

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Neuroanatomie

Direktorin: Prof. Gabriele Rune

Untersuchungen zum Einfluss von Neurosteroiden auf eine CREB-vermittelte Alteration der Reelin-Expression und -Sekretion in Cajal-Retzius-Zellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Anna-Gila Karbe
aus Hamburg

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.12.2019**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Eckart Förster

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ileana Hanganu-Opatz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Cajal-Retzius Zellen und Reelin	5
1.2 Die Reeler-Mutante	6
1.3 Die normale Gehirnentwicklung und Störungen in der Reeler-Mutante.....	7
1.4 Weitere Rollen des Reelin	9
1.5 Die Reelin-Signalkaskade	10
1.6 Die Rolle von Neurosteroiden im ZNS und Verbindungen zum Reelin	12
1.7 Der Wachstumsfaktor Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF).....	14
1.8 Der Transkriptionsfaktor Cyclic-AMP Response Element Binding Protein (CREB) und eine mögliche Verbindung zum Reelin	16
1.9 Endgültige Fragestellung	18

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Weitere Materialien	20
2.1.3 Software	21
2.1.4 Chemikalien	22
2.1.5 Protokolle Lösungen	25

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Hirnlysaten	28
2.2.2 Genotypisierung	28
2.2.3 Herstellung hippokampaler Slice Kulturen	29
2.2.4 Stimulationsexperimente	30
2.2.5 Proteinkonzentrierung von Überständen der Slice-Kulturen	31
2.2.6 Immunhistochemie an Slice-Kultur-Schnitten	31
2.2.7 Western Blotting	32
2.2.7.1 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	32
2.2.7.2 Western Blot Verfahren	33
2.2.8 Datenauswertung	34
2.2.9 Statistische Datenanalyse	35

3. Ergebnisse

3.1 Western-Blot-Untersuchungen zur Reelin-Sekretion aus hippocampalen Slice-Kulturen	38
3.2 Vergleichende Analysen der Dab1-Phosphorylierung in hippocampalen Slice-Kulturen	43
3.3 Vergleiche zur CREB-Phosphorylierung im Hippokampus der Reeler-Maus	47
3.4 Auswirkungen auf die CREB- und Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen hippocampaler Slice-Kulturen visualisiert mit immunhistochemischen Verfahren	51
3.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur pCREB-Expression in Cajal-Retzius-Zellen	53
3.4.2 Immunhistochemische Untersuchungen zur Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen	59
3.4.3 Korrelationen zwischen pCREB und Reelin	63
3.5 Untersuchungen zur pCREB-Expression in Reelin-positiven Interneuronen	65

4. Diskussion

4.1 pCREB-Expressivität im Reelin-defizienten Reeler verglichen mit dem Wildtypen	69
4.2 Einflüsse von Östradiol, GnRH und BDNF auf die Reelin-Sezernierung aus Cajal-Retzius-Zellen von Wildtyp Ratten im Alter P5	71
4.3 pCREB-Expression in Reelin-positiven Interneuronen	79

5. Zusammenfassung und Ausblicke

81

6. Abkürzungsverzeichnis

84

7. Literaturverzeichnis

86

8. Danksagung

97

9. Lebenslauf

98

10. Eidesstattliche Erklärung

99

1. Einleitung

1.1 Cajal-Retzius-Zellen und Reelin

Ramon y Cajal beschrieb 1890 in der äußersten Rindenschicht am Kaninchenhirn, der zellarmen Schicht I, eine durch Golgi-Imprägnation dargestellte Untergruppe von Pionierneuronen typischer Morphologie, wobei er in seinen weiteren Untersuchungen große horizontal orientierte Neurone und Neurone mit einem kurzen Axon unterschied (Cajal, 1897).

Gustaf Retzius bestätigte 1891 das Vorhandensein ähnlicher Zellen in der äußersten Kortexschicht am Kaninchen und beschrieb in seinen „Biologische(n) Untersuchungen“ die gleiche Neuronengruppe auch in Gewebe humaner Feten. An Gehirnen Neugeborener sowie Erwachsener gelang ihm jedoch keine Darstellung der zuvor beschriebenen Zellen (Retzius 1893). Retzius fasste die von Cajal in der Layer I beschriebenen Zellen als eine Gruppe von Neuronen zusammen und nannte sie Cajal'sche Zellen. In Abbildung 1 dargestellt sind erste Zeichnungen von Cajal-Retzius-Zellen aus den Arbeiten von Ramon y Cajal und Gustaf Retzius.

Was schon damals auffiel war, dass diese Zellen bereits postnatal untergingen, womit eine Rolle speziell in der Gehirnentwicklung anzunehmen war. Cajal-Retzius-Zellen (CR-Zellen) sezernieren ein Glykoprotein, genannt Reelin, in den Extrazellulärraum (D'Arcangelo et al., 1997). Die Bedeutung von Reelin wurde erst viel später mit der Entdeckung der Reeler-Mutante deutlich.

LAYER I OF HUMAN CEREBRAL CORTEX

93

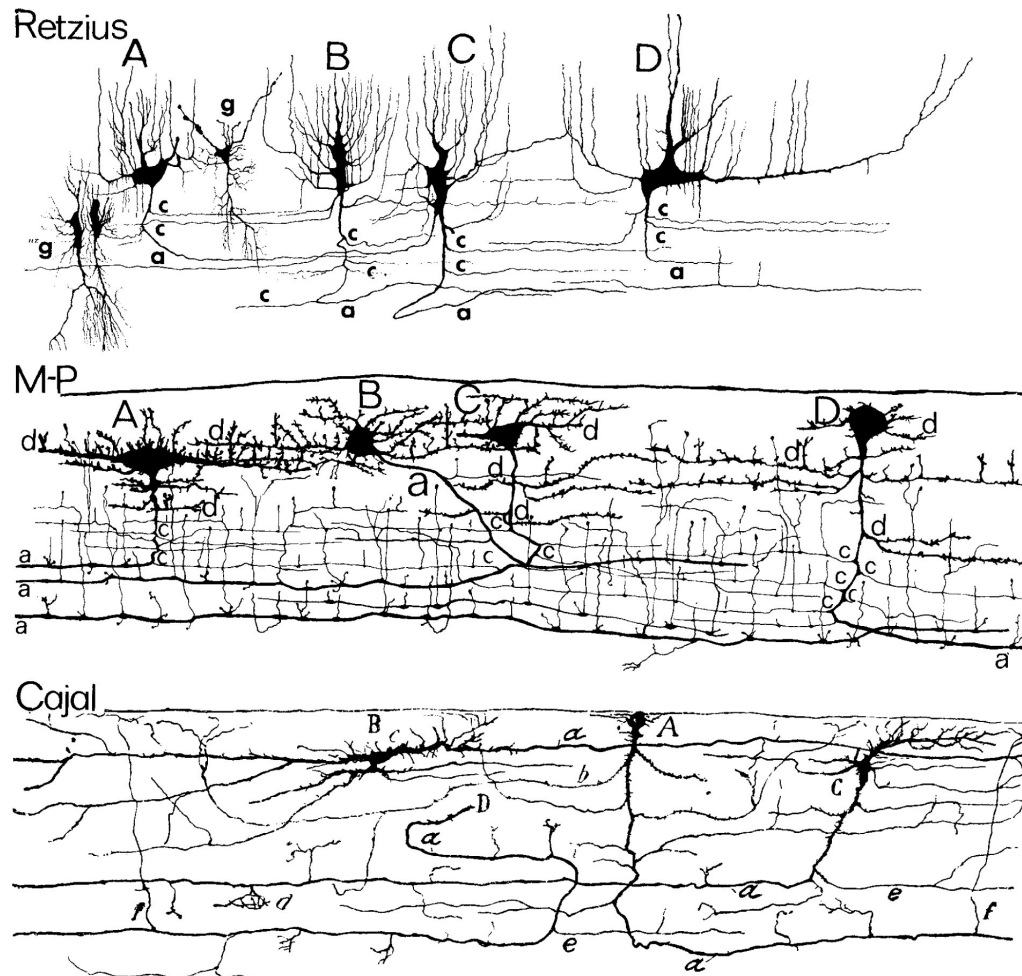


Fig. 2. Original drawings of Cajal-Retzius cells from the motor cortex of a 26-week-old fetus (Retzius, 1894), a newborn (Marín-Padilla and Marín-Padilla, '82) and a 2-month-old infant (Cajal, '11) illustrating their overall structure and varied morphology from a sagittal perspective of layer I. Pyriform or triangular (Retzius A,B,C; M-P C,D; Cajal A), horizontal monopolar or bipolar (Retzius D; M-P A; Cajal B), and stellate-like (M-P B) cell types have been most frequently described

from this perspective. Regardless of morphologic type all neurons are characterized by a descending axonic process that gives off proximal dendritic (M-P d; Cajal b) and middle axonic collaterals (Retzius c; M-P c; Cajal e), and becomes a long tangential fiber within the lower region of layer I (Retzius a; M-P a; Cajal a). The lettering on the drawings, excepting those of Cajal's, is mine.

Abbildung 1:

Zeichnungen von Cajal-Retzius-Zellen des cerebralen Kortex (Layer I) durch Retzius (oben), Marín-Padilla (mitte) und Cajal (unten).

Aus Marín-Padilla, 1990.

1.2 Die Reeler-Mutante

Falconer beschrieb 1951 erstmals eine Maus-Mutante mit charakteristischerweise motorischen Koordinationsstörungen, Ataxie und Tremor (Falconer, 1951). Aufgrund dieses Phänotyps kam es zu der Bezeichnung „Reeler“-Mutante. Jahrzehnte später konnte das veränderte RELN-Gen als ursächliche Grundlage im Reeler identifiziert

werden mit immunhistochemischem Nachweis einer gestörten Kortex-Laminierung im Vergleich zum Wildtypen (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995). Weitere typische Veränderungen speziell im Hippokampus (Caviness & Sidman, 1973), Cerebellum (Mikoshiba et al. 1980) und Bulbus olfactorius (Wyss et al., 1980) unterstreichen die scheinbar essentielle Bedeutung des Reelin für eine normale Gehirnentwicklung.

Im Menschen führt eine Reelin-Defizienz zur Lissenzephalie mit cerebellärer Hypoplasie, einer schweren Erkrankung mit gravierender geistiger Behinderung und Verzögerungen der Psychomotorik (Chang et al., 2007; Hong et al., 2000)

1.3 Die normale Gehirnentwicklung und Störungen in der Reeler-Mutante

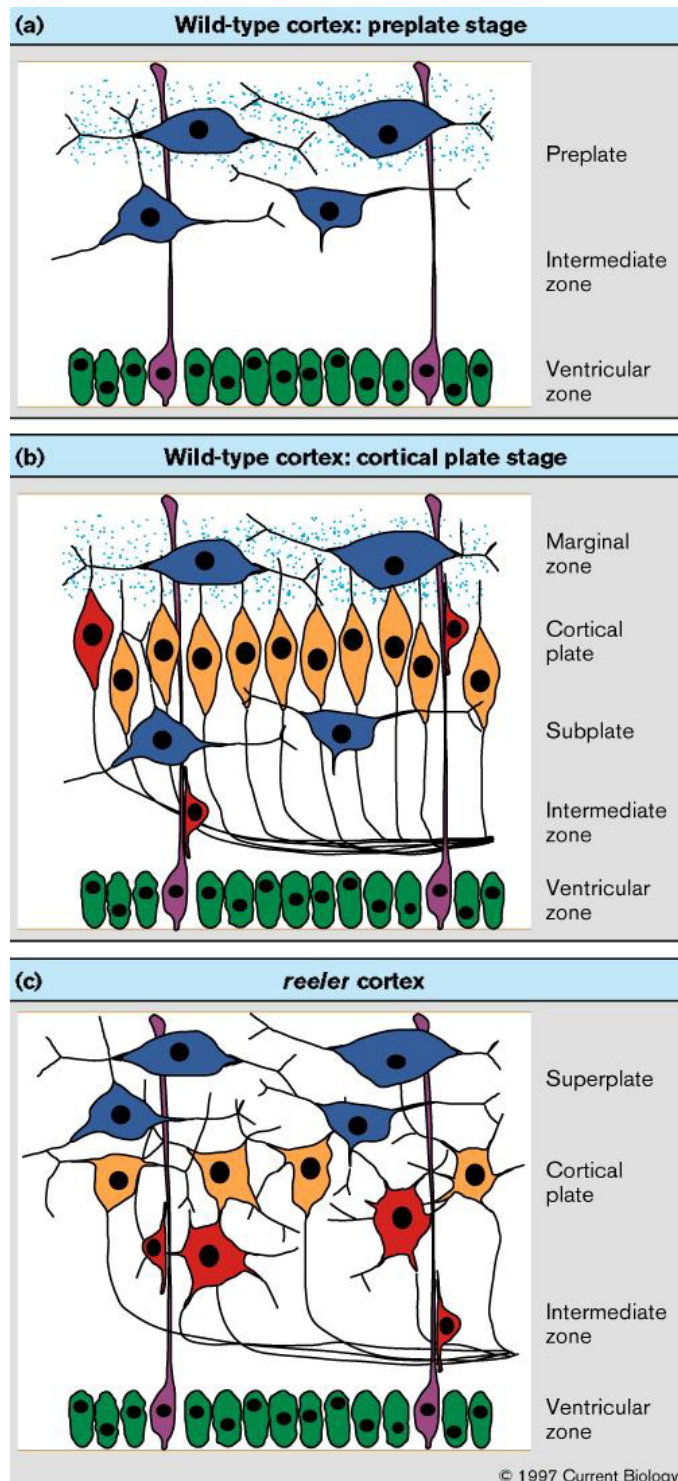
Die Entwicklung des Gehirns von Säugetieren folgt einem bestimmten Ablauf. Wichtig für die Neuronenmigration und typische Schichtung des cerebralen Kortex ist unter anderem das Glykoprotein Reelin (Förster et al., 2006; Frotscher, 1998; Rice & Curran, 2001; Soriano et al., 1994; Tissir & Goffinet, 2003).

Reelin wird während der kortikalen Entwicklung größtenteils von den zuvor bereits beschriebenen Cajal-Retzius Zellen in der Marginalzone des sich entwickelnden Kortex sezerniert, wobei diese beginnend etwa ab dem postnatalen Tag 5 (P5) untergehen (Alcántara et al., 1998; D'Arcangelo et al., 1995, 1997) und im adulten Säugerhirn eine weitere Reelin-Expression vorwiegend in GABAergen Interneuronen im cerebralen Kortex und Hippokampus sowie glutamatergen Körnerzellen im Kleinhirn stattfindet (Alcántara et al., 1998; Pesold et al., 1998; Ramos-Moreno, Galazo, Porrero, Martínez-Cerdeño, & Clascá, 2006). In der Literatur wird ein im Vergleich zum Neokortex verzögerter Verlust Reelin-exprimierender CR-Zellen im Hippokampus beschrieben (Anstötz et al., 2016).

Anhand elektronenmikroskopischer und Golgi-Imprägnations-Studien sowie sogenannter autoradiographischer Untersuchungen erfolgten in der Vergangenheit Untersuchungen, auf denen unser heutiges Verständnis der Gehirnentwicklung und typischen Kortexplaminierung baut (Angevine & Sidman, 1961; Caviness, 1982; Gilmore & Herrup, 1997; Rakic, 1972). Bei autoradiographischen Untersuchungen erfolgen serielle Injektionen von radioaktiv markiertem Thymidin, welches sich in der DNA von sich teilenden Zellen anreichert, dies ermöglicht eine zeitliche und örtliche

Beobachtung von migrierenden Neuronen in der Kortex-Entwicklung. Die Schichtenbildung des zerebralen Kortex beginnt um den Embryonaltag 10 bis 12 (E10-E12) mit dem Auftreten der Cajal-Retzius-Zellen in der sogenannten Preplate neben der pialen Oberfläche (Caviness, 1982). Aus der Ventrikularzone generierte Neurone migrieren von hier ausgehend radial Richtung pial in die Preplate und spalten diese hierdurch in die oberflächlich gelegene Marginalzone, in der sich nun die Cajal-Retzius-Zellen befinden, und die tiefer gelegene Subplate. In der Folge migrieren später generierte Neurone entlang radial ausgerichteter Gliafasern nach (Rakic, 1972), die an den älteren Neuronen vorbeiziehen und sich unterhalb der Marginalzone ansiedeln. Hierdurch entsteht typischerweise eine inside-out-Schichtung mit insgesamt sechs Kortexschichten (Angevine & Sidman, 1961; Frotscher, 1998; Gilmore & Herrup, 1997), die jedoch in der Reeler-Mutante gestört ist. In der Reeler-Mutante fehlt die Subplate und die Neurone der Subplate befinden sich stattdessen nahe der pialen Oberfläche. Migrierende Neurone gelangen nicht in die Preplate, diese wird folglich nicht in Marginalzone und Subplate gespalten. Im Reeler sammeln sich Neurone in der sogenannten „Superplate“. Abbildung 2 zeigt die regelrechte Kortexformation in der Wildtyp-Maus verglichen mit der migrationsbedingt gestörten Entwicklung in der Reeler-Mutante.

Die regelrechte Formation im Hippokampus stellt sich ähnlich dem cerebralen Kortex dar. Pyramidalzellen aus einer proliferativen Zone nahe dem Ventrikel migrieren entlang radialer Fasern und bilden die Pyramidalzellschicht in einem inside-out-Schema. Neuroepitheliale Zellen aus der Ventrikularzone bilden Vorläufer der Körnerzellen, die nach Migration eine proliferative Zone unterhalb der Pyramidalzellschicht bilden. Aus diesen Vorläuferzellen postmitotisch entstandene Körnerzellen migrieren radial und bilden den Gyrus dentatus in einer out-side-in-Schichtung (Förster et al., 2006). Am Embryonaltag 18.5 (E18.5) ist die Hippokampus-Schichtung abgeschlossen und Cajal-Retzius-Zellen finden sich in der Marginalzone.

**Abbildung 2:**

Schematische Darstellung der Kortexentwicklung im Wildtypen sowie die gestörte Entwicklung in der Reeler-Mutante.

- (A) Darstellung der Kortex-Entwicklung zum Zeitpunkt der Preplate-Bildung. Preplate Neurone sind in dunkelblau dargestellt, undifferenzierte Zellen aus der Ventrikulärzone in grün, radiale Gliazellen in lila und aus Cajal-Retzius-Zellen sezerniertes Reelin in hellblau.
- (B) Spaltung der Preplate in die Subplate und Marginalzone durch die sich entwickelnde kortikale Platte in der Wildtyp-Maus. In orange Neurone der späteren Layer VI, in rot Neurone der späteren Layer V.
- (C) In der Reeler-Mutante findet keine Spaltung der Preplate in die 2 Schichten statt. Neurone, die normalerweise die Layer V bilden sollten (rot) migrieren nicht an Neuronen der Layer VI (gelb) vorbei.

Aus Gilmore & Herrup, 1997

1.4 Weitere Rollen des Reelin

Neben einer Kontrolle der Neuronenmigration und der korrekten Neuronenpositionierung pränatal während der Kortexschichtung scheint Reelin auch

im adulten Gehirn eine Rolle zu spielen. In vivo intrahippokampale Applikationen des Anti-Reelin-Antikörpers CR50, der nachgewiesenermaßen die Funktion des Reelins aufhebt (Ogawa et al., 1995), führten zu einer Verbreiterung der Körnerzellschicht ähnlich der bei der mesialen Temporallappenepilepsie auftretenden Granularzelldispersion (GCD) (Heinrich, 2006). Somit scheint Reelin auch für die Aufrechterhaltung der Laminierung im ausgereiften adulten Gehirn von Bedeutung zu sein.

Des Weiteren wird Reelin eine Rolle für die synaptische Plastizität und Lernen und Gedächtnis im Gehirn adulter Mäuse zugeschrieben (Hethorn et al., 2015; Niu, Yabut, & D’Arcangelo, 2008; Rogers et al., 2011; Weeber et al., 2002).

Verschiedene Studien implizieren einen Zusammenhang zwischen insuffizienter Reelin-Aktivität und diversen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Autismus (Fatemi et al., 2005), Schizophrenie, der mesialen Temporallappenepilepsie (Duveau, Madhusudan, Caleo, Knuesel, & Fritschy, 2011; Heinrich, 2006) und der Alzheimer’schen Erkrankung (Kocherhans et al., 2010; Yu et al., 2014). Deshalb ist die Erlangung eines tieferen Verständnisses der Regulationsmechanismen der Reelin-Sekretion auch in Hinsicht auf eventuelle therapeutische Ansätze sinnvoll.

1.5 Die Reelin-Signalkaskade

Das mit einem ungefähren Molekulargewicht von 388 kDa große Glykoprotein Reelin besteht aus einer N-terminalen Region, der Zentralregion, sowie der C-terminalen Region. Die N-terminale Region spielt vor Allem eine Rolle für die Oligomer-Bildung (Utsunomiya-Tate et al., 2000), die C-terminale Region ermöglicht die Sekretion in den Extrazellulärraum (D’Arcangelo et al., 1997). Eine schematische Darstellung des Reelin-Signalweges ist in Abbildung 3 zu sehen. Reelin wird nach Sekretion durch eine bisher unbekannte Metalloprotease an 2 Stellen gespalten, sodass drei Fragmente unterschiedlicher Größe resultieren (Lambert de Rouvroit et al., 1999). Diese Prozessierung scheint von relevanter Bedeutung zu sein, denn eine Behandlung mit Metalloprotease-Inhibitoren führte in embryonalen Schnittkulturen zu Migrationsstörungen (Jossin et al., 2007). Verantwortlich für die Rezeptorbindung und folglich Signalvermittlung sind nach in vitro-Untersuchungen das komplette Reelin-Protein sowie das zentrale Reelin-Fragment (Jossin, 2004). Reelin bindet an

die membranständigen Rezeptoren Apolipoprotein-E Rezeptor Typ 2 (ApoER2) und Very-low density lipoprotein Rezeptor VLDLR (Hiesberger et al., 1999; Trommsdorff et al., 1999). Disabled 1 (Dab1), ein intrazelluläres Adapterprotein, interagiert in der Folge mit dem zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren (Howell, Herrick, Hildebrand, Zhang, & Cooper, 2000; Howell, Herrick, & Cooper, 1999) sowie den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Fyn und Src aus der Src-Kinase-Familie (Arnaud et al., 2003; Bock & Herz, 2003; Howell et al., 1997). Es wird angenommen, dass Reelin als Homodimer bzw. Oligomer sekretiert wird und Ligandenbindung zu einem Clustering von ApoER2 und VLDLR führt, welches letztendlich eine Dab1-Dimerisierung bzw. Oligomerisierung und Phosphorylierung von Dab1 ermöglicht (Strasser et al., 2004). mDab1, das Maus-Homolog zum zuvor in Drosophila beschriebenen Disabled, wurde über ein Yeast-two-Hybrid-System als Interaktionspartner für Src identifiziert und findet sich weit verbreitet im ZNS sowie in hämatopoetischen Zellen (Howell, Hawkes, Soriano, & Cooper, 1997; Rice et al., 1998). Dab1 wird Reelin vermittelt phosphoryliert (Howell et al., 1999), in-vitro-Untersuchungen zu Folge geschieht dies an drei verschiedenen Tyrosin-Resten: Y198, Y220 und Y232 (Ballif et al., 2004; Keshvara et al., 2001). Dieser Schritt im Reelin-Signalweg ist essentiell, denn Mutationen in allen fünf potentiellen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen des Dab1 führten in vivo zu einem ähnlichen Phänotyp wie in der Reeler-Mutante oder Dab1-Knockout-Mäusen (Howell et al., 2000). Die weitere intrazelluläre Signalvermittlung verläuft über das phosphorylierte Dab1. Mutationen für Dab1 (Howell et al., 1997; Rice et al., 1998; Sheldon et al., 1997), VLDLR, ApoER2 (Drakew et al., 2002; Trommsdorff et al., 1999), Src- und Fyn (Kuo, Arnaud, Kronstad-O'Brien, & Cooper, 2005) führen jeweils zu Reeler-ähnlichen Mutanten.

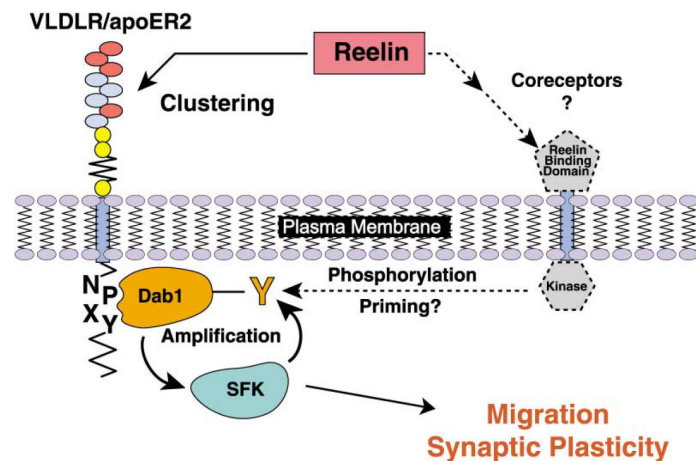


Abbildung 3:

Schematische Darstellung der Reelin-Signalkaskade

Oligomerisiertes Reelin bindet an die membranständigen Rezeptoren VLDLR und apoER2, hierüber vermittelt wird das zytosolische Dab1 über Kinasen der Src-Familie (SFK) intrazellulär phosphoryliert und weitere intrazelluläre Effekte auf Migration und synaptische Plastizität vermittelt.

Aus Bock und Herz 2003.

1.6 Die Rolle von Neurosteroiden im ZNS und Verbindungen zum Reelin

Für Östrogen ist seit Längerem eine Rolle im ZNS für die synaptische Plastizität, Langzeitpotenzierung und Neuroprotektion bekannt (Woolley, 2007). Vor über 25 Jahren konnte in ovariectomierten Ratten eine verminderte Dichte an dendritischen Spines in der CA1-Region des Hippokampus sowie ein Rescue-Effekt durch systemische Östrogen-Behandlung gezeigt werden (Gould, Woolley, Frankfurt, & McEwen, 1990). Weiter wurden Korrelationen zwischen Veränderungen der Östrogen-Spiegel während des weiblichen Ratten-Zyklus und der Synapsen-Dichte in dieser Region festgestellt (Woolley & McEwen, 1990).

Dabei konnte neben der gonadalen Östrogen-Produktion eine de-novo Synthese vor Ort, im Speziellen aus hippokampalen Neuronen, belegt werden (Prange-Kiel et al., 2003). Zugabe des Aromatase-Hemmstoffs Letrozol zu hippokampalen Dispersionskulturen sowie auch hippokampalen Slice-Kulturen zeigte in beiden Fällen dagegen eine signifikante Abnahme des synthetisierten Östrogens (Kretz, 2004; Prange-Kiel et al., 2003).

Östrogen-Effekte werden über zwei Rezeptoren, Estrogenrezeptor - α und - β (ER- α

und ER- β), vermittelt. Diese fungieren nach Translokation in den Nukleus als Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren mit Bindung an spezifische Estrogen Response Elements (EREs). Weiter wird auch eine nicht-genomische schnelle Signalvermittlung über membrangebundene Rezeptoren beschrieben. Es wird angenommen, dass dies über bisher wenig untersuchte weitere Rezeptoren, die mER, vermittelt wird (Klinge, 2001).

Eine Expression von ER- α und ER- β konnte in hippocampalem Gewebe gezeigt werden (González et al., 2007). Auch Cajal-Retzius-Zellen scheinen zumindest den ER- α zu exprimieren. Bender et al. zeigten neben der Rezeptor-Expression für Östrogen in Cajal-Retzius-Zellen eine vermehrte Reelin-Expression immunhistochemisch nach Behandlung hippocampaler Slice-Kulturen mit Östrogen (Bender et al., 2010). Somit ist ein stimulierender Effekt von Östrogen auf den Reelin-Signalweg anzunehmen. Wie dieser Effekt vermittelt wird, bleibt unklar.

Das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) ist ein entscheidender Faktor der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und wirkt hierüber regulierend auf die Steroidsynthese in den Gonaden. GnRH wird in Neuronen des Hypothalamus synthetisiert und typischerweise pulsatil in das Pfortadersystem des Hypophysenvorderlappens sezerniert. Hier wirkt GnRH stimulierend auf gonadotrope Zellen und es kommt zur Freisetzung von Follikel Stimulierendem Hormon (FSH) und Luteinisierendem Hormon (LH), die wiederum die gonadale Produktion von Sexualsteroiden regulieren (Conn & Crowley Jr., 1994). Neben diesem indirekten Weg konnten in ovariellen Gewebe Rezeptoren für GnRH und entsprechende direkte Effekte auf die Steroidogenese gezeigt werden (Janssens, Brus, Cahill, Huirne, Schoemaker, 2000).

Von Interesse für diese Arbeit war die Erkenntnis, dass GnRH scheinbar auch auf hippocampale Neurone Einfluss nimmt. Hippokampi adulter Ratten enthalten Rezeptoren, die für GnRH empfindlich sind. Die GnRH-Rezeptor-mRNA-Expression in Hippokampi ist in etwa 5-fach höher im Vergleich zum Neokortex, dies deutet auf eine besondere Responsivität des Hippokampus für GnRH hin (Prange-Kiel et al., 2008). Nach GnRH-Stimulierung hippocampaler Slice-Kulturen war eine dosisabhängige Beeinflussung der Östrogen-Synthese nachweisbar (Prange-Kiel et al., 2008). Simultane Letrozol-Behandlung führte dagegen zu einer Inhibierung der

Östrogen-Sekretion, sodass von einer Aromatase-abhängigen Wirkung ausgegangen werden kann und GnRH-vermittelte Effekte des Östrogens möglich wären.

GnRH-Neurone stammen ursprünglich aus der olfaktorischen Plakode und migrieren während der Embryonalentwicklung entlang Axonen des Nervus vomeronasalis ins Vorderhirn und siedeln sich in der hypothalamischen Region an (Wray, Grant, & Gainer, 1989). Eine gestörte Migration zeigt sich am Menschen beim sogenannten Kallmann-Syndrom, einer Kombination aus Anosmie und hypogonadotropem Hypogonadismus (Seminara et al., 1998). Gehirne embryonaler und adulter Reeler-Mutanten-Mäuse weisen eine deutlich erniedrigte Anzahl an GnRH-Neuronen auf (Cariboni et al., 2005). In-vitro-Untersuchungen mit Co-Kulturen von Reelin-sezernierendem Bulbus-Olfactorius-Gewebe und einer Zelllinie mit Charakteristika ähnlich den GnRH-Neuronen zeigten einen repulsiven Effekt des Reelin auf die Neuronenmigration (Cariboni et al., 2005). Eine Blockade der Reelin-Funktion in Slice-Kulturen von E18-Hirnschnitten durch Zugabe des CR50-Antikörpers führte zu einer Umleitung und Ansiedlung von GnRH-Neuronen vor allem im Kortex (Cariboni et al., 2005). Somit wird eine Reelin-Wirkung auf die Migration GnRH-sezernierender Neurone deutlich. Weitere Zusammenhänge zwischen Reelin und GnRH sind bis dato nicht bekannt, jedoch wäre ein möglicher GnRH-vermittelter Feed-back Mechanismus denkbar und hier weitere Untersuchungen diesbezüglich sehr interessant.

1.7 Der Wachstumsfaktor Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)

BDNF ist ein sekretorisches Protein, welches zur Familie der Neurotrophine gehört. Der Wachstumsfaktor findet sich weit verbreitet im zentralen Nervensystem mit besonders starker Expression im Hippokampus (Hofer et al., 1990).

Eine Vorstufe, das freigesetzte pro-BDNF (Mowla et al., 2001), wird anschließend proteolysiert in die aktive BDNF-Form und bindet mit hoher Affinität vor allem an die Tropomyosin-related Kinase Rezeptor-Kinase B (TrkB) voller Länge, wobei auch Signalvermittlungen über prozessierte TrkB beschrieben werden (Klein et al 1993). Durch Liganden-Bindung wird eine Dimerisation und Autophosphorylierung des Rezeptors intrazellulär induziert und es kommt zur Aktivierung intrazellulärer

Signalkaskaden. Hierzu gehören der Ras-MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase)-Weg, der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) -Akt-Weg und der PLC γ (Phospholipase C γ) -Ca²⁺-Weg (Kaplan & Miller, 2000).

BDNF spielt eine wichtige Rolle für Neuronen-Differenzierung und Überleben im peripheren und zentralen Nervensystem (Ghosh et al., 1994; Kirschenbaum & Goldman, 1995; Schwieger et al., 2015). Außerdem ist eine Beeinflussung von Langzeitpotenzierung im Hippocampus und somit Lernen und Gedächtnisbildung (Minichiello et al., 1999) sowie synaptische Plastizität (Silva, Kogan, & Frankland, 1998) bekannt. Des Weiteren wurden in transgenen Mäusen mit Defizienz des BDNF oder des Rezeptors für BDNF, TrkB, Migrationsdefekte im Cerebellum und Neokortex festgestellt (Borghesani et al., 2002; Gates et al., 2000; Medina et al., 2004) und eine chemotaktische TrkB-vermittelte Wirkung von BDNF auf migrierende cerebelläre Granularzell-Vorläufer gezeigt (Zhou et al., 2007). BDNF-Null-Mutationen sind nur für sehr kurze Zeit lebensfähig (Jones et al., 1994).

Im Exon des BDNF-Gens wurde ein ERE identifiziert (Sohrabji, Miranda, & Toran-Allerand, 1995), somit ist eine direkte Beeinflussung durch Östrogen naheliegend. Dementsprechend bestehen zyklusabhängige Alterationen der BDNF-mRNA- und Protein-Expression (Gibbs, 1998; Scharfman, Mercurio, Goodman, Wilson, 2003). Ovariectomierte Ratten zeigten deutlich verminderte Mengen an BDNF-mRNA- und -Protein im Hippokampus und Kortex, exogene Östrogen-Zufuhr erwirkte dagegen einen Rescue-Effekt auf mRNA- sowie Protein-Ebene (Berchtold et al., 2001; Singh et al., 1995; Sohrabji et al., 1995).

Zusammenhänge zum in der Entwicklung entscheidenden Reelin wurden in verschiedenen Untersuchungen vermutet. An Kortexgewebe von BDNF-Knockout-Mäusen konnte man zeigen, dass zwar zum frühesten Messzeitpunkt an P0 die Reelin-mRNA-Level im Vergleich zum Wildtypen nicht unterschiedlich waren, jedoch ein rasches Absinken der Reelin-mRNA-Level wie im Wildtypen beobachtet unter BDNF-Defizienz zunächst ausblieb (Ringstedt et al., 1998). BDNF-mRNA-Expression ist im Kortex von Wildtypen dabei pränatal nur marginal vorhanden und nimmt mit dem Alter zu mit starker BDNF-Expression zwei Wochen postnatal (Friedman et al., 1991). Weiter konnte eine TrkB-Expression in Cajal-Retzius-Zellen und BDNF-Responsivität gezeigt werden (Brunstrom et al., 1997; Marty et al., 1996; Ringstedt et

al., 1998) wie im Folgenden ausgeführt. Behandlungen kortikaler Dispersionskulturen mit BDNF zeigten immunhistochemisch sowie auf RNA-Ebene vermehrte CR-Zellen, die eine verminderte Reelin-Expression aufwiesen. E18 BDNF-überexprimierende transgene Mäuse zeigten eine geringe Reelin-mRNA-Expression im Kortex. Hierbei zeigten Vergleiche von BDNF- und Reelin-mRNA Levels mit Wildtypen eine negative Korrelation der beiden Parameter. Immunhistochemisch führte BDNF-Überexpression zu Invaginationen und Heterotopien im Kortex sowie gestörter Laminierung der kortikalen Platte (Ringstedt et al., 1998). In einem Mausmodell für Temporallappenepilepsie mittels Kainsäure-Injektionen in den Hippokampus konnte nach Injektion eine gestörte Reelin-Prozessierung und Freisetzung gezeigt werden bei gleichzeitigem Nachweis stark erhöhter TrkB-Immunreaktivität in den Cajal-Retzius-Zellen (Duveau et al., 2011). Somit ist eine BDNF-beeinflusste Alteration der Reelin-Prozessierung möglich.

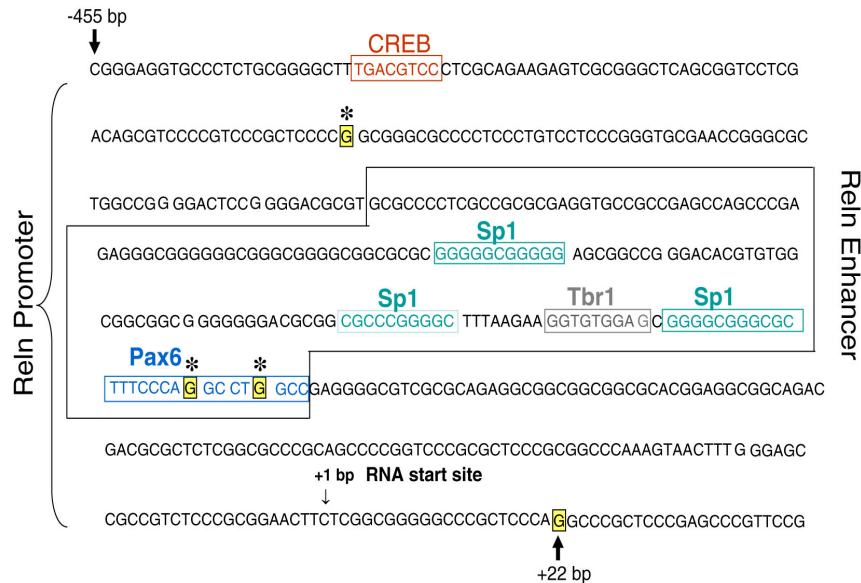
In Zusammenschau dieser Erkenntnisse könnte BDNF als negativer Regulator im Reelin-Signalweg fungieren. Weiter ist eine neurotrophe Wirkung des BDNF auf Cajal-Retzius-Zellen beschrieben mit verlängerter Persistenz von Cajal-Retzius-Zellen in BDNF-überexprimierenden transgenen Mäusen (Ringstedt et al., 1998) sowie unter BDNF-Behandlung hippokampaler Slice-Kulturen (Brunstrom et al., 1997; Marty et al., 1996).

1.8 Der Transkriptionsfaktor Cyclic-AMP Response Element Binding Protein (CREB) und eine mögliche Verbindung zum Reelin

Das cyclic-AMP (cAMP) Response Element Binding Protein, kurz CREB, ist ein viel untersuchter Transkriptionsfaktor. Die Aktivität von CREB wird durch Phosphorylierung reguliert, unter Anderem als Antwort auf den second messenger cAMP. cAMP setzt die katalytische Untereinheit der zytoplasmatischen Proteinkinase A (PKA) frei, die daraufhin passiv in den Nukleus diffundiert und CREB typischerweise am Serin Rest 133 phosphoryliert und hierdurch auf die Genexpression Einfluss nimmt (Gonzalez & Montminy, 1989). CREB bindet nach Dimerisierung und Rekrutierung des Co-Aktivators CREB-binding Protein (CBP) an eine bestimmte DNA-Sequenz, das cAMP-responsive element (CRE) (Montminy et al., 1986). Im Verlauf erfolgt wieder eine Dephosphorylierung und somit

Deaktivierung durch die Serin/Threonin-Phosphatase PP-1 und PP2-A (Wadzinski et al., 1993). CREB-Knockout-Mäuse zeigen eine gestörte T-Zell-Entwicklung sowie verminderte T-Zellanzahl im Thymus und sie sterben in der Regel bei Geburt aufgrund von Lungenatelektasen (Rudolph et al., 1998). Mutationen, die zu einer Störung der CREB-Phosphorylierung führen, bedingen Kleinwuchs. Mehrere Untersuchungen belegen Einflüsse auf Langzeitpotentierung und synaptische Plastizität (Benito & Barco, 2010). Auch wird eine Bedeutung für Neuronen-Überleben vermutet. In-vivo Untersuchungen an sich entwickelnden Gehirnen transgener Mäuse mit kombinierter Mutation für CREB und cAMP responsive element modulator (CREM), einem weiteren Transkriptionsfaktor und Regulator des CREB, zeigten generalisierten vermehrten Neuronenverlust und hohe Apoptoseraten (Mantamadiotis et al., 2002). Es konnte eine Wachstumsfaktor-vermittelte Bedeutung für Neuronen-Überleben gezeigt werden, so wirken NGF (Nerve-Growth-Factor) und BDNF über Phosphorylierung von CREB stimulierend auf die Genexpression des anti-apoptotischen Bcl-2 (Riccio et al., 1999; Saini et al., 2004). Die Regulationsaktivität für ein Zielgen hängt mit der Zusammensetzung und Länge der CRE-Sequenz sowie Lage in der Promoterregion zusammen. Methylierung des CRE verhindert CREB-Bindung in vitro (Iguchi-ariga & Schaffner, 1989).

Anstoß für die vorliegende Arbeit, CREB als möglichen Modulator der Reelin-Sekretion zu untersuchen, gab die Erkenntnis, dass sich solch eine CRE-Sequenz auch in der Promotorregion des Reelin-Gens findet (Grayson et al., 2006). Außerdem konnten Migrationsdefekte im cerebralen Kortex, Hippokampus und Bulbus olfactorius von kombiniert CREB- und CREM-defizienten transgenen Mäusen detektiert werden, die sich immunhistochemisch und in der BrdU-Analyse ähnlich dem Reeler-Phänotyp darstellten (Díaz-Ruiz et al., 2008). Hirnlysate dieser Mutanten enthielten deutlich reduziertes Dab1-Protein und Dab1-mRNA-Expression im Vergleich zum Wildtypen.

**Abbildung 4:**

Schematische Übersicht über den Aufbau der Promotorregion des humanen Reelin-Gens. Dargestellt ist die vollständig gemappte Reelin-Promotorregion. Die RNA-Startstelle ist als +1 markiert. Umrandet ist die identifizierte Enhancer Region. In gelb markierte G-Reste sollen Basen darstellen, die bei Schizophrenie Patienten methyliert sind, jedoch nicht bei Nicht-Schizophrenie-Patienten.

Farbig markiert sind hier relevante Transkriptionsfaktorbindungsstellen, unter anderem in rot für CREB.

Aus Grayson et al., 2006.

1.9. Endgültige Fragestellung

Reelin ist seit der Entdeckung der Cajal-Retzius-Zellen ein viel untersuchtes Extrazelluläres Matrixprotein und dessen essentielle Rolle in der Gehirnentwicklung ist unumstritten. Dennoch ist zu den Upstream-Signalen, die letztendlich auf die Reelin-Sekretion wirken, diese modulieren und somit Einfluss auf anschließende Signalvermittlung nehmen nur wenig bekannt. Eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREB, der auch in Zusammenhang mit Neuronenmigration gebracht wurde, in der Promotorregion des Reelin-Gens legt eine direkte Wirkung von CREB auf die Reelin-Expression nahe. Östrogen soll die Reelin-Sekretion fördern über ER- α , der auf Cajal-Retzius-Zellen gefunden wurde. BDNF dagegen wird als negativer Einflussfaktor für die Reelin-Sekretion gehandelt. Eine mögliche CREB-vermittelte Einflussnahme der genannten Faktoren auf die Reelin-Sekretion soll daher im Folgenden erarbeitet werden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank, Heracell 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence
Gefrierschrank, -25°C, -80°C	Liebherr
Konfokales Mikroskop System	
Axiovert 100M	Zeiss
LSM 510 Meta	Zeiss
Kryostat HM 560	Microm
Kühlschrank, 4°C	Liebherr
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss
Netzgerät E835	Consort
Schüttler, Cell Shaker Variospeed	Chemetron
Step One Plus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems
Stereomikroskop Hund H33	Hund

Sterile Werkbank, Gelair Flow BSB 4	Gelaire
Tissue Chopper, McIlwain	Campden Instruments
Thermocycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad Julabo 13	Julabo Labortechnik
Zentrifugen	
Universal 32R	Hettich Lab Technology
Eppendorf 5414 Microcentrifuge	Eppendorf

2.1.2. Weitere Materialien

Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten (100kDa)	Merck Millipore
Chirurgisches Besteck	Fine Science Tools
Deckgläser (24x60mm)	Roth
Elektrophorese System und Blot-Modul, XCell SureLock Mini Cell	Thermo Scientific
Eppendorf-Tube transparent (1,5ml)	Eppendorf
Gelelektrophorese-Kammer, Sub Cell GT	Bio Rad
Gel-Kassetten (1,5mm)	Thermo Scientific
Gewebskultur-Platte (100x20mm)	Falcon
Millicell Kultur-Membranen (30mm)	Merck Millipore

Multiwell-Zellkulturplatten (6-Well)	Falcon
Objektträger Super Frost (75x25mm)	Hecht-Assistent
PCR-Tubes (0,5ml)	Eppendorf
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipettierhilfe, Accu-Jet	Brand
Röhrchen (10ml, 50ml)	Greiner Bio One
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Falcon

2.1.3 Software

Adobe Illustrator CS6	Adobe
Adobe Photoshop CS5 Extended Version 12.0	Adobe
BZ-II-Analyzer	Keyence
BZ-II-Viewer	Keyence
SPSS Statistics Version 23 für Mac	IBM
Fusion Capture Advance Programm	Vilber
ImageJ64	NIH
Microsoft Excel für Mac 2011	Microsoft
Microsoft Word für Mac 2011	Microsoft
Step One Plus Software v2.3	Applied Biosystems
ZEN lite 2011	Zeiss

2.1.4 Chemikalien

17 β -Estradiol (E2)	Sigma-Aldrich
Acrylamid	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich
BDNF	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bradford Reagenz 5x	Bio Rad
Dako Fluoreszenz Eindeck-Medium	Dako
DAPI	Sigma-Aldrich
DNA-Extraktions-Kit für PCR (Extraktions-Lösung, Gewebspräparationslösung, Neutralisationslösung)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Genoxxon
Gefriereinbettmedium, Tissue-Tek	Sakura
Glycin	Roth
GnRH (LHRH)	Abcam
Immersionsöl Typ A	Nikon
Immobilon Western HRP-Substrat	Merck Millipore
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore
L-Glutamin, 200 nM	Thermo Fisher Scientific

Methanol	J.T. Baker
Molekulargewichtsmarker	
Prestained Plus Page Ruler	Thermo Scientific
Spectra Multicolor High Range	Thermo Scientific
NaCl	Roth
Na-Desoxycholat	Sigma-Aldrich
Neurobasal A Medium	GIBCO
Natriumhdihydrogenphosphat Monohydrat Na_2HPO_4	Merck Millipore
NP40 Alternative	Calbiochem
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)-Tabletten	Merck Millipore
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Millipore
Phospho-CREB Peptid	Abcam
Phospho-Stop ,Tablette	Roche
Pierce ECL Western Blot Substrat	Thermo Scientific
Ponceau S	Merck Millipore
Protease-Inhibitor Cocktail, Tablette	Roche
cDNA-Synthese Kit, Maxima first Strand (Maxima Enzym Mix, 5xReaktionsmix)	Thermo Scientific
Saccharose	Merck Millipore
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Biomol

Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	Serva
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth
EDTA	Merck Millipore
Triton X	Sigma-Aldrich
Tween	Sigma-Aldrich

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Primär- und Sekundärantikörper. WB (Western Blot), IHC (Immunhistochemie).

	Name	Klonalität	Wirt	Verdünnung	Firma	Verwendung
Primär-antikörper	Dab1	poly	Kaninchen	1:1000	Rockland	WB
	4G10	mono	Maus	1:1000	Millipore	WB
	CR50	mono	Maus	1:1000	MBL	IHC
	CREB	mono	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Tech.	WB
	pCREB	mono	Kaninchen	1:800 bzw. 1:1000	Cell Signaling Tech.	IHC/WB
	G10	mono	Maus	1:500	Millipore	WB
	GAPDH	mono	Maus	1:10000	Ambion	WB
	α -Tubulin	mono	Maus	1:10000	Sigma	WB
Sekundär-antikörper	Alexa Fluor 488	poly	Ziege (anti-Kaninchen)	1:500	Thermo Scientific	IHC
	Alexa Fluor 555	poly	Ziege (anti-Maus)	1:500	Thermo Scientific	IHC
	HRP	poly	Ziege (anti-Kaninchen)	1:2500	Jackson Immuno Research	WB

2.1.5 Protokolle Lösungen

Für Slice-Kulturexperimente:

Inkubationsmedium für hippokampale Slice-Kulturen

17 β -Estradiol-Stimulationslösung

- 10⁻⁴ M Stammlösung (in Aqua dest.)
- 1 μ l Stammlösung je 1ml Inkubationsmedium

BDNF-Stimulationslösung

- 50 μ g/ μ l Stammlösung
- 1 μ l Stammlösung je 1ml Inkubationsmedium

GnRH-Stimulationslösung

- 10⁻⁴M Stammlösung (in Aqua dest.)
- 1 μ l Stammlösung je 1ml Inkubationsmedium

Reelin-Stimulationslösung

- 20-fach aufkonzentrierte Lösung eines Reelin-produzierenden HEK-293 Zell-Überstandes (siehe Forster et al., 2002)
- 1 μ l Stammlösung je 1ml Inkubationsmedium

Für Genotypisierung:

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

- 54g Tris
- 27,5g Borsäure
- 20ml 0,5M EDTA
- mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen, pH 8,0

Agarose-Gel (2%-ig)

- 4g Agarose mit 0,5-fachem TBE auf 200ml auffüllen
- nach kurzem Aufkochen und Abkühlen Zugabe 4µl Ethidiumbromid

Für Western Blotting:

Lämmli-Puffer

- 100ml 10-facher Lämmli-Puffer (30g Tris, 144g Glycin, 100ml 10%-SDS auf 1000ml mit Aqua dest.)
- mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen

RIPA-Puffer (100ml)

- 750mg Tris
- 900mg NaCl
- 10ml 10%-NP40
- 2,5ml Na-Desoxycholat
- 1ml EDTA 100mM
- mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen

RIPA-Lösung zum Lysieren (1ml)

- 1 Tablette Phospho-Stop in 1ml RIPA-Puffer lösen
- 1 Tablette Protease-Inhibitor in 2ml RIPA-Puffer lösen
- 100 µl Phospho-Stopp-Lösung und 40 µl Protease-Inhibitor mit RIPA-Puffer auf 1ml auffüllen

Transferpuffer (1000ml)

- 80ml 12,5-facher Transfer-Puffer (18,2g Tris, 90 g Glycin auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen)
- 200ml Methanol
- 2ml 10%-SDS

Lösung 1 für Trenngel (200ml)

- 36,3g Tris Base

- 8ml 10%-SDS
- mit Aqua dest. auf 200ml auffüllen, pH 8,8

Lösung 2 für Sammelgel

- 6g Tris
- 4ml 10%-SDS
- mit Aqua dest. auf 200ml auffüllen, pH 8,8

Trenngel (Beispiel 10%-ig)

- 3,32ml 30%-Acrylamid
- 2,5ml Lösung 1
- 4,18ml Aqua dest.
- 100 µl 10%-SDS
- 20 µl TEMED

Sammelgel (Beispiel 10%-ig)

- 1ml 30%-Acrylamid
- 2,5ml Lösung 2
- 6,5ml Aqua dest.
- 100 µl 10%-APS
- 20 µl TEMED

Für Immunhistochemie:

Paraformaldehyd-Lösung (4%-ig, 50ml)

- 2g PFA
- mit PBS auffüllen auf 50ml und im Wasserbad bei 60°C lösen

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, 1000ml)

- 8g NaCl
- 2g KCL
- 1,44g Na₂HPO₄

- 0,24g KH_2PO_4
- mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen, pH 7,4

Saccharose-Lösung (25%-ig, 100ml)

- 25 g Sacchararose
- mit PBS auf 100ml auffüllen

2.2 Methoden

In den folgenden Experimenten verwendete Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz gehalten. Alle Experimente wurden gemäß den geltenden gesetzlichen Bestimmungen und im Einvernehmen mit der Ethikkommission durchgeführt.

2.2.1 Herstellung von Hirnlysaten

Es wurden Gewebeproben von Mäusen am Postnatal Tag 0 bis 2 (P0-2) sowie 12 Wochen alten Tieren gesammelt und in verschiedene Gruppen nach Geschlecht und Genotyp eingeteilt. Der erwachsene Reeler-Phänotyp war unmissverständlich an der typischen Gangataxie zu identifizieren, die Bestimmung bei den Neugeborenen erfolgte über Schwanzbiopsien. Nach Dekapitation und Entnahme der Gehirne wurden die Hippokampi unter dem Binokularen Mikroskop isoliert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Homogenisierung erfolgte im Glasplotter in 200 µl RIPA-Puffer plus Protease-Inhibitor und Phosphostop (siehe Anhang) bei den adulten Gewebeproben und in 100 µl RIPA-Puffer bei den neugeborenen Tieren. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm und Überführen des Überstandes wurden die Proben nach erneutem Schockgefrieren in Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps für die Unterscheidung zwischen Wildtypen, homozygoten Reelern und heterozygoten Reelern bei neugeborenen Mäusen

erfolgte die Genotypisierung mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) anhand von Schwanzbiopsien.

Zur DNA-Extraktion wurden fertige Lösungen der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Es wurden je 50µl Extraktionslösung mit 12,5µl Tissue Prep mit dem Mausschwanzgewebe gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung für 3 Minuten in den Heizblock bei 95°C. Nach dem Herausnehmen wurden dem Gemisch nun je 50µl Neutralisationspuffer zugefügt. Zuvor wurde ein PCR-Mastermix vorbereitet, der je Probe 5µl PCR-Mix 5, 2µl H₂O, sowie je 0,5µl der 2 Primer für das Reelin-Gen enthielt. Diesem Mastermix wurden 2µl des Probengemischs zugefügt. Es folgte die PCR anhand eines vorgeschriebenen Schemas aus Denaturierung, Annealing und Elongation in 35 Zyklen in einem Thermo-Cycler.

Anschließend wurde den Proben je 2µl Lade-Puffer (6-fach Loading Buffer) zugegeben, bevor diese auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetragen werden konnten. Nun erfolgte die eigentliche Gel-Elektrophorese der zuvor durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente. Anhand des typischen Bandenmusters konnte der Genotyp bestimmt werden.

2.2.3 Herstellung hippokampaler Slice-Kulturen

Hippokampale Slice-Kulturen ermöglichen die relativ simple Kultivierung von explantiertem Gewebe bei gut erhaltener organotypischer Struktur über mehrere Tage bis Wochen. Das hier angewandte Verfahren basiert auf einer von Stoppini et al. 1991 entwickelten Methode (Stoppini, Buchs, & Muller, 1991). Für Slice-Kulturen wurde Gewebe von Ratten am postnatalen Tag 5 (P5) verwendet. Es erfolgten unabhängige Stimulationsexperimente für Weibchen und Männchen. Je Stimulationsexperiment wurde Hippokampusgewebe von 4 Tieren verwendet. Nach Dekapitation und Entnahme des Gehirns wurden die Hippokampi unter einem Binokularen Mikroskop isoliert und mit einem Tissue-Chopper in 400 µm dicke koronare Scheiben („slices“) geschnitten. Diese Hippokampus-Scheiben wurden auf spezielle Membranen (Millicell Culture Insert Membrane) in 6-Well-Platten mit je einem ml Neuronenkulturmedium verteilt, sodass auf jedem Well gleich viele Hippokampi von unterschiedlichen Tieren verteilt waren.

2.2.4 Stimulationsexperimente

Die Hippokampalen Slices wurden nach 3 Tagen Ruhezeit im Inkubator zu definierten Zeitpunkten über einen Zeitraum von immer 2 Tagen über insgesamt eine Woche stimuliert. Hierzu wurde Neuronenkulturmedium mit Zusatz von Östrogen, GnRH und BDNF sowie in der Kontrollgruppe ohne Zusatz verwendet. Überstände wurden an Tag 3 nach 2 Tagen ohne Behandlung separat als Kontrolle je Behandlungsgruppe, sowie am Ende jeder Stimulationsperiode gepoolt gesammelt für jede Behandlungsgruppe. Nach Ende der dritten Stimulationsperiode wurden die Slices an Tag 10 für die weitere Immunhistochemie, Immunoblotting-Experimente oder real-Time PCR weiterverarbeitet.

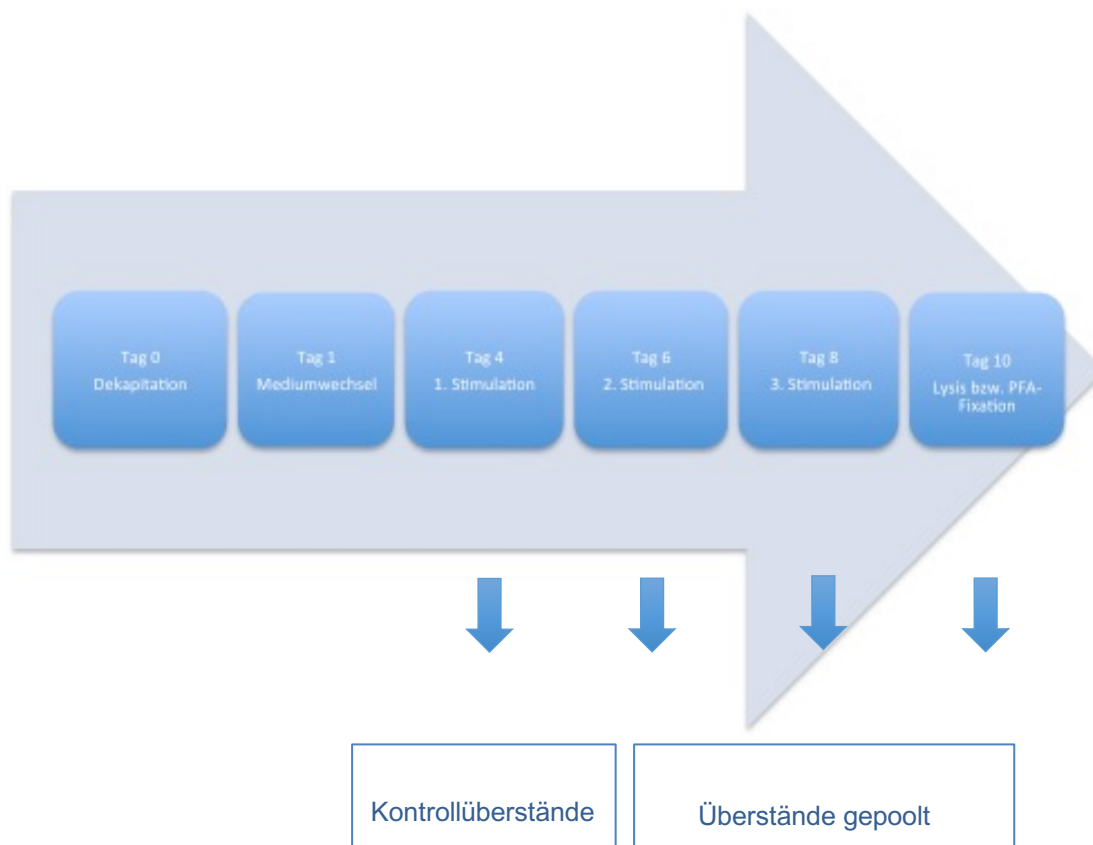


Abbildung 5:

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit organotypischen Hippokampalen Slice-Kulturen.

Hippokampus-Schnitte von P5-Ratten wurden an Tag 0 gewonnen. An Tag 1 erfolgte ein Medium-Wechsel. Stimulationen mit Östrogen, BDNF und GnRH sowie Neuronenmedium ohne Zusatz als Kontrollgruppe erfolgten an Tag 4, 6, und 8. Zusätzlich wurden Überstände gesammelt an Tag 4 vor Beginn der Stimulationen als Kontroll-Überstand ohne Behandlung sowie gepoolt an Tag 6, 8 und 10, nachdem jeweils zuvor über 2 Tage stimuliert worden ist.

2.2.5 Proteinkonzentrierung von Überständen der Slice-Kulturen

Überstände wurden nach 2 Tagen ohne Behandlung als Kontroll-Überstand sowie nach 3 mal 2 Tagen Behandlung gesammelt. Die Proben wurden anschließend mittels Ultrafiltration um den Faktor 4 bzw. 12 aufkonzentriert. Hierzu wurden Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Einheiten mit einer Molekulargewichtsgrenze des Filters von 10K verwendet, die Proben wurden mit 4000g bei 4°C zentrifugiert. Nach Wiegen auf einer austarierten Waage wurden die konzentrierten Proben jeweils auf ein Zielvolumen von genau 500µl gebracht.

2.2.6 Immunhistochemie an Slice-Kultur-Schnitten

Um Einflüsse einer Östrogen-, BDNF- und GnRH-Behandlung auf die CREB-Phosphorylierung in Cajal-Retzius-Zellen zu untersuchen, wurden Färbungen der wie oben beschriebenen behandelten hippokampalen Slices mit einem pCREB-Antikörper vorgenommen. Zur Markierung der Cajal-Retzius-Zellen sowie ebenfalls Messung der Reelin-Expression dieser Zellen unter den Behandlungen wurden Färbungen mit einem CR50-Antikörper vorgenommen. Zur Färbung von Interneuronen in Kapitel 3.6 wurde an Stelle des CR50-Antikörpers ein G10-Antikörper verwendet, welcher ebenfalls Reelin-Protein markiert.

Slices wurden nach Beendigung der Stimulations-Experimente 1,5-stündig in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und anschließend in PBS gewaschen.

Darauffolgend wurden die Schnitte mit 25%-iger Sucrose-Lösung für 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden diese in Tissue-Tec gebettet auf Trockeneis gefroren und bei -20°C gelagert.

Die so eingebetteten Hippokampus-Slices wurden am Cryostat in 20µm dicke Scheiben geschnitten, bei Raumtemperatur auf einem Objektträger luftgetrocknet und wieder bei -20°C eingefroren. An den Schnitten wurde die weitere Immunhistochemie durchgeführt.

Nach Nachfixierung mit 50%igem und danach 100%igem eiskalten Methanol und anschließendem Waschen in PBS erfolgte das Blocking in 3%igem BSA und 0,05%igem TritonX über 1 Stunde. Es folgte die Inkubation mit dem 1.

Primärantikörper (pCREB 1:800 verdünnt in PBS) über Nacht bei 4°C und am nächsten Tag die Inkubation mit einem geeigneten Sekundärantikörper, einem

fluoreszenzmarkierten polyklonalen anti-rabbit Antikörper (A488 1:500 verdünnt in PBS). Anschließend die Inkubation mit einem 2. Primärantikörper (CR50 bzw. G10) wieder über Nacht und auch am nächsten Tag die Inkubation mit einem geeigneten 2. Sekundärantikörper, einem fluoreszenzmarkierten polyklonalen anti-Maus Antikörper (A555, 1:500 verdünnt in PBS). Hierbei wurden, um Kreuzreaktionen zu vermeiden beachtet, dass die verwendeten Antikörper aus unterschiedlichen Wirten stammen.

2.2.7 Western Blotting

Der Western Blot ist ein verbreitetes Verfahren für den direkten quantitativen Vergleich zu untersuchender Proben auf enthaltene Protein Mengen. Hierzu werden Probengemische zunächst in einer Gelelektrophorese nach Größe der unterschiedlichen Proteine aufgetrennt. Über speziell hergestellte Antikörper kann das nachzuweisende Protein dann gebunden werden. Über einen zweiten Antikörper kann anschließend dieser gebundene Primär-Antikörper markiert werden und hierüber letztendlich detektiert werden.

In dieser Arbeit wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt, um zunächst zu untersuchen, ob es Unterschiede in der pCREB-Expression zwischen Wildtypen, heterozygoten Reelern und homozygoten Reeler-Mausmutanten im Alter P0-2 sowie bei 12 Wochen alten Tieren gibt. Außerdem wurden wie oben beschrieben behandelte hippokampale Slices lysiert und der Proteingehalt an Dab1 und phosphoryliertem Dab1 mit Hilfe des Dab1- und 4G10-Antikörpers (gegen phosphoryliertes Dab1) unter den verschiedenen Behandlungsgruppen verglichen. Zusätzlich wurden in Überständen dieser Slice-Kulturen nach Aufkonzentrierung wie oben beschrieben die Mengen des sezernierten Reelins vor und nach Behandlung im Überstand verglichen.

2.2.7.1 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Um beim Immunoblotting möglichst gleiche Mengen der Proben aufzutragen und somit in der weiteren Auswertung später vergleichen zu können, ist zunächst die Durchführung eines sogenannten Bradford Essays sinnvoll.

Dazu wurde zunächst eine Standardreihe angesetzt mit aufsteigenden Mengen an Bovine Serum Albumin (zusammen mit Ripa-Puffer und mit Aqua dest. verdünnt). Das Bradford-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Zu je 19 µl wurden 1 µl der zu messenden lysierten Proben gegeben und mit je 1ml Bradford Reagenz versetzt. Die konzentrationsabhängige Reaktion wurde im Photometer gemessen und somit die Menge n an Probe je Lysat ermittelt.

Für das Immunoblotting wurden die jeweiligen Slices einer Stimulation am letzten Tag gesammelt und in 50 µl Ripa-Puffer mit Zusatz von Protease-Inhibitor und Phosphostop lysiert, abzentrifugiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7.2 Western Blot Verfahren

Die gewonnenen Gewebeproben wurden mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden 12%-ige Acryl-Amid-Gele nach Anleitung gegossen und in diese die zu vergleichenden Proben mit aus dem Bradford-Essay ermittelten gleichen Mengen an Probe aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Marker verwendet (Page Ruler Plus Prestained, Millipore) und mit den verschiedenen Proben auf dem Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese über 1 Stunde bei 180 Volt erfolgte das Blotting für 2 Stunden bei 40 Volt auf eine Nitrocellulosemembran. Nun sollte das Protein entlang des angelegten Gradienten von dem Gel auf die Membran gewandert sein. Die Membran wurde über 1,5 Stunden mit 5%igem Bovinem Serumalbumin (BSA) geblockt, um den Hintergrund zu reduzieren. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit einer Antikörper-Lösung gegen das nachzuweisende Protein, zusätzlich diente als Kontrolle für die spätere Auswertung die Inkubation mit einem Standard, hier wurde α -Tubulin oder GAPDH (je 1:10000 verdünnt) verwendet. Nach Waschen der Membran mit PBST erfolgte am nächsten Tag die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper für 2 Stunden und erneutes Waschen mit PBST. Die Aufnahmen der Blots wurden mit dem Fusion-Camera-Programm durchgeführt. Hierzu verwendete ich das Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate, ein chemilumineszentes-Substrat, das Horseradish Peroxidase-Aktivität (HRP) auf der Membran detektiert.

Die Spezifität des verwendeten pCREB-Antikörpers wurde mit Hilfe eines Blocking Experimentes festgestellt. Hierzu wurde eine Probe zur Kontrolle ohne sowie mit Zusatz eines speziellen pCREB-Blocking Peptides auf ein Gel aufgetragen und anschließend mit dem pCREB-Antikörper inkubiert. Unter Zusatz des pCREB-Blocking Peptids zu dem verwendeten pCREB-Antikörper verschwand das Signal auf Höhe der pCREB-Bande bei ~43 kDa (siehe Abbildung 6). Zugabe des Blocking Peptids zu dem verwendeten CREB-Antikörper führte zu keiner signifikanten Änderung des Signals auf der Membran (siehe Abbildung 6).

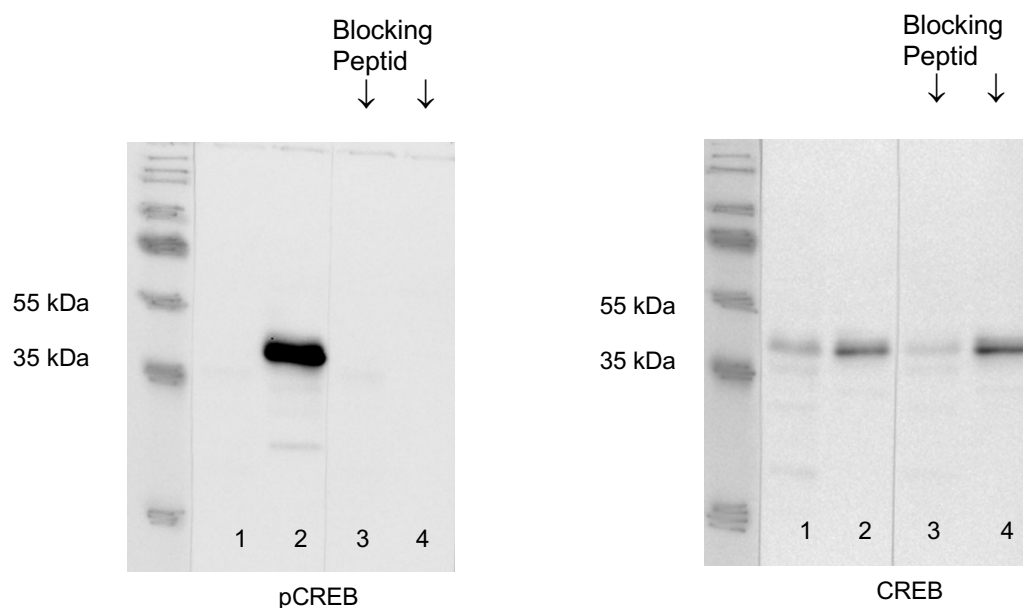


Abbildung 6: Antikörper-Spezifität für CREB und pCREB.

Westernblot-Aufnahmen. In Lane 1 und 3 Hirnlysate eines 12 Wochen alten Tieres, bei Lane 2 und 4 Hirnlysate eines neugeborenen Tieres. Lane 3 und 4 nach Zugabe eines Blocking Peptids für pCREB.

Links: Starke pCREB-Proteinexpression bei ~43kDa. Nach Zugabe eines Blocking Peptids für pCREB zum verwendeten pCREB-Antikörper kein Signal mehr auf der Höhe sichtbar.

Rechts: Es erfolgte die Inkubation mit einem CREB-Antikörper. Auch nach Zugabe eines Blocking Peptids für pCREB ist das CREB-Signal unverändert.

2.2.8 Datenauswertung

Die Quantifizierung der Intensität der Bandenstärke in Western-Blot-Aufnahmen sowie der Färbintensität in den immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungs- und Verarbeitungs-Programms ImageJ (NIH, free source,

<https://imagej.nih.gov/ij/>). Die Western-Blot-Analysen wurden nach dem Protokoll von Lukemiller (<https://Lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>) durchgeführt und für jede untersuchte Gruppe gegen eine Ladekontrolle der Probe in Form von α -Tubulin, einem Bestandteil der Mikrotubuline oder GAPDH, einem Enzym der Glykolyse, ins Verhältnis gesetzt. Auf diesem Wege wurden relative Mengenverhältnisänderungen in Abhängigkeit zur Behandlung ermittelt.

Für die relative Quantifizierung von Proteinmengen in immunhistochemischen Präparaten wurden Cajal-Retzius-Zellen in der äußeren Molekularschicht an einem Konfokalen Mikroskop in 63-facher Vergrößerung mit einem Wasser-Immersions-Objektiv aufgenommen. Die Aufnahmen der Cajal-Retzius-Zellen erfolgten in drei separaten Kanälen für CR50, pCREB und Dapi. Über ImageJ wurden Schwellenwert- (Threshold-) abhängige Messungen der optischen Dichte durchgeführt für die Reelin- und pCREB-Expression jeder Zelle. Hierbei wurde die Integrated Density (optische Dichte), das Produkt aus dem für die Messung ausgewählten Bereich und dem mittleren Grauwert der in diesem Bereich enthaltenen Pixel, in Cajal-Retzius-Zellen gemessen. Die Schwellenwert-abhängigen Einstellungen für jeden einzelnen Kanal wurden innerhalb eines Experiments beibehalten. Interneurone wurden am Fluoreszenz-Mikroskop in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und auch hier die optische Dichte der pCREB-Fluoreszenz semiquantitativ gemessen, nachdem zuvor ein Threshold festgesetzt worden war.

2.2.9 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mithilfe der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics in der Version 23.0.

Für die statistische Analyse der Daten aus den Western-Blot-Messungen (Kapitel 3.1, 3.3, 3.4) wurden die Datensätze auf Normalverteilung geprüft, dies geschah in Betrachtung des Shapiro-Wilk-Tests, der Histogramme und Q-Q-Plots. Nach Prüfung der Datensätze auf Normalverteilung wurde, wenn diese gegeben war, eine Univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Adjustierung durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu eruieren. Bei nicht-normalverteilten Daten führte ich einen Kruskal-Wallis-Test und bei Signifikanz unter

den Gruppen einen anschließenden Mann-Whitney-U-Test durch. Die Ergebnisdarstellung erfolgt als Mittelwerte mit Standardfehlern.

Für die statistische Datenauswertung der Daten aus den Immunofluoreszenzfärbungen (Kapitel 3.4) erfolgte eine Analyse in einem generalisiert linearen gemischten Modell. Wieder prüfte ich wie oben erwähnt die Messwerte auf Normalverteilung. Da dieses Modell parametrische post-Hoc Tests anwendet, transformierte ich meine Datensätze, welche nicht normalverteilt waren, nach folgender Formel:

$$y=\ln(x+1)$$

Die Addition der Einzelwerte mit 1 erfolgte, um auch Messwerte von $x=0$ in die statistische Datenanalyse einzuschließen. Hierdurch wurde eine annähernde Normalverteilung erreicht und die statistische Datenanalyse mit diesen Werten fortgeführt, unter der Annahme einer ausreichenden Robustheit der post-Hoc-Testung.

Bei signifikanten F-Werten folgte die Betrachtung der Kontraste zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Behandlungsgruppen in einer paarweisen Kontrastanalyse. Die Kontrastanalyse ermöglicht über die Prüfung globaler Unterschiede hinaus die Bewertung von Effektstärken und den Vergleich mehrerer Gruppen untereinander und gegeneinander.

Ergänzend führte ich eine ordinale Regressionsanalyse der Daten durch.

Für die Cajal-Retzius-Zellen führte ich eine Korrelationsanalyse für die Variablen Reelin-Expression und pCREB-Expression in Cajal-Retzius-Zellen durch. Hierbei erfolgte die Betrachtung der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho bei Vorliegen nicht normalverteilter Datensätze. Ein positives Vorzeichen dieses Koeffizienten zeigt einen gleichsinnigen Zusammenhang an, wohingegen ein negatives Vorzeichen einen gegenläufigen Zusammenhang bedeutet. Der Wert des Korrelationskoeffizienten variiert zwischen -1 und 1, wobei ein Wert von 0 bzw. nahe 0 bedeutet, dass die Merkmale unkorreliert sind und mit Zunahme des Wertes eine stärkere Korrelation bestehen muss. Hier wurden ebenfalls die Signifikanzen dieser Koeffizienten geprüft.

Die Ergebnisdarstellung für die immunhistochemischen Untersuchungen in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 erfolgte als Angabe der prozentualen mittleren Differenzen jeder

Gruppe zur unbehandelten Kontrollgruppe mit Aufführung der Standardfehler der Kontraste. Außerdem wurden jeweils unterhalb der Diagramme die geschätzten Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall nach Rücktransformation aufgeführt.

Für alle Daten wurden verschiedene Signifikanz-Level festgesetzt: * für $p < 0,05$, signifikant; ** für $p < 0,01$, sehr signifikant; *** für $p < 0.001$, höchst signifikant.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Wirkung des Transkriptionsfaktors CREB auf den Reelin-Promotor und somit die Reelin-Genexpression zu eruieren. Unsere Arbeits-Hypothese beruhte hierbei auf einem bereits zuvor nachgewiesenem CREB-spezifischen Bindungsmotiv (CRE) in der Promotorregion des Reelin-Gens (Grayson et al. 2006). Hierzu sollten im Speziellen Einflüsse von Östrogen, GnRH und BDNF untersucht werden, welche in der Literatur bereits in Zusammenhang mit Reelin gestellt worden waren. (Bender et al. 2010; Prange-Kiel et al. 2008; Ringstedt et al. 1998). Diese Effekte sollten an Hippokampalen Schnittkulturen weiblicher und männlicher P5-Ratten in Zusammenhang mit der CREB-Phosphorylierung in Cajal-Retzius-Zellen untersucht werden.

Hippokampale Slicekulturen wurden mit den bereits zuvor aufgeführten verschiedenen Substanzen stimuliert und die Reelin-Protein-Sekretion in den Überstand, sowie die Phosphorylierung von Disabled 1 unter den Behandlungsgruppen verglichen. Um mögliche Zusammenhänge zwischen dem phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB (pCREB) und Reelin zu evaluieren, wurde die CREB-Phosphorylierung im Hippokampus der Reeler-Mutante im Vergleich zum Wildtypen mittels Immunoblot-Analysen untersucht. Da durch den Western Blot nicht direkt auf die gesteigerte CREB-Aktivierung in einem bestimmten Zelltyp (z.B. Cajal-Retzius-Zellen) geschlossen werden konnte, erfolgten anschließend immunhistochemische Untersuchungen zur pCREB- und Reelin-Immunreaktivität speziell in den Reelin-sezernierenden Cajal-Retzius-Zellen

hippokampaler Schnittkulturen nach Behandlung mit Östrogen, GnRH und BDNF. Im Folgenden sollen die erhobenen Ergebnisse unter Berücksichtigung geschlechtsspezifischer Unterschiede dargestellt werden.

3.1 Western-Blot-Untersuchungen zur Reelin-Sekretion aus hippocampalen Slice-Kulturen

Als Ausgangsmodell für die folgenden Untersuchungen dienten organotypische Hippokampus Slice-Kulturen der Ratte. Hippokampale Slice-Kulturen aus Gewebe von Ratten am Postnataltag 5 (P5) wurden über zehn Tage kultiviert, wobei für insgesamt sechs Tage ab Tag 4 im 48-stündigen Takt Stimulationen mit Kulturmedium und Zusatz von Östrogen, BDNF oder GnRH bzw. ohne Zusatz in der Kontrollgruppe erfolgten. Reelin ist ein etwa 400 kDa schweres Glykoprotein, welches in vivo von Cajal-Retzius-Zellen und in organotypischen hippocampalen Slice-Kulturen in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird (D'Arcangelo et al. 1997). Eine mögliche Regulation der Reelin-Sekretion unter den verschiedenen Behandlungen sollte daher mittels Western-Blot-Analysen untersucht werden. Gesammelte Überstände der einzelnen Gruppen über einen Zeitraum von 48 Stunden vor Beginn der jeweiligen Stimulationen dienten hierbei als interne Kontrolle je Behandlungsgruppe (in Abbildung 7B als „vor Stimulation“). Über jeweils 48 Stunden nach jeder Stimulation für insgesamt drei Stimulationsperioden gesammelte Überstände wurden mit den Kontrollüberständen verglichen.

Reelin wird nach Sekretion in Fragmente verschiedener Größen gespalten, welche sich im Überstand finden. Hier wurden mit Hilfe des Reelin-spezifischen G10-Antikörpers Banden bei etwa 400 kDa, 330 kDa sowie 180 kDa detektiert und deren Intensität mit dem Programm ImageJ semiquantitativ gemessen. In Abbildung 7A ist ein exemplarischer Blot dargestellt in Abhängigkeit zu den unterschiedlichen Behandlungen.

Wieder erfolgt zunächst die Ergebnisdarstellung Slice-Kulturen weiblicher Tiere. In Abbildung 7B sind die densitometrischen Werte aus den Western-Blot-Analysen in drei separaten Balkendiagrammen entsprechend der Größe der Reelin-Fragmente als Mittelwert + Standardfehler aus drei Experimenten dargestellt. Diese sind jeweils normalisiert auf den Kontrollwert vor Stimulation, angegeben in Prozent der Proteinmenge. Bei der Interpretation ist zu beachten, dass nach Stimulation die

dreifache Menge an Medium aufgetragen wurde, verglichen mit dem Kontrollüberstand. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte eine deutliche Reduktion der 400 kDa-Bande auf $53,75 \pm 8,89\%$ des Ausgangswertes. Die 330 kDa-Bande zeigte keine signifikante Veränderung der Signalintensität. Auf Höhe der 180 kDa zeigte sich in allen Behandlungsgruppen das stärkste Signal (siehe Abbildung 7B). Die 180 kDa-Bande in der Kontrollgruppe zeigte eine Intensitätssteigerung über die 3 Stimulationsperioden ($174,77 \pm 81,09\%$ des Ausgangswertes). Unter Östrogen-Behandlung zeigte sich eine geringere Reduktion der Intensität der 400 kDa-Reelin-Bande auf $74,30 \pm 8,01\%$ (Vergleich zur Kontrollgruppe: $p=0,200$; Mann-Whitney-U-Test, nicht signifikant) und die relative Intensität der 180 kDa Reelin-Bande war geringer im Vergleich zur Kontrolle ($115,57 \pm 20,97\%$ des Ausgangswertes; $p=1,000$; Mann-Whitney-U-Test, nicht signifikant).

Die BDNF-Behandlung auf 400 kDa-Höhe führte zu einer Signalsteigerung auf $216,65 \pm 38,51\%$ des Ausgangswertes. Dieser Unterschied war nicht signifikant zur Kontrollgruppe ($p=1,000$; Mann-Whitney-U-Test). Ebenso zeigte sich auf Höhe der 330 kDa Reelin-Bande eine Intensitätssteigerung auf $156,27 \pm 10,97\%$ im Vergleich zu $95,12 \pm 51,98\%$ in der Kontrollgruppe ($p=0,700$; Mann-Whitney-U-Test, nicht signifikant). Für die 180 kDa-Bande war ähnlich der Kontrollgruppe eine stärkere Intensität nachweisbar ($153,42 \pm 30,88\%$ des Ausgangswertes). GnRH zeigte eine noch deutlichere Zunahme der 400 kDa-Bande nach Stimulation auf $468,9 \pm 168,76\%$ des Ausgangswertes, dieser Unterschied lag noch über dem Signifikanzniveau von 0,05 beim Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,100$; Mann-Whitney-U-Test). Auf Höhe der 330 kDa-Reelin Bande entsprach das Signal $176,89 \pm 36,40\%$ des Ausgangswerts ($p=0,400$; Mann-Whitney-U-Test, nicht signifikant). Auf Höhe der 180 kDa-Bande zeigte sich dagegen eine tendenzielle geringere Intensität im Vergleich zur Kontrollgruppe ($86,84 \pm 35,66\%$ des Ausgangswertes im Vergleich zu $174,77 \pm 81,09\%$ in der Kontrollgruppe; $p=1,000$; Mann-Whitney-U-Test). Zusammenfassend zeigten sich nach Behandlung mit BDNF und besonders mit GnRH tendenziell eine vermehrte Intensität der Reelin-Banden in Überständen hippocampaler Slice-Kulturen weiblicher Tiere, mit Ausnahme der 180 kDa-Bande, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die Ergebnisse erreichten jedoch kein Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Zieht man bei der Interpretation zusätzlich in Betracht, dass in den Überständen nach Stimulation die dreifache Menge an Medium aufkonzentriert wurde, so deuten die Ergebnisse darüber hinaus auf eine

altersabhängige generelle Abnahme der Sekretionstätigkeit von Cajal-Retzius-Zellen hin, was auf das in vivo beschriebene Absterben von Cajal-Retzius-Zellen mit zunehmenden Alter zurückzuführen sein könnte.

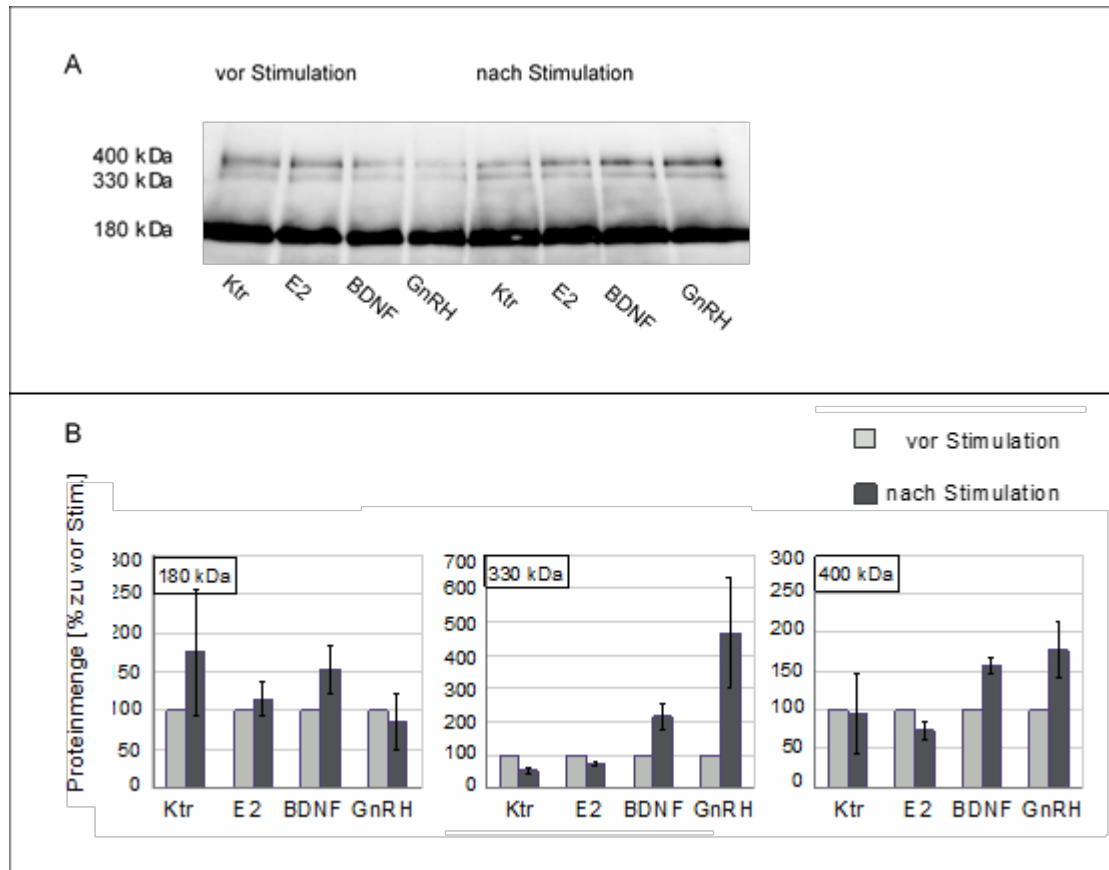


Abbildung 7: Einfluss der Stimulationsexperimente auf die Reelin-Sekretion in hippocampalen Slice-Kulturen weiblicher P5-Ratten.

Slice-Kulturen wurden über sechs Tage alle 48 Stunden mit Zusatz von Östrogen, GnRH oder BDNF zum Kulturmedium stimuliert. In der Kontrollgruppe erfolgte die Behandlung ohne Zusatz. Überstände vor und nach Stimulation wurden getrennt gesammelt, aufkonzentriert und miteinander für jede Behandlungsgruppe verglichen.

- (A) Repräsentativer Western Blot. Zu sehen sind Signale auf Höhe 400 kDa, 330 kDa und 180 kDa. Links zu sehen im Blot sind Kontrollgruppenüberstände vor Beginn der Stimulation aufgetragen. Die Slice-Kulturen, die später mit E2, BDNF, bzw. GnRH behandelt wurden, sind bereits entsprechend benannt. Rechts sind exemplarische Zellüberstände nach sechs Tagen Stimulationsdauer abgebildet.
- (B) Darstellung der semiquantitativen Western-Blot Analysen als relativer Mittelwert in Prozent $\pm$ Standardfehler. $n = 3$ Slice-Kultur-Experimente. Isolierte Darstellung für die verschiedenen Reelin-Banden bei 400 kDa, 330 kDa und 180 kDa. Werte vor Beginn der Stimulationen in der jeweiligen Behandlungsgruppe wurden als 100% gesetzt und mit dem Reelin-Gehalt in Überständen nach Stimulationen verglichen. Bei keiner Behandlung kam es zu einer signifikante Änderung der Sekretion in Cajal-Retzius Zellen.

Nach dem selben Prinzip wurden Überstände aus hippocampalen Slice-Kulturen von männlichen P5-Ratten gesammelt und ebenfalls hinsichtlich der Reelin-Sekretion

verglichen. Abbildung 8 B stellt die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen als prozentuale Mittelwerte mit Standardfehlern in Bezug zum Kontrollwert vor Stimulation dar. In der unbehandelten Kontrollgruppe wurden noch $197,36 \pm 71,38\%$ des Ausgangswertes an 330 kDa-Fragment und nur $143,12 \pm 20,27\%$ an 400 kDa Reelin in den Überständen detektiert, dies war der niedrigste Wert im Vergleich mit den unterschiedlichen Behandlungen. Dagegen war das Signal auf Höhe 180 kDa mit $192,48 \pm 51,1\%$ des Ausgangswertes im Gruppenvergleich am stärksten. Unter Östrogen-Behandlung war der Anteil an 400 kDa Reelin nach Stimulation von $292,89 \pm 147,29\%$ zwar höher als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht mehr signifikant ($p=1,000$). Das 330 kDa Reelinfragment war mit nur $133,25 \pm 30,6\%$ etwas geringer als in der Kontrollgruppe ($p=0,700$ nach Mann-Whitney-U-Test; nicht signifikant). Es fanden sich nach den Stimulationen $187,05 \pm 37,95\%$ des Ausgangswertes an 180 kDa Reelinfragment in den Überständen, dies war ähnlich der Kontrollgruppe. Nach BDNF-Stimulation betrug die Konzentration an 400 kDa Reelin $307,67 \pm 82,26\%$ des Kontrollwertes, somit zeigte sich eine nicht signifikante aber deutlich vermehrte Sekretion dieses Fragments verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p=0,100$ nach Mann-Whitney-U-Test). Das 330 kDa Fragment betrug $270,96 \pm 96,74\%$ des Ausgangswertes nach Stimulation. Dies war im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht mehr signifikant ($p=1,000$ nach Mann-Whitney-U-Test). Die Konzentration der 180 kDa-Reelin-Bande betrug $166,71 \pm 41,90\%$ des Ausgangswertes verglichen zu Stimulationsbeginn und war geringer als in der Kontrollgruppe. In Überständen von GnRH-behandelten Slices fand sich der größte Anteil an 330 kDa und 400 kDa schwerem Reelin ($384,82 \pm 176,23\%$ und $449,83 \pm 31,15\%$). In beiden Fällen wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,400$ und $p=0,100$). GnRH-Behandlung zeigte im Verhältnis den geringsten Anteil an 180 kDa Reelin nach Stimulation mit nur noch $133,17 \pm 11,34\%$. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe stellte sich jedoch keine Signifikanz dar ($p=0,400$ nach Mann-Whitney-U-Test).

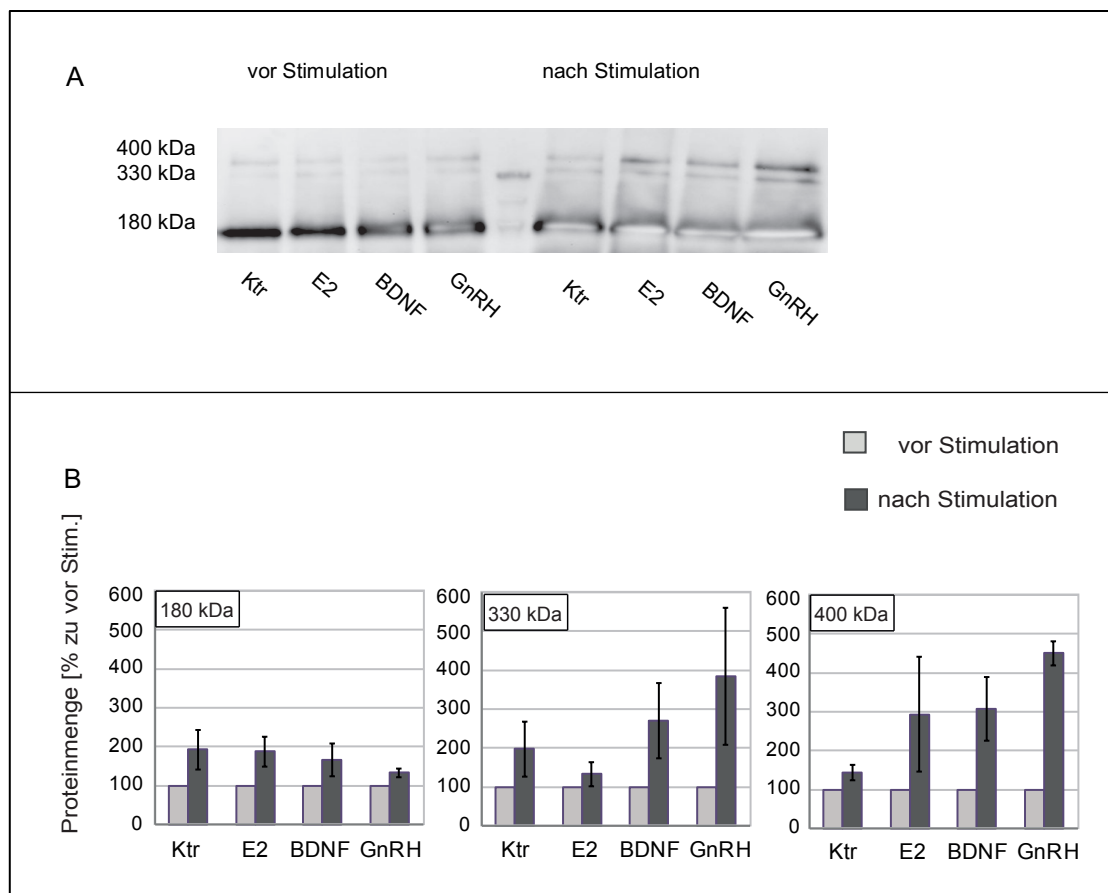


Abbildung 8: Einfluss der Stimulationsexperimente auf die Reelin-Sekretion in hippocampalen Slice-Kulturen männlicher P5-Ratten.

Slice-Kulturen wurden über sechs Tage alle 48 Stunden mit Zusatz von Östrogen, GnRH oder BDNF zum Kulturmedium stimuliert. In der Kontrollgruppe erfolgte die Behandlung ohne Zusatz zum Kulturmedium. Überstände vor und nach Stimulation wurden getrennt gesammelt, aufkonzentriert und miteinander für jede Behandlungsgruppe verglichen.

(A) Repräsentativer Western Blot. Zu sehen sind Signale auf Höhe 400 kDa, 330 kDa und 180 kDa. Links zu sehen im Blot wurden für jede Gruppe Kontrollüberstände von vor Stimulation aufgetragen, rechts jeweils nach sechs Tagen Stimulationsdauer. Das Gitter (welches Gitter? S.o.) oberhalb des Bildes spiegelt das Behandlungsmuster wieder. Deutlich überstrahltes Signal der Banden bei 180 kDa.

(B) Darstellung der semiquantitativen Western-Blot Analysen als relativer Mittelwert in Prozent $\pm$ Standardfehler. $n = 3$ Slice-Kultur-Experimente. Isolierte Darstellung für die verschiedenen Reelin-Banden bei 400 kDa, 330 kDa und 180 kDa. Werte vor Beginn der Stimulationen in der jeweiligen Behandlungsgruppe wurden als 100% gesetzt und mit dem Reelin-Gehalt in Überständen nach Stimulationen verglichen. Vor allem GnRH-Stimulation zeigt deutlich stärkere Proteinexpression auf Höhe der 400 kDa- und 330 kDa-Bande nach Stimulation. Jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$)

3.2 Vergleichende Analysen der Dab1-Phosphorylierung in hippocampalen Slice-Kulturen

Um zu evaluieren, ob Stimulationen an den hippocampalen Slices Effekte auf den Reelin-Signalweg zeigten, wurde die Phosphorylierung des intrazellulären Adaptermoleküls Disabled-1 mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Reelin-Bindung an ApoER2 sowie VLDL-Rezeptoren vermittelt eine Dab1-Phosphorylierung. Maus-Mutanten mit Substitution der Tyrosinstellen durch Phenylalanin zeigten einen Phänotyp ähnlich dem Reeler - somit ist die Dab1-Phosphorylierung essentiell für die Induktion von Reelin-Effekten (Howell et al. 2000).

Es wurden über zwei verschiedene Antikörper sowohl Proteinmengen des unphosphorylierten als auch phosphorylierten Dab1 (pDab1) ermittelt und anschließend das Verhältnis von pDab1 zu unphosphoryliertem Dab1 berechnet. Die Ergebnisse der weiblichen hippocampalen Slice-Kulturen sind in Abbildung 9 C,D,E sowie in der tabellarischen Übersicht in Tabelle 2 dargestellt. In keiner Behandlungsgruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Menge des unphosphorylierten Dab1-Proteins (siehe Abbildung 9 A und C). Über einen Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper (4G10) konnte auf Höhe der Dab1-Bande bei etwa 80kDa das phosphorylierte Dab1 detektiert und semiquantitativ gemessen werden (siehe Abbildung 9 B). Nach Östrogen-Behandlung zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung auf Höhe der Dab1-Bande ($1,55 \pm 0,21$; $n=2$; $p=0,047$ nach Bonferroni, signifikant). Nach Korrelation mit dem ebenfalls ermittelten Dab1-Gehalt der Proben zeigte sich eine nicht mehr signifikante Steigerung der Phosphorylierung ($1,30 \pm 15$ -fach der Kontrolle). Auch unter GnRH-Behandlung zeigte sich eine leicht vermehrte Phosphorylierung ($1,19 \pm 0,07$; $n=2$; $p=1,000$ nach Bonferroni, nicht signifikant). Nach Korrelation mit dem enthaltenen Dab1 der Proben ergab sich eine nicht-signifikante Steigerung der Dab1-Phosphorylierung um den Faktor $1,27 \pm 0,18$. Nach BDNF-Behandlung zeigte sich keine Veränderung der Dab1-Phosphorylierung. Eine Behandlung mit zugefügtem rekombinanten Reelin führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von Dab1 ($1,48 \pm 0,13$; $n=2$; $p=0,127$ nach Bonferroni, nicht signifikant). Nach Korrelation mit dem Dab1-Gehalt der Proben zeigte sich eine Erhöhung der Dab1-Phosphorylierung um den Faktor $1,63 \pm 0,29$ verglichen mit der Kontrolle (nicht signifikant).

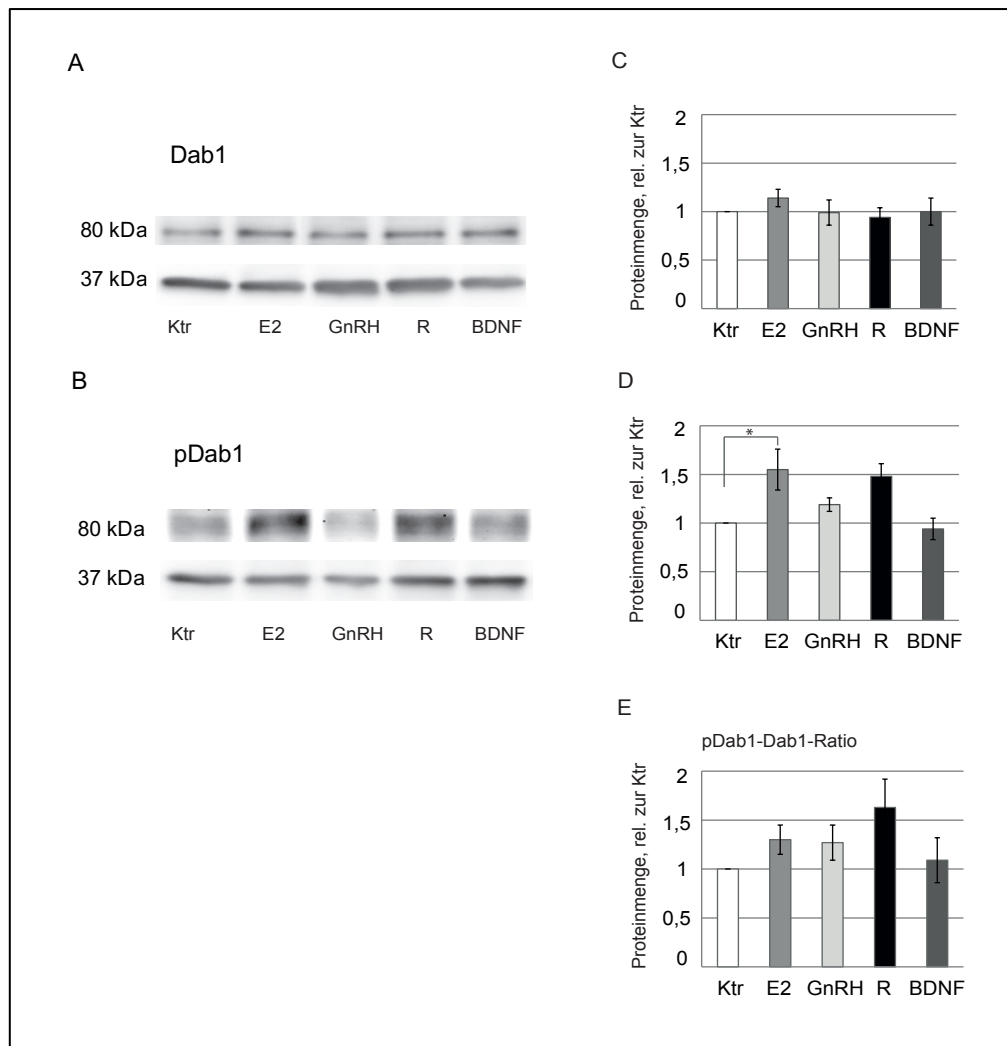


Abbildung 9: Effekte auf die Dab1-Phosphorylierung in weiblichen hippocampalen Slice-Kulturen. Hippokampale Slice-Kulturen weiblicher P5-Ratten wurden über insgesamt sechs Tage mit Östrogen (E2), GnRH, Reelin (R) oder BDNF stimuliert bzw. Kontroll-behandelt (Kontrollgruppe; Ktr) und das Gewebe anschließend lysiert für die weiteren Western-Blot-Analysen. n= 6 Blots aus 2 Slice-Kulturen.

- (A) Repräsentativer Western Blot zur Detektion von Dab1 bei 80 kDa in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Als Kontrolle diente GAPDH bei ~37 kDa.
- (B) Repräsentativer Western Blot zur Detektion des Gehalts an phosphoryliertem Protein auf Höhe der Dab1-Bande bei 80 kDa (pDab1). Als Kontrolle diente erneut GAPDH bei ~37 kDa. Östrogen-Behandlung zeigt vermehrte Phosphorylierung auf Höhe der Dab1-Bande. Zusätzlich ist eine Reelin-Behandlung aufgeführt, diese zeigt verstärkte pDab1-Proteinexpression.
- (C) Balkendiagramm mit Vergleich der Dab1-Proteinmengen in den verschiedenen Behandlungsgruppen über Western-Blot-Analysen. Dab1-Mengen wurden zur GAPDH-Menge einer Probe relativiert und für die Ergebnisdarstellung ins Verhältnis zur Kontrollgruppe gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler.
- (D) Balkendiagramm mit Vergleich des phosphorylierten Dab1 (pDab1). Darstellung wie in (C). Östrogen-Behandlung führt zu signifikant vermehrter pDab1-Proteinexpression. Reelin-Behandlung zeigt eine nicht signifikante Steigerung ($p=0,127$; Bonferroni).
- (E) Balkendiagramm zum Vergleich der pDab1-Dab1-Ratio ermittelt aus den Einzelergebnissen der Western-Blot-Analysen.

Tabelle 2: Western-Blot-Analysen zur Dab1-Phosphorylierung aus den Daten aus Abbildung 9. Angaben relativ zur Kontrolle.

		Dab1	4G10	4G10/Dab1
Kontrolle	Mittelwert	1,00	1,00	1,00
	Standardfehler des Mittelwertes	,00	,00	,00
Östrogen	Mittelwert	1,14	1,55	1,30
	Standardfehler des Mittelwertes	,09	,21	,15
GnRH	Mittelwert	,99	1,19	1,27
	Standardfehler des Mittelwertes	,13	,07	,18
Reelin	Mittelwert	,94	1,48	1,63
	Standardfehler des Mittelwertes	,10	,13	,29
BDNF	Mittelwert	1,00	,94	1,09
	Standardfehler des Mittelwertes	,14	,11	,23
p-Wert	ANOVA	,713	,007	,246

In männlichen Slice-Kulturen zeigten sich in den verschiedenen Behandlungsgruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Dab1-Proteinexpression (siehe Abbildung 10 und Tabelle 3. $p=0,671$; ANOVA). Die Östrogen-Behandlung führte in der Tendenz zu einer leicht verminderten Phosphorylierung auf Höhe der Dab1-Bande sowie einer Reduktion des Verhältnisses von pDab1 zu Dab1 (nicht signifikant, $0,85 \pm 0,14$ der Kontrolle; $p=0,333$; Bonferroni). GnRH-behandelte Slices zeigten beim Vergleich mit der Kontrolle einen leicht reduzierten Dab1-Gehalt ($0,92 \pm 0,14$ der Kontrolle) sowie eine zur Kontrolle gleich starke Phosphorylierung auf Höhe der Dab1-Bande ($0,99 \pm 0,17$). Das Verhältnis von pDab1 zu Dab1 ergab somit eine in der Tendenz leichte Erhöhung verglichen mit der Kontrolle ($1,23 \pm 0,29$ -fach der Kontrolle). BDNF-Behandlung bewirkte keinen wesentlichen Unterschied in der Dab1-Proteinexpression zur Kontrolle. Die Phosphorylierung auf Dab1-Höhe war dagegen im Mittel leicht erhöht ($1,22 \pm 0,30$), das Verhältnis von pDab1 zu Dab1 lag bei $1,13 \pm 0,23$ und war nicht signifikant verändert. Reelin-Behandlung führte im Mittel zu einer geringen Steigerung der Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($1,24 \pm 0,29$ -fach der Kontrolle). Nach Korrelation mit dem entsprechenden Dab1-Gehalt der Proben zeigte sich eine nicht signifikant vermehrte Phosphorylierung ($1,28 \pm 0,34$).

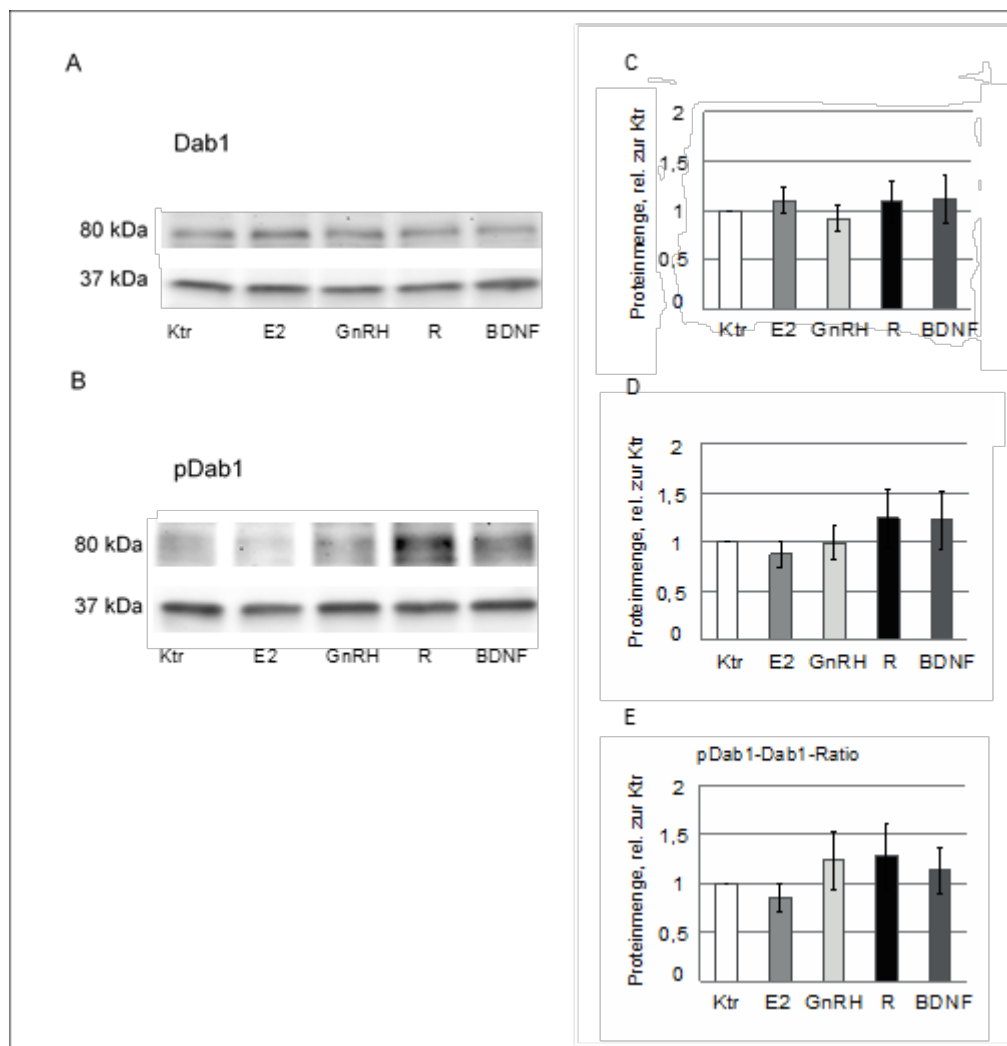


Abbildung 10: Effekte auf die Dab1-Phosphorylierung in männlichen hippocampalen Slice-Kulturen.

Hippokampale Slice-Kulturen männlicher P5-Ratten wurden über insgesamt sechs Tage mit Östrogen (E2), GnRH, Reelin (R) oder BDNF stimuliert bzw. Kontroll-behandelt (Kontrollgruppe; Ktr) und das Gewebe anschließend lysiert für die weiteren Western-Blot-Analysen. n= 6 Blots aus 2 Slice-Kulturen.

- (A) Repräsentativer Western Blot zur Detektion von Dab1 bei 80 kDa in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Als Kontrolle diente GAPDH bei ~37 kDa.
- (B) Repräsentativer Western Blot zur Detektion des Gehalts an phosphoryliertem Dab1-Protein bei 80 kDa (pDab1). Als Kontrolle diente erneut GAPDH bei ~37 kDa. Reelin-Behandlung zeigt eine verstärkte nicht signifikante pDab1-Proteinexpression.
- (C) Balkendiagramm mit Vergleich der Dab1-Proteinmengen in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Dab1-Mengen wurden zur GAPDH-Menge einer Probe relativiert und für die Ergebnisdarstellung ins Verhältnis zur Kontrollgruppe gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Kein Unterschied unter den Gruppen.
- (D) Balkendiagramm mit Vergleich des phosphorylierten Dab1 (pDab1). Darstellung wie in (C). Reelin- und BDNF-Behandlung führen jeweils zu nicht signifikant vermehrter pDab1-Proteinexpression.
- (E) Balkendiagramm zum Vergleich der pDab1-Dab1-Ratio ermittelt aus den Einzelergebnissen der Western-Blot-Analysen. Kein signifikanter Unterschied unter den Gruppen.

Tabelle 3: Western-Blot-Analysen zur Dab1-Phosphorylierung aus den Daten aus Abbildung 10. Angaben relativ zur Kontrolle.

		Dab1	4G10	4G10/Dab1
Kontrolle	Mittelwert	1,00	1,00	1,00
	Standardfehler des Mittelwertes	,00	,00	,00
Östrogen	Mittelwert	1,10	,87	,85
	Standardfehler des Mittelwertes	,13	,13	,14
GnRH	Mittelwert	,92	,99	1,23
	Standardfehler des Mittelwertes	,14	,17	,29
Reelin	Mittelwert	1,09	1,24	1,28
	Standardfehler des Mittelwertes	,14	,29	,34
BDNF	Mittelwert	1,12	1,22	1,13
	Standardfehler des Mittelwertes	,24	,30	,23
p-Wert	ANOVA	,713	,007	,246

3.3 Vergleiche zur CREB-Phosphorylierung im Hippokampus der Reeler-Maus

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Reelin-Expression und dem Transkriptionsfaktor CREB zu untersuchen, wurden mittels Western-Blot-Analysen Vergleiche des Proteingehalts an phosphoryliertem CREB (pCREB) durchgeführt. Die homozygote Reeler-Mutante exprimiert kein Reelin (D’Arcangelo et al. 1995), Heterozygote Reelermäuse exprimieren 50% des Reelingehalts einer Wildtyp-Maus (D’Arcangelo et al. 1995). Wildtypen exprimieren in der Regel bei Geburt noch hohe Mengen an Reelin, die ab P5 stetig abnehmen (D’Arcangelo et al. 1995).

In dieser Arbeit wurden semiquantitative Bestimmungen des CREB und pCREB-Gehalts in Hippokampi dieser drei Genotypen durchgeführt, die Vergleiche erfolgten an P0- bis P2-Mäusen. Es wurde zwischen Gewebe männlicher und weiblicher Tiere unterschieden und separate Vergleiche wurden durchgeführt.

Tabelle 4 zeigt in tabellarischer Übersicht die Ergebnisse für CREB, pCREB und die pCREB-CREB-Ratio, wobei die Darstellung im Verhältnis zum Wildtypen erfolgt.

Im Vergleich zum Wildtypen zeigten Reeler-Hippokampi einen sehr gering erhöhten Gehalt an CREB (Reeler: $1,19 \pm 0,08$; $p=0,200$, Mann-Whitney-U-Test). In

Heterozygoten war die CREB-Expression um den Faktor $1,55 \pm 0,20$ im Vergleich zum Wildtypen erhöht (siehe Abbildung 11 A und C sowie Tabelle 4), dies erwies sich

jedoch als ein nicht signifikanter Unterschied ($n = 3$ Tiere je Gruppe; $p=0,100$, Mann-Whitney-U-Test).

Auch das Level der Phosphorylierung des CREB Proteins, das laut Literatur (Mayr und Montminy 2001; Sands und Palmer 2008) den Grad der Aktivierung dieses Proteins widerspiegelt unterschied sich nicht unter den verschiedenen Genotypen ($p=0,957$, Kruskal-Wallis-Test). Wurde phosphoryliertes und unphosphoryliertes CREB zueinander ins Verhältnis gesetzt (pCREB-CREB-Ratio), zeigten sich in der statistischen Datenanalyse keine Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,393$, Kruskal-Wallis-Test).

Abb. 11

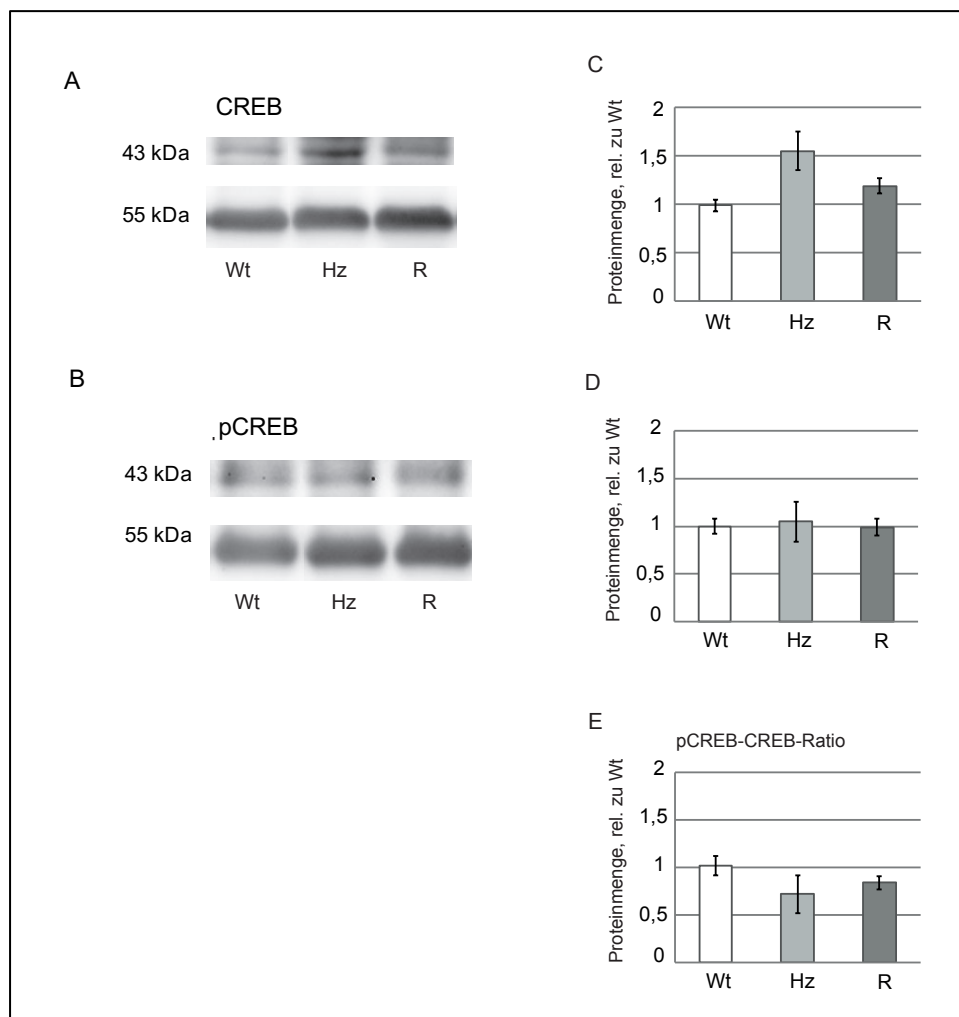


Abbildung 11: Western-Blot-Analysen zur CREB-Phosphorylierung in der weiblichen Reeler-Mutante.

- (A) Repräsentativer Western Blot. Vergleich Wildtyp (Wt), Heterozygoter Reeler (Hz) und homozygoter Reeler (R) hinsichtlich der CREB-Proteinmenge bei 38 kDa in Hippokampus-Lysaten im Alter P0-2.
- (B) Repräsentativer Blot. Vergleich innerhalb der gleichen Tiere hinsichtlich der Phosphorylierung von CREB auf Höhe der 34 kDa-Bande.
Als Kontrolle diente in (A) und (B) jeweils die α -Tubulin-Bande bei 55 kDa.
- (C) Balkendiagramm mit Vergleich der CREB-Menge unter den drei Genotypen im Verhältnis zum Wildtypen. Gemessen wurde die optische Dichte mittels ImageJ und anschließend relativiert gegen die jeweilige α -Tubulin-Menge der Probe. Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. $n=3$ Tiere je Gruppe.
- (D) Balkendiagramm mit Vergleich der jeweiligen pCREB-Mengen unter den drei Genotypen im Verhältnis zum Wildtypen.
- (E) Balkendiagramm mit Vergleich der ermittelten pCREB-CREB-Ratio unter den drei Genotypen.

Tabelle 4: Western-Blot-Analysen zur CREB-Phosphorylierung in weiblichen Hippokampi relativ zum Wildtypen.

Genotyp		pCREB	CREB	pCREB/CREB
Wildtyp	Mittelwert	1,00	0,99	1,02
	Standardfehler des Mittelwertes	,08	,06	,10
Heterozygot	Mittelwert	1,05	1,55	0,72
	Standardfehler des Mittelwertes	,21	,20	,20
Reeler	Mittelwert	0,99	1,19	0,84
	Standardfehler des Mittelwertes	,09	,08	,07

Im Folgenden sollen auch die Ergebnisse der Gewebeproben von männlichen Reeler-, heterozygoten und Wildtyp- Mäusen vorgestellt werden. Wie in Abbildung 12 C und Tabelle 5 ersichtlich, unterschied sich der Gehalt an dem Gesamt-CREB im Mittel nicht wesentlich zwischen Reeler- und Wildtyp Mäusen. Heterozygote Reeler zeigten dagegen einen geringeren Gesamtanteil des Transkriptionsfaktors ($0,61 \pm 0,14$ relativ zum Wildtypen), dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,100$, Mann-Whitney-U-Test).

Zusätzlich erfolgten Auswertungen der Mengen an phosphoryliertem CREB. Dieses war in der Tendenz im Reeler gering erhöht im Vergleich zum Wildtyp ($1,13 \pm 0,13$

relativ zum Wildtyp; $p=0,700$, Mann-Whitney-U-Test). In der pCREB-CREB-Ratio zeigte sich im Reeler ein nicht-signifikanter leicht vermehrter pCREB-Anteil im Vergleich zum Wildtypen ($1,16 \pm 0,18$; $p=0,700$, Mann-Whitney-U-Test). Im heterozygoten Reeler war die pCREB-Expression leicht vermindert verglichen zum Wildtypen ($0,82 \pm 0,22$). Nach Korrelation mit dem entsprechenden ebenfalls verringerten Gesamt-CREB-Gehalt der Proben ergab sich ein verstärkt phosphorylierter CREB-Anteil in Heterozygoten verglichen zum Wildtypen (siehe Abbildung 12 E; $1,32 \pm 0,08$) Dieser Unterschied erreichte nicht das Signifikanzniveau ($p=0,100$, Mann-Whitney-U-Test).

Abb. 12

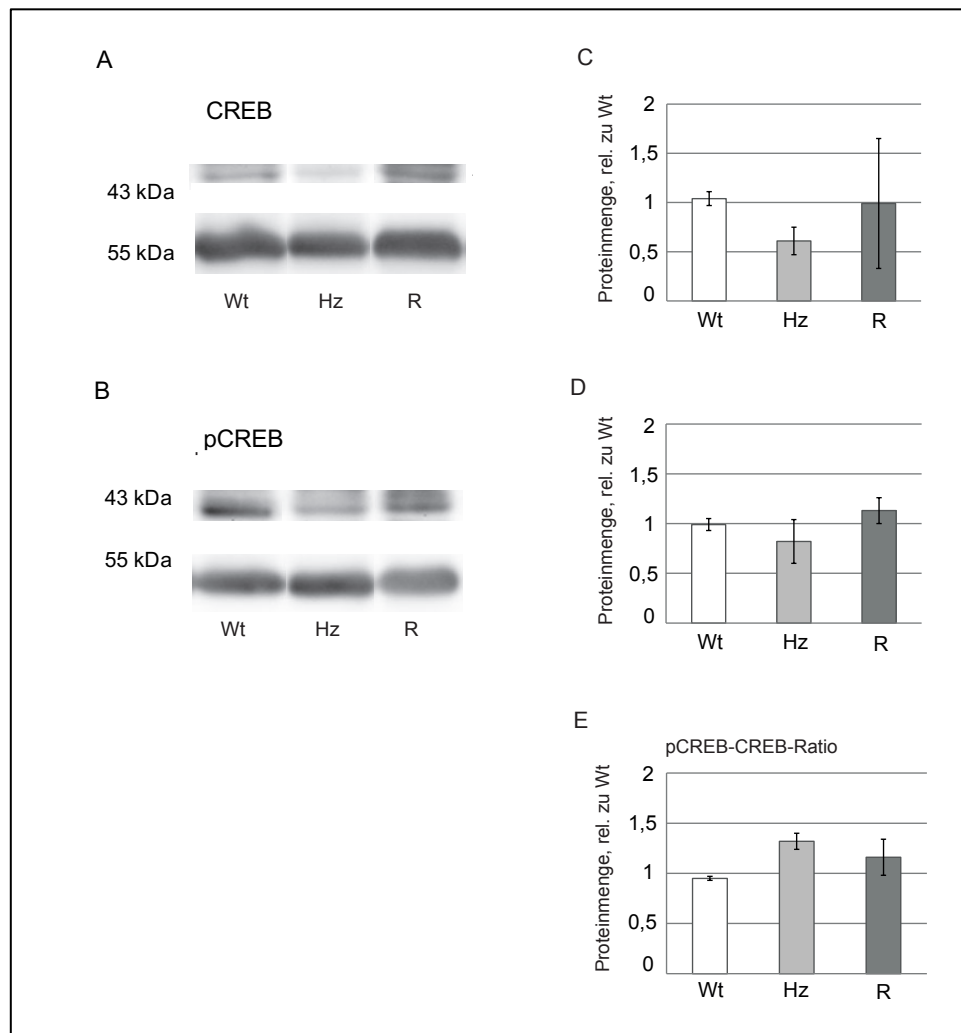


Abbildung 12: Western-Blot-Analysen zur CREB-Phosphorylierung in der männlichen Reeler-Mutante.

- (A) Repräsentativer Western Blot. Vergleich Wildtyp (Wt), Heterozygoter Reeler (Hz) und homozygoter Reeler (R) hinsichtlich der CREB-Proteinmenge bei 38 kDa in Hippokampus-Lysaten im Alter P0-2.
- (B) Repräsentativer Blot. Vergleich innerhalb der gleichen Tiere hinsichtlich der Phosphorylierung von CREB auf Höhe der 34 kDa-Bande.
Als Kontrolle diente in (A) und (B) jeweils die α -Tubulin-Bande bei 55 kDa.
- (C) Balkendiagramm mit Vergleich der CREB-Menge unter den drei Genotypen im Verhältnis zum Wildtypen. Gemessen wurde die optische Dichte mittels ImageJ und anschließend relativiert gegen die jeweilige α -Tubulin-Menge der Probe. Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. n=3 Tiere je Gruppe.
- (D) Balkendiagramm mit Vergleich der jeweiligen pCREB-Mengen unter den drei Genotypen im Verhältnis zum Wildtypen.
- (E) Balkendiagramm mit Vergleich der ermittelten pCREB-CREB-Ratio unter den drei Genotypen.

Tabelle 5: Western-Blot-Analysen zur CREB-Phosphorylierung in männlichen Hippokampi relativ zum Wildtypen.

Genotyp		CREB	pCREB	pCREB/CREB
Wildtyp	Mittelwert	1,04	,99	0,95
	Standardfehler des Mittelwertes	,07	,06	,02
Heterozygot	Mittelwert	0,61	,82	1,32
	Standardfehler des Mittelwertes	,14	,22	,08
Reeler	Mittelwert	0,99	1,13	1,16
	Standardfehler des Mittelwertes	,66	,13	,18

3.4 Auswirkungen auf die CREB- und Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen hippocampaler Slice-Kulturen visualisiert mit immunhistochemischen Methoden

Zur Messung von behandlungsabhängigen Alterationen der pCREB- und Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen wurden hippocampale Slice-Kulturen angelegt und wie in den vorangegangenen Experimenten behandelt.

Immunofluoreszenzfärbungen wurden an den kryokonservierten Schnitten durchgeführt, diese sind in Abbildung 13 in einer Übersichtsaufnahme zu sehen.

Cajal-Retzius-Zellen wurden anhand der Reaktivität mit dem CR50-Antikörper sowie der typischen Morphologie zur Unterscheidung von ebenfalls Reelin-exprimierenden Interneuronen und ihrer Lokalisation in der äußeren Molekularschicht identifiziert (siehe Abbildung 13 C). Phosphoryliertes CREB wurde mittels eines in der Literatur gut etablierten Antikörpers markiert, der nachweislich das aktivierte intranukleäre CREB-Protein markiert (Mayr und Montminy 2001; Sands und Palmer 2008), eine Dapi-Kernfärbung sicherte die ausschließlich intranukleäre Messung (siehe Abbildung 13B). Die intranukleäre Intensität wurde anschließend mit Hilfe des Programms ImageJ quantitativ gemessen.

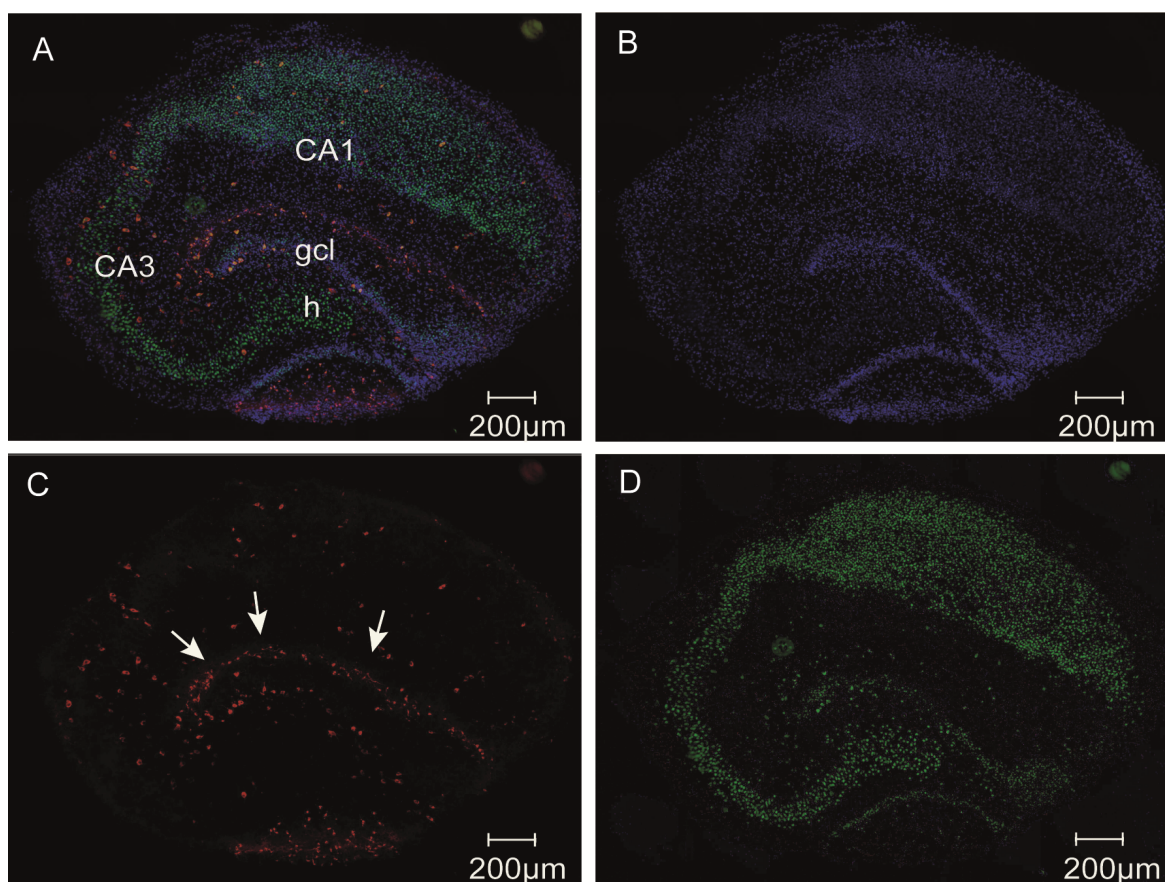


Abbildung 13: Exemplarische Übersichtsaufnahmen eines Hippokampus-Schnittes aus hippocampaler Slice-Kultur von weiblichen P5-Ratten. Immunofluoreszenz-Färbungen.

20-fache Vergrößerung, mit einem Keyence-Mikroskop aufgenommen

- (A) Überlagerung der Färbungen aus den drei Kanälen in (B), (C) und (D). Beschriftung der verschiedenen Regionen. CA1, CA3, gcl Körnerzellschicht, h Hilus.
- (B) Dapi-Färbung zur Markierung der Zellkerne.
- (C) Färbung mit einem Primärantikörper gegen Reelin (CR50) dargestellt in rot. Mit einem Pfeil markiert ist ein gut abgrenzbares Band aus Cajal-Retzius-Zellen in der äußeren Molekularschicht in Nähe des Körnerzellbandes. Hier erfolgten die Messungen unter Abschnitt 3.1.
- (D) Färbung mit einem Primärantikörper gegen pCREB dargestellt in grün. Es ist eine deutliche pCREB-Expression im Körnerzellband, Hilus und Pyramidenzellband der CA1- und CA3-Regio erkennbar.

3.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur pCREB-Expression in Cajal-Retzius-Zellen

Zunächst werden die erhobenen Ergebnisse der Experimente mit hippocampalen Slice-Kulturen weiblicher Tiere beschrieben.

Abbildung 14 zeigt Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop von mit dem CR-50-Antikörper markierten Cajal-Retzius-Zellen, unter den vier verschiedenen Behandlungen in kryokonservierten Schnitten. Mit Pfeilen markiert sind einzelne immunfluoreszenzmarkierte Cajal-Retzius-Zellen. Cajal-Retzius-Zellen in der Kontrollgruppe weisen intranukleär kaum eine Färbeintensität für pCREB auf, hier durch den Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 grün fluoreszierend dargestellt. Zum Vergleich sind Aufnahmen von mit BDNF und Östrogen behandelten Schnitten angefügt, welche vermehrt pCREB-positive Cajal-Retzius-Zellen zeigen.

Gemessen wurde die Integrated Density, also die optische Dichte für das pCREB-Signal einzelner Cajal-Retzius-Zellen. Insgesamt wurden aus drei unterschiedlichen Slice-Kultur-Experimenten mit jeweils vier verschiedenen Behandlungsgruppen insgesamt 1571 Zellen in allen Gruppen mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen und anschließend ausgewertet.

In Abbildung 15 ist die prozentuale mittlere Differenz zur Kontrollgruppe unter den drei Behandlungen als Balkendiagramm grafisch dargestellt, die Nulllinie entspricht der Kontrollgruppe. Unterhalb der Balken sind zusätzlich die geschätzten Mittelwerte mit den zugehörigen 95-Konfidenzintervallen gezeigt.

Die einfaktorielle Varianzanalyse erwies einen höchst signifikanten Unterschied unter den verschiedenen Behandlungsgruppen ($F(3; 1567)=34,42$; $p<0,001$). In der weiteren gruppenspezifischen Analyse zeigte die Östrogen-Behandlung eine Steigerung der pCREB-Immunreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen im Mittel um $57,43\pm 27,12\%$ zur Kontrollgruppe ($p=0,0011$, Bonferroni, hoch signifikant). Unter BDNF-Behandlung zeigte sich eine mittlere Differenz von $76,96\pm 24,1\%$ zur Kontrollgruppe ($p<0,001$; Bonferroni, höchst signifikant). In der GnRH-Gruppe zeigte sich eine Verringerung um $109,59\pm 8,86\%$ der pCREB-Expression in der Kontrollgruppe ($p=0,003$ nach Bonferroni, sehr signifikant).

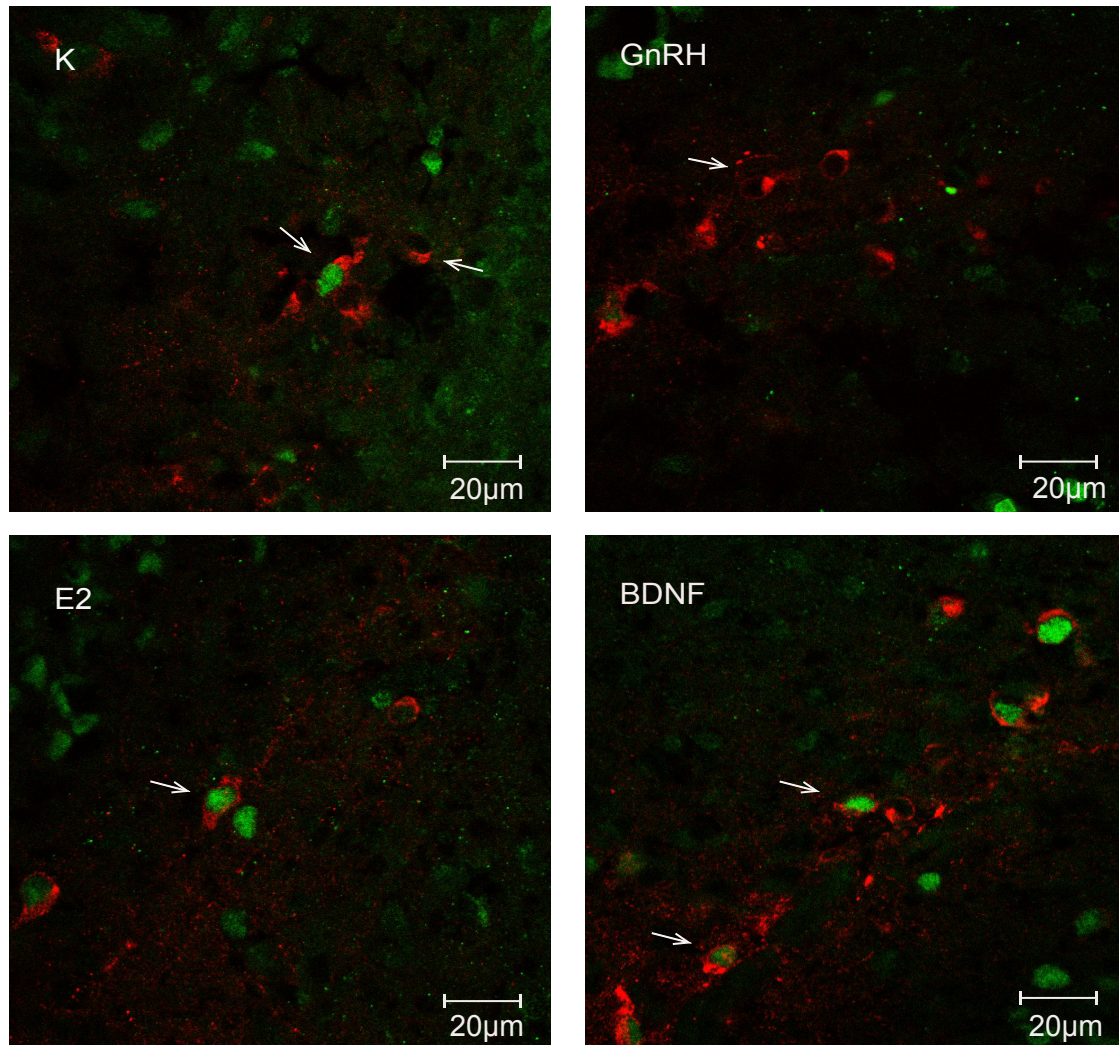


Abbildung 14: Immunreaktivität für den phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB in Cajal-Retzius Zellen des Hippokampus unter den verschiedenen Behandlungen.

Hippokampale Slice-Kulturen weiblicher P5-Ratten. n= 3 Slice-Kultur-Experimente. Je Stimulationsgruppe wurden 316 bis 453 Zellen ausgewertet.

Cajal-Retzius-Zellen in der äußeren Molekularschicht in 63-facher Vergrößerung mit dem Konfokalen Mikroskop aufgenommen. Immunofluoreszenzfärbungen für Reelin (rot) und pCREB (grün). Pfeile markieren einzelne Cajal-Retzius-Zellen.

In den 4 verschiedenen Aufnahme Kontrollgruppe (K), GnRH-Behandlung (GnRH), Östrogenbehandlung (E2), BDNF-Behandlung (BDNF).

Nach Östrogen- und BDNF-Behandlung zeigen sich vermehrt pCREB-exprimierende Cajal-Retzius-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Gruppe und nach GnRH-Behandlung.

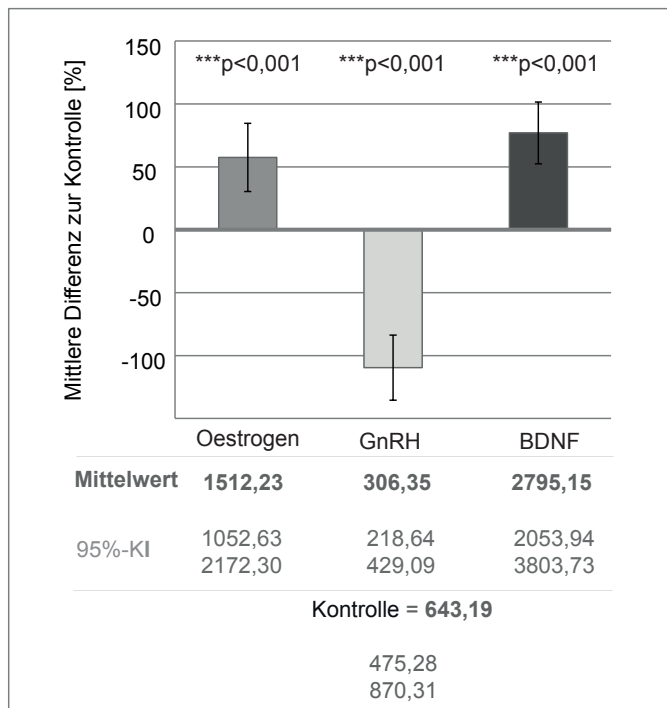


Abbildung 15: Vergleiche zur Immunreaktivität für den phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB in Cajal-Retzius Zellen des Hippokampus unter den verschiedenen Behandlungen. Hippokampale Slice-Kulturen weiblicher P5-Ratten. n= 3 Slice-Kultur-Experimente. Je Stimulationsgruppe wurden 316 bis 453 Zellen ausgewertet. Graphische Darstellung der Mittleren Differenzen mit zugehörigen Standardfehlern der geschätzten Kontraste zur unbehandelten Kontrollgruppe in Prozent für die pCREB-Färbung in Cajal-Retzius-Zellen. Die Nulllinie spiegelt die Kontrollgruppe wieder. Unterhalb der Balken sind die geschätzten Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall gezeigt. Angabe der p-Werte, Bonferroni. Östrogen- und BDNF-Behandlung zeigen gegenüber der Kontrollgruppe höchst signifikant vermehrte pCREB-Intensität. GnRH bewirkt eine höchst signifikante Reduktion derselben.

Um eine differenziertere Aussage über die Veränderung der CREB-Phosphorylierung in den einzelnen Cajal-Retzius-Zellen unter den Behandlungen ermöglichen zu können und den Effekt von Ausreißern zu minimieren, erfolgte eine Einteilung der Färbeintensität in drei Gruppen als schwach, mittelstark und stark pCREB-immunreaktiv durch eine Kategorisierung der ermittelten Messwerte mittels ImageJ. Eine Übersicht der prozentualen Anteile in den verschiedenen Behandlungsgruppen stellt Abbildung 16 dar. Es wurde eine ordinale Regressionsanalyse durchgeführt, um Effekte der Behandlungen zu prüfen. Die Vorzeichen und Höhe der ermittelten Koeffizienten erlauben Aussagen über die Wirkungsrichtung und Wirkungsstärke der untersuchten Einflussvariablen in Betrachtung der unbehandelten Kontrollgruppe. In allen Behandlungsgruppen wurde der größte Anteil der ausgewerteten Zellen als schwach pCREB-immunreaktiv eingeordnet (62,37% bis maximal 84,07% der Zellen). Unter Behandlung mit Östrogen erhöhte sich der Anteil stark pCREB-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. So wurden $15,67 \pm 3,94\%$ der Zellen in der Östrogengruppe als stark gefärbt gewertet, der Anteil in der Kontrollgruppe

betrug $8,77 \pm 4,15\%$. In der Regressionsanalyse zeigte sich ein Koeffizient von 0,237, somit ist eine Verschiebung zu stärker gefärbten Zellen deutlich ($p=0,006$; sehr signifikant). Unter Behandlung mit BDNF zeigten 37,63% der Zellen eine mittelstarke oder starke pCREB-Immunfärbung im Vergleich zu 19,00% in der Kontrollgruppe. $15,5 \pm 2,27\%$ waren stark pCREB-exprimierend, den größten Anteil bildeten die mittelstark exprimierenden Zellen mit $22,13 \pm 4,16\%$, in der Kontrollgruppe waren $10,23 \pm 5,55\%$ der Zellen mittelstark pCREB-immunoreaktiv. Der Koeffizient in der BDNF-Gruppe lag bei 0,397, somit war hier ein noch größerer Einfluss auf die Kontrollgruppe nachweisbar ($p<0,001$; höchst signifikant). Dagegen zeigte die GnRH-Behandlung nur sehr wenige mittelstark und stark gefärbte Cajal-Retzius-Zellen. $7,87 \pm 6,61\%$ waren hier stark gefärbt. In der GnRH-Gruppe fanden sich die meisten schwach pCREB-immunopositiven Zellen im Gruppenvergleich ($84,07 \pm 4,45\%$). Der Koeffizient war in der GnRH-Gruppe negativ und lag bei -0,091, beschreibt somit einen negativen Einfluss auf die pCREB-Immunfärbung verglichen mit keiner Behandlung ($p=0,264$; nicht signifikant).

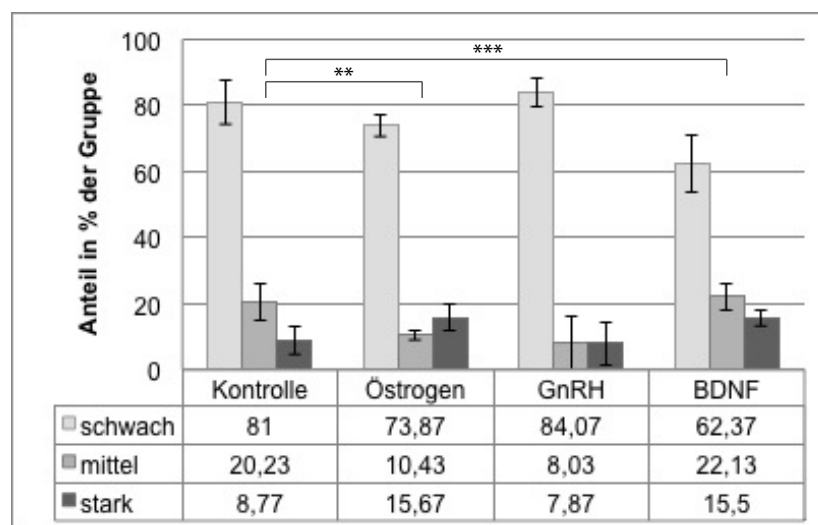


Abbildung 16: Intensität der pCREB-Expression in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus weiblicher neugeborener P5-Ratten. n=3 Slice-Kultur-Experimente.

%-Anteil pCREB-positiver CR-Zellen eingestuft nach Färb-Intensität (schwach, mittel, stark) in den verschiedenen Behandlungs-Gruppen als Mittelwerte aus drei Experimenten $\pm$ Standardfehler. %Behandlungsgruppe Es zeigen sich sehr bzw. höchst signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe unter Östrogen- und BDNF-Behandlung in der Verteilung zu den Färbintensitätsklassen.

Ebenso wurden entsprechende Analysen an männlichen hippocampalen Slice-Kulturen durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse zur pCREB-

Immunfärbung unter den verschiedenen Behandlungen in Cajal-Retzius-Zellen als mittlere Differenzen bezogen auf die Kontrollgruppe entsprechend der Nulllinie dargestellt. Unterhalb der Graphik sind erneut die geschätzten Mittelwerte mit den zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Insgesamt wurden 1936 Cajal-Retzius-Zellen mit dem Konfokalen Mikroskop aufgenommen und ausgewertet. Stimulation mit BDNF zeigte eine deutlich positive mittlere Differenz der pCREB-Immunreaktivität zur Kontrollgruppe von $67,04 \pm 28,15\%$ ($p < 0,001$; Bonferroni, höchst signifikant). Östrogen-Behandlung führte anders als bei den weiblichen Neuronen zu einer signifikanten Verminderung der pCREB-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($-126,60 \pm 29, \%$; $p = 0,004$, Bonferroni, hoch signifikant). Unter GnRH-Behandlung zeigte sich eine ähnliche pCREB-Expression wie in der Kontrollgruppe ($p = 0,980$, Bonferroni, nicht signifikant).

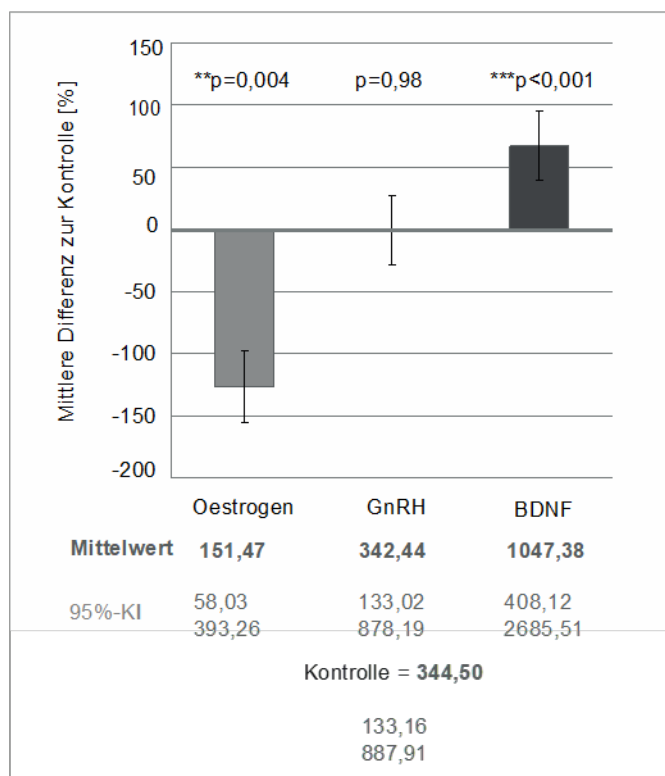


Abbildung 17: Immunreaktivität für den phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus unter den verschiedenen Behandlungen. Hippokampale Slice-Kulturen männlicher P5-Ratten, Immunhistochemische Auswertungen. $n=3$ Slice-Kultur-Experimente. Je Stimulationsgruppe wurden 481 bis 521 Zellen ausgewertet. Graphische Darstellung der Mittlere Differenzen mit zugehörigen Standardfehlern der geschätzten Kontraste zur Kontrollgruppe in Prozent für die pCREB-Färbung in Cajal-Retzius-Zellen. Die Nulllinie spiegelt die Kontrollgruppe wieder. Unterhalb der Balken sind die geschätzten Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall gezeigt. Angabe der p-Werte, Bonferroni. Östrogenbehandlung zeigt eine signifikante Reduktion der pCREB-Färbintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe. BDNF-Behandlung zeigt eine höchst signifikante Steigerung der pCREB-Immunreaktivität verglichen mit der Kontrolle.

Hiermit übereinstimmend zeigten sich in der Graduierung der ausgewerteten Zellen in drei Intensitätsgrade entsprechende Veränderungen. Diese sind in der Übersicht in

Abbildung 18 gezeigt. In allen vier Gruppen war der größte Teil der ausgewerteten Zellen schwach pCREB-immunopositiv (76,67% bis maximal 82,63%). Unter BDNF-Behandlung war der Anteil mittelstark pCREB-immunopositiver Zellen um 40% im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ($14,37 \pm 7,88\%$). Der Koeffizient von 0,179 in der Regressionsanalyse spiegelt die eine Einflussstärke der BDNF-Behandlung wieder ($p=0,016$; signifikant). Östrogen- und GnRH-Behandlungen zeigten dagegen keine größeren Unterschiede zur Kontrollgruppe in der Verteilung zwischen schwach, mittelstark und stark pCREB-exprimierenden Zellen. Der Koeffizient für die Östrogen-Behandlung lag bei 0,085, somit war hier keine starke Beeinflussung in der pCREB-Expression nachweisbar ($p=0,269$; nicht signifikant). Unter GnRH-Behandlung lag der Koeffizient bei 0,065 ($p=0,378$; nicht signifikant).

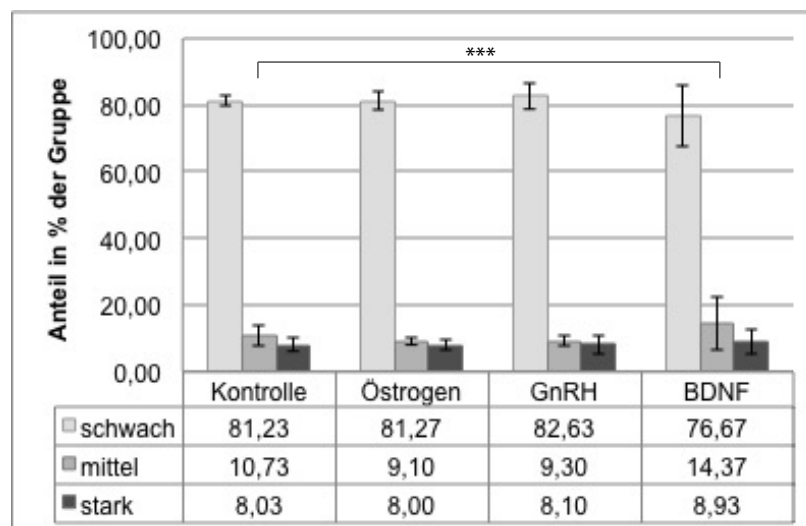


Abbildung 18: Intensität der pCREB-Expression in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus männlicher neugeborener P5-Ratten.

n=3 Slice-Kultur-Experimente.

%-Anteil pCREB-positiver CR-Zellen eingestuft nach Färb-Intensität (schwach, mittel, stark) in den verschiedenen Behandlungs-Gruppen als Mittelwerte aus drei Experimenten $\pm$ Standardfehler. Es zeigt sich ein höchst signifikanter Unterschied zwischen BDNF-Behandlung und Kontrollgruppe, jedoch keine signifikanten Unterschiede für die anderen Behandlungen.

Anhand der vorliegenden Daten ist in vitro eine vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB nach BDNF-Behandlung in Cajal-Retzius-Zellen sowohl weiblicher, als auch männlicher P5-Ratten-Hippokampi nachweisbar. Eine vermehrte Phosphorylierung durch die Wirkung von Östrogen zeigte sich dagegen nur in Cajal-

Retzius-Zellen Hippokampaler Slice-Kulturen weiblicher Tiere. GnRH führte in Cajal-Retzius-Zellen weiblicher Hippokampi zu einer verringerten pCREB-Expression, in Cajal-Retzius-Zellen männlicher Tiere war hingegen kein Effekt nachweisbar.

3.4.2 Immunhistochemische Untersuchungen zur Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen

Zusätzlich erfolgten Messungen der Reelin-Expression mit Hilfe des CR50-Antikörpers an den untersuchten Cajal-Retzius-Zellen der hippokampalen Slice-Kulturen. Wieder erfolgt zunächst die Ergebnisdarstellung aus den Versuchen mit hippokampalen Slice-Kulturen weiblicher P5-Ratten. Für die statistische Datenanalyse erfolgte erneut eine Transformation mittels Logarithmieren und anschließende Rücktransformation für die Ergebnisdarstellung.

Abbildung 19 stellt diese als prozentuale mittlere Differenzen zur Kontrollgruppe unter den verschiedenen Behandlungsgruppen dar. Zusätzlich sind die geschätzten Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall zu sehen. Bei $F(3;1567)=1567$; $p<0,001$ bestanden deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Über die paarweise Kontrastanalyse wurden mittlere Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen ermittelt. Stimulationen mit Östrogen und GnRH führten zu einer mittleren Differenz von $62,01\pm13,88\%$ und $56,96\pm13,09\%$ zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Reelin-Immunreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen. Diese waren höchst signifikant (jeweils $p<0,001$, Bonferroni). BDNF-Behandlung bewirkte keinen wesentlichen Unterschied in der Reelin-Signalintensität der Cajal-Retzius-Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe ($p=0,097$, Bonferroni, nicht signifikant).

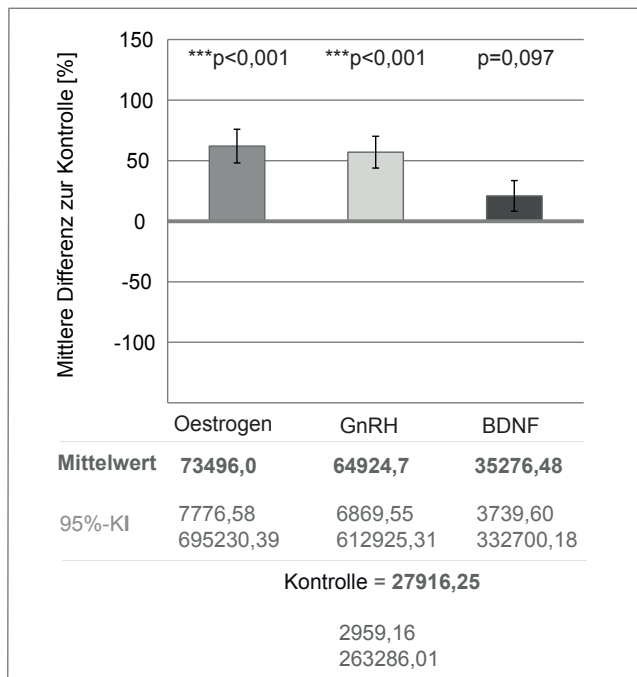


Abbildung 19: Quantifikation der Immunreaktivität für Reelin in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus. Hippokampale Slice-Kulturen weiblicher P5-Ratten. n=3 Slice-Kultur-Experimente. Je Gruppe wurden insgesamt 316 bis 453 Zellen ausgewertet. Behandlungen erfolgten über insgesamt 6 Tage. Graphische Darstellung der Mittleren Differenzen $\pm$ Standardfehlern der geschätzten Kontraste zur Kontrollgruppe in Prozent für die Reelin-Färbung in Cajal-Retzius-Zellen. Die Nulllinie spiegelt die Kontrollgruppe wieder. Unterhalb des Balkendiagramms sind die geschätzten Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall gezeigt. Angabe der p-Werte, Bonferroni. Östrogen- und GnRH-Behandlung zeigen einen positiven Effekt auf die Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen, wohingegen BDNF-Behandlung keinen signifikanten Unterschied in der Reelin-Expression zeigt.

Auch für die Reelin-Immunreaktivität wurde die Verteilung der Färbeintensitäten in den gebildeten drei Klassen (stark, mittel, schwach gefärbt) untersucht, in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Behandlungen wurde eine ordinale Regressionsanalyse durchgeführt. Es zeigte sich in der unbehandelten Kontrollgruppe eine gleichmäßige Verteilung zwischen schwach, mittelstark und stark Reelin-immunopositiven Zellen (siehe Abbildung 20). Dagegen war der Anteil stark Reelin-immunopositiver Zellen nach BDNF- und GnRH-Stimulation deutlich erhöht. GnRH hatte unter den drei Behandlungen den stärksten Effekt mit einem Koeffizienten von 0,527 ($p < 0,001$; höchst signifikant). Hier waren im Mittel nur 18,83% der Zellen schwach Reelin-exprimierend, den größten Anteil mit 45,47% bildeten stark Reelin-exprimierende Zellen. Der BDNF-Effekt war geringer, der Koeffizient betrug hier 0,209 ($p = 0,023$; signifikant). Östrogen-Stimulation führte zu einem höheren Anteil an mittelstark Reelin-exprimierenden Cajal-Retzius-Zellen (48% der Zellen) mit einem Koeffizienten von 0,440 ($p < 0,001$; höchst signifikant).

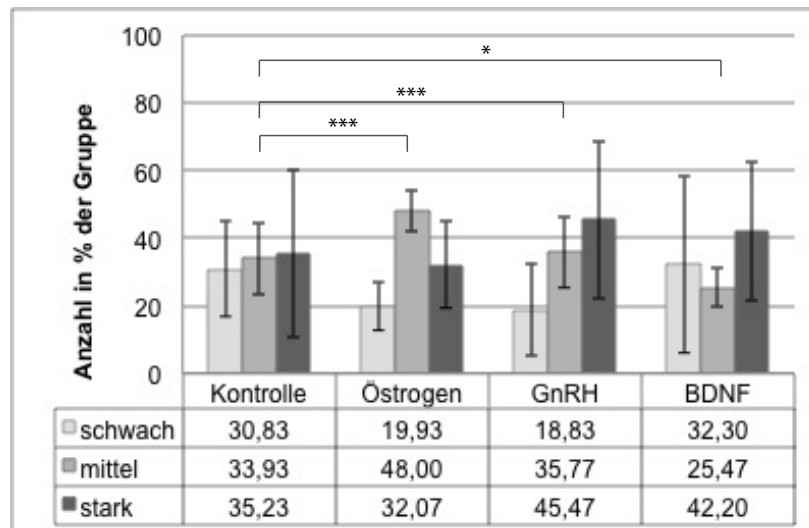


Abbildung 20: Intensität der Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus weiblicher neugeborener Ratten.

n=3 Slice-Kultur-Experimente.

%-Anteil Reelin-positiver CR-Zellen eingestuft nach Färb-Intensität (schwach, mittel, stark) in den verschiedenen Behandlungs-Gruppen als Mittelwerte aus drei Experimenten $\pm$ Standardfehler. Unter Östrogen- und GnRH-Behandlung zeigen sich höchst signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe in der Reelin-Expression der CR-Zellen. Ebenfalls bestehen sehr signifikante Unterschiede in der BDNF-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Auswertungen der Experimente mit Slice-Kulturen männlicher Tiere sind in Abbildung 21 dargestellt. Es zeigten sich jeweils höchst signifikante Reduktionen in der mittleren Differenz für die Reelin-Expression zwischen der Kontrollgruppe und mit Östrogen sowie GnRH behandelten Slice-Kulturen ($-73,67 \pm 9,52$ und $-82,21 \pm 9,09\%$; jeweils $p < 0,001$; Bonferroni, höchst signifikant). Zwischen der Kontroll- und BDNF-Gruppe ergab sich eine mittlere Differenz von $-46,23 \pm 9,20\%$ ($p < 0,001$; Bonferroni, höchst signifikant).

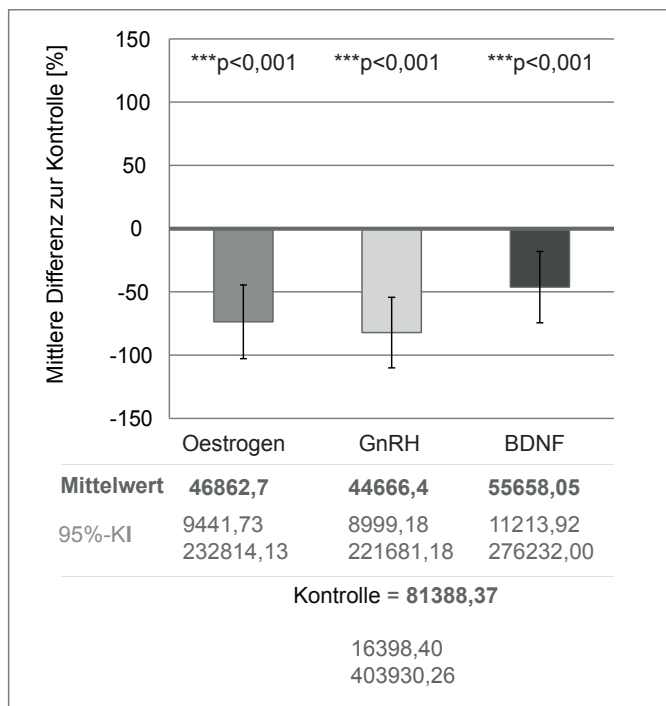


Abbildung 21: Quantifikation der Immunreaktivität für Reelin in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus. Hippokampale Slice-Kulturen männlicher P5-Ratten. n=3 Slice-Kultur-Experimente. Je Gruppe wurden insgesamt 481 bis 521 Zellen ausgewertet.

Behandlungen erfolgten über insgesamt 6 Tage.

Graphische Darstellung der Mittleren Differenzen $\pm$ Standardfehlern der geschätzten Kontraste zur Kontrollgruppe in Prozent für die Reelin-Färbung in Cajal-Retzius-Zellen. Die Nulllinie spiegelt die Kontrollgruppe wieder. Unterhalb des Balken sind die geschätzten Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall gezeigt. Angabe der p-Werte, Bonferroni.

Östrogen-, GnRH wie auch BDNF-Behandlung zeigen eine höchst signifikante Reduktion beim Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Auch bei Darstellung der Verhältnisse in der Klasseneinteilung nach der Färbeintensität zeigte sich in den drei Behandlungsgruppen ein geringerer Anteil stark Reelin-immunopositiver Cajal-Retzius-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 22), wobei ein größerer Teil der Zellen mittelstark Reelin-positiv war. In der Östrogen-Gruppe wurden nur $29,3 \pm 15,36\%$ der Cajal-Retzius-Zellen als stark Reelin-immungefärbt gewertet, wohingegen diese Gruppe $51,13 \pm 17,86\%$ der Kontrollgruppe ausmachte. Der Koeffizient betrug $-0,632$, war somit deutlich negativ ($p < 0,001$; höchst signifikant). Unter GnRH-Behandlung wurden nur $28,90 \pm 14,94\%$ als stark Reelin-immunopositive Cajal-Retzius-Zellen gezählt. Der Anteil der Zellen der schwach Reelin-positiven Gruppe war mit $27,80 \pm 16,42\%$ dagegen unter den verglichenen Gruppen am größten ($15,00 \pm 5,69\%$ in der Kontrollgruppe schwach gefärbt), dies spiegelte sich in dem Koeffizienten von $-0,638$ ebenfalls wieder ($p < 0,001$; höchst signifikant). In der BDNF-Gruppe betrug der Koeffizient $-0,609$ ($p < 0,001$; höchst signifikant), somit bestand auch hier eine Verschiebung hin zu geringerer Reelin-Immunreaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe.

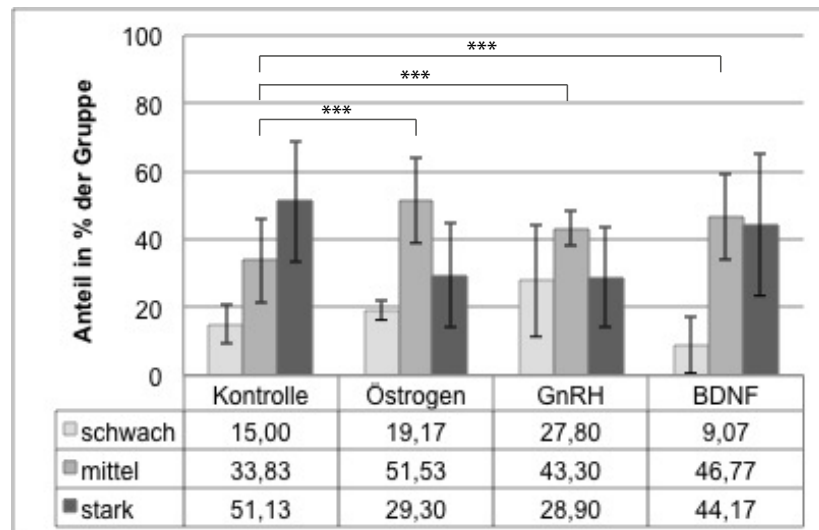


Abbildung 22: Intensität der Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus männlicher Ratten.

n=3 Slice-Kultur-Experimente.

%-Anteil Reelin-positiver CR-Zellen eingestuft nach Färb-Intensität (schwach, mittel, stark) in den verschiedenen Behandlungs-Gruppen als Mittelwerte aus drei Experimenten $\pm$ Standardfehler. Es zeigen sich höchst signifikante Unterschiede in der Reelin-Expression der CR-Zellen in allen drei Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigte sich in Cajal-Retzius-Zellen weiblicher Hippokampi eine positive Wirkung von Östrogen, BDNF und GnRH auf die Intensität der Reelin-Immunfärbung in Cajal-Retzius-Zellen. In Slice-Kulturen aus männlichen Tieren dagegen zeigten sich negative Effekte aller drei Behandlungen auf die Reelin-Immunreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen.

3.4.3 Korrelationen zwischen pCREB und Reelin

Da in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beeinflussung des Reelin-Signalwegs durch den Transkriptionsfaktor CREB adressiert wurde, ist es sinnvoll, die quantitativ ausgewerteten Ergebnisse der Immunfärbungen vergleichend zu betrachten. Hierfür erfolgte eine Korrelationsanalyse, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor CREB und der regulation der Exoression des extrazellulären Matrixproteins Reelin zu evaluieren. Die Ergebnisse sind tabellarisch in Tabelle 6 und 7 für Untersuchungen an Slice-Kulturen weiblicher und männlicher Tiere aufgeführt. Der Spearman-Rho Korrelationskoeffizient in der unbehandelten weiblichen Kontrollgruppe lag bei 0,107, also bestand eine geringe jedoch noch

signifikant positive Korrelation zwischen Reelin- und pCREB-Immunreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen. Östrogen- und BDNF-Behandlung zeigten Korrelationskoeffizienten um den Nullwert und stehen folglich in keiner Wechselbeziehung. Die GnRH-Behandlung zeigte dagegen eine signifikant negative Reelin-pCREB-Korrelation mit einem Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten von -0,273. Das heißt in dieser Gruppe gibt es keine Evidenz für einen Zusammenhang von Reelin-Expression und CREB-Aktivierung. In der männlichen Kontrollgruppe sowie der BDNF-behandelten Gruppe lag der Spearman-Rho Korrelationskoeffizient um den Nullwert, somit wurde keine direkte Korrelation zwischen Reelin und pCREB deutlich. Östrogen-behandelte Zellen zeigten einen gering negativen Korrelationskoeffizienten von -0,164 ($p < 0,001$), GnRH-behandelte Zellen dagegen zeigten eine gering positive Korrelation zwischen Reelin und pCREB ($p < 0,001$).

Tabelle 6: Korrelationen zwischen Reelin und pCREB in weiblichen Slice-Kulturen

Stimulation			
Kontrolle	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	,107
		Signifikanz (2-seitig)	,023
Östrogen	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	-,095
		Signifikanz (2-seitig)	,093
BDNF	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	,050
		Signifikanz (2-seitig)	,298
GnRH	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	-,273
		Signifikanz (2-seitig)	,000

Tabelle 7: Korrelationen zwischen Reelin und pCREB in männlichen Slice-Kulturen

Stimulation			
Kontrolle	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	-,081
		Signifikanz (2-seitig)	,081
Östrogen	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	-,164
		Signifikanz (2-seitig)	,000
BDNF	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	,101
		Signifikanz (2-seitig)	,092
GnRH	Messung für CR50 und pCREB	Korrelationskoeffizient	,163
		Signifikanz (2-seitig)	,000

3.5 Untersuchungen zur pCREB-Expression in Reelin-positiven Interneuronen

Neben Cajal-Retzius-Zellen findet eine Reelin-Expression auch in einer Untergruppe GABAerger Interneuronen des Hippokampus statt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Reelin-exprimierende Interneurone im Bereich der Körnerzellschicht und im Stratum radiatum untersucht. Es erfolgten Behandlungen mit Östrogen, GnRH und BDNF entsprechend den Ausführungen in Kapitel 2.2.4. Interneurone wurden mit einem G10-Antikörper markiert und die optische Dichte der Fluoreszenz-Intensität für pCREB mit Hilfe des Programms ImageJ bestimmt. Solch eine Kombination von Reelin- und pCREB-Färbung ist in Abbildung 23 A in der Übersicht in 20-facher Vergrößerung zu sehen. Daneben finden sich Vergrößerungen von Interneuronen des Stratum radiatum (Abb. 23 B) sowie der Körnerzellschicht (Abb. 23 C).

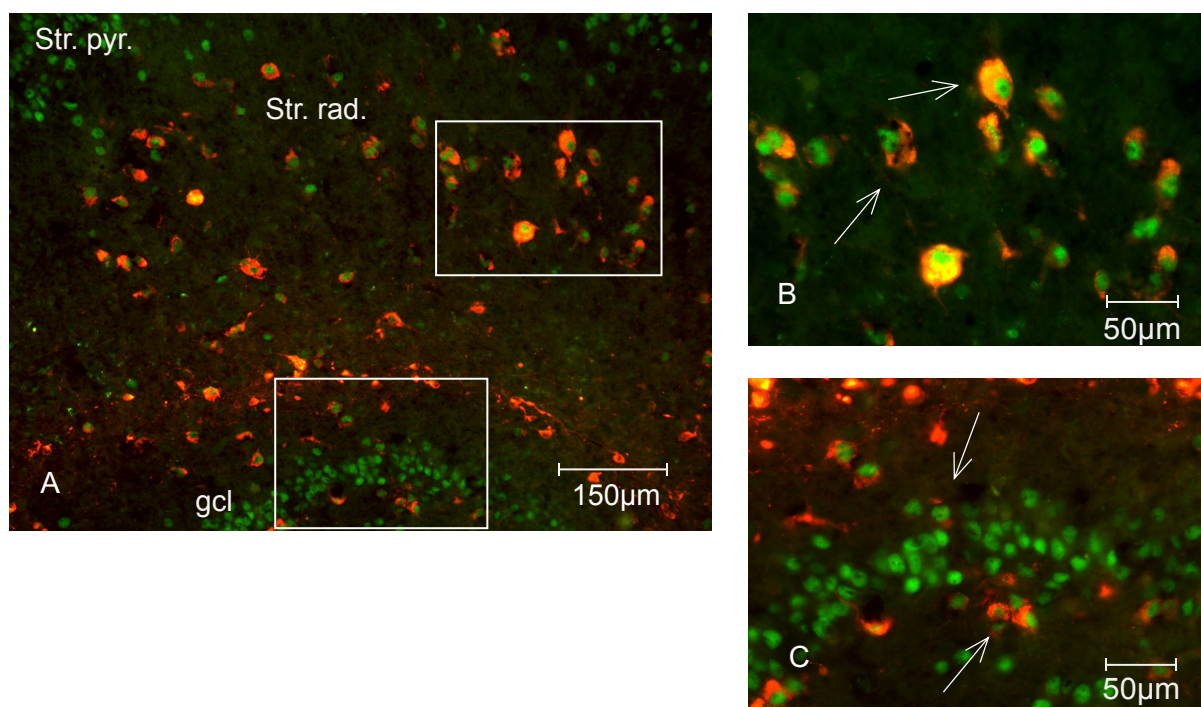


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung von Interneuronen des Hippokampus.

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte an Schnitten aus hippocampalen Slice-Kulturen von P5-Ratten. Dargestellt ist die Reelin-Färbung mit dem G10-Antikörper, hier rot-fluoreszierend durch den Sekundärantikörper Alexa Fluor 555. In grün zu sehen die pCREB-Färbung. Aufnahmen erfolgten am Keyence-Mikroskop.

- (A) Übersichtsaufnahme in 20-facher Vergrößerung mit Darstellung der Körnerzellschicht (gcl), darüber der Molekularschicht und dem Stratum radiatum (Str. rad). Sowie ganz außen dem Stratum pyramidale (Str. pyr). Rechtecke markieren Regionen, in denen Interneurone ausgewertet wurden.
- (B) Interneurone des Stratum radiatum in 60-facher Vergrößerung. Es fällt eine starke Reelin- und pCREB-Färbung auf. Interneurone haben große Somata und besitzen radiär ausgerichtete Fortsätze. Markierung beispielhafter Interneurone mit einem Pfeil.
- (C) Interneurone in 60-facher Vergrößerung in Nähe der Körnerzellschicht. Markierung einzelner Interneurone mit einem Pfeil.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Zählung von Interneuronen der Körnerzellschicht und des Stratum radiatum als prozentuale Mittlere Differenzen bezogen auf die Kontrollgruppe dargestellt. Unterhalb der Graphik finden sich die geschätzten Mittelwerte mit den zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen, in den beiden verschiedenen Regionen für hippocampale Hirnschnitte von Weibchen und Männchen getrennt abgebildet.

Im Körnerzellband sowie auch Stratum radiatum weiblicher Hippokampi fanden sich unter GnRH- und BDNF-Behandlung verstärkt pCREB-positive Interneurone (Körnerzellband: $p < 0,001$ nach Bonferroni, höchst signifikant bzw. $p = 0,012$ nach Bonferroni, signifikant. Stratum radiatum: $p < 0,001$ nach Bonferroni, höchst signifikant bzw. $p = 0,002$ nach Bonferroni, sehr signifikant).

Unter Östrogen-Behandlung zeigte sich dagegen eine verringerte pCREB-Expression im Körnerzellband ($p = 0,001$; Bonferroni, höchst signifikant) und Stratum radiatum ($p = 0,002$ nach Bonferroni, sehr signifikant) in Hippokampi weiblicher Tiere. In männlichen Hippokampi war im Körnerzellband eine signifikante Reduktion unter GnRH- ($p < 0,001$ nach Bonferroni, höchst signifikant) und BDNF-Behandlung nachweisbar ($p < 0,001$ nach Bonferroni, höchst signifikant). Östrogen-Behandlung bewirkte keine Änderung in der pCREB-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,082$ nach Bonferroni). Im Stratum radiatum bewirkten alle drei Behandlungen eine Reduktion der pCREB-Expression (je $p < 0,001$ nach Bonferroni, höchst signifikant).

Abb. 24

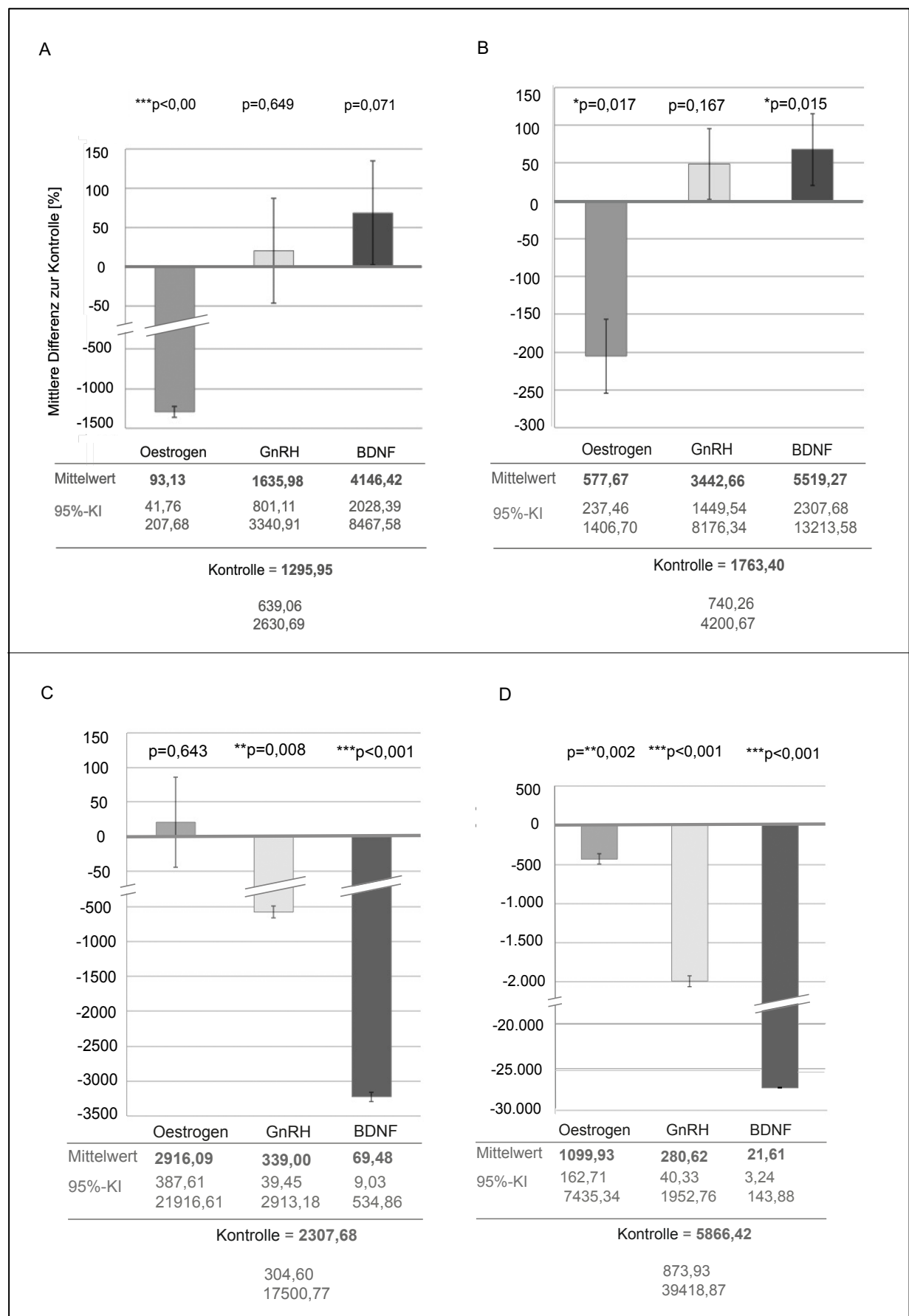


Abbildung 24: *pCREB-Expression unter verschiedenen Stimulationsbedingungen in Reelin-exprimierenden Interneuronen.*

Hippokampale Slice-Kulturen weiblicher und männlicher P5-Ratten. Immunhistochemische Auswertungen. N= 2 Slice-Kultur Experimente. Je Gruppe wurden 26 bis 57 Interneurone ausgewertet. Behandlungen erfolgten über insgesamt 6 Tage.

Graphische Darstellung der Mittleren Differenzen $\pm$ Standardfehlern der geschätzten Kontraste zur Kontrollgruppe in Prozent für die pCREB-Färbeintensität in Reelin-positiven (G10-Antikörper) Interneuronen der Körnerzellschicht (GCL) und des Stratum radiatum. Die Nulllinie spiegelt die Kontrollgruppe wieder. Unterhalb der Balken sind die geschätzten Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall gezeigt. Angabe der p-Werte, Bonferroni.

- (A) pCREB-Expression in Interneuronen der Körnerzellschicht, weibliche Slice-Kulturen. Unter Östrogen Behandlung zeigt sich eine höchst signifikante Reduktion der pCREB-Expression.
- (B) pCREB-Expression in Interneuronen des Stratum radiatum, weibliche Slice-Kulturen. Östrogen-Stimulation führt in diesen Interneuronen ebenfalls zur einer signifikanten Reduktion der pCREB-Expression, BDNF-Stimulation steigert die pCREB-Expression signifikant.
- (C) pCREB-Expression in Interneuronen der Körnerzellschicht, männliche Slice-Kulturen. GnRH- und BDNF-Behandlung reduzieren die pCREB-Expression der Interneurone sehr bzw. höchst signifikant.
- (D) pCREB-Expression in Interneuronen des Stratum radiatum, männliche Slice-Kulturen. Alle Behandlungen reduzieren die pCREB-Expression der untersuchten Interneurone deutlich.

4. Diskussion

In der Promotorregion des Reelin-Gens findet sich eine CRE-Sequenz, eine spezielle Bindungsregion für den Transkriptionsfaktor CREB (Grayson et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese getestet, ob Reelin durch CREB-reguliert wird. Reelin hat eine zentrale Bedeutung für die Neuronenmigration während der Entwicklung, verschiedene Mutationen im Reelin-Signalweg haben ausgeprägte Störungen der Kortexschichtung zur Folge (D’Arcangelo et al., 1995; Honda et al., 2011; Howell et al., 1997; Kuo et al., 2005; Ogawa et al., 1995; Trommsdorff et al., 1999). Neuere Studien belegen zudem im adulten Gehirn eine Rolle von Reelin für synaptische Plastizität, neuronales Überleben und diverse psychiatrische Erkrankungen (Fatemi et al., 2005; Grayson et al., 2006; Hethorn et al., 2015; Hong et al., 2000; Kocherhans et al., 2010; Marrone et al., 2006; Mota et al., 2014; Niu et al., 2008; Rogers et al., 2011; Weeber et al., 2002). Über die Regulation der Reelin-Expression in den Cajal-Retzius-Zellen ist hingegen wenig bekannt.

Die Identifizierung relevanter Faktoren, die den Reelin-Signalweg beeinflussen zu untersuchen ist daher für das bessere Verständnis einer korrekten Gehirnentwicklung und Ursachen, die solch eine verhindern, von immenser Bedeutung. Zusätzlich sind hiervon möglicherweise auch therapeutische Ansätze abzuleiten bei Erkrankungen mit nachweislich beeinträchtigter Reelin-Signalweg wie Schizophrenie und Autismus.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an hippocampalen Slice-Kulturen von Rattengewebe durchgeführt, die am Postnataltag 5 präpariert wurden. Diese Methodik ist eine in unserer Arbeitsgruppe im Institut für Neuroanatomie, UKE Hamburg, gut etablierte Methodik und weltweit etabliertes Modellsystem, um Neurone in explantiertem Zustand unter in vivo-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen, bei insgesamt gut erhaltener Zytostuktur des Hippokampusgewebes. Die insbesondere für die vorliegende Arbeit interessanten Cajal-Retzius-Zellen konnten somit immunhistochemisch angefärbt und untersucht werden. In dissoziierten Neuronenkulturen aus Hirngewebe sind hingegen nur wenige Cajal-Retzius-Zellen enthalten und können mit den ebenfalls Reelin-exprimierenden

Interneuronen verwechselt werden. Durch die erhaltene Gewebemorphologie und die zellmorphologischen Eigenheiten ist diese Unterscheidung in den Slice-Kulturen sehr gut möglich.

4.1 pCREB-Expressivität im Reelin-defizienten Reeler verglichen mit dem Wildtypen

Zusätzlich zu den im Anschluss aufgeführten Stimulationsexperimenten an hippocampalen Slice-Kulturen wurde untersucht, ob es prinzipiell Unterschiede in der Phosphorylierung von CREB im Reelin-defizienten Modell der Reeler-Maus gibt. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass eine CREB/CREM-Defizienz im sich entwickelnden Gehirn in multiplen Regionen, dem Hippokampus eingeschlossen, eine gestörte neuronale Migration mit erhöhter Zelldispersion zur Folge hat, ähnlich einer Reelin-Defizienz oder einer Störung des Reelin-Signalwegs (Díaz-Ruiz et al., 2008). In dieser Studie zeigte sich im Vergleich zum Wildtypen eine unveränderte Reelin-Expression, auffällig waren jedoch eine reduzierte Dab1-Proteinexpression und eine reduzierte Dab1-Phosphorylierung (Díaz-Ruiz et al., 2008). In einer anderen Studie konnte eine Reelin-induzierte CREB-Bindung an dessen Bindungsmotive in genomischen Promotor- sowie Enhancer-Sequenzen nachgewiesen werden und hierüber die Einflussnahme auf die Transkription von Reelin-Zielgenen (Telese et al., 2015). Diese Ergebnisse implizieren relevante Interaktionen zwischen dem Reelin-Protein und dem Transkriptionsfaktor CREB.

Eine Reelin-Defizienz in der homozygoten Reelermutante bzw. Reduktion in der heterozygoten Reelermaus zeigte in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der CREB- Phosphorylierung und der CREB-Proteinexpression der untersuchten Hippokampi im Vergleich zum Reelin-exprimierenden Wildtypen (Abbildung 11 und 12). Dies zeigte sich sowohl in weiblichen, wie auch männlichen neugeborenen Mäusen. Zuvor war also ein Zusammenhang zwischen einer Reduktion der CREB-Expression und Migrationsstörungen in der Gehirnentwicklung gezeigt worden, ohne eine gleichzeitige Reelin-Defizienz nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass es in der Reeler-Maus, die charakteristische Migrationsstörungen aufweist, nicht zu einer relevanten Änderung der CREB-Proteinexpression im

Hippokampus kommt. Dies ist in Hinweis darauf, dass ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Proteinen unwahrscheinlich ist.

Die Western Blot-Analyse ist für unsere Fragestellung eine sehr grobe Untersuchungsmethode. spielen zahlreiche Einflussfaktoren eine Rolle für die CREB-Expression und –Phosphorylierung. Zum anderen wurden hier nicht isolierte Cajal-Retzius-Zellen untersucht, sondern das Hippokampus-Gewebe in toto, welches auch z.B. nicht-Reelin-sezernierende Pyramidenzellen enthält, die stark pCREB exprimieren (R a Bender, Cariaga, & Baram, 2000). Die Isolierung von Cajal-Retzius-Zellen aus Reeler-Mäusen ist jedoch eine bisher unzureichend etablierte Methode, da Cajal-Retzius-Zellen deutlich kürzer leben, weniger zahlreich. Da bei Untersuchungen des gesamten Hippokampusgewebes subtile Änderungen in der Reelin-Expression und CREB-Phosphorylierung in Cajal-Retzius-Zellen mit der Western Blotting Methode möglicherweise nicht erfasst werden können, wurden die weiteren Analysen der Expression von Reelin durch Analyse immunhistochemischer Färbungen durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.2).

4.2 Einflüsse von Östradiol, GnRH und BDNF auf die Reelin-Expression von Cajal-Retzius-Zellen über die Aktivierung von CREB

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch Phosphorylierung wurde mit Hilfe von pCREB-Immunfärbungen in Cajal-Retzius Zellen nach verschiedenen Behandlungen charakterisiert. Von Interesse war hierbei nicht nur die Aktivierung von CREB, sondern auch die gleichzeitige Änderung der Reelin-Proteinexpression dieser Zellen. Zusätzlich wurden potentielle Änderungen des in die Überstände sezernierten Reelins untersucht.

Östradiol aktiviert CREB in Cajal-Retzius-Zellen und stimuliert die Reelin-Expression

In den hier dargestellten Untersuchungsergebnissen zeigte sich geschlechtsspezifisch eine robuste CREB-Phosphorylierung nach Östrogen-Behandlung in Cajal-Retzius-Zellen weiblicher Hippokampi (Abb. 20). Dies steht in

Einklang mit früheren Untersuchungen anderen Autoren, die Östrogen-vermittelt stärkeren Ca^{2+} -Influx und hierüber CREB-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen zeigen konnten (Zhou et al., 2005). Auch in einem Alzheimer-Modell konnte an PC12-Zellen unter Östrogen-Behandlung eine Amyloid- β -induzierte Suppression der CREB-Phosphorylierung bei gleichzeitig verstärkter Phosphorylierung von GSK-3 (Glykogen Synthase Kinase 3) aufgehoben werden (Y. Chen et al., 2013). Speziell in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus war dies bisher noch nicht gezeigt worden. Die pCREB-Immunreaktivität von Cajal-Retzius-Zellen männlicher Ratten zeigte sich dagegen unter Östrogen-Behandlung wesentlich reduziert im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, was auf geschlechtsspezifische Unterschiede hinweist.

Östrogen-Behandlung bewirkte nicht nur eine vermehrte CREB-Phosphorylierung, sondern auch eine verstärkte Reelin-Immunreaktivität in den Cajal-Retzius-Zellen weiblicher P5-Ratten, die sehr wahrscheinlich eine vermehrte Östrogen-induzierte Reelin-Expression reflektiert (Abb. 24), aber prinzipiell auch Ausdruck einer reduzierten Reelin-Sekretion und damit einer Akkumulation des nicht-sezernierten Reelins in Cajal-Retzius-Zellen sein könnte. Dagegen war die Reelin-Immunreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen männlicher Tiere wiederum signifikant verringert (Abb. 26). Frühere In vivo Untersuchungen an heterozygoten Reeler-Mäusen hatten am postnatalen Tag 5 (P5) im Vergleich zum Wildtypen eine signifikant verringerte Anzahl von Purkinje-Zellen im Cerebellum bei der männlichen heterozygoten Reelermaus erwiesen (Biamonte et al., 2009). 17- β -Östradiol Injektion in die Cisterna magna an P5 hatte einen Rescue-Effekt für die Zahl der Purkinje-Zellen bewirkt. Gleichzeitig hatten die Autoren unter der Behandlung an P7 und P8, also nach 48 und 72 Stunden Behandlung, eine signifikante Steigerung der Reelin-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene zeigen können. Die aufgeführten Ergebnisse waren im Rahmen dieser Studie nur in männlichen, nicht jedoch in weiblichen Tieren signifikant nachweisbar gewesen (Biamonte et al., 2009). Bender et al. (2010) hatten im Rahmen eines ähnlichen Modells wie in der vorliegenden Arbeit hippocampale Slice-Kulturen für 7 Tage mit 17- β -Östradiol behandelt und sahen hier eine signifikante Steigerung der Reelin-Proteinmenge im Western-Blot wie auch in immunhistochemischen Untersuchungen von Cajal-Retzius-Zellen (Bender et al., 2010). Die vorliegenden Daten bestätigen somit die vorangegangenen Untersuchungen.

Darüberhinausgehend sollte in der vorliegenden Arbeit nun ein möglicher Östrogen-vermittelter Zusammenhang zwischen CREB-Phosphorylierung und Reelin-Sekretion in Cajal-Retzus-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden statistische Korrelationsanalysen durchgeführt, welche jedoch keinen ausreichend großen und signifikanten Korrelationskoeffizienten für die beiden Variablen erreichten (Abb. 28). Diese Analysen sprechen somit dafür, dass Östrogen-Behandlung zwar auf die Reelin-Expression und die CREB-Phosphorylierung einen fördernden Einfluss hat, Hinweise für einen kausalen Zusammenhang wurden jedoch nicht gefunden. Wenn man die Ergebnisse den weiteren Behandlungsgruppen, stellt man fest, dass z.B. auch unter BDNF-Behandlung eine höchst signifikant erhöhte pCREB-Immunreaktivität nachweisbar war (Abb. 20), die Reelin-Immunreaktivität hier jedoch unverändert zur Kontrollgruppe blieb (Abb. 24). Dies unterstützt die Annahme, dass kein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Variablen Reelin-Expression und CREB-Phosphorylierung besteht.

Aus Abbildung 16 und Abbildung 18 geht hervor, dass der Großteil der untersuchten Cajal-Retzus-Zellen eine sehr geringe pCREB-Immunreaktivität aufweist (ca. 80% aller ausgewerteten Zellen sind schwach pCREB-immunreaktiv). Beschrieben sind für die CREB-Phosphorylierung ein rascher Calmodulin Kinase VI-abhängiger Weg, welcher eine CREB-Aktivierung innerhalb der ersten 10 Minuten zeigt, sowie ein langsamer Phosphorylierungsweg über Ras/Mitogen-aktivierte Protein Kinase (Wu, Deisseroth, & Tsien, 2001). Liu et al. hatten bereits nach 7 Minuten Behandlung von organotypischen Slice-Kulturen verschiedener Regionen der Basalganglien mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylat-Cyclase, eine starke CREB-Phosphorylierung zeigen können. Nach bereits 4 bis 8 Stunden war jedoch nur noch eine geringe pCREB-Immunreaktivität nachweisbar (Liu & Graybiel, 1998). In vitro-Untersuchungen an adulten Ratten mit Implantation von Stimulationselektroden hatten nach Hochfrequenzstimulation ebenfalls ein biphasisches Zeitmuster einer verstärkten pCREB-Immunreaktivität in den untersuchten Hippokampi gezeigt mit jedoch einem ersten Peak nach etwa 30 Minuten sowie einem zweiten Peak nach zwei Stunden, der für mindestens 24 Stunden anhielt (Schulz et al., 1999). Folglich sind nach 48 Stunden Stimulation, wie sie in den vorliegenden Experimenten durchgeführt wurden, möglicherweise bereits initiale Einflüsse auf die CREB-Phosphorylierung nicht abschätzbar. Möglicherweise wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein zu langes Zeitfenster gewählt, um die CREB-Phosphorylierung mit der

Reelin-Proteinexpression zu korrelieren. Das experimentelle Design und damit die Dauer der Stimulation war jedoch in diesem Zusammenhang gemäß Bender et al. (2010) durchgeführt worden, um ähnliche Ergebnisse für die Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen zu reproduzieren wie in dieser Studie beschrieben (Bender et al., 2010). Andererseits zeigte sich in Interneuronen bei gleicher Behandlung eine starke CREB-Phosphorylierung, sodass zu vermuten ist, dass Cajal-Retzius-Zellen generell vergleichsweise geringe Mengen an phosphoryliertem CREB enthalten. Aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich der CREB-Aktivierung könnte man anhand der vorliegenden Datenlage möglicherweise z.B. 2 und 12 Stunden nach Stimulation erwarten.

Eine Steigerung der Reelin-Immunreaktivität war im Rahmen dieser Arbeit auch trotz der längeren Stimulationsdauer gut nachweisbar (Abb. 19). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine verstärkte Reelin-Proteinexpression durch den Einfluss von Östrogen lediglich im Hippokampus weiblicher Tiere nachgewiesen, was die vorangegangene Untersuchung von Bender et al. (2010) bestätigt, wobei zu beachten ist, dass in der zitierten Studie nicht zwischen Männchen und Weibchen unterschieden wurde (Roland a. Bender et al., 2010). Zusammenfassend konnten hier immunhistochemisch sowohl eine verstärkte CREB-Phosphorylierung wie auch Reelin-Immunreaktivität nach Östrogen-Behandlung in hippokampalen Cajal-Retzius-Zellen weiblicher Ratten nachgewiesen werden.

Nach Östrogen-Behandlung war das Reelin-Protein in den Überständen aus den hippokampalen Slice-Kulturen, im Gegensatz zu den immunhistochemischen Untersuchungen der Reelin-exprimierenden Cajal-Retzius-Zellen jedoch nicht signifikant erhöht (Abb. 7). Es ist also nicht auszuschließen, dass die erhöhte Reelin-Immunreaktivität von Cajal-Retzius-Zellen in den vorliegenden immunhistochemischen Auswertungen eine reduzierte Reelin-Sekretion und nicht eine vermehrte Reelin-Expression reflektiert. Zu bedenken ist hier, dass die Überstände möglicherweise nicht nur aus Cajal-Retzius-Zellen sezerniertes Reelin enthalten. Andererseits enthielt mit Östrogen behandeltes Hippokampus-Gewebe signifikant mehr phosphoryliertes Dab1. Nach Normalisierung auf die ebenfalls untersuchte Menge an unphosphoryliertem Dab1 der Proben war das Ergebnis jedoch nicht signifikant (Abb.9). Bemerkenswert ist zu den Untersuchungen der Dab1-Phosphorylierung in hippokampalen Slice-Kulturen, dass die durchgeführte

Reelin-Behandlung von Wildtyp-Slice-Kulturen keine signifikant vermehrte Dab1-Phosphorylierung bewirkte. An in vitro-Untersuchungen dissoziierter Neuronenkulturen hatten Arnaud et al. zeigen können, dass eine Reelin-Behandlung ein Maximum an Dab1 Tyrosin Phosphorylierung bereits nach 5 Minuten erreichte und nach etwa einer Stunde wieder abnahm (Arnaud et al., 2003). Ursächlich hierfür sahen die Autoren über einen Reelin-vermittelten proteasomalen Abbau von Dab1. Die Autoren argumentierten, dass die Dab1-Phosphorylierung durch Reelin transient sein muss, um eine transiente Antwort z.B. migrierender Neurone auf eine Reelin-Exposition zu ermöglichen und damit feiner steuern zu können (Arnaud et al., 2003). In vivo-Untersuchungen im Rahmen einer anderen Studie mit intrathekaler Reelin-Behandlung 4 Monate alter Mäuse zeigten ebenfalls einen raschen Anstieg des phosphorylierten Dab1 am Hippokampus nach 15 Minuten. Dieser Effekt hielt für etwa 3 Stunden an und ließ dann deutlich nach. Nach 5 Tagen war der Effekt nicht mehr nachweisbar (Rogers et al., 2011). Die Reelin-Stimulation diente in meiner Arbeit als Kontrolle und zeigte, dass möglicherweise die Stimulationsdauer von 48 Stunden zu lang gewählt ist, um die maximale Auswirkung einer Behandlung auf die Dab1-Phosphorylierung beurteilen zu können. Östrogen-Behandlung hippokampaler Slice-Kulturen männlicher P5-Ratten zeigte eine signifikant verringerte Reelin-Immunreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Abb. 21), ebenso war in den Überständen keine wesentlich verstärkte Reelin-Sekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar (Abb. 8). Auch die Analyse der Dab1-Phosphorylierung ergab keinen Hinweis auf eine erhöhte Reelin-Proteinexpression unter Einfluss von Östrogen in Gewebe männlicher Tiere. Insgesamt scheint Östrogen lediglich in Cajal-Retzius-Zellen von Hippokampi weiblicher Tiere einen fördernden Einfluss auf die CREB-Phosphorylierung und Reelin-Reaktivität von Cajal-Retzius-Zellen zu haben, jedoch nicht auf die Menge an sezerniertem Reelin, welches aus den Überständen der Slice-Kulturen gemessen wurde.

GnRH stimuliert Reelin-Expression in Cajal-Retzius Zellen ohne auf pCREB Einfluss zu nehmen

Interessanterweise hatte GnRH-Stimulation eine vermehrte (nicht signifikante) Reelin-Sezernierung in das Kulturmedium weiblicher sowie auch männlicher

hippokampaler Slice-Kulturen zur Folge (Abb. 7 und 8). Die Dab1-Phosphorylierung in dem untersuchten Hippokampus-Gewebe war hier bei beiden Geschlechtern dagegen nicht signifikant erhöht gewesen (Abb. 9 und 10). Anders als unter Östrogen-Behandlung hatte diese Behandlung in weiblichen Kulturen zwar ebenfalls zu einer signifikant vermehrten Immunreaktivität für Reelin in Cajal-Retzius-Zellen geführt, die Immunreaktivität für pCREB war dagegen deutlich reduziert gewesen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies stützt die Interpretation, dass CREB-Phosphorylierung keine Rolle für die Erhöhung der Reelin-Immunreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen spielt. In anderen Untersuchungen hatten GnRH-Stimulationen von hippocampalen Slice-Kulturen wie auch neuronalen Dispersionskulturen eine dosisabhängige Stimulation der E2-Synthese zur Folge. Diese E2-Synthese war durch Behandlung mit dem Aromatase-Blocker Letrozol- inhibierbar und folglich Aromatase-abhängig (Prange-Kiel et al., 2008). In der männlichen Untersuchungsreihe war hier keine wesentlich vermehrte Reelin-Expression bei unveränderter pCREB-Expression gezeigt worden. Zusammenhänge zwischen Reelin und GnRH sind nur wenig untersucht. Bekanntermaßen soll Reelin für die Migration von GnRH-Neuronen von der olfaktorischen Plakode in den Hypothalamus eine Rolle spielen, GnRH-Neurone exprimieren jedoch nur zu einem geringen Anteil ApoER2 und kein Dab1, sodass die Autoren hier einen bisher unbekannten Signalweg vermuteten (Cariboni et al., 2005). Mehrere Studien zeigten das Vorhandensein GnRH-Rezeptor-exprimierender Neurone in verschiedenen Arealen des Gehirns, unter anderem auch im Hippokampus (Jennes et al., 1988; Prange-Kiel et al., 2008; Wen et al., 2011; Wilson et al., 2006), wobei bisher zu der Funktion von GnRH in Neuronen wenig bekannt ist. Anhand meiner Daten lässt sich kein Zusammenhang zwischen der GnRH-induzierten Reelin-Expression und dem Transkriptionsfaktor CREB ableiten. Jedoch implizieren die Daten eine Responsivität der Cajal-Retzius-Zellen auf GnRH. Dies weist auf das Vorhandensein von GnRH-Rezeptoren in CR-Zellen hin, was in zukünftigen Studien untersucht werden müsste

BDNF bewirkt vermehrte Expression aktivierten CREBs ohne Einfluss auf die Reelin-Expression

Cajal-Retzius-Zellen gehen in den ersten zwei postnatalen Wochen zunehmend unter (Alcántara et al., 1998; D’Arcangelo et al., 1995, 1997). Eine BDNF-Behandlung hatte in einer anderen Studie jedoch zu einer verstärkten Calretinin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen und möglicherweise auch verlängertem Überleben geführt (Marty et al., 1996; Ringstedt et al., 1998). Eine direkte BDNF-vermittelte Wirkung auf die Reelin-Expression konnte bisher nicht gezeigt werden. Jedoch wurden unter BDNF-Behandlung erhöhte Level des Reelin-Rezeptors VLDLR in hippokampalen Neuronen nachgewiesen, was eine erhöhte Reelin-Responsivität der Neurone bewirken könnte (Do et al., 2013). Ringstedt et al. hatten in ihrer Studie dagegen unter BDNF-Stimulierung kortikaler Neurone vermehrt schwach Reelin-exprimierende Neurone zeigen können nach 12 Stunden, 2 Tagen oder 5 Tagen Behandlung, und daher einen negativ-regulatorischen Einfluss von BDNF auf den Reelin-Signalweg angenommen (Ringstedt et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an die Untersuchungen von Ringstedt et al. als Kontrolle eine BDNF-Behandlung mit erwartetem Negativ-Effekt auf die Reelin-Expression und den Reelin-Signalweg durchgeführt. Immunhistochemische Analysen der Reelin-Proteinexpression speziell in Cajal-Retzius-Zellen zeigten eine zur Kontrollgruppe unveränderte Reelin-Expression in den Neuronen von Slice-Kulturen weiblicher Tiere sowie eine Reduktion der Reelin-Expression in Cajal-Retzius-Zellen von Slice-Kulturen männlicher Tiere (Abb. 19 und 21). Eine Quantifizierung der Reelin-Sekretion durch Western-Blot-Analyse der in das Medium der Slice-Kulturen sezernierten Reelin-Menge zeigte nach BDNF-Behandlung eine nicht-signifikante Zunahme des Reelin-Proteins im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 7 und 8). Die Phosphorylierung des intrazellulären Effektorproteins Dab1 blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert phosphoryliert (Abb. 9 und 10). Untersuchungen zu Einflüssen des Neurotrophins BDNF auf den Reelin-Signalweg an männlichen Slice-Kulturen erwiesen insgesamt ähnliche Ergebnisse wie auch in den untersuchten weiblichen Kulturen.

Ähnlich wie auch Östrogen-Behandlung bewirkte BDNF eine robuste Zunahme der CREB-Phosphorylierung in den untersuchten hippokampalen Cajal-Retzius-Zellen weiblicher sowie auch männlicher Tiere (Abb. 15 und 17). In kortikalen Neuronen konnte eine BDNF-induzierte Stimulierung der CREB-Aktivierung bereits in früheren Studien wiederholt nachgewiesen werden (Finkbeiner et al., 1997; L Minichiello et al.,

2002); hauptsächlich vermittelt über die ERK1/2- (extrazellulär-signal reguliertes Kinase 1/2) regulierte Mitogen-und-Stress-aktivierte Proteinkinase 1, MSK1 (Arthur et al., 2004; Daumas et al., 2017). Für CREB sind auch negativ-regulatorische Funktionen beschrieben. So bindet CREB z.B. in einem Hypoxischen Myopathie-Modell an die CRE-Sequenz der IGF2R- (Insulin-like growth factor 2 Rezeptor) Promotorregion und supprimiert hierüber die IGF2R-Proteinexpression mit Verhinderung einer Cardiomyoblasten-Apoptose (Chen et al., 2015). Des Weiteren ist eine Alternierung der Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB über dessen Phosphorylierung bekannt. PKA-Phosphorylierung am Serin-133 Rest des CREB bewirkt eine verstärkte Affinität für die CRE-Sequenz und somit Transkriptionsinduktion von Zielgenen. GSK-3 dämpft dagegen CREB-vermittelte Gen-Expression über Phosphorylierung an Serin-129 (Bullock & Habener, 1998; Grimes & Jope, 2001; Tullai et al., 2007), eine GSK3-Phosphorylierung ist jedoch nur an bereits Serin-133-phosphoryliertem CREB möglich (Fiols et al., 1994). Eine eindeutig negativ-regulierende Rolle des BDNF auf den Reelin-Signalweg kann man anhand meiner erhobenen Daten nicht bestätigen. BDNF scheint die CREB-Aktivierung in Cajal-Retzius-Zellen zu steigern, der durch die CREB-Phosphorylierung induzierte Effekt in der Cajal-Retzius-Zelle bleibt jedoch unklar.

Unterschiedliche Ergebnisse aus weiblichen und männlichen Versuchstieren

Auf den ersten Blick widersprüchlich und unter Betrachtung der bisher in der Literatur erhobenen Daten interessant sind die besonders unter Östrogen-Behandlung auffällig divergierenden Ergebnisse zwischen weiblichen und männlichen Tieren. Cajal-Retzius-Zellen exprimieren nachweislich ER- α , über welchen Östrogen-Signale folglich auch an diesen Neuronen vermittelt werden können (Roland a. Bender et al., 2010). Abhängig von ER- α erfolgt vermittelt über mGluR eine Östrogen-induzierte CREB-Phosphorylierung, diese konnte jedoch ausschließlich in hippokampalen Neuronen weiblicher neugeborener Ratten nachgewiesen werden (Boulware, 2005). In der aktuellen Arbeit zeigt Östrogen eine deutliche Stimulation der Reelin- wie auch pCREB-Expression in Cajal-Retzius-Zellen weiblicher, nicht jedoch männlicher Slice-Kulturen des Hippokampus (Abb. 15, 17, 19 und 21). Unterschiede zwischen den Geschlechtern durch Einflüsse peripher zirkulierenden Östrogens aus den Gonaden

können bei Tieren dieses Alters generell, sowie in dem hier verwendeten Modell einer organotypischen Slice-Kultur, während der Dauer des Experiments ausgeschlossen werden. Ergebnisse mehrerer Untersuchungen des letzten Jahrzehnts fordern jedoch immer mehr die Berücksichtigung eines sogenannten sexuellen Dimorphismus bei der Interpretation von Untersuchungen zur Gehirnentwicklung wie auch am adulten Gehirn (Fester & Rune, 2014; Hill & Van Den Buuse, 2011; Meitzen et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse im Sinne einer geschlechtsspezifisch vermehrten CREB-Phosphorylierung unter Östrogen-Behandlung wurden auch an neonatalen hippocampalen Pyramidenzellen gezeigt (Meitzen et al., 2012). Vermutet wird, dass Neurone bereits pränatal durch die frühe Hormon-Exposition geschlechtsspezifisch vorgeprägt werden und abhängig hiervon unterschiedlich responsiv für Östrogen-Einflüsse sind. Östrogen-vermittelt wurde eine verstärkte CREB-Phosphorylierung in hippocampalen Pyramidenzellen weiblicher neugeborener Ratten beobachtet – vorangegangene neonatale Testosteron- wie auch Östrogen-Exposition von weiblichen Ratten bewirkte eine verminderte Sensitivität für Östrogen mit ausbleibender Östrogen-vermittelter CREB-Phosphorylierung (Meitzen et al., 2012). So zeigen sich bekanntermaßen beim Männchen je ein Peak des gonadal generierten Testosterons zum einen zum Ende der Gestation, wie auch bei P0 (Weisz & Ward, 1980), wohingegen diese steroidalen Einflüsse beim Weibchen ausbleiben (Rhoda et al., 1984). Zusammenfassend wird angenommen, dass frühe gonadale Östrogen- oder Testosteron-Exposition zur Maskulinisierung des Gehirns führt, wohingegen entsprechend fehlendes Östrogen oder Testosteron in einer Feminisierung des Gehirns resultiert, welche hormonelle Einflüsse und einen sogenannten sexuellen Dimorphismus bereits pränatal erklären könnten.

4.3 pCREB-Expression in Reelin-positiven Interneuronen

Von Interesse war auch, ob ähnliche Effekte auch in Reelin-sezernierenden Interneuronen zu beobachten sind, denn nach der Geburt wird Reelin vorrangig von einer Untergruppe GABAerger Interneurone sezerniert (Alcántara et al., 1998; Pesold et al., 1998). Insgesamt auffällig war bei Betrachtung der Interneurone unter dem Mikroskop im Vergleich zu den zuvor untersuchten Cajal-Retzius-Zellen eine deutlich

erhöhte und insgesamt starke pCREB-Expression in den untersuchten Interneuronen des Körnerzellbandes sowie des Stratum radiatum.

Die GAD65-Expression in kortikalen Neuronen scheint über eine CREB-Bindung an die Promoter-Region des GAD65-Gens reguliert zu werden (Sánchez-Huertas & Rico, 2011). Tsui et al. hatten eine Rolle von CBP, dem Protein welches mit CREB interagiert, für die Differenzierung von neuronalen Prekursorzellen zu GAD67-positiven Interneuronen in vitro aus primären Zellkulturen aus der Eminentia mediana sowie in vivo an CBP-haploinsuffizienten P4-Mäusen zeigen können (Tsui et al., 2014). Des Weiteren scheint CREB für die Initiierung von Langzeitpotenzierung in Interneuronen des Stratum oriens/ Alveus des Hippocampus notwendig zu sein (Ran, Laplante, & Lacaille, 2012)

Stimulation mit Östrogen zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden untersuchten Regionen sowohl in weiblichen wie auch männlichen Neuronen signifikante Reduktionen der pCREB-Signalintensität verglichen zur Kontrollgruppe (Abb. 24). Dies steht im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Ergebnissen an Cajal-Retzius-Zellen. Interneurone exprimieren nachgewiesenermaßen ERs (Weiland et al., 1997) und spielen wie auch Östrogene eine wichtige Rolle für synaptische Plastizität. Die Expression von ER β nimmt mit zunehmendem Alter zu, wobei die Expression pränatal an Tag 18,5 (E18,5) im gesamten Gehirn, im Hippokampus jedoch bereits am embryonalen Entwicklungstag 15,5 (E15,5) und 16,5 (E16,5) im Hippokampus gezeigt werden konnte (Fan et al. 2012). Die hier vorliegenden die Interneurone betreffenden Ergebnisse sind überraschend. Möglicherweise liegt eine altersabhängige Responsivität der Interneurone auf Östrogene vor, wobei in dem untersuchten Alter wie erläutert bereits eine hohe ER β -Expression vorliegt.

Untersuchungen von Mott et al. hatten in 18 Monate alten weiblichen Ratten im Vergleich zu jüngeren 3 Monate alten Tieren eine verminderte E2-Responsivität von ER β nachgewiesen (Mott et al., 2014), wobei keine Untersuchungen zu perinatalen Tieren vorliegen. BDNF-Stimulation zeigte an Interneuronen der männlichen Tiere eine signifikante Reduktion verglichen zur Kontrollgruppe, dagegen in weiblichen Tieren eine signifikant verstärkte CREB-Expression verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 24), was ähnlich den Untersuchungsergebnissen an Cajal-Retzius Zellen ist und letztendlich für eine robuste Induktion der CREB-Phosphorylierung durch BDNF-Behandlung spricht.

5. Zusammenfassung und Ausblicke

Östradiol induziert perinatal an den untersuchten hippocampalen Cajal-Retzius-Zellen deutlich die CREB-Phosphorylierung und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB. Gleichzeitig zeigt sich eine Steigerung der Reelin-Immunoreaktivität in den Cajal-Retzius-Zellen, auf die Östradiol aber gemäß den hier erzielten Ergebnissen nicht pCREB-vermittelt Einfluss nimmt. Untersuchungen zur Dab1-Phosphorylierung als funktioneller Parameter zeigten eine Steigerung unter Östradiol-Behandlung im Hippokampus weiblicher Tiere. Somit könnte Östradiol neben einer bekannten Rolle für Reproduktion und synaptischer Plastizität und Langzeitpotenzierung auch Einfluss auf Neuronenmigration und Gehirnentwicklung nehmen, eine Rolle, die bisher in diesem Zusammenhang wenig diskutiert wurde. In Interneuronen, welche zum Teil ebenfalls wie Cajal-Retzius-Zellen Reelin exprimieren, jedoch eine vollkommen andere Funktion ausüben und primär im adulten Gehirn eine Rolle spielen, ließ sich dies nicht reproduzieren. Zusätzlich wurde die Auswirkung einer GnRH-Behandlung untersucht, wobei hier anders als unter Östradiol eine signifikante Reduktion der pCREB-Phosphorylierung gezeigt werden konnte, bei jedoch ebenfalls signifikant gesteigerter Reelin-Immunoreaktivität in Cajal-Retzius-Zellen, sowie auch an sezerniertem Reelin-Protein in das Medium (nicht signifikant). Diese Ergebnisse implizieren einen CREB- wie auch Östradiol-unabhängigen Weg. Der Nervenwachstumsfaktor BDNF, der ubiquitär im Gehirn vorkommt, scheint auch in perinatalen Cajal-Retzius-Zellen eine starke CREB-Phosphorylierung zu induzieren, wobei im Gegenteil zu den Untersuchungen mit Östradiol keine gleichzeitige Reelin-Induktion beobachtet wurde. Dies erhärtet die Hypothese, dass CREB-Aktivierung und Reelin-Sekretion nicht kausal in Zusammenhang stehen. An Interneuronen konnten ähnliche Auswirkungen auf die pCREB-Expression an perinatalen Schnittkulturen nicht gezeigt werden. Lediglich ähnlich waren die Effekte der BDNF-Behandlung auf die pCREB-Expression in Interneuronen der weiblichen Versuchstiere. Wäre CREB ein relevanter Regulator für die Reelin-Expression, würde man bei Reelin-Defizienz eine Hochregulation des CREB erwarten. Dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit mit dem Western-Blot Verfahren nachgegangen. Der Nachweis an CREB sowie pCREB in Hippokampus-Gewebe war jedoch in den vorliegenden Untersuchungen unabhängig vom Genotypen in homozygoten Reelermäusen wie auch in Wildtyp-Mäusen unverändert.

Um die hier vorliegenden Untersuchungen fortzuführen, könnten in einem ersten Schritt immunhistochemische Untersuchungen zur möglichen Expression von GnRH-Rezeptoren an Cajal-Retzius-Zellen durchgeführt werden. Außerdem wäre interessant, die Expression von ER- α im zeitlichen Entwicklungsverlauf sowie Einflüsse von Östrogen und GnRH auf das Neuronen-Überleben näher zu betrachten. Diese Arbeit hat einen CREB-unabhängigen Einfluss von Östrogen und GNRH auf die Reelin Expression in Cajal-Retzius-Zellen des Hippokampus deutlich gemacht. Der speziellen Rolle von Neurosteroiden in diesen Neuronen sollte in zukünftigen Untersuchungen weiter nachgegangen werden.

Summary and outlook

Perinatally, estradiol clearly induces CREB phosphorylation and thus activation of the transcription factor CREB in the examined hippocampal Cajal-Retzius cells. At the same time, there is a relevant increase in the immunoreactivity for Reelin in Cajal-Retzius cells. However, estradiol does not influence the Reelin-expression pCREB-mediated, according to the results obtained here. Studies on Dab1 phosphorylation as a functional parameter showed an increase after estradiol treatment in the hippocampus of female animals. Thus, in addition to a known role for reproduction and synaptic plasticity and long-term potentiation, estradiol could also influence neuronal migration and brain development, a role that has been little discussed in this context. In interneurons, some of which also express Reelin like Cajal-Retzius cells, but have a completely different function and play a role primarily in the adult brain, a similar effect of estrogen treatment on CREB phosphorylation could not be reproduced. In addition, the effect of GnRH treatment was investigated, which showed in contrast to estrogen treatment a significant reduction in CREB-phosphorylation, but also significantly increased Reelin immunoreactivity in Cajal-Retzius cells as well as the secreted Reelin protein in the medium (not significantly). These results imply a CREB as well as estradiol independent pathway. The nerve growth factor BDNF, which is highly abundant in the mammalian brain, also appears to induce strong CREB phosphorylation in perinatal Cajal-Retzius cells, whereas no concomitant Reelin induction was observed, in contrast to studies with estradiol. This supports the hypothesis that CREB activation and Reelin secretion are not causally

related. On interneurons, similar effects on pCREB expression on perinatal hippocampal slice cultures could not be demonstrated. Merely similar were the effects of BDNF treatment on pCREB expression in interneurons of female animals. If CREB was a relevant regulator of Reelin expression, Reelin deficiency would be expected to up-regulate CREB. This hypothesis was investigated in this work with the Western Blot method. The detection of CREB and pCREB in hippocampal tissue, however, was unchanged in the present studies regardless of the genotype in homozygous Reeler mice as well as in wild-type mice.

To pursue these experiments, immunohistochemically analysis of the expression of GnRH receptors on Cajal Retzius cells could be performed in a first step. In addition, it would be interesting to take a closer look at the expression of ER- α over time as well as the effects of estrogen and GnRH treatment on neuronal survival. This work has shown an effect of estrogen and GnRH on the Reelin expression in Cajal-Retzius-Cells of the hippocampus, which is independent of CREB. The special role of neurosteroids in these neurons should be further pursued in future investigations.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ApoER2	Apolipoproteinrezeptor E Rezeptor 2
APS	Ammonium Persulfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CA-Region	Cornu Ammonis-Region
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CRE	cAMP-responsive element
CBP	CREB-binding Protein
CREB	cAMP response binding Protein
CREM	cAMP responsive element modulator
CR-Zelle	Cajal-Retzius-Zelle
Dab1	Disabled 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER α	Estrogenrezeptor α
ER β	Estrogenrezeptor β
ERK 1/2	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase 1/2
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD67	Glutamat-Decarboxylase 67
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCD	Granularzelldispersion
Gcl	Körnerzellschicht
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
HRP	Horseradish peroxidase)
IGFR	Insulin-like growth factor 2 Rezeptor

LH	Luteinisierendes Hormon
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
mDab1	Maus Disabled1
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSK1	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase-1
NGF	nerve growth factor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PC12-Zelle	Phäochromozytom Zelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pCREB	phosphoryliertes cAMP response binding Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PLCy	Phospholipase Cy
RIPA	Radioimmunoprecipitations-Assay
rpm	rounds per minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Str. pyr.	Stratum pyramidale
Str. rad.	Stratum radiatum
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
TrkB	Tropomyosin-related Kinase Rezeptor-Kinase B
VLDLR	Very Low Density Lipoproteinrezeptor

7. Literaturverzeichnis

- Alcántara, S., Ruiz, M., Arcangelo, G. D., Ezan, F., Lecea, L. De, Curran, T., Soriano, E. (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(19), 7779–7799. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.4515-09.2010>
- Angevine, J. B., & Sidman, R. L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 192(4804), 766–768. <http://doi.org/10.1038/192766b0>
- Anstötz, M., Huang, H., Marchionni, I., Haumann, I., MacCaferri, G., & Lübke, J. H. R. (2016). Developmental Profile, Morphology, and Synaptic Connectivity of Cajal-Retzius Cells in the Postnatal Mouse Hippocampus. *Cerebral Cortex*, 26(2), 855–872. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhv271>
- Arnaud, L., Ballif, B. A., & Cooper, J. A. (2003). Regulation of Protein Tyrosine Kinase Signaling by Substrate Degradation during Brain Development. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9293–9302. <http://doi.org/10.1128/mcb.23.24.9293-9302.2003>
- Arnaud, L., Ballif, B. A., Förster, E., & Cooper, J. A. (2003). Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of Disabled-1 during brain development. *Current Biology*, 13(1), 9–17. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01397-0](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01397-0)
- Arthur, J. S. C., Fong, A. L., Dwyer, J. M., Davare, M., Reese, E., Obrietan, K., & Impey, S. (2004). Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 Mediates cAMP Response Element-Binding Protein Phosphorylation and Activation by Neurotrophins. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4324–4332. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5227-03.2004>
- Ballif, B., Arnaud, L., Arthur, W. T., Guris, D., Akira Imamoto, & Cooper, J. A. (2004). Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 Pathway in Reelin-Stimulated Neurons. *Current Biology*, 14, 606–610. <http://doi.org/DOI.10.1016/j.cub.2004.03.038>
- Bender, R. a., Zhou, L., Wilkars, W., Fester, L., Lanowski, J. S., Paysen, D., Rune, G. M. (2010). Roles of 17 β -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cerebral Cortex*, 20(December), 2985–2995. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhq047>
- Bender, R. a, Cariaga, W., & Baram, T. Z. (2000). Enhanced CREB phosphorylation in immature granule cells indicates a specific role of CREB in granule cell differentiation, 26, 1596.
- Benito, E., & Barco, A. (2010). CREB ' s control of intrinsic and synaptic plasticity : implications for CREB-dependent memory models. *Trends in Neurosciences*, 33(5), 230–240. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.001>
- Berchtold, N., Kesslak, J. P., Pike, C. J., Adlard, P. A., & Cotman, C. W. (2001). Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 14, 1992–2002. <http://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01825.x>
- Biamonte, F., Assenza, G., Marino, R., D'Amelio, M., Panteri, R., Caruso, D., Keller, F. (2009). Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 103–115. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.001>
- Bock, H. H., & Herz, J. (2003). Reelin Activates Src Family Tyrosine Kinase in Neurons. *Current Biology*, 13(2), 18–26.

- Borghesani, P. R., Peyrin, J. M., Klein, R., Rubin, J., Carter, A. R., Schwartz, P. M., ... Segal, R. a. (2002). BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development (Cambridge, England)*, 129(6), 1435–1442.
- Boulware, M. I. (2005). Estradiol Activates Group I and II Metabotropic Glutamate Receptor Signaling, Leading to Opposing Influences on cAMP Response Element-Binding Protein. *Journal of Neuroscience*, 25(20), 5066–5078. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1427-05.2005>
- Brunstrom, J. E., Gray-Swain, M. R., Osborne, P. a., & Pearlman, A. L. (1997). Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron*, 18(3), 505–517. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81250-7](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81250-7)
- Bullock, B. P., & Habener, J. F. (1998). Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA- binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry*, 37(11), 3795–3809. <http://doi.org/10.1021/bi970982t>
- Cariboni, A., Rakic, S., Liapi, A., Maggi, R., Goffinet, A., & Parnavelas, J. G. (2005). Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Development (Cambridge, England)*, 132, 4709–4718. <http://doi.org/10.1242/dev.02033>
- Caviness, V. S. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: A developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Developmental Brain Research*, 4(3), 293–302. [http://doi.org/10.1016/0165-3806\(82\)90141-9](http://doi.org/10.1016/0165-3806(82)90141-9)
- Caviness, V. S., & Sidman, R. L. (1973). Retrohippocampal , Hippocampal and Related Structures o f the Forebrain in the Reeler Mutant Mouse '. *Journal of Comparative Neurology*, 147(2), 235–254. <http://doi.org/10.1002/cne.901470206>
- Chang, B. S., Duzcan, F., Kim, S., Cinbis, M., Aggarwal, A., Apse, K. A., Walsh, C. A. (2007). The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 144(1), 58–63. <http://doi.org/10.1002/ajmg.b.30392>
- Chen, W. K., Kuo, W. W., Hsieh, D. J. Y., Chang, H. N., Pai, P. Y., Lin, K. H., ... Huang, C. Y. (2015). CREB negatively regulates IGF2R gene expression and downstream pathways to inhibit hypoxia-induced H9c2 cardiomyoblast cell death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27921–27930. <http://doi.org/10.3390/ijms161126067>
- Chen, Y., Su, Y., Run, X., Sun, Z., Wang, T., Sun, S., & Liang, Z. (2013). Pretreatment of PC12 cells with 17 β -estradiol prevents a β -induced down-regulation of CREB phosphorylation and prolongs inhibition of GSK-3 β . *Journal of Molecular Neuroscience*, 50(3), 394–401. <http://doi.org/10.1007/s12031-012-9938-7>
- Conn, P. M., & Crowley Jr., W. F. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med*, 45, 391–405. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.391>
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I., & Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/374719a0>
- D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., & Curran, T. (1997). Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for*

- Neuroscience*, 17(1), 23–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8987733>
- Daumas, S., Hunter, C. J., Mistry, R. B., Morè, L., Privitera, L., Cooper, D. D., ... Frenguelli, B. G. (2017). The Kinase Function of MSK1 Regulates BDNF Signaling to CREB and Basal Synaptic Transmission, But Is Not Required for Hippocampal Long-Term Potentiation or Spatial Memory. *Eneuro*, 4(1), ENEURO.0212-16.2017. <http://doi.org/10.1523/ENEURO.0212-16.2017>
- Díaz-Ruiz, C., Parlato, R., Aguado, F., Ureña, J. M., Burgaya, F., Martínez, A., ... Soriano, E. (2008). Regulation of neural migration by the CREB/CREM transcription factors and altered Dab1 levels in CREB/CREM mutants. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(4), 519–528. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.019>
- Do, H. T., Bruelle, C., Tselykh, T., Jalonon, P., Korhonen, L., & Lindholm, D. (2013). Reciprocal regulation of very low density lipoprotein receptors (VLDLRs) in neurons by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and reelin: Involvement of the E3 LIGASE myl1/idol. *Journal of Biological Chemistry*, 288(41), 29613–29620. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.500967>
- Drakew, A., Deller, T., Heimrich, B., Gebhardt, C., Del Turco, D., Tielsch, A., ... Frotscher, M. (2002). Dentate granule cells in reeler mutants and VLDLR and ApoER2 knockout mice. *Experimental Neurology*, 176, 12–24. <http://doi.org/10.1006/exnr.2002.7918>
- Duveau, V., Madhusudan, A., Caleo, M., Knuesel, I., & Fritschy, J. M. (2011). Impaired reelin processing and secretion by Cajal-Retzius cells contributes to granule cell dispersion in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 21, 935–944. <http://doi.org/10.1002/hipo.20793>
- Falconer, D. (1951). Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *Journal of Genetics*, 50(2), 192–205. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02996215>
- Fatemi, S. H., Snow, A. V., Stary, J. M., Araghi-Niknam, M., Reutiman, T. J., Lee, S., ... Pearce, D. a. (2005). Reelin signaling is impaired in autism. *Biological Psychiatry*, 57, 777–787. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.018>
- Fester, L., & Rune, G. M. (2014). Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Research*, 1621, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.033>
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S. F., Maloratsky, A., Jacobs, K. M., Harris, K. M., & Greenberg, M. E. (1997). CREB: A major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19(5), 1031–1047. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80395-5](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80395-5)
- Fiols, C. J., Williams, J. S., Chouon, C.-H., Wang, Q. M., Roach, P. J., & Andrisanioll, O. M. (1994). A Secondary Phosphorylation of CREB341 at Serf2 ' Is Required for the CAMP-mediated Control of Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 269(12), 32187–32193.
- Förster, E., Jossin, Y., Zhao, S., Chai, X., Frotscher, M., & Goffinet, A. M. (2006). Recent progress in understanding the role of Reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 23(December 2005), 901–909. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04612.x>
- Forster, E., Tielsch, A., Saum, B., Weiss, K. H., Johanssen, C., Graus-Porta, D., Frotscher, M. (2002). Reelin, Disabled 1, and α 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 13178–13183. <http://doi.org/10.1073/pnas.202035899>

- Förster, E., Zhao, S., & Frotscher, M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience*. <http://doi.org/10.1038/nrn1882>
- Friedman, W. J., Olson, L., & Persson, H. (1991). Cells that Express Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA in the Developing Postnatal Rat Brain. *Eur.J.Neurosci.*, 3(1460–9568 (Electronic)), 688–697.
- Frotscher, M. (1998). Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 570–575. [http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(98\)80082-2](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80082-2)
- Gates, M. A., Tai, C. C., & MacKlis, J. D. (2000). Neocortical neurons lacking the protein-tyrosine kinase B receptor display abnormal differentiation and process elongation in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 98(3), 437–447. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00106-8](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00106-8)
- Ghosh, A., Carnahan, J., & Greenberg, M. E. (1994). Survival of Cortical Neurons Requirement for BDNF in Activity-Dependent. *Science*, 263(5153), 1618–1623. <http://doi.org/10.1126/science.7907431>
- Gibbs, R. B. (1998). Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Research*, 787(2), 259–268. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01511-4](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01511-4)
- Gilmore, E. C., & Herrup, K. (1997). Cortical development: layers of complexity. *Current Biology : CB*, 7(4), R231–R234. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00108-4](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00108-4)
- Gonzalez, G. A., & Montminy, M. F. (1989). Cyclic AMP Stimulates Somatostatin Gene Transcription by Phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cell*, 59(4), 675–680. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90013-5](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90013-5)
- González, M., Cabrera-socorro, A., Pérez García, C. G., Fraser, J. D., Lopez, F. J., Alonso, R., & Meyer, G. (2007). Distribution Patterns of Estrogen Receptor α and β in the Human Cortex and Hippocampus During Development and Adulthood. *The Journal of Comparative Neurology*, 503(6), 790–802. <http://doi.org/10.1002/cne.21419>
- Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(4), 1286–1291.
- Grayson, D. R., Chen, Y., Costa, E., Dong, E., Guidotti, A., Kundakovic, M., & Sharma, R. P. (2006). The human reelin gene: Transcription factors (+), repressors (-) and the methylation switch (+/-) in schizophrenia. *Pharmacology and Therapeutics*, 111, 272–286. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.007>
- Grimes, C. A., & Joje, R. S. (2001). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *Journal of Neurochemistry*, 78(6), 1219–32. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00495.x>
- Heinrich, C. (2006). Reelin Deficiency and Displacement of Mature Neurons, But Not Neurogenesis, Underlie the Formation of Granule Cell Dispersion in the Epileptic Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(17), 4701–4713. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5516-05.2006>
- Helen E. Scharfman, Thomas C. Mercurio, Jeffrey H. Goodman, Marlene A. Wilson, N. J. M. (2003). Hippocampal Excitability Increases during the Estrous Cycle in the Rat: A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neuroscience*, 23(37), 11641–11652.

- Hethorn, W. R., Ciarlone, S. L., Filonova, I., Rogers, J. T., Aguirre, D., Ramirez, R. A., ... Weeber, E. J. (2015). Reelin supplementation recovers synaptic plasticity and cognitive deficits in a mouse model for Angelman syndrome. *European Journal of Neuroscience*, 41(10), 1372–1380. <http://doi.org/10.1111/ejn.12893>
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B. W., Goffinet, A., Mumby, M. C., Cooper, J. a., & Herz, J. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of Disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, 24(2), 481–489. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80861-2](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80861-2)
- Hill, R. a., & Van Den Buuse, M. (2011). Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. *Brain Research*, 1384, 51–60. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.060>
- Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J., & Barde, Y. A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *Embo J*, 9(8), 2459–2464. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2369898>
- Honda, T., Kobayashi, K., Mikoshiba, K., & Nakajima, K. (2011). Regulation of cortical neuron migration by the reelin signaling pathway. *Neurochemical Research*, 36, 1270–1279. <http://doi.org/10.1007/s11064-011-0407-4>
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. a, Grant, P. E., Hourihane, J. O., ... Walsh, C. a. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genetics*, 26(september), 93–96. <http://doi.org/10.1038/79246>
- Howell, B. W., Gertler, F. B., & Cooper, J. A. (1997). Mouse disabled (mDab1): A Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO Journal*, 16(1), 121–132. <http://doi.org/10.1093/emboj/16.1.121>
- Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P., & Cooper, J. a. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*, 389(October), 733–737. <http://doi.org/10.1038/39607>
- Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P., & Cooper, J. A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*, 389(6652), 733–7. <http://doi.org/10.1038/39607>
- Howell, B. W., Herrick, T. M., & Cooper, J. A. (1999). Reelin-induced tryosine phosphorylation of Disabled 1 during neuronal positioning. *Genes and Development*, 13(6), 643–648. <http://doi.org/10.1101/gad.13.6.643>
- Howell, B. W., Herrick, T. M., Hildebrand, J. D., Zhang, Y., & Cooper, J. a. (2000). Dab 1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Current Biology : CB*, 10(1), 98109. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00608-4](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00608-4)
- Iguchi-ariga, S. M. M., & Schaffner, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer / promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes and Development*, 3, 612–619. <http://doi.org/10.1101/gad.3.5.612>
- Janssens RM, Brus L, Cahill DJ, Huirne JA, Schoemaker J, L. C. (2000). Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Human Reproduction Update*, 6(5), 505–518. <http://doi.org/10.1002/cne.21419>
- Jennes, L., Dalati, B., & Conn, P. M. (1988). Distribution of gonadotropin releasing hormone agonist binding sites in the rat central nervous system. *Brain Research*, 452(1–2), 156–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2841008>
- Jossin, Y. (2004). The Central Fragment of Reelin, Generated by Proteolytic Processing In Vivo, Is Critical to Its Function during Cortical Plate Development.

- Journal of Neuroscience*, 24(2), 514–521. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3408-03.2004>
- Jossin, Y., Gui, L., & Goffinet, A. M. (2007). Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(16), 4243–52. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0023-07.2007>
- Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 381–391. [http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00092-1](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00092-1)
- Keshvara, L., Benhayon, D., Magdaleno, S., & Curran, T. (2001). Identification of Reelin-induced Sites of Tyrosyl Phosphorylation on Disabled 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16008–16014. <http://doi.org/10.1074/jbc.M101422200>
- Kevin R. Jones, Isabel Fariñas, Carey Backus, and L. F. R. (1994). Targeted Disruption of the BDNF Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development but Not Motor Neuron Development. *Cell*, 76(6), 989–999. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90377-8](http://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90377-8)
- Kirschenbaum, B., & Goldman, S. A. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), 210–214. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.1.210>
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, 29(14), 2905–2919. <http://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>
- Kocherhans, S., Madhusudan, A., Doehner, J., Breu, K. S., Nitsch, R. M., Fritschy, J.-M., & Knuesel, I. (2010). Reduced Reelin Expression Accelerates Amyloid- Plaque Formation and Tau Pathology in Transgenic Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Neuroscience*, 30(27), 9228–9240. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0418-10.2010>
- Kretz, O. (2004). Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *Journal of Neuroscience*, 24(26), 5913–5921. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5186-03.2004>
- Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., & Cooper, J. a. (2005). Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(37), 8578–8586. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1656-05.2005>
- Lambert de Rouvroit, C., de Bergeyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y., & Goffinet, a M. (1999). Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Experimental Neurology*, 156(1), 214–7. <http://doi.org/10.1006/exnr.1998.7007>
- Liu, F. C., & Graybiel, A. M. (1998). Region-dependent dynamics of cAMP response element-binding protein phosphorylation in the basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4708–13. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9539803
- Marin-Padilla (1990). Three-dimensional structural organization of layer I of the human cerebral cortex: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 229, 89–105. doi: 10.1002/cne.902990107
- Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S. C., Kern, H., Kretz, O., Martin Villalba, A., ... Schütz, G. (2002). Disruption of CREB function in brain leads to

- neurodegeneration. *Nature Genetics*, 31(1), 47–54. <http://doi.org/10.1038/ng882>
- Marrone, M. C., Marinelli, S., Biamonte, F., Keller, F., Sgobio, C. A., Ammassari-Teule, M., ... Mercuri, N. B. (2006). Altered cortico-striatal synaptic plasticity and related behavioural impairments in reeler mice. *European Journal of Neuroscience*, 24(7), 2061–2070. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05083.x>
- Marty, S., Carroll, P., Cellerino, A., Castrén, E., Staiger, V., Thoenen, H., & Lindholm, D. (1996). Brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of various hippocampal nonpyramidal neurons, including Cajal-Retzius cells, in organotypic slice cultures. *Journal of Neuroscience*, 16(2), 675–687.
- Medina, D. L., Sciarretta, C., Calella, A. M., Von Bohlen Und Halbach, O., Unsicker, K., & Minichiello, L. (2004). TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLC??-mediated control of neuronal migration. *EMBO Journal*, 23(19), 3803–3814. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600399>
- Meitzen, J., Grove, D. D., & Mermelstein, P. G. (2012). The organizational and aromatization hypotheses apply to rapid, nonclassical hormone action: Neonatal masculinization eliminates rapid estradiol action in female hippocampal neurons. *Endocrinology*, 153(10), 4616–4621. <http://doi.org/10.1210/en.2012-1525>
- Mikoshiba, K., Nagaike, K., & Kohsaka, S. (1980). Developmental Studies on the Cerebellum from reeler Mutant Mouse in Vivo and in Vitro. *Developmental Biology*, 79, 64–80. [http://doi.org/doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90073-1](http://doi.org/doi.org/10.1016/0012-1606(80)90073-1)
- Minichiello, L., Calella, A. M., Medina, D. L., Bonhoeffer, T., Klein, R., & Korte, M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36(1), 121–137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367511>
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kühn, R., Unsicker, K., Cestari, V., ... Klein, R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, 24(2), 401–414. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80853-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80853-3)
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagnertt, J. A., Mandel, G., & Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(September), 6682–6686.
- Mota, S. I., Ferreira, I. L., Valero, J., Ferreira, E., Carvalho, A. L., Oliveira, C. R., & Rego, a. C. (2014). Impaired Src signaling and post-synaptic actin polymerization in Alzheimer's disease mice hippocampus — Linking NMDA receptors and the reelin pathway. *Experimental Neurology*, 261, 698–709. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.07.023>
- Mott, N. N., Pinceti, E., Rao, Y. S., Przybycien-Szymanska, M. M., Prins, S. A., Shults, C. L., ... Pak, T. R. (2014). Age-dependent Effects of 17 β -estradiol on the Dynamics of Estrogen Receptor β (ER β) Protein–Protein Interactions in the Ventral Hippocampus. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(3), 760–779. <http://doi.org/10.1074/mcp.M113.031559>
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphyl, R. A. (2001). Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12660–12666. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008104200>
- Niu, S., Yabut, O., & D'Arcangelo, G. (2008). The Reelin Signaling Pathway Promotes Dendritic Spine Development in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10339–10348. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1917-08.2008>
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajimat, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Mikoshibat,

- K. (1995). The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*, 14(5), 899–912. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90329-1](http://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90329-1)
- Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M. G., Uzunov, D. P., Costa, E., Guidotti, A., & Caruncho, H. J. (1998). Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3221–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3221>
- Prange-Kiel, J., Jarry, H., Schoen, M., Kohlmann, P., Lohse, C., Zhou, L., & Rune, G. M. (2008). Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Cell Biology*, 180(2), 417–426. <http://doi.org/10.1083/jcb.200707043>
- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H., & Rune, G. M. (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13(2), 226–234. <http://doi.org/10.1002/hipo.10075>
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, 145(1), 61–83. <http://doi.org/10.1002/cne.901450105>
- Ramos-Moreno, T., Galazo, M. J., Porrero, C., Martínez-Cerdeño, V., & Clascá, F. (2006). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: Immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 23(2), 401–422. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04567.x>
- Ran, I., Laplante, I., & Lacaille, J.-C. (2012). CREB-Dependent Transcriptional Control and Quantal Changes in Persistent Long-Term Potentiation in Hippocampal Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 32(18), 6335–6350. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5463-11.2012>
- Rhoda, J., Corbier, P., & Roffi, J. (1984). Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: Aromatization of testosterone to 17 β -estradiol. *Endocrinology*, 114(5), 1754–1760. <http://doi.org/10.1210/endo-114-5-1754>
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A., & Ginty, D. D. (1999). Mediation by a CREB Family Transcription Factor of NGF-Dependent Survival of Sympathetic Neurons. *Science*, 286(December), 2358–2362. <http://doi.org/10.1126/science.286.5448.2358>
- Rice, D. S., & Curran, T. (2001). Role of the Reelin Signaling Pathway in Central Nervous System Development.
- Rice, D. S., Sheldon, M., D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Goldowitz, D., & Curran, T. (1998). Disabled-1 acts downstream of Reelin in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development (Cambridge, England)*, 125, 3719–3729.
- Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., ... Ibáñez, C. F. (1998). BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron*, 21, 305–315. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80540-1](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80540-1)
- Rogers, J. T., Rusiana, I., Trotter, J., Zhao, L., Donaldson, E., Pak, D. T. S., ... Weeber, E. J. (2011). Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(9), 558–564. <http://doi.org/10.1101/lm.2153511>
- Rudolph, D., Tafuri, A., Gass, P., Hämmerling, G. J., Arnold, B., & Schütz, G. (1998). Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences*, 95(8), 4481–4486. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/95/8/4481.abstract>
- Saini, H. S., Gorse, K. M., Boxer, L. M., & Sato-bigbee, C. (2004). Neurotrophin-3 and a CREB-mediated signaling pathway regulate Bcl-2 expression in oligodendrocyte progenitor cells. *Journal of Neurochemistry*, 89, 951–961. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02365.x>
- Sánchez-Huertas, C., & Rico, B. (2011). CREB-dependent regulation of gad65 transcription by BDNF/TrkB in cortical interneurons. *Cerebral Cortex*, 21(4), 777–788. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhq150>
- Schulz, S., Siemer, H., Krug, M., & Höllt, V. (1999). Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(13), 5683–5692. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/19/13/5683%5Cnpapers3://publication/uuid/01594AB7-F231-4B3F-905C-9491383E29D6>
- Schwieger, J., Warnecke, A., Lenarz, T., & Esser, K. (2015). Neuronal Survival , Morphology and Outgrowth of Spiral Ganglion Neurons Using a Defined Growth Factor Combination. *PLoS ONE*, 10(8), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0133680>
- Seminara, S. B., Hayes, F. J., & Crowley, W. F. (1998). Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency in the Human (Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann's Syndrome): Pathophysiological and Genetic Considerations. *Endocrine Reviews*, 19(5), 521–539. <http://doi.org/10.1210/edrv.19.5.0344>
- Sheldon, M., Rice, D. S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., ... Goldowitz, D. (1997). Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature*, 389(6652), 730–3. <http://doi.org/10.1038/39601>
- Silva, A. J., Kogan, J. H., & Frankland, P. W. (1998). Creb and memory. *Annu Rev Neurosci.*, 21, 127–148. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.127>
- Singh, M., Meyer, E. M., & Simpkins, J. W. (1995). The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*, 136(5), 2320–2324. <http://doi.org/10.1210/endo.136.5.7720680>
- Sohrabji, F., Miranda, R. C., & Toran-Allerand, C. D. (1995). Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 11110–11114.
- Soriano, E., Del Río, J. A., Martínez, A., & Supèr, H. (1994). Organization of the Embryonic and Early Postnatal Murine Hippocampus. I Immunocytochemical Characterization of Neuronal Populations in the Subplate and Marginal Zone. *The Journal of Comparative Neurology*, 342, 571–595. <http://doi.org/10.1007/s00330-011-2364-3>
- Stoppini, L., Buchs, P. -a., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37, 173–182. [http://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](http://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M)
- Strasser, V., Fasching, D., Hauser, C., Mayer, H., Bock, H. H., Hiesberger, T., ... Nimpf, J. (2004). Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 24(3), 1378–86. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.3.1378-1386.2004>

- Telese, F., Ma, Q., Perez, P. M., Notani, D., Oh, S., Li, W., ... Rosenfeld, M. G. (2015). LRP8-Reelin-Regulated Neuronal Enhancer Signature Underlying Learning and Memory Formation. *Neuron*, 86, 696–710. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.033>
- Tissir, F., & Goffinet, A. M. (2003). Reelin and brain development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(6), 496–505. <http://doi.org/10.1038/nrn1113>
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., ... Herz, J. (1999). Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, 97(6), 689–701. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80782-5](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80782-5)
- Tsui, D., Voronova, A., Gallagher, D., Kaplan, D. R., Miller, F. D., & Wang, J. (2014). CBP regulates the differentiation of interneurons from ventral forebrain neural precursors during murine development. *Developmental Biology*, 385(2), 230–241. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.11.005>
- Tullai, J. W., Chen, J., Schaffer, M. E., Kamenetsky, E., Kasif, S., & Cooper, G. M. (2007). Glycogen synthase kinase-3 represses cyclic AMP Response element-binding protein (CREB)-targeted Immediate early genes in quiescent cells. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M700067200>
- Utsunomiya-Tate, N., Kubo, K., Tate, S., Kainosho, M., Katayama, E., Nakajima, K., & Mikoshiba, K. (2000). Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9729–34. <http://doi.org/10.1073/pnas.160272497>
- Wadzinski, B. E., Wheat, W. H., Jaspers, S., Peruski, L. F., Lickteig, R. L., Johnson, G. L., & S, D. J. K. (1993). Nuclear Protein Phosphatase 2A Dephosphorylates Protein Kinase A-Phosphorylated CREB and Regulates CREB Transcriptional Stimulation. *Molecular and Cellular Biology*, 13(5), 2822–2834.
- Weeber, E. J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J. M., Förster, E., David Sweatt, J., & Herz, J. (2002). Reelin and apoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39944–39952. <http://doi.org/10.1074/jbc.M205147200>
- Weiland, N. G., Orikasa, C., Hayashi, S., & McEwen, B. S. (1997). Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *Journal of Comparative Neurology*, 388(4), 603–612. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971201\)388:4<603::AID-CNE8>3.0.CO;2-6](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971201)388:4<603::AID-CNE8>3.0.CO;2-6)
- Weisz, J., & Ward, I. L. (1980). Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*, 106(1), 306–316. <http://doi.org/10.1210/endo-106-1-306>
- Wen, S., Götz, I. N., Mai, O., Schauer, C., Leinders-Zufall, T., & Boehm, U. (2011). Genetic identification of GnRH receptor neurons: A new model for studying neural circuits underlying reproductive physiology in the mouse brain. *Endocrinology*, 152(4), 1515–1526. <http://doi.org/10.1210/en.2010-1208>
- Wilson, A. C., Salamat, M. S., Haas, R. J., Roche, K. M., Karande, A., Meethal, S. V., ... Atwood, C. S. (2006). Human neurons express type I GnRH receptor and respond to GnRH I by increasing luteinizing hormone expression. *Journal of Endocrinology*, 191(1), 651–663. <http://doi.org/10.1677/joe.1.07047>
- Woolley, C. S. (2007). Acute Effects of Estrogen on Neuronal Physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 657–680. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105219>
- Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1990). Naturally Occurring Fluctuation in Dendritic

- Hippocampal Pyramidal Neurons Spine Density on Adult. *The Journal of Neuroscience*, 10(December), 4035–4039.
- Wray, S., Grant, P., & Gainer, H. (1989). Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode (prenatal development/in situ hybridization/histochemistry/immunocytochemistry/[³H]thymidine autoradiography). *Neurobiology*, 86(October), 8132–8136.
<http://doi.org/10.1073/pnas.86.20.8132>
- Wu, G.-Y., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: Convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2808–2813.
<http://doi.org/10.1073/pnas.051634198>
- Wyss, J. M., Stanfield, B. B., & Cowan, W. M. (1980). Structural abnormalities in the olfactory bulb of the Reeler mouse. *Brain Research*, 188(2), 566–571.
[http://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90056-6](http://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90056-6)
- Yu, D., Fan, W., Wu, P., Deng, J., Liu, J., Niu, Y., ... Deng, J. (2014). Characterization of hippocampal Cajal-Retzius cells during development in a mouse model of Alzheimer ' s disease (Tg2576), 9(4).
<http://doi.org/10.4103/1673-5374.128243>
- Zhou, J., Zhang, H., Cohen, R. S., & Pandey, S. C. (2005). Effects of Estrogen Treatment on Expression of BDNF and CREB Expression and Phosphorylation in Rat amygdaloid and hippocampal Structures. *Neuroendocrinology*, 81(5), 294–310. <http://doi.org/10.1159/000088448>.
- Zhou, P., Porcionatto, M., Pilapil, M., Chen, Y., Choi, Y., Tolias, K. F., Segal, R. A. (2007). NIH Public Access. *Neuron*, 5(1), 56–68.
<http://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.030>

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen Kollegen des Instituts für Neuroanatomie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bedanken, die mich mit Rat und Tat unterstützten, sowie die Arbeit im Labor sehr angenehm machten. Ganz besonderer Dank gilt natürlich meinem Betreuer Dr. Maurice Meseke, der mich auf diesem Weg sehr eng betreut und unterstützt hat und mich sehr gut methodisch wie auch theoretisch in die Grundlagenforschung eingeführt und wissenschaftliches Denken gelehrt hat, sowie meinem Doktorvater Herrn Prof. Eckart Förster, der trotz der räumlichen Distanz stets ansprechbar war und mit seinen Ideen bereichert hat. Herrn Dr. Hans O. Pinnschmidt vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie am UKE danke ich für die Beratung und Unterstützung bei der für einen Mediziner teils sehr verwirrenden statistischen Datenanalyse. Frau Prof. Gabriele Rune möchte ich für die Möglichkeit der Arbeit an Ihrem Institut und den hiermit verbundenen Möglichkeiten sehr danken.

Zu allerletzt danke ich meinen lieben Eltern für die anhaltende Unterstützung während Schule, Studium und nun auch dem Weg bis zur Promotion, ohne deren ständige Motivation und Bekräftigung dies nicht möglich gewesen wäre.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10. 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.

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

Unterschrift: