. Dies stimmt mit der lang bestehenden Kenntnis über die Estrogenerhöhung kurz vor Ovulation überein. Gemeint ist der Zeitpunkt des Wechsels von Proöstrus zu Östrus, da diesem Wechsel eine Erhöhung von Aromatase vorausgehen muss. Diese Erkenntnisse wurden auf die Maus übertragen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit fanden aufgrund dieser Ergebnisse ausschließlich im Proöstrus statt und gewährleisteten damit auch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Ein weiteres Ergebnis der Arbeit von Carlos Stocco (2008) war, dass die Verteilung von Aromatase innerhalb des antralen Follikels adulter Mäuse nicht gleichmäßig ist. In der Immunhistochemie wurde die höchste Dichte an Aromatase in den randnahen Granulosazellen der Follikelperipherie entdeckt.

### **2.2.3 Entnahme der Ovarien**

Für die Entnahme der Ovarien werden die Mäuse anästhesiert oder mittels Trockeneis getötet. Der Bauchraum wird mit einem Längsschnitt entlang der Linea Alba eröffnet, danach folgt ein Entlastungsschnitt nach lateral auf Höhe des Rippenbogens. Anschließend werden die Ovarien freipräpariert und entnommen. Diese werden sofort in ein frisches Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann bei -80°C gelagert.

### **2.2.4 Immunhistochemie**

Mit Hilfe der Immunhistochemie werden die Ovarien der Reeler-Mutante und des Wildtyps hinsichtlich der Aromataseexpression untersucht.

Die Methode basiert auf der Anlagerung von Antikörpern, welche gegen Aromatase gerichtet sind. Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper binden an diesen Primärantikörpern. Unter UV-Licht werden die Schnitte fotografiert und die Stärke der Anlagerung beurteilt. Die Auswertung erfolgt mit dem Computerprogramm ImageJ (Siehe 2.2.6). Alle Untersuchungen wurden von einer Negativkontrolle begleitet.

Für die immunhistochemische Färbung werden Gefrierschnitte vom Ovar am Kryomikrom (HM560) angefertigt (12µm Schnittdicke, Objekttemperatur -21°C, Messertemperatur -18°C). Sie werden mit einem Objektträger aufgenommen und mind. 30 min getrocknet, bevor sie für 10min in Aceton fixiert werden. Auch danach wird wieder mind. 10min getrocknet. Die Schnitte werden bei -25°C gelagert.

Die eingefrorenen Schnitte werden zunächst für mind. 20 min aufgetaut und anschließend für 10 min getrocknet. Fixiert wird nun mit Paraformaldehyd 4% (PFA, gelöst in PBS) für 10 min. Danach wird 3mal für 5 min mit PBS gewaschen.

Die Schnitte werden in eine feuchte Kammer gelegt. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen werden sie mit 10% Normal Goat Serum (NGS, PBS als Basislösung, Firma: Sigma) benetzt, 100µl pro Schnitt. Nach 30 min wird es abgeschüttet und es folgt der Primärantikörper (Anti-Aromatase-Antikörper, gelöst in 3%iger NGS-PBS-Lösung, 100µl pro Schnitt). Die Präparate verbleiben über Nacht gekühlt in einer feuchten Kammer. Eine Blockierung mit 10%iger NGS-Lösung, wie auch die Blockierung der Pufferlösung war nötig, da in den Testreihen mit weniger NGS eine zu hohe Hintergrundfärbung entstand.

Am nächsten Tag wird 3mal für 5 min mit PBS gewaschen. Die folgenden Arbeitsschritte werden im Dunkeln abgefertigt.

Der Sekundärantikörper wird auf die Präparate gegeben (GAR – Goat anti rabbit). Nach 1 Stunde wird 2mal für 5min und 1mal für 10min mit PBS gewaschen. Zur Markierung der DNA werden die Schnitte für exakt 1 min in Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Verdünnung 1:1000) getaucht. Anschließend wird 2mal 5 min mit PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte mit A.dest. gewaschen wurden, wird mit Deckgläschen und Kleber eingedeckt (Dako, Fluorescent Mounting Medium). Die fertigen Objekte werden im Kühlschrank gelagert, bis die Deckgläschen fest auf den Objektträgern haften.

Photographiert werden die Schnitte am Konfokalen Mikroskop (Axiovert 100, MikroSystems LSM, Firma: Zeiss) in 40facher Vergrößerung, im UV-Licht mit Cy3-Filter. Die Fotos wurden mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

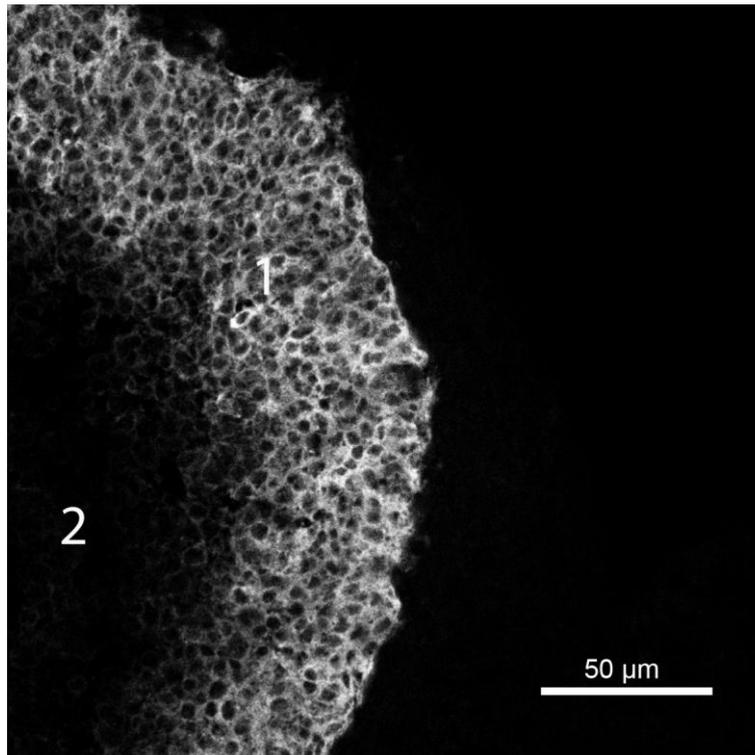


Abbildung 2.2.4.1 Ausschnitt vom Rand des Tertiärfollikels eines Wildtyps: Immunhistochemische Markierung der Aromatase und Cy3-Färbung. Photographiert wurden die Schnitte bei 40facher Vergrößerung unter einem Cy-3-Filter mit dem konfokalen Mikroskop. Markiert sind die Granulosazellschicht (1) und das flüssigkeitsgefüllte Antrum folliculare (2).

Verwendete Materialien:

PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung):

Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )+2H <sub>2</sub> O	17,8g
NaCl	16,0g

Lösen in 1,8 Liter A.dest., pH-Einstellung auf 7,4, anschließend mit A.dest. auf 2 Liter auffüllen.

Dapi: 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff,  
 Verdünnung 1:1000, Absorptionsmaximum (A<sub>max</sub>) liegt bei einer Wellenlänge von 358nm und das Emissionsmaximum (E<sub>max</sub>) bei 461nm

### Antikörper:

Primärantikörper: Anti-Aromatase-Antikörper (Garcia-Segura et al., 1999, Yague et al., 2006, 2008), polyklonal, Wirt: Hase, Verdünnung: 2:1000 in PBS mit 3% NGS

Sekundärantikörper: GAR: Goat-anti-rabbit (1:2 in Glycerol, Verdünnung 2:500), Cy3-konjugiert (Fluoreszenz, Amax: 550nm, Emax: 570nm), affinitätsgereinigt, Firma: Jackson Immuno Research Laboratories

## **2.2.5 Westernblot**

Mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens wurde das Aromatasevorkommen in den Ovarien der Reeler-Mutante und des Wildtyps untersucht. Dies geschah mit 2 Aromatase-Antikörpern: der GP1- und der Acris-Antikörper. Alle Untersuchungen wurden von einer Negativkontrolle begleitet.

Für das Verfahren wird das Ovar zerkleinert und die Proteine des Homogenats werden in einem Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die getrennten Proteine werden auf eine Membran übertragen. Die dadurch entstehenden Banden können nun mit Hilfe spezifischer Antikörperbindungen zugeordnet werden. Die fertigen Blots werden mit dem Computerprogramm ImageJ ausgewertet (Siehe 2.2.6).

### Aufbereitung der Ovarien:

Die eingefrorenen unfixierten Ovarien werden jeweils mit 192µl RIPA-Puffer und 8µl Proteaseinhibitor (Pi+EDTA) versetzt und auf Eis mit einem Glas-Homogenisator zerkleinert. Wenn das Ovar genügend zerkleinert ist, wird das Homogenat in ein Röhrchen überführt und ruht für 30min auf Eis.

Anschließend wird es für 20min bei 13000g (RCF) und 4°C zentrifugiert und der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt.

Das Material wird in mehrere Aliquots aufgeteilt, z.B. à 20µl, um zu verhindern, dass jedes Mal die gesamte Menge aufgetaut wird und die Proteine eventuell degradieren

könnten. Anschließend werden die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Bestimmung der Proteinkonzentration im Homogenat:

Die Proteinkonzentration wird mit dem Test nach Bradford bestimmt und erfolgt im Eppendorf Bio-Photometer. Diese Bestimmung der Gesamtproteinmenge ist nötig, um die Proben im Proteingehalt aneinander anzugleichen, damit eine exakte Messung der Aromataseexpression gewährleistet ist.

Für die Eichreihe misst man  $0\mu\text{g}$ ,  $1,25\mu\text{g}$ ,  $2,5\mu\text{g}$ ,  $5\mu\text{g}$ ,  $7,5\mu\text{g}$  und  $10\mu\text{g}$  BSA (Bovine Serum Albumin) in einem Volumen von  $800\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und  $200\mu\text{l}$  Biorad Protein Assay Reagenz (+  $1\mu\text{l}$  RIPA-Puffer im Probenansatz, um eventuelle Farbabweichungen, die durch den Puffer entstehen könnten, zu berücksichtigen).

Für die Messung der Probe setzt man ein:  $1\mu\text{l}$  Probe +  $800\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  +  $200\mu\text{l}$  Biorad Protein Assay. Es empfiehlt sich mindestens 3 Röhrchen pro Probe zu richten, um einen Mittelwert zu berechnen. Die Eichreihe und Proben werden mindestens 5 Minuten stehen gelassen, um dann die Absorption bei  $595\text{ nm}$  zu messen.

Für das Beschicken der Lauftaschen des Gels wurden jeweils  $15\mu\text{g}$  Proteingemisch in der entsprechenden Menge  $\text{H}_2\text{O}$  und Laemmli ProbenPuffer gemischt und für 5min auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Danach kühlt es kurz auf Eis ab.

Zur Identifizierung der genauen Proteingröße der Aromatase beim Gellauf, ließen wir bei den ersten Messungen eine Probe Ratten-Ovar mitlaufen.

#### Vorbereitung der Gelelektrophorese:

Für die optimale Auftrennung der zu untersuchenden Proteine (Aromatase,  $55\text{ kd}$ ) wird ein 10% Acrylamidgel verwendet.

Rezept für 4 Gele (10%):

Trenngel:	$\text{H}_2\text{O}$	8ml
	30% Acrylamid RotiphoreseGel 30 (37, 5:1)	6,6ml
	1,5M Tris-Puffer pH 8,8	5ml
	10% SDS	$200\mu\text{l}$
	10% Ammoniumpersulfat	$200\mu\text{l}$

	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	8µl
Sammelgel:	H2O	5,5ml
	30% Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	1,7ml
	0,5M Tris-Puffer pH 6,8	2,5ml
	10% SDS	100µl
	Bromphenolblau (in H2O gesättigt)	100µl
	10% Ammoniumpersulfat	100µl
	TEMED	10µl

Für das Trenngel und das Sammelgel gelten: Ammoniumpersulfat und TEMED werden erst unmittelbar vor dem Befüllen der Kammern zum Gemisch hinzugegeben. Zuerst wird das Trenngel fertig gemischt, unverzüglich in die Gelkammer eingebracht und mit Wasser beschichtet. Hier zeichnet sich nach ca. 20-30min deutlich eine Schicht zwischen Gel und Wasser ab. Das Wasser wird nach dem Auspolymerisieren entfernt.

Nun kann das Sammelgel gemischt und auf das Trenngel gegeben werden. Anschließend schiebt man vorsichtig einen Kamm hinein. Dieser formt die späteren Laufaschen. Nach 15-20 min ist das Sammelgel fest und der Kamm kann entnommen werden.

Die Gele werden nun in die Elektrophoresegelkammer eingebracht. Der Raum zwischen den Gelen wird mit Laemmli Proben Puffer sowie rund herum ca. 2-3 cm hoch gefüllt. Nun können die Taschen beladen werden.

Jede Tasche wird einzeln mit einer langen Pipettenspitze beladen. Für die spätere Bandenzuordnung wurde der Benchmark prestained protein ladder (Firma: Invitrogen, #10748-010) als Marker benutzt.

Die Proteine werden anschließend für eine Stunde bei 200V getrennt.

In der Zeit können die Filterpapiere (Firma: Whatman) in Semidryblotpuffer eingelegt werden (je Gel 2 dünne und 2 dicke Papiere).

Nach ca. einer Stunde können nun die fertigen Gele aus dem Gerät entnommen werden. Die Gelkammerplatten werden mit Hilfe eines Spatels auseinander gehiebt. Vom Gel wird der obere Teil (Sammelgel) mit einem Skalpell entfernt und verworfen.

#### Blot (Semi dry):

Um die Proteine des Gels auf eine Membran zu übertragen, werden die Gele wie folgt in die Transferapparatur (Firma: Bio-Rad, Semidry-Transfer-Cell) eingebracht:

1 dickes, 1 dünnes Whatman-Filterpapier, eine Membran, das Gel, 1 dünnes und 1 dickes Whatman-Filterpapier.

Es wird eine Nitrocellulosemembran BA 85 mit einer Porengröße von  $0,45\mu\text{m}$  benutzt (Firma: PROTRAN, Whatman). Die Membran und das Gel werden vor Platzierung kurz in Semidryblotpuffer getaucht. Die Übertragung der Proteine läuft bei 35V.

Nach einer Stunde werden die Gele verworfen und die fertig geblotteten Membranen für eine Minute in Ponceau S ROT (Firma: Sigma) getaucht, um die übertragene Proteinmenge zu überprüfen und zu markieren. Danach werden die Membranen vorsichtig mit Wasser gewaschen.

Anschließend werden die Membranen je nach Primärantikörper zurechtgeschnitten. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen werden sie mit 5%iger Milchpulverlösung (Bio-Magermilch-Pulver, Firma: Heirler, gelöst in 0,3% PBS Tween) für eine Stunde auf den Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Dieser Schritt wurde variiert und die Blockierung wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht belassen.

Es werden 2 verschiedene Primärantikörper gegen Aromatase eingesetzt:

- Monoklonaler Antikörper von Acris (Wirt: Maus)
- Polyklonaler GP1-Antikörper (Wirt: Meerschwein)

Der Primärantikörper wird mit 5%igem Milchpulver (gelöst in 0,3% PBS Tween) verdünnt und zu den Proben gegeben. Zur Kontrolle der verwendeten Proteinmenge wird der GapDH-Antikörper genutzt. Die Proben werden über Nacht gekühlt geschüttelt.

Am nächsten Tag wird der Primärantikörper entfernt und die Membranen werden 3mal für 10min mit 0,3%igem PBS Tween gewaschen.

Dann wird der Sekundärantikörper hinzugegeben, gelöst in Milchpulver-Lösung (5%iges Milchpulver, gelöst in 0,3% PBS Tween). Der Sekundärantikörper wird für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen.

Für die mit Acris-Aromatase- und GapDH-behandelten Proben wird der Anti-Mouse-Monoklonal-Sekundärantikörper benutzt (gelöst in 0,3% PBS Tween, Verdünnung 1:2500). Für die Proben, welche mit GP1 als Primärantikörper behandelt wurden, wird der Anti-Guinea-Pig-Antikörper sekundär hinzugegeben (Verdünnung 1:5000). Anschließend wird 3mal mit 0,3% PBS Tween gewaschen.

Entwickelt werden die Blots mit Pierce ECL Western Blotting Substrat. Die 1:1-Mischung wird flächendeckend auf die Membran pipettiert und nach einer Minute abgegossen. Nun werden die Blots in der richtigen Anordnung in die Entwicklungskassetten gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt (Firma: AGFA CRONEX 5). Der Röntgenfilm verbleibt für variable Zeiten auf dem Blot in der Kassette, um dann in der Entwicklermaschine entwickelt zu werden. Die fertigen Blots wurden eingescannt und mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

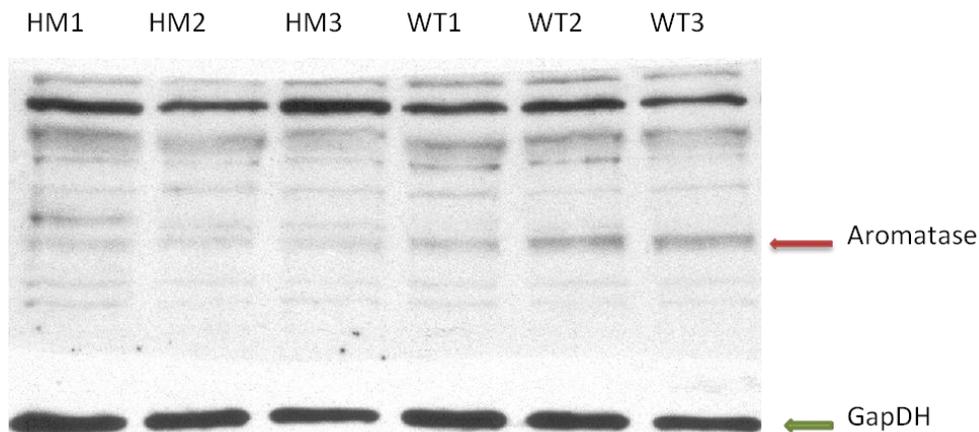


Abbildung 2.2.5.1 Scan eines Western Blots:

Jede Bahn (von oben nach unten) entspricht einer Maus, wobei das Ovar-Homogenat in Banden aufgetrennt vorliegt. Links 3 homozygote Reeler-Mutanten (HM 1-3) und rechts 3 Wildtyp-Mäuse (WT 1-3). Verwendet wurde der Aromatase-Antikörper GP1 und der GapDH-Antikörper, zur Bestimmung der Proteinmenge der jeweiligen Probe. Die Aromatase-Bande ist bei 55 kDA rot markiert und die GapDH-Bande grün markiert bei 36kDA.

### Verwendete Lösungen und Materialien:

#### Primärantikörper:

- Monoklonaler Aromatase-Antikörper, Cytochrom P450 19A1, Wirt: Maus, Firma: Acris Antibodies GmbH, Verdünnung 1:200
- Polyklonaler, nicht affinitätsgereinigter Aromatase-Antikörper aus dem Meerschwein (Guinea Pig 1= GP1), aus eigenem Labor, Immunisierung der Tiere durch die Firma Pineda, Verdünnung 1:500
- Anti-GapDH, monoklonaler Maus-Antikörper gegen Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (GapDH), Firma: Applied Biosystems/ Ambion, Verdünnung 1:20 000

#### Sekundärantikörper:

- Ziege-Anti-Maus IgG (H+L, monoklonal), Meerrettich-Peroxidase konjugiert, Firma: Jackson ImmunoResearch Laboratories, Verdünnung: 1:2500
- Peroxidase-konjugierter affinitätsgereinigter Esel-Anti-Meerschwein IgG (H+L), Firma: Jackson ImmunoResearch Laboratories, Verdünnung: 1:5000

#### RIPA Puffer:

150mM NaCl  
50mM Trisphosphat 7,5  
1% Nonidet P-40 (NP40)  
0,1% SDS  
0,5% Natriumdesoxycholat  
5mM EDTA

Frisch hinzugegeben wird ein Proteaseinhibitor (Firma: Roche, Pi complete, Konzentration 1:25, für das tatsächlich benötigte Volumen). Alle Schritte geschehen auf Eis.

5fach Laemmli ProbenPuffer: 0.5M Dithiothreitol (DTT)  
10% SDS  
0,4M Tris-HCl, pH 6,8  
49,5% Glycerin  
Spatelspitze Bromphenolblau

Semi-Dry Transfer-Puffer: 25 mM Tris-Base  
150 mM Glycin  
10% Methanol  
0,05% SDS

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4:  
150mM NaCl  
10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> +H<sub>2</sub>O

## 2.2.6 ImageJ

ImageJ ist ein Bildbearbeitungs - und Verarbeitungsprogramm. Es wurde am National Institut of Health in den USA entwickelt. Mit Hilfe dieses Programms fand die Auswertung der Immunhistochemie und des Western Blots statt.

Zur Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte wird die fluoreszenzmarkierte Aromatase-Antikörperbindung mit Hilfe des Programms in Graustufen übersetzt. Dadurch kann ein durchschnittlicher Grauwert einer ausgewählten Fläche gemessen werden. Bezeichnet wird dies als Integrated Density (Int Den). Der Int Den-Wert entspricht der Aromataseexpression.

Beim Westerblot wird mit Hilfe von ImageJ die Aromatase-Bande des jeweiligen Tieres untersucht. Hierfür wird die Bandenfärbung in eine Kurvenform übersetzt, wobei die Stärke der Färbung dem Ausschlag der Kurve auf der Y-Achse entspricht. Diese Peaks können dann miteinander verglichen werden. Die Maßeinheit der Aromataseexpression ist auch hier Int Den.

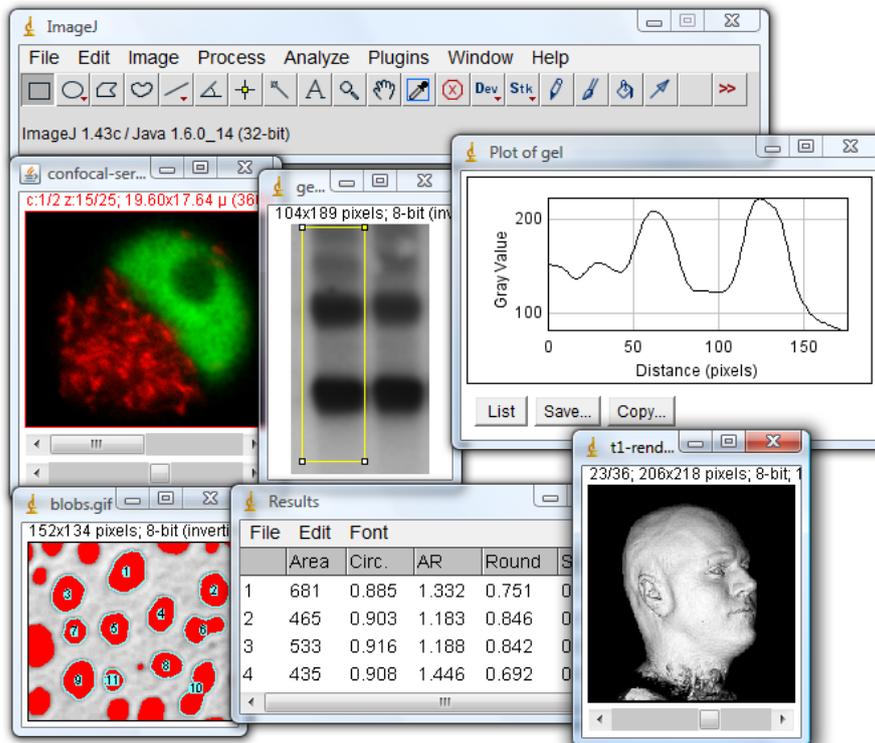


Abbildung 2.2.6.1 Darstellung des Programms ‚ImageJ‘ mit seinen Bildverarbeitungsmöglichkeiten (Quelle: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Ovarien und der gonadale Zyklus der Reeler-Mutante untersucht. Der Vaginalzyklus wurde täglich mittels Vaginalabstrichen erhoben. Die ovarielle Aromataseexpression wurde mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens und der Immunhistochemie analysiert.

#### 3.1 Vaginalzyklus

Während des Zyklus verändern sich Epithel und Lamina propria der Vagina und können daher zur Zyklusdiagnostik herangezogen werden. Innerhalb eines Zyklus wird das gesamte Epithel ausgetauscht.

Mit Hilfe von Vaginalabstrichen wurde der genitale Zyklus von insgesamt 8 weiblichen Reeler-Mutanten und 13 Wildtyp-Mäusen hinsichtlich der Regelmäßigkeit, Länge und Häufigkeitsverteilung der Zyklusphasen untersucht.

Der Vaginalzyklus der Maus gliedert sich generell in 4 Phasen: Diöstrus, Proöstrus, Östrus und Metöstrus (Nelson et al., 1982). Die Aufzählung entspricht auch der physiologischen Abfolge der Zyklusphasen. Alle Abstriche wurden nach Pappenheim gefärbt und in 20facher Vergrößerung fotografiert (Mikroskop: Zeiss, Axiolab 2).

Definition der Zyklusphasen (Nelson et al., 1982, Solberg, 2004):

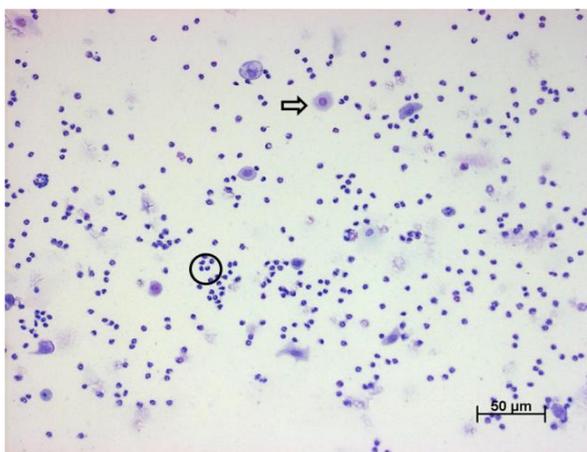


Abbildung 3.1.1 Diöstrus: Im Abstrich dieser Zyklusphase dominieren Leukozyten (Kreis) sowie einige unverhornte Epithelzellen (Pfeil).

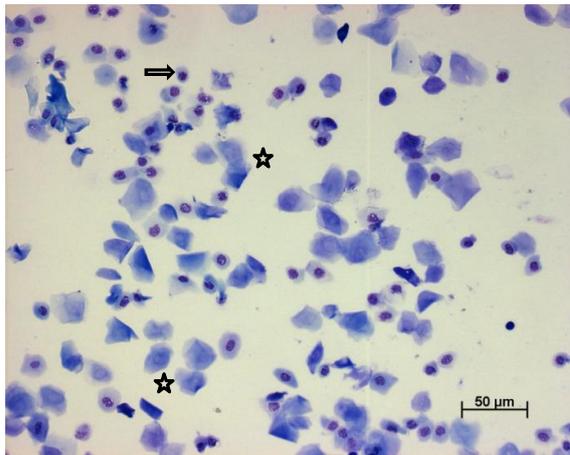


Abbildung 3.1.2 Proöstrus: Während des Proöstrus bestimmen verhornte Epithelzellen (Stern) und Epithelzellen (Pfeil) das Bild.

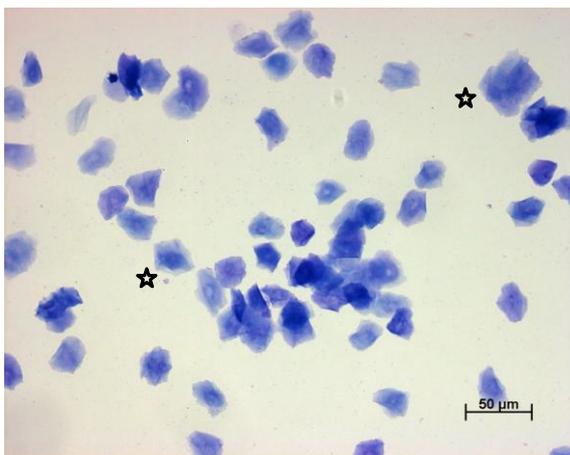


Abbildung 3.1.3 Östrus: Durch zunehmende Verhornung der Epithelschichten überwiegen in dieser Phase die verhornten Epithelzellen (Stern), Unverhornte kommen nur vereinzelt vor (nicht abgebildet). Die Ovulation erfolgt spontan etwa 2-3 Stunden nach Beginn des Östrus (Morrow, 1986).

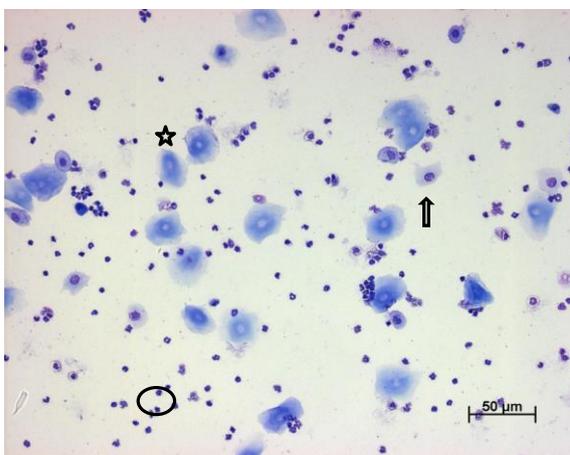


Abbildung 3.1.4 Metöstrus: Verhornte Epithelzellen (Stern) und Leukozyten (Kreis) bilden die Mehrheit. Es kommen vereinzelt Epithelzellen (Pfeil) vor.

## Beispielhafte Darstellung des Vaginalzyklus einer Reeler-Mutante und einer Wildtyp-Maus:

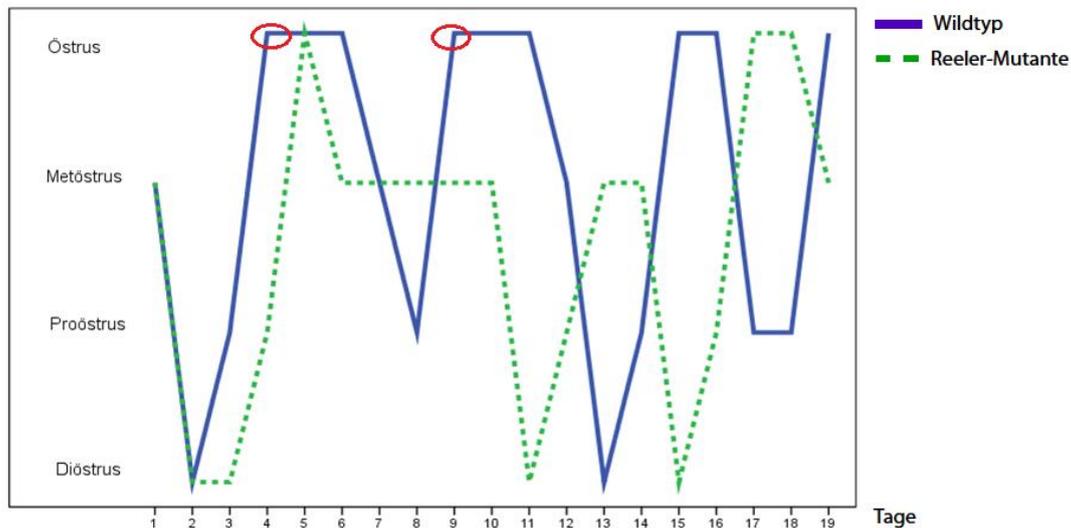


Abbildung 3.1.5 Genitaler Zyklus einer homozygoten Reeler-Mutante (grün-gestrichelt) und einer Wildtyp-Maus (blau). Dargestellt ist die Zyklusphase pro Tag über einen Zeitraum von 19 Tagen. Eine Zykluslänge entspricht der Entwicklung von Östrus zu Östrus (rot markiert). Bei Messunterbrechungen wurde die Entwicklungstendenz nachvollzogen.

Der genitale Zyklus der Reeler-Mutante weist in diesem Zeitraum knapp 3 Zykluswiederholungen mit unterschiedlicher Dauer von 4 und 8 Tagen auf. Es gibt eine Plateaubildung im Metöstrus (Tag 5-11) und eine unvollständige Zyklusentwicklung ohne Östrus (Tag 12-15). Die Wildtyp-Maus zeigt einen regelmäßigen Zyklus und knapp 4 Zykluswiederholungen mit Schwankungen in der Gesamtzykluslänge von 4 bis 6 Tagen. In der Literatur wird der Zyklus der Maus als polyöstrisch beschrieben, mit einer alters- und rasseabhängigen Dauer von 4-6 Tagen im Durchschnitt (Morrow, 1986).

Bei der Reeler-Mutante liegt ein unregelmäßiger Zyklus vor. Die Gesamtzykluslänge schwankt, wie auch die Länge der einzelnen Zyklusphasen. Die nächstfolgende Entwicklungsphase wird nicht immer erreicht. Der genitale Zyklus der Wildtyp-Maus variiert in der Gesamtlänge nicht so stark wie bei der Reeler-Mutante und weist keine Zyklusabbrüche auf.

Bei der Auswertung der Abstriche war auffällig, dass die der homozygoten Reeler-Mutante häufig nicht eindeutig einer Zyklusphase zu zuordnen waren. Es waren vielmehr Zwischenstufen der eigentlichen Zyklusphasen

### Zykluslänge im High-Low-Diagramm:

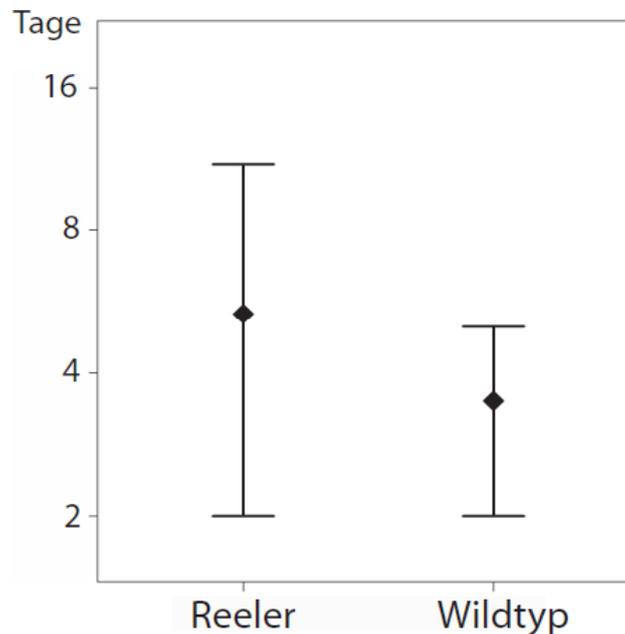


Abbildung 3.1.6 Mittelwert der Zykluslänge der homozygoten Reeler-Mutante (links) und der Wildtyp-Maus (rechts) in Tagen. Semilogarithmische Darstellung mit minimaler und maximaler beobachteter Zykluslänge. Basis sind Daten von 5 homozygoten Reeler-Mäusen und 4 Wildtyp-Mäusen. Als Zykluslänge gilt der Abstand zwischen 2 aufeinanderfolgenden Östrusphasen. Die Zykluslänge beträgt bei der Reeler-Mutante im Mittel 5,33 Tage mit einer maximalen Zykluslänge von 11 und einer minimalen von 2 Tagen. Beim Wildtyp liegt der Mittelwert bei 3,49 Tagen, mit einer maximalen Zykluslänge von 5 und einer minimalen von 2 Tagen.

### Tabelle 3.1.1 Häufigkeit der Zyklusphasen:

Zyklusphase	Wildtyp	Homozygote Reeler-Mutante
Diöstrus	18,04%	24,32%
Proöstrus	23,88%	17,36%
Östrus	43,76%	27,08%
Metöstrus	14,39%	31,23%

Häufigkeitsverteilung der Zyklusphasen der Wildtyp-Maus (links) und der Reeler-Mutante (rechts). Die Prozentzahlen sind der jeweilige Anteil der Zyklusphase an der gesamten Beobachtungszeit (Durchschnittswert von 13 Wildtyp-Mäusen und 8 Reeler-Mutanten).

Die Phase Östrus nimmt beim Wildtyp mit 43,76% die größte Zeit des Zyklus in Anspruch (rot). Der Proöstrus ist mit 23,88% vertreten, dicht gefolgt von Diöstrus mit 18,04% und dem Metöstrus mit 14,39%.

Bei der homozygoten Reeler-Mutante ist die am häufigsten vertretene Phase der Metöstrus mit 31,23% (rot). Östrus (27,08%) und Diöstrus (24,32%) nehmen einen ähnlichen Anteil am Gesamtzyklus ein. Das Schlusslicht bildet der Proöstrus mit 17,36%.

### **3.2. Aromataseexpression im Ovar**

Zur Untersuchung der Frage, ob die Abwesenheit von Reelin Auswirkungen auf Estrogensynthese im Ovar hat, wurde die Aromatase mit den Verfahren Immunhistochemie und Western Blot untersucht.

Für den Vergleich wurden die Ovarien von insgesamt 3 homozygoten Reeler-Mutanten und 3 Wildtyp-Mäusen untersucht. Dabei gelang jeweils ein Ovar des paarigen Organs in das Westernblot-Verfahren und eins wurde immunhistochemisch gefärbt.

In der Immunhistochemie wurde das Aromatasevorkommen gezielt in den Tertiärfollikeln untersucht, beim Western Blot wurde das Aufgebot im gesamten Ovar, als Homogenat, gemessen.

Die Ergebnisse beider Verfahren wurden anhand des Gemischten Modell-Verfahrens (hierarchisches Modell) auf Signifikanz getestet, um die Identitäten der einzelnen Mäuse zu berücksichtigen.

Die Auswertung fand unter den üblichen Kriterien statt:  $\alpha$ -Fehler wurde bei 0,05 vorher festgelegt und der p-Wert gilt als hochsignifikant bei  $< 0,001$ .

Der Vollständigkeit halber wurde auf Normalverteilung geprüft. Von dieser ist bei einer Probengröße von jeweils 3 Mäusen nur eingeschränkt auszugehen. Im Histogramm stellte sich die Verteilung als symmetrisch und eingipflig dar.

Die Erhebung der Daten erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die statistische Auswertung mit dem Statistikprogramm SPSS 14 und 18 für Windows.

### 3.2.1. Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung wurden Cryostatschnitte mit einer Dicke von 12µm große Scheiben verwandt. Die durch Antikörper markierte Aromatase wurde mit Hilfe eines Cy3-gebundenen Antikörpers sekundär sichtbar gemacht. Alle Messungen wurden von einer Negativkontrolle begleitet.

#### Schaubild eines Tertiärfollikels

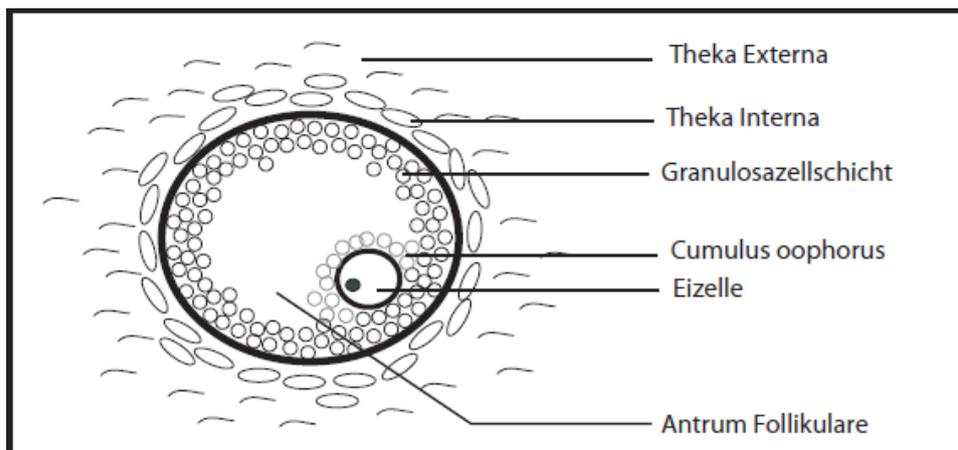


Abbildung 3.2.1.1 Schema eines Tertiärfollikels: Die Eizelle ist im Ovarium in Primordialfollikeln angelegt, welche sich durch den Einfluss von FSH (und LH) zyklisch über den Zustand des Primär- und Sekundärfollikels bis zum Tertiärfollikel weiterentwickeln. In diesem Stadium ist die Eizelle in einen Hügel aus Follikel epithelzellen, den Cumulus oophorus, eingebettet. Die Eizelle wird direkt von der Eihaut, die Zona pellucida und angrenzenden Zellen, der Corona radiata, welche sich radiär ausrichten, umschlossen. Das den Follikel auskleidende, mehrschichtige Epithel wird aus Granulosazellen gebildet. In ihnen werden mit Hilfe von Aromatase Androgene zu Estradiol umgewandelt. Im Inneren des Follikels ist das Antrum folliculi, ein Hohlraum gefüllt mit Liquor folliculi..

Den Follikel umgibt eine bindegewebige Schicht, welche in Theka Interna und Extrema unterteilt ist, wobei in der Theka Interna die Androgensynthese stattfindet.

#### Aromatasevorkommen im Tertiärfollikel

Bei der Betrachtung der gefärbten Ovarschnitte mit dem Axioskop ist ein Unterschied im Aromatasevorkommen zwischen homozygoter Reeler-Mutante und Wildtyp-Maus sichtbar. Auffallend war zusätzlich, dass die Ovarien der Reeler-Mutante im Ganzen kleiner waren.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Aromataseproduktion überwiegend in den antralen bzw. präovulatorischen Follikeln stattfindet. Desweiteren ist die Verteilung der Aromataseexpression innerhalb der antralen Follikel nicht gleichmäßig. Dieselben Beobachtungen machte auch Carlos Stocco (2008) bei der Untersuchung von Ratten bezüglich der ovariellen Aromataseexpression. In der Immunhistochemie wurde die höchste Dichte an Aromatase in den randnahen Granulosazellen der Follikelperipherie entdeckt. Die Granulosazellen nahe des Antrums sowie des Comulus zeigten deutlich weniger Aromatase-Immunreaktivität..

Dargestellt sind folgend ein Tertiärfollikel einer Wildtyp-Maus und einer homozygoten Reeler-Mutante. Ein deutlicher Unterschied, wie auf diesen Beispielbildern, war nicht bei allen Untersuchungen zu sehen. In anderen Follikelentwicklungsstadien war kein Unterschied zwischen Reeler-Mutante und Wildtyp unter dem Mikroskop erkennbar.

### Wildtyp

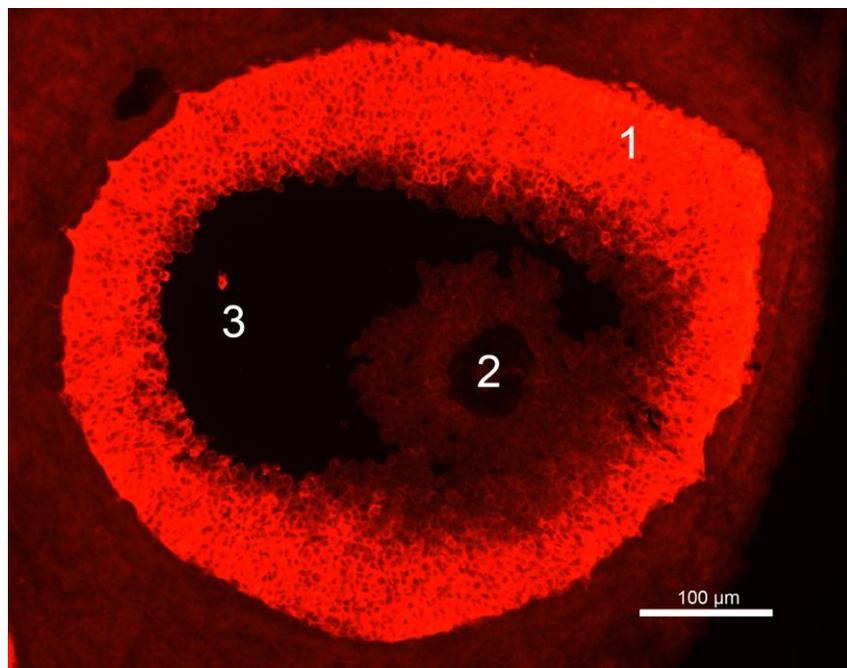


Abbildung 3.2.1.2 Tertiärfollikel einer Wildtyp-Maus: Immunhistochemische Markierung der Aromatase mit Hilfe des Anti-Aromatase-Antikörpers (Garcia-Segura et al., 1999, Yague et al., 2006,

2008), sowie sekundäre Cy3-Färbung (orange Färbung). Fotografiert in 20facher Vergrößerung am Axioskop mit Cy-3-Filter.

Das größte Aromatasevorkommen ist in der Granulosazellschicht (1). Die Granulosazellen sind über die ganze Schicht homogen gefärbt, mit einer Abschwächung im Bereich des Cumulus oophorus mit Eizelle (2). Das Antrum ist nicht gefärbt (3). Der Tertiärfollikel ist deutlich abgegrenzt von der unmittelbar anliegenden Theka Interna.

### Homozygote Reeler-Mutante

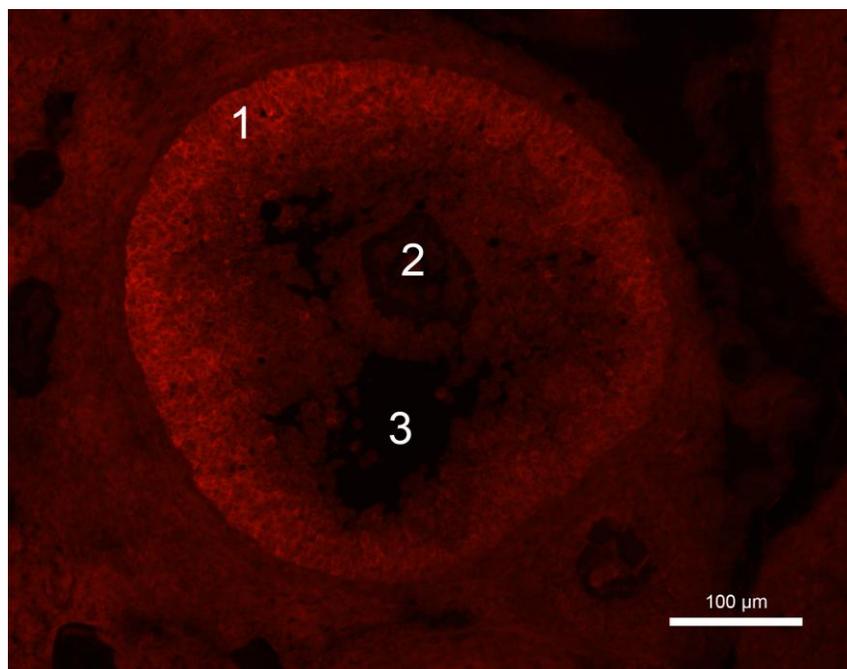


Abbildung 3.2.1.3 Tertiärfollikel einer homozygoten Reeler-Mutante: Immunhistochemische Markierung der Aromatase mit Hilfe des Anti-Aromatase-Antikörpers (Garcia-Segura et al., 1999, Yague et al., 2006, 2008), sowie sekundäre Cy3-Färbung (orange Färbung). Fotografiert in 20facher Vergrößerung am Axioskop mit Cy-3-Filter.

Die randbildenden Granulosazellen (1) des Follikels grenzen sich durch ihre Färbung von der umliegenden Thekazellschicht ab, sind jedoch schwächer angefärbt als bei der Wildtyp-Maus (Abb.3.2.1.2). In der Granulosazellschicht ist von außen nach innen eine Abstufung der Färbung zu erkennen. Auch hier sind die Eizelle, wie auch die umliegenden Zellen, schwächer (2) und das Antrum folliculare nicht gefärbt (3).

### Analyse der Aromataseexpression

Für eine genaue Analyse wurden die Schnitte mit einem konfokalen Mikroskop fotografiert und mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Im Folgenden sind Abbildungen von Randabschnitten der Tertiärfollikel einer Wildtyp-Maus und einer homozygoten Reeler-Mutante mit dem konfokalen Mikroskop zu sehen.

#### Wildtyp

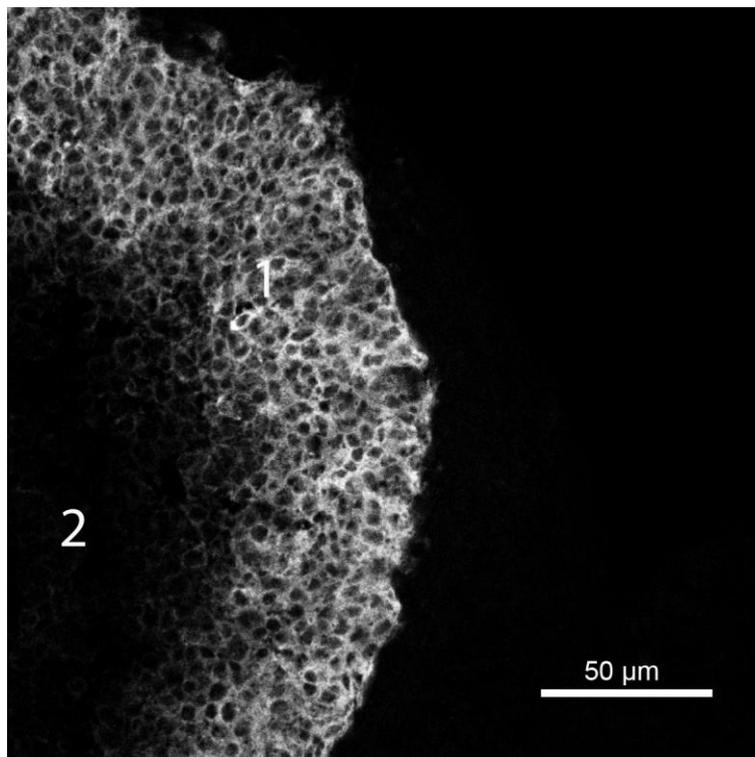


Abbildung 3.2.1.4 Ausschnitt vom Rand des Tertiärfollikels eines Wildtyps: Immunhistochemische Markierung der Aromatase und Cy3-Färbung. Photographiert wurden die Schnitte bei 40facher Vergrößerung und Cy3-Filter mit dem konfokalen Mikroskop.

Abgebildet ist die Granulosazellschicht (1), welche das flüssigkeitsgefüllte Antrum folliculare (2) umschließt. Die Granulosazellen sind stark angefärbt und nehmen zum Antrum hin etwas an Färbung ab.

## Homozygote Reeler-Mutante

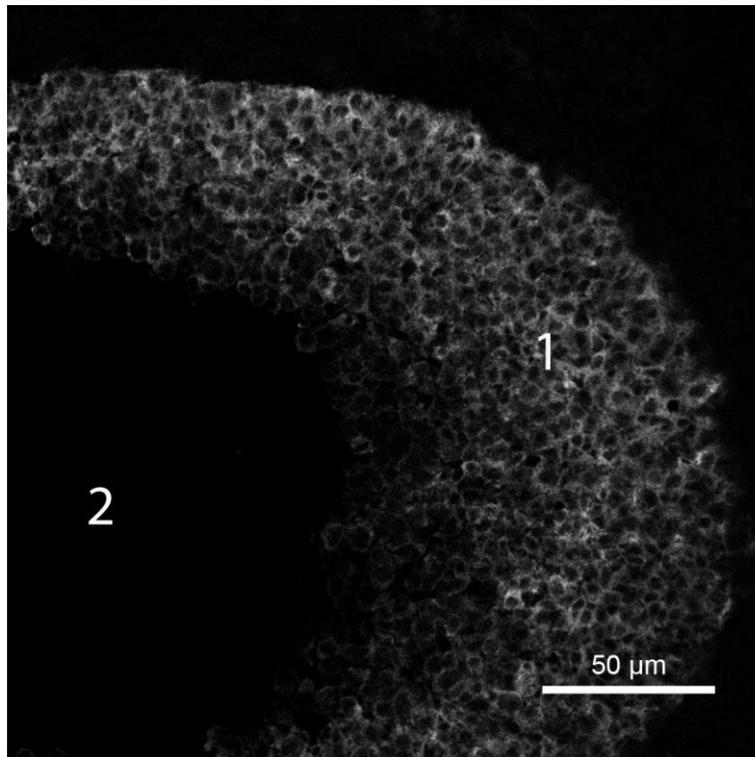


Abbildung 3.2.1.5 Ausschnitt von einem Tertiärfollikelrand einer homozygoten Reeler – Mutante:  
(Methode und Einstellungen wie beim Wildtyp, S. Abb. 3.2.1.4)

Auch hier ist die Granulosazellschicht (1) angefärbt und umgibt das nicht gefärbte Antrum (2). Die Färbung ist hier jedoch schwächer als beim Wildtyp.

### Auswertung mit ImageJ

Hier liegen 2 Datensätze vor, diese werden als IHC 1 und IHC 2 bezeichnet (Immunhistochemie 1. Versuch und 2. Versuch). Die Untersuchungen unterscheiden sich dadurch, dass bei der IHC 2 Ausschnitte des Tertiärfollikelquerschnitts und bei der IHC 1 der gesamte Tertiärfollikelquerschnitt untersucht wurden.

### Ergebnisse der Immunhistochemie IHC 1:

Im hierarchischen Modell ergab sich bei den Auswertungen der IHC 1 eine Differenz der Mittelwerte zwischen Reeler-Mutanten und den Wildtyp bei 1,47 mit einem 95%igen KI (Konfidenzintervall) von [1,25, 1,72] und einem p-Wert von  $< 0,001$ .

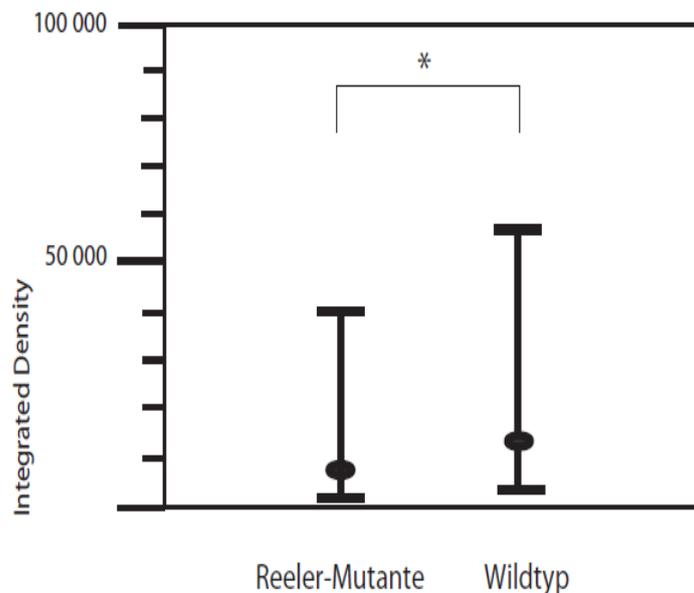


Abbildung 3.2.1.6: High-Low-Diagramm der Immunhistochemie IHC 1:

Abgebildet sind die Mittelwerte der Reeler-Mutanten und Wildtyp-Mäuse mit ihren Ober- und Untergrenzen in der Maßeinheit Int Den (Integrated Density). Dies entspricht der Aromatase-Antikörperbindung und damit der Aromataseexpression einer bestimmten Fläche (Details S. 2.2.6 ImageJ).

Die Messungen ergaben für die Aromataseexpression in den Tertiärfollikeln der homozygoten Reeler-Mutanten (links) einen Mittelwert von 8871 (Unter-/Obergrenze: 1914 / 41020) und beim Wildtyp (rechts) von 12971 (Unter-/Obergrenze: 2857 / 59020).

## Ergebnisse der Immunhistochemie IHC 2

Im hierarchischen Modell ergab sich bei der Testung IHC 2 ein Unterschied der beiden Gruppen vom Faktor 2,47 (95% KI [1,99, 3,08]), mit einem p-Wert von  $< 0,001$ .

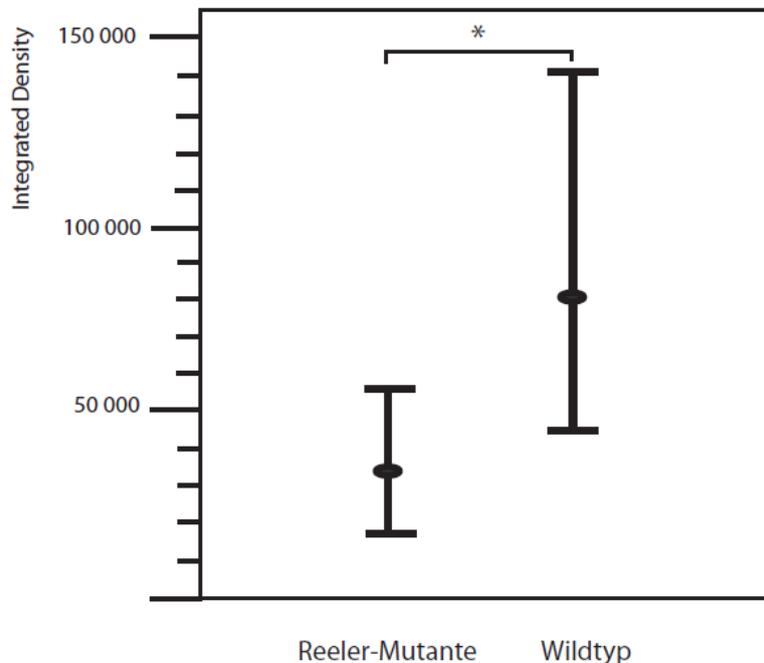


Abbildung 3.2.1.7 High-Low-Diagramm der Immunhistochemie IHC 2:

Abgebildet sind Mittelwerte der Reeler-Mutanten und Wildtyp-Mäuse mit ihren Ober- und Untergrenzen in der Maßeinheit Int Den (Integrated Density), wie bei IHC 1 (Abb. 3.2.1.6).

Der Mittelwert der Aromataseexpression der homozygoten Reeler-Mutanten betrug 32284 (Unter-/Obergrenze: 18578 / 56234) und der der Wildtypen 79799 (Unter-/Obergrenze: 44977/ 141579).

Die Ergebnisse der Testungen IHC 1 und 2 lassen sich nicht miteinander vergleichen, da der Messbereich keine fixe Skala darstellt, sondern sich bei jeder Messung neu definiert. Entscheidend sind die Relationen innerhalb der Messungen.

### 3.2.2 Western Blot

Dieses Verfahren ist mit 2 verschiedenen Aromatase-Antikörpern durchgeführt worden: der GP1-Antikörper und der Acris-Antikörper (siehe Material und Methoden). Die genaue Auswertung mittels ImageJ war nur mit dem GP1-Antikörper möglich, da sich unter dem Acris-Antikörper vereinzelt Doppelbanden darstellten, welche die exakte Analyse mit dem Programm behinderte (S. Abb. 3.2.2.3). Anstelle der Programmanalyse erfolgt eine deskriptive Beurteilung.

#### Western Blot mit dem GP1-Antikörper:

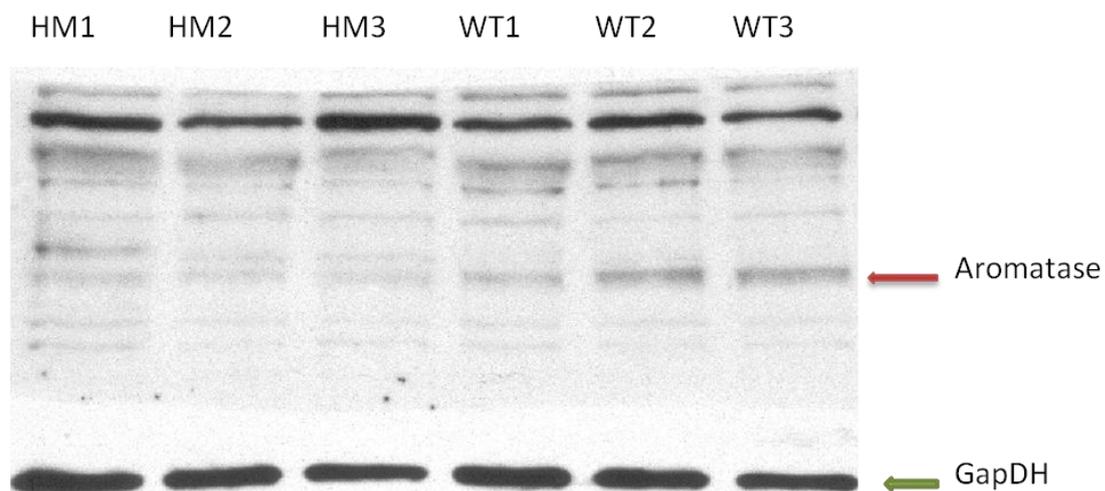


Abbildung 3.2.2.1 Scan eines Western Blots:

Es wurden von 6 Mäusen jeweils ein Ovar verwendet. Jede Bahn (von oben nach unten) entspricht einer Maus, wobei das Ovarhomogenat in Banden aufgetrennt vorliegt. Links 3 homozygote Reeler-Mutanten (HM 1-3) und rechts 3 Wildtyp-Mäuse (WT 1-3).

Verwendet wurde der Aromatase-Antikörper GP1 und der GapDH-Antikörper, zur Bestimmung der Proteinmenge der jeweiligen Probe. Die Aromatase-Bande ist bei 55 kDA rot und die GapDH-Bande grün markiert bei 36kDA.

### Auswertung der Western Blot-Ergebnisse:

Die Auswertung der Banden und damit die Messung der Aromataseexpression fand mit dem Programm ImageJ statt und wurde anschließend mit SPSS analysiert.

Grundlage der Ergebnisse sind 8 Blots von jedem Tier. Getestet wurde auf einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Gruppen (Reeler-Mutante/Wildtyp).

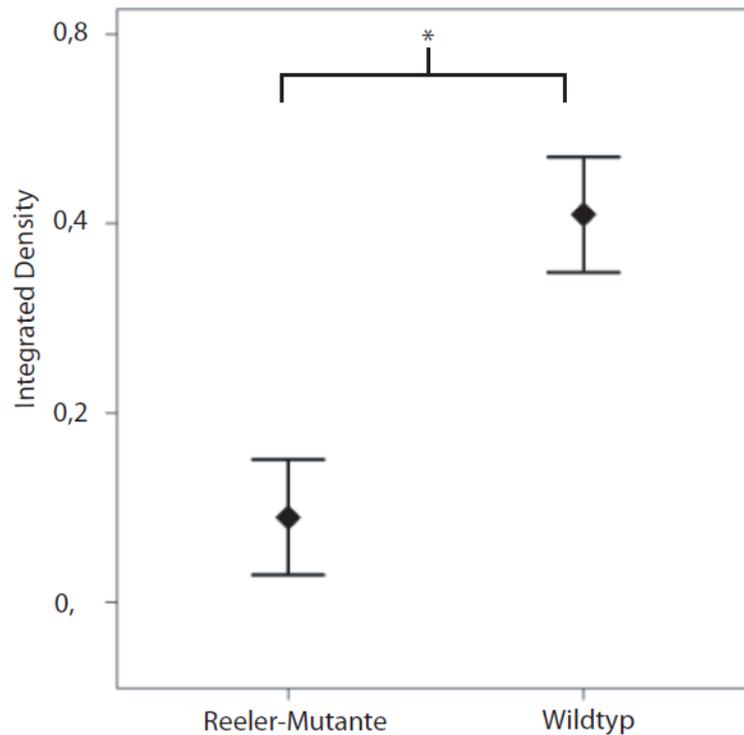


Abbildung 3.2.2.2 Analyse der Aromataseexpression im Western Blot-Verfahren:

Dargestellt sind die Mittelwerte der beiden Gruppen im High-Low-Diagramm in logarithmischer Skalierung in der Einheit Integrated Density (Int Den).

Der Mittelwert der Schätzer liegt bei den homozygoten Reeler-Mutanten (links) bei 0,14 (Unter-/Obergrenze 0,11 / 0,17) und bei den Wildtyp-Mäusen (rechts) bei 0,41 (Unter-/Obergrenze 0,34 / 0,51).

Im hierarchischen Modell ergab sich eine 3,03 fache Differenz zwischen den beiden Gruppen mit einem 95%igem KI von [2,25, 4,08]. Es stellte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei einem p-Wert von  $< 0,001$  dar.

### Westernblot mit dem Acris-Antikörper:

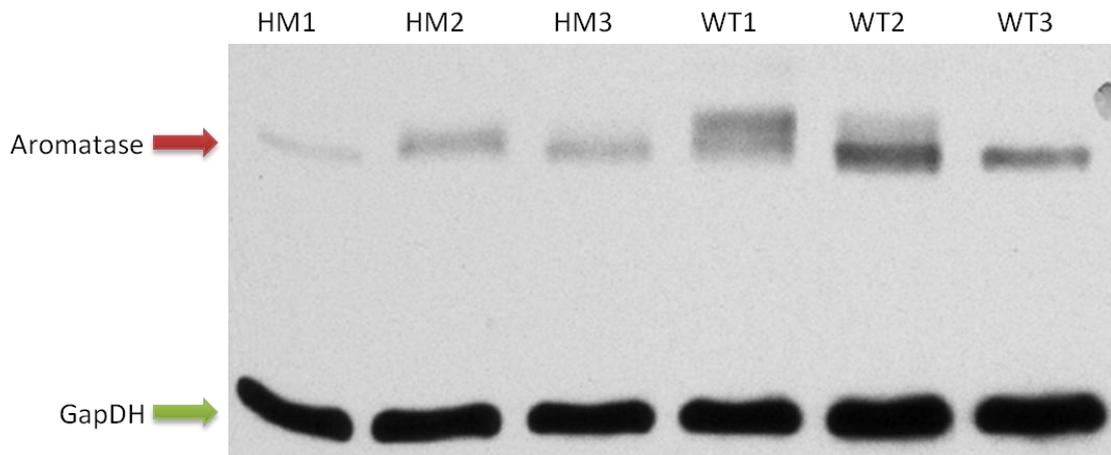


Abbildung 3.2.2.3 Scan eines Western Blots mit dem Aromatase-Antikörper ‚Acris‘:

Es wurde Material derselben Mäuse untersucht, welche auch mit dem GP1-Antikörper behandelt wurden (Abb. 3.2.2.1).

Jede Laufspur entspricht einer Maus. Untersucht wurden 3 homozygote Reeler-Mutanten (HM 1-3, links) und 3 Wildtyp-Mäuse (WT 1-3, rechts). Gekennzeichnet sind jeweils die Aromatase-Bande (55kDA) und die GapDH-Bande (36 kDA).

Die oben bereits erwähnte Problematik der Doppelbandenbildung ist hier bei der Aromatase-Bande von WT 1 und 2 zu erkennen. Die Aromatase-Bande ist dort nicht klar als einzelne Bande zu erkennen. Vielmehr sind es 2 Banden, bei der nicht mit völliger Sicherheit die richtige Aromatase-Bande identifiziert werden konnte. Für die Auswertung mit dem Programm ImageJ ist eine klare Abgrenzung der Bande notwendig, sodass hier das Programm nicht angewendet werden konnte. Was der Antikörper dort färbt, ob ein anderes Aromatase-Isotop oder ein anderes Gewebe, bleibt vorerst unklar. Dieses Phänomen der Doppelbanden-Bildung zeigte sich auch bei den anderen Messungen (insgesamt 5 Messungen).

Erkennbar ist die Tendenz der Ergebnisse: Die 3 homozygoten Reeler-Mutanten wiesen eine schwächere Färbung der Aromatase-Bande auf, als die der Wildtypen. Dies entspricht den Ergebnissen mit dem GP-1-Antikörper.

### **3.3 Weitere Beobachtungen und Zusammenfassung**

Weitere Beobachtungen im Zuge der Untersuchungen waren, dass die Reeler-Mutante nur eingeschränkt überlebensfähig ist. Ab der 2.-3. Lebenswoche nahm die Zahl der überlebenden Mäuse drastisch ab. Die Beobachtungen von Caviness et al. (1972) über die Verhaltensweise von Reeler-Mutanten in der Gruppe, wie auch deren Mobilität, konnten wir bestätigen.

In dieser Doktorarbeit wurden zusätzlich heterozygote Reeler-Mutanten mit den bekannten Methoden untersucht. Eine Heterozygotie der Reeler-Mutation führt nicht immer zur Ausbildung des Reeler-Phänotyps (Niu et al., 2004, Biamonte et al., 2009, Lombardero et al., 2007). Bei manchen Maus-Mutanten genügte eine Reduktion der Reelin-Konzentration um 50% um ein Phänomen auszubilden, bei anderen sind erst bei vollständigem Reelin-Mangel die typischen Reeler-Phänomene zu erkennen. Bei der Analyse der Vaginalabstriche war kein deutlicher Unterschied zwischen einer heterozygoten Reeler-Mutante und dem Wildtyp feststellbar. Auch in den anderen Verfahren fanden sich keine eindeutigen Ergebnisse. Deshalb wurde sich in dieser Arbeit auf die homozygoten Reeler-Mutanten konzentriert.

Zusammengefasst sind die Ergebnisse der Untersuchungen, eine signifikante Differenz in der Aromataseexpression in den Tertiärfollikeln (IHC) bzw. Ovar (WB) zwischen weiblichem Wildtyp und Reeler-Mutante sowie ein unregelmäßiger und verlängerter ovarieller Zyklus (mit veränderter Verteilung der Zyklusphasen) in der Reeler-Mutante.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Abwesenheit von Reelin im Organismus der Maus auf die Vorgänge im Ovar Einfluss hat. Sie führt zu einer Suppression der Aromataseproduktion in den Tertiärfollikeln des Ovars und dadurch zu einer Veränderung des gonadalen Zyklus. Wie diese Veränderung zustande kommt, ob Reelin direkt auf die Aromatase wirkt oder dies durch die veränderte Migration der GnRH-Neuronen im Gehirn hervorgerufen wird, wird weiter unten diskutiert (S. 4.2.3.1). Zusammengenommen jedoch könnten diese Veränderungen die verminderte Fertilität der Reeler-Mutante erklären.

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodische Überlegungen

Der genitale Zyklus der Reeler-Mutante ist unregelmäßig (Verlängerte Zyklusphasen, unvollständige Zyklusentwicklung), mit einer Gesamtlänge von 5,33 Tagen im Mittel und einer minimalen Länge von 2 und einer Maximallänge von 11 Tagen. Die Wildtyp-Maus zeigt eine Gesamtzykluslänge von 3,49 Tagen im Durchschnitt, mit Schwankungen von 2 bis 5 Tagen, ohne Zyklusabbrüche. Die Länge der einzelnen Zyklusphasen ist bei der homozygoten Reeler-Mutante anders verteilt (S. Tabelle 4.1.1). Bei der homozygoten Reeler-Mutante ist der Metöstrus die längste Phase des Zyklus und beim Wildtyp der Östrus.

**Tabelle 4.1.1 Häufigkeitverteilung der Zyklusphasen**

<b>Zyklusphase</b>	<b>Wildtyp</b>	<b>Reeler-Mutante</b>
Diöstrus	18,04%	24,32%
Proöstrus	23,88%	17,36%
Östrus	43,76%	27,08%
Metöstrus	14,39%	31,23%

Häufigkeitverteilung der Zyklusphasen der Wildtyp-Maus (links) und der Reeler-Mutante (rechts). Die Prozentzahlen sind der jeweilige Anteil der Zyklusphase an der gesamten Beobachtungszeit (S. Tab.3.1.1).

Grenzen der Methode:

Bei der Anfertigung des genitalen Abstriches ist eine Differenz in der Materialgewinnung durch die Mechanik und die individuelle Anatomie des Tieres möglich. Messlücken sind nur bedingt interpretierbar, jedoch wurde zur Anfertigung der Beispielkurven (S. Abb. 3.1.5) ihre Entwicklungstendenz veranschaulicht. Es ist möglich, dass durch die Größe der Messabstände (alle 24 Stunden) Zyklusentwicklungen nicht berücksichtigt werden konnten.

Es wurde zudem beobachtet, dass sich der genitale Zyklus von Tieren in Gesellschaft nach einem gewissen Zeitraum aneinander angleicht. Umgebungseigenschaften, wie

Schwankungen in Temperatur, Luftfeuchtigkeit etc. sind zu vernachlässigen, da sie auf beide Gruppen gleichermaßen wirken.

Bei der Auswertung der Abstriche war auffällig, dass die Abstriche der homozygoten Reeler-Mutante häufig nicht eindeutig einer Zyklusphase zu zuordnen waren. Es waren vielmehr Zwischenstufen der eigentlichen Zyklusphasen.

In beiden immunhistochemischen Nachweisen (IHC 1 und 2) wurde eine signifikante Differenz zwischen Reeler-Mutante und Wildtyp hinsichtlich der Aromataseexpression beobachtet. Bei der IHC 1 ergab sich eine Differenz der Mittelwerte von 1,47 (95%igen KI von [1,25; 1,72]) und bei der IHC 2 ein Unterschied vom Faktor 2,47 (95% KI [1,99; 3,08]).

Entscheidend bei den beiden immunhistochemischen Messungen sind die Relationen der Gruppen zueinander. Die Ergebnisse der beiden Messungen sind einzeln zu beurteilen und nicht miteinander vergleichbar. Der Unterschied zwischen den beiden Messungen bezüglich der Höhe der Differenz könnte jedoch auch darauf zurück zu führen sein, dass bei der IHC 2 Ausschnitte des Tertiärfollikelquerschnitts untersucht wurden und bei der IHC 1 der gesamte Tertiärfollikelquerschnitt. Entscheidend ist, dass in beiden Messungen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Aromataseexpression der beiden Gruppen zu ersehen ist.

Veränderung der Ergebnisse durch z.B. die Temperatur während der Bearbeitungszeit, die Antikörper-Verteilung auf dem Objektträger, Verweildauer im Strahl des konfokalen Mikroskops etc. sind zu vernachlässigen, da sie sich auf beide Gruppen gleichermaßen auswirken.

Auch im Western Blot wurde ein Unterschied zwischen Reeler-Mutante und Wildtyp festgestellt, mit einem höheren Aromatasevorkommen in der Wildtyp-Maus. Es ergab sich eine signifikante Differenz vom Faktor 3,03 (95% KI von [2,25; 4,08]).

Die Präparation der Ovarien für den Western Blot wurde akkurat durchgeführt. Jedoch sind eventuelle Messabweichungen, durch belassene Anteile von umliegendem Gewebe möglich. Auch hier können Schwankungen bezüglich der Messergebnisse auftreten durch Temperatur während der Bearbeitungszeit, die Antikörper-Verteilung auf den Blots, Belichtungszeit des Röntgenfilms etc..

Für die Untersuchungen des Aromatasevorkommens wurden insgesamt 3 homozygote Reeler-Mäuse und 3 Wildtyp-Mäuse untersucht. Dabei wurde jeweils ein Ovar des paarigen Organs immunhistochemisch und das andere mittels Westernblot-Verfahren untersucht. Alle Ovarien wurden in der derselben Zyklusphase (Proöstrus) entnommen, um dieselben Grundvoraussetzungen zu garantieren, da die Estrogenproduktion und damit die Aromataseexpression in den einzelnen Zyklusphasen variiert. Zu beachten ist, dass nicht beide Ovarien dieselbe Aromataseaktivität besitzen müssen.

Es wurden diese 2 Verfahren zum Aromatase nachweis gewählt, da sich im Western Blot das Vorkommen im gesamten Ovar untersuchen lässt. In der Immunhistochemie hingegen lässt sich die Aromatase gezielt in den einzelnen Strukturen des Ovars beobachten. Auch eine Beurteilung der Morphologie war möglich.

## **4.2 Reelin und Reproduktion**

### **4.2.1 Reelin und Estrogen**

Die Forschung an der Reeler-Mutante bezog sich überwiegend auf das Gehirn. Erst später wurden andere Organe bzw. die der Peripherie, auf das Auftreten von Reelin oder auf Veränderungen durch eine Reelin-Defizienz untersucht.

Bender et al. fanden aktuell (2010) einige Hinweise für eine Verbindung zwischen Reelin und Estrogen bzw. der Aromatase im Hippocampus. Sie untersuchten die Rolle von  $17\beta$ -Estradiol im Bezug auf die Reelin-Expression, wie auch die Synaptogenese im Gyrus dentatus. Dabei fanden sie heraus, dass die Cajal-Retzius-Zellen, welche Reelin synthetisieren, den Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) stark exprimieren. Die Applikation von exogenem Estrogen in hippocampalen Slice-Kulturen führte zu einem Anstieg der Reelin-Expression in den Cajal-Retzius-Zellen. Dieser Effekt ließ sich wiederum durch eine Blockade von Estrogenrezeptoren aufheben. Auch eine Blockade der Aromatase durch Letrozol führte zu einer reduzierten Reelinexpression. Dies hat wiederum Störungen in der Synaptogenese zur Folge, nicht aber in der neuronalen Migration.

In hippocampalen Neuronen der Reeler-Mutante wurde eine veränderte Expression der Estrogen-Rezeptoren beobachtet (bisher nicht veröffentlicht), Wie nach Hemmung der Aromatase durch Letrozol (Prange-Kiel et al., 2003) ist der ER  $\alpha$  herunter und ER  $\beta$  herauf reguliert. Weitere, bisher unveröffentlichte Ergebnisse einer Doktorarbeit unseres Institutes demonstrieren zusätzlich, dass die Aromatase im Hippocampus der Reeler-Mutante inhibiert ist.

Die Arbeitsgruppe von Biamonte et al. (2009) untersuchte Beziehungen von neuroaktiven Steroiden und Reelin im Wildtyp und in der heterozygoten Reeler-Mutante im Bezug auf die Anzahl von Purkinje-Zellen im Cerebellum. Sie fanden eine Reduktion von Purkinje-Zellen in den männlichen Heterozygoten, welche sich durch Behandlung von  $17\beta$ -Estradiol wieder anheben ließ. Desweiteren stieg die Reelin-mRNA-Expression nach Behandlung mit  $17\beta$ -Estradiol in den männlichen Heterozygoten. Nach Gabe eines Estrogen-Antagonisten (Tamoxifen) war eine Reduktion von Purkinje-Zellen nur in den weiblichen Mäusen feststellbar.

Estrogen und Reelin interagieren beide mit Lipoproteinen bzw. ihren Rezeptoren. ApoE und seine Rezeptoren spielen hierbei eine besondere Rolle. ApoE-Polymorphismen erhöhen das Risiko für eine Demenz-Erkrankung (Cheng et al., 2007).

Estrogen scheint einen protektiven Effekt auf Synapsen und Gedächtnis zu haben, wie z.B. bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer Demenz (Blanc et al., 2010, Członkowska et al., 2003). Rezente Studien belegen, dass dieser Effekt auf einer Interaktion von Estrogen und ApoE4 beruht. Estradiol stimuliert das Neuritenwachstum und die Abgabe von glial synthetisiertem ApoE. Das durch Estrogen induzierte Neuritenwachstum benötigt ApoE. Zudem erhöhte eine Estradiolgabe in OVX-Mäusen neben der ApoE-Expression, auch die von LRP (Lipoproteinrezeptor-related-Protein) (Cheng et al., 2007) und Synaptophysin im Gehirn (Struble et al., 2007, Gibbons et al., 2011).

Apo E spielt eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung und Verteilung von Lipoproteinen und Cholesterol (Raber, 2004). Es gibt 3 bekannte ApoE-Isoformen (2,3,4). Sie unterscheiden sich in den Cystein- und Arginin-Vorkommen an Position 112 und 158 und in ihren metabolischen Prozessen (Mahley and Huang, 1999). ApoE4 (Arg-112, Arg-158) bindet an den LDL-Rezeptor und ist assoziiert mit erhöhten

Cholesterolkonzentrationen. Außerdem zeigt es eine Lipoprotein-Präferenz für VLDL.

ApoE ist in Prozesse des Neuritenwachstums und Neuroprotektion involviert (Mahley, 1988). Diese Effekte werden wahrscheinlich durch die Bindung von ApoE an das LDLR-related Protein (LRP) moduliert und involviert dabei den Androgen-Rezeptor (Holtzman et al., 1995; Nathan et al., 2002). ApoE4 reduziert die Androgenbindung an den Androgenrezeptor. Die Grundlage der Androgen-Therapie bei Alzheimer ist, dass die Bindung von Androgenen an den Androgen-Rezeptor die Bindung von ApoE antagonisieren könnte. Dies könnte sich protektiv gegenüber der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen auswirken.

ApoE und Reelin binden beide an Lipoprotein-Rezeptoren (Herz und Chen, 2006) und funktionieren als Komponenten der neuronalen Signalübertragung (Rogers und Weeber, 2008). Reelin und ApoE modulieren zusätzlich hippocampale LTPs und wirken auf AMPA und NMDA-Rezeptoren, welches im Zusammenhang mit der Entstehung von Alzheimer wichtig ist (Seripa et al., 2008). Reelin bindet an den Lipoprotein-Rezeptor ApoER2. Die Interaktion von ApoER2 und Reelin ist an Prozessen der Neuronenmigration während der Gehirnentwicklung sowie bei der Modulation der synaptischen Plastizität im adulten Gehirn beteiligt. In der ApoER2-defizienten Maus kommt es zu einem Reeler-ähnlichen Phänotyp mit neuronalen Migrationsstörungen (D'Arcangelo et al., 1999).

Miettinen et al. (2005) untersuchten den Zusammenhang zwischen einem Genotyp, welcher mit dem Auftreten der familiären Alzheimerform (AD) (APP/PS1) und der Reelinkonzentration verbunden ist. Zusätzlich wurden die Tiere mit einem Second-Risk-Faktor für das Auftreten von Alzheimer belastet: der Ovariectomie (OVX). In OVX-Mäusen war die Zahl der Reelin-exprimierenden Zellen (Cajal-Retzius-Zellen, hippocampale Interneurone) signifikant reduziert, in den Mäusen mit dem AD-Genotyp ohne OVX nicht signifikant. Eine zusätzliche Hemmung der gonadalen Hormone führte jedoch nicht zu einer weiteren Abnahme von Reelin-positiven Zellen. Die Arbeitsgruppe schloss aus diesen Untersuchungen, dass Veränderungen in Reelin-produzierenden Zellen an Störungen von Reparaturmaßnahmen gekoppelt sind, in

welche APP/PSI und gonadale Hormone, wie z.B. bei der Pathogenese von Alzheimer involviert sind.

Es wurde jedoch nicht nur der Estrogenstoffwechsel in Bezug auf Reelin, sondern auch der des Testosterons untersucht. Auch hier gibt es Vermutungen über eine Interaktion. Es gibt bisweilen nur wenige Studien zum Thema Testosteron und Reelin und die bisherigen Forschungen weisen teils divergierende Ergebnisse auf.

Untersuchungen am europäischen Star von Absil et al. (2003) zeigten, dass der Hirnkern, welcher den Gesang der Tiere kontrolliert (HVC) und der Nucleus uvaefornis Reelin positiv sind. In der Studie wurde die Reelin-Expression in diesen und anderen Hirnregionen gemessen, mit und ohne Zugabe von exogenem Testosteron. Die Reelinexpression war nach Testosterongabe im HVC und im Nucleus uvaefornis stark reduziert.

In einer anderen Studie über den Zusammenhang von Reelin und dem Gesang-Kontrollsystem vom Singvögel (Serinus canaria) im Bezug auf ihre saisonale Plastizität, wurde jedoch kein Effekt von Testosteronbehandlung auf die Dichte von Reelin-positiven Strukturen gefunden (Balthazart et al., 2008)

Die 2 im Folgenden vorgestellten Studien beschäftigen sich nicht mit der direkten Interaktion von Reelin und Estrogen, sind jedoch in einem anderen Zusammenhang interessant.

Die Arbeitsgruppe von Stein et al. (2010) befasst sich mit dem Zusammenhang von Reelin und seiner Rolle bei der Prognose von Brustkrebs. Sie fanden heraus, dass Reelin im luminalen Epithel und im Myoepithel der normalen Brust exprimiert wird, nicht aber in der von Krebs befallenen. Es gibt eine Korrelation zwischen dem Verlust von Reelin im Gewebe und reduziertem Überleben sowie positivem Lymphknotenstatus bei Brustkrebs.

Beim ‚Triple negativen‘ Brustkrebs (ER-, PR- (Progesteronrezeptor) und HER2- (Human Epidermal Growth Faktor Rezeptor 2) -negativ, welche nicht für Tamoxifen- und Herceptin-Therapie zugänglich sind) gibt es die Option einer Chemotherapie mit Decitabin. Dieses methyliert Estrogenrezeptoren, welche durch Methyl- oder Histon-Gruppen-Besetzung inaktiviert sind. Dadurch sind sie wieder zugänglich für eine Tamoxifen-Behandlung.

In dieser Studie wurde ein Bezug zwischen Reelin und der Promotormethylierung vor und nach Decitabine-Behandlung untersucht. Sie fanden eine umgekehrte Korrelation zwischen der Promotormethylierung und der Reelin-Expression. Folglich erhöht eine Demethylierung durch Decitabine die Expression von Reelin mRNA. Zusätzlich supprimiert eine Reelin-Überexpression sowie eine Behandlung mit rekombinantem Reelin die Zellmigration als auch die Invasivität im tumorösen Gewebe.

Lintas et al. untersuchten (2010) die Methylierung des Reelin-Promotors vor und nach Pubertätsbeginn, sprich in Abhängigkeit von der Ausschüttung der Geschlechtshormone. Es wurde die Reelin-Promotormethylierung prä- und postpuberal in temperokortikalem Gewebe gemessen. Es stellte sich heraus, dass im Gegensatz zum präpuberalen, es im postpuberalen Gewebe eine starke DNA-Methylierung am Reelin-Promoter gibt. Geschlechtshormone scheinen die DNA-Methylierung am Reelin-Promotor zu erhöhen.

Die Reelin-Expression könnte demnach durch die Promotor-Methylierung in Brustkrebszellen kontrolliert werden (Stein et al., 2010). Zum anderen erhöht das Auftreten der Sexualhormone im Gehirn die Methylierung des Reelin-Promotors (Lintas et al., 2010).

#### **4.2.2 Reelin und männliche Infertilität**

Das Aromatase- oder Estrogen-Vorkommen wurde in den Ovarien der Reeler-Mutante bisweilen noch nicht untersucht. Deshalb ist das einzige vergleichbare Ergebnis, das der Arbeitsgruppe von Coriboni et al. (2005), welche die Hoden von 2 männlichen Reeler-Mutanten in Paraffinschnitten auf Veränderungen untersuchten. Sie fanden eine Dilatation der Tubuli Seminiferi und eine Reduktion ihrer Dichte im Vergleich zum Wildtyp. Die Spermatogenese schien in beiden Tiergruppen vollständig zu funktionieren. Sertoli-Zellen waren vorhanden und es war keine Hypoplasie, aber eine sichtbare Reduktion der Leydig-Zellen zu sehen. Durch die fehlende Hypoplasie vermutete die Arbeitsgruppe, dass es sich eher um einen hypogonadotrophen Hypogonadismus handelt, als um intrinsische Defekte des Hodens (Mason et al., 1986; Corradi et al., 2003). Die gonadalen Veränderungen werden hier in Zusammenhang

mit der reduzierten Fertilität der Reeler-Mutante gesetzt. Diese These entspricht dem Krankheitsbild des Kallman Syndroms, wobei es durch eine Migrationsstörung der GnRH-Neuronen und olfaktorischen Axone in den Bulbus Olfactorius zur Anosmie und hypogonadotropen Hypogonadismus mit Hoden- bzw. Ovarialhypoplasie kommt (Kallmann et al., 1944). Die Reeler-Mutante zeigt demnach ein ähnliches Bild.

Es beschäftigten sich noch andere Arbeitsgruppen mit dem Thema Reelin und männlicher Infertilität. Es gibt 2 Studien, die sich mit der Spermienentwicklung und dem Lipoprotein-Rezeptor ApoER2, einem Bestandteil der Reelin-Signalkette, beschäftigten. Cariboni et al. (2005) fanden keine deutliche Veränderung der Spermienogenese der Reeler-Mutante. Ihrer Theorie nach liegt der Infertilität eine Störung der Hypothalamus-Hypophysenachse zugrunde. Jedoch wurde in ApoER2-Knockout-Mäusen keine Migrationsstörung der GnRH-Neurone beobachtet (Cariboni et al., 2005).

Andersen et al. belegten 2003, dass ApoER2 ein wichtiger Faktor bei der Spermienentwicklung ist. ApoER2 ist involviert in die Expression von Clusterin und Phospholipid Hydroxyperoxid Glutathion Peroxidase (PHGPx), welche für die Spermienentwicklung zuständig sind. In ApoER2-Knockouts fanden sich reduzierte PHGPx-Level, welche zu anormaler Spermienmorphologie und Immotilität und damit zur Infertilität führten. Auch hier wurden keine Unterschiede in Gewicht, Größe oder Gewebemorphologie der Hoden sowie Nebenhoden zwischen den Knockouts und Wildtyp-Mäusen gefunden.

Laut dieser Studie spielt ApoER2 eine wichtige Rolle bei der Expression von spermalem PHGPx im Nebenhoden. Ein Fehlen führt zu strukturellen sowie funktionalen Defiziten der Spermien-Mitochondrien und zur Zellvolumendysregulation. Dies mündet in Immobilität der Spermien und somit in männlicher Infertilität.

ApoER2 beeinflusst noch über einen anderen Weg die Spermienmotilität. ApoER2 reguliert die Aufnahme von Selenium in Gehirn und Hoden der Maus über die Endozytose vom Selenoprotein P (Sepp1). Eine Defizienz von ApoER2 oder Sepp1 münden in hypomotilen Spermien und Infertilität (Masiulis et al., 2009).

Es wurde herausgefunden, dass in den Hoden mit Hilfe der Aromatase Estrogen produziert wird (O'Donnell et al., 2001). Auch ER  $\alpha$  und  $\beta$  sind in testikulären Zellen

und epididymalem Epithel vorhanden (Carreau und Hess, 2010). Desweiteren wurde herausgefunden, dass die Spermienmotilität in ER  $\alpha$ -mutierten Mäusen gestört ist (Joseph et al., 2010). Diese Spermiendefekte sind nicht intrinsisch, sondern am wahrscheinlichsten durch ein verändertes Milieu im Nebenhoden bedingt.

In einer Studie von Allan et al. (2010) wurde herausgefunden, dass Estradiol die Spermatogenese induziert und zirkulierendes FSH erhöht. Mit ER  $\alpha$ - und  $\beta$ -Knockout-Mäusen testeten sie den Einfluss von Estrogen auf den Hoden. In der Wildtyp-Maus und in der ER $\beta$ -Knockout, nicht aber in der ER  $\alpha$ -Knockout, erhöhte eine Estrogengabe das Gewicht von Hoden und Nebenhoden und das FSH im Serum. Nach Gabe von ER-Agonisten stieg nur beim ER $\alpha$  das Gewicht von Hoden und Nebenhoden, die Anzahl an Sertolizellen, Spermatogonien sowie meiotische und postmeiotische Keimzellen. Nur der ER $\alpha$ -Agonist führte zu markanten FSH-Erhöhungen im Serum.

Die Arbeitsgruppe schloss daraus, dass Estrogen-induzierte Spermatogenese ER $\alpha$  involviert und zu einer Erhöhung von FSH im Blut und der Sertolizellfunktion führt.

### **4.2.3 Reelin-Estrogen-Crosstalk**

Eine Reelindefizienz hat Auswirkungen auf Ovar und Testis, vermutlich auch auf die Spermio-genese und Follikulogenese. Neben den Veränderungen, die die Basis der Fertilität betreffen, stehen die rein körperlichen Möglichkeiten der Reeler-Mutante. Die Reeler-Mutante ist durch die Ataxie und ihre typisch schwankende Fortbewegung in ihrer Mobilität eingeschränkt. Auch die Arbeitsgruppe von Cariboni et al. (2005) sah die reduzierte Mobilität der Reeler-Mutante als mögliche Erklärung für die reduzierte Fertilität.

#### **4.2.3.1 Reelin - direkte vs. indirekte Wirkung auf das Ovar**

Die Reelin-Defizienz führt zu einer reduzierten Aromatasekonzentration in den Ovarien. Auf welchem Weg Reelin auf die Gonaden wirkt, ist noch nicht vollends geklärt. Hier werden nun einige Theorien diskutiert.

##### 1. Direkte Interaktion von Reelin und Aromatase im Ovar:

Aktuelle Ergebnisse unseres Institutes haben Reelin mRNA und das Protein im Ovar nachgewiesen (bisher unveröffentlicht). Die Arbeitsgruppe von Fayad et al. fand 2007 Reelin in den Thecazellen der dominanten Follikel. Ikeda und Terashima wiesen 1997 eine Reelinexpression im ovariellen Interstitium, nicht aber im Follikel nach. Jedoch geben sie an, dass ein geringes Aufkommen möglicherweise übersehen worden sein kann.

Die Theorie ist, dass Reelin im Ovar direkt auf die Aromataseproduktion wirkt, wie es auch im Hippocampus vermutet wird. Unser Institut wies eine Aromatasereduktion im Hippocampus der Reeler-Mutante nach (bisher unveröffentlicht). Außerdem wurde im Hippocampus eine veränderte Expression der Estrogenrezeptoren ER  $\alpha$  und  $\beta$  in Abhängigkeit von der Reelin-Konzentration nachgewiesen. Es könnte durch die veränderte Expression der ER's zu einer Reduktion der Aromataseproduktion kommen.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Fayad et al. (2007). Untersucht wurde das Auftreten von Low-density Lipoprotein Rezeptor-related Protein 8 (LRP8), einem Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie, welches in Vorgänge der Endozytose und Signaltransduktion, in verschiedenen Follikelstadien des

ovariellen Zyklus involviert ist. Exprimiert wird LRP 8 in den Granulosazellen. Die LRP8-Expression war im dominanten Follikel gegenüber allen anderen Stadien erhöht. Es wurden keine Unterschiede der LDLR- und VLDLR-Expressionen in den verschiedenen Follikeln gefunden. Nach hCG- (humane Choriongonadotropin) -Behandlung sank die LRP8-Konzentration in den Granulosazellen. Reelin ist ein Ligand von LRP8 und ist hoch exprimiert in den Thecazellen der dominanten Follikel, im Gegensatz zu anderen Entwicklungsstadien. Mitogen-aktivierte Proteinkinase 8-interacting Protein 1 (MAPK8IP1) kodiert für intrazelluläre Interaktionspartner von LRP8. Seine mRNA wird in den Granulosazellen exprimiert.

In dieser Studie wurde eine Verbindung zwischen Reelin, LRP8 und MAPK8IP1 gezogen. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass sie auf die folliculären Veränderungen regulatorische Effekte oder zumindest einen Einfluss auf die regulatorischen Prozesse haben.

Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es möglich, dass Reelin z.B. durch die veränderte Expression der Estrogenrezeptoren (ER  $\alpha$ ) direkt zu einer Erniedrigung der Aromatase im Ovar führt. Desweiteren könnte Reelin, als Ligand von LRP8, die Follikulogenese beeinflussen und damit auch die Estrogenproduktion, welche v.a. in den heranreifenden Follikeln stattfindet.

## 2. Aromatasereduktion als Auswirkung der zerebralen Veränderungen:

Durch die Reelindefizienz kommt es zu neuronalen Migrationsstörungen (Förster et al., 2006), auch der GnRH-Neurone (Cariboni et al., 2005). Zusätzlich kommt es zu einer Verminderung der Anzahl der GnRH-Neuronen. Die örtliche und zahlenmäßige Veränderung könnte zu einer Störung ihrer Funktion und damit zu einer verminderten Produktion und Sezernierung von GnRH führen.

Eine reduzierte Abgabe von GnRH würde in der Hypophyse zu einer verminderten Produktion und Abgabe von LH und FSH führen. Eine verminderte Konzentration der hypophysären Hormone würde wiederum zu einer reduzierten Aromatase und damit Estrogenproduktion führen.

Demnach müssten der LH- und FSH- Spiegel bei einer Reduktion von GnRH erniedrigt sein.

Jedoch gibt es noch 2 zu beachtende Feedbackmechanismen, bei denen gonadal gebildetes Estrogen die zerebrale Hormonausschüttung beeinflusst (In: Biochemie und Pathobiochemie, 2007).

Eine reduzierte Estrogenkonzentration im Blut wirkt auf die GnRH-Neurone im Hypothalamus und führt zu einer Erhöhung ihrer Abgabe (positiver Feedbackmechanismus). Durch die erniedrigte Anzahl und eine mögliche Veränderung der Funktion der GnRH-Neurone, könnte diese Feedbackachse zum Erliegen kommen.

Der Estrogenspiegel im Blut wirkt auch auf die Sezernierung der hypophysären Hormone. Estradiol hemmt, zusammen mit von Granulosazellen gebildetem Inhibin die FSH-Ausschüttung (negativer Feedbackmechanismus) und fördert wiederum ab Zyklusmitte über Hypothalamus und Hypophyse die LH-Ausschüttung (positiver Feedbackmechanismus).

Eine erniedrigte Estrogenkonzentration müsste folglich zu einer erhöhten Ausschüttung von GnRH führen, welche eine Erhöhung der FSH- und LH-Ausschüttung bedingen würde. Ab Zyklusmitte wäre die LH-Konzentration möglicherweise im Vergleich erniedrigt, da Estradiol von diesem Zeitpunkt an ein Stimulus für die LH-Ausschüttung ist.

Bei einer Insuffizienz der GnRH-Neuronen in der Reeler-Mutante müsste der GnRH-Spiegel trotz geringem Estradiol erniedrigt sein (positive Feedbackachse). Die FSH- und LH-Konzentration wären durch den fehlenden hypothalamischen Reiz auch reduziert. Die Hemmung der FSH-Ausschüttung im Zusammenspiel mit Inhibin bleibt aus (negativer Feedbackmechanismus). Die LH-Konzentration wäre ab Zyklusmitte noch dramatischer erniedrigt sein, da Estradiol als Stimulus fehlt.

Die Arbeitsgruppe von Lombardero et al. (2007) untersuchten die Hypophyse der homozygoten und heterozygoten Reeler-Mutante auf endokrine Aktivität und morphologische Unterschiede zur Wildtypmaus. Sie untersuchten es auf der Basis, daß die Reelindefizienz zu zerebralen Veränderungen führt und bei der Reeler-Mutante eine Wachstumsstörung sowie eine reduzierte Fertilität festgestellt wurde. Gefunden wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen bezüglich des Körpergewichtes sowie in den Konzentrationen von ACTH (Adrenocortikotropes Hormon) und LH in den Blutgefäßen. Die ACTH-

Konzentration war in den Reeler-Mutanten niedriger, die LH-Konzentration höher, als in den Wildtypmäusen. Das Growthhormone (GH) wies eine hohe individuelle Variation und keine Reduktion in der Reeler-Mutante auf. Außerdem wurden keine Unterschiede in den Zelltypen der Hypophyse gefunden. Daraus schlossen sie, dass eine Hypophysenhypofunktion nicht verantwortlich für die Wachstumsretardierung ist. Die LH-Konzentration war in ihren Messungen erhöht. Dieses Ergebnis widerspricht der Theorie von der gestörten GnRH-Aktivität durch die Reelindefizienz. Jedoch wäre es auch möglich, dass unabhängig von der Funktion der GnRH-Neurone, der niedrige Estrogenspiegel direkt auf die Hypophyse wirkt und dort zu einer Erhöhung der LH-Ausschüttung führt. In diesem Zusammenhang, ohne direkte Wirkung von Reelin im Ovar, würde man allerdings auch eine steigende Estrogenkonzentration erwarten.

Zu dem Ergebnis der Lombardero-Arbeitsgruppe ist einzuräumen, dass diese Untersuchung unabhängig von der ovariellen Zyklusphase der Mäuse geschah. Da der LH- und FSH-Spiegel während des Zyklus extrem variiert, könnte hier auch eine Beeinflussung der erhobenen Daten durch die jeweilige Zyklusphase vorliegen.

### 3. Weitere Ideen:

- a. Neben der Rolle von Reelin für die zerebrale Neuronenmigration reguliert es auch im Rückenmark die axonale Migration. Es ist involviert bei der Wanderung der Nozizeptionsneurone im dorsalen Anteil des Rückenmarks (Villeda et al., 2006, Akopians et al., 2008) und beeinflusst die Positionierung der Somata der Motoneurone. Bei Reelindefizienz kommt es zur einer veränderten Positionierung der Neurone im Rückenmark und im Gehirn führt es zu einem veränderten axonalem Wachstum (Förster et al., 2006). Dies könnte die periphere Innervation oder Reizleitung von Organen beeinflussen.

- b. Zyklusstörungen sieht man bei der Frau oft in Zusammenhang mit Stress.

Neben der Überlegung wie Reelin auf die Gonaden wirkt, ist zudem interessant, welche Trigger es für die Reelinausscheidung gibt.

Es gibt eine Studie von Lussier et al. (2009), welche die Reelin-Produktion mit stressinduzierter Ausschüttung von Kortikosteroiden in Verbindung setzt. Basis ist die Assoziation zwischen Reelin und hippocampaler Plastizität und die Annahme,

dass reduzierte Plastizität mit dem Auftreten von Depressionen im Zusammenhang steht. Die Gabe von Corticosteroiden führte bei der Ratte zur Abnahme von Reelin-positiven Zellen in der hippocampalen CA1-Region. Zusätzlich wurde herausgefunden, dass erhöhte Kortikoidsteroidkonzentrationen die Inzidenz von depressivem Verhalten erhöhen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Reelinsignalweg bei der Expression von depressivem Verhalten nach Exposition von hohen Glucokortikoidkonzentrationen eine Rolle spielen könnte.

Auch die Arbeitsgruppe von Gross et al. (2010) beschäftigte sich mit der Wirkung von Stress, hier Early-Life-Stress, auf die Reelin-Expression. Basis der Untersuchungen ist die Erkenntnis, dass Early-Life-Stress die Entwicklung von psychiatrischen Störungen prädisponiert. Der Stress wurde durch Kortikoidgabe imitiert. Es stellte sich eine geschlechtsspezifische Wirkung von Stress auf die Reelinexpression dar. Nur in den Männchen führte die Simulation von Early-Life-Stress zu einer Abnahme der Reelin-Expression.

Diese beiden Studien belegen, dass Stress die Ausschüttung von Reelin, wie auch die Anzahl der Reelin-positiven Zellen beeinflusst. Stress steht wieder im Zusammenhang mit dem Auftreten von psychiatrischen Störungen, wie z.B. Depression. Diese sind wiederum oft assoziiert mit Zyklusstörungen.

### 4.2.3.2 Schnittstellen der Estrogen- und Reelin-Signalkette

Estrogen und Reelin beeinflussen sich gegenseitig. Beide sind in Prozesse der neuronalen Migration, in der Modulation von LongTermPotentiation (LTP's) involviert und beiden wurde eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen. Nun bleiben einige Fragen offen:

In was für einer Beziehung stehen sie zueinander? Wie moduliert Estrogen die Reelinexpression im Hippocampus? Wie führt vermindertes Reelin zur veränderten Estrogenrezeptor- und Aromataseexpression?

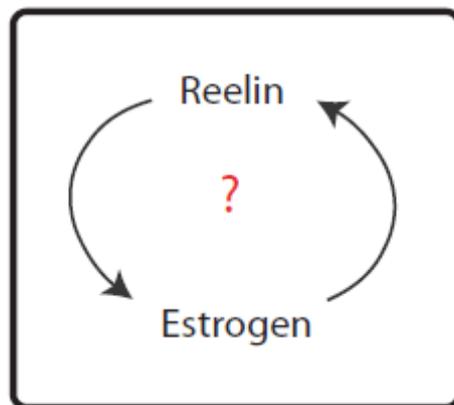


Abbildung 4.2.3.2.1 Verbindung Reelin und Estrogen – wer reguliert wen?

Um diesen Fragen weiter auf den Grund zu gehen, ist hier zusammengetragen, welche Schnittstellen der beiden Signalwege es gibt und welche Interaktionspartner eine mögliche Verbindung der beiden Signalwege darstellen könnten.

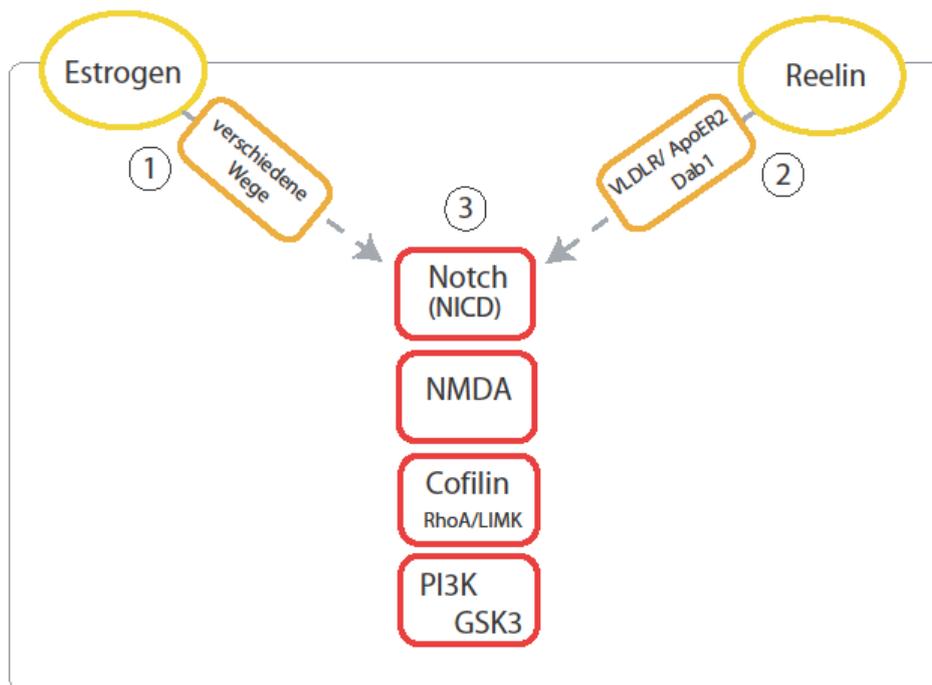


Abbildung 4.2.3.2.2: Schnittstellen der Signalwege von Estrogen und Reelin (Übersicht: Siehe 1.3 und 1.9).

Estrogen und Reelin haben nach Bindung an die Zelle gemeinsame Interaktionspartner. In dieser Abbildung sind entsprechende Mediatoren dargestellt; Notch1, NMDA-Rezeptor, Cofilin und PI3K/GSK3.

(1) Estrogen hat verschiedene intrazelluläre Wirkungsmöglichkeiten (Roman-Blas et al., 2009). Nach Ligandenbindung des Estrogenrezeptors (ER) dimerisiert der Rezeptor, wandert in den Zellkern und kann dort an ERE's (Estrogen-Response-Elements) oder anderen Transkriptionsfaktoren binden. Der ER kann auch mit einem G-Protein-gekoppelten-Rezeptor 30 (GP30) membrangebundene Signalkaskaden aktivieren, wie z.B. die PI3K oder die PKC/MAPK-Signalkette und damit die Extrazellulär-regulierte Kinase (ERK 1/2) aktivieren.

(2) Reelin bindet an den VLDL- oder den ApoE 2- Rezeptor. Dies führt zur Phosphorylierung des intrazellulären Adapterproteins Dab1.

(3) Reelin und Estrogen regulieren:

- **Notch1:** Der Notch1-Rezeptor hat eine intrazelluläre Domäne NICD, welche nach Stimulation die Transkription zahlreicher Targetgene induzieren kann (Frotscher, 2010). Notch1 ist involviert beim Neuritenwachstum migrierender Neuronen (Sibbe et al., 2009).

Reelin wirkt vermutlich durch das phosphorylierte Dab1 auf NICD (Frotscher, 2010). Desweiteren führt die Inhibition des Notch1-Signalweges zu einem Reeler-ähnlichen Bild des Hippocampus (Sibbe et al., 2009, Hashimoto-Torii et al., 2008).

Von Estrogen wird angenommen, dass es nicht die Expression, wohl aber die Aktivierung von Notch1 beeinflusst (Bender et al., 2010, Rizzo et al., 2008). Bender et al. fanden signifikant reduzierte Level von NICD nach Estrogenbehandlung.

- **NMDA-Rezeptor:** NMDA -Rezeptoren modulieren die LongTermPotentiation (LTP), welche Effekte auf Lernen und Gedächtnis haben (Bi et al., 2001).  
Reelin induziert ApoER2, VLDLR und Dab1, diese regulieren die Funktion des NMDA-Rezeptors (Bacskai et al., 2000, Qui et al., 2003, 2002, May et al., 2005). Dies geschieht durch Tyrosin-Phosphorylierung der NR2a- und auch NR2b-Untereinheiten (Chen et al., 2005).  
Estradiol ist in der Lage Langzeitpotenzierung in CA3-CA1-Synapsen zu induzieren (Foy et al., 1999). Dies ist nach neusten Untersuchungen auf eine Balance zwischen NMDA- und AMPA-Rezeptoren zurückzuführen (Smith und McMahon, 2005). Estrogen kann durch eine veränderte Transkription von Genen im Zellkern, als auch via ERK/MAPK-Weg auf NMDA-/AMPA-Rezeptoren wirken.
- **Cofilin:** Die Phosphorylierung von Cofilin macht F-Aktin depolymerisierungsunfähig und stabilisiert dadurch das Aktinzytoskelett einer Zelle. Die Veränderung des Zytoskeletts ist essentiell beim Migrationsprozess von Neuronen.  
Durch Reelinbindung phosphoryliertes Dab1 interagiert mit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und der LIM Kinase 1 (LIMK-1). LIMK-1 bewirkt die Phosphorylierung von Cofilin am Serin-Rest 3 (Chai et al., 2009), welches F-Aktin depolymerisierungsunfähig macht und somit das Aktinzytoskelett stabilisiert.  
Estrogen ist wiederum ein positiver Modulator des Signalweges RhoA > LIMKinase > Cofilin (Krámar et al., 2009). Es aktiviert die GTPase RhoA und phosphoryliert Cofilin. Estrogen erhöht die Spinesynapsenkonzentration von F-Aktin und fördert ihre Polymerisierung, welche auch ist mit der Generierung von LTPs assoziiert.
- **PI3K/ GSK3:** Reelin führt über ApoER2-Rezeptoren zu einer Herunterregulierung der Aktivität von GSK3 $\beta$ , eine der Kinasen, welche für die Tau-Phosphorylierung zuständig ist (Beffert et al., 2002, Ohkubo et al., 2003). Desweiteren reagiert phosphoryliertes Dab1 mit der PI3K.  
In neuronalen Zellen wird laut Mendez und Garcia-Segura (2006) der Estrogenrezeptor durch die PI3- und die GS 3-Kinase reguliert.

**Tabelle 4.2.3.2.1 Interaktionspartner von Reelin und Estrogen**

<b>Interaktionspartner</b>	<b>Reelin</b>	<b>Estrogen</b>
VLDLR	X	0
APOER2	X	0
ApoE	0	X
LRP 8	X	X
ER $\alpha/\beta$	X	X
Dab1	X	0
PI3K	X	X
GSK3	X	X
LIMK1 (Cofilin)	X	X
Notch1	X	Aktivierung von Notch1
NMDA	X	X

Dargestellt sind alle in der Literatur rezensierten Interaktionspartner von Reelin und Estrogen. In der linken Spalte sind die Interaktionspartner aufgezählt. In der mittleren Spalte sind die Interaktionspartner mit einem ‚X‘ markiert mit denen Reelin und in der rechten Spalte die mit denen Estrogen jeweils interagiert. ‚0‘ steht für keine bekannte Interaktion.

Anhand des Schaubilds und der Tabelle lassen sich einige Übereinstimmungen der Interaktionspartner und Signalwege von Reelin und Estrogen überblicken.

Ob die einzelnen Faktoren und wenn, auf welche Weise sie die beiden Signalwege miteinander verbinden, desweiteren wie Reelin auf den Estrogenstoffwechsel wirkt und umgekehrt, lässt sich jedoch aus den aktuellen Ergebnissen nicht erschließen. Dies wird den Anreiz für weitere Forschungen bilden.

Aus den bisherigen Ergebnissen ist jedoch ersichtlich, dass beide Substanzen sich gegenseitig regulieren. Möglich scheint außerdem, dass der Estrogen-Reelin-Crosstalk eine Homöostase in der Zelle bildet sowie, dass die gegenseitige Regulation für den Erhalt von bestimmten zellulären Basisaktivitäten essentiell ist.

## 5. Folgen und Auswirkungen

Das Ergebnis dieser Arbeit ist, dass es durch die Reelindefizienz im Organismus der homozygoten Reeler-Mutante zu einer Reduktion der Aromataseexpression im Ovar kommt. Im Folgenden werden die möglichen Auswirkungen beschrieben.

Die Aromatase der Granulosazellen katalysiert die Estrogensynthese (S. Abb. 1.7.1). Durch eine geringere Aromatasekonzentration kommt es vermutlich zu einer verminderten Estrogensynthese. Estrogen ist ein Induktor vieler Reaktionen.

Eine Wirkung dieses Hormons ist die Stimulation der Endometriumentwicklung im Uterus und dessen Vaskularisierung, sprich die Vorbereitung für die Einnistung der Eizelle nach Befruchtung (In: Basislehrbuch Physiologie, 2006). Es ist auch verantwortlich für die zyklische Veränderung des Vaginalepithels. Durch eine vermutliche Estrogenreduktion bei Reelinmangel kommt es zu Zyklusstörungen. Estrogen wird nicht nur in den Follikeln produziert, es ist auch essentiell für deren Reifung und Wachstum. Die maximale Estradiol-Konzentration zur Mitte des Menstruationszyklus bewirkt die Ausschüttung von LH (LH-Peak), welche die Ovulation bedingt. Außerdem reguliert das gebildete Estrogen via Feedbackmechanismus die hypothalamischen und hypophysäre Hormonausschüttung. Zusammenfassend ist eine Störung der gonadalen Prozesse von Follikelreifung über Ovulation bis hin zu Schleimhautdifferenzierungen denkbar, welche die Fertilität beeinträchtigen würden.

Neben den gonadalen Auswirkungen einer Estrogenreduktion gibt es noch weitere Wirkorte des Hormons. Bei einer Estrogenreduktion könnten Folgeerscheinungen auftreten, ähnlich denen einer Menopause.

Der menopausale Estrogenmangel ist mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Morbus Alzheimer und Parkinson assoziiert (Bhavnani, 2003). Estrogenabhängige zerebrale Prozesse stehen nicht nur unter dem Einfluss von zerebral synthetisiertem Estrogen, sondern auch dem zyklisch schwankenden gonadalen Estrogen. Es führt zu einer zyklischen Zu- und Abnahme der Synapsendichte im Hippocampus. Dies könnte durch ein reduziertes Aufkommen von Estrogen in der Reeler-Mutante gestört werden.

Eine häufige Erkrankung der Menopause ist die Osteoporose (In: Biochemie und Pathobiochemie, 2007). Ein Estrogenmangel führt zu einer Reduktion des Knochenstoffwechsels und der ossären Stabilität.

## **6. Fragen und Projekte**

Die Erkenntnisse dieser Arbeit gehen Hand in Hand mit weiteren Fragen.

Bis zu diesem Zeitpunkt bleibt es weiterhin ungeklärt über welche Mechanismen die Reproduktionsorgane der Reeler-Mutane beeinflusst werden.

Wird die Aromatase durch die GnRH-Migrationsdefizienz und eine dadurch veränderte GnRH-Ausschüttung supprimiert? Dann würde dies unweigerlich zu einer reduzierten hypophysären LH- und FSH- Ausschüttung führen. Die genannten Releasinghormone könnten in einem weiteren Projekt im Serum gemessen werden. Auch eine Messung der Estradiolkonzentration im Serum wäre sinnvoll, um genaue Auswirkungen der ovariellen Aromatasesuppression zu erfassen und ihre Folgen besser abzuschätzen.

Reelin mRNA und Protein wurden bereits im Ovar nachgewiesen (bisher unveröffentlicht). In unserem Institut wird gegenwärtig untersucht, ob Reelin die Aromatase im Ovar moduliert, folglich eine direkte Interaktion vorliegt. Zusammen mit einer Estradiol-Messung im Serum und einer LH- und FSH-Bestimmung versprechen wir uns mehr Klarheit über den Wirkungsweg von Reelin auf die gonadalen Prozesse.

In Kollaboration mit einer Arbeitsgruppe in Düsseldorf untersucht unser Institut zurzeit die männlichen Gonaden der Reeler-Mutante. Sie suchen nach Veränderungen, wie z.B. Vakuolen im Epithel der Tubuli Seminiferi und anderen Zeichen für eine erniedrigte Bluthodenschranke. Desweiteren überprüfen sie die Tight Junctions des Tubuli-Epithels und messen den Durchmesser der Tubuli Seminiferi.

Bei einer Reelindefizienz kommt es zu einer verminderten Spinesynapsendichte, zu einer geringeren Aromatasekonzentration (bisher unveröffentlicht) und einer veränderten Estrogenrezeptor-Expression im Hippocampus. Um weitere Erkenntnisse über die Beziehung von Estrogen und Reelin zu erlangen, beschäftigt sich unser

Institut mit der Möglichkeit, dass die Reelinbedingte Synapsenreduktion Estrogen-abhängig passiert. In den Untersuchungen wird Estradiol zu den Neuronenkulturen einer Reeler-Mutante gegeben und anschließend die Synapsendichte gemessen.

In einem weiteren Projekt mit der Frage nach einer direkten Estrogen-Reelin-Interaktion könnten Neuronenkulturen einer Reeler-Mutante mit Reelin versetzt werden, um dann die Estrogenkonzentration zu messen.

In Mäusen, bei denen der ApoER2 und der VLDL-Rezeptor mutiert sind, wurde keine Migrationsstörung der GnRH-Neurone gefunden (Cariboni et al., 2005). Daraus schloss die Arbeitsgruppe, dass die veränderte Migration dieser Neuronen in der Reeler-Mutante nicht über den üblichen ApoER2/VLDLR/Dab1-Weg verlief. Hier besteht die Hypothese, dass diese Migrationsstörung durch die Estrogensuppression im Gehirn oder durch die veränderte Expression der Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  bei Reelinmangel zustande kommt, da es eine direkte Wechselwirkung zwischen Estrogen und GnRH im Gehirn gibt. Ob diese GnRH-Migrationsstörung allein von der veränderten Estrogenkonzentration und nicht vom Reelinmangel abhängt, könnte durch eine Blockade des Estrogens während der neuronalen Entwicklung getestet werden.

Die Inhibition des Notch1-Signalweges führt zu einem Reeler-ähnlichen Bild des Hippocampus (Sibbe et al., 2009). Dab-1, ein Bestandteil der Reelin-Signalkaskade, behindert den Notch1-Abbau und ist mit Notch1 kolokalisiert (Sibbe et al., 2009). Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse unseres Instituts demonstrieren, dass die Funktion von Reelin bei der Formation des radialen Gliagerüsts und bei der Schichtenbildung der Neuronen auf einer Interaktion mit Notch1 basiert. Ein interessantes Projekt wäre, die Konzentration von Notch1 oder von NICD in der Reeler-Mutante zu messen. Eine Abhängigkeit der beiden würde Notch1 als Verbindungspartner des Estrogen- und Reelin-Signalwegs immer wahrscheinlicher machen.

Es ist essentiell für die weiteren Schlüsse zu der Wirkung und den Aufgaben von Reelin, dass Untersuchungen über die Verbindung von Reelin und seinen Interaktionspartnern folgen müssen, besonders im Bezug auf den Estrogen-Stoffwechsel.

## **7. Relevanz**

Die Untersuchung der Reproduktionsorgane der Reeler-Mutante diente dazu eine mögliche Erklärung für die reduzierte Fertilität der Mäuse zu erfassen. Diese Arbeit demonstriert, dass Reelin mehr Auswirkungen auf den Körper hat, als bisher angenommen. Es beeinflusst nicht nur zerebrale und neuronale Prozesse, sondern ist auch in den peripheren Reproduktionsorganen entscheidend. Durch das Ergebnis dieser Arbeit ist eine mögliche Erklärung für die reduzierte Fertilität bei Reelinmangel gegeben. Die Wirkung von Reelin auf die Gonaden vor dem Hintergrund der neusten Ergebnisse macht eine direkte Interaktion von Reelin und Estrogen im Ovar immer wahrscheinlicher.

## 8. Zusammenfassung

Die Reeler-Mutante ist eine natürliche Mutante, bei der das extrazelluläre Matrixprotein Reelin mutiert ist und dadurch nicht exprimiert wird. Reelin ist essentiell für die neuronale Migration des Cortex während der Embryonalentwicklung. Die Folge der Mutation ist unter anderem eine gestörte neuronale Migration und Synaptogenese. In der Literatur ist bei Reelindefizienz auch eine Migrationsstörung von GnRH-Neuronen beschrieben worden. Die GnRH-Neuronen sind Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, welche die Reproduktion und damit auch die gonadale Estrogensynthese reguliert. Die Dichte der GnRH-Neuronen ist im Hypothalamus der Reeler-Mutante reduziert. Zerebral gebildetes Estradiol und damit die Aktivität der Aromatase, das finale Enzym der Estrogensynthese, sind essentiell für den Erhalt von Synapsen, Axonwachstum und Neurogenese im Hippocampus. Im Ovar ist Aromataseaktivität Voraussetzung für Follikelwachstum und Ovulation. Reelin wurde in den Ovarien der Maus nachgewiesen, sodass eine direkte Interaktion zwischen Reelin und Estrogen im Ovar zunehmend wahrscheinlicher wird. Auf diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit, die Physiologie der Reproduktion der Reeler-Mutante zu untersuchen. Untersucht wurden der genitale Zyklus sowie die ovarielle Aromataseexpression mittels Immunhistochemie und Western Blot-Verfahren in Wildtyp und homozygoter Reeler-Mutante. Vorausgegangene Untersuchungen unseres Institutes zur Beziehung von Reelin und Estrogen zeigen, dass Estrogen die Reelinexpression im Hippocampus reguliert. Umgekehrt führt eine Reelindefizienz zu einer Reduktion der Aromatase im Hippocampus und im Ovar. Ergebnis dieser Arbeit ist ein unregelmäßiger genitaler Zyklus der weiblichen Reeler-Mutante sowie eine signifikante Reduktion der ovariellen Aromataseexpression. Durch das Ergebnis dieser Arbeit ist eine mögliche Erklärung für die reduzierte Fertilität bei Reelinmangel gegeben. Eine Reelindefizienz hat Auswirkungen auf Ovar und Testis, vermutlich auch auf die Spermio-genese und Follikulogenese. Wie diese Veränderungen zustande kommen, ob Reelin direkt auf die Aromatase wirkt oder dies durch die veränderte Migration der GnRH-Neuronen im Gehirn passiert, wird Gegenstand nachfolgender Untersuchungen unseres Institutes sein.

## 9. Literaturverzeichnis:

Absil P, Pinxten R, Balthazart J, Eens M. (2003) Effects of testosterone on Reelin expression in the brain of male European starlings. *Cell and Tissue Research* 312(1): 81-93.

Akopians AL, Babayan AH, Beffert U, Herz J, Basbaum AI, Phelps PE. (2008) Contribution of the Reelin signaling pathways to nociceptive processing. *European Journal of Neuroscience* 27(3): 523 - 37.

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. *Journal of Neuroscience* 18(19): 7779 - 99.

Alejandre-Gomez M, Garcia-Segura LM, Gonzalez-Burgos I. (2007) Administration of an inhibitor of estrogen biosynthesis facilitates working memory acquisition in male rats. *Journal of Neuroscience Research* 58(3): 272 - 7.

Allan CM, Couse JF, Simanainen U, Spaliviero J, Jimenez M, Rodriguez K, Korach KS, Handelsman DJ. (2010) Estradiol induction of spermatogenesis is mediated via an estrogen receptor- $\alpha$  mechanism involving neuroendocrine activation of follicle-stimulating hormone secretion. *Endocrinology* 151(6): 2800 - 10.

Andersen OM, Yeung CH, Vorum H, Wellner M, Andreassen TK, Erdmann B, Mueller EC, Herz J, Otto A, Cooper TG, Willnow TE. (2003) Essential Role of the Apolipoprotein E Receptor-2 in Sperm Development. *The Journal of Biological Chemistry* 278(26): 23989 – 23995.

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM. (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *Journal of Neurobiology* 47(4): 318 - 29.

Bacskai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW, Hyman BT. (2000) The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)* 97(21): 11551 - 6.

Balthazart J, Voigt C, Boseret G, Ball GF. (2008) Expression of reelin, its receptors and its intracellular signaling protein, Disabled1 in the canary brain: relationships with the song control system. *Neuroscience* 153(4): 944 - 962.

Balthazart und Ball. (2006) Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter?. *Trends in Neuroscience* (5): 241 - 9.

Bamburg JR. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 185 - 230.

Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J. (2002) Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *The Journal of Biological Chemistry* 277(51): 49958 - 64.

Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J. (2005) Modulation of synaptic plasticity and memory by reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor ApoER2. *Neuron* 47: 567 - 579.

Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski JS, Paysen D, König A, Rune GM. (2010) Roles of 17 $\beta$ -Estradiol involve Regulation of reelin Expression and synaptogenesis in the Dentate Gyrus. *Cerebral Cortex* 20(12): 2985 - 95.

Beyer C, Green SJ, Barker PJ, Huskisson NS, Hutchison JB. (1994a) Aromatase-immunoreactivity is localised specifically in neurons in the developing mouse hypothalamus and cortex. *Brain Research* 638: 203 - 210.

Beyer C, Tramonte R, Hutchison RE, Sharp PJ, Barker PJ, Huskisson NS, Hutchison JB. (1994b) Aromatase-immunoreactive neurons in the adult female chicken brain detected using a specific antibody. *Brain Research Bulletin* 33(5): 583 - 8.

Bhavnani BR. (2003) Estrogens and menopause: pharmacology of conjugated equine estrogens and their potential role in the prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85(2-5): 473 - 82.

Bi R, Foy MR, Vouimba RM, Thompson RF, Baudry M. (2001) Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)* 98(23): 13391 – 13395.

Biamonte F, Assenza G, Marino R, D'Amelio M, Panteri R, Caruso D, Scurati S, Yague JG, Garcia-Segura LM, Cesa R, Strata P, Melcangi RC, Keller F. (2009) Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival. *Neurobiology of Disease* 36(1): 103 - 115.

Blanc F, Poisbeau P, Sellal F, Tranchant C, de Seze J, André G. (2010) Alzheimer disease, memory and estrogen. *Revue Neurologique (Paris)* 166(4): 377 - 388.

Book and Morest. (1990) Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla. *The Journal of Comparative Neurology* 297(1): 55 - 76.

Botella-López A, Burgaya F, Gavín R, García-Ayllón MS, Gómez-Tortosa E, Peña-Casanova J, Ureña JM, Del Río JA, Blesa R, Soriano E, Sáez-Valero J. (2006) Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)* 103(14): 5573 - 5581.

Bradford R, Parnavelas JG, Lieberman AR. (1977) Neurons in Layer 1 of the developing occipital cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 176(1): 121 - 132.

Cariboni A, Rakic S, Liapi A, Maggi R, Goffinet A, Parnavelas JG. (2005) Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Development* 132: 4709 - 4718.

Carreau and Hess. (2010) Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1546): 1517 - 1525.

Caviness VS Jr, So DK, Sidman RL. (1972) The hybrid reeler mouse. *Journal of Heredity* 63(5): 241 - 246.

Caviness, V. S. Jr. (1982) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Research* 256(3): 293–302.

Chai X, Förster E, Zhao S, Bock HH, Frotscher M. (2009) Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *Journal of Neuroscience* 29(1): 288 –299.

Chang BS, Duzcan F, Kim S, Cinbis M, Aggarwal A, Apse KA, Ozdel O, Atmaca M, Zencir S, Bagci H, Walsh CA. (2007) The Role of RELN in Lissencephaly and Neuropsychiatric Disease. *American Journal of Medical Genetics Part B* 144(1): 58 - 63.

Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J. (2005) Reelin Modulates NMDA Receptor Activity in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience* 25(36): 8209 - 8216.

Cheng X, McAsey ME, Li M, Randall S, Cady C, Nathan BP, Struble RG. (2007) Estradiol replacement increases the low-density lipoprotein receptor related protein (LRP) in the mouse brain. *Neuroscience Letters* 417(1): 50 - 4.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. (2008) Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *The Journal of Neuroscience* 28(35): 8691 - 7.

Clarkson und Herbison. (2009) Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *Journal of Neuroendocrinology* 21(4): 305 - 11.

Colledge WH. (2009) Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20(3), 115 - 21.

Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W, Amadio S, Maggi R, Quattrini A, Consalez GG. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in *Ebf2*-null mice. *Development* 130(2): 401 -10.

Curran and D'Arcangelo. (1998) Role of Reelin in the control of brain development. *Brain Research Reviews* 26: 285 - 294.

Członkowska A, Ciesielska A, Joniec I. (2003) Influence of estrogens on neurodegenerative processes. *Medical Science Monitor* 9(10): 247 - 56.

Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J. (2004) Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit depressive-like symptomatology. *European Journal of Neuroscience*. 20(1): 217 - 28.

D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. (1999) Reelin is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron* 24: 471 - 479.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. (1995) A Protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374(6524): 675 - 6.

D'Arcangelo G, Miao GG, Curran T. (1996) Detection of the Reelin breakpoint in reeler mice. *Molecular Brain Research* 39: 234-236.

D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T. (1997) Reelin is a Secreted Glycoprotein Recognized by the CR-50 Monoclonal Antibody. *The Journal of Neuroscience* 17(1): 23 - 31.

Del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E. (1997) A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385: 70 - 74.

Dernoncourt C, Ruelle D, Goffinet AM. (1991) Estimation of genetic distances between "reeler" and nearby loci on mouse chromosome 5. *Genomics* 11(4): 1167 -69.

DeSilva U, D'Arcangelo G, Braden VV, Chen J, Miao GG, Curran T, Green ED. (1997) The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. *Genome Research* 7: 157 - 164.

Drakew A, Frotscher M, Deller T, Ogawa M, Heimrich B. (1998) Developmental distribution of a reeler gene-related antigen in the rat hippocampal formation visualized by CR-50 immunocytochemistry. *Neuroscience* 82(4): 1079 - 86.

Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ. (2002) Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Research* 57: 413 - 418.

Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES. (2000) Reelin binds  $\alpha 3\beta 1$  integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27(1): 33 - 44.

Durakoglugil MS, Chen Y, White CL, Kavalali ET, Herz J. (2009) Reelin signalling antagonizes  $\beta$ -amyloid at the synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106(37): 15938 - 15943.

Falconer DS. (1951) Two new mutants trembler and reeler, with neurological actions in the house mouse. *Journal of Genetics* 50: 192 – 201.

Fatemi SH. (2000) Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Molecular Psychiatry* 5(6): 654 - 63.

Fatemi SH. (2002) The role of Reelin in pathology of autism. *Molecular Psychiatry* 7(9): 919 - 20.

Fayad T, Lefebvre R, Nimpf J, Silversides DW, Lussier JG. (2007) Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (LRP8) is upregulated in granulosa cells of bovine dominant follicle: expression studies. *Biology of Reproduction* 76(3): 466 - 75.

Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM. (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19(8): 692 - 705.

Flores F, Naftolin F, Ryan KJ. (1973) Aromatization of androstenedione and testosterone by rhesus monkey hypothalamus and limbic system. *Neuroendocrinology* 11(3): 177 - 82.

Förster E, Zhao S, Frotscher M. (2006) Laminating the hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience* 7(4): 259 - 67.

Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. (1999) 17 $\beta$ -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *Journal of Neurophysiology* 81(2): 925 - 9.

Frotscher M, Haas CA, Förster E. (2003) Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cerebral Cortex* 13: 634 - 640.

Frotscher M, Chai X, Bock HH, Haas CA, Förster E, Zhao S. (2009) Role of reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *Journal of Neural Transmission* 116: 1451 - 1455.

Frotscher M. (2010) Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends in Neuroscience* 33: 407 - 414.

Garcia-Segura, L.M. (2008) Aromatase in the Brain: Not just for reproduction anymore. *Journal of Neuroendocrinology* 20: 705 - 712.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology* 63(1): 29 - 60.

Garcia-Segura und Wise. (2000) Introduction to the special issue on neuroprotection by steroids: new perspectives. *Journal of Neurocytology* 5-6: 305 - 6.

Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89(2): 567 - 78.

Gibbons AS, Udawela M, Jeon WJ, Seo MS, Brooks L, Dean B. (2011) The neurobiology of APOE in schizophrenia and mood disorders. *Frontiers in Bioscience* 16: 962 - 79.

Grassi S, Fronzaroli A, Dieni C, Scarduzio M, Pettorossi VE. (2009) Long-term potentiation in the rat medial vestibular nuclei depends on locally synthesized 17 $\beta$ -estradiol. *The Journal of Neuroscience* 29(34): 10779 - 83.

Gross CM, Flubacher A, Tinnes S, Heyer A, Scheller M, Herpfer I, Berger M, Frotscher M, Lieb K, Haas CA. (2010) Early life stress stimulates hippocampal reelin gene expression in a sex-specific manner: Evidence for corticosterone-mediated action. *Hippocampus* 6. Dezember 2010 (Steht vor dem Druck).

Haas CA, Dudeck O, Kirsch M, Huszka C, Kann G, Pollak S, Zentner J, Frotscher M. (2002) Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 22(14): 5797 - 802.

Haas und Frotscher. (2010) Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Experimental Brain Research* 200: 141 - 149.

Hashimoto-Torii K, Torii M, Sarkisian MR, Bartley CM, Shen J, Radtke F, Gridley T, Sestan N, Rakic P. (2008) Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60(2): 273 - 84.

Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Müller M, Fahrner A, Kirsch M, Freiman T, Suzuki F, Depaulis A, Frotscher M, Haas CA. (2006) Reelin Deficiency and Displacement of mature Neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus.

Herz und Chen. (2006) Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 850 - 859.

Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. (1999) Direct binding of Reelin to VLDL Receptor and ApoE receptor 2 induces Tyrosine Phosphorylation of Disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24: 481 - 489.

Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S, et al. (1995) The Reeler gene encodes a Protein with a EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nature Genetics* 10(1): 77 - 83.

Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, Kawato S. (2008) Estrogen synthesis in the brain - role in synaptic plasticity and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology* 290(1-2): 31 - 43.

Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL. (1995) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)* 92(21): 9480 - 4.

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with the human RELN mutations. *Nature Genetics* 26: 93 - 96.

Ikeda und Terashima. (1997) Expression of Reelin, the Gene Responsible for the Reeler Mutation, in Embryonic Development and adulthood in the mouse. *Developmental dynamics* 210: 157 - 172.

Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E. (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)* 95(26): 15718 - 23.

Joseph A, Hess RA, Schaeffer DJ, Ko C, Hudgin-Spivey S, Chambon P, Shur BD. (2010) Absence of estrogen receptor  $\alpha$  leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function. *Biology of Reproduction* 82(5): 948 - 57.

Kallmann, F.J., Schönfeld, W.A., Barrera, S.E. (1944) The genetic aspects of primary eunuchoidism. *American Journal of Mental Deficiency* 48: 203-236.

Kobow K, Jeske I, Hildebrandt M, Hauke J, Hahnen E, Buslei R, Buchfelder M, Weigel D, Stefan H, Kasper B, Pauli E, Blümcke I. (2009) Increased reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 68(4): 356 - 64.

Kramár EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G. (2009a) Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *Journal of Neuroscience* 29(41): 12982 - 93.

Kramár EA, Chen LY, Rex CS, Gall CM, Lynch G. (2009b) Estrogen's Place in the Family of Synaptic Modulators. *Molecular and Cellular Pharmacology* 1(5): 258 - 262.

Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. (2004) Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen syntheses. *The Journal of Neuroscience* 24(26): 5913 - 5921.

Lintas und Persico. (2010) Neocortical RELN promoter methylation increases significantly after puberty. *NeuroReport* 21(2): 114 - 8.

Lombardero M, Kovacs K, Horvath E, Salazar I. (2007) Hormonal and morphological study of the pituitaries in reeler mice. *International Journal of Experimental Pathology* 88(3): 165 - 73.

Lussier AL, Caruncho HJ, Kalynchuk LE. (2009) Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 460(2): 170 - 4.

Mahley RW. (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240(4852): 622 - 30.

Mahley und Huang. (1999) Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Current Opinion in Lipidology* 10(3): 207 - 17.

Marin-Padilla M. (1990) Three-dimensional structural organization of layer 1 of the human cerebral cortex: a golgi study. *The Journal of ComparativeNeurology* 299(1): 89 - 105.

Marin-Padilla M. und TM. (1982) Origin, prenatal development and structural organization of layer I of the human cerebral (motor) cortex. A Golgi study. *Anatomy and Embryology (Berl)* 164(2): 161- 206.

Masiulis I, Quill TA, Burk RF, Herz J. (2009) Differential functions of the Apoer2 intracellular domain in selenium uptake and cell signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 390(1): 67 - 73.

Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, Szonyi E, Wilcox JN, Seeburg PH, Stewart TA. (1986) The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 234(4782): 1372 - 8.

May P, Herz J, Bock HH. (2005) Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(19-20): 2325 - 38.

Mendez und Garcia-Segura. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology* 147(6): 3027 - 39.

Miettinen R, Riedel A, Kalesnykas G, Kettunen HP, Puoliväli J, Soininen H, Arendt T. (2005) Reelin-immunoreactivity in the hippocampal formation of 9-month-old wildtype mouse: effects of APP/PS1 genotype and ovariectomy. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 30(2-3): 105 - 18.

Miyata T, Nakajima K, Mikoshiba K, Ogawa M. (1997) Regulation of Purkinje Cell Alignment by Reelin as Revealed with CR-50 Antibody. *The Journal of Neuroscience* 17(10): 3599 – 3609.

Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, Estrada-Camarena E, Mendez P, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. (2008a) Contribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  to the effects of estradiol in the brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108(3-5): 327 - 38.

Morissette M, Le Saux M, Di Paolo T. (2008b) Effect of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  agonists on brain N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Neuroendocrinology* 20(8): 1006 - 14.

Mukai H, Kimoto T, Hojo Y, Kawato S, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M. (2010) Modulation of the synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800(10): 1030 - 1044.

Mukai H, Takata N, Ishii HT, Tanabe N, Hojo Y, Furukawa A, Kimoto T, Kawato S. (2005) Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology. *Neuroscience* 138(3): 757 - 64.

Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience* 4(2): 143 - 50.

Nadarajah und Parnavelas. (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience* 3(6): 423 - 32.

Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. (1971) Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 33(2): 368 - 70.

Nakajima K, Mikoshiba K, Miyata T, Kudo C, Ogawa M. (1997) Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAb against Reelin. *Neurobiology* 94: 8196 -8201.

Nakano Y, Kohno T, Hibi T, Kohno S, Baba A, Mikoshiba K, Nakajima K, Hattori M. (2007) The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (28): 20544 - 52.

Nathan BP, Jiang Y, Wong GK, Shen F, Brewer GJ, Struble RG. (2002) Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons . *Brain Research* 928(1-2): 96 - 105.

Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. (1982) A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biology of Reproduction* 27(2): 327 - 39.

Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, D'Arcangelo G. (2004) Reelin Promotes Hippocampal Dendrite Development Through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway. *Neuron* 41: 71 - 84.

Nogi T, Yasui N, Hattori M, Iwasaki K, Takagi J. (2006) Structure of a signaling-competent reelin fragment revealed by X-ray crystallography and electron tomography. *The EMBO Journal* 25 (15): 3675–83.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22(3): 289 - 318.

Ohkubo N, Lee YD, Morishima A, Terashima T, Kikkawa S, Tohyama M, Sakanaka M, Tanaka J, Maeda N, Vitek MP, Mitsuda N. (2003) Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  cascade. *The FASEB Journal* 17(2): 295 - 7.

Parinaud J, Beaur A, Bourreau E, Vieitez G, Pontonnier G. (1988) Effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells. *Fertil Steril* 50(4): 597 - 602.

Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. (2007) Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *The Journal of Comparative Neurology* (501): 150 - 167.

Pesold C, Pisu MG, Impagnatiello F, Uzunov DP, Caruncho HJ. (1998) Simultaneous detection of glutamic acid decarboxylase and reelin mRNA in adult rat neurons using in situ hybridization and immunofluorescence. *Brain Research Protocols* 3(2): 155 - 60.

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13(2): 226 - 34.

Prange-Kiel J. (2006) Estrogenwirkungen im Gehirn. *Gynäkologische Endokrinologie* 4: 6- 11.

Prange-Kiel und Rune. (2006) Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138(3): 765 - 72.

Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM. (2008) Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *The Journal of Cell Biology* 180(2): 417 - 426.

Qiu und Weeber. (2007) Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *Journal of Neurophysiology* 97(3): 2312 - 21.

Qiu S, Zhao LF, Korwek KM, Weeber EJ. (2006) Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 26(50): 12943 - 55.

Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico AM, Ciafré SA, D'Arcangelo G, Farace MG, Keller F. (2002) Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry* 277(1): 303 - 9.

Raber J. (2004) Androgens, apoE and Alzheimer's disease. *Hormones and Behavior* 53(5): 706 - 15.

Rakic und Caviness. (1995) Cortical development: View from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14(6): 1101-1104.

Ramos-Moreno T, Galazo MJ, Porrero C, Martínez-Cerdeño V, Clascá F. (2006) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* 23(2): 401 - 22.

Retzius G. (1893) Die Cajalschen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren. *Biologische Untersuchungen* 5: 1 – 9.

Rice und Curran. (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annual Review of Neuroscience* 24: 1005-39.

Rizzo P, Miao H, D'Souza G, Osipo C, Song LL, Yun J, Zhao H, Mascarenhas J, Wyatt D, Antico G, Hao L, Yao K, Rajan P, Hicks C, Siziopikou K, Selvaggi S, Bashir A, Bhandari D, Marchese A, Lendahl U, Qin JZ, Tonetti DA, Albain K, Nickoloff BJ, Miele L. (2008) Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Research* 68(13): 5226 - 35.

- Rogers und Weeber. (2008) Reelin and apoE actions on signal transduction, synaptic function and memory formation. *Neuron Glia Biology* 4(3): 259 - 70.
- Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. (2009) Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Research & Therapy* 11(5): 241.
- Roselli CE, Horton LE, Resko JA. (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117(6): 2471 - 7.
- Royaux I, Lambert de Rouvroit C, D'Arcangelo G, Demirov D, Goffinet AM. (1997) Genomic organization of the mouse reelin gene. *Genomics* 46(2): 240 - 50.
- Rugarli E. (2011) Kallmann Syndrome - From Genetics to Neurobiology. *Journal of the American Medical Association* 305(4): 329 - 423.
- Rugarli und Ballabio. (1993) Kallmann Syndrom. *Journal of the American Medical Association* 270 (22): 2713 - 2716.
- Rugarli EI, Ghezzi C, Valsecchi V, Ballabio A. (1996) The Kallmann syndrom gene product expressed in COS cells is cleaved on the cell surface to yield a diffusible component. *Human Molecular Genetics* 5(8): 1109- 1115.
- Schiffmann SN, Bernier B, Goffinet AM. (1997) Reelin mRNA expression during mouse brain development. *European Journal of Neuroscience* 9(5): 1055 - 71.
- Schwarting GA, Raitcheva D, Bless EP, Ackerman SL, Tobet S. (2004) Netrin 1-mediated chemoattraction regulates the migratory pathway of LHRH neurons. *European Journal of Neuroscience* 19(1): 11 - 20.
- Seripa D, Matera MG, Franceschi M, Daniele A, Bizzarro A, Rinaldi M, Panza F, Fazio VM, Gravina C, D'Onofrio G, Solfrizzi V, Masullo C, Pilotto A. (2008) The RELN locus in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 14(3): 335 - 44.
- Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T. (1997) Scrambler and Yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389(6652): 730 - 3.

Sibbe M, Förster E, Basak O, Taylor V, Frotscher M. (2009) Reelin and notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 29(26): 8578 - 8585.

Simpson und Davis. (2001) Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis - Some new Perspectives. *Endocrinology* 142(11): 4589 - 4594.

Sinopoli KJ, Floresco SB, Galea LA. (2006) Systemic and local administration of estradiol into the prefrontal cortex or hippocampus differentially alters working memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 86(3): 293 - 304.

Smith und McMahon. (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *The Journal of Neuroscience* 25(34): 7780 - 91.

Smith und McMahon. (2006) Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *The Journal of Neuroscience* 26(33): 8517 - 22.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nature Neuroscience* 8(8): 1051 - 8.

Soriano und Del Rio. (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46(3): 389 - 94.

Stein T, Cosimo E, Yu X, Smith PR, Simon R, Cottrell L, Pringle MA, Bell AK, Lattanzio L, Sauter G, Lo Nigro C, Crook T, Machesky LM, Gusterson BA. (2010) Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *The American Journal of Pathology* 177(5): 2323 -33.

Stocco C. (2008) Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* 73(5): 473 - 87.

Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, Schwaab R, Schramm J, Bidlingmaier F, Klingmüller D. (1998) Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in the human

temporal lobe. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244(3): 768 - 71.

Struble RG, Nathan BP, Cady C, Cheng X, McAsey M. (2007) Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: an important role in neuronal regeneration. *Experimental Gerontology* 42(1-2): 54 - 63.

Teillon SM, Yiu G, Walsh CA. (2002) Reelin is expressed in the accessory olfactory system, but is not a guidance cue for vomeronasal axons. *Developmental Brain Research* 140: 303 - 307.

Tissir und Goffinet. (2003) Reelin and brain development. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 496-505.

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J. (1999) Reeler/ Disabled -like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell* 97: 689 - 701.

Uyanik et al. (2003) Neuronale Migrationsstörungen: Klinik und Molekulargenetik der Lissencephalien. *Aktuelle Neurologie* 30: 328 - 334.

Villeda SA, Akopians AL, Babayan AH, Basbaum AI, Phelps PE. (2006) Absence of Reelin results in altered nociception and aberrant neuronal positioning in the dorsal spinal cord. *Neuroscience* 139(4): 1385 - 96.

Von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM. (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *Journal of Neuroendocrinology* 18(11): 847 - 56.

Yague JG, Lavaque E, Carretero J, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. (2004) Aromatase, the enzyme responsible for the estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastoms. *Neuroscience Letters* 368: 279 - 284.

Yague JG, Muñoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. (2006) Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 138(2): 389 - 401.

Yague JG, Wang AC, Janssen WG, Hof PR, Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Morrison JH. (2008) Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Research* 1209: 115 - 27.

Yip JW, Yip YP, Nakajima K, Capriotti C. (2000) Reelin controls position of autonomic neurons in the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(15): 8612 - 8616.

Zaki M, Shehab M, El-Aleem AA, Abdel-Salam G, Koeller HB, Ilkin Y, Ross ME, Dobyns WB, Gleeson JG. (2007) Identification of a novel recessive RELN mutation using a homozygous balanced reciprocal translocation. *American Journal of Medical Genetics part A*. 143(9): 939 - 44.

Zhao S, Chai X, Förster E, Frotscher M. (2004) Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* 131: 5117 - 5125.

Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM. (2010) Aromatase inhibitors Induce Spine synapse Loss In the Hippocampus of Ovariectomized Mice. *Endocrinology* 151(3): 1153 - 1160.

#### Bücher:

Ganten D und Ruckpaul K. (2006) *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*: 581 - 583.

Golenhofen K. (2006) *Basislehrbuch Physiologie: Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten 4.Auflage*: 395 - 398.

Graumann W. (2005) *Compact Lehrbuch Anatomie : in vier Bänden*: 327 -332.

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC.(2007) *Biochemie und Pathobiochemie, 8.Auflage*: 878, 744.

Morrow DA. (1986) *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: W.B. Sanders Company.

#### Dissertationen:

Chai X. (2006) Rescue of the reeler phenotype in the dentate gyrus by slice cocultures. Medizinische Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

#### Internetquellen:

Solberg P. (2004) Examination of vaginal smears in the rat, Laboratory Animal Unit, National Institute of Public Health, Oslo. <http://oslovet.norecopa.no/teaching/rat/oestrus/> (the NORINA database record number 5424). Stand: 21.07.2011, 11.34Uhr)

### 10. Abkürzungsverzeichnis:

A.dest.	- Destilliertes Wasser
AK	- Antikörper
Amax	- Absorptionsmaximum
AMPA	- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid Rezeptor
ApoER2	- ApoLipoprotein-Rezeptor 2
Bp	- Basenpaare
BSA	- Bovine Serum Albumin
CA	- Cornu Ammonis
Ca.	- Circa
Cm	- Centimeter
Cy3	- Carbocyanin 3
°C	- Grad Celsius
Dapi	- 4',6-Diamidino-2 phenylindol
dNTP	- Desoxyribonucleosidtriphosphate
E2	- Estrogen
ED	- Embryonaltag

EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	- Epidermal growth faktor
E max	- Emissionsmaximum
ER	- Estrogenrezeptor
FSH	- Follikelstimulierendes Hormon
GAR	- Goat-anti-rabbit (Ziege-anti-Hase)
GP1	- Guinea Pig 1 (Meerschwein 1)
GnRH	- Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCl	- Chlorwasserstoff
HER2	- Human Epidermal Growth Faktor Rezeptor 2
H+L	- Heavy and light chains vom IgG (schwere und leichte Ketten)
HM	- Homozygote Reeler-Mutante
Ig G	- Immunglobulin G
Int Den	- Integrated Density
Int-for/rew-wt/rl	- Integrant strain forward/rewind – Wildtyp/Reeler
Kb	- Kilobasen
Kd	- Kilodalton
KI	- Konfidenzintervall
Ladder	- Marker
LH	- Luteinisierendes Hormon
M	- Molar
MAPK	- Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min	- Minute
Mind.	- Mindestens
mM	- Millimolar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	- Natriumchlorit
NGS	- Normal Goat Serum
nM	- Nanometer
NMDA	- N-Methyl-D-Aspartat
NP40	- Nonidet P-40 (Octoxinol 9)
Nr.	- Nummer

PCR	- Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	- Paraformaldehyd
Pi	- Protease Inhibitor
PR	- Progesteronrezeptor
PBS	- Phosphat gepufferte Salzlösung
RCF	- Relative centrifugal force (in units of gravity)
RIPA	- Radioimmunoprecipitation assay Puffer
Rpm	- Rounds per Minute
Sek	- Sekunden
SDS	- Sodium Dodecyl Sulfate
Taq	- Thermus aquaticus (DNA-Polymerase-Quelle)
TBS	- Tris-buffered Saline
Temp.	- Temperatur
µl	- Microliter
UV	- Ultraviolet
VLDLR	- Very Low Density Rezeptor
WDH	- Wiederholung
w/v	- Weight/Volumen (g/ml)
WT	- Wildtyp
ZNS	- Zentrales Nervensystem

## **11. Danksagung**

Ich danke hiermit meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Rune, für die Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Lepu Zhou und Bettina Kruck danke ich für ihre Betreuung und für ihr stetig offenes Ohr. Christiane Schröder-Birkner, Lars Fester, Dana und Burkhard danke ich dafür, dass sie immer Zeit für mich hatten. Vielen Dank an das gesamte Institut für Neuroanatomie, in dem jeder ein Ansprechpartner war.

Meine Familie war meine Motivation und Stärke. Vielen Dank an meine Mutter und meinen Bruder. Vielen Dank an Marten für die nie endenden Diskussionen.

## **12. Eidesstattliche Versicherung:**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....