

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für experimentelle Medizin

Institut für Neuroanatomie

Institutsdirektorin: Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

## **Reelin in Gonaden von Ratten und Mäusen Nachweis und Wirkung auf die Aromatase-Aktivität**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von

Claas Kruse  
aus Hamburg

Hamburg 2012

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.08.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. F. Pröls

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. E. Förster

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Jänicke

## Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung .....	5
1.1 Das Enzym Aromatase und die Wirkung von Östrogenen .....	5
1.2 „Brain Aromatase“: Im Gehirn gebildete Östrogene beeinflussen Neurone und Lernprozesse.....	7
1.3 Reelin: Von schwankender Maus zur Entschlüsselung elementarer Signalwege der neuronalen Migration und Differenzierung.....	9
1.4 Reelin Signalweg.....	11
1.5 Wirkung von Reelin beim Adulten .....	12
1.6 Reelin und Östrogen.....	12
1.7 Klinische Relevanz der Signalwege von Reelin und Östrogen.....	13
1.8 Mögliche Muster einer Interaktion von Reelin und Aromatase.....	14
1.9 GnRH-Neurone oder Reelin Interaktion? Suche nach einem Erklärungsmodell für die Fertilitätsstörung der Reeler-Mäuse .....	15
1.10 Arbeitshypothese und Fragestellung .....	16
2. Material und Methoden .....	17
2.1 Materialien: .....	17
2.1.1 Biochemische Substanzen .....	17
2.1.2 Zellkultur.....	18
2.1.2.1 Medien und Zusätze .....	18
2.1.2.2 Zelllinien .....	19
2.1.3 Antikörper .....	19
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	19
2.1.5 Molekularbiologische Materialien .....	21
2.1.5.1 Reinigungs- und Isolierungskits.....	21
2.1.5.2 Restriktionsverdau.....	21
2.1.5.3 DNA-Gelelektrophorese.....	21
2.1.5.4 Vektoren .....	22
2.1.5.5 cDNA-Bildung, PCR.....	22
2.1.5.6 Transfektion .....	22
2.1.6 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.7 Geräte: .....	23
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Biochemische Methoden: .....	23
2.2.1.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Ratten- und Mäusegewebe .....	23
2.2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	24
2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
2.2.1.4 Immunblot (Western-Blot).....	26
2.2.1.5 Präzipitation mit Methanol.....	27
2.2.1.6 Immunpräzipitation .....	27
2.2.1.7 Besonderheiten für den Nachweis von Reelin .....	29
2.2.2 Zellbiologische Methoden:.....	29
2.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen und Materialien.....	29
2.2.2.2 Passage der Zellen und Versorgung mit Medium .....	30
2.2.2.3 Kryokonservierung der Zellen .....	30
2.2.2.4 Herstellung konditionierten Mediums.....	31
2.2.2.5 Aromatase-Assay .....	32
2.2.2.6 Radioimmunassay (RIA).....	34
2.2.2.7 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA .....	35
2.2.3 Molekularbiologische Methoden: .....	36
2.2.3.1 Isolation von DNA aus humanen KGN-Zellen .....	36

2.2.3.2 RNA Isolation aus Rattengewebe .....	37
2.2.3.3 Primer .....	37
2.2.3.4 Herstellung von cDNA für RT-PCR mittels Reverser Transkription .....	41
2.2.3.5 PCR .....	41
2.2.3.6 DNA Gelelektrophorese .....	43
2.2.3.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Gel .....	43
2.2.3.8 DNA Ligation .....	43
2.2.3.9 Transformation von Vektoren in kompetente Zellen .....	44
2.2.3.10 Präparation von Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse .....	45
2.2.3.11 Konzentrationsbestimmung der DNA .....	46
3. Ergebnisse .....	47
3.1. Nachweis von Reelin in den Gonaden .....	47
3.1.1 Protein-Nachweis durch Western-Blot .....	47
3.1.2 Nachweis von Reelin mRNA .....	49
3.2 Untersuchung der Reelinwirkung auf die Aromataseaktivität in Aromatase-Assays ...	53
3.2.1 Bestimmung der Aromatase-Aktivität nach Lephart und Simpson (1991) .....	53
3.2.2 Bestimmung der Aromatase-Aktivität im Radioimmunassay (RIA) .....	60
3.3 Untersuchung der Wirkung von Reelin auf die Aromatasetranskription im Luciferase-Assay .....	62
3.3.1 Klonierung der ovar- und hirnspezifischen Aromatase-Promotoren in das Luciferase Plasmid .....	63
3.3.2 Optimierung der Transfektion .....	66
4. Diskussion .....	69
4.1 Nachweis von Reelin in Ratten- und Mausgewebe .....	69
4.2 Aromatase-Assays .....	71
4.3 Offene Fragen, Analyse .....	78
4.4 Regulation der Aromatasetranskription durch Reelin .....	79
4.5 Hypothese der Einflussnahme von Reelin auf die Fertilität .....	81
5. Zusammenfassung .....	83
6. Abkürzungsverzeichnis .....	84
7. Literaturverzeichnis .....	86
8. Danksagung .....	92
9. Eidesstattliche Versicherung .....	93

## 1. Einleitung

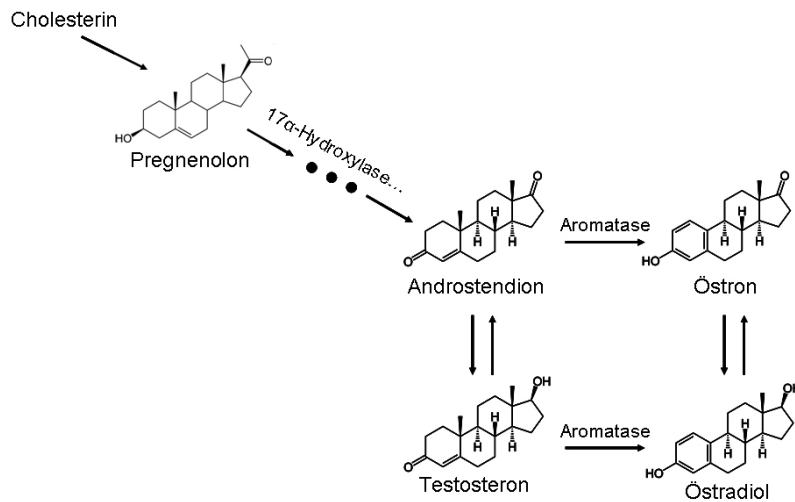
In neuroanatomischen- und neurophysiologischen Untersuchungen zu Mechanismen der kortikalen Entwicklung, der Synapsenbildung und deren Plastizität auch im adulten Stadium haben zwei Moleküle eine besondere Aufmerksamkeit gewonnen: Das Östrogen-bildende Enzym Aromatase und das Glykoprotein Reelin (D'Arcangelo et al. 1995, Naftolin et al. 1971).

Beide haben sich zu Schwergewichten der Neurowissenschaft entwickelt und jahrzehntelange Forschungsarbeiten haben einen erheblichen Zuwachs an Erkenntnissen erbracht. Interessanterweise können Östrogene und Reelin im zentralen Nervensystem ähnliche strukturelle Veränderungen hervorrufen (siehe unten). Dies weist auf eine Interaktion von Reelin und Aromatase hin.

Um einen Überblick über beide Moleküle zu bekommen, soll zunächst der aktuelle Stand der Forschung von Aromatase und Reelin dargestellt werden.

### **1.1 Das Enzym Aromatase und die Wirkung von Östrogenen**

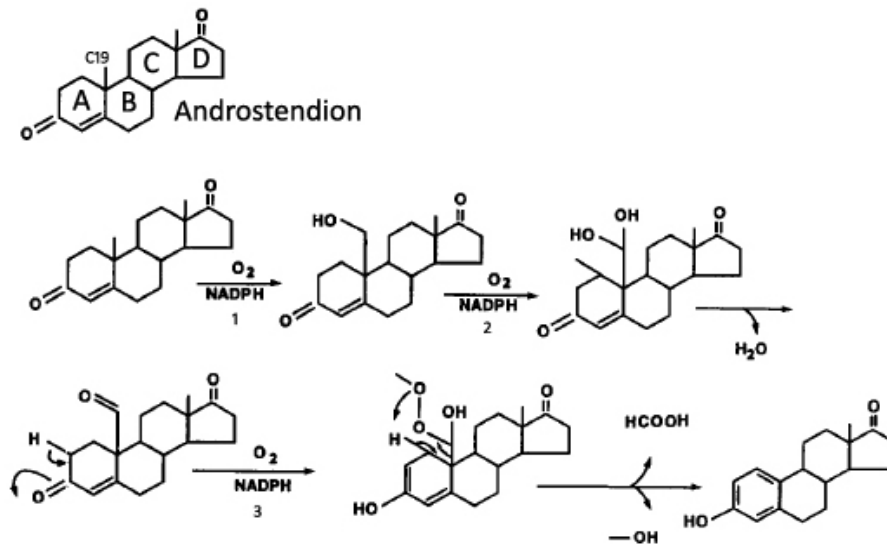
Die CYP450 (Cytochrom P450) Aromatase katalysiert die Synthese von Östrogenen. Hierzu werden die androgenen Steroidhormone Androstendion oder Testosteron als Substrat genutzt (Abbildung 1). Kennzeichnend für die Aromatase-Reaktion ist die Umwandlung des ungesättigten A-Ringes der männlichen C19-Sexualsteroidhormone in einen gesättigten aromatischen Ring. Unter zusätzlicher Abspaltung eines C-Atoms als Ameisensäure entstehen dann in drei Reaktionsschritten die weiblichen C18-Sexualsteroidhormone (Abbildung 2, detaillierte biochemische Beschreibung der Reaktion: Abbildung 3).



### Abbildung 1: Weg der Biosynthese der Östrogene

Pregnenolon entsteht aus Cholesterin und ist Vorstufe aller weiteren Steroidhormone. Für die Bildung von Androstendion ist unter anderem die 17 $\alpha$ -Hydroxylase erforderlich. Die Synthese der Östrogene erfordert die Umwandlung androgener Vorstufen durch das Enzym Aromatase.

Das in den Gonaden synthetisierte Östrogen wird sezerniert und ist maßgebend für den Serumöstrogenspiegel. Der Östrogenspiegel ist für Follikelwachstum und Ovulation elementar. Das Ovar steht in endokrinologischen Regelkreisen mit der Hypophyse und dem Hypothalamus und der prä-ovulatorische Anstieg von Östrogenen im Serum ist entscheidend für die LH-vermittelte Ovulation (Lehrbuch Physiologie, Klinke Pape Silbernagl, Thieme). Die Aromatase wird im Ovar vor allem in den Granulosazellen der Follikel exprimiert. Die androgenen Vorstufen für die Enzymreaktion werden durch die benachbarten Thekazellen bereitgestellt (Hillier et al. 1994). Auch beim Mann hat die Aromatase Einfluss auf die Keimzellbildung und -reifung und wird in Leydig- und Sertoli-Zellen gebildet (Carreau et al. 2010). Aromataseaktivität findet man physiologischerweise außerdem in Nebennierenrinde, Fettgewebe und in der Plazenta (Lephart u. Simpson 1991).



**Abbildung 2: Aromatase Reaktion (Abb. aus Lephart 1996, ver.)**

Je nach Substrat wird Androstendion in Östron - oder Testosteron in Östradiol umgewandelt. Als Co-Substrate werden für diese Reaktion außerdem drei mol NADPH und  $O_2$  pro mol Östrogen benötigt.

Nach Bindung des Androgens an die Aromatase wird Sauerstoff in drei aufeinanderfolgenden Hydroxylierungen in das Molekül eingefügt. Die erste Hydroxylierung erfolgt an der C-19-Methylgruppe, und es entsteht ein C-19 Alkohol. Bei der zweiten Hydroxylierung, die ebenfalls am C-19-Atom stattfindet, entsteht unter Abspaltung von Wasser ein C-19-Aldehyd. Der Mechanismus der dritten und letzten Hydroxylierung ist nicht geklärt, unter Bildung eines Phenolringes im A-Ring kommt es zu der Abspaltung des C-19-Kohlenstoffatoms als Ameisensäure (Lephart 1996).

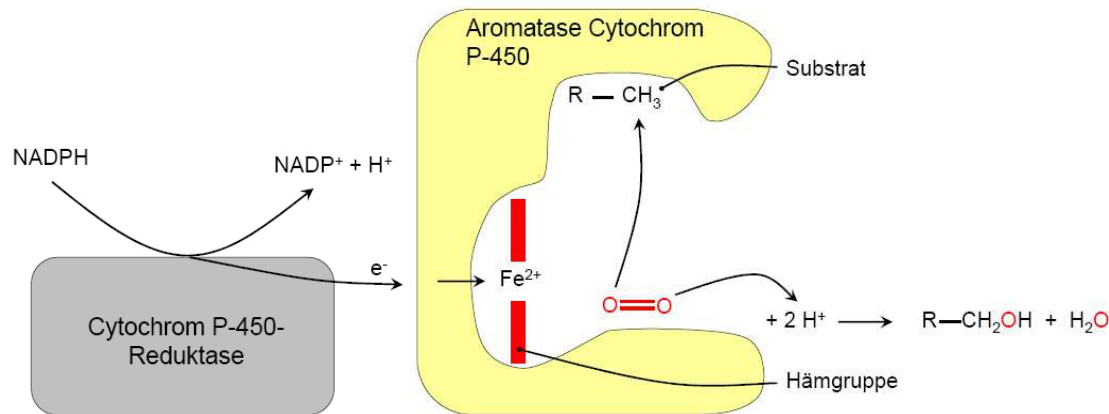
## 1.2 „Brain Aromatase“: Im Gehirn gebildete Östrogene beeinflussen Neurone und Lernprozesse

Interessanterweise spielt die Aromatase auch im zentralen Nervensystem eine entscheidende Rolle. Naftolin beschrieb die CYP450 Aromatase erstmalig 1971 im Diencephalon. Er konnte nachweisen, dass zirkulierendes Androgen in Östrogen umgewandelt wird und begründete die „Brain-Aromatase-Hypothese“, wonach die lokal im Gehirn gebildeten Östrogene neuroendokrine Abläufe beeinflussen (Naftolin et al. 1971). Man weiß heute, dass geschlechtsspezifische Differenzierungsprozesse einzelner Hirnregionen während der Hirnentwicklung über die lokale Regulation der Östrogenkonzentrationen durch die Aromatase gesteuert werden (Lephart Review 1996). Der unterschiedliche, geschlechtsspezifische Aufbau einiger limbischer und hypothalamischer Hirnregionen ist vermutlich entscheidend für die Steuerung des Sexualverhaltens (Roselli et al. 2007).

Darüber hinaus ist bekannt, dass Östrogen neuromodulatorische Effekte über die Regulierung synaptischer Spines ausübt. Im Hippocampus zeigte sich eine Veränderung der Spinedichte in verschiedenen Phasen des Menstruationszyklus weiblicher Ratten und es wurde ein Zusammenhang mit den variierenden Östrogenkonzentrationen im Serum während des Zyklus

vermutet (Woolley et al. 1990). Gleichzeitig führte die Ovariectomie bei weiblichen Mäusen zu einem Verlust an dendritischen Spines und die Substitution von Östrogen im Serum konnte diesen Effekt aufheben (Gould et al. 1990). Die positive Wirkung von Östrogenen auf die Spinedichte konnte in weiteren Arbeiten bestätigt werden (Kretz et al. 2004, Prange-Kiel et al. 2006). Darüber hinaus wirkt Östrogen auch auf das Wachstum von Axonen (von Schassen et al. 2006) und stimuliert die Neurogenese im adulten Hippocampus (Fester et al. 2006). Offenbar ist für die neuromodulierenden Prozesse aber nicht nur der Serumöstrogenspiegel bedeutend, sondern vor allem lokal im Hirn gebildetes und parakrin wirkendes Östrogen (Kretz et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Aromatase auch im Hippocampus exprimiert wird (Wehrenberg et al. 2001) und dass Östrogen dort de novo aus Cholesterin gebildet wird (Prange-Kiel et al. 2003, Hojo et al. 2004, Fester et al. 2009). Eine Hemmung der Aromatase oder der Steroidaufnahme in hippocampalen Kulturen (Ratte) führt zu einer Abnahme an proliferierenden- und einer Zunahme an apoptotischen Neuronen (Fester et al. 2006). Dieser negative Effekt konnte durch gleichzeitige Applikation von Östrogen ausgeglichen werden. Zusätzlich ist eine Beeinflussung des LTP durch Östrogene bekannt (Warren et al. 1995), die auf einer Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor beruht (Smith u. McMahon 2005). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass Östrogene eine neuroprotektive Wirkung bei Alzheimer, Schizophrenie und der Regeneration nach traumatischen neurologischen Ereignissen (z.B. Apoplex) haben (Garcia-Segura 2001). Der Signalweg der Östrogene wird über die beiden Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  vermittelt. Diese Steroidrezeptoren sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Nach Bindung von Östrogen dimerisieren die Rezeptoren, binden im Zellkern an spezifische DNA Sequenzen (an sogenannte Östrogen responsive Elemente = EREs) und kontrollieren dadurch die Transkription von Genen (Klinge et al. 2001). Es wird vermutet, dass Östrogensignale zusätzlich über membrangebundene Rezeptoren vermittelt werden (Toran-Allerand et al. 2002).





**Abbildung 3: Biochemischer Blick auf die Aromatase-Reaktion (Rassow, Lehrbuch Biochemie, ver.)**

Die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen wird durch die CYP450 Aromatase im endoplasmatischen Retikulum der Zelle katalysiert (Lephart et al. 1996). Die Aromatase ist ein Enzym-Komplex, bestehend aus dem Aromatase Cytochrom P450-Protein und dem Flavoprotein NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. Cytochrom-P450 Enzyme gehören zu der Gruppe der Monooxygenasen: Molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) wird an das Enzym gebunden und ein Sauerstoffatom in das Substrat (R-CH<sub>3</sub>) eingebaut, während das andere unter Bildung von Wasser (H<sub>2</sub>O) freigesetzt wird.

Die Rolle der Cytochrom-P450-Reduktase in dem Enzym-Komplex ist die Aufnahme der Elektronen von NADPH und deren Übertragung auf das Aromatase-Cytochrom P450 über Flavoproteine. Dieser Transfer der Elektronen bewirkt die Veränderung in einer für P-450-Enzyme typischen Häm-Gruppe, die am zentralen Eisen-Ion reduziert wird (Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup>). Das als Cosubstrat benötigte O<sub>2</sub> kann dann binden und das Substrat oxygenieren.

### 1.3 Reelin: Von schwankender Maus zur Entschlüsselung elementarer Signalwege der neuronalen Migration und Differenzierung

Im Jahre 1951 wurde in Edinburgh, Schottland, eine natürliche Mausmutante erstmals beschrieben (Falconer, 1951). Auffällig an der Maus waren charakteristische neurologische Defizite wie Tremor, Ataxie und ein schwankender Gang. Letzterer war ausschlaggebend für die Namensgebung dieser Mäusegruppe: „Reeler“ (to reel, englisch für schwanken). Der Beschreiber sah in dem Verhalten eine große Ähnlichkeit zu Mäusen im Rauschzustand nach der Anästhesie mit Äther. Außerdem wurde durch Fehlen aggressiven Verhaltens auf eine mentale Retardierung der Reeler geschlossen. Der Reeler-Phänotyp ist rezessiv und wird nur ausgeprägt, wenn beide Allele betroffen sind. Männliche Reeler-Mäuse brachten mit weiblichen Wildtyp-Mäusen keinen Nachwuchs hervor und auch weibliche Reeler-Mäuse sind nur vermindert fertil (Falconer 1951).

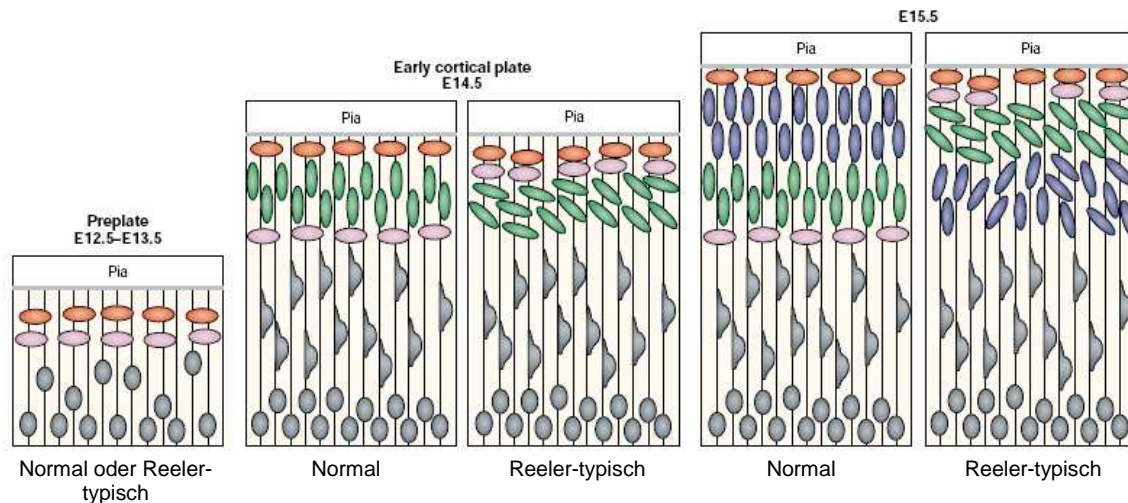
Die morphologische Untersuchung des Gehirns der Reeler-Mäuse zeigte einen auffälligen Aufbau des Kleinhirns: Makroskopisch mit Aufhebung der typischen Kleinhirnwindungen (Foliae) und mikroskopisch eine diffuse Vermischung der Zellarten (Hamburgh 1960). Die Mehrheit der kortikalen Neurone der Reeler-Mäuse entstand zwar zur korrekten Zeit, war intrazerebral funktionell verschaltet und lebensfähig, wies jedoch eine erstaunliche

Veränderung in der Organisation auf (Caviness und Rakic 1978). So zeigte sich im Kortex eine Aufhebung der spezifischen Schichtung mit einer Inversion der Positionen von Körner- und Pyramidenzellen. Außerdem konnten für die Reeler-Maus auch Veränderungen in den Strukturen des Ncl. n. facialis und der unteren Olivenkerne, damit also des Hirnstamms, gezeigt werden (Goffinet et al. 1984).

Ein weiterer Meilenstein gelang 1995 durch die Identifizierung des für den Reeler-Phänotyp verantwortlichen Reelin-Gens (D'Arcangelo et al. 1995). In situ-Hybridisierungen zeigten, dass Reelin im sich entwickelnden Kortex von Cajal-Retzius Zellen gebildet wird. Diese Zellen sind Neurone der Marginalzone des embryonalen Cortex und wurden bereits 1891 von Cajal und Retzius (1893) beschrieben. Die Hypothese einer Beeinflussung der neuronalen Migrations- und Zelladhäsionsprozesse durch das Protein Reelin in bestimmten Entwicklungsphasen (D'Arcangelo et al. 1995) eröffnete ein breites Spektrum an Forschungsmöglichkeiten.

Heute ist bekannt, dass Reelin ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix ist und die Migration von Neuronen aus der ventrikulären in die marginale Zone des Kortex kontrolliert, wo es als essentieller Stoppsignalgeber fungiert (Frotscher et al. 1998). Die Bildung des Schichtungsmusters im Isokortex erfolgt typischerweise nach dem „inside-out“-Prinzip, wonach ontogenetisch jüngere Neurone durch die älteren Schichten hindurch migrieren, um sich ihnen von außen anzulagern (Angevine u. Sidman 1961). Ohne das Reelin-vermittelte Stoppsignal kommt es hier zu einem fehlerhaften Aufbau in den betroffenen Strukturen und zur Ausbildung des Reeler Phänotyps mit einer „outside-in“-Struktur (Abbildung 4).

Auch im Hippocampus sind in Cornu Ammonis und Gyrus Dentatus die typischen Schichtungen aufgehoben (Caviness und Rakic 1978) und Reelin ist für eine regelhafte Anordnung der verschiedenen Neuronenpopulationen notwendig (Förster et al. 2006).



**Abbildung 4: Schematischer Überblick der frühen kortikalen Entwicklung in Mäusen (Tissir u. Goffinet 2003)**

Im Laufe der embryonalen Hirnentwicklung kommt es durch Migrationsprozesse zur spezifischen Schichtenbildung einzelner Neuronengruppen. Dargestellt sind histologische Schnitte des embryonalen Kortex von Wildtyp (WT, normal) und Reeler-Mäusen zu bestimmten Entwicklungsstagen (E12.5-E15.5). Pia steht für die anliegende Hirnhaut und bildet damit die Grenze zur äußersten Hirnschicht. Am embryonalen Entwicklungstag E 13.5 kann kein Unterschied zwischen Reeler und WT-Kortex festgestellt werden. Reelin-positive (rot) und Reelin-negative (rosa) Zellen bilden in loser horizontaler Verbindung die „Vorplatte“ („Preplate“). Am E 14.5 migrieren die Zellen über radiäre Gliazellen (bauchige Zellen). Die erste Kohorte migrierender Zellen (grün) setzt sich zwischen Reelin-positiven und Reelin-negativen Zellen fest und spaltet die „Preplate“ auf. Beim Reeler kommt es nicht zu dieser Aufspaltung. Am E 15.5 migriert eine zweite Kohorte Zellen (blau) in Richtung Pia und legt sich den bestehenden Neuronen der kortikalen Platte oberflächlich an („inside-out“-Prinzip). Bei den Reelern können die älteren Neuronenschichten nicht durchbrochen werden, es entsteht ein „outside-in“-Gradient.

## 1.4 Reelin Signalweg

Es sind derzeit zwei Reelin-Rezeptoren bekannt, die Lipoprotein-Rezeptoren ApoER2 (Apolipoprotein E Rezeptor 2) und VLDLR („Very Low Density Lipoprotein Receptor“) (Trommsdorff et al. 1999). Knock-out Mäuse, die für beide Rezeptoren defizient sind, können vom Phänotyp der Reeler-Mäuse nicht unterschieden werden, was auf die Abhängigkeit des Reelin-Signalweges von den Lipoproteinrezeptoren hinweist (Trommsdorff et al. 1999). Knockout-Versuche mit Mäusen, die nur für jeweils einen der Rezeptoren defizient sind, zeigen unterschiedliche Migrationsdefekte und sprechen für verschiedene, sich ergänzende Signalwege der Rezeptoren (Hack et al. 2007).

Auf der intrazellulären Seite ist der Reelin-Signalweg an das Adapterprotein Dab1 (Drosophila Disabled Genprodukt 1) gekoppelt, das an zytoplasmatische Bereiche beider Reelinrezeptoren binden kann (Trommsdorff et al. 1999). Dab1 wird nach Reelin-Bindung an die Rezeptoren durch Phosphorylierung an Tyrosinen aktiviert (Howell et al. 1999, Hiesberger et al. 1999) und beeinflusst über verschiedene Signalwege unter anderem die

Migration der Neurone durch Veränderungen am Zytoskelett (Review Förster et al. 2010). Mit n-cofilin als Aktin-assoziiertem Protein konnte ein Effektormolekül der Reelinsignalkaskade identifiziert werden, das direkt Einfluss auf die Stabilität und Dynamik des Zytoskeletts nimmt (Chai et al. 2009).

### **1.5 Wirkung von Reelin beim Adulten**

Reelin wird im embryonalen Gehirn durch die Cajal-Retzius-Zellen gebildet (D´Arcangelo et al. 1995). Postnatal nimmt die Bildung des Proteins in diesen Zellen ab, und es findet eine verstärkte Expression in GABAergen Interneuronen statt, die in mehreren Schichten des Neokortex und Hippocampus vorkommen (Alcántara et al. 1998). Mit dem Wechsel der Produktionsstätte verändert sich auch die Wirkungsweise des Reelins. War es in der Embryogenese elementar für die Migrationsprozesse von Neuronen, wirkt es im adulten Säuger auf die Organisation der synaptischen Kontakte.

Interessanterweise zeigen heterozygote Reeler-Mäuse, die keine Veränderung der kortikalen Schichtung, aber eine verminderte Reelinproduktion aufweisen, im Hippocampus eine verminderte Anzahl postsynaptischer Spines (Niu et al. 2008).

Es ist bekannt, dass Reelin über seine Signalwege auf die Dendritogenese (Niu et al. 2008), Synaptogenese (Borrell et al. 1999) und synaptische Plastizität wirkt (Beffert et al. 2005, Herz u. Chen 2006, Niu et al. 2008, Weeber et al. 2002). In der Retina führt Reelindefizienz zu einer Veränderung der neuronalen Schaltkreise (Rice et al. 2001).

Außerdem beeinflusst Reelin das LTP und damit Lernprozesse über eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Herz u. Chen 2006, Weeber et al. 2002).

Reelin bleibt also auch über die Entwicklungsphase des ZNS hinaus ein wichtiger Modulator neuronaler Verbindungen.

### **1.6 Reelin und Östrogen**

Die beiden Moleküle Aromatase und Reelin zeigen einige Gemeinsamkeiten in ihrer Wirkung auf die Zielzellen. So wird von beiden die Dendritogenese, Synaptogenese und auch das LTP beeinflusst. Reelin und Östrogen (als Produkt der Aromatase) wirken dabei auf ApoE-Rezeptoren, den Notch1-Signalweg und auf das Zytoskelett.

ApoER2 ist einer der beiden Reelinrezeptoren (Trommsdorff et al. 1999). Östrogen stimuliert die Bildung des für den Fettstoffwechsel elementaren und mit genetischen Erkrankungen

assoziierten ApoE (Apolipoprotein E) (Nathan et al. 2004). Gleichzeitig kommt es in dominanten Follikeln, die hohe Konzentrationen an Östrogen bilden, zu einer Zunahme des ApoER2 (Fayad et al. 2007).

Notch ist ein transmembranöser Rezeptor, der nach Ligandenbindung proteolytisch gespalten wird und im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt (Yoon u. Gaiano 2005). Der Notch1-Signalweg führt zu neuronalen Differenzierungsprozessen und ist stark mit dem Reelin-Signalweg assoziiert. Notch1 interagiert mit dem Effektorprotein des Reelinsignalweges Dab1 und in Reeler-Mäusen ist die aktivierte, proteolytierte Form von Notch1 vermindert (Sibbe et al. 2009, Hashimoto-Torii et al. 2008). Auch für Östrogene ist eine Wechselwirkung mit Notch beschrieben (Rizzo et al. 2007). Die Behandlung hippocampaler Schnittkulturen mit Östrogenen führt zu einer Reduzierung der proteolysierten Form von Notch1 (Bender et al. 2010).

In rezenten Studien wurde sowohl für Reelin, als auch für Östrogen ein übereinstimmender Mechanismus zur Beeinflussung des Zytoskeletts beschrieben. Die Signalwege beider Moleküle wirken über n-Cofilin. Cofilin ist ein Protein, das Aktin depolymerisiert, es aus dem Verbund löst und so die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts regulieren kann (Bamburg u. Wiggan 2002). n-Cofilin steht für die nicht-muskuläre Isoform des Proteins. Sowohl Reelin als auch Östrogen bewirken über die Phosphorylierung von n-Cofilin dessen Inaktivierung, die zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts führt (Chai et al. 2009, Yuen et al. 2011). Bezogen auf die embryonale Neuronenmigration wird vermutet, dass Reelin auf diesem Wege die Verankerung der Neurone in der Marginalzone vermittelt (Chai et al. 2009) während Östrogen über diesen Mechanismus die Bildung von Synapsen fördert (Yuen et al. 2011).

## **1.7 Klinische Relevanz der Signalwege von Reelin und Östrogen**

Die Mechanismen der Neurogenese und Neuromodulation sind von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse. Wie beschrieben beeinflussen sowohl Östrogen als auch Reelin die Neuronenbildungs- und Differenzierungsprozesse. Neuere Arbeiten weisen zunehmend auf einen Zusammenhang der beiden Moleküle bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen hin. Das Fehlen von Reelin führt bei Menschen beispielsweise zum Krankheitsbild der Lissenzephalie (Hong et al. 2000). Grundsätzlich wirken Störungen im Reelinsignalweg durch die veränderte Neuronenmigration epileptogen (Eriksson et al. 2001, Haas et al. 2002). Auch scheint Reelin eine Rolle bei der Alzheimerschen Erkrankung

(Tissir u. Goffinet 2003) und bei der Entstehung von Psychosen bei psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie und der bipolaren Störung zu spielen (Guidotti et al. 2000). Die neuroprotektiven Effekte von Östrogen beziehen sich vor allem auf Morbus Alzheimer, Epilepsie und Schizophrenie (Garcia-Segura et al. 2001). Somit gibt es auch für die klinischen Auswirkungen bei Veränderungen im Reelin- oder Östrogenstoffwechsel eine auffällige Überschneidung. Diese lässt gemeinsame Signalwege vermuten und unterstreicht die Relevanz für die Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Reelin und Östrogenen. Interessanterweise exprimieren Reelin produzierende Cajal Retzius-Zellen im Hippocampus in hohem Maße den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  (Bender et al. 2010). Dieser Befund motivierte zu der Untersuchung der Östrogenwirkung auf die Reelinbildung in diesen Zellen. Hippocampale Schnittkulturen wurden mit Östrogen, Östrogen in Kombination mit einem Östrogenrezeptorblocker oder dem Aromatasehemmer Letrozol behandelt. Mittels Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Reelinbildung verstärkt (Bender et al. 2010). Die These, dass dieser Signalweg über den Östrogenrezeptor vermittelt ist, wird durch den Befund gestützt, dass der positive Effekt bei gleichzeitiger Gabe von Östrogenrezeptorblocker aufgehoben wurde (Bender et al. 2010). Auch im Cerebellum konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Reelinbildung verstärkt (Biamonte et al. 2009). Östrogene beeinflussen die Reelinbildung in Hippocampus und Cerebellum also in positiver Weise. Im Rahmen dieser Arbeit soll nun umgekehrt untersucht werden, welche Wirkung Reelin auf die Bildung von Östrogen hat.

In Zellkulturversuchen soll hierzu mittels Aromatase-Assays die Wirkung von Reelin auf die Aromatase-Enzymaktivität bestimmt werden. Mit molekularbiologischen Methoden soll zusätzlich die Wirkung von Reelin auf die Transkription der Aromatase untersucht werden.

### **1.8 Mögliche Muster einer Interaktion von Reelin und Aromatase**

Mögliche Interaktionsmuster für Reelin und Aromatase in den Zellversuchen sind sowohl eine positive als auch eine negative Beeinflussung der Aromataseaktivität durch Reelin. Eine Erhöhung der Östrogenbildung über Reelin-gekoppelte Stoffwechselwege würde eine gegenseitige Induktion bedeuten.

Es wäre auch ein Mechanismus ähnlich der Theorie der Produkthemmung möglich (Feedback Inhibition): Reelin, dessen Bildung über Östrogen-gekoppelte Stoffwechselwege erhöht wird (Bender et al. 2010), könnte durch eine Hemmung der Aromatase mittelbar negativ regulierend auf die eigene Synthese wirken.

Neben möglichen Erkenntnissen einer Interaktion von Reelin und Aromatase für die oben beschriebenen neuromodulatorischen Mechanismen im Hippocampus und dem gesamten ZNS, soll in dieser Arbeit einer weiteren Fragestellung nachgegangen werden: Der Rolle von Reelin in den Gonaden. Zu diesem Thema ist bisher nur sehr wenig bekannt.

### **1.9 GnRH-Neurone oder Reelin Interaktion? Suche nach einem Erklärungsmodell für die Fertilitätsstörung der Reeler-Mäuse**

Reelin-defiziente Reeler-Mäuse zeigen neben dem viel beschriebenen neurologischen Phänotyp auch eine verminderte Fertilität (Falconer 1951). Für die fehlerhafte Schichtung von kortikalen Neuronen werden mangelnde, Reelin-abhängige Migrationsimpulse als kausales Erklärungsmodell herangeführt (s.o.). Neben den hierdurch möglichen motorischen Defiziten, die natürliche Paarungsabläufe erschweren können, zeigen Reeler-Mäuse auch Veränderungen im Sozialverhalten (Myers et al. 1970).

Reelin kontrolliert neben der kortikalen Schichtung auch die Migration von Gonadotropin-Releasing-Hormon-(GnRH)-Neuronen und Reeler-Mäuse zeigen eine verminderte Anzahl dieser Neurone im Hypothalamus (Cariboni et al. 2005). Auch die Verbindungen der Neuronenfortsätze zur Eminentia Mediana, wo das GnRH in ein spezielles Kapillarsystem abgegeben wird und zum Hypophysenvorderlappen gelangt, sind vermindert (Cariboni et al. 2005). Die GnRH Neurone stehen auf diesem Wege normalerweise in der Hypothalamisch-Hypophysär-Gonadalen-Achse (HPG-Achse) in enger Wechselwirkung mit Hypophyse und Gonaden und üben einen regulierenden Einfluss auf die Synthese der Sexualhormone aus. Die Infertilität der Reeler-Mäuse könnte auf einer Beeinflussung hormonaler Regelkreise aufgrund dieser veränderten Hirnstruktur beruhen.

Es gibt Hinweise darauf, dass es bei den Reeler-Mäusen zu einer Störung der Follikulogenese mit Verlängerung des gonadalen Zyklus kommt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aromatase-Immunreaktivität in den Follikeln vermindert ist (Dissertation C. Schmahl 2012). Das Enzym Aromatase ist jedoch sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Säugern für die sexuelle Fruchtbarkeit essentiell (s.o.). Somit lässt die Reelin-defiziente Maus auch auf der gonadalen Ebene charakteristische Funktionsstörungen erkennen. Einen Reeler-typischen Phänotyp gibt es in den Gonaden aber nicht (Ikeda u. Terashima 1997).

Zur Klärung der funktionellen Fertilitätsstörungen der Reeler Mäuse können somit folgende Arbeitshypothesen aufgestellt werden:

1. Reelin-Mangel bedingt eine Fehlmigration der GnRH-Neurone und folglich eine verminderte Freisetzung von GnRH. Über Veränderungen in der HPG-Achse kommt es so zu einer verminderten Stimulation der gonadalen Gewebe.

2. Reelin wirkt lokal in den Gonaden. Es kontrolliert in den Ovarien die Follikulogenese und im Hoden/Nebenhoden die Spermatogenese. Möglicherweise entfaltet Reelin seine Wirkung dabei über die Regulation der Aromatase-Aktivität. Bei Reeler-Mäusen entfällt die stimulierende Wirkung des Glykoproteins in den Gonaden.

Die Grundvoraussetzung einer Regulation der Aromatase durch Reelin in den Gonaden ist, dass Reelin dort überhaupt vorhanden ist. Aus diesem Grund ist der Schwerpunkt dieser Arbeit der Nachweis dieses Glykoproteins in den Gonaden.

### **1.10 Arbeitshypothese und Fragestellung**

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese ist die Beeinflussung der Aromataseaktivität durch das Glykoprotein Reelin. Dabei ist die Fragestellung sowohl für Neuronendifferenzierungsprozesse im ZNS, als auch für die Keimzellreifung in den Gonaden relevant.

Eine notwendige Voraussetzung für das Zusammenwirken beider Moleküle ist deren gleichzeitiges Vorkommen in den untersuchten Organen. Im ZNS konnten sowohl Reelin, als auch die Östrogen-bildende Aromatase nachgewiesen werden. Die Gonaden sind durch eine hohe Aromataseexpression charakterisiert und sind die Hauptquelle des Östrogens in Säugetieren. Ein fundierter Nachweis von Reelin in den Geschlechtsorganen wurde bisher aber noch nicht unternommen. Ziel dieser Arbeit war daher der Nachweis von Reelin in den gonadalen Geweben, sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene.

Um die Wirkung von Reelin auf die Aromataseaktivität untersuchen zu können, wurden zellbasierte Aromataseassays durchgeführt. Außerdem wurden Promotorkonstrukte kloniert, die nun als „Readout“-System für weitergehende Promotorstudien zur Verfügung stehen. In diesen soll der Frage nachgegangen werden, ob Reelin die Transkription von Aromatase reguliert.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien:

#### 2.1.1 Biochemische Substanzen

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
1- $\beta$ -Androstendion	Hartmann Analytic
Androstendion:	Sigma
4-Androsten-3,17-dione (Vetranal®)	
Aktivkohle	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Aqua ad iniectabilia	Baxter
Bio Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bromphenolblau	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Chemilumineszenz Substrate:	
ECL (PierceECL Western Blotting Subst.)	Thermo Scientific
Pico (Super Signal West Pico)	Thermo Scientific
Femto (Super Signal West Femto)	Thermo Scientific
Dichlormethan	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Ethanol	Apotheke UKE
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Formestan	Sigma
Glycerin	Sigma
Glycin	Roth
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver	Heirler
Natriumdeoxycholat	Sigma
NP40 Alternative	Calbiochem
Page Ruler Plus Prestained Marker	Fermentas

PBS-Tabletten	Merck
Phos-Stop	Roche
Ponceau-Rot	Merck
Protease-Inhibitoren-Mix Complete	Roche
Protein-A Agarose	Sigma
Protein-G Agarose	Sigma
Rotiphorese-Gel 30 % (Acrylamid)	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka
Szintillationsflüssigkeit: Rotiszint ecoplus	Carl Roth
TBE-Puffer 10x	USB
TEMED	Sigma
TRIS	Roth
Trockeneis	TMG
Tween	Sigma
Trypsin EDTA	Biochrom

## 2.1.2 Zellkultur

### 2.1.2.1 Medien und Zusätze

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
F-12-Medium	Gibco
Fetales Kälber Serum (FCS)	PLA
LB-Medium	Sigma
Minimum Essential Medium	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen

### 2.1.2.2 Zelllinien

<u>Name</u>	<u>Beschreibung</u>
JEG-3	Humane Chorionkarzinomzellen
KGN	Humane Granulosazellen aus Ovarialkarzinom

### 2.1.3 Antikörper

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Primär-Ak: Anti-Reelin G10 (MAB 5364)	Millipore	1:1000
Sekundär-Ak: Goat-Anti-Mouse HRP	Thermo	1:2500

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

#### 5x Laemmli Probenpuffer: (Endvolumen 20ml)

1,54g	DTT ( $\approx$ 0.5M)
2.0g	SDS ( $\approx$ 10%)
8,0ml	1M Tris-HCl, pH 6,8 ( $\approx$ 0.4M)

Dieses Gemisch ergibt ca. 10,5ml, für 30 min. wird es gelöst und dann mit Glycerin auf 20ml aufgefüllt.

Eine Spatelspitze Bromphenolblau wird am Ende hinzugefügt.

#### Elektrophoresepuffer:

25mM	Tris
192mM	Glycin
0,1%	SDS

10x Laemmli-Laufpuffer:

30g            Tris-Base  
144g          Glycin  
10g            SDS  
Ad 1000ml mit Wasser

Transferpuffer für Nassblot (1x):

Glycin        2,9g  
Tris           5,8g  
10% SDS     3,7ml  
Methanol     200ml  
Ad 1000ml mit Wasser

RIPA-Puffer:

150mM        NaCl  
50mM         Tris pH 7,5  
1%            NP 40 Alternative  
0,1%          SDS  
0,5%          NaDeoxycholat  
5mM          EDTA

Zugabe von Proteaseinhibitoren (fertige Lösungen aus Tabletten hergestellt) kurz vor Gebrauch: „PhosStop“ (1:10) und „Complete“ (1:25)

PBS-Tween 20: (PBS/0,3% Tween 20):

30ml          Tween 10%  
100ml         10X PBS pH 7,4  
Ad 1000ml mit 870ml Wasser

10x TBE Puffer-Stammlösung:

0,89M	Tris
0,89M	Borsäure
0,02M	EDTA

**2.1.5 Molekularbiologische Materialien**

**2.1.5.1 Reinigungs- und Isolierungskits**

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
DNA-Extraktion aus Gel	QIAquick Gel Extraction Kit
DNA Isolationsreagenz aus Zellen	AppliChem
Miniprep Plasmid Kit GeneJET™	Fermentas
Midiprep: HiSpeed® Plasmid Purification	Qiagen
QIA-Schredder-Säule	Qiagen
RNA-Isolation: RNeasy Mini-Kit	Qiagen

**2.1.5.2 Restriktionsverdau**

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Puffer Verdau: Fast Digest 10x	Fermentas
Restriktionsendonukleasen:	
NheI, XhoI, EcoRI, (HindIII, BanHI)	Fermentas

**2.1.5.3 DNA-Gelelektrophorese**

Marker Gel: 1kb+	Invitrogen
Puffer DNA Gel: DNA Loading-Dye 6x	Fermentas

**2.1.5.4 Vektoren**

pDrive	Qiagen
pCMS-EGFP	Clontech
pGl3 Luciferase Reporter Vektor	Promega

**2.1.5.5 cDNA-Bildung, PCR**

Primer: Oligo dT	Invitrogen
First Strand Buffer 5x	Invitrogen
dNTP-Mix	Fermentas
Superscript® II, Reverse Transkriptase	Invitrogen
Taq Polymerase PCR Master Mix (2X)	Genaxxon
Dithiothreitol (DTT) 0,1M	Invitrogen

**2.1.5.6 Transfektion**

Transfektionsreagenz	Metafectene® Pro, Biontex
----------------------	---------------------------

**2.1.6 Verbrauchsmaterialien**

Petrischale 100x20mm (83.1802)	Sarstedt
12-Well-Platte (150628)	Nunc
24- und 96-Well-Platte	Falcon
Zellkulturflaschen	Falcon
Pippettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Kryo-Tubes	Roth
Zentrifugenröhrchen 1,5ml	Eppendorf, Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, konisch (15ml; 50ml)	Falcon
Filterpapier	Sartorius
PCR-Tubes	Eppendorf
Nitrozellulose-Membran: Protran	S&S

**2.1.7 Geräte:**

MACSmix™ Tube-Rotator	Miltenyi Biotec
Pipetten	Eppendorf
Nassblot Western-Blot-Apparatur	BioRad
SDS-PAGE-Apparatur	BioRad
Entwicklermaschine	Protec
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich
Mikroskope	Zeiss
Western-Blot-Zubehör (Glasplatten, Gelgießapparatur..)	BioRad
Thermocycler PCR	Biometra
Photometer	Eppendorf
Kamera DNA-Gele:	Kodak
Kamera Transfektion: AxioCam	Zeiss
Neubauer Zählkammer	Brand
β-Counter: 2900TR Tricarb	Packard

**2.2 Methoden****2.2.1 Biochemische Methoden:****2.2.1.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Ratten- und Mäusegewebe**

Gewebehomogenisierung:

Um das Vorhandensein von Reelin in verschiedenen Geweben zu untersuchen, wurden Proteinlysate angefertigt.

Für die Präparation wurden 1-3 Monate alte Ratten und Mäuse beider Geschlechter verwendet. Nach Herauspräparation der Organe wurden diese umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Auch bei den weiteren Verarbeitungsschritten wurde auf niedrige Temperaturen geachtet und alle Arbeiten auf Eis durchgeführt, um mögliche Verdauungsprozesse durch Proteasen zu verhindern. Es wurden die Organe Hippocampus, Ovar, Hoden und Nebenhoden isoliert.

Die Gewebe wurden zur Homogenisierung in einen Glaspotter überführt. Hierfür wurden sie in RIPA-Puffer gelöst, dem kurz vor der Verwendung PhosStop (Roche) und der Protease-Inhibitoren-Mix Complete (Roche) hinzugegeben wurde. Das Homogenat wurde nachfolgend auf 1,5ml Zentrifugenröhrchen verteilt und für eine Inkubationszeit von 20-30 min. auf Eis stehen gelassen.

Nach der 20 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rcf wurden die Proteinüberstände isoliert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C verwahrt. Um bei der späteren Untersuchung der Proteinlysate mehrfache Auftau- und Einfriervorgänge zu verhindern, wurden die Überstände in kleinen Volumina aliquotiert.

### **2.2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Sie basiert auf der Interaktion von Bestandteilen der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie®. Bei Bindung der Proteine an Coomassie in saurem Medium verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 470nm auf 595nm, was im Photometer gemessen werden kann. Hierbei verhält sich der entstehende Farbumschlag über einen breiten Konzentrationsbereich linear zu der eingesetzten Proteinmenge. Anhand einer zur Kontrolle mit BSA angefertigten Eichreihe kann somit die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben bestimmt werden. Für die Proteinbestimmung wurden 980µl 1x Bradford-Reagenz mit 19µl H<sub>2</sub>O und 1µl Probe gemischt und in Dreifachbestimmungen die Konzentrationen ermittelt.

### **2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung und Analyse von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Durch die Bindung der Proteine an das in dem Gel vorhandene Detergenz SDS bilden sich negativ geladene SDS-Proteinkomplexe in einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Molekularmasse. Die Bindung an SDS überdeckt somit die Eigenladung der meisten Proteine und führt zu einer einheitlichen Negativladung. Somit wird eine alleine durch das Molekulargewicht bedingte Auftrennung der Proteine ermöglicht. Als Grundlage für die durchgeführten gelelektrophoretischen Versuche diente das SDS-PAGE-System nach Laemmli (1970).



Da das untersuchte Protein Reelin, bzw. dessen Fragmente mit 160-420kDa ein relativ hohes Molekulargewicht haben, wurden Trenngel mit einer geringen Acrylamidkonzentration von 6% verwendet.

#### Herstellung der Gele:

Die verwendeten Glasscheiben wurden mit Ethanol gereinigt und in die Gießapparatur eingebracht. Dann wurde das erst wenige Augenblicke zuvor angesetzte Trenngel mit einer 5ml Pipette zwischen die Glasscheiben in die Apparatur gegossen und sofort mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde das Wasser entfernt und eine Schicht Sammelgel auf das ausgehärtete Trenngel gegossen. Im Anschluss wurden zügig die Gelkämme eingebracht.

#### Rezeptur für 6%iges SDS-Polyacrylmidgel:

	Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	5,3ml	5,5ml
Acrylamid 30%	2ml	1,7ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5ml	-----
0,5M Tris pH 6,8	-----	2,5ml
10% SDS	100µl	100µl
Bromphenolblau	-----	100µl
10% APS	100µl	100µl
TEMED	4µl	10µl

#### Vorbereitung der Proben:

Die Gewebeprobe wurden mit Wasser verdünnt und mit Laemmli-Probenpuffer, der in der Endlösung in der Konzentration von 1x vorlag, gemischt. Für die durchgeführten Versuche wurden Proteinmengen von 15µg bis 200µg verwendet. Die Denaturierung der Proteine erfolgte für 3 min. bei 95°C. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben direkt in die Geltaschen eingebracht.

#### Gelelektrophoretische Auftrennung der Proben:

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in der speziellen Gelkammer erfolgte bei 25mA pro Gel. Als Puffer für die Gelelektrophorese wurde der Laufpuffer nach Laemmli verwendet.

Zur Bestimmung der Molekulargröße der Proteine wurde der Page Ruler Plus Prestained Marker (Fermentas) verwendet.

#### **2.2.1.4 Immunblot (Western-Blot)**

##### Transfer auf Membran:

Bei Erreichen der für die Untersuchung relevanten Bandengrößen und damit Molekulargewichte in der elektrischen Auftrennung wurde die Gelelektrophorese gestoppt und die Polyacrylamidgele für das Blotting-Verfahren verwendet.

Beim Western-Blot werden die Proteine durch das Anlegen einer Spannung, von dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran; S&S) übertragen. Auf dieser Membran können die Proteine dann in späteren Schritten mit Antikörpern markiert und sichtbar gemacht werden. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde das Nassblotverfahren angewendet, da die Übertragung großer Proteine im alternativen Semi-Dry-Blotverfahren vergleichsweise niedrig war.

Der Transfer-Puffer wurde als eine 10x-Lösung gelagert und für die Versuche mit auf 4°C vorgekühltem Wasser und Methanol angesetzt. Die Schwämme für das Verfahren wurden in dem Puffer vorgeweicht, die Nitrozellulose-Membran auf 6x9cm zugeschnitten.

Die Blotapparatur wurde nach Vorschrift zusammengebaut und der Behälter mit dem kalten Transferpuffer gefüllt. Um die niedrige Temperatur für den Transfer aufrechtzuerhalten, wurde die Apparatur in einer Styroporbox und von Eis umgeben gelagert, zusätzlich wurde ein Rührfisch eingebracht.

Der Blot wurde über Nacht bei einer konstanten Spannung von 20V durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung gefärbt, um die Genauigkeit und Qualität der Proteinübertragung zu kontrollieren.

##### Detektion der Proteine:

Die Membran wurde in Blockierlösung (fettarmes Milchpulver in PBS-T in 5%iger Konzentration) eine Stunde lang bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C und in einer Konzentration von 1:1000 in Blockierlösung. Anschließend wurde die Membran viermalig in PBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 50 min. bei RT inkubiert. Dieser

speziesspezifische Antikörper ist an HRP (Horseradish-Peroxidase) gekoppelt und ermöglicht eine spätere Darstellung mittels Detektionsreagenzien.

Durch erneute Waschschrte wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Mittels Chemielumineszenz wurden die spezifischen Protein-Antikörper-Komplexe nachgewiesen. Als Reagenzien wurden ECL, Pico und Femto (alle von Thermo Scientific) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Grundlage der Chemielumineszenz ist die Entsendung von Lichtstrahlen aus dem in der Lumineszenzlösung enthaltenen Luminol durch die Einwirkung der an den sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase. Die in dieser Reaktion entstehenden Strahlen wurden durch die Belichtung des Röntgenfilms (Agfa) nachgewiesen. Die Belichtungszeiten variierten von 10 sek. bis 30 min. Die Entwicklung und Fixierung des Filmes wurde in der Entwicklermaschine durchgeführt.

Nicht selten wurde nach primärer Detektion mit Pico viermalig in PBS-T gewaschen und danach das sensitivere Femto zur erneuten Darstellung verwendet. Empirisch zeigte sich so ein geringerer Hintergrund als bei alleiniger Verwendung von Femto.

#### **2.2.1.5 Präzipitation mit Methanol**

Als sehr effiziente unterstützende Methode für den Nachweis von Reelin hat sich die Präzipitation der Proteinlysate mit Methanol erwiesen. In Anlehnung an eine von Smalheiser und Kollegen (2000) verwendete Methode wurden die Proteinlysate mit 1ml eiskaltem Methanol übergossen und anschließend gevortext. Über Nacht wurden die Proben bei -20°C gelagert und am nächsten Tag 15 min. lang bei 13.000 Umdrehungen/min. (U/min.) und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und restliches Methanol durch erneute Zentrifugation und anschließendes Abpipettieren entfernt.

Die entstandenen Sedimente wurden mit 1x Laemmli-Probenpuffer gründlich resuspendiert, 3 min. lang aufgeköcht und dann direkt in die Geltaschen aufgetragen.

#### **2.2.1.6 Immunpräzipitation**

Ziel der Immunpräzipitation (IP) ist es, auch in sehr geringen Mengen vorkommende und damit schwer nachweisbare Proteine photochemisch darstellen zu können. Durch selektive Bindung eines spezifischen Antikörpers und nachfolgende Präzipitation der gesuchten Epitope wird bei korrekt ablaufender IP eine Konzentrierung der gesuchten Substanz mit

Reduzierung des Hintergrundes erreicht. Dadurch wird eine bessere Darstellungsmöglichkeit der gesuchten Proteine nach durchgeführter SDS-PAGE ermöglicht.

Für die IP wurden Proteinlysate verwendet, die aus den Ratten- und Mausorganen gewonnen wurden. Als Beads kamen Protein-G Agarosekügelchen (Sigma) zum Einsatz. Das Protein-G stammt aus der Zellwand bestimmter Streptokokkenarten und hat die Eigenschaft, Antikörper, mit sehr hoher Affinität an deren Fc-Teil zu binden. Über den spezifischen Fab-Teil der Antikörper können somit weiterhin Antigene gebunden werden.

Die Fixierung des Antikörpers am Fc-Teil in der Agarose ermöglicht somit die Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe.

Für die Versuche wurden jeweils 500µg Proteinlysate verwendet. In einem ersten Schritt wurden die Proben vorgereinigt, indem unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen provoziert wurden. Hierfür wurden die Proben mit 10µg Mäuse-Ig-G inkubiert, da auch der später verwendete spezifische Anti-Reelin-Ak murinen Ursprungs ist. Zusätzlich wurden PhosStop (Roche) und der Protease-Inhibitoren-Mix Complete (Roche) zur Verhinderung von Protein-Verdauungsprozessen beigefügt. Das Gemisch wurde mit RIPA ad 500µl aufgefüllt.

Es wurde für 60 min. bei 4°C drehend inkubiert und anschließend für 20 sek. bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Dann wurden 50µl vorgewaschene, und in RIPA 1:2 verdünnte Protein-G-Agarosekügelchen zu den Proben pipettiert und erneut drehend bei 4°C für 60 min. inkubiert. Durch erneute Zentrifugation für 20 sek. bildeten die Beads mit den unspezifischen Ag-Ak-Komplexen ein Sediment und der Überstand wurde für die spezifische Anti-Reelin-Immunpräzipitation verwendet.

Jeweils 500µl Überstand wurden im nachfolgenden Schritt entweder mit 5µg spezifischem Anti-Reelin-Ak (MAB 5364, Millipore) oder 5µg unspezifischem Maus-IgG als Kontrolle, über Nacht drehend bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 50µl gewaschener und in RIPA 1:2 verdünnter Beads wurde für mindestens 60 min. drehend inkubiert und im Anschluss bei maximaler Umdrehung für 20 sek. zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Sediment dreimalig in 500µl RIPA gewaschen und anschließend in 25µl 2x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Nach 10 minütigem Kochen bei 95°C wurden die Proben mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

### **2.2.1.7 Besonderheiten für den Nachweis von Reelin**

Es wurden spezielle Erkenntnisse bezüglich der Handhabung von Proben für den Nachweis von Reelin in die Methoden einbezogen (Lugli et al. 2003).

So wird z.B. mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Proben mit zunehmendem Verlust der 420kDa-Bande beschrieben und auch angemerkt, dass Reelin hochsensitiv auf verlängerte Aufkochzeiten durch fast vollständiges Aufbrechen der spezifischen Banden reagiert. Als Maßnahmen wurden die Proteinlysate in versuchsangepassten Aliquotierungen portioniert und die Aufkochzeit auf 3 min. beschränkt.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden:**

### **2.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen und Materialien**

JEG-3: Humane Chorionkarzinomzellen  
KGN: Humane Granulosazellen aus Ovarialkarzinom

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter genauer Beachtung des sauberen Arbeitens an der sterilen Werkbank durchgeführt. Vor und nach dem Arbeiten wurde die Werkbank mit 80%igem Ethanol gereinigt, alle verwendeten Gefäße und Geräte wurden vor dem Einbringen in die Werkbank ebenfalls gereinigt. Die Pasteur-Glaspipetten wurden vor der Verwendung abgeflammt.

Die für die Versuche verwendeten KGN-Zellen wurden in einer Mischung aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und F-12-Medium kultiviert (DMEM/F12 1:1, Gibco), das zusätzlich durch 5-10% Fetales Kälber Serum (FCS) und Penicillin+Streptomycin (Pen/Strep) (Konzentration nach Verdünnung: Pen.:100U/ml, Strep: 100µg/ml) ergänzt wurde. Bei den JEG-3-Zellen wurde Minimum Essential Medium (MEM, Gibco) verwendet, das ebenfalls mit FCS und Pen/Strep versetzt wurde.

Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin/EDTA (Trypsin 0,25%, EDTA 0,025%) verwendet. Alle Medien und Zusätze waren steril und wurden vor deren Verwendung auf 37°C erwärmt. Als Kulturgefäße wurden Produkte der Firmen Sarstedt, Nunc, und Falcon BD verwendet. Die Inkubation aller Zellen erfolgte bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%, bei einer Luftfeuchtigkeit von 95%.

### **2.2.2.2 Passage der Zellen und Versorgung mit Medium**

Die Zellen wurden passagiert, wenn sie mit einer Bedeckung von etwa 90% der verfügbaren Wachstumsfläche subkonfluent waren. Dieses war bei den JEG-3 Zellen in der Regel zwei Mal pro Woche der Fall, bei jeweiliger Neuaussaat im Verhältnis von 1:10. Die KGN-Zellen wurden je nach Bedarf für die Versuche ein bis zwei Mal pro Woche passagiert, bei Neuaussaat zwischen 1:2 und 1:5.

Für die Passage der Zellen wurde nach Betrachtung der Zellmorphologie im Lichtmikroskop und dem Ausschluss möglicher Kontaminationen das Medium abgesaugt und Trypsin + EDTA appliziert. Mit diesem Schritt wurden die Zellen angedaut, um sie vom Boden des Kulturgefäßes zu lösen. Nach einer Einwirkzeit von 2 min. im Inkubator und Kontrolle der enzymatischen Reaktion unter dem Mikroskop wurde die vierfache Menge des jeweiligen Kulturmediums hinzugegeben, um die Trypsinierungsreaktion zu stoppen.

Durch 5 minütige Zentrifugation bei 1000 U/min und RT bildeten die Zellen ein Sediment, das nach Verwerfung des Überstandes mit frischem Medium resuspendiert wurde. Je nach gewünschter Dichte wurden die Zellen dann neu ausplattiert.

Für die Versuche in Gefäßen mit kleineren Wachstumsflächen (12-Well-, 24-Well-, und 96-Well-Platten) wurde hierfür die Zellzahl im Medium durch Quantifizierung in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die resuspendierten Zellen wurden gut gemischt und 50µl des Zellgemisches mit einer Pipette entnommen und in die Neubauer Zählkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen pro Gruppenquadrat (bestehend aus jeweils 16 kleineren Quadraten) bestimmt, indem vier Gruppenquadrate ausgezählt und deren Mittelwert gebildet wurde. Durch Multiplikation dieses Wertes mit dem Faktor  $10^4$  konnte die Anzahl der Zellen pro ml errechnet werden.

Zwischen den Passageschritten wurden die Zellkulturen in der Regel alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt. Hierfür wurde nach Examination der Zellen im Mikroskop das Medium der Kulturen abgesaugt und durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes, Medium ersetzt.

### **2.2.2.3 Kryokonservierung der Zellen**

#### Einfrieren:

Um die Zellen langfristig zu lagern, wurden sie in einem speziellen Medium eingefroren. Hierfür wurden die Zellen, wie für das Passagieren beschrieben (2.2.2.2), vom

Zellkulturgefäß gelöst und abzentrifugiert. Das Sediment wurde dann in einem auf 37°C vorgewärmten Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 10% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in ein 2ml Kryoröhrchen überführt. Nach 30-minütiger Kühlphase im Eiswasser im Kühlschrank wurden die Zellen in einer Styroporbox für 24h bei -80°C gelagert. Danach wurde ein Transfer in Behälter mit Flüssigstickstoff durchgeführt.

#### Auftauen:

Zum Auftauen der Zellen wurden die Aliquots aus dem Flüssigstickstoff geholt und sofort im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Sobald das gesamte Eis geschmolzen war wurden die Zellen unter der Werkbank zügig in 10ml Kulturmedium überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/min. wurde das Medium abgesaugt und das Zellsediment in 5ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und dann in gewünschter Dichte ausplattiert.

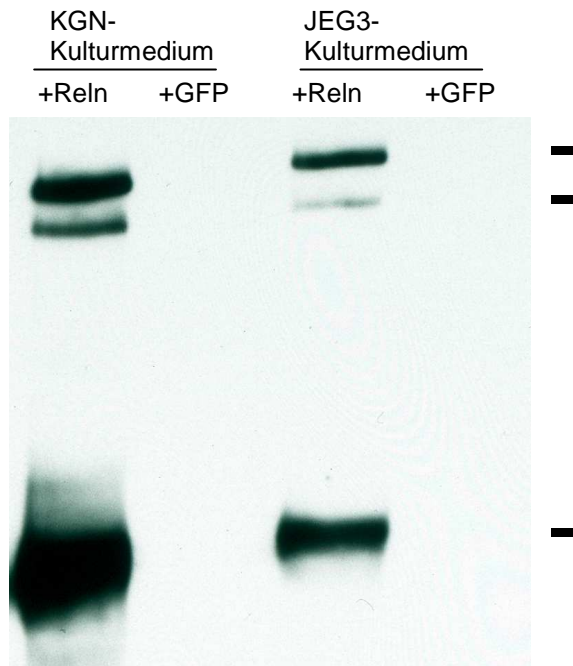
#### **2.2.2.4 Herstellung konditionierten Mediums**

Das für die Zellkulturversuche verwendete konditionierte Medium wurde mit transfizierten HEK-Zelllinien gewonnen, die im Institut etabliert sind. Angewendet wurden eine Reelin-produzierende und eine Green-Fluorescent-Protein (GFP)-produzierende Zelllinie.

Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurden sie auf Petrischalen ausplattiert und in FCS-haltigem DMEM-Medium kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das serumhaltige Medium entfernt und durch nicht serumhaltiges Kulturmedium ersetzt. In diesem Medium wurden die Zellen dann erneut 1-2 Tage kultiviert. Das infolge der Kultivierung von den Zellen konditionierte Medium wurde dann gesammelt und aliquotiert eingefroren.

Die Zellen konnten nachfolgend erneut mit serumhaltigem Medium inkubiert werden, wodurch sie sich erholten und erneut zur Herstellung serumfreien konditionierten Mediums zur Verfügung standen. Dieses Prozedere konnte bis zu drei Mal wiederholt werden.

Mittels Westernblot wurde das Vorkommen von Reelin in den Medien überprüft (Abb. 5).



**Abbildung 5: Überprüfung der konditionierten Medien auf das Vorhandensein von Reelin**

Reelin- oder GFP-produzierende HEK-Zellen wurden in serumfreiem Medium kultiviert und das konditionierte Medium für Zellkulturversuche gesammelt. Die Medien wurden mittels Western-Blot mit dem monoklonalen Anti-Reelin-Ak MAB 5364 auf das Vorhandensein von Reelin untersucht. Alle drei Banden (160, 310 und 420 kDa) sind Reelin-spezifisch (siehe unten).

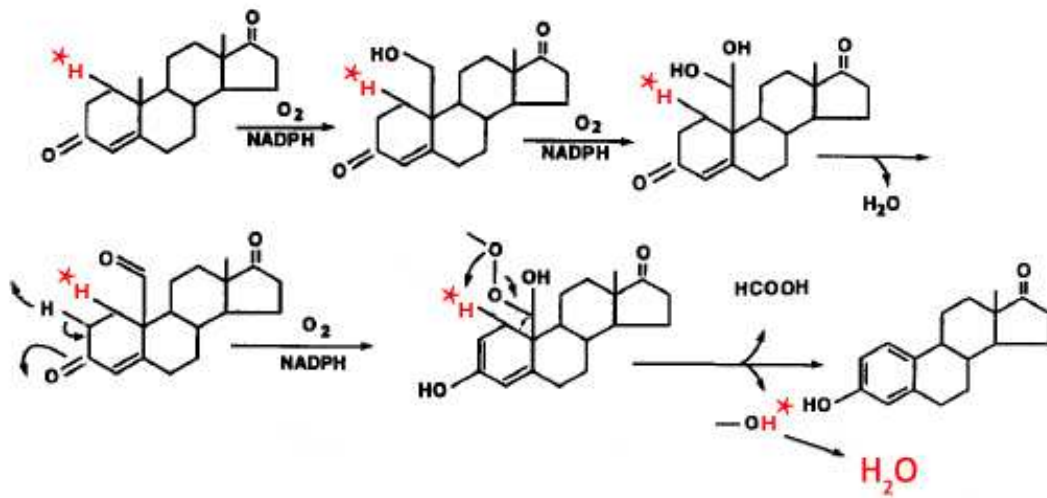
### 2.2.2.5 Aromatase-Assay

Um die Aktivität der CYP-450 Aromatase in Zellkulturen zu bestimmen, wurde der Aromatase-Assay nach E.D. Lephart und E.R. Simpson (1991) durchgeführt. Dieser zellbasierte Assay wurde mit JEG-3-Zellen nach Drenth et al. (1998) und auch mit KGN-Zellen durchgeführt.

#### Prinzip:

Das als Substrat für den Aromatase-Assay verwendete [1- $\beta$ - $^3$ H] Androstendion (Hartmann Analytic, spezifische Aktivität: 26,3 Ci/mmol bzw. 973,1 GBq/mmol) trägt an der 1 $\beta$ -Stelle ein radioaktives Tritium( $^3$ H)-Atom, das im letzten Reaktionsschritt als Wasser freigesetzt wird (Abbildung 6). Dieses radioaktive Wasser wird in Waschschrinen isoliert und von möglicherweise verbliebenem Substrat getrennt (Substrat als lipophiles Steroidhormon wird von der wässrigen Phase getrennt und verworfen), um anschließend im  $\beta$ -Counter die Radioaktivität zu quantifizieren. Die Enzymaktivität kann somit proportional zum freigesetzten, radioaktiven Wasser bestimmt werden.





**Abbildung 6: Aromatase-Assay nach Lephart, Methods in Enzymology Vol. 206 (1991) (ver.)**

Bei der Umwandlung von Androgenen in Östrogene werden jeweils drei Moleküle NADPH und  $\text{O}_2$  je gebildetes Molekül Östrogen benötigt. Durch konsekutive Hydroxylierungen und Einfügungen von Sauerstoff am C-19-Atom kommt es im Laufe der Reaktion zur Abspaltung der ehemaligen C-19 Methylgruppe als Ameisensäure und zur Aromatisierung des A-Ringes. Außerdem entsteht Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

Als Substrat für den Aromatase-Assay wurde radioaktives [1- $\beta$ - $^3\text{H}$ ] Androstendion verwendet, das an der 1 $\beta$ -Stelle des C-19-Atoms ein radioaktives Tritium( $^3\text{H}$ -Atom (mit \* markiert) trägt. Das im letzten Reaktionsschritt entstehende Wasser trägt dieses  $^3\text{H}$ -Atom und kann als Maß für die Aromataseaktivität im  $\beta$ -Counter gemessen werden.

Das radioaktive [1- $\beta$ - $^3\text{H}$ ] Androstendion wurde kurz vor dem Versuch in serumfreiem, Reelin- oder GFP-haltigem Medium in einer Stammlösung von 200nM angesetzt. Die gewünschte Substratkonzentration im Assay wurde mit 50nM festgelegt. Dieser Wert bezieht sich auf Berichte von  $K_m$ -Werten für Androstendion zwischen 30-50nM (Lephart und Simpson 1991) und  $62 \pm 19\text{nM}$  (Krekels 1991).

Die in 12-Well-Platten kultivierten, subkonfluenten Zellen wurden 1 bis 21 Stunden vor Zugabe des radioaktiven Mediums mit 500 $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium inkubiert, das entweder Reelin oder GFP beinhaltet. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden 125 $\mu\text{l}$  des für die Inkubation verwendeten Mediums abgesaugt und verworfen und durch 125 $\mu\text{l}$  des 200nM [1- $\beta$ - $^3\text{H}$ ]Androstendion-haltigen Mediums ersetzt, das mit dem Restmedium gut vermischt wurde (Endkonzentration des Androstendions: 50nM). Die Zellen wurden dann bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  für 1 bis 2 Stunden inkubiert.

Im Anschluss wurden die 500 $\mu\text{l}$  Zellüberstand in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit 2ml Dichlormethan (Roth) überschichtet, 1 min. lang gevortext und dann 5 min. lang bei 2500 U/min. zentrifugiert. Von dem entstandenen wässrigen Überstand wurden jeweils 500 $\mu\text{l}$  zusammen mit 500 $\mu\text{l}$  Dextran behandelte Aktivkohle (Sigma) in ein 1,5ml

Zentrifugationsröhrchen pipettiert und für 10 sek. gevortext, gefolgt von 10 min. Zentrifugation bei 5500 U/min..

100µl des entstandenen Überstandes wurden mit 2ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth) gemischt und zur Auswertung in den Szintillations-Counter gegeben.

Um falsch positive Ergebnisse der Aromatase-Aktivität auszuschließen, wurde der Assay auch nach Behandlung der Zellen mit dem Aromatase-Hemmer 4-Hydroxy-Androstendion (Formestan, Sigma) durchgeführt.

Die im  $\beta$ -Counter gemessene Strahlung (in counts/min.) diene als indirektes Maß der Aktivität der Aromatase.

#### **2.2.2.6 Radioimmunassay (RIA)**

Der Radioimmunassay ist eine sehr empfindliche Methode für den Nachweis und die Quantifizierung kleinster Substanzmengen. Er wurde 1960 von Yalow und Berson etabliert. Das Prinzip des Assays basiert auf der Kompetition der gesuchten Substanz (z.B. Hormon) aus der Probe mit einem radioaktivmarkiertem Analogon um die Bindung an einen spezifischen Antikörper.

Die Menge des Antikörpers ist genau auf die Menge der radioaktiv-markierten Substanz abgestimmt. Durch homologe, kompetitive Bindung auch der nicht radioaktiven Substanz aus der Probe an den Antikörper, können nicht alle markierten Teile binden und werden durch Waschprozesse entfernt.

Die gemessene Strahlungsaktivität der Antigen-Antikörperkomplexe ist daher von dem Anteil radioaktiv markierter Teilchen an den Komplexen abhängig, welche wiederum durch die Menge unmarkierter Substanz in der Probe bestimmt wird. Anhand einer Eichkurve kann so auf die Konzentration der untersuchten Substanz geschlossen werden.

Die Durchführung des RIA zur Östrogenbestimmung wurde in Göttingen vom „Department für Endokrinologie“ verblindet vorgenommen.

#### **Gewinnung der untersuchten Proben:**

##### Medium:

KGN-Zellen wurden in Petrischalen (Wachstumsfläche 10cm<sup>2</sup>) kultiviert. Bei Erreichen der Subkonfluenz wurde das Zellmedium abgesaugt und durch 5ml serumfreies und 50nM

Androstendion-haltiges Medium ersetzt. Dieses Medium war außerdem entweder Reelin- oder GFP-haltig.

Nach einer Inkubationszeit von 4 oder 8 Stunden wurde das Medium abgenommen, in 15ml Greiner überführt und sofort bei -20°C eingefroren. Der Versand nach Göttingen erfolgte ebenfalls bei -20°C.

#### Proteinlysat:

Die Zellen wurden nach der Entnahme des Mediums zwei Mal mit PBS gewaschen, dann mit 300µl RIPA+PI beschichtet, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Die Herstellung des Lysates erfolgte wie oben beschrieben. 50µl des Lysates wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford genutzt, der Rest bei -20°C nach Göttingen versandt.

### **2.2.2.7 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA**

Die Transfektion dient dem Einbringen von DNA, RNA und Expressionsvektoren in eukaryote Zellen. Um dieses zu erreichen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die sowohl chemische (Calciumphosphat-Präzipitation), physikalische (Elektroporation, Mikroinjektion) und biologische (Lipofektion, Virensysteme) Maßnahmen beinhalten.

Für die durchgeführten Transfektionen wurde als Methode die Lipofektion mit kationischen Liposomen angewendet. Dieses erstmals 1987 von Felgner und Mitarbeitern beschriebene Verfahren basiert auf der endozytotischen Aufnahme von mit einem Lipidgemisch komplexierter DNA durch die Zielzellen.

Dieses Lipidgemisch besteht aus kationischen Lipiden und ungeladenen Helferlipiden, die durch Ultraschallbehandlung sogenannte Liposomen bilden. Das Gemisch wurde für die Versuche als fertige Transfektionslösung (Metafectene® PRO, Biontex) bezogen. Für den Erfolg der Technik und eine hohe Ausbeute an transfizierten Zellen ist es notwendig, die auf die jeweilige Zellart zugeschnittenen optimalen Transfektionsbedingungen herauszufinden. Einflussgrößen sind hier vor allem das Verhältnis von DNA zu Transfektionslösung, deren absolut eingesetzte Mengen je Transfektionsansatz, die Inkubationszeit und Zelldichte, sowie die Verwendung serumhaltigen- oder freien Mediums.

#### Optimierung der Transfektion mit Metafectene® Pro

Zur Ermittlung optimaler Transfektionsbedingungen wurde die Transfektion mit einem Green Fluorescent Protein (GFP) Vektor durchgeführt (pCMS-EGFP; Clontech). Dieser wurde

zuvor mittels Midi-Prep vervielfältigt (siehe unten). Als Zellreihen wurden immortalisierte Zelllinien von KGN und Neuro-2a verwendet. Als Grundlage der Versuche diente das Optimierungsprotokoll des Herstellers (Biontex).

Die Zellen wurden in verschiedener Dichte in 96-Well-Platten ausgesät und nach einer Ruhepause von 24h für die Transfektion selektiert. Von den KGN-Zellen wurden die Ansätze mit 11.000 und 22.000 Zellen/well und von den Neuro-2a-Zellen 20.000 und 30.000 Zellen/well ausgewählt.

Als Vorbereitung für die Transfektion wurden sowohl die DNA, als auch das Transfektionsreagenz mit serumfreiem Medium gemischt, dann zusammengebracht und 20 min. lang inkubiert, damit sich die DNA-Lipidkomplexe bilden konnten. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von Vektor-DNA und Transfektionsreagenz angewendet (siehe Tabelle 1). Von dem DNA-Lipidgemisch wurden dann jeweils 100µl auf die mit frischem, serumfreien Medium versorgten Zellen in einem Verhältnis von 1 zu 10 gegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach 3h wurde die Transfektionsreaktion durch Wechsel des Mediums beendet. Nun wurden die Zellen in serumhaltigem Medium für weitere 24h in den Inkubator gegeben.

Verhältnis DNA/ Metafectene® Pro	1/4	1/8	1/16	1/4	1/8	1/12	1/5,33	1/8	1/10.67
DNA	0,5µg	0,5µg	0,5µg	1µg	1µg	1µg	1,5µg	1,5µg	1,5µg
Metafectene® Pro	2µl	4µl	8µl	4µl	8µl	12µl	8µl	12µl	16µl

**Tabelle 1: Protokoll zur Optimierung der Transfektion von KGN- und Neuro2a-Zellen**

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden:

#### Herstellung der Promotorkonstrukte:

##### 2.2.3.1 Isolation von DNA aus humanen KGN-Zellen

Für den Luciferase-Assay wurde genetisches Material aus den KGN Zellen gewonnen. Zur Extraktion der DNA wurde ein spezielles Isolierungsreagenz (DNA Isolation Reagent for Genomic DNA, AppliChem) verwendet, das direkt auf die vom Medium befreiten Zellen gegeben wurde. Hierbei wurde je 1ml Reagenz auf eine Petrischale konfluenten KGN-Zellen (Wachstumsfläche von 10cm<sup>2</sup>) gegeben und 5 min. lang bei RT inkubiert. Durch die freigesetzte genomische DNA bildete sich ein dickflüssiges Gemisch. Anschließend wurde mit 1000 g für 10 min. bei RT zentrifugiert, der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen

überführt und das Sediment verworfen. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 1ml 100% EtOH pro ml DNA Isolations-Reagenz und nachfolgendes Mischen durch Inverting. Es wurde 3 min. lang bei RT inkubiert und die dann sichtbar gewordene DNA durch Zentrifugation bei 5000 g für 5 min. bei RT gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zwei Mal mit 95% EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation mit 1000 g für 1 min. bei RT wurde das Ethanol gründlich entfernt.

Das DNA-haltige Sediment wurde dann in 8mM NaOH gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes der DNA Proben erfolgte nach Protokoll des Herstellers mit HEPES.

### Nachweis der Reelin mRNA

#### **2.2.3.2 RNA Isolation aus Rattengewebe**

Für die Extraktion der RNA wurde das RNeasy Mini-Kit von Qiagen verwendet.

Die Gewebe stammten von 12 Wochen alten Ratten und wurden bei -80°C gelagert. Unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff wurden die Organe mit dem Mörser pulverisiert. Anschließend wurde das pulverisierte Gewebe in einen RNA-Puffer (1ml RLT-Puffer + 10µl β-Mercaptoethanol) überführt und durch Schwenken im warmen Wasserbad und leichtes Vortexen gelöst. Die Homogenisierung erfolgte in einer hierfür speziell entwickelten Säule (QIASchredder, Qiagen). Die weiteren Schritte der RNA-Extraktion erfolgten gemäß Protokoll des Herstellers. Die Bestimmung der Konzentration der Proben erfolgte im Photometer.

#### **2.2.3.3 Primer**

Zum Nachweis der Reelin mRNA in den Gonaden und zur Amplifikation der Aromatase-Promotoren wurden Primersequenzen ausgewählt (s.u.) und bei der Firma Eurofins bestellt.

Das Primerdesign wurde unter Beachtung einiger elementarer Regeln bezüglich Primerlänge, Primerstruktur (keine Sekundärstrukturen) und Verhältnis der einzelnen Basen zueinander (und damit Beeinflussung der Schmelztemperatur) festgelegt. Die Überprüfung der Genspezifität der Primer erfolgte mit der „Blast“ Software des NCBI (National Center for Biotechnology Information).

a) Primer für den Nachweis der Reelin mRNA:

Für den Nachweis der Reelin mRNA wurden bewusst intronüberspannende Primer ausgewählt. Diese amplifizieren spezifisch die gespleißte, intronbereinigte mRNA und vermeiden somit eine genomische Verunreinigung bei der Amplifikation. Die Informationen über die Spleißstellen der mRNA wurde erneut über die Datenbank des NCBI bezogen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt

Name	Sequenz	Produktlänge
Ratte Reelin, 477	fw: 5'-CAA GCA TCC AGT CTT CTC AGA GCA TT-3' rv: 5'-GGT ATG TGG TAG TCA ACT CTC GAG G-3'	417 bp
Ratte Reelin, 659	fw: 5'-GGG CTC CTG AGG AGG ACT CGG CC-3' rv: 5'-GCC ATC CTC ATT GAA GAA GAG GTT GT-3'	659 bp
Ratte Reelin, 417	fw: 5'-CCA CGT CTC CTC AAG TGC CAC ACA-3' rv: 5'-GTG CTC CCA ATT TGC AAG ACA AAC ATA-3'	477 bp

**Tabelle 2: Primersequenzen für den Reelin mRNA-Nachweis**

b) Primer für die Herstellung der Promotorkonstrukte

Die Genregulation der Aromatase wird über gewebespezifische Promotoren gesteuert (Boon et al. 2010). Die Primer wurden unter Beachtung der aktuellen Literatur so ausgewählt, dass die spezifischen Regionen der Aromatasepromotoren aus Gehirn und Ovar flankiert wurden. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 dargestellt, deren Genprodukte zeigen die Abbildungen 7-8. Genauere Informationen zu den gewebespezifischen Aromatasepromotoren sind in der Diskussion aufgeführt (4.4).

Name	Sequenz	Produktlänge
Gehirn Aromatase Human	fw: 5'-GCT AGC TAT CCC AAA ATA TAA GCC ACA AAG AG-3' rv: 5'-CTC GAG TGG GTC TGC TGG TCA CTT CTA GT-3'	1694 bp
Ovar Aromatase Human	fw: 5'-GCT AGC TGA GCT TTA TTT TCT TAT AAT TTG GC-3' rv: 5'-CTC GAG CTG TGG AAA TCA AAG GGA CAG AA-3'	341 bp

**Tabelle 3: Primersequenzen zur Amplifikation der hirn- und ovarspezifischen Aromatasepromotoren**

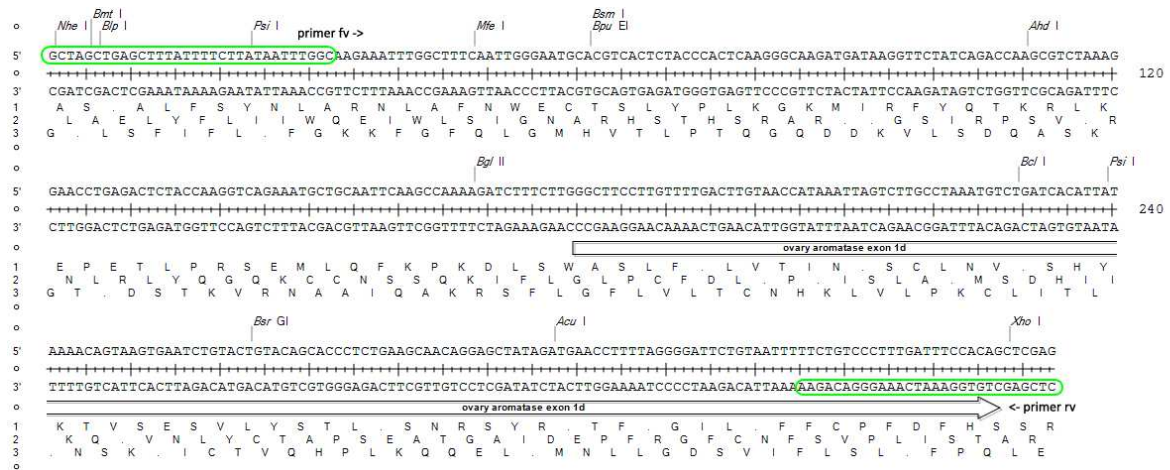


Abbildung 7: Sequenz des ovariellen Promotors, der mittels spezifischer Primer amplifiziert wurde

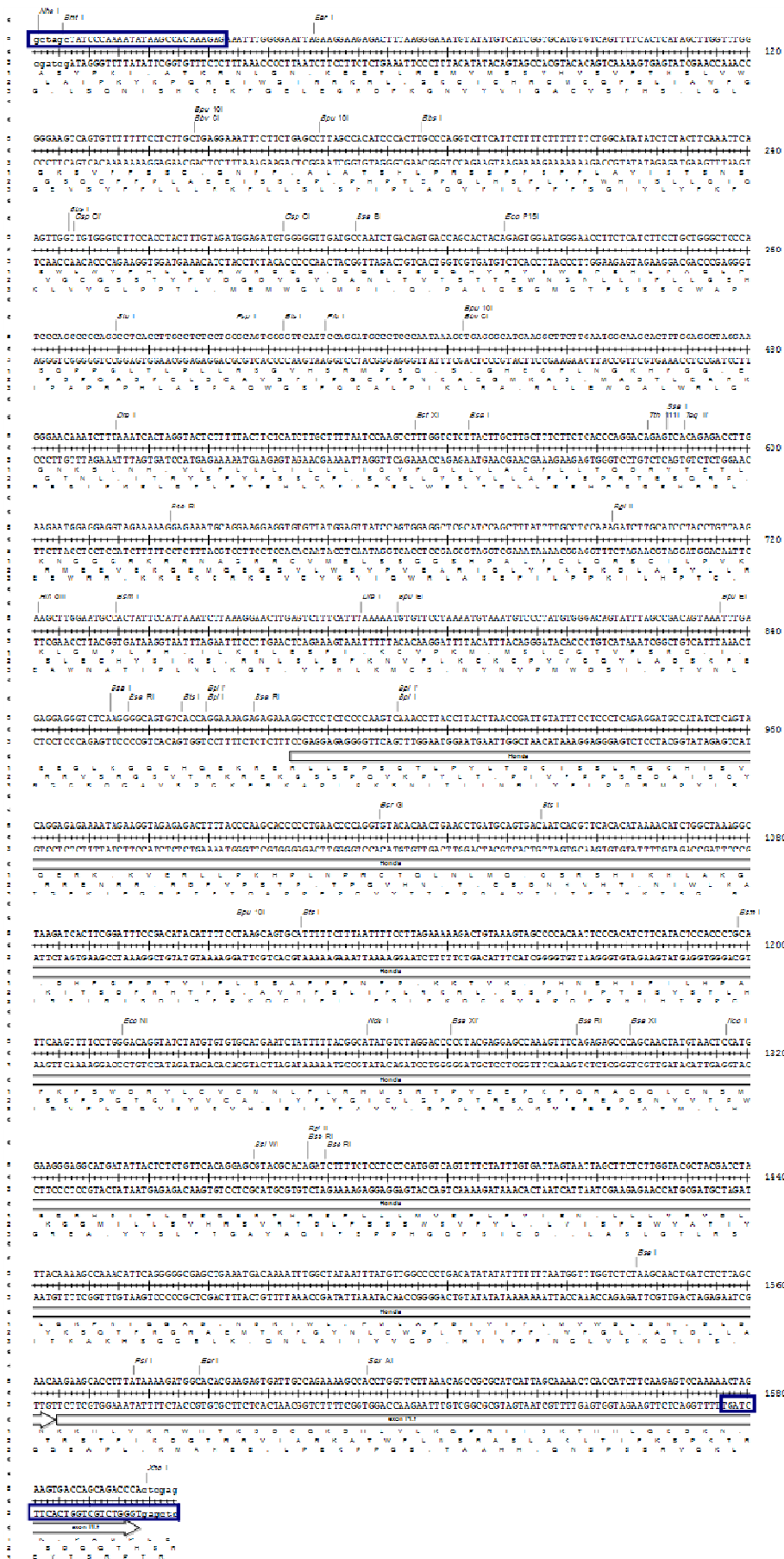


Abbildung 8: Sequenz des hirnspezifischen Aromatase-Promotors des Exon I, nach Honda et al. 1994, BBRC (Abb.3): "5' flanking region of brain exon1"



### 2.2.3.4 Herstellung von cDNA für RT-PCR mittels Reverser Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Superscript® II, Reverse Transkriptase, Invitrogen) wurde eine komplementäre cDNA zur isolierten mRNA erstellt. Dieses virale Enzym (aus dem Moloney Murine Leucemia Virus) ermöglicht hierbei das Umschreiben der als Ribonukleinsäure kodierten Information in Desoxyribonukleinsäure, welche dann mittels PCR problemlos vervielfältigt werden kann.

Für die Bindung der Primer wurden jeweils 1µg RNA der einzelnen Gewebe mit DEPC auf 10µl aufgefüllt und durch 0,5µl Oligo dT-Primer ergänzt. Dieser Primer besteht aus mehreren Thymidinen, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und damit der Reversen Transkriptase die Kodierung entlang der gesamten mRNA bis zu deren 5'-Ende ermöglicht. Das Gemisch wurde für 10 min. bei 65°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und die Primer hybridisieren zu lassen. Im Anschluss wurde kurz zentrifugiert.

Für die Bildung der cDNA wurden dann 9,6µl Mastermix bestehend aus Nukleotiden, Puffer, einem RNase-Inhibitor und der Reversen Transkriptase zu dem Gemisch gegeben.

Es wurde für 60 min. bei 37°C und nachfolgend für 5 min. bei 95°C inkubiert. Dann wurden die Proben auf Eis gestellt.

#### Mastermix für cDNA Bildung

10 mM dNTPs:	1,6µl
5x conc. Puffer:	4,0µl
Superscript:	2,0µl
DTT (0,1M)	2,0µl

### 2.2.3.5 PCR

#### Nachweis der Reelin mRNA

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde für den spezifischen Reelin mRNA Nachweis angewendet. Die mittels reverser Transkriptase gebildete cDNA wurde hier mit Primern für Reelin-mRNA spezifische Sequenzen vervielfältigt.

### Herstellung der Promotorkonstrukte

Für den Klonierungsschritt im Luciferase-Versuch (siehe unten) wurden als gewünschte Gensequenzen die Aromatase-Promotoren aus dem KGN-Genom amplifiziert.

Die PCR dient der Amplifikation gewünschter Gensequenzen und hat eine hervorragende Bedeutung in der molekularbiologischen Diagnostik und Forschung.

Der typische Ablauf der PCR beinhaltet drei Phasen: In der Denaturierungsphase bei hohen Temperaturen kommt es zu einer Auftrennung der DNA-Stränge. Das Annealing dient dem Anlagern und Hybridisieren der eingesetzten Primer und in der Elongationsphase kommt es schließlich zur Synthese eines komplementären DNA-Stückes durch die verwendete *Thermus Aquaticus* (Taq)-Polymerase.

Diese hitzestabile DNA-Polymerase hat ihr Arbeitsoptimum bei 72°C und arbeitet mit einer 5'3'-Polymeraseaktivität. Gewöhnlich werden die drei PCR-Phasen in 20-30 Zyklen durchlaufen, welche es ermöglichen, eine sehr große Menge der gesuchten DNA-Sequenzen aus dem eingesetzten Material zu erhalten.

Als Primer werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet, die spezifisch an gewünschte DNA-Sequenzen binden und somit die gezielte Vervielfältigung ermöglichen. Hierbei werden die Einzelstränge der gesuchten Gensequenz bei doppelsträngig vorliegender Ausgangssubstanz jeweils von einem eigenen Primer flankiert.

Die PCR wurde in einem Thermozykler mit einem PCR Mastermix durchgeführt (Taq Polymerase PCR Master Mix (2x); Genaxxon). Pro Gewebe und Primer wurden die Ansätze jeweils auf Eis zusammenpipettiert, kurz gevortext und zentrifugiert.

### Zusammenstellung der PCR-Ansätze

<1µg DNA

0,1-0,5µM Primer

ad 20µl H<sub>2</sub>O

20µl 2x Mastermix

Inhalt des Taq Mastermix (2x): Taq DNA Polymerase:0,05 units/µl, Tris HCl: pH 8,8, Tween-20: 0,02 %, MgCl<sub>2</sub>: 3mM, dNTPs: jeweils 0,4mM

### **2.2.3.6 DNA Gelelektrophorese**

Die DNA Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um Arbeitsschritte mit PCR-Produkten, Vektoren und Restriktionsendonukleasen zu kontrollieren. Bei dieser Methode kommt es zu einer Auftrennung der eingesetzten DNA-Fragmente nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Das in dem Gel vorhandene Reagenz Ethidiumbromid interkaliert mit der Nukleinsäure und macht sie dem Beobachter dadurch unter UV-Licht sichtbar. Durch parallele Einbringung von Markern (z.B. 1kb-Plus, Invitrogen) mit bekanntem Laufmuster ist eine Größenzuordnung der untersuchten Fragmente möglich.

Die Gele zur Auftrennung der DNA hatten einen Agaroseanteil von 1%. Für die Herstellung von 2 kleinen Gelen wurde 1g Agarose in 100ml 0,5x TBE gemischt, für 1,5 min. in der Mikrowelle aufgeköcht, kurz abgekühlt und mit 1,3µl Ethidiumbromid versetzt. Dann wurde das Gel in die Kammern gegossen und die Aushärtung abgewartet.

Die Auftrennung wurde bei 60-100V durchgeführt. Vor dem Einbringen der Proben wurden diese noch mit einem Probenpuffer (DNA Loading-Dye 6x, Fermentas) versetzt.

Die Dokumentation der Gele erfolgte an einem UV-Tisch mit angeschlossener Kamera.

### **2.2.3.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Gel**

Die gewünschten DNA-Banden wurden unter dem UV-Tisch aus dem Agarosegel herausgeschnitten, aus dem Gel isoliert und gereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Hierbei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

### **2.2.3.8 DNA Ligation**

Bei der im Zuge der Klonierung ausgeführten Ligation („ligare“ lat. für binden) werden bestimmte DNA Sequenzen in Form eines Inserts mit einem Vektor zusammengebracht. Die hierbei entstehenden neuen Genkombinationen werden durch die Aktivität von Ligasen ermöglicht, die komplementäre Stücke zusammenfügen können.

Für die Herstellung der Promotor-Luciferase Konstrukte kam es zu zwei verschiedenen Ligations-Ansätzen.

Die mittels PCR vervielfältigten Gensequenzen für die Promotoren der Aromatase wurden zunächst in einen Cloning Vektor (pDrive Cloning Vector, Qiagen) subkloniert. Die typischerweise bei der PCR entstehenden Adenosin-Überhänge an den 5`- und 3`-Enden der DNA (bei Verwendung einer Polymerase ohne „proof reading“) verbinden sich hierbei mit hoher Spezifität mit den Uridin-Überhängen an dem linearen Vektor und bilden so ein kloniertes Plasmid.

Die Ligation in den pDrive Vektor erfolgte nach Tabelle 4 und anschließender Inkubation bei 4°C über Nacht. Danach konnten die Plasmide für die Transformation in kompetente Zellen verwendet werden.

<u>Insert</u>	<u>pDrive Vektor</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>2x Ligations- Mastermix</u>
Ovar PCR Fragment: 1µl	1µl	3µl	5µl
Gehirn PCR Fragment: Sediment	1µl	4µl	5µl

**Tabelle 4: Ligationsansatz der ovar- und hirnspezifischen Promotoren in den pDrive-Vektor**

Die Ligation in den für den Luciferase-Assay ausgewählten pGL3 Vektor (Promega) erfolgte nach parallelem Verdau des Inserts und des Vektors mit NheI und XhoI in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert zu Vektor).

### **2.2.3.9 Transformation von Vektoren in kompetente Zellen**

Für das Einbringen gewünschter DNA durch Vektoren in bakterielle Zellen (Transformation) wurde die kompetente Zelllinie XL1-Blue der E.coli verwendet.

Von dieser wurde je Transformationsansatz ein Aliquot mit 100µl Zellen aus dem -80°C Eisschrank entnommen und für 10 min. auf Eis unter leichtem Aufschütteln aufgetaut. Es wurde 1µl DNA aus dem Ligationsansatz zu den Zellen pipettiert und sanft vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 90 sek. im 42°C warmen Wasserbad schockerhitzt und im Anschluss erneut für 2 min. auf Eis abgekühlt. Zu jedem Ansatz wurden 900µl LB-Medium ohne Antibiotika hinzugegeben und die Zentrifugenröhrchen für 1h bei 37°C und 225 U/min. im Schüttler inkubiert, um eine Expression der Resistenzgene zu ermöglichen.

Nachfolgend wurden 20µl und 100µl des bakterienhaltigen Mediums mit dem Drigalski Spatel auf Ampicillin-haltigem Agar ausgestrichen. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C kultiviert.

### 2.2.3.10 Präparation von Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse

Für die Präparation von Plasmid DNA aus Bakterienkulturen wurden kommerziell verfügbare Reinigungskits verwendet. Diese basieren grundsätzlich auf der Methode der alkalischen Lyse, gekoppelt an die Isolation der Plasmid-DNA mittels Silica-Membranen (Miniprep) oder Anionenaustauscherharzen (Midiprep).

Die alkalische Lyse (Birnboim u. Doly 1979) ist heute die Standardmethode zur Präparation von ringförmiger DNA. In einem ersten Schritt werden die Bakterien durch Zugabe von EDTA, SDS und Natronlauge in einer stark alkalischen Lösung lysiert und die Proteine und DNA denaturiert. Die Zugabe von Kaliumacetat führt zu einer Ausfällung von Proteinen und chromosomaler DNA, während die Stränge der Plasmid-DNA nach der Neutralisierung des pH-Wertes wieder hybridisieren können. Bei der nachfolgenden Zentrifugation bildet die ausgefällte DNA mit den Proteinen und Zelltrümmern ein Sediment, während sich die Plasmid-DNA im Überstand befindet.

Diese wird dann nach Überführung des Überstandes in eine Trennsäule isoliert und mit Ethanol gewaschen, um restliche Verunreinigungen zu entfernen.

#### Miniprep:

Für die Miniprep wurde ein hierfür etabliertes Reinigungskit verwendet (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas).

Einzelne gewachsene Kolonien der nach der Transformation auf Agarosegel angelegten Zellkultur wurden mit einer sterilen Pipettenspitze abgehoben und jeweils 3ml LB-Medium + Ampicillin (100µg/ml) angeimpft. Es folgte die Inkubation über Nacht im Schüttler bei 37°C und 225 U/min.. Jeweils 1ml der Bakterienkultur wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 min. bei 8000 U/min. und RT zentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt und basierten auf dem oben genannten Prinzip.

#### Midiprep:

Die Midiprep dient der Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA mit hoher Reinheit. Auch für dieses Verfahren wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (HiSpeed® Plasmid Purification, Qiagen).

Das genetische Ausgangsmaterial für die Midi-Prep wurde nach dem Kontrollverdau der Plasmide der vorangegangenen Mini-Prep ausgewählt. Klone, die das gewünschte Bandenmuster im Kontrollgel zeigten, wurden einer erneuten Wachstumsphase unterzogen.

Hierfür wurden 100µl aus der Kultur der selektierten Bakterienkolonie in 50ml LB Medium (100µg/ml Ampicillin) gegeben und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 225 U/min. inkubiert.

Dann wurden die Kulturen in einen 50ml Greiner überführt und für 15 min. bei 5000 U/min. und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf Eis gestellt.

Die Durchführung der Methode erfolgte dann nach Vorgaben aus dem Handbuch des Herstellers basierend auf dem oben beschriebenen Prinzip.

#### **2.2.3.11 Konzentrationsbestimmung der DNA**

Die Quantifizierung der DNA erfolgte im Photometer bei verschiedenen Verdünnungen (1:100 oder 1:50). Als Leerwert wurden 100µl H<sub>2</sub>O verwendet.

Das zugrundeliegende Prinzip der Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf der Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm, bei der Purin- und Pyrimidinbasen ihr Absorptionsmaximum für UV-Licht haben.

Die Konzentration der Nukleinsäure errechnete sich dann durch Multiplikation der OD bei 260nm mit dem Verdünnungsfaktor (V) und einem für die jeweilige Nukleinsäure typischen Multiplikationsfaktor (F):

$$\text{cDNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Nachweis von Reelin in den Gonaden

##### 3.1.1 Protein-Nachweis durch Western-Blot

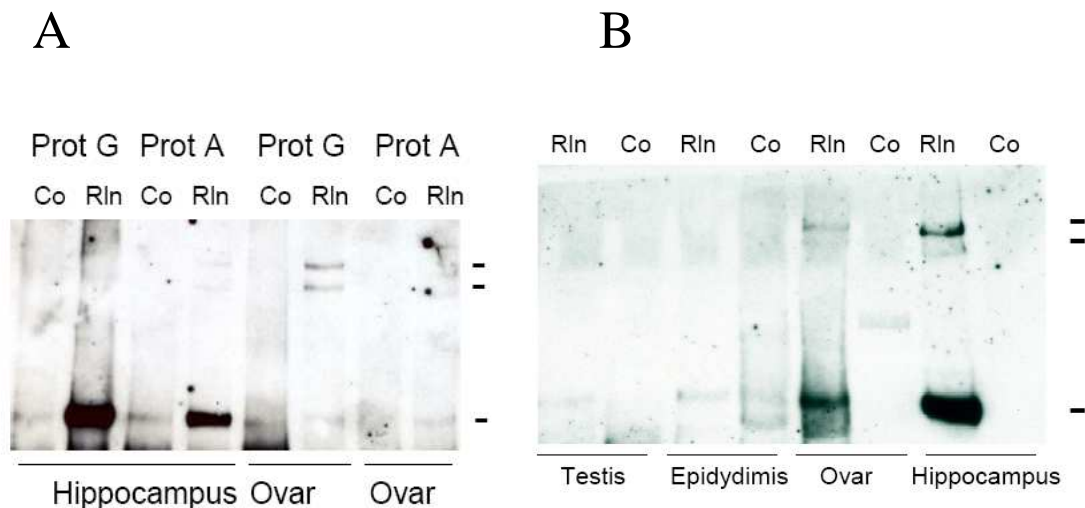
Eine elementare Voraussetzung für die Beeinflussung der Aromataseaktivität durch Reelin ist das Vorhandensein von Reelin im untersuchten Gewebe.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war daher der Nachweis von Reelin in allen gonadalen Geweben.

Es wurden Zellhomogenate von Ovarien, Hoden und Nebenhoden angefertigt (siehe Material und Methoden). Zellhomogenate aus Hippocampus oder Cortex, beides Gewebe bei denen das Vorhandensein von Reelin nachgewiesen ist, wurden als Positivkontrollen verwendet.

In einer ersten experimentellen Reihe wurde versucht, das gonadale Reelin mittels Immunpräzipitation (IP) nachzuweisen. Hierzu wurde zunächst untersucht, ob sich Protein A oder Protein G besser zur Reelin-Präzipitation eignen.

Das Ovar wies bei dieser Methode, parallel zum Hippocampus-Protein, das Reelin-spezifische Bandenmuster auf (Abbildung 9a-b). Es ist durch drei prominente Migrationsbanden mit einem Molekulargewicht von 160 kDa, 310 kDa und 420 kDa gekennzeichnet (Lambert et al. 1999). Im Nebenhoden und Hoden war der Nachweis schwieriger und es konnte nur schwach die 160 kDa Bande, die ein proteolytisches Spaltprodukt des Reelins ist, nachgewiesen werden (Abbildung 9b). Aufgrund der Ergebnisse wurde Protein G für alle weiteren IP-Experimente verwendet (siehe Abbildung 9a).



**Abbildung 9a-b: Immunpräzipitation von Proteinlysaten durch den Anti-Reelin-Ak MAB5364**

500µg Proteinlysate (Ratte) aus Hippocampus und Ovar (A) sowie zusätzlich Hoden und Nebenhoden (B) wurden mit unspezifischem Mäuse Ig-G vorgereinigt und dann mit 5µg spezifischem Anti-Reelin-Ak (Rln), oder mit 5µg unspezifischem Mäuse-IgG als Kontrolle (Co) inkubiert. Antikörper und Igs waren an Protein A und G (A) oder nur an Protein G (B) gebunden. Die Proben wurden durch SDS-Page aufgetrennt und mittels Nassblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit dem Anti-Reelin-Ak.

(A) Vergleich der Präzipitationsergebnisse von Protein A und Protein G:

In Ovar und Hippocampus (=Positiv Kontrolle) zeigen sich die Reelin-typischen Bandenmuster bei den Proben, die mit dem Reelin-Ak präzipitiert wurden (Rln). Die lediglich mit Mäuse-Serum präzipitierten Kontrollen (Co) zeigten diese Banden nicht.

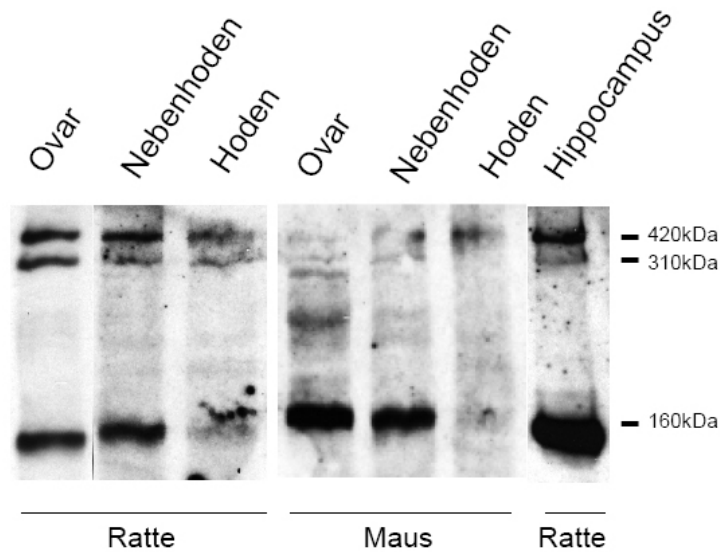
(B) Nachweis in allen Geweben mit Protein G:

Reelin-typische Bandenmuster zeigen sich in Ovar und Hippocampus, bei Präzipitation mit dem Anti-Reelin-Ak (Rln). Im Nebenhoden und Hoden zeigt sich hier lediglich die proteolytische Produktbande von 160kDa. Die Kontrollen mit Mäuse-Serum (Co) zeigen keine der Reelin-typischen Banden.

In weiteren experimentellen Reihen wurde versucht, den Nachweis zu optimieren. Beste Ergebnisse wurden durch die Präzipitation der Proben mit Methanol nach Smalheiser (2000) und die Visualisierung des Bandenmusters mit Femto als eine sehr sensitive Lumineszenzlösung erreicht. Die deutlichsten Signale erhielt man im Nebenhoden und Ovar, wo die größten Mengen an Reelin nachzuweisen waren. Geringe, an der Nachweisgrenze liegende Mengen, konnten aber auch im Hoden nachgewiesen werden, was insbesondere im Rattengewebe gut gelang (siehe Abbildung 10). Starkes Vorhandensein der 160kDa Reelin-Bande weist in diesen Versuchen auf proteolytische Spaltung von Reelin hin.

Zusammenfassend kann aufgrund der Befunde gesagt werden, dass das charakteristische Bandenmuster des Glykoproteins Reelin im Western-Blot in allen drei gonadalen Geweben (Hoden, Nebenhoden, Ovar) von Maus und Ratte nachgewiesen werden kann.





**Abbildung 10: Western Blots mit dem Nachweis von Reelin-Protein in Ratten- und Mausgewebe**

Aus Ratten- und Mausgewebe (jeweils 3 Monate alt) wurden Proteinlysate gewonnen. Von diesen wurden jeweils 80µg Protein (Hippocampus=40µg) mit Methanol präzipitiert und im SDS-Page aufgetrennt. Mittels Nassblot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit dem monoklonalen Anti-Reelin-Ak MAB 5364 nachgewiesen.

Ovar, Nebenhoden, Hoden und Hippocampus zeigen die reelintypischen Banden bei 420, 310 und 160kDa. Die größte Menge an Reelin in den Gonaden befindet sich im Ovar und Nebenhoden.

### 3.1.2 Nachweis von Reelin mRNA

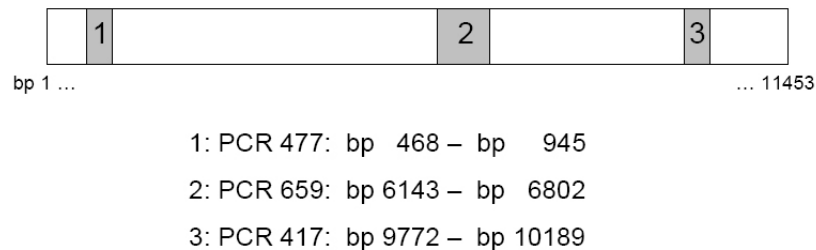
Da Reelin auch im Blutserum vorhanden ist (Smalheiser et al. 2000), sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse im Westernblot auf im Blut zirkulierendes Reelin oder auf organspezifisches Reelin zurückzuführen sind.

Hierfür wurde die RNA aus Rattengewebe isoliert und eine reverse Transkription mit anschließender PCR durchgeführt (siehe 2.2.3.2 und 2.2.3.5).

Für diesen Nachweis wurden drei unabhängige Primerpaare konzipiert, die Intron überspannend spezifisch an die angegebenen Sequenzen binden (Abbildung 11). Durch die Auswahl intronüberspannender Primer wurde garantiert, dass nur ein Nachweis des RNA Transkripts erfolgte und Spuren genomischer DNA den Nachweis nicht verfälschten. Genomische DNA hätte zu PCR-Fragmenten der Größe von 102 kb, 8,9 kb und 2,9 kb geführt.

Mittels DNA Gelelektrophorese wurden die PCR Produkte im Anschluss der Größe nach aufgetrennt und analysiert.

## Reelin cDNA Ratte (11,453 kb)

**Abbildung 11: Reelin cDNA der Ratte und die Sequenzen der drei ausgewählten intronüberspannenden Primerpaare**

Strategie zur Lokalisation der PCR-Produkte auf der Reelin cDNA zum Nachweis der RNA im untersuchten Gewebe.

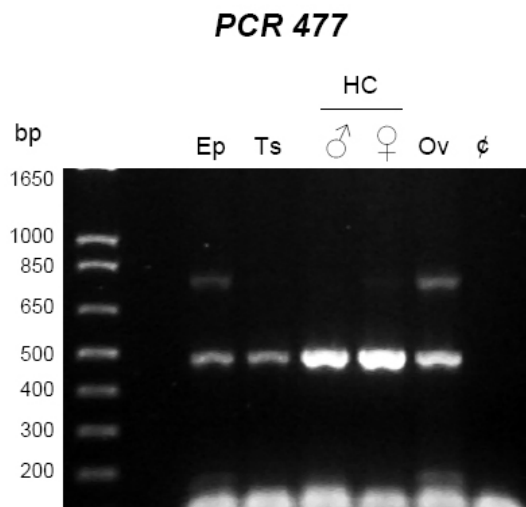
Bei allen der drei eingesetzten Primerpaaren konnten im Ovar, Hoden, Nebenhoden und dem Hippocampus (Kontrolle) die PCR-Produkte der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abbildung 12a-c).

Obwohl es sich hierbei um einen qualitativen Nachweis handelt war auffällig, dass sich die Intensität der Signale in den Kontrollgelen der verschiedenen Organe sehr unterschiedlich darstellt. Analog zu den Untersuchungen auf Protein-Ebene waren innerhalb der gonadalen Gewebe in Ovar und Nebenhoden die stärksten Signale zu sehen, während die hippocampalen Gewebe als Positivkontrollen noch intensivere Signale abgaben. Das schwächste Signal ging erneut vom Hoden aus, ein direkter Vergleich der Genprodukte von Hoden und Nebenhoden zeigt dieses in Abbildung 13.

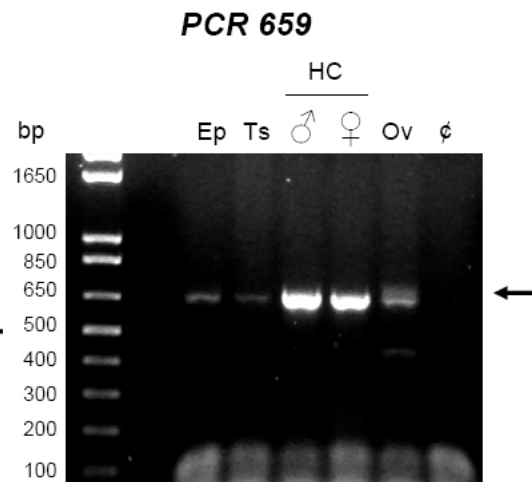
Diese organspezifischen Unterschiede der Reelin mRNA-Expression konnten zusätzlich in einem semiquantitativen Nachweis gezeigt werden (Abbildung 14). Die Reelin cDNA der untersuchten Gewebe wurde mit dem Primerpaar 659 vervielfältigt und 18s rRNA als endogene Kontrolle verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend im DNA-Gel aufgetrennt und die Signalintensität der Banden mit dem Computerprogramm „ImageJ“ (National Institute of Health) analysiert. Der Nebenhoden zeigte im Vergleich zum Hoden ein 3fach stärkeres Signal und unterstützt die vorherigen Beobachtungen (Abbildung 14b).

Bei Verwendung der Primerpaare für die PCR 477 wurde eine weitere Bande in Ovar und Nebenhoden von etwa 800 bp detektiert (Abbildung 12a), deren Identität im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte.

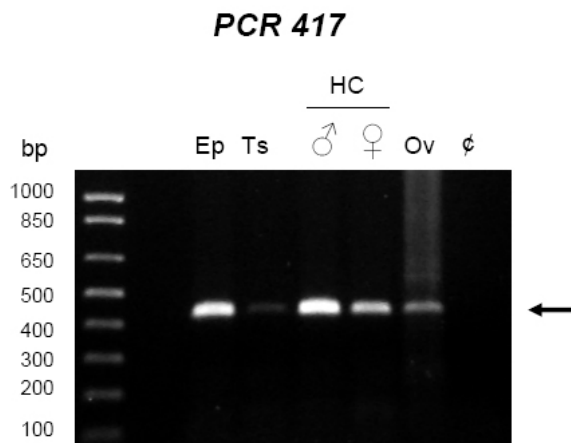
A



B



C



**Abbildung 12a-c: Nachweis Reelin-spezifischer cDNA mittels PCR mit den Primerpaaren 477, 659 und 417**

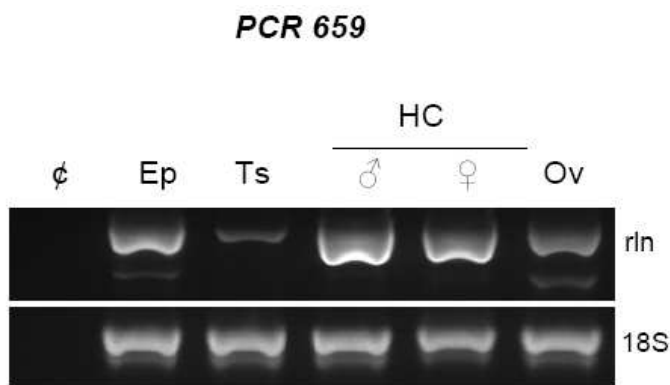
PCR mit 25 Zyklen. Die RNA wurde aus verschiedenen Geweben isoliert: Ep=Epidydimis (Nebenhoden), Ts=Testis (Hoden), HC=Hippocampus, Ov=Ovar. Mittels reverser Transkription wurde komplementäre cDNA aus je 1µg der isolierten mRNA gebildet. Die Reelin cDNA wurde mit spezifischen, intronüberspannenden Primerpaaren mittels PCR vervielfältigt. Es zeigen sich unterschiedlich starke Signale für die verschiedenen Gewebe. Ovar und Nebenhoden zeigen eine höhere Signalintensität als Hoden.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen das Vorhandensein von Reelin-kodierender mRNA in den Gonaden. Zusammen mit dem Nachweis des Reelin-Proteins zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass Reelin in allen gonadalen Geweben vorhanden und nachweisbar ist. Eine Wechselwirkung von Reelin und Aromatase ist somit möglich und steht im Einklang mit der Arbeitshypothese einer Beeinflussung der Aromatase durch Reelin.

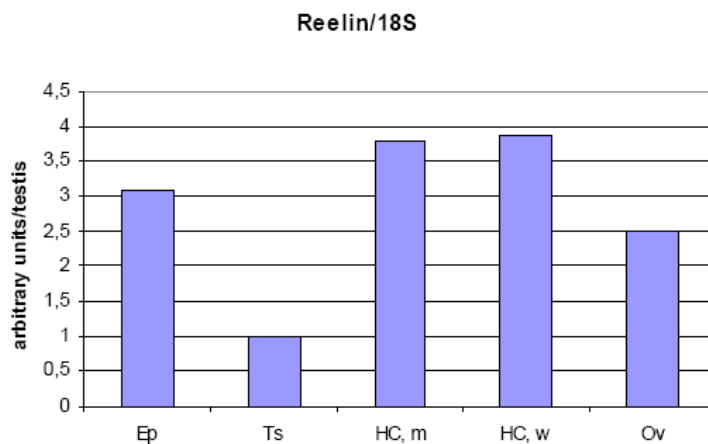


**Abbildung 13: Vergleich der Menge an PCR-Produkten aus Reelin-spezifischer cDNA mit den Primerpaaren 417 und 659 in Nebenhoden und Hoden**  
Es zeigt sich für die jeweiligen Genprodukte im Nebenhoden deutlich stärkere Signale als im Hoden.

A



B



**Abbildung 14a-b: Semiquantitativer Nachweis von Reelin cDNA in verschiedenen Organen mittels PCR**  
(A) Reelin cDNA aus Nebenhoden (Ep), Hoden (Ts) Hippocampus (HC) und Ovar (Ov) wurde mit dem Primerpaar 659 vervielfältigt. Als endogene Kontrolle wurde die 18s rRNA verwendet.  
(B) Die Bandenintensität der PCR-Produkte wurde mit „ImageJ“ analysiert und mit der Intensität von 18S verrechnet. Dargestellt sind die Werte der Organe im Verhältnis zum Hoden.

### **3.2 Untersuchung der Reelinwirkung auf die Aromataseaktivität in Aromatase-Assays**

In den Versuchen wurde sowohl die Östrogenbildung selbst, als auch die Aktivität der Aromatase gemessen. Um die Wirkung von Reelin auf die Östrogenbildung zu untersuchen, wurden östrogenbildende Zellkulturen mit Reelin-, oder mit GFP-konditioniertem Überstand als Kontrolle, behandelt und die Aromataseaktivität gemessen. Als Zelllinien wurden humane Chorionkarzinomzellen (JEG3) und Granulosazellen aus einem humanen Ovarialkarzinom (KGN) verwendet. Die Anwendung beider Zelllinien wurde bereits in Assays zur Aromatase-Bestimmung beschrieben (Drenth et al 1998, Nishi et al. 2001). Die Eignung der Zellen für die Versuche beruht vor allem auf der hohen Anzahl an Aromatase-bildenden Zellen bei weitgehend aufrechterhaltenem physiologischem Steroidhormonproduktionsmuster und guter Kultivierbarkeit.

#### **3.2.1 Bestimmung der Aromatase-Aktivität nach Lephart und Simpson (1991)**

Zur Bestimmung der Aromatase-Aktivität wird bei diesem radioaktiven Assay ein mit Tritium ( $^3\text{H}$ ) markiertes Androstendion als Substrat der Aromatase verwendet. Im Laufe der Enzymreaktion wird dieses so umgewandelt, dass radioaktives,  $^3\text{H}$ -markiertes Wasser entsteht, das als Maß der Enzymaktivität im  $\beta$ -Counter gemessen werden kann.

Genauere Beschreibungen zum Reaktionsverlauf und zur Behandlung der Zellkulturen bis zur Messung der Radioaktivität der einzelnen Proben sind im Material- und Methodenteil zu finden (Abschnitt 2.2.2.5).

Zur Etablierung des Assays wurde in ersten Experimenten neben der Behandlung der Zellen mit Reelin auch der Aromatase-Inhibitor 4-Hydroxy-Androstendion (Formestan) verwendet, der die Substratbindestelle des Enzyms irreversibel blockiert. Formestan behandelte Zellen zeigten erwartungsgemäß eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität (Abbildung 15a-b). So ging die Anzahl der gemessenen Counts fast auf das Niveau nicht radioaktiv behandelte Zellen zurück. Die Funktionalität des Assays für Inhibitoren der Enzymfunktion konnte somit sichergestellt werden.

Da das Formestan in Ethanol gelöst werden musste, wurde parallel auch das Medium einiger nicht Formestan behandelte Zellen mit 0,075%igem Ethanol angereichert. Die Enzymaktivität dieser Kontrollzellen war vergleichbar mit der Aktivität von Zellen ohne Ethanolzusatz.

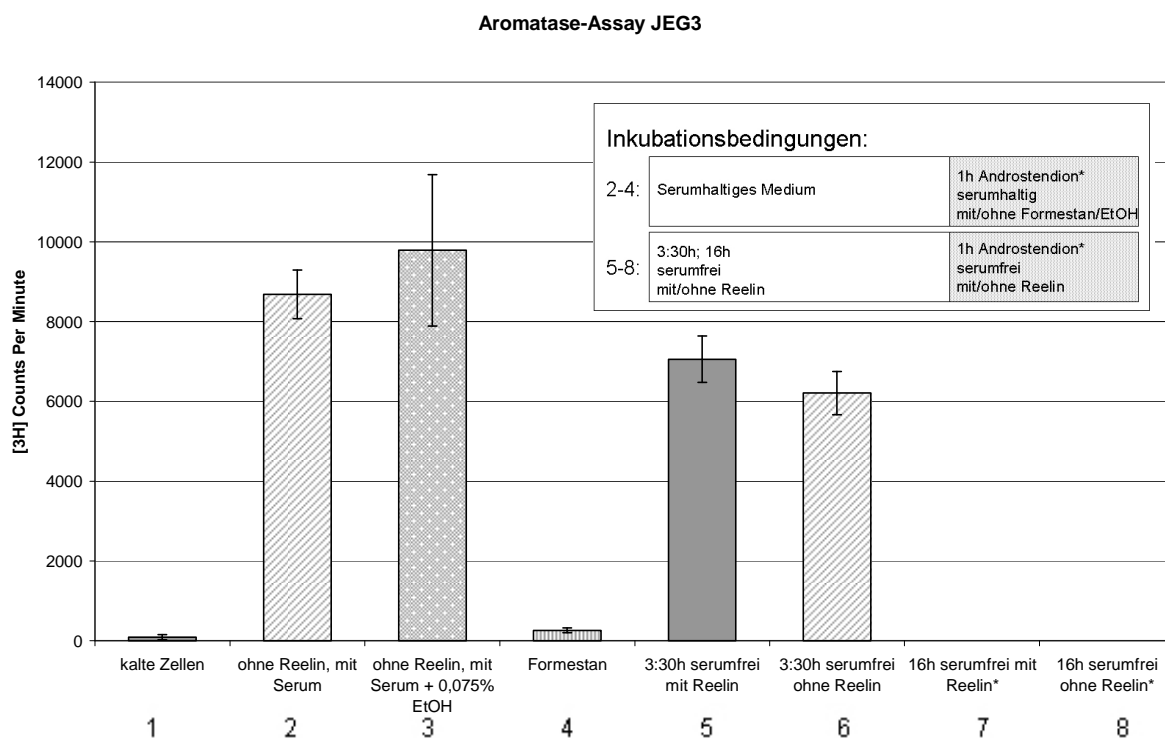
Um im Zuge der Etablierung des Assays auch erste Einschätzungen der Auswirkung von Reelin auf die Aromataseaktivität zu erlangen, wurden Zellkulturen mit oder ohne Reelin in serumfreiem Medium für 3:30h und 16h (JEG3-Zellen) bzw. 4:30h und 16h (KGN-Zellen) inkubiert und  $^3\text{H}$ -markiertes Wasser nach Inkubation von 1h mit radioaktivem Androstendion ( $\text{A}^*$ ) im  $\beta$ -Counter bestimmt. Hier zeigten sich keine erheblichen Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (Abbildung 15a-b).

Nach 3:30h bzw. 4:30h konnte eine Tendenz der Induktion der Aromatase durch Reelin in JEG3 bzw. in den KGN-Zellen beobachtet werden. Alle Zellen, die in serumfreiem Medium inkubiert wurden, zeigten eine geringere Aromataseaktivität als Kontrollen in serumhaltigem Medium. Da im Serum (FCS) jedoch Faktoren enthalten sind, die möglicherweise regulierend auf die Aromataseaktivität einwirken könnten (Zytokine und Hormone), sollten die Versuche möglichst in serumfreiem Medium durchgeführt werden. Während die JEG3-Zellen kürzere Inkubationszeiten in serumfreiem Medium gut überlebten, waren längere Inkubationszeiten (16h) jedoch letal (Abbildung 15a).

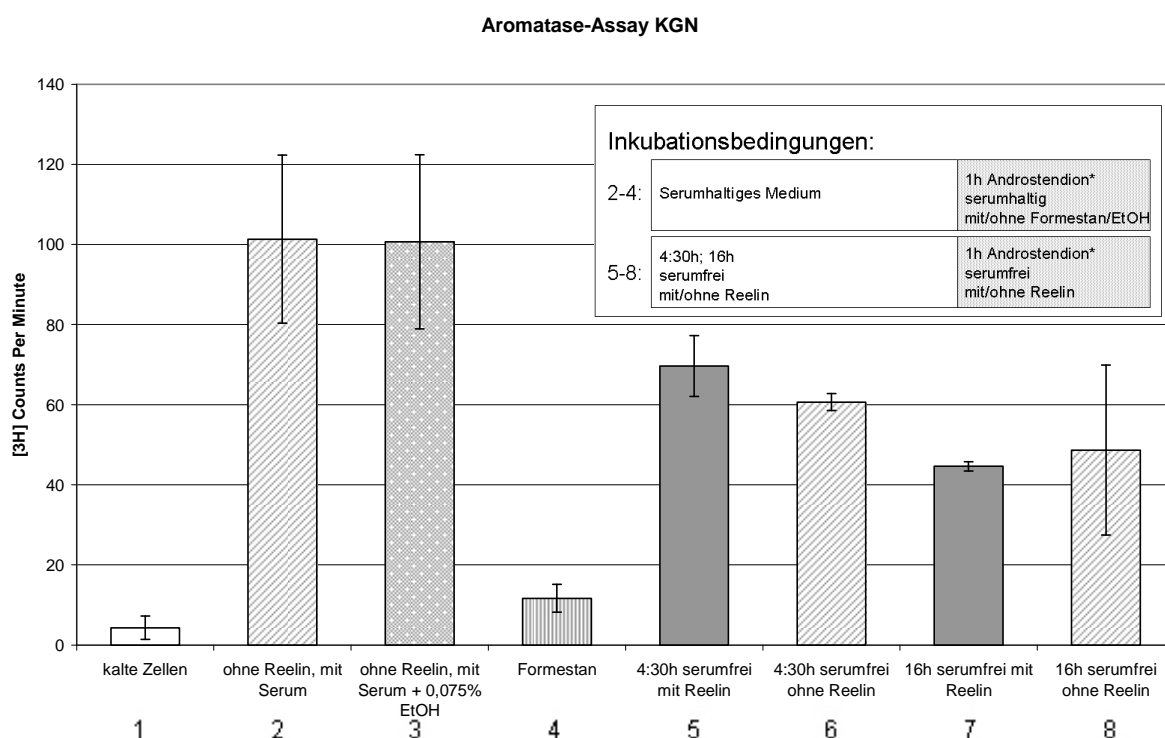
Der Vergleich von KGN-Zellen mit 4:30h und 16h serumfreier Behandlung zeigte ebenfalls eine Abnahme der Aktivität mit zunehmender Inkubationszeit. Die KGN-Zellen waren im Vergleich zu den JEG3-Zellen aber auch nach 16h Behandlungszeit noch vital und ihre Aromataseaktivität konnte bestimmt werden (Abbildung 15b). Eine Tendenz der Induktion der Aromatase durch Reelin war nach dieser langen Inkubationszeit nicht mehr erkennbar.

Zusammenfassend kann aus dieser experimentellen Serie gesagt werden, dass nach 3h bis 4h Inkubation mit Reelin eine tendenzielle Induktion der Aromatase gemessen werden konnte. Obwohl die Ergebnisse mit KGN-Zellen und JEG3-Zellen vergleichbar sind, fällt bei Betrachtung der Ordinate auf, dass für KGN-Zellen fast um ein hundertfaches niedrigere Werte als für die JEG3-Zellen erzielt wurden.

A



B



**Abbildung 15a-b: Etablierung des Assays mit JEG3-(A) und KGN-Zellen (B), n=3**

JEG3 und KGN Zellen wurden mit oder ohne Reelin serumfrei für die angegebenen Zeiten inkubiert. Außerdem wurden Kontrollzellen in serumhaltigem Medium inkubiert. Anschließend wurde mit radioaktivem Androstendion (A\*) für eine weitere Stunde inkubiert und mittels Bestimmung der Aktivität des radioaktiven Wassers (cpm, Counts per Minute) im Aromatase-Assay nach Lephart und Simpson (1991) die Aromataseaktivität indirekt gemessen. Um die Funktionalität der Methode zu überprüfen, wurden einige Kulturen mit dem Aromatase-Hemmer Formestan (in EtOH gelöst) inkubiert (zeitgleich mit A\*).

\*JEG3-Zellen nach 16h serumfreier Inkubation tot, daher keine Messung.

In weiteren Versuchen wurde die Aromataseaktivität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen bestimmt, wobei die Inkubationszeiten mit Reelin und die mit dem radioaktiven Androstendion variiert wurden. Ziel war es, die Messbedingungen zu optimieren und zu untersuchen, ob in Abhängigkeit von den Behandlungsbedingungen signifikante Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen Reelin- und GFP-behandelten Zellen erzielt werden konnten. GFP-konditionierter Überstand aus HEK-Zellen wurde verwendet, um möglicherweise sezernierte Nebenprodukte während der Reelinbildung (ebenfalls durch HEK-Zellen) auch im Kontrollmedium vorzufinden.

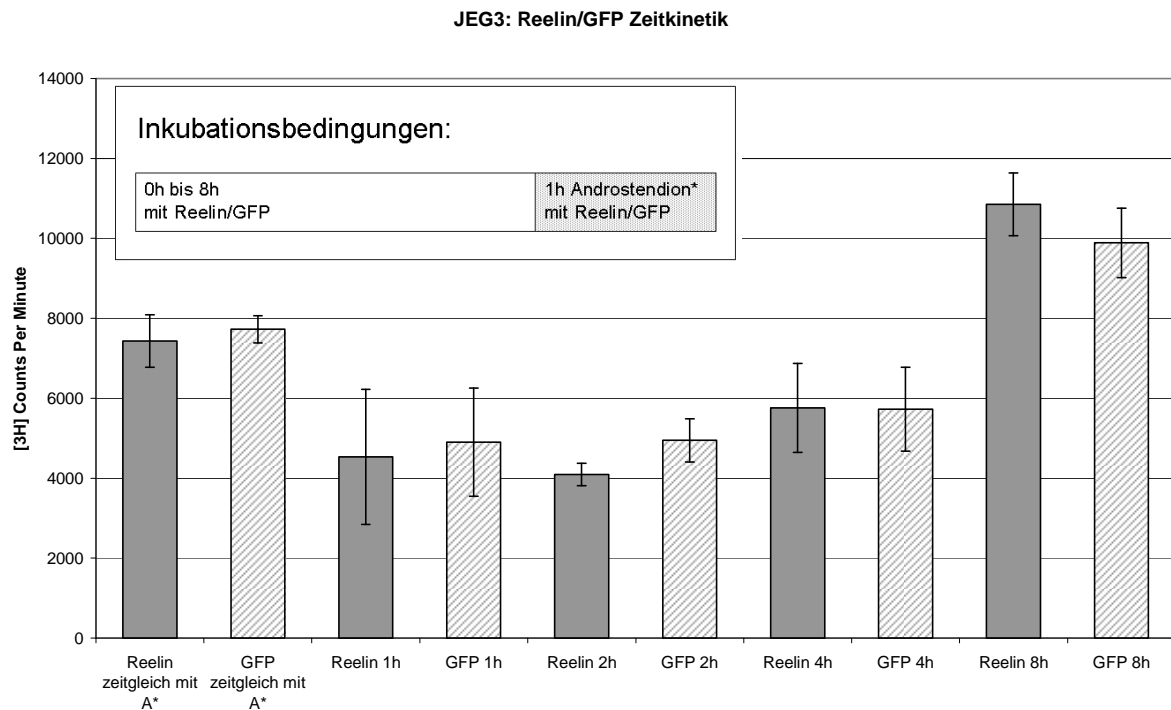
So wurden JEG3-Zellen und KGN-Zellen verschieden lang (JEG3: 0h-8h; KGN: 4 und 18h) mit Reelin- bzw. GFP-konditioniertem Medium vorbehandelt und die Aromataseaktivität gemessen. Es zeigte sich hierbei kein Unterschied zwischen den Werten Reelin- und GFP-behandelter Zellen (Abbildung 16a-b).

Bei JEG3-Zellen war die höchste Aromataseaktivität nach 8h Vorinkubationszeit messbar. Eine 1-4-stündige Vorinkubationszeit führte zu einer niedrigeren Aktivität als bei Zellen, die direkt ohne Vorbehandlung für eine Stunde mit Androstendion und Reelin-/GFP-haltigem, serumfreiem Medium inkubiert wurden (Abbildung 16a). Bei den KGN-Zellen war die maximale Aromataseaktivität nach 4h messbar. Eine 18-stündige Vorinkubationszeit führte zu einer starken Abnahme der Enzymaktivität (Abbildung 16b), was vermutlich wiederum auf eine verminderte Zellzahl nach der langen serumfreien Inkubationszeit der Zellen zurückzuführen ist.

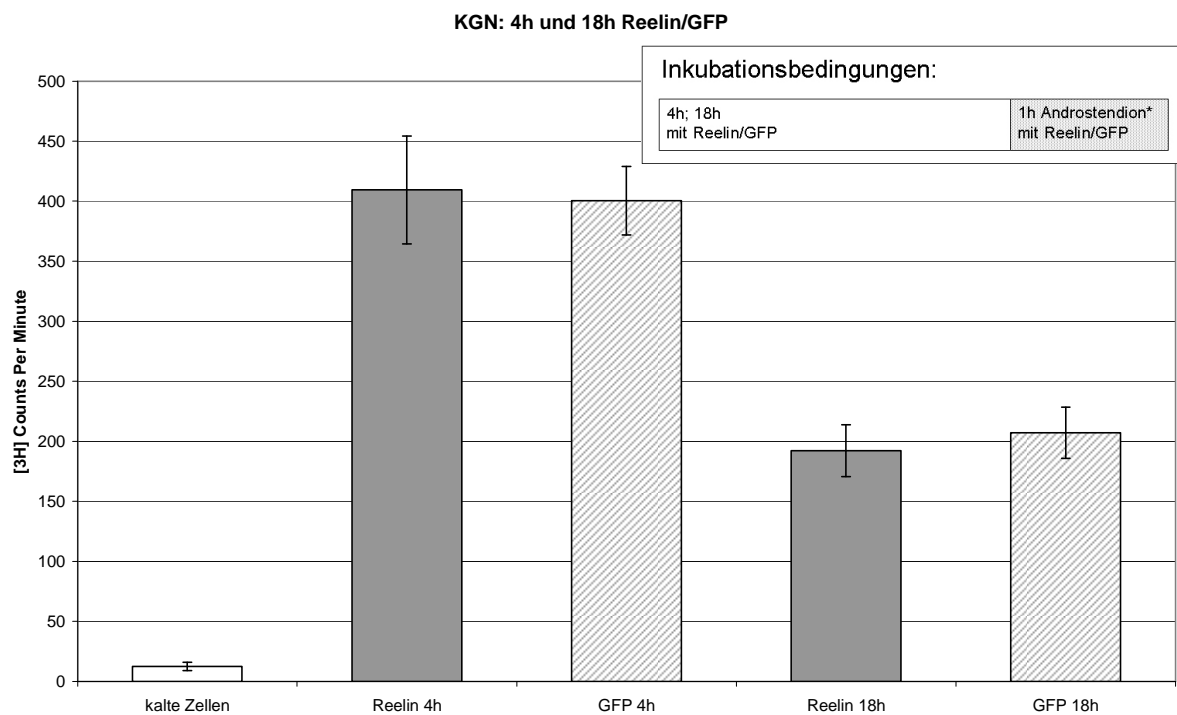
Die induzierende Wirkung von Reelin auf die Aromataseaktivität in KGN-Zellen nach kürzerer Inkubationszeit (4h30; Abbildung 15b) konnte nicht reproduziert werden (4h; Abbildung 16b).



A



B



**Abbildung 16a-b (A) JEG3-Zellen; Zeitkinetik für die Inkubation mit Reelin/GFP, n=3**

**(B) KGn-Zellen; Inkubation für 4h und 18h mit Reelin/GFP im Vergleich, n=5**

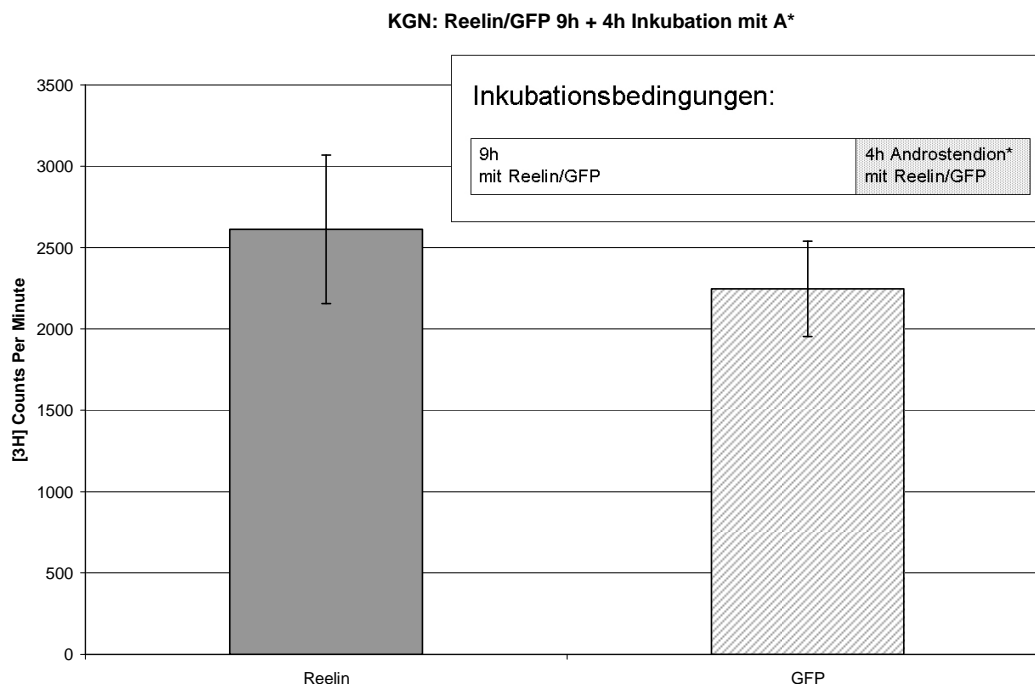
Vorinkubation der Zellen mit Reelin/GFP für die angegebenen Zeiten. Anschließend Inkubation mit radioaktivem Androstendion in serumfreiem, Reelin-/GFP-haltigem Medium für 1h. Kalte Zellen = Zellmedium ohne Radioaktivität.

Da radioaktives Wasser als Readout-System für die Aromataseaktivität genutzt wurde, das aus dem  $^3\text{H}$ -markiertem Androstendion stammt, wurde versucht, die Sensitivität des Assays durch Verlängerung der Androstendion-Inkubationszeit zu erhöhen.

Für den nachfolgenden Versuch wurde deshalb die Inkubationszeit mit Androstendion unter Beibehaltung von Reelin/GFP auf 4h erhöht. Da die KGN-Zellen im Mikroskop auch nach 12h Inkubationszeit noch vital aussahen wurde die Vorinkubationszeit mit Reelin/GFP auf 9h festgelegt.

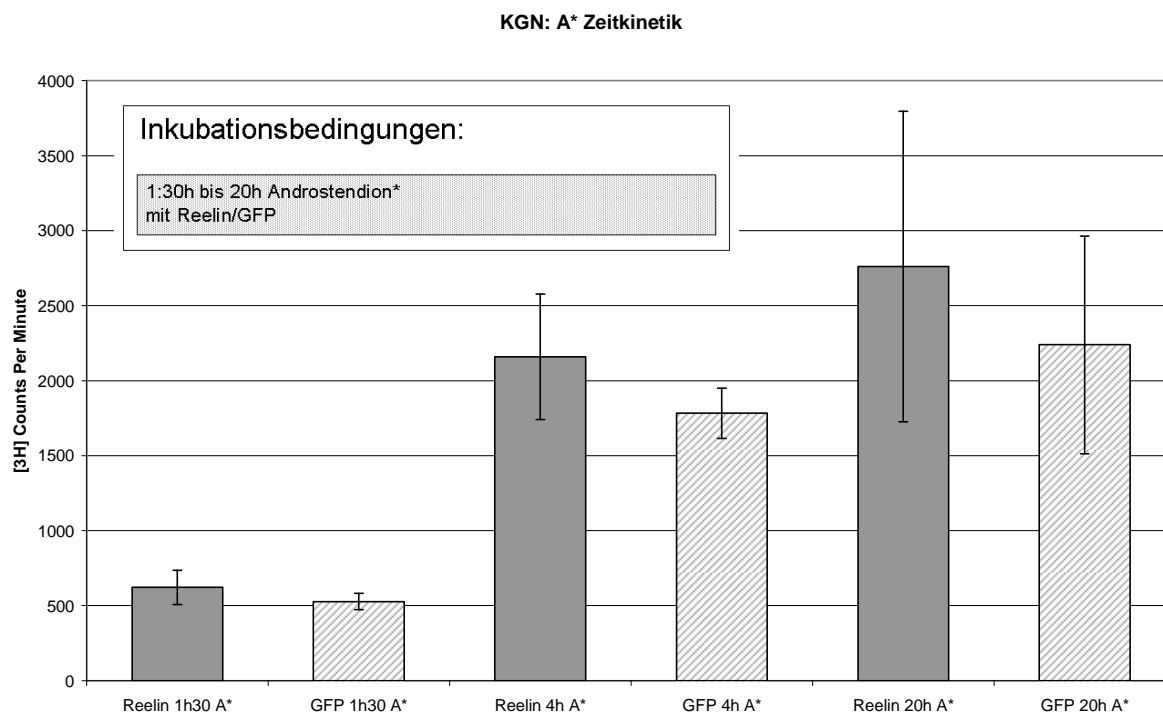
Reelin-behandelte Zellen zeigten in diesem Versuch mit einem Mittelwert von 2613 counts per minute (cpm) ( $\pm 456$ ) ein im Mittel um 367 cpm höheres Messergebnis als GFP-behandelte Zellen (2246 cpm;  $\pm 293$ ) (Abbildung 17). Die Tendenz einer Aromatase-stimulierenden Wirkung von Reelin ist hier erkennbar, erreicht aber noch kein statistisch signifikantes Niveau.

Die längere Inkubationszeit mit Androstendion führte zu einer starken Zunahme der counts und versprach eine sensitivere Darstellung möglicher Unterschiede in der Enzymaktivität. In einer letzten experimentellen Serie wurde deshalb direkt für 1:30h, 4h und 20h mit radioaktivem Androstendion inkubiert (Abbildung 18). KGN-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten direkt mit Androstendion in serumfreiem Medium inkubiert, dem entweder Reelin oder GFP zugesetzt war. Innerhalb der ersten vier Stunden nahm die Aromataseaktivität deutlich zu. Ein weiterer Anstieg konnte auch nach 20h Inkubationszeit gemessen werden (Abbildung 18). Zu allen untersuchten Zeitpunkten war jedoch erneut kein signifikanter Unterschied zwischen Reelin- und GFP-behandelten Zellen messbar.



**Abbildung 17: KGn-Zellen; Vergleich bei Inkubation mit Reelin/GFP für 9h und A\* für 4h, n=9**

KGn-Zellen wurden in serumfreiem Medium für 9h mit Reelin/GFP und anschließend für weitere 4h mit radioaktivem Androstendion (+Reelin/GFP) inkubiert. Anschließend wurde im Aromatase-Assay nach Lephart und Simpson radioaktives Wasser gemessen und dadurch indirekt die Aromataseaktivität bestimmt.



**Abbildung 18: KGn-Zellen; Zeitkinetik für die Inkubation mit radioaktivem Androstendion (A\*), n=5**

KGn-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit serumfreiem Zellmedium in Gegenwart von 50nM radioaktivem Androstendion inkubiert. Außerdem war dem Medium entweder Reelin oder GFP zugesetzt. Im Aromatase-Assay nach Lephart und Simpson wurde radioaktives Wasser gemessen (counts per minute) und somit indirekt die Aromataseaktivität bestimmt. Die dargestellten Werte ergeben sich aus der Differenz der gemessenen Werte und der Leerwerte (nur Medium).

Zusammenfassend konnte in diesen Versuchsreihen mit der Methode des Aromatase-Assays nach Lephart und Simpson keine eindeutige Beeinflussung der Aromatase durch Reelin nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich von Reelin behandelten und GFP behandelten Zellkulturen bei verschiedenen Inkubationsbedingungen konnte in keinem Versuchsaufbau ein wesentlicher Unterschied in der Aromataseaktivität belegt werden. So waren sich die Werte der jeweiligen direkten Vergleichsgruppen durchweg sehr ähnlich, unabhängig davon, ob die Inkubationszeiten mit Reelin/GFP oder Androstendion modifiziert wurden (Abbildung 15-18).

Durch die Versuchsergebnisse wird deutlich, dass die Detektion einer möglichen Beeinflussung der Aromatase durch Reelin mit dieser Methode sehr schwierig ist. Als alternative Technik erfolgte im Anschluss die Messung der Aromatase-Aktivität mittels Radioimmunassay, wobei die Zellen hier nicht mehr vorinkubiert wurden, sondern wie im Versuch der Abbildung 18 direkt in androstendionhaltigem Medium in An- und Abwesenheit von Reelin kultiviert wurden.

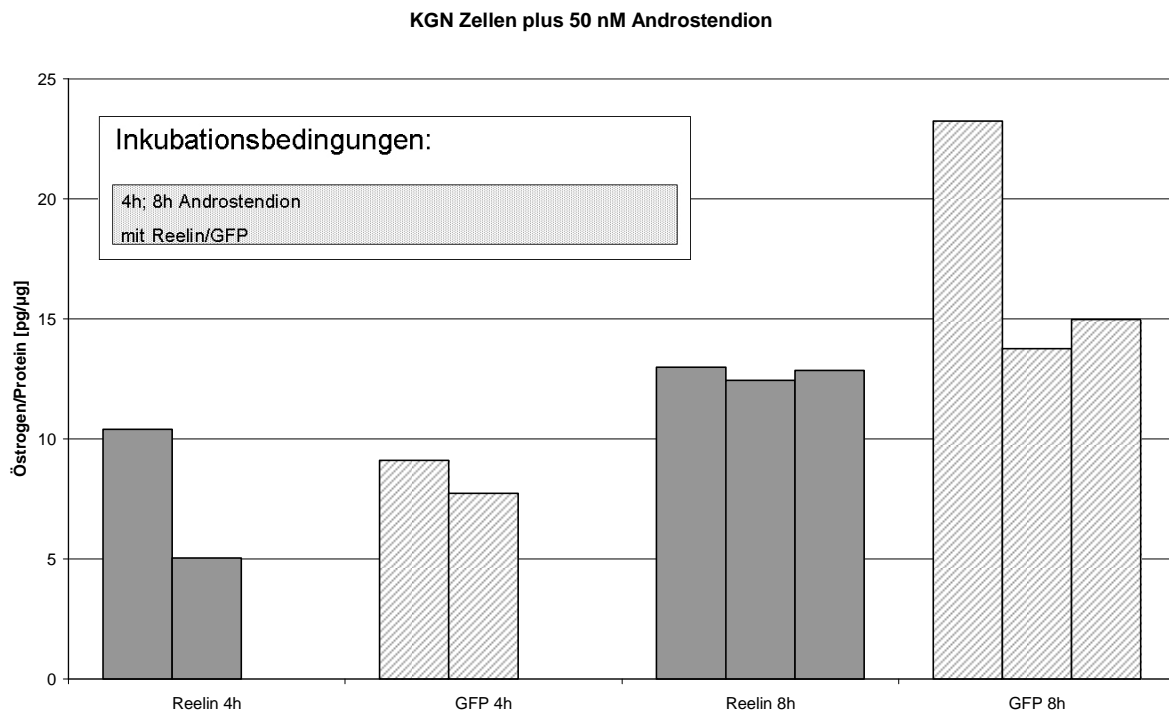
### **3.2.2 Bestimmung der Aromatase-Aktivität im Radioimmunassay (RIA)**

Der RIA wurde als alternativer Aromataseassay durchgeführt. Er zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität aus und ermöglicht die Darstellung und Quantifizierung selbst kleinster Substanzmengen.

Um eine mögliche Beeinflussung der Aromatase-Aktivität durch Reelin zu messen, wurden Granulosazellkulturen (KGN-Zellen) in Petrischalen kultiviert und, bei Subkonfluenz, für 4h bzw. 8h mit serumfreiem, GFP- oder Reelin-haltigem Zellmedium versorgt und die Menge des gebildeten Östrogens bestimmt. Hierfür wurde das konditionierte Medium nach der Inkubationszeit abgenommen, eingefroren und verblindet zur Analyse an das „Institut für Endokrinologie“ nach Göttingen verschickt. Um die Aktivität der Aromatase der einzelnen Proben zu vergleichen, wurde die gemessene Menge gebildeten Hormons (Östrogen in pg/Probe, durch den RIA bestimmt) auf die jeweilig vorhandene Menge an Protein ( $\mu\text{g}$ ) der einzelnen Proben bezogen und berechnet. Die Protein-Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford. Hierzu wurden die Zellen direkt nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen und auf Eis mit RIPA+PI lysiert. Die zu vergleichenden Werte des RIA haben somit die Einheit Östrogen/Proteinmenge in  $\text{pg}/\mu\text{g}$ .

Der RIA zeigte sowohl nach 4h als auch nach 8h vergleichbare Werte für die Reelin- und GFP-behandelten Zellen (siehe Abbildung 19), und es konnte erneut kein deutlicher Hinweis

auf eine Veränderung der Aromataseaktivität durch Reelin festgestellt werden. Bei dieser Untersuchung wurde noch mit einer relativ kleinen Anzahl von Proben gearbeitet. Ausreißer bedingten in dem Versuch daher teilweise eine sehr hohe Standardabweichung der Messwerte. Deshalb sind in der Abbildung die Einzelmesswerte angegeben (Abbildung 19). Nachfolgende Untersuchungen im Institut an KGN-Zellen mit einer höheren Stichprobenzahl erbrachten vergleichbare Ergebnisse.



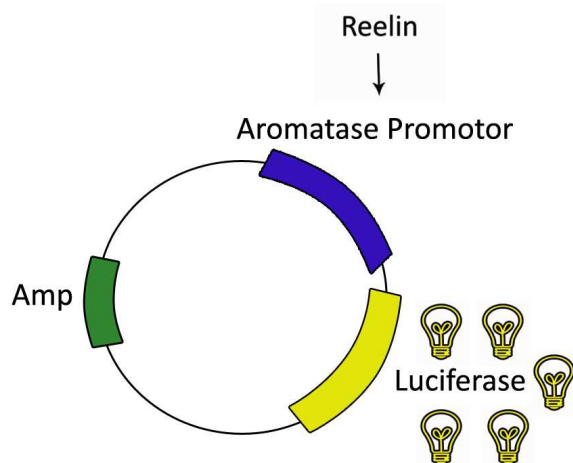
**Abbildung 19: RIA mit KGN-Zellen, n=2 (4h); n=3 (8h)**

KGN-Zellen wurden für 4h und für 8h mit Reelin- oder GFP-haltigem Kulturmedium (serumfrei) inkubiert. Dieses war mit 50nM Androstendion versetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das konditionierte Medium abgenommen und eingefroren. Die Zellen wurden in PBS lysiert und anschließend die Proteinkonzentration der Proben nach Bradford bestimmt. Mittels RIA wurde dann der Östrogengehalt des Zellmediums der jeweiligen Proben bestimmt. Die Aromatase-Aktivität konnte so indirekt als Östrogen/Proteinmenge bestimmt werden.

Auch anhand des RIA konnte für die KGN-Zellen kein signifikanter Unterschied der Aromatase-Aktivität zwischen Reelin- und GFP-behandelten Zellen festgestellt werden. Somit konnte weder mit dem Aromatase-Assay nach Lephart und Simpson noch mit dem sensitiveren RIA eine Beeinflussung der Aromatase-Aktivität durch Reelin nachgewiesen werden.

### 3.3 Untersuchung der Wirkung von Reelin auf die Aromatasetranskription im Luciferase-Assay

Um die Wirkung von Reelin auf die Aromatasetranskription untersuchen zu können, wurden spezielle Reporter-Konstrukte angefertigt. Das Funktionsprinzip dieser Reporter-Konstrukte beruht auf der Klonierung eines induzierbaren Promotorelementes vor den kodierenden Bereich eines messbaren Enzyms (Luciferase = Reporter). In dieser Arbeit sollten Aromatase-spezifische Promotoren aus dem KGN-Zellgenom in das Reporter-Konstrukt kloniert werden. Die Plasmide können dann in eukaryonte Zellen transfiziert werden, die in An- oder Abwesenheit von der zu untersuchenden Substanz (z.B. Reelin) in Kultur stehen. Abhängig von der Wirkung der Substanz auf das Promotorelement kommt es nachfolgend zu einer unterschiedlich starken Transkriptionsrate des Reporterelements. Diese kann in einem anschließenden Luciferase-Assay durch die Entstehung von Licht gemessen werden, das bei der Luciferase katalysierten Oxidation von Luciferin emittiert wird (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Schematische Darstellung des Luciferase Reportergensystems mit vorgeschaltetem Aromatase-Promotor**

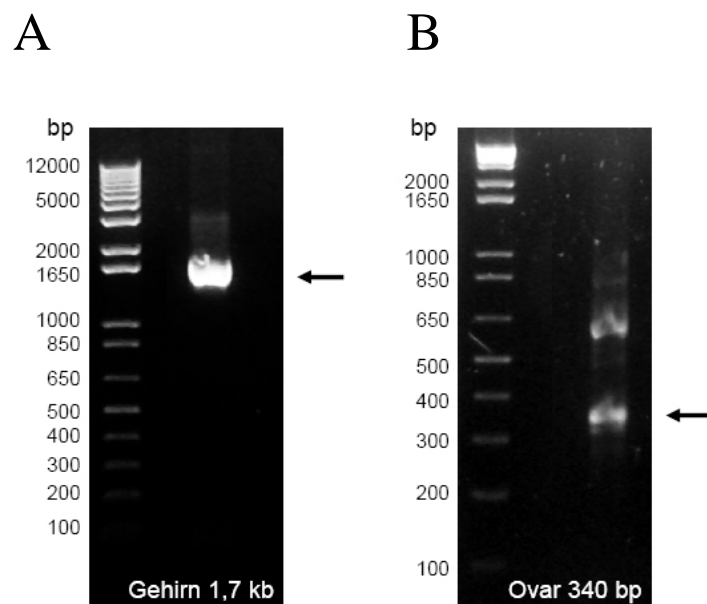
Der humane Aromatasepromotor wird vor das Reporterelement mit Luciferaseaktivität kloniert. Dieses ermöglicht eine Messung der transkriptionellen Aktivität durch die Luciferase-katalysierte Oxidation von Luciferin, bei der Licht entsteht. (Amp = Ampicillin)

Um das Prinzip des Luciferase-Assays für die Fragestellung der transkriptionellen Regulation der Aromatase durch Reelin zu nutzen, sollten im Zuge dieser Arbeit zwei wesentliche Voraussetzungen geschaffen werden:

1. Klonierung der ovar- und hirnspezifischen Promotoren in das Luciferase-Plasmid.
2. Optimierung der Transfektionsbedingungen der Plasmide für neuronale und ovarielle Zellen.

### 3.3.1 Klonierung der ovar- und hirnspezifischen Aromatase-Promotoren in das Luciferase Plasmid

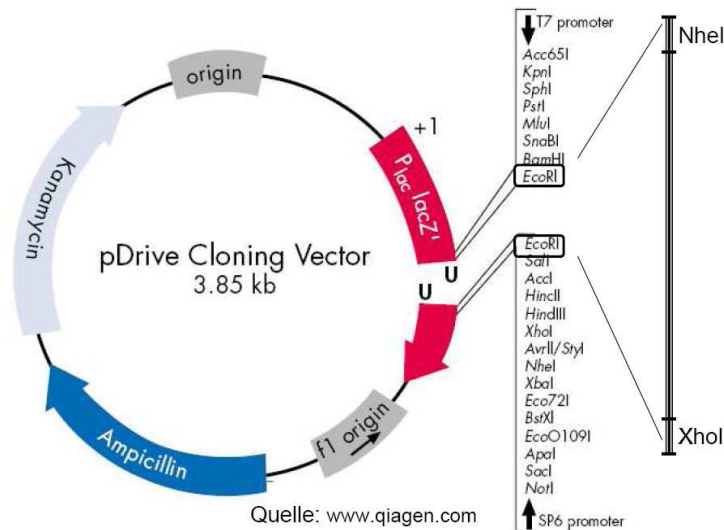
Um die Promotoren der Aromatase als Gensequenzen für die Klonierung zu erhalten, wurden mittels PCR die gewünschten Promotorelemente aus dem Genom der humanen KGN-Zellen amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass sowohl der hirnspezifische, als auch der ovarspezifische Promotor selektiv vervielfältigt werden konnten (Tabelle 3; 2.2.3.3). Die genomische DNA wurde aus den humanen KGN-Zellen isoliert und anschließend mit den organspezifischen Primern mittels PCR amplifiziert (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Amplifikation der hirnspezifischen und ovarspezifischen Aromatase-Promotoren mittels PCR**

Aus KGN-Zellen wurde genomische DNA gewonnen und die Sequenzen der hirnspezifischen und ovarspezifischen Aromatase-Promotoren wurden mit passenden Primerpaaren mittels PCR vervielfältigt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 1%igem Agarosegel. Die gesuchten Genprodukte waren 1,7kb (Gehirn, A) und 340 bp (Ovar, B) groß.

Die PCR-Produkte wurden anschließend aus dem Agarosegel extrahiert, gereinigt (siehe 2.2.3.10) und zunächst in den Cloning Vektor (pDrive Cloning Vector, Qiagen) ligiert (Abbildung 22). Dann wurden die Ligationsansätze in kompetente Zellen (XL1-Blue) transformiert.



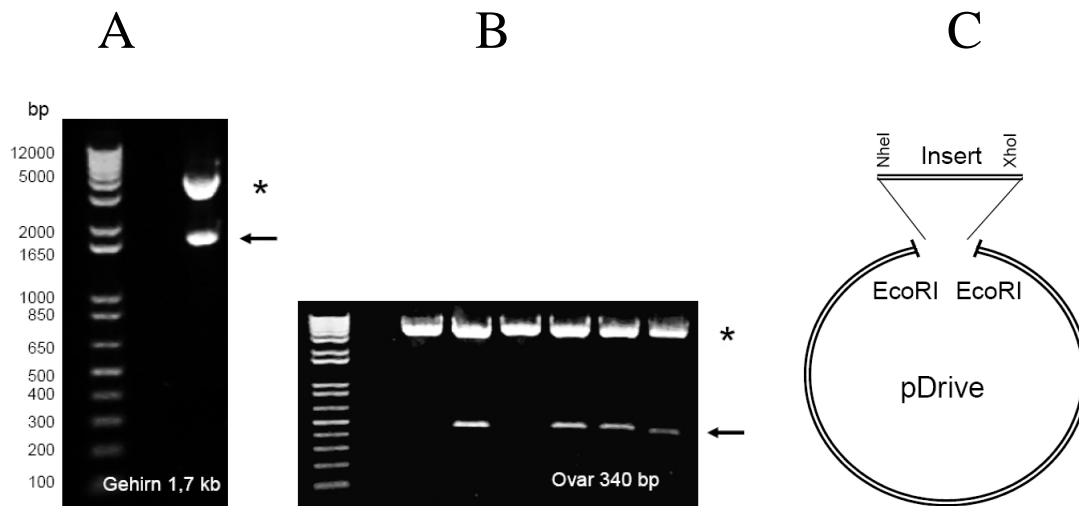
**Abbildung 22: pDrive Cloning Vector (Qiagen)**

Die mittels PCR amplifizierte Gensequenzen der hirn- und ovarspezifischen Aromatasepromotoren wurden in den Cloning Vektor ligiert. Dabei legten sich die bei der PCR typischerweise entstehenden Adenosin-Überhänge an den 5'- und 3'-Enden der DNA und die Uridin-Überhänge des linearen Vektors zusammen und bildeten ein kloniertes Plasmid. Mit diesem waren dann Amplifikationsschritte und das spezifische Herausschneiden der Gensequenzen für weitere Klonierungen möglich. Für den analytischen Verdau wurde mit EcoRI geschnitten. Die Inserts beinhalten die Schnittstellen für den Doppelverdau mit NheI und XhoI (Markierungen).

Nach Inkubation über Nacht auf ampicillinhaltigem Agarosegel wurden einzelne Kolonien selektiert und in 3ml ampicillinhaltigem Medium kultiviert. Durch die Wachstumsphasen der Bakterien kam es auch zu einer Vervielfältigung der transformierten Plasmid-DNA. Aus zwölf Vorkulturen wurde die DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau analysiert. Die Gelanalysen zeigten die erfolgreiche Klonierung der Aromatasepromotoren des Ovars und des Gehirns (Abbildung 23a-b).

Nachfolgende Sequenzanalysen bestätigten die Amplifikation und Klonierung der gewünschten Promotorfragmente.





**Abbildung 23a-c: Subklonierung der Aromatase-Promotoren in pDrive. DNA-Gele der Mini-Prep, Verdau mit EcoRI**

Der klonierte pDrive Vektor (C) wurde in kompetente XL1-blue Zellen transformiert. Durch Wachstumsphasen der Zellen wurde das Plasmid amplifiziert und mit dem Verfahren der Mini-Prep später aus den Bakterien isoliert. Anschließend wurde die DNA mittels Gelelektrophorese analysiert. Hierfür wurden die isolierten Plasmide mit EcoRI geschnitten und in 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Pfeile weisen auf die Aromatasepromotoren als gesuchte Gensequenzen bei 1,7 kb (Gehirn, A) und 340 bp (Ovar, B) hin.

\*=Vektor bei 3,85 kb.

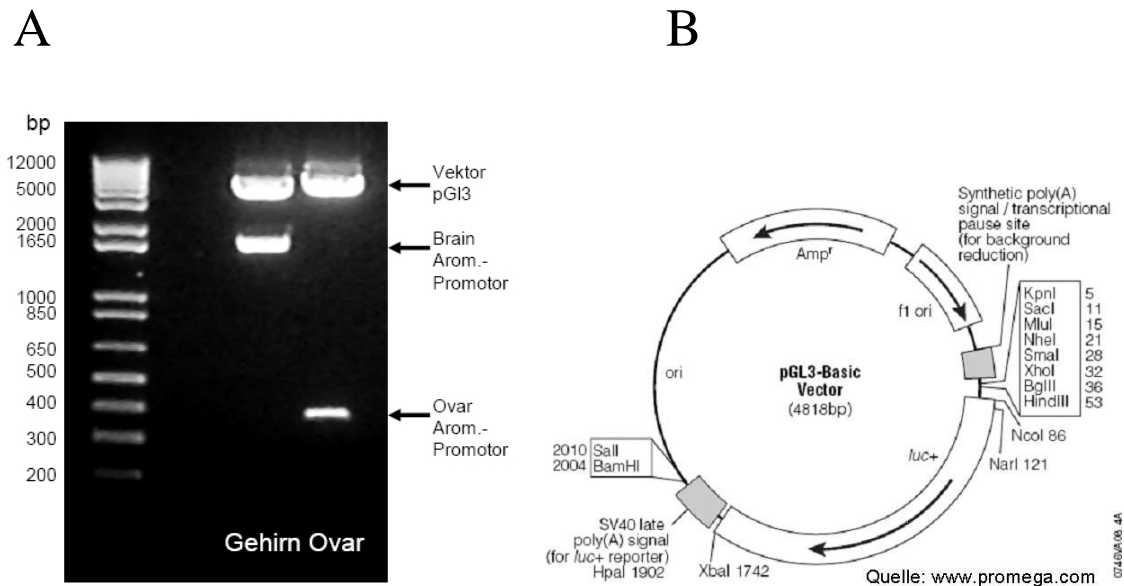
Vor der Klonierung in den pGL3-Vektor, der die Luciferase cDNA enthält, wurde dieser vervielfältigt. Dafür wurde er, wie für den klonierten pDrive-Vektor beschrieben, in kompetente Zellen transformiert, amplifiziert und die DNA aus den Bakterien isoliert.

Um den Promotor der Aromatase als gewünschte Gensequenz in den Luciferase-Vektor zu klonieren, mussten beide Komponenten mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dadurch sollte die Zusammenlagerung und Ligation der Schnittstellen ermöglicht werden. Als Restriktionsenzyme wurden die Endonukleasen NheI und XhoI ausgewählt. Über ihre Schnittstellen wurde sowohl der pGL3-basic-Vektor geöffnet, als auch die Aromatasepromotoren aus dem pDrive Vektor herausgeschnitten. Die NheI und XhoI Schnittstellen waren Teil der für die Amplifikation der PCR-Fragmente benutzten PCR-Primer und somit im Insert enthalten (Abbildung 22, 23).

Mittels Gelelektrophorese wurden die Fragmente aufgetrennt und anschließend aus der Agarose herausgeschnitten und aufgereinigt. Dann wurden in Ligationsansätzen die Aromatasepromotoren als Insert in den NheI und XhoI geschnittenen pGL3-Basic-Vektor kloniert.

Über Transformation von XL1-Blue-Zellen, Mini- und Midiprep wurde das klonierte Plasmid vervielfältigt. Die Kontrollgele der Midiprep-DNA nach Restriktion der Plasmide mit NheI und XhoI zeigten die jeweiligen Inserts und belegten die erfolgreiche Klonierung aromataspezifischer Promotoren in das Luciferase-Plasmid (Abbildung 24a). Somit steht

ein Reporter-System für die Bestimmung der Promotoraktivität der Aromatase für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung, die leider im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.



**Abbildung 24a-b: Verdau der pGL3-Vektoren nach Klonierung mit Aromatase-Promotoren**  
(A) Die Aromatase-Promotoren wurden mit dem pGL3-Vektor ligiert und damit die Klonierung des Luciferase Plasmids vollendet. Die Plasmide wurden mit NheI und XhoI probeverdaut. Nach Auftrennung im Agarosegel (1%) zeigen sich die Inserts bei 1,7kb (Gehirn) und 340 bp (Ovar).

(B) Darstellung des Reportersystems pGL3-Basic mit Luciferaseaktivität (Promega): Dem für die Luciferase kodierendem Plasmidabschnitt (*luc+*) kann über Klonierung ein induzierbares Promotorelement vorgeschaltet werden. Dafür steht eine Reihe von Schnittstellen durch Restriktionsendonukleasen zur Verfügung. Durch Messung von Licht, das bei der Luciferase katalysierten Oxidation von Luciferin entsteht, kann die Genaktivität bestimmt werden. Diese ist abhängig von der Promotoraktivität.

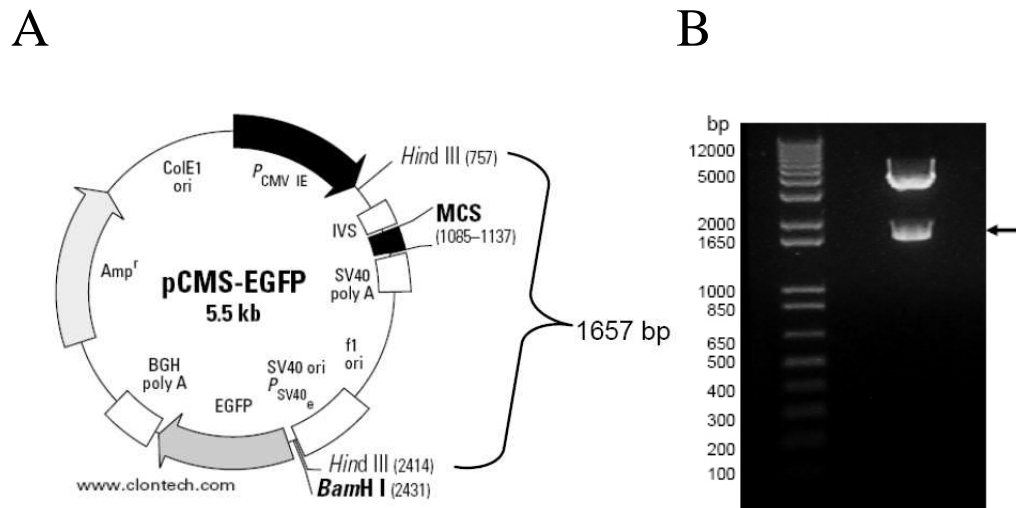
### 3.3.2 Optimierung der Transfektion

Die Transfektion des klonierten Luciferase-Plasmids sollte in Neuro2a-Zellen als neuronale Zelllinie, und KGN-Zellen, als ovarielle Zelllinie, durchgeführt werden.

Um die optimalen Bedingungen für die Transfektion dieser Zelllinien zu ermitteln, wurden Transfektionsversuche mit dem pCMS-EGFP-Vektor (Clontech) durchgeführt. Mit diesem Vektor transfizierte Zellen bilden das Enhanced Green Fluorescent Protein als Marker und können im Mikroskop direkt visualisiert werden. Der Vektor eignet sich deshalb besonders gut, um die Anzahl erfolgreich transfizierter Zellen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen festzustellen. Diese ermittelten Konditionen sollten dann für spätere Transfektionen mit dem Luciferase-Plasmid übernommen werden.

Vor Beginn der Transfektionsversuche wurde der pCMS-EGFP-Vektor wie oben beschrieben amplifiziert, indem er in kompetente Zellen transformiert, und die Plasmid-DNA nach

Vermehrungsphasen wieder isoliert wurde. Durch Restriktionsverdau mit der Endonuklease HindIII nach der DNA-Isolierung wurde die Identität der vervielfältigten Plasmide nachgewiesen (Abbildung 25b).

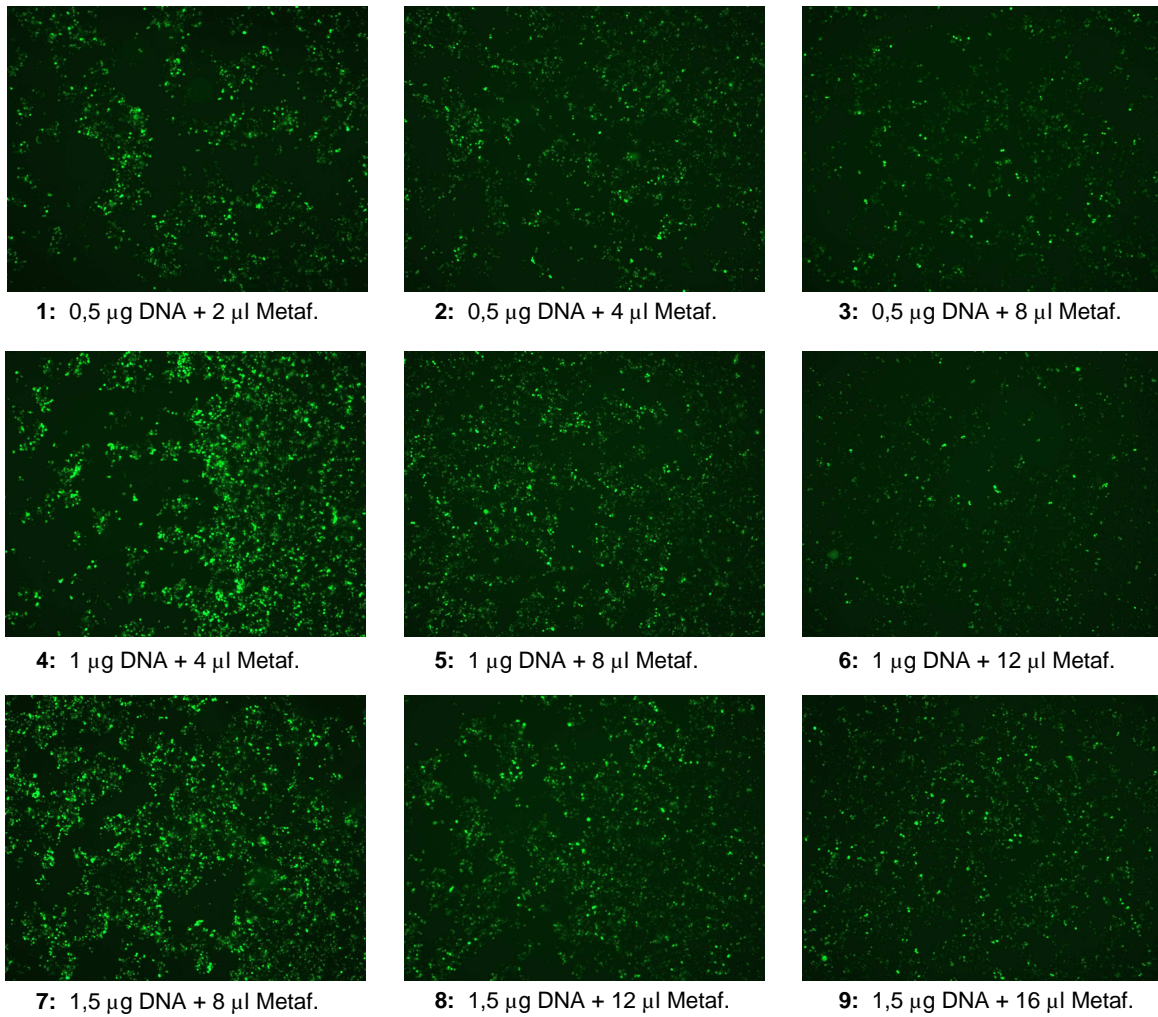


**Abbildung 25a-b: Schema des pCMS-EGFP Vektors und Identifizierung im Agarosegel nach Verdau mit Hind III**

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde ein Vektor verwendet, der transfizierte Zellen durch Bildung von grünem, fluoreszierendem Protein sichtbar macht (A). Nach Amplifikation des Vektors in transformierten Zellen wurde das Plasmid mittels Midi-Prep isoliert. Es folgte ein Restriktionsverdau mit der Endonuklease Hind III. Die Auftrennung der Schnittprodukte erfolgte in 1%igem Agarosegel. Die Banden bei 1650 bp und 3800 bp bestätigen die Identität des amplifizierten Plasmids (B).

Um die eukaryonten Zellen mit dem Plasmid zu transfizieren, wurde die Methode der Lipofektion mit kationischen Liposomen angewendet (siehe 2.2.2.7). Als Transfektionslösung wurde Metafectene® PRO (Biontex) verwendet. Zellen wurden in unterschiedlicher Dichte in 96-well-Platten ausgesät und nach 24h, gemäß Protokoll des Herstellers, mit der Plasmid-DNA transfiziert.

Die Neuro2a-Zellen zeigten in allen Ansätzen eine hohe Transfektionsrate, wobei die höchste Transfektionseffizienz für 30.000 Zellen/well bei Behandlung mit 1,5µl DNA und 16µl Metafectene® Pro erreicht wurde (Abbildung 26). Die erfolgreich transfizierten Zellen leuchten grün auf. Eine sehr intensive Grünfärbung wie in Abbildung 26.4 zu sehen ist, kann ein Zeichen für apoptotische Zellen sein. Diese Konditionen sollten daher vermieden werden.



**Abbildung 26: Transfektion des pCMS-EGFP-Vektors in Neuro2a-Zellen**

Es wurden Neuro2a-Zellen in verschiedener Dichte in 96-Well-Plates ausgesät. Nach einer Ruhepause von 24h wurde die Transfektion mit Metafectene® PRO durchgeführt. Dabei wurden, um optimale Transfektionsbedingungen zu ermitteln, verschiedene Mengen an Transfektionslösung und Plasmid-DNA verwendet.

Für die KGN-Zellen konnte mit keiner der durchgeführten Kombinationen von Transfektionslösung und Vektor-DNA eine effektive Transfektion erzielt werden.

## 4. Diskussion

Reelin und das Östrogen-bildende Enzym Aromatase sind intensiv erforschte Moleküle der Neurowissenschaften. Der aktuelle wissenschaftliche Kenntnisstand beider Strukturen wurde in der Einleitung jeweils ausgiebig beschrieben. Auffälligerweise besteht eine große Überschneidung in der Wirkung von Reelin und Östrogen im ZNS. Unter anderem steuern sie neuronale Differenzierungsprozesse durch die Beeinflussung der synaptischen Plastizität über die Spinedichte, das LTP und die Dendritogenese. Die zugrundeliegenden Signaltransduktionswege zeigen dabei einige gemeinsame Komponenten auf (siehe Einleitung).

Die Möglichkeit einer Interaktion zwischen den beiden Molekülen ist daher eine sinnvoll begründete und aussichtsreiche Hypothese. Tatsächlich konnte in einer vorausgegangenen Arbeit gezeigt werden, dass Östrogen die Reelinbildung in hippocampalem Gewebe positiv beeinflusst (Bender et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob Reelin eine nachweisbare Veränderung der Aromataseaktivität bewirkt.

Dieser Fragestellung wurde bisher in keiner wissenschaftlichen Publikation nachgegangen. Vor dem Hintergrund, dass Reeler-Mäuse Fertilitätsstörungen zeigen (Falconer 1951) und Reelin möglicherweise die Follikulogenese beeinflusst (Fayad et al. 2007) (bei Reeler-Mäusen also Veränderungen im Einflussbereich des Östrogenstoffwechsels bestehen), lag der Untersuchungsschwerpunkt auf den aromatasereichen gonadalen Geweben. Initial sollte gezeigt werden, dass Reelin und Aromatase nicht nur im Gehirn, sondern auch gonadal gemeinsam synthetisiert werden. Anschließend wurde in unterschiedlichen Aromataseassays untersucht, ob Reelin die Aromataseaktivität beeinflusst. Die Anfertigung von Reporterkonstrukten wurde durchgeführt, um in zukünftigen Promotorstudien die Wirkung von Reelin auf die transkriptionelle Aktivität der Aromatase zu untersuchen.

### 4.1 Nachweis von Reelin in Ratten- und Mausgewebe

#### Hippocampus

Reelin konnte in hippocampalem Gewebe aus Maus und Ratte in mRNA- und Proteinform nachgewiesen werden (Abbildung 9a-b). Auf diese Weise konnte eine Positivkontrolle der Tiere etabliert und zum Vergleich der untersuchten gonadalen Gewebe herangezogen werden.

Es ist bekannt, dass Reelin im Hippocampus sowohl von Cajal-Retzius-Zellen als auch von GABAergen Interneuronen gebildet wird (Förster et al. 2006).

### **Gonaden**

Das Reelin-Protein konnte mittels Western-Blot erstmalig in Ovar, Nebenhoden und Hoden nachgewiesen werden (Abbildung 9; 10). Der Nachweis gelang sowohl für Maus- als auch für Rattengewebe.

Es lassen sich aus den Ergebnissen organspezifische Muster bezüglich des Reelingehaltes und dessen Expression ableiten. Reelin wird vor allem im Ovar in relativ hohen Mengen gebildet. Bei männlichen Ratten konnte gezeigt werden, dass Reelin im Nebenhoden in höheren Mengen vorliegt als im Hoden.

Um zu untersuchen, ob Reelin endogen in den Gonaden gebildet wird, wurden die Gewebe zusätzlich auf das Vorhandensein von Reelin mRNA untersucht.

Mittels PCR konnte durch drei voneinander unabhängige, intronüberspannende Primerpaare das Vorhandensein von Reelin-mRNA in Ovar, Nebenhoden und Hoden nachgewiesen werden (Abbildung 12a-c). Dabei zeigte sich ein gewebespezifisches Expressionsmuster der Reelin mRNA. Die höchste Reelin-Expression war in Nebenhoden und Ovar nachzuweisen, bei männlichen Ratten war die Expression im Nebenhoden 3fach höher als im Hoden (Abbildung 14). Es konnte demnach gezeigt werden, dass die mRNA-Mengen mit den ermittelten Protein-Mengen der jeweiligen Gewebe korrelieren.

Bisher lagen noch keine Ergebnisse zur Detektion von Reelin in Proteinform in den Gonaden von Ratte oder Maus vor. Dafür konnte das Reelin-Protein im Blut nachgewiesen werden (Smalheiser et al. 2000). Somit besteht eine im Organismus zirkulierende Form des Glykoproteins. Der alleinige Nachweis von Reelin in den beschriebenen Organen lässt also noch nicht auf lokal gebildetes und gewebegebundenes Protein schließen, sondern könnte auch durch seine zirkulierende Form bedingt sein. Durch den Reelin mRNA Nachweis in den Gonaden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Protein auch endogen gebildet wird.

In zwei Arbeiten wurde bereits zuvor das Vorhandensein von Reelin-mRNA in den Gonaden beschrieben. Ikeda und Terashima (1997) führten insitu-Hybridisierungen mit radioaktivem <sup>35</sup>S durch und konnten Reelin-mRNA in Hoden und Ovar darstellen. Im Hoden war die mRNA auf einige Tubuli Seminiferi konzentriert, während die Signale im Ovar im Interstitium und nicht in den Follikeln zu finden waren. Fayad und Kollegen (2007) führten semiquantitative RT-PCR Versuche durch und konnten Reelin-mRNA in der Theca interna

dominanter Follikel, nicht aber in der Granulosazellschicht nachweisen. Die beiden Veröffentlichungen unterscheiden sich daher in der Information bezüglich der genauen Lokalisation von Reelin im Ovar.

Die Frage der exakten Lokalisation des Reelins in mRNA- und Proteinform in den untersuchten Geweben (welche Zellen bilden das Reelin, in welchen Zellkompartimenten?) wäre für ein besseres Verständnis der physiologischen Funktionsmechanismen des Reelins und der Aromatase sehr wertvoll. Die RT-PCR der vorliegenden Arbeit ist jedoch keine passende Methode, um diesbezüglich genauere Informationen hervorzubringen. Für die Fragestellung dieser Arbeit waren die Ergebnisse der RT-PCR aber sehr zufriedenstellend, da überhaupt ein valider Reelinnachweis durchgeführt werden konnte. Eine effiziente Detektion der Reelin mRNA könnte in späteren Versuchen mittels hochsensitiver radioaktiver *in situ*-Hybridisierung adressiert werden.

Auf Proteinebene konnte mit der Methode des Western-Blot ebenfalls keine Angabe zur Lokalisation in den Geweben erfasst werden. Hier könnten weiterführende immunhistochemische Untersuchungen erkenntnisreich sein. Diese wurden für Reelin bisher sowohl im ZNS als auch in peripheren Geweben (Leber, Prostatakarzinom) erfolgreich durchgeführt (Cariboni et al. 2005, Botella-López et al. 2008, Perrone et al. 2007). In den Gonaden ist der immunhistochemische Nachweis von Reelin bisher jedoch noch nicht gelungen.

Die Ergebnisse des Reelinnachweises decken sich mit den bisher veröffentlichten Daten in mRNA-Form und es konnte erstmalig auch die Proteinform von Reelin in den Gonaden dargestellt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Protein- und mRNA-Reelingehalte korrelieren. Im Ovar war die größte Menge darstellbar. Erstmals konnte Reelin auch im Nebenhoden dargestellt werden. Hier ließen sich interessanterweise ähnlich hohe Proteinmengen wie im Ovar darstellen. In den Gonaden wird demzufolge sowohl Reelin als auch Aromatase synthetisiert. Die Hypothese der Reelin-Aromatase-Interaktion auf gonadaler Ebene wird durch diese Befunde gestützt.

## **4.2 Aromatase-Assays**

Um den Einfluss von Reelin auf die Aktivität der Aromatase zu untersuchen, wurden zwei zellbasierte Aromatase-Assays durchgeführt. Die Zellen wurden in den Versuchen mit konditioniertem, Reelin-haltigem Medium, oder als Kontrolle mit konditioniertem Medium

GFP-transfizierter Zellen inkubiert. Dabei war das GFP selber für die Versuche uninteressant, sondern es sollten auf diese Weise die Sekretionsprodukte, die von den Reelin- bzw. GFP-transfizierten und stoffwechselaktiven Zellen in das Medium sezerniert wurden, konstant gehalten werden. Das GFP-Medium war somit reelinfreies Medium, beinhaltete aber in vergleichbarer Zusammensetzung möglicherweise beeinflussende Nebenprodukte. Die Reelinfreiheit des GFP-Mediums konnte im Western-Blot gesichert werden (Abbildung 5).

Der Assay nach Lephart und Simpson (1991) basiert auf der Messung von radioaktivem Wasser als indirekten Parameter der Enzymaktivität und im RIA wurde das gebildete Östrogen als Aktivitätsparameter der Aromatase verwendet.

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte mit keiner der angewandten Methoden der Beweis einer Beeinflussung der Aromatase durch Reelin erbracht werden. Die Inkubationszeiten der Zellen mit Reelin oder GFP und auch mit dem radioaktiven Androstendion wurden bewusst variiert, um Vergleiche unter verschiedenen Konditionen anstellen zu können. Dabei zeigte sich bei keinem der Experimente ein deutlicher Unterschied zwischen Reelin- und GFP-behandelten Zellen. Im Aromatase-Assay nach Lephart und Simpson zeigte sich eher die Tendenz einer positiven Beeinflussung der Aromatase-Aktivität durch Reelin (Abbildung 17; 18) während die Reelin-behandelten Zellen im RIA eher die Tendenz einer verminderten Aromataseaktivität zeigten (Abbildung 19). Bei beiden Assays handelt es sich um bereits etablierte Messverfahren, die durchaus geeignet sind, statistisch relevante Unterschiede der Aromataseaktivität verschiedener Zellkulturen darzustellen (siehe unten). Die durchgeführte Blockierung der Aromatase mit Formestan im Assay nach Lephart und Simpson zeigte in unseren Versuchen auf eindrucksvolle Weise zumindest die Sensitivität der Methode für Inhibitoren der Aromatase (Abbildung 15).

### **Vergleich der Ergebnisse mit Zellassays aus der Literatur**

Vergleichbare Experimente mit KGN-Zellen zeigten für andere Substanzen eine eindeutig stärkere Induktion der Aromataseaktivität: Untersuchungen mit cAMP (cyklisches Adenosinmonophosphat), hMG (humanes menopausales Gonadotropin) und hFSH (humanes Follikelstimulierendes Hormon) führten zu einer vielfach erhöhten Enzymaktivität (cAMP 4-fach, hMG 3-fach, FSH 2,5-fach gegenüber Ausgangswerten) (Nishi et al. 2001). Der Versuchsaufbau war vergleichbar: Nach 12 Stunden Vorinkubation wurde für weitere 12 Stunden mit radioaktivem Androstendion inkubiert, dann allerdings in Abwesenheit der stimulierenden Mediatoren. In jenem Versuch wurde allerdings durchgehend in serumhaltigem Medium inkubiert.



Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche erfolgten in serumfreiem Medium, da das Vorhandensein von Serum in einigen Zelllinien zu einer Verminderung der Aromataseaktivität führen kann (Lephart u. Simpson 1991). Außerdem ist bekannt, dass Serum gewöhnlicherweise eine Reihe nicht genau definierter Substanzen wie Steroidhormone, Neurotrophine und weitere Wachstumsfaktoren beinhalten kann (Fester et al. 2006). Diese könnten die Aromataseaktivität beeinflussen und die Versuchsergebnisse dementsprechend verfälschen. In den initial ausgeführten Etablierungsassays mit KGN- und JEG3-Zellen wurde dennoch versuchsweise auch die Aromataseaktivität von Zellen in serumhaltigem Medium bestimmt (Abbildung 15). Bemerkenswerterweise zeigten die in serumhaltigem Medium kultivierten Zellen eine höhere Enzymaktivität als solche in serumfreiem Medium. Dieses könnte einerseits durch einen stimulierenden Effekt des Serums bedingt sein, wahrscheinlicher ist jedoch ein negativer Einfluss der serumfreien Inkubationszeit auf die Aromataseaktivität durch eine Verminderung der Zellvitalität. Es zeigte sich, dass langzeitiges Fehlen von Serum im Kulturmedium von 16 bis 18 Stunden eine negative Auswirkung auf die Enzymaktivität hatte. Die JEG3-Zellen starben und KGN-Zellen zeigten sehr niedrige Werte (Abbildung 15). An der Kultivierung in serumfreiem Medium wurde dennoch festgehalten, um eine Beeinflussung der Messwerte durch die oben genannten, möglicherweise im Serum vorhandenen Zytokine, zu verhindern.

Auch im RIA konnte mit cAMP eine erhebliche Induktion (23,8fach) der Östrogenproduktion in KGN-Zellen erreicht werden (Nishi et al. 2001). Gleichzeitig konnte in hippocampalen Dispersionskulturen eine eindeutige Inhibition der Aromatase durch Formestan gezeigt werden (Prange Kiel et al. 2003). Grundsätzlich sind beide Methoden also geeignet, sowohl Effekte von starken Induktoren-, als auch von starken Inhibitoren der Aromatase darzustellen. Der ausgebliebene Nachweis einer Interaktion zwischen Reelin und Aromatase mit den angewandten Zellassays kann folgende Ursachen haben:

1. Es gibt tatsächlich keine Interaktion zwischen den beiden Molekülen
2. Das Problem liegt bei den angewandten Methoden: Diesen fehlt es für den Reelin-Versuch an Sensitivität, um die gesuchte Interaktion zu detektieren.
3. Die Auswahl des Zellmodells birgt Probleme: Eventuell sind elementare Signalwege in den verwendeten Zelllinien nicht vorhanden, die in-vivo Konditionen werden damit nur ungenügend widergespiegelt.

### **Stärken und Schwächen der Verwendung von Zelllinien**

Möglicherweise bedingen die verwendeten Zelllinien ein Problem des Versuchsettings. Mit den KGN-Zellen wurde für die Versuche eine permanente Granulosazelllinie verwendet, die aus einem humanen, invasivem Ovarialkarzinom isoliert wurde. Initial wurden außerdem JEG3-Zellen (humane Chorionkarzinomzellen) verwendet. Auffällig waren in den Assays die starken Unterschiede in der Aromataseaktivität von KGN- und JEG3-Zellen. Praktisch führte die niedrigere Aromataseaktivität der KGN-Zellen zu einer Anpassung der Versuche mit nachfolgender Erhöhung der Inkubationszeiten mit dem radioaktiven Androstendion (Abbildung 17; 18). Die parallele Verwendung der Zelllinien lag darin begründet, dass schon Erfahrungen mit den JEG3-Zellen vorlagen, für die Untersuchung einer möglichen gonadalen Interaktion aber die ovariellen KGN-Zellen das zu bevorzugende Zellsystem darstellten.

In ihren funktionellen Eigenschaften sind die KGN-Zellen den physiologisch vorkommenden Granulosazellen sehr ähnlich und deshalb für die Untersuchungen attraktiv. Sie zeigen ein für Granulosazellen typisches Produktionsmuster für Steroidhormone und exprimieren als einzige etablierte Zelllinie der Granulosazellen den FSH-Rezeptor (Nishi et al. 2001). Für den im Zuge der Forschungsarbeit durchgeführten Aromatase-Assay war vor allem die Charakteristik der Steroidhormonproduktion der KGN-Zellen von großer Wichtigkeit.

Immunhistochemische Untersuchungen an ihnen zeigten einen großen Anteil CYP450 positiver, also Aromatase exprimierender, Zellen (Nishi et al. 2001). Die KGN-Zellen können zwar Pregnenolon produzieren, durch ein Fehlen der  $17\alpha$ -Hydroxylase sind sie aber nicht dazu befähigt, weitere Differenzierungsschritte für selbst synthetisierte Steroide durchzuführen (zu der Östrogenbiosynthese siehe Abbildung 1 in Einleitung). Andererseits können Steroidhormone, die an anderer Stelle des Körpers durch die  $17\alpha$ -Hydroxylase verändert wurden, sehr wohl weiter metabolisiert werden. Diese Eigenschaft ist typisch für Granulosazellen, die zur Bildung von Östrogenen wie oben beschrieben auf weiter prozessierte Steroide aus der Theca-Interna angewiesen sind (Hillier et al. 1994). Von extern appliziertes Androstendion oder Testosteron als Substrate der Aromatase können somit von den KGN-Zellen in die Produkte Östron und Östrogen umgewandelt werden, wobei durch die fehlende  $17\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität eine Östrogeneigensynthese ausgeschlossen werden kann.

Zelllinien bestechen außerdem durch ihre zeitlich fast unbegrenzte Kultivierbarkeit. Für die KGN-Zellen wurden auch nach mehr als 100 Passagen und fünf Jahren Kultur keine auffälligen Veränderungen festgestellt (Nishi et al. 2001). Die in den Versuchen dieser Arbeit

verwendeten Kulturen wurden jedoch nicht mehr als 30 Mal passagiert, um die Wahrscheinlichkeit der Verwendung genetisch veränderter Zellen zu minimieren.

Primäre Zellkulturen haben wiederum eine begrenzte Lebensdauer und zeigen mit der Zeit typische Veränderungen, wie verringerte Zellteilungsraten und Alterungsprozesse. Gegenüber den permanenten Kulturen haben sie aber einen entscheidenden Vorteil: Sie spiegeln die in vivo Bedingungen im Organismus am besten wider, während permanente Zelllinien häufig ursprüngliche Eigenschaften der Zellen verloren haben (Schmitz, Lehrbuch Zellkultur). Somit ist es möglich, dass die verwendeten Zelllinien trotz der Beibehaltung einiger charakteristischer Eigenschaften (siehe oben) für den Nachweis einer Reelin-Aromatase-Interaktion nicht geeignet waren, da andere, möglicherweise entscheidende, in-vivo Eigenschaften nicht mehr vorhanden waren.

### **Kokulturen als besseres Zellkulturmodell?**

Neben der funktionellen Ausstattung der verwendeten Granulosazelllinie selbst, könnte für eine möglichst lebensnahe Darstellung der Aromataseaktivität eventuell auch das Zusammenwirken mit weiteren Zellarten notwendig sein. Wie erwähnt erfolgt die Östrogenbiosynthese durch ein Zusammenspiel der Theca-interna- und Granulosazellen (Hillier et al. 1994). Im Versuchssetting wurde durch die Gabe des Androstendions zwar die Hauptaufgabe der Theca-interna-Zellen (Herstellung von männlichen Sexualhormonen) übernommen, möglicherweise bestehen aber weitere Wechselwirkungen zwischen den beiden Zellschichten, die in reiner Granulosazellkultur nicht zur Geltung kommen können. Solche Wechselwirkungen könnten auch für den Reelin-Signalweg in den Gonaden wichtig sein:

Interessanterweise konnte in Granulosazellen dominanter Follikel der Nachweis des Reelin-Rezeptors ApoER2 erbracht werden, während die Reelin-mRNA im Ovar in der anliegenden Theca interna nachgewiesen wurde (Fayad et al. 2007). Es wäre also möglich, dass Reelin in der Theca interna gebildet wird und an den Granulosazellen seine Wirkung entfaltet. Wie Androstendion wurde auch Reelin in den Versuchen extern zu den Granulosakulturen gegeben und die hauptsächliche Funktion der Theca-Zellen somit substituiert. Dennoch könnten bisher unbekannt regulative Wechselwirkungen bei der Granulosa-Monokultur ausbleiben. Zukünftige Zellkulturversuche könnten deshalb erfolgsversprechender sein, wenn sie:

1. Mit primären ovariellen Kulturen durchgeführt werden, um mögliche Funktionsverluste der Zelllinien auszuschließen.

2. Als Kokulturen von Granulosa- und Theca-Zellen angelegt werden, um die Wichtigkeit einer möglichen Interaktion dieser beiden Zellarten für den Reelin-Signalweg zu berücksichtigen.

Für Rattengewebe sind sowohl die isolierte Kultur von Theca-Interna- und Granulosazellen (Erickson 1983), als auch die Kokultur von beiden Zellarten (Woodruff et al. 1993) in serumfreiem Medium bereits etablierte Verfahren.

Hippocampale Neurone, die *in vivo* erwiesenermaßen sowohl die Aromatase bilden (Wehrenberg et al. 2001), als auch benachbart zu Reelin-exprimierenden Zellen liegen, haben eine so geringe Aromataseaktivität, dass sie für die Untersuchung einer Interaktion im Aromataseassay nach Lephart und Simpson nicht verwendet werden konnten. Der RIA könnte mit hippocampalen Dispersionskulturen aber zukünftig verwendet werden, um eine Beeinflussung der Östrogenbildung durch Reelin nachzuweisen. Somit könnte alternativ eine weitere primäre Zellkultur genutzt werden, die Aromatase bildet und physiologischerweise im Kontakt mit Reelin steht.

### **Vergleich der Versuchsergebnisse mit Daten bekannter Targetgene**

In der Literatur sind einige Zellkulturversuche beschrieben, in denen die Wirkung von Reelin auf bekannte Targetgene untersucht wurde. Reelin beeinflusst über die Phosphorylierung der Erk1/2 Proteine (extracellular signal-regulated kinase) die Transkription von Egr1 (early gene early growth response 1) und darüber die Bildung des Egr1-Proteins (Simó et al. 2007). Es wird vermutet, dass dieses Protein Einfluss auf die Loslösung migrierender Neurone aus der Subventrikulärzone hat (Simó et al. 2007). Telencephalische Primärkulturen und dissoziierte neuronale Kulturen aus der Subventrikulärzone wurden mit Reelin- oder Kontrollüberstand kultiviert. Dabei zeigten die Reelin behandelten Zellen im Western-Blot schon nach 30 Minuten eine stark vermehrte Synthese des Egr-1 Proteins im Vergleich zu den Kontrollen. Das Plateau lag bei 60-90 Minuten. Auch eine parallel durchgeführte semiquantitative RT-PCR zeigte für Reelin-behandelte Kulturen nach 30 Minuten eine starke Zunahme der Egr1-mRNA (Simó et al. 2007). Demnach liegt die Transkriptionsinitiation von Reelin bei diesem Versuch bei ca. 30 Minuten (bzw. davor, da 30 Minuten auch der erste Messzeitpunkt war).

Ein weiteres Targetgen von Reelin ist der kodierende Bereich für das Blbp (brain lipid-binding protein) in radiären Gliazellen (Hartfuss et al. 2003). Es wird vermutet, dass Blbp Einfluss auf die Morphologie der Gliazellen nimmt. Im Kortex von Reelern ist Blbp vermindert. Dissoziierte kortikale Zellen aus Wildtyp und Reeler wurden mit Reelin oder Kontrollmedium behandelt, fixiert und anschließend immunhistochemisch auf Blbp

untersucht. Nach 2 Stunden war keine Veränderung festzustellen, eine starke Zunahme des Proteins in Reelin-behandelten Kulturen zeigte sich aber interessanterweise nach 24 Stunden (Hartfuss et al. 2003). Die Reelinwirkung wird in Gliazellen in diesem Fall also erst nach einer größeren Latenzzeit sichtbar.

Auch um den Einfluss von Reelin auf die Phosphorylierung einiger Signalelemente zu untersuchen, wurden neuronale Dispersionskulturen in Reelin-haltigem Medium kultiviert. Die Reelin-induzierte Dab1-Phosphorylierung war bereits nach 10 Minuten nachweisbar und zeigte nach 30 Minuten ihren Höhepunkt (Howell et al. 1999, Analyse durch Western-Blot). Das MAP1B (Mikrotubulus Assoziiertes Protein) hatte in neuronalen Dispersionskulturen bei Behandlung mit Reelin wiederum nach 6 Stunden die stärkste Phosphorylierung (González-Billault et al. 2004), während Reelin den Gesamtgehalt des MAP1B-Proteins nicht veränderte. Durch Reelin gesteuerte Phosphorylierungsschritte konnten folglich nach 10-30 Minuten, bzw. nach 6 Stunden dargestellt werden.

Die Literatur zeigt demnach einige Beispiele für Zellkulturversuche, bei denen mit Reelin-haltigem Überstand gearbeitet wurde, um eine Beeinflussung der Signaltransduktionswege und der Transkription durch Reelin zu untersuchen. Es wird deutlich, dass durch die Behandlung von Zellkulturen mit Reelin statistisch relevante Veränderungen induzierbar - und methodisch über Western-Blot, Immunhistochemie und RT-PCR nachzuweisen sind. In keinem der erwähnten Reelin-Zellkulturversuche wurde allerdings der Effekt von Reelin auf die Aromataseaktivität untersucht. Darüberhinaus wurde nicht mit gonadalen Zellen gearbeitet. Auffällig ist, dass der Reelin-vermittelte Effekt bei den aufgeführten Studien nach sehr unterschiedlichen Vorinkubationszeiten zu sehen ist. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es für die Untersuchung der Wirkung von Reelin auf die Aromataseaktivität sinnvoll, das Substrat (Androstendion) direkt mit dem Reelin zu den Zellen zu geben, um ein maximales Zeitfenster für die Detektion möglicher Veränderungen abzudecken. Nach diesem Muster wurde dementsprechend in den späteren Versuchen nach Lephart und Simpson und im RIA vorgegangen. Allerdings musste das Zeitfenster in den hier verwendeten Assays nicht allzu kritisch gewählt werden, da bei der indirekten Aromataseaktivitätsbestimmung nicht temporäre Phosphorylierungen oder Transkriptionsprodukte, sondern das zeitlich akkumulierte Östrogen, bzw.  $^3\text{H}$ -haltige Wasser bestimmt wurden.

### 4.3 Offene Fragen, Analyse

#### **Einflussfaktoren auf die Messwerte**

Innerhalb der untersuchten Gruppen ergaben sich teilweise recht hohe Standardabweichungen. Grundsätzlich muss beachtet werden, dass der Präzision der angewandten Methoden einige Grenzen gesetzt sind. Ein möglicher Ungenauigkeitsfaktor kann durch verschieden dichtes Wachstum der Zellkulturen bedingt sein, obwohl die Aussaat der Zellen zu gleichen Bedingungen erfolgte und die Auswahl in die Reelin- oder Kontrollgruppe randomisiert getroffen wurde. Zellkulturversuche basieren auf biologischen Systemen, die nicht in absoluter Vollständigkeit kontrolliert werden können. Bei späterer Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop konnte kein Unterschied zwischen Reelin- und Kontrollzellen bezüglich Dichte und Vitalität festgestellt werden, Ungenauigkeiten können aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Im RIA wurden mögliche Unterschiede der Zelldichte durch die Bestimmung der Proteinkonzentration standardisiert. Vergleiche der Östrogenwerte des RIA mit und ohne Verrechnung der Proteinmengen zeigten jedoch vergleichbare Werte.

Wie oben erwähnt konnte mit den durchgeführten Versuchen kein Unterschied der Aromataseaktivität bzw. Östrogensynthese nach Reelinbehandlung festgestellt werden. Möglicherweise sind die angewandten Methoden nicht sensitiv genug, bzw. die verwendeten Zelllinien nicht geeignet, um signifikante Unterschiede herausarbeiten zu können.

#### **Mögliche Reelin-Effekte über Enzymaktivität oder Genexpression**

Die Aromataseaktivität kann posttranslational durch Phosphorylierungen reguliert werden. Die Proteinsequenz der Aromatase hat typische Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen A und C (Boon et al. 2010). In Brustkrebszellen führt die Phosphorylierung durch Östrogen zu einer Aktivitätssteigerung (Catalano et al. 2009), während an anderer Stelle eine Verminderung der Aromataseaktivität durch Phosphorylierungen beschrieben ist (Balthazart, Baillien, Ball 2001, Miller 2008). Grundsätzlich herrscht aber noch Unklarheit über die genauen Mechanismen der Aromataseregulation. Eine Regulation durch Reelin via Phosphorylierung wäre gut möglich, da es, wie oben erwähnt, bekannte Targetgene gibt, die nach diesem Prinzip durch Reelin verändert werden und dadurch Signalkaskaden aktivieren (Howell et al. 1999, González-Billault et al. 2004).

Grundsätzlich interessant ist es herauszufinden, ob Reelin-induzierte Veränderungen der Östrogenbildung primär auf einer Beeinflussung der Aktivität der Aromatase oder auf deren

Genexpression beruhen. Für die praktische Durchführung der Versuche sind die verschiedenen Hypothesen der möglichen Aromataseregulation indes nicht relevant gewesen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Aromatase-Assays bleibt unklar, ob eine mögliche Veränderung der Aromataseaktivität (gemessen durch verbrauchtes Substrat oder gebildetes Produkt) auf einer veränderten Genexpression (Bildung des Aromatase-Enzyms), deren Aktivität (Enzymaktivität), oder einer Kombination aus beidem beruht. Einzig über die Bildung der indirekten Aktivitätsparameter Östrogen und  $^3\text{H}$ -haltiges Wasser in Abhängigkeit von Reelin sollte die Möglichkeit der Aromataseregulation untersucht werden.

Promotorstudien würden es ermöglichen, Reelin-induzierte Effekte auf die Transkriptionsrate der Aromatase zu untersuchen.

#### **4.4 Regulation der Aromatasetranskription durch Reelin**

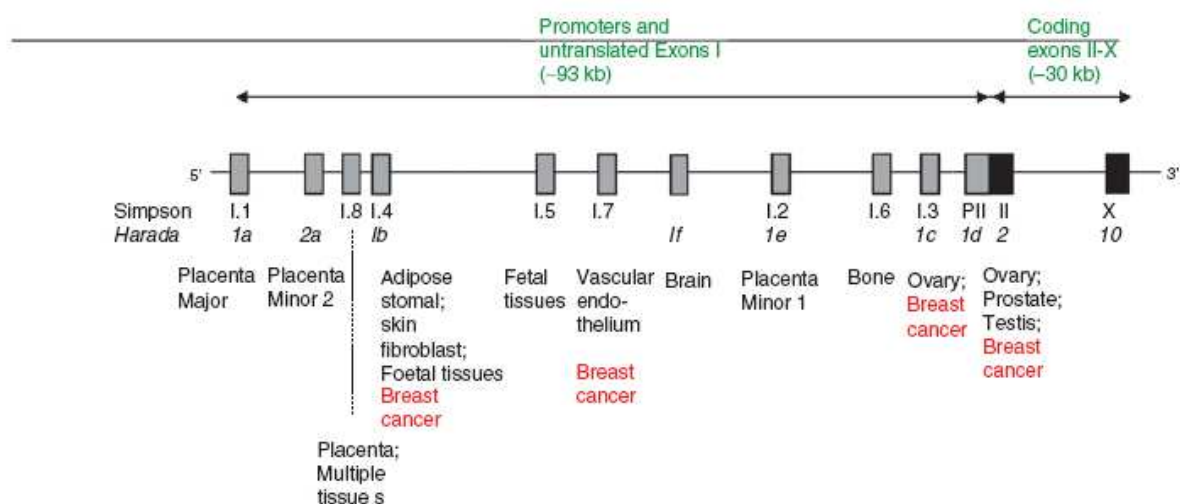
Um den Einfluss von Reelin auf die transkriptionelle Aktivität der Aromatase zu untersuchen, wurden Reportergenkonstrukte angefertigt. Die hirn- und ovarspezifischen Aromatasepromotoren wurden aus der genomischen DNA der humanen KGN-Zellen gewonnen und vor ein Reportergen mit Luciferaseaktivität kloniert. Die Vektoren sollen in zukünftigen Versuchen in neuronale und ovarielle Zellen transfiziert werden, um anschließend in einem Luciferase-Assay den Einfluss von Reelin auf die Aktivität der Aromatasepromotoren und dadurch die Genexpression bestimmen zu können (siehe Einleitung). Diese Versuche waren im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchzuführen und sollen zeitnah in einer folgenden Dissertation unternommen werden. Es konnten für die neuronalen Neuro2a-Zellen mit dem pCMS-EGFP-Vektor optimale Transfektionsbedingungen ermittelt werden, während die Transfektion der KGN-Zellen schwierig und noch optimierbar ist.

Der Luciferase-Assay wurde als System der quantitativen Genaktivitätsmessung ausgewählt, da er über eine hohe Sensitivität verfügt.

Die Gewinnung der gewebsspezifischen Aromatase-Promotoren erfolgte mit speziell angefertigten Primern nach Untersuchung der Gensequenzen und Abgleich mit der Literatur (siehe Material & Methoden 2.2.3.3). Die Regulation des Aromatasegens ist hochkomplex und derzeit noch in erheblichem Maße unverstanden. Bei den meisten Säugetieren unterliegt die Kontrolle der Aromataseexpression organspezifischen Promotoren (Bulun et al. 2003). Beim Menschen sind derzeit insgesamt elf verschiedene Promotoren bekannt (u.a. spezifisch für Hirn, Ovar, Fettgewebe, Plazenta, Knochen), bei der Maus sind es fünf (Boon et al. 2010).

Die Regulation der Aromataseaktivität beim Menschen erfolgt demnach gewebeabhängig mit speziellen Promotoren und durch alternatives Spleißen (Boon et al. 2010). Das humane, für die Aromatase kodierende Gen CYP19A1 befindet sich auf dem Chromosom 15q21.1 und besteht aus neun kodierenden Exons (Exon II bis X), denen am 5'-Ende ein untranslatierter Bereich vorgeschaltet ist (Bulun et al. 2003). Dieser untranslatierte Bereich beinhaltet die verschiedenen gewebspezifischen Promotoren und Exons I, die eine gewebetypische Expression und Regulation des CYP19A1-Genes ermöglichen, dabei aber stets für ein identisches Aromatase-Protein kodieren. Die Redundanz liegt darin begründet, dass die Aromatase-Transkripte zwar gewebetypische 5'-Enden besitzen, da diese aber nicht translatiert werden, ist die kodierende Sequenz der Aromatase und dadurch auch die des Proteins unabhängig der verwendeten Promotoren identisch (Boon et al. 2010). Für das Gehirn ist spezifischerweise der Promotor If (Honda, Harada & Takagi 1994), für das Ovar der Promotor PII (I.d nach Harada 1993) in der Literatur beschrieben. Beide konnten isoliert und in den Vektor kloniert werden.

Wenngleich diese Exons I (inkl. Promotoren) gewebespezifisch sind, sind sie nicht die einzige Transkriptionsvariante im jeweiligen Gewebe. So benutzt die Plazenta beispielsweise parallel eine ganze Reihe dieser Promotoren (Mahendroo et al. 1993), der ovarspezifische Promotor PII kommt zusätzlich auch in Prostata-, Hoden- und Brustkrebsgewebe vor (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27: Das menschliche Aromatase (CYP19A1) Gen (Boon et al. 2010)**

Schematische Darstellung der gewebespezifischen Promotoren und 5'-untranslatierten Exons I. Diese bilden einen dreimal höheren Anteil (~93kb) am Gesamtgen als die kodierenden Exons II-X (~30kb). Es werden, wie dargestellt, identische Exone nach zwei verschiedenen Nomenklaturen (Harada oder Simpson) benannt.



Die Regulation der Aromatase wird unter anderem über Hormone (z.B. hFSH für den PII im Ovar) und Zytokine (z.B. IL-6, IL-11, TNF $\alpha$  im Fettgewebe) gesteuert (Simpson 2004). Die Signalwege werden hierbei, wie auch für Reelin beschrieben, über „second-messenger“ vermittelt.

Die oben aufgeführten Versuche zu den Reelin-Targetgenen Egr1-Protein und Blbp ermutigen zu genaueren Untersuchungen der Reelinwirkung auf das potentielle Targetgen Aromatase. Dabei stellt die hochkomplexe Regulation des Aromatasegens eine besondere Herausforderung dar und es wird spannend sein zu sehen, ob die ausgewählten Promotorelemente im Luciferase-Versuch funktionieren werden. Hierbei sollte in jedem Fall auch eine Positivkontrolle (z.B. mit hFSH, cAMP oder Östrogen) durchgeführt werden.

#### **4.5 Hypothese der Einflussnahme von Reelin auf die Fertilität**

Zwar konnte in den Versuchen dieser Arbeit kein Nachweis für die Regulation der Aromatase durch Reelin in den Gonaden erbracht werden, die These einer direkten gonadalen Wirkung von Reelin sollte dennoch nicht verworfen werden. Wie oben erwähnt gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass Reelin und Aromatase in diesen Organen interagieren könnten. Dominante Follikel im Ovar zeigen interessanterweise eine starke Zunahme der Expression des Reelin-Rezeptors ApoER2 (Fayad et al. 2007) und auch im Nebenhoden konnte eine hohe Dichte an ApoER2 und dessen Funktion für die Spermienreifung nachgewiesen werden (Andersen et al. 2003). In der Einleitung wurde beschrieben, dass die reduzierte Fertilität der Reeler-Mäuse alternativerweise auch auf einer Fehlmigration der GnRH-Neurone, also auf einer Störung im ZNS, basieren könnte (Cariboni et al. 2005). Bei Menschen führen Erkrankungen, die auf einer Insuffizienz oder Fehllokalisierung von GnRH-Neuronen basieren, bei Männern zum klinischen Bild des hypogonadotropen Hypogonadismus (Schwanzel-Fukuda et al. 1989): Durch mangelnde GnRH-Sekretion kommt es zur Fehlfunktion der Hypophyse und folglich zu einer defizitärer Stimulation des Hodengewebes mit LH/FSH. Es resultiert ein auffälliger Kleinwuchs der Hoden mit mangelnder Funktionalität und Fertilität (Behre et al. 2009, Lehrbuch Andrology, Springer). Für Reeler-Mäuse ist kein besonderer Phänotyp der gonadalen Organe bekannt (Ikeda u. Terashima 1997). Aussehen, Größe und Volumen der Hoden zeigen keine Unterschiede zum Wildtyp und auch histologisch konnten keine auffälligen Unterschiede festgestellt werden (persönliche Mitteilung durch K. Morcinek, Universität Köln).

Die Tatsache, dass es bei Reeler-Mäusen keine auffälligen Veränderungen in der Morphologie der Gonaden gibt, spricht eher gegen die These einer zentralen Störung der GnRH-Neurone als Ursache der verminderten Fertilität. Es ist gut möglich, dass die HPG-Achse bei Reeler-Mäusen trotz verminderter GnRH-Neurone noch genügend funktionsfähig ist. Interessant wäre für diese Fragestellung ein Vergleich der Serumwerte einiger Hormone der HPG-Achse zwischen Reeler- und Wildtyp-Mäusen. Bei Menschen werden als Standarddiagnostik hypogonadotroper Fertilitätsstörungen die Werte von LH, FSH, Testosteron und Östrogen bestimmt, teilweise in Kombination mit einer GnRH Stimulation (GnRH selbst kann durch seine niedrigen Konzentrationen im Serum nur sehr schwer bestimmt werden) (Behre et al. 2009).

Das Vorhandensein von Reelin in den gonadalen Geweben ist auf jeden Fall eine Arbeitsgrundlage für nachfolgende Untersuchungen einer möglichen Wechselwirkung von Aromatase und Reelin bzw. von Aromatase- und Reelininduzierten Signalkaskaden.

## 5. Zusammenfassung

Das Glykoprotein Reelin und das von der Aromatase gebildete Hormon Östrogen sind bekannte Neuromodulatoren des ZNS. Reelin ist vor allem dafür bekannt, die neuronale Migration in der Embryogenese durch die Vermittlung von Stoppsignalen entscheidend zu steuern. Aber auch im adulten Säuger beeinflusst es die neuronale Plastizität. Hier gibt es eine auffällige Überschneidung mit den beschriebenen Wirkungen des Sexualhormons Östrogen auf neuronale Strukturen. Die Identifizierung des Östrogens als Neuromodulator und der Nachweis, dass das Hormon lokal im ZNS durch Aromatase gebildet wird, sind wegweisende Forschungserkenntnisse der letzten Jahre. Zugrundeliegende physiologische Steuerungsmechanismen der Östrogenbildung sind aber weitestgehend noch unbekannt. Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit der Effekte beider Substanzen stellt sich die Frage, ob Reelin ein entscheidender Faktor bei der Regulation der Aromatase und damit der Östrogenwirkung sein könnte. Über das zentrale Nervensystem hinaus lässt sich diese Fragestellung interessanterweise auch auf die gonadale Ebene transferieren: Mausmutanten, die genetisch bedingt vermindert Reelin bilden (sog. Reeler-Mäuse), zeigen Fertilitätsstörungen. Ein entscheidender Regulator der hormonellen Steuerkreise in den Gonaden ist wiederum das Östrogen. Anhand dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob es in den Gonaden möglicherweise eine Interaktion von Reelin und Aromatase gibt und ob ein Fehlen dieser Wechselwirkung als Erklärungsmodell für die Fertilitätsstörung der Reeler-Mäuse dienen könnte.

Als essentielle Grundlage für weitere Untersuchungen konnte in dieser Arbeit der Nachweis von Reelin in den Gonaden von Wildtyp Mäusen und Ratten auf Protein- und auf mRNA-Ebene erbracht werden. Die nachgewiesene Reelin-Proteinmenge und Höhe der mRNA-Expression zeigten organspezifische Muster mit höchsten Mengen im Ovar, geringeren im Nebenhoden und geringsten Mengen im Hoden. In Zellkulturversuchen wurde die Auswirkung von Reelin auf die Aromataseaktivität östrogenproduzierender Zellen anhand von Aromataseassays untersucht, wobei kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen festgestellt werden konnte. Um den Einfluss von Reelin auf die Aromatasetranskription untersuchen zu können, wurden in einem molekularbiologischen Verfahren zwei Konstrukte kloniert, in welche die organspezifischen Aromatasepromotoren aus dem Gehirn und Ovar eingebracht werden konnten. Entsprechende Analysen konnten im Rahmen der Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

<sup>35</sup> S	Schwefel Radionuklid
<sup>3</sup> H	Tritium
APO E	Apolipoprotein E
APOER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
Blbp	Brain lipid binding protein
C19, C18	Angabe zur Anzahl der Kohlenstoff (C) –Atome der Substanzen
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute
CYP 450	Cytochrom P450
Dab1	Drosophila Disabled Genprodukt 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Säure engl. = acid)
E 13.5	embryonaler Entwicklungstag 13.5
ERE	Estrogen Responsive Element
Erk 1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2
Egr1	Early gene early growth response 1
fw	Vorwärtsstrang der DNA (forward)
FCS	Fetales Kälber (engl. = calf) Serum
g	Erdschwerebeschleunigung als Einheit der Zentrifugalbeschleunigung
GABA	Gamma-Amino-Butter-Säure (Säure engl. = acid)
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GFP	Green-Fluorescent-Protein
HRP	Horseradish-Peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich)
hFSH	humanes Follikelstimulierendes Hormon
hMG	humanes menopausales Gonadotropin
HPG-Achse	Hypothalamisch-Hypophysär-Gonadalen-Achse (hypothalamic pituitary gonadal axis)
LTP	Langzeit-Potenzierung (engl. = Longterm Potentiation)
LH	Luteinisierendes Hormon..
MAP1B	Mikrotubulus Assoziiertes Protein 1B
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ncl. n.	Nucleus nervus: Kern eines Hirnnerven

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	Optische Dichte
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force)
rv	Rückwärtsstrang der DNA (reverse)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
u.	und
ver.	verändert
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7. Literaturverzeichnis

- Alcántara, S., M. Ruiz, G. D'Arcangelo, F. Ezan, L. de Lecea, T. Curran, C. Sotelo, E. Soriano (1998). "Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse." *J Neurosci* **18**(19): 7779-99.
- Andersen, O. M., C. H. Yeung, H. Vorum, M. Wellner, T. K. Andreassen, B. Erdmann, E. C. Mueller, J. Herz, A. Otto, T. G. Cooper, T. E. Willnow (2003). "Essential role of the apolipoprotein E receptor-2 in sperm development." *J Biol Chem* **278**(26): 23989-95.
- Angevine, J. B., Jr. und R. L. Sidman (1961). "Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse." *Nature* **192**: 766-8.
- Balthazart, J., M. Baillien, G. F. Ball (2001). "Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity." *J Steroid Biochem Mol Biol* **79**(1-5): 261-77.
- Bamburg, J. R., O. P. Wiggan (2002). "ADF/cofilin and actin dynamics in disease." *Trends Cell Biol* **12**(12): 598-605.
- Beffert, U., E. J. Weeber, A. Durudas, S. Qiu, I. Masiulis, J. D. Sweatt, W. P. Li, G. Adelman, M. Frotscher, R. E. Hammer, J. Herz (2005). "Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2." *Neuron* **47**(4): 567-79.
- Behre, H. M., E. Nieschlag, P. C.-J., W. P., S. M. (2009). *Andrology, Kapitel 12*. Berlin, Springer.
- Bender, R. A., L. Zhou, W. Wilkars, L. Fester, J. S. Lanowski, D. Paysen, A. König, G. M. Rune (2010). "Roles of 17 $\beta$ -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus." *Cereb Cortex* **20**(12): 2985-95.
- Biamonte, F., G. Assenza, R. Marino, M. D'Amelio, R. Panteri, D. Caruso, S. Scurati, J. G. Yague, L. M. Garcia-Segura, R. Cesa, P. Strata, R. C. Melcangi, F. Keller (2009). "Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival." *Neurobiol Dis* **36**(1): 103-15.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Boon, W. C., J. D. Chow, E. R. Simpson (2010). "The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase." *Prog Brain Res* **181**: 209-32.
- Borrell, V., J. A. Del Rio, S. Alcántara, M. Derer, A. Martínez, G. D'Arcangelo, K. Nakajima, K. Mikoshiba, P. Derer, T. Curran, E. Soriano (1999). "Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections." *J Neurosci* **19**(4): 1345-58.
- Botella-Lopez, A., E. de Madaria, R. Jover, R. Bataller, P. Sancho-Bru, A. Candela, A. Compan, M. Perez-Mateo, S. Martínez, J. Saez-Valero (2008). "Reelin is overexpressed in the liver and plasma of bile duct ligated rats and its levels and glycosylation are altered in plasma of humans with cirrhosis." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(4): 766-75.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Bulun, S. E., S. Sebastian, K. Takayama, T. Suzuki, H. Sasano, M. Shozu (2003). "The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters." *J Steroid Biochem Mol Biol* **86**(3-5): 219-24.
- Cariboni, A., S. Rakic, A. Liapi, R. Maggi, A. Goffinet, J. G. Parnavelas (2005). "Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons." *Development* **132**(21): 4709-18.

- Carreau, S., S. Wolczynski, I. Galeraud-Denis (2010). "Aromatase, oestrogens and human male reproduction." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1546): 1571-9.
- Catalano, S., I. Barone, C. Giordano, P. Rizza, H. Qi, G. Gu, R. Malivindi, D. Bonofiglio, S. Ando (2009). "Rapid estradiol/ERalpha signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **23**(10): 1634-45.
- Caviness, V. S., Jr., P. Rakic (1978). "Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice." *Annu Rev Neurosci* **1**: 297-326.
- Chai, X., E. Forster, S. Zhao, H. H. Bock, M. Frotscher (2009). "Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3." *J Neurosci* **29**(1): 288-99.
- D'Arcangelo, G., G. G. Miao, S. C. Chen, H. D. Soares, J. I. Morgan, T. Curran (1995). "A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler." *Nature* **374**(6524): 719-23.
- Drenth, H. J., C. A. Bouwman, W. Seinen, M. Van den Berg (1998). "Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3." *Toxicol Appl Pharmacol* **148**(1): 50-5.
- Erickson, G. F. (1983). "Primary cultures of ovarian cells in serum-free medium as models of hormone-dependent differentiation." *Mol Cell Endocrinol* **29**(1): 21-49.
- Eriksson, S. H., M. Thom, J. Heffernan, W. R. Lin, B. N. Harding, M. V. Squier, S. M. Sisodiya (2001). "Persistent reelin-expressing Cajal-Retzius cells in polymicrogyria." *Brain* **124**(Pt 7): 1350-61.
- Falconer, D. S. (1951). "Two new mutations, trembler and reeler with neurological action in the mouse." *J Genet* **50**: 192-201.
- Fayad, T., R. Lefebvre, J. Nimpf, D. W. Silversides, J. G. Lussier (2007). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (LRP8) is upregulated in granulosa cells of bovine dominant follicle: molecular characterization and spatiotemporal expression studies." *Biol Reprod* **76**(3): 466-75.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7413-7.
- Fester, L., V. Ribeiro-Gouveia, J. Prange-Kiel, C. von Schassen, M. Bottner, H. Jarry, G. M. Rune (2006). "Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis." *J Neurochem* **97**(4): 1136-44.
- Fester, L., L. Zhou, A. Butow, C. Huber, R. von Lossow, J. Prange-Kiel, H. Jarry, G. M. Rune (2009). "Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus." *Hippocampus* **19**(8): 692-705.
- Förster, E., H. H. Bock, J. Herz, X. Chai, M. Frotscher, S. Zhao (2010). "Emerging topics in Reelin function." *Eur J Neurosci* **31**(9): 1511-8.
- Förster, E., S. Zhao, M. Frotscher (2006). "Laminating the hippocampus." *Nat Rev Neurosci* **7**(4): 259-67.
- Frotscher, M. (1998). "Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers." *Curr Opin Neurobiol* **8**(5): 570-5.
- Garcia-Segura, L. M., I. Azcoitia, L. L. DonCarlos (2001). "Neuroprotection by estradiol." *Prog Neurobiol* **63**(1): 29-60.
- Goffinet, A. M. (1984). "Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice." *Brain Res* **319**(3): 261-96.
- Gonzalez-Billault, C., J. A. Del Rio, J. M. Urena, E. M. Jimenez-Mateos, M. J. Barallobre, M. Pascual, L. Pujadas, S. Simo, A. L. Torre, R. Gavin, F. Wandosell, E. Soriano, J. Avila (2005). "A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration." *Cereb Cortex* **15**(8): 1134-45.

- Gould, E., C. S. Woolley, M. Frankfurt, B. S. McEwen (1990). "Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood." *J Neurosci* **10**(4): 1286-91.
- Guidotti, A., J. Auta, J. M. Davis, V. Di-Giorgi-Gerevini, Y. Dwivedi, D. R. Grayson, F. Impagnatiello, G. Pandey, C. Pesold, R. Sharma, D. Uzunov, E. Costa (2000). "Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study." *Arch Gen Psychiatry* **57**(11): 1061-9.
- Haas, C. A., O. Dudeck, M. Kirsch, C. Huszka, G. Kann, S. Pollak, J. Zentner, M. Frotscher (2002). "Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy." *J Neurosci* **22**(14): 5797-802.
- Hack, I., S. Hellwig, D. Junghans, B. Brunne, H. H. Bock, S. Zhao, M. Frotscher (2007). "Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons." *Development* **134**(21): 3883-91.
- Hamburgh, M. (1960). "Observations on the Neuropathology of 'Reeler', a Neurological Mutation in Mice." *Cellular and Molecular Life Sciences* **16**, Number 10: 460-461.
- Harada, N., T. Utsumi, Y. Takagi (1993). "Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11312-6.
- Hartfuss, E., E. Forster, H. H. Bock, M. A. Hack, P. Leprince, J. M. Luque, J. Herz, M. Frotscher, M. Gotz (2003). "Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation." *Development* **130**(19): 4597-609.
- Hashimoto-Torii, K., M. Torii, M. R. Sarkisian, C. M. Bartley, J. Shen, F. Radtke, T. Gridley, N. Sestan, P. Rakic (2008). "Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex." *Neuron* **60**(2): 273-84.
- Herz, J. und Y. Chen (2006). "Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* **7**(11): 850-9.
- Hiesberger, T., M. Trommsdorff, B. W. Howell, A. Goffinet, M. C. Mumby, J. A. Cooper, J. Herz (1999). "Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation." *Neuron* **24**(2): 481-9.
- Hillier, S. G., P. F. Whitelaw, C. D. Smyth (1994). "Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited." *Mol Cell Endocrinol* **100**(1-2): 51-4.
- Hojo, Y., T. A. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H. T. Ishii, H. Mukai, J. H. Morrison, W. G. Janssen, S. Kominami, N. Harada, T. Kimoto, S. Kawato (2004). "Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(3): 865-70.
- Honda, S., N. Harada, Y. Takagi (1994). "Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain." *Biochem Biophys Res Commun* **198**(3): 1153-60.
- Hong, S. E., Y. Y. Shugart, D. T. Huang, S. A. Shahwan, P. E. Grant, J. O. Hourihane, N. D. Martin, C. A. Walsh (2000). "Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations." *Nat Genet* **26**(1): 93-6.
- Howell, B. W., T. M. Herrick, J. A. Cooper (1999). "Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning." *Genes Dev* **13**(6): 643-8.
- Ikeda, Y. und T. Terashima (1997). "Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse." *Dev Dyn* **210**(2): 157-72.



- Klinge, C. M. (2001). "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements." *Nucleic Acids Res* **29**(14): 2905-19.
- Klinke, R., H.-C Pape, S. Silbernagl, (2005). *Physiologie*. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Krekels, M. D., W. Wouters, R. De Coster, R. Van Ginckel, A. Leonaers, P. A. Janssen (1991). "Aromatase in the human choriocarcinoma JEG-3: inhibition by R 76 713 in cultured cells and in tumors grown in nude mice." *J Steroid Biochem Mol Biol* **38**(4): 415-22.
- Kretz, O., L. Fester, U. Wehrenberg, L. Zhou, S. Brauckmann, S. Zhao, J. Prange-Kiel, T. Naumann, H. Jarry, M. Frotscher, G. M. Rune (2004). "Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis." *J Neurosci* **24**(26): 5913-21.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lambert de Rouvroit, C., V. de Bergeyck, C. Cortvrindt, I. Bar, Y. Eeckhout, A. M. Goffinet (1999). "Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase." *Exp Neurol* **156**(1): 214-7.
- Lephart, E. D. und E. R. Simpson (1991). "Assay of aromatase activity." *Methods Enzymol* **206**: 477-83.
- Lephart, E. D. (1996). "A review of brain aromatase cytochrome P450." *Brain Res Brain Res Rev* **22**(1): 1-26.
- Lugli, G., J. M. Krueger, J. M. Davis, A. M. Persico, F. Keller, N. R. Smalheiser (2003). "Methodological factors influencing measurement and processing of plasma reelin in humans." *BMC Biochem* **4**: 9.
- Mahendroo, M. S., C. R. Mendelson, E. R. Simpson (1993). "Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue." *J Biol Chem* **268**(26): 19463-70.
- Miller, T. W., I. Shin, N. Kagawa, D. B. Evans, M. R. Waterman, C. L. Arteaga (2008). "Aromatase is phosphorylated in situ at serine-118." *J Steroid Biochem Mol Biol* **112**(1-3): 95-101.
- Myers, W. A. (1970). "Some observations on "reeler", a neuromuscular mutation in mice." *Behav Genet* **1**(3): 225-34.
- Naftolin, F., K. J. Ryan, Z. Petro (1971). "Aromatization of androstenedione by the diencephalon." *J Clin Endocrinol Metab* **33**(2): 368-70.
- Nathan, B. P., A. G. Barsukova, F. Shen, M. McAsey, R. G. Struble (2004). "Estrogen facilitates neurite extension via apolipoprotein E in cultured adult mouse cortical neurons." *Endocrinology* **145**(7): 3065-73.
- Nishi, Y., T. Yanase, Y. Mu, K. Oba, I. Ichino, M. Saito, M. Nomura, C. Mukasa, T. Okabe, K. Goto, R. Takayanagi, Y. Kashimura, M. Haji, H. Nawata (2001). "Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor." *Endocrinology* **142**(1): 437-45.
- Niu, S., O. Yabut, G. D'Arcangelo (2008). "The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons." *J Neurosci* **28**(41): 10339-48.
- Perrone, G., B. Vincenzi, M. Zagami, D. Santini, R. Panteri, G. Flammia, A. Verzi, D. Lepanto, S. Morini, A. Russo, V. Bazan, R. M. Tomasino, V. Morello, G. Tonini, C. Rabitti (2007). "Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade." *Mod Pathol* **20**(3): 344-51.
- Prange-Kiel, J., U. Wehrenberg, H. Jarry, G. M. Rune (2003). "Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons." *Hippocampus* **13**(2): 226-34.
- Prange-Kiel, J., L. Fester, L. Zhou, H. Lauke, J. Carretero, G. M. Rune (2006). "Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons." *Hippocampus* **16**(5): 464-71.

- Rassow, J., K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann (2006). *Biochemie*. 1. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Retzius, G. (1893). "Die Cajal'schen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren." *Biologische Untersuchungen Neue Folge* **5**: 1-8.
- Rice, D. S., S. Nusinowitz, A. M. Azimi, A. Martinez, E. Soriano, T. Curran (2001). "The reelin pathway modulates the structure and function of retinal synaptic circuitry." *Neuron* **31**(6): 929-41.
- Rizzo, P., H. Miao, G. D'Souza, C. Osipo, L. L. Song, J. Yun, H. Zhao, J. Mascarenhas, D. Wyatt, G. Antico, L. Hao, K. Yao, P. Rajan, C. Hicks, K. Siziopikou, S. Selvaggi, A. Bashir, D. Bhandari, A. Marchese, U. Lendahl, J. Z. Qin, D. A. Tonetti, K. Albain, B. J. Nickoloff, L. Miele (2008). "Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches." *Cancer Res* **68**(13): 5226-35.
- Roselli, C. F. (2007). "Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection." *J Steroid Biochem Mol Biol* **106**(1-5): 143-50.
- Schmitz, S. (2009). *Der Experimentator Zellkultur*. Heidelberg, Spektrum akademischer Verlag.
- Schwanzel-Fukuda, M., D. Bick, D. W. Pfaff (1989). "Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome." *Brain Res Mol Brain Res* **6**(4): 311-26.
- Sibbe, M., E. Forster, O. Basak, V. Taylor, M. Frotscher (2009). "Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus." *J Neurosci* **29**(26): 8578-85.
- Simó, S., L. Pujadas, M. F. Segura, A. La Torre, J. A. Del Rio, J. M. Urena, J. X. Comella, E. Soriano (2007). "Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation." *Cereb Cortex* **17**(2): 294-303.
- Simpson, E. R. (2004). "Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression." *Semin Reprod Med* **22**(1): 11-23.
- Smalheiser, N. R., E. Costa, A. Guidotti, F. Impagnatiello, J. Auta, P. Lacor, V. Kriho, G. D. Pappas (2000). "Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1281-6.
- Smith, C. C., L. L. 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." *J Neurosci* **25**(34): 7780-91.
- Tissir, F. and A. M. Goffinet (2003). "Reelin and brain development." *Nat Rev Neurosci* **4**(6): 496-505.
- Toran-Allerand, C. D., X. Guan, N. J. MacLusky, T. L. Horvath, S. Diano, M. Singh, E. S. Connolly, Jr., I. S. Nethrapalli, A. A. Tinnikov (2002). "ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury." *J Neurosci* **22**(19): 8391-401.
- Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R. E. Hammer, J. A. Richardson, J. Herz (1999). "Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2." *Cell* **97**(6): 689-701.
- von Schassen, C., L. Fester, J. Prange-Kiel, C. Lohse, C. Huber, M. Bottner, G. M. Rune (2006). "Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth." *J Neuroendocrinol* **18**(11): 847-56.
- Warren, S. G., A. G. Humphreys, J. M. Juraska, W. T. Greenough (1995). "LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats." *Brain Res* **703**(1-2): 26-30.

- Weeber, E. J., U. Beffert, C. Jones, J. M. Christian, E. Forster, J. D. Sweatt, J. Herz (2002). "Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning." *J Biol Chem* **277**(42): 39944-52.
- Wehrenberg, U., J. Prange-Kiel, G. M. Rune (2001). "Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase." *J Neurochem* **76**(6): 1879-86.
- Woodruff, T. K., J. Battaglia, A. Bowdidge, T. A. Molskness, R. L. Stouffer, N. A. Cataldo, L. C. Giudice, J. Orly, J. P. Mather (1993). "Comparison of functional response of rat, macaque, and human ovarian cells in hormonally defined medium." *Biol Reprod* **48**(1): 68-76.
- Woolley, C. S., E. Gould, M. Frankfurt, B. S. McEwen (1990). "Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons." *J Neurosci* **10**(12): 4035-9.
- Yalow, R. S., S. A. Berson (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man." *J Clin Invest* **39**: 1157-75.
- Yoon, K., N. Gaiano (2005). "Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants." *Nat Neurosci* **8**(6): 709-15.
- Yuen, G. S., B. S. McEwen, K. T. Akama (2011). "LIM kinase mediates estrogen action on the actin depolymerization factor Cofilin." *Brain Res* **1379**: 44-52.

## 8. Danksagung

Ich möchte Frau Prof. Rune für die Möglichkeit und für das entgegengebrachte Vertrauen danken, dieses spannende Thema in ihrem Institut bearbeitet haben zu dürfen.

Der gesamten Arbeitsgruppe bin ich unheimlich dankbar für die herzliche Aufnahme und dauerhafte Unterstützung. Die positive Arbeitsstimmung und der nette Umgang miteinander, brisanter Phasen wie bevorstehender Veröffentlichungen oder des Präparierkurses zum Trotz, haben mich nachhaltig beeindruckt. Von allen Seiten konnte ich mich stets auf Ratschläge und Einschätzungen verlassen. Danke.

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Pröls und Frau Schröder-Birkner danken.

Es war eine wunderbare Erfahrung mit Frau Prof. Pröls zusammenarbeiten zu dürfen.

Jederzeit konnte ich mich auf ihre Anregungen verlassen. In ihrer ruhigen Art wusste sie es, mich in verschiedensten Phasen aufzubauen, anzuspornen, oder auch in überhohen Erwartungen zu bremsen, je nachdem, was gerade notwendig war. So konnte das gesamte Projekt kontinuierlich voranschreiten. An ihrem scheinbar unendlichen Wissen hat sie mich gerne teilhaben lassen. Ihre Begeisterung für die Forschung war mitreißend. In der Schreibphase konnten ihre präzisen Anmerkungen so manche Blockade lösen. Vielen Dank! Frau Schröder-Birkner möchte ich für ihre Geduld bei der Einarbeitung in die Vielzahl der Methoden danken. Ihre fröhliche Art und Aufmunterungen haben mir sehr geholfen, auch Rückschläge gut wegstecken zu können.

Frau Herbort danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur.

Bei Frau Haman möchte ich mich für die Möglichkeit der Nutzung ihrer HEK-Zellen danken.

Herrn Dr. Zhou danke ich für die Präparation der Maus- und Rattenorgane.

Frau Dr. Brandt und Frau Wilkars danke ich neben den vielen konstruktiven wissenschaftlichen Ratschlägen auch für ihre Einschätzungen zum Alltag in der Forschung, und zu Frustrationen durch ausgebliebene Ergebnisse. Gespräche mit ihnen lehrten mich geduldiger zu werden.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, um deren Unterstützung ich in jeder Lebenslage weiß.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: .....