

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR LOKALISATION UND EXPRESSION DES REELIN - SYSTEMS
IM HUMANEN ENTERISCHEN NERVENSYSTEM UND IM RATTENDARM**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian – Albrechts - Universität zu Kiel

vorgelegt von
PUYA GHORBANI FIDKOUHI

aus Ahwaz

Kiel 2015

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. M. Böttner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Baron

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.01.2016

gez.:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung	10
1.1. Das Enterische Nervensystem (ENS)	10
1.1.1. Einführung.....	10
1.1.2. Funktion des ENS	10
1.1.3. Anatomie und Histologie des ENS.....	11
1.1.4. Neurone und Neurotransmitter des ENS	12
1.2. Reelin	13
1.2.1. Struktur Reelins.....	13
1.2.2. Reelin Synthese	14
1.2.3. Reelin Rezeptoren und Signalkaskade	14
1.2.4. Proteolytische Spaltung von Reelin	15
1.2.5. Bedeutung Reelins im zentralen Nervensystem (ZNS) während der Entwicklung und im adulten Gehirn	16
1.2.6. Bedeutung Reelins in humanen Pathologien	16
1.3. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)	17
2. Zielsetzung und Fragestellung.....	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Material und Geräte	19
3.1.1. Chemikalien.....	19
3.1.2. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.3. Kits	22
3.1.4. Antikörper	23
3.1.5 Puffer und Lösungen	23
3.1.6 Nucleotide und Wachstumsfaktoren	25

3.1.7 Enzyme	25
3.2. Methoden.....	26
3.2.1. Gewebe.....	26
3.2.2. Laser Capture-Microdissection (LCM)	29
3.2.3. RNA-Isolierung	30
3.2.4. mRNA-Expressionsstudien.....	31
3.2.5. Immunohistochemische Verfahren	35
3.2.6. Statistische Verfahren	43
4. Ergebnisse	44
4.1. mRNA Expressionsstudien an humanem Gewebe.....	44
4.1.1. mRNA Expression des Reelin-Systems im humanen Kolon	44
4.1.2. Genexpression des Reelin-Systems in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons	45
4.2. Lokalisation von Reelin im humanen Kolon.....	46
4.2.1. Immunohistochemie für Reelin an humanem Kolon mittels Detektion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Hämalaun Kernfärbung.....	46
4.2.2. Dual-Label-Immunohistochemie	47
4.2.2.1. Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin und PGP 9.5 im humanen Kolon....	47
4.2.3. Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin und Synaptophysin im humanen Kolon	48
4.3. Ontogenetische Studie der mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im Dün- und Dickdarm der Ratte	56
4.4. Zellkultur	60
5. Diskussion.....	61
5.1. Wesentliche Erkenntnisse.....	61
5.2. Methodik	61
5.2.1. Lokalisationsstudien	61
5.2.2. Expressionsstudien	63

5.3. Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im humanen enterischen Nervensystem.....	63
5.4. Lokalisation von Reelin im humanen Kolon.....	64
5.4.1. Kolokalisation von Reelin mit PGP 9.5.....	64
5.4.2. Kolokalisation von Reelin mit Synaptophysin.....	65
5.5. Ontogenesestudie: mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im Rattendarm.....	67
5.6. Reelin-Lokalisation in Kulturen enterischer Ganglienzellen.....	69
5.7. Mögliche synaptische Funktionen von Reelin im ENS.....	71
5.8. Ausblick	72
6. Zusammenfassung.....	73
7. Literaturverzeichnis	75
8. Danksagung	92
9. Lebenslauf.....	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionen des enterischen Nervensystems (ENS)	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung (A) und humaner Paraffinschnitt in Hämatoxylin-Eosin Färbung (B) der Darmwand mit Plexus submucosus und Plexus myentericus (modifiziert nach Böttner et al 2012).....	12
Abbildung 3: Molekülstruktur von Reelin (modifiziert nach Dityatev und Schachner 2003). ..	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Reelin-Signalwegs (modifiziert nach Herz und Chen, 2006)	15
Abbildung 5: mRNA Expression des Reelin-Systems in Ganzwandresektaten und intestinalen Gewebeschichten des humanen Kolons.....	45
Abbildung 6: mRNA Expression des Reelin-Systems in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons.....	46
Abbildung 7: Lokalisation von Reelin im humanen Kolon. Immunohistochemie für Reelin. ...	49
Abbildung 8: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und PGP 9.5 (rot) im Plexus myentericus des humanen Kolons.....	50
Abbildung 9: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und PGP 9.5 (rot) im Plexus submucosus des humanen Kolons.....	51
Abbildung 10: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und PGP 9.5 (rot) in Nervenfasern der Tunica muscularis des humanen Kolons	52
Abbildung 11: Dual-Label-Immunocytochemie für Reelin (grün) und Synaptophysin (rot) im Plexus Myentericus des humanen Kolons	53
Abbildung 12: Dual-Label-Immunocytochemie für Reelin (grün) und Synaptophysin (rot) im Plexus submucosus des humanen Kolons	54
Abbildung 13: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und Synaptophysin (rot) in Nervenfasern der Tunica muscularis des humanen Kolons	55
Abbildung 14: Ontogenetische Studie zur relativen mRNA-Expression von Reelin, VLDLR, Lrp 8 und Dab1 im Dünndarm (A-D) und Dickdarm (E-H) der Ratte	59
Abbildung 15: Immunohistochemie für Reelin in für 3 Wochen kultivierten enterischen Ganglienzellen von Ratten	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	19
Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte.....	21
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	22
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	23
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 7: Verwendete Nucleotide und Wachstumsfaktoren.....	25
Tabelle 8: Verwendete Enzyme.....	25
Tabelle 9: Protokoll Paraffineinbettung	27
Tabelle 10: Arbeitsprotokoll für den DNase Verdau und die cDNA Synthese mittels reverser Transkription	31
Tabelle 11: Arbeitsprotokoll der qPCR.....	34
Tabelle 12: Verwendete Primersequenzen in der qPCR.....	34
Tabelle 13: Verwendete Antikörper in der Immunohistochemie	38
Tabelle 14: Arbeitsprotokoll der Immunohistochemie nach ABC-Methode und mit DAB als Chromogen an paraffineingebetteten Schnitten des humanen Kolons.....	38
Tabelle 15: Arbeitsprotokoll der Immunohistochemie nach der ABC-Methode und mit DAB als Chromogen an kultivierten enterischen Nervenzellen	40
Tabelle 16: Verwendete Antikörper in der Dual-Label Fluoreszenz-Immunohistochemie.....	42
Tabelle 17: Arbeitsprotokoll der Dual-Label Fluoreszenz-Immunohistochemie an paraffineingebetteten Schnitten des humanen Kolons.....	42

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex Methode
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Antigen
AK	Antikörper
ANS	Autonomes Nervensystem
ApoEr2	Apolipoprotein E receptor 2
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Baasenpaar
CA 1	Cornu ammonis 1
Ca+	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	engl.: complementary desoxyribonuclein acid
CREB	cyclic-AMP-response element binding protein
Ct	engl.: Cycle Threshold
C-Terminus	Carboxy-terminale Ende eines Proteins
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dab1	Disabled 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	engl.: Desoxyribonuclein acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine-tetraacetic-acid
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

ENS	Enterisches Nervensystem
Fc	engl.: fragment crystallizable
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FFPE	formalin-fixierte, paraffin-eingebettet
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung
GABA	engl.: γ -Aminobutyric acid
GDNF	Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor
GFL	GDNF- family of Ligands
GFR α	GDNF-family Rezeptor α 1
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	engl.: hour
H ₂ O	chem. Formel für Wasser
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HL	Hämalaun
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
kDa	Kilodalton
LCM	Laser Capture Microdissection
LIMK	Lin 11, Isl-1, Mec-3-Kinase
Lis1	Lissenzephalie Gen 1
Lrp8	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8
LZP	Langzeitpotenzierung
MEM	minimum essential medium
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol

Min.	Minuten
MW	Mittelwert
mRNA	engl.: messenger ribonucleinacid
ng	nanogramm
NICD	Notch-intrazelluläre Domäne
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-Terminus	Amino-terminale Ende eines Proteins
P	Postnataltag
PBS	engl.: phosphate buffered Saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PDL	Poly-D-Lysin
PGP 9.5	engl.: protein gen product 9.5
qPCR	engl.: quantitative polymerase chain reaction
RET	engl.: rearranged during transfection
RNA	engl.: Ribonucleic acid
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	engl.: real-time polymerase chain reaction
SEM	engl.: standard error of the mean
SNAP25	synaptosomal assoziiertes Protein 25
SSW	Schwangerschaftswoche
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus Thermophilus aquaticus
TBS	engl.: Tris-buffered Saline
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Das Enterische Nervensystem (ENS)

1.1.1. Einführung

Das enterische Nervensystem (ENS) umfasst über 150 Millionen Neurone und erstreckt sich über den gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT). Neben diesem innerviert es zusätzlich Pankreas, Leber und Gallenblase (Costa, 1987) und kann als Teil des autonomen Nervensystems (ANS) betrachtet werden, da es zwar gewissen Einflüssen des Zentralnervensystems (ZNS) unterliegt, jedoch weitgehend autark von diesem arbeitet (Bornstein, 2009; Wood, 2004). So zeigten frühe Versuche von Bayliss und Starling, dass ein isolierter Darm weiterhin seine regelrechte Funktion durchführt und der Darminhalt von oral nach aboral koordiniert transportiert wird (Bayliss and Starling, 1899, 1900). Daraufhin wurde 1899 „the law of the intestine“ formuliert, welches besagt, dass ein Stimulus (Anwesenheit von Nahrung im Darm) eine Kontraktion im proximalen Anteil und eine Relaxation im distalen Anteil des Darmabschnittes initiiert. Aufgrund seiner Autonomie und funktionalen Komplexität wird das ENS auch „little brain of the gut“ genannt (Frieling, 1993; Wood, 1999). Die Nomenklatur „enterisches Nervensystem“ wurde 1921 eingeführt (Langley, 1921).

Ontogenetisch entstammen die enterischen Neurone multipotenten Stammzellen der Neuralleiste, einer transienten Komponente des Ektoderms während der Neurulation (Le Douarin and Teillet, 1974; Le Douarin, 1973). Der Ursprung der meisten enterischen Stammzellen lässt sich in der vagalen Neuralleistenregion (im Bereich der Somiten 1-7) lokalisieren, eine geringere Anzahl befindet sich auch im sakralen Bereich (Burns and Le Douarin, 1998; Pomeranz and Gershon, 1990). Die Wanderung erfolgt zunächst ventrolateral und anschließend ventromedial entlang der dorsalen Aorta. Nach vollständiger Kolonisation formen diese Stammzellen komplexe Netzwerke aus differenzierten Neuronen und Gliazellen, welche sich in Ganglien zwischen der Ring- und Längsmuskulatur (Plexus myentericus) und in der Submukosa (Plexus submucosus) ansiedeln (Le Douarin and Teillet, 1974; Le Douarin, 1973). Untersuchungen zeigten, dass sich zunächst der myenterische Plexus ausbildet, gefolgt vom submukösen Plexus (Jiang et al., 2003).

1.1.2. Funktion des ENS

Das ENS reguliert Peristaltik, Motorik, Blutfluss sowie den mukösen Transport und die Sekretion durch die Drüsen (Abb.1). Zusätzlich beeinflusst es immunologische und endokrine Funktionen, aber auch den Wasser- und Ionentransport (Costa et al., 2000; Furness and

Costa, 1987; Snoek et al., 2010; Suprenant, 1994). Das ENS ist in der Lage, die Effektoren, wie zum Beispiel die Muskulatur oder die Mukosa, getrennt zu steuern und aktivierende oder hemmende Wirkung auszuüben, wobei der Plexus submucosus maßgeblich Vorgänge in der Mukosa steuert, während der Plexus myentericus für die Muskulatur im GIT zuständig ist. Zudem sorgt die Verbindung dieser beider *Plexus* dafür, dass die diversen Vorgänge während der Propulsion zeitlich aufeinander abgestimmt werden können.

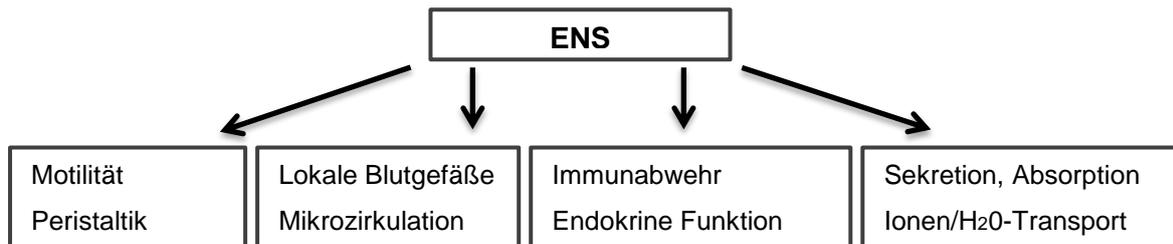


Abbildung 1: Funktionen des enterischen Nervensystems (ENS)

1.1.3. Anatomie und Histologie des ENS

Das ENS ist in der Wand des GIT lokalisiert. Die in Ganglien zusammengelagerten Neurone sind durch interganglionäre Nervenfasern miteinander verbunden. So entstehen *Plexus* aus einem Nervenfasernetz mit je einem Ganglion an den Knotenpunkten (Lüllmann-Rauch, 2003) und Gliazellen mit Nähr- und Stützfunktion. Die Neurone bilden die erregungsleitende Struktur des ENS und innervieren den GIT und mit cholinergen und nitregeren Axonen auch interstitielle Zellen von Cajal (Huizinga et al., 2011), welche eine Schrittmacherfunktion einnehmen (Hirst et al., 2006; Hirst and Suzuki, 2006; Thuneberg, 1982). Die unterschiedlichen *Plexus* werden grob unterteilt in den Plexus submucosus, welcher in der Submukosa liegt (Meissner Plexus) und den Plexus myentericus (Auerbach Plexus), der zwischen der Ring- und Längsschicht der Tunica muscularis lokalisiert ist (Gunn, 1968; Ohkubo, 1936; Scheuermann D. W. und Stach, 1984) (Abb.2).

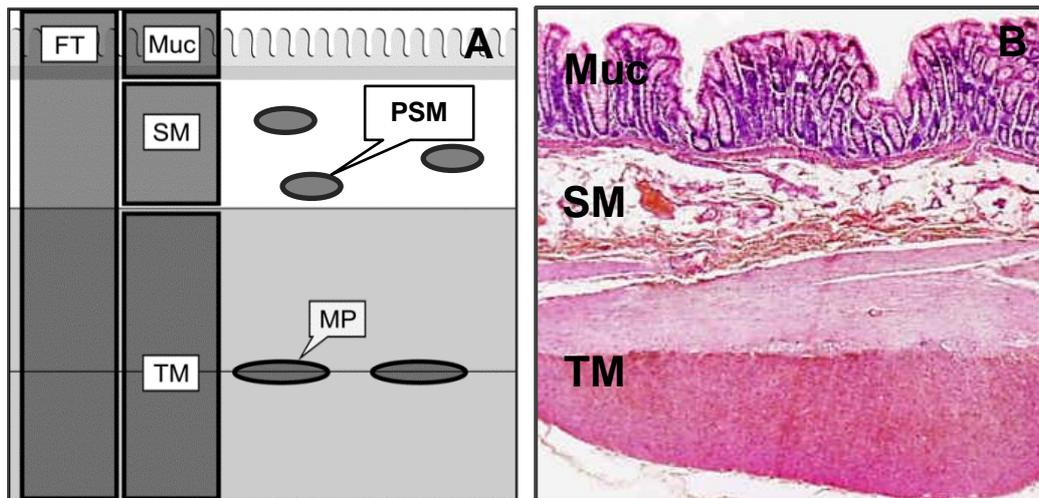


Abbildung 2: Schematische Darstellung (A) und humaner Paraffinschnitt in Hämatoxylin-Eosin Färbung (B) der Darmwand mit Plexus submucosus und Plexus myentericus (modifiziert nach Böttner et al 2012).
 FT = full thickness (Ganzwandschicht), MUC = Mukosa, SM = Submukosa, TM = Tunica muscularis, MP = Plexus myentericus, PSM = Plexus submucosus

1.1.4. Neurone und Neurotransmitter des ENS

Die von verschiedenen Neuronen des ENS vermittelten Funktionen reflektieren sich in der großen Diversität der Neurone, die sich in ihrer Form, Lokalisation, Projektion und Funktion unterscheiden (Costa et al., 1996). Um funktionale Diversität zu gewährleisten, werden in den unterschiedlichen Neuronen verschiedene Neurotransmitter, wie zum Beispiel Acetylcholin, Noradrenalin, Adenosintriphosphat (ATP), Peptide, Stickstoffmonoxid, Histamin und Serotonin, synthetisiert (Lüllmann-Rauch, 2003; McConalogue and Furness, 1994).

Intrinsische primär afferente Neurone finden sich sowohl in myenterischen als auch in submukösen Ganglien. Sie reagieren auf luminale chemische Stimuli, mechanische Veränderungen der Mukosa und Muskelspannung, wodurch die autonome sensorische Reizaufnahme ermöglicht wird (Costa et al., 2000; Costa et al., 1996; Furness et al., 1998). Die Motoneurone des ENS innervieren die Effektorsysteme des ENS und können aktivierend oder inhibierend wirken. Die exzitatorischen Neurone verwenden Acetylcholin und Tachykinin als Neurotransmitter und wirken direkt auf die glatte Muskulatur. In den inhibitorischen Motoneuronen kommen Stickstoffmonoxid, Serotonin, Adenosintriphosphat, Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Hypophyse aktivierendes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Verwendung (Brookes, 1991; Steele, 1991). Die Kommunikation zwischen enterischen Nervenzellen wird durch Interneurone sichergestellt. Diese ermöglichen die höhere Funktion des ENS und können hemmender oder aktivierender Form sein. Transmitter, die von Interneuro-

nen verwendet werden, sind unter anderem Acetylcholin, Substanz P, Serotonin, Stickstoffmonoxid und VIP (Brookes, 1997; Costa et al., 2000).

1.2. Reelin

Reelin ist ein großes, sezerniertes, extrazelluläres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 400 kDa, bestehend aus 3461 Aminosäuren (AS) (D'Arcangelo et al., 1995). Die Kartierung für das kodierende Gen erfolgte auf dem humanen Chromosom 7q22 (DeSilva et al., 1997). Sezernierte Reelin Moleküle bilden große Proteinkomplexe (Utsunomiya-Tate et al., 2000). Zudem zeigt Reelin eine Serin-Protease Charakteristik (Quattrocchi et al., 2002). Während der frühen Entwicklungsphase des Cortex reguliert Reelin die regelrechte Migration der kortikalen Neurone und in der späteren Entwicklungsphase die Ausreifung von Dendriten und dendritischen „Spines“ (stachelförmige Fortsätze). Im adulten Gehirn ist es an der Modulation synaptischer Funktionen beteiligt (Förster et al., 2010). Die Erstbeschreibung einer Reelin–Maus-Mutante, der sogenannten *Reeler*-Maus, die taumelnde Bewegungen aufwies, erfolgte durch Douglas S. Falconer 1951 (Falconer, 1951). Zusätzlich zeigten sich bei dieser Maus atypische Schichtungen des Neocortex, Hippocampus und Cerebellum (Caviness Jr, 1982; D'Arcangelo et al., 1995; Mariani et al., 1977; Ogawa et al., 1995; Stanfield et al., 1979; Tissir and Goffinet, 2003; Trommsdorff et al., 1999).

1.2.1. Struktur Reelins

Reelin besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, gefolgt von einer F-Spondin-ähnlichen, 200 AS langen Sequenz (F-spondin-like sequence) (Abb.3.). F-Spondin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches an Adhäsion und Extension von kommissuralen Axonen im Rückenmark beteiligt ist (Klar et al., 1992). Eine etwa 400 AS lange Region folgt der „F-spondin-like“ Domäne. Es folgen acht Repeats mit einer Länge von etwa je 380 AS mit zentralen „Epidermal Growth Factor-like“-Motiven (EGF-like-Motiv), welche die Repeats in Untereinheiten (A und B) unterteilen. Den Abschluss bildet ein C-terminales Ende (D'Arcangelo et al., 1995; Ichihara et al., 2001; Nogi et al., 2006; Tissir and Goffinet, 2003). Dieses ist essentiell für die Sekretion in den extrazellulären Raum (D'Arcangelo et al., 1997; Martínez-Cerdeño et al., 2003). Das N-terminale Signalpeptid beherbergt die Epitope für die Antikörper G 10, 142 und den funktions-neutralisierenden Antikörper CR-50 (D'Arcangelo et al., 1997; Nakajima et al., 1997; Ogawa et al., 1995).

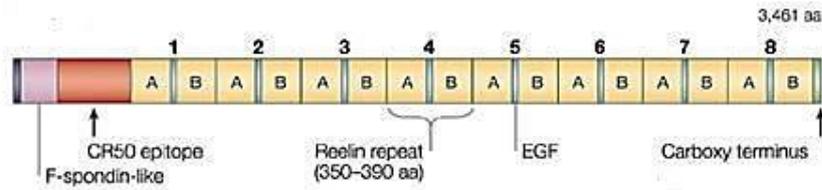


Abbildung 3: Molekülstruktur von Reelin (modifiziert nach Dityatev und Schachner 2003). Das Reelin-Molekül besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer anschließenden F-Spondin-ähnlichen Sequenz, gefolgt von acht Repeats (1-8), bestehend aus Unterdomänen (A u. B), die durch ein EGF-Motiv getrennt sind.

1.2.2. Reelin Synthese

Während der pränatalen Entwicklung des ZNS wird Reelin von Cajal-Retzius (CR) Zellen in der Marginalzone des Neocortex und Hippocampus und von Körnerzellen des Cerebellums synthetisiert und sezerniert (Alcántara et al., 1998; D'Arcangelo et al., 1997; Frotscher, 1998; Nakajima et al., 1997). Im adulten Gehirn wird Reelin von Subpopulationen GABAerger Interneurone, cerebellären Körnerzellen und bis zu einem gewissen Grad von verbleibenden Cajal-Retzius Zellen gebildet und sezerniert (Alcántara et al., 1998; Drakew et al., 1997; Pesold et al., 1998).

1.2.3. Reelin Rezeptoren und Signalkaskade

Das sezernierte Reelin bindet an die Lipoproteinrezeptoren Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (Lrp8), welcher auch als Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2) bekannt ist (Kim et al., 1996), und an Very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) (D'Arcangelo et al., 1999) (Abb.4). Diese wiederum sind mit ihrem cytoplasmatischen Anteil an das intrazelluläre Adapterprotein Disabled 1 (Dab1) (Howell et al., 1997a) gekoppelt (Howell et al., 1997b). Die Bindung Reelins an diese Rezeptoren induziert intrazellulär die Tyrosinphosphorylierung von Dab1 vor allem durch Fyn-und-Src-Kinasen (Ballif et al., 2003; Bock and Herz, 2003; Howell et al., 2000). Das phosphorylierte Dab1 aktiviert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Bock et al., 2003), was zur Aktivierung der Protein Kinase B und Inhibierung der Glykogen-Synthase Kinase 3 β (GSK 3 β) und letztendlich zur Phosphorylierung des Mikrotubuli-stabilisierenden Proteins Tau führt (Beffert et al., 2002). Zusätzlich führt die Aktivierung von PI3K zur Phosphorylierung der LIM-Kinase (LMK). Dies wiederum führt zur Phosphorylierung von Cofilin. Dadurch kann Cofilin das F-Aktin nicht mehr depolymerisieren, was zur Stabilisierung des Aktincytoskelettes führt (Arber et al., 1998; Chai et al., 2009a, b).

Einen alternativen Weg für die Stabilisierung neuronaler Fortsätze stellt die Reelin-Notch Interaktion dar. Die Notch-intrazelluläre Domäne (NICD) interagiert mit Dab1, was die Degradation von NICD verhindert (Hashimoto-Torii et al., 2008). Die Phosphorylierung von Dab1 führt zu einer retrograden Translokation des NICD in den Nucleus und induziert die Transkription bestimmter Zielgene, was zum Wachstumsarrest und zur Stabilisierung der Fortsätze führt (Šestan et al., 1999).

Weiterhin kommt es durch die Phosphorylierung von Dab1 zur Mobilisierung des Lissencephaly 1-Komplexes (Lis1). Dieser ist beteiligt an der Regulation neuronaler Migration und regelrechter kortikaler Schichtung (Herz and Chen, 2006). Zudem beeinflusst Reelin (Src-Kinase und Dab1 abhängig) die Aktivität NMDA-artiger Glutamatrezeptoren, durch Phosphorylierung und den dadurch resultierenden Calciumeinstrom, welcher wiederum den Transkriptionsfaktor cyclic-AMP-response element binding protein (CREB) induziert (Chen et al., 2005).

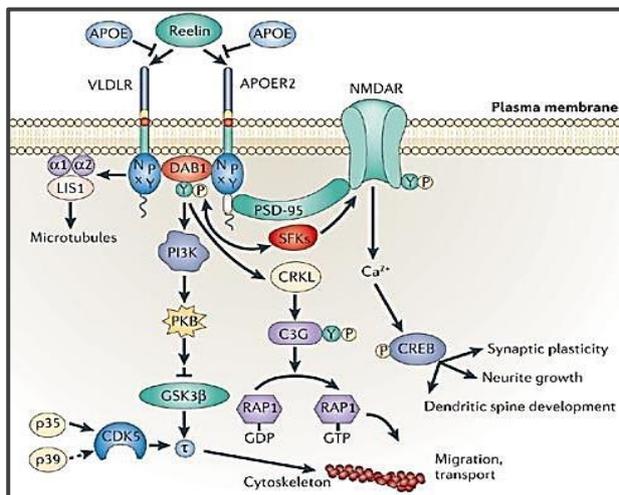


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Reelin-Signalwegs (modifiziert nach Herz und Chen, 2006). Reelin bindet an die Lipoproteinrezeptoren VLDLR und Lrp8 (ApoER2). Intrazellulär sind diese an Dab1 gekoppelt. Durch Phosphorylierung von Dab1 werden diverse intrazelluläre Vorgänge induziert.

1.2.4. Proteolytische Spaltung von Reelin

Reelin wird *in vivo* N-terminal nach dem zweiten Repeat und C-terminal nach dem sechsten Repeat proteolytisch, durch Metallproteasen und Proteasen des Plasminogen aktivierenden Systems, gespalten (Ignatova et al., 2004; Lambert de Rouvroit et al., 1999; Lugli et al., 2003). Es entstehen so zusätzlich fünf Fragmente. Drei dieser Fragmente enthalten die Repeats drei bis sechs, welche die zentralen Fragmente darstellen und ausschlaggebend für

die Bindung und Phosphorylierung von Dab1 sind (Jossin et al., 2004; Lambert de Rouvroit et al., 1999).

1.2.5. Bedeutung Reelins im zentralen Nervensystem (ZNS) während der Entwicklung und im adulten Gehirn

Während der frühen pränatalen Ontogenese ist Reelin an der Regulation der Migration und laminären Schichtung von Neuronen in diversen Strukturen des ZNS wie im Neocortex, Hippocampus, Cerebellum und Rückenmark beteiligt (Cooper, 2008; D'Arcangelo et al., 1995; Forster et al., 2006; Rakic and Caviness Jr, 1995; Tissir and Goffinet, 2003; Yip et al., 2007). Zudem fungiert Reelin als „Stop-Signal“ für Neurone, die ihre Zielposition erreicht haben, indem es die Ablösung migrierender Neurone vom radialen Glia-Gerüst induziert (Zhao and Frotscher, 2010). Außerdem beeinflusst Reelin die Differenzierung und Funktionalität radialer Gliazellen (Förster et al., 2002; Frotscher et al., 2003; Hartfuss et al., 2003). In späteren Entwicklungsphasen fördert Reelin die Dendritogenese (MacLaurin et al., 2007; Niu et al., 2008; Pappas et al., 2002; Yabut et al., 2007) und Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts (Chai et al., 2009b; Frotscher, 2010; Hiesberger et al., 1999). Zusätzlich spielt es bei der Modulation der Langzeitpotenzierung (LZP) (Chen et al., 2005; Pujadas et al., 2010) und synaptischer Plastizität (Beffert et al.; Rogers et al., 2011; Weeber et al., 2002) eine Rolle und ist beteiligt an präsynaptischer Neurotransmitterfreisetzung (Hellwig et al., 2011).

1.2.6. Bedeutung Reelins in humanen Pathologien

Eine Dysfunktion der Reelin Signalkaskade lässt sich in diversen neurologischen und neuropsychiatrischen Krankheitsbildern, namentlich der Lissenzephalie, Schizophrenie, bipolarer Störung, Major Depression, Autismus, Temporallappen-Epilepsie und Morbus Alzheimer, beobachten (Grayson et al., 2006; Guidotti A et al., 2000). So zeigt sich eine signifikante Herunterregulation der Reelin Expression im Kleinhirn von Patienten mit bipolarer Störung und Schizophrenie, bei autistischen Patienten zusätzlich im frontalen Cortex (Fatemi et al., 2001; Teixeira et al., 2011). Eine verringerte Reelin Expression wird mit der Entstehung von β -Amyloid-Plaques bei der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht (Kocherhans et al., 2010). Bei der Temporallappen-Epilepsie zeigt sich eine Korrelation zwischen Reelin Defizienz und der Entstehung der Körnerzell-Dispersion (Haas and Frotscher, 2010). Auch die autosomal rezessive Form der Lissenzephalie mit Kleinhirnhypoplasie steht in Assoziation mit einer Punktmutation des *RELN* Gens (Hong, 2000).

1.3. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)

Das Signalmolekül Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) moduliert die Proliferation und das Überleben enterischer Neurone (Anitha et al., 2006; Gianino et al., 2003; Heuckeroth et al., 1998) und stellt daher einen unabdingbaren Faktor für die ENS-Genese dar. Der GDNF/GFL-Komplex bindet an den transmembranen Tyrosin-Kinase-Rezeptor RET, welcher wiederum, im Zusammenhang mit der GDNF Signalkaskade, für seine Aktivierung eine der vier Glycosylphosphatidylinositol (GPI) gekoppelten Ko-Rezeptoren (GFR α 1–4) benötigt (Durbec et al., 1996; Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996). GDNF, GFR α oder RET Defizienz führen zu intestinaler Aganglionose und Defekten im sympathischen, parasymphathischen und sensorischen Nervensystem (Enomoto et al., 1998; Moore et al., 1996; Schuchardt et al., 1994).

2. Zielsetzung und Fragestellung

Reelin ist ein sezerniertes Protein, das eine entscheidende Rolle in der Regulation der neokortikalen Architektur während der Entwicklung spielt. Zu späteren Zeitpunkten konnte gezeigt werden, dass Reelin zusätzliche Funktionen wie die Modulation der Dendritogenese, die Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts und die Beeinflussung der Langzeit-Potenzierung ausübt. Seine biologischen Wirkungen vermittelt Reelin über die Rezeptoren VLDLR (Very low density-lipoprotein receptor) und Lrp8 (Low density lipoprotein receptor related protein 8), welche wiederum an Dab1 (Disabled 1) binden.

Während Expression und Funktion von Reelin im ZNS bereits gut beschrieben sind, ist über die Rolle von Reelin im ENS noch wenig bekannt. Daher sollten in dieser Arbeit grundlegende Erkenntnisse zur Expression und Funktion von Reelin im ENS gewonnen werden. Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Werden Reelin und dessen korrespondierende Rezeptoren und Dab1 im humanen Kolon und insbesondere in enterischen Ganglien exprimiert?
- In welchen Gewebe- und Zelltypen ist Reelin im humanen Kolon lokalisiert?
- Lässt sich eine Ko-Lokalisation von Reelin und dem synaptischen Vesikelmarker Synaptophysin im humanen Kolon nachweisen?
- Wie wird die Expression von Reelin, dessen Rezeptoren und Dab1 während der postnatalen Ontogenese im Dünndarm und Dickdarm der Ratte reguliert?
- Wird die Reelin Lokalisation in kultivierten enterischen Neuronen der Ratte durch den neurotrophen Faktor GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) beeinflusst?

3. Material und Methoden

3.1. Material und Geräte

3.1.1. Chemikalien

Nachfolgend in Tabelle 1 sind alle Chemikalien aufgeführt, die in dieser Arbeit zur Verwendung gekommen sind.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Antikörperdiluent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aquatex	Merck, Darmstadt, D
B 27 Supplementmix	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Blockserum „Normalserum“	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Citrat	Roth, Karlsruhe, D
DAPI	Roche, Mannheim, D
Desoxyribonukleosidtriphosphaste (dNTP`s)	Promega, Madison, U.S.A
3-3`-Diaminobenzidin (DAB)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNase Puffer	Sigma, Dreisenhofen, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)	Sigma, Dreisenhofen, D
Glutamine	Sigma, Dreisenhofen, D
Hämalaun nach Mayer	Roth, Karlsruhe, D
Hanks Balanced Salt Solution	Promocell, Heidelberg, D
Immumount	Thermo Scientific, Bremen, D
Isomount	Labonord, Templemars, Frankreich

Kristall-Violett	Merck, Darmstadt, D
Minimal Essential Medium (MEM)	Promocell, Heidelberg, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Methronidazol	Ratiopharm, Ulm, D
Neurobasalmedium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
PCR Puffer	Promega, Madison, U.S.A
Polylysin/Laminin	Sigma, Dreisenhofen, D
Refobacin	Merck, Darmstadt, D
RNase freies Wasser	Macherey-Nagel, Düren, D
Shandon Cryomatrix	Thermo Scientific, Bremen, D
TRIS	Roth, Karlsruhe, D
TRizol®	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau	Merck, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Roth, Karlsruhe, D

3.1.2. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Geräte und in Tabelle 3 aufgelisteten Verbrauchsmaterialien wurden in dieser Arbeit genutzt.

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte

Produkt	Name	Hersteller
Brutschrank	Forma Scientific	Labotect, Göttingen, D
Cryostat	2800Frigocut N	Reichert-Jung, Heidelberg, D
Digitalkamera	Axiocam	Zeiss, Jena, D
Digitalkamera	digital slight	Nikon, Tokio, Japan
Durchlicht-Mikroskop	eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
LCM-Instrument		Carl Zeiss MicroImaging München, D
Kühlschrank -20°C	electronic	Bosch, Gerlingen, D
Mikrowelle		Panasonic, Hamburg, D
Pipetten (1, 10, 100, 1000µl)	Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, D
Umluftschrank		Memmert, Schwabach, D
Thermocycler	ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Rodgau, D
Wasserbad		Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge	Minifuge 2	Heraeus Christ, Osterode, D
	Biofuge	Heraeus Christ, Osterode, D

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
AdhesiveCaps	Carl Zeiss, München, D
AMPLIseal	Greiner, Frickenhausen, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
HistoBond®	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Objektträger	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshafen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt, D
Probengefäße (Tubes 1,5ml)	Eppendorf, Sarstedt, D
96 Well Platten	Greiner Bio-one, Monroe, U.S.A

3.1.3. Kits

Für diese Arbeit verwendete Kits werden folgend in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Kits

Produkt	Hersteller
ABC Elite Kit	Vector Laboratories, Eching, D
Liquid DAB+ (Diaminobenzidin)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Nucleospin XS-Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
Nucleospin RNA II-Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
qPCR Master Mix Plus	Eurogentec, Köln, D

3.1.4. Antikörper

Für die Immunohistochemie und Dual-Label-Fluoreszenz-Immunohistochemie verwendete Primär- und Sekundärantikörper sind folgend in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Hersteller
Primär			
Anti-PGP 9.5	Rabbit	1:2000	UCL, Isle of Wight, GB
Anti-Reelin	Mouse	1:200	Acris, Herford, D
Anti-Synaptophysin	Rabbit	1:200	Biozol, Echingen, D
sekundär			
Alexa Fluor 488	goat, anti-mouse	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 546	goat, anti-rabbit	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alpha E 0432	goat, anti-rabbit, biotyniliert	1:400	Dako, Hamburg, D
Alpha E 0433	goat, anti-mouse, biotyniliert	1:400	Dako, Hamburg, D

3.1.5 Puffer und Lösungen

Folgend in Tabelle 6 sind in dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Menge/Herstellung
Puffer		
TBS Puffer (pH 7,6)		9 Teile H ₂ O bidest
		1 Teil TBS-Stammlösung:
	Tris-Base	242,28g [10 mM] TRIS

	Natriumchlorid	344,40g [50 mM] NaCl
Zitronesäurepuffer (pH 6,1)	Citrat	2,1g [10 mM]
	H ₂ Odest	1l
PBS Puffer (pH 7,2)	NaCl	16,00g [273 mM]
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	2,88g [12,8 mM]
	KH ₂ PO ₄	0,48g [3,5 mM]
	KCl	0,40g [5,3 mM]
	H ₂ O bidest	ad 2l

Lösung

MEM +Antibiose	Fertiglösung	500,0ml
	PS-Lösung (Penicillin-Streptomycin)	6,0ml
	Metronidazol (500mg/ml)	1,0ml
	Refobacin (40mg/ml)	0,5ml
HBSS w Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Fertiglösung	500,0ml
	PS-Lösung	6,0ml
Neurobasalmedium	Fertiglösung	500,00ml
	Glutamine	1,25ml
	PS-Lösung	6,00ml
	B27 Supplementmix	10,00ml
H ₂ O ₂ -Lösung final 3%	30% H ₂ O ₂	20ml
	H ₂ O bidest	180ml

3.1.6 Nucleotide und Wachstumsfaktoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Nucleotide und Wachstumsfaktoren sind wie folgt in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Nucleotide und Wachstumsfaktoren

Produkt	Hersteller
Nucleotid	
Primer ¹	GE Healthcare, Freiburg, D
Protein	
GDNF 100µg/ml	PeptoTech, Hamburg, D

¹Primersequenzen siehe Tabelle 12

3.1.7 Enzyme

Enzyme, die in dieser Arbeit zur Verwendung gekommen sind, sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Produkt	Hersteller
Collagenase	Sigma, Dreisenhofen, D
Desoxyribonuklease I	Sigma, Dreisenhofen, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, U.S.A
Trypsin	Sigma, Dreisenhofen, D

3.2. Methoden

3.2.1. Gewebe

3.2.1.1. Humanes Gewebe

Das humane Vollwandgewebe, welches für die Immunohistochemie und in Genexpressionsstudien verwendet wurde, entstammte Patienten, die sich aufgrund eines nicht-stenosierenden distalen Kolonkarzinoms einer Resektion im Bereich des (sigmoiden) Kolons oder Rektums unterziehen mussten. Es lagen keine intestinalen Motilitätsstörungen oder Hinweise für eine enterische Neuropathie vor. Die Genehmigung zur Studie an humanem Gewebe stammte von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland (B299/07).

Nach Resektatentnahme wurde im Bereich des distalen Sigmoids, proximal der Konfluenz der Tänien ein 6 cm x 3 cm großes Gewebestück zur weiteren Aufbereitung entnommen. Es wurde ein Mindestabstand von 10 cm zu dem Tumor eingehalten, um eine physiologische Morphologie zu gewährleisten. Der Längsrand des Gewebelockes entsprach hierbei der Schnittoberfläche für histologische Schnitte. Die Ausrichtung erfolgte quer zur Darmachse. Einer Austrocknung des entnommenen Gewebes, während des Transports von der Klinik in das Labor, wurde durch Lagerung in PBS (Phosphate-buffered-saline, pH=7,2) Puffer vorgebeugt. Um ein Schrumpfen oder Dehnen des Gewebes zu vermeiden, wurde es spannungsfrei, mittels Nadeln auf einer Korkplatte, befestigt. Für die Paraffineinbettung wurde ein Darmvollwandstreifen von 5 mm x 25 mm zugeschnitten und, wie in Tabelle 9 dargestellt, aufbereitet. Von den generierten Paraffingewebeblöcken wurden anschließend 6 µm dicke Schnitte erzeugt.

Tabelle 9: Protokoll Paraffineinbettung

Schritt	Substanz	Konzentration	Durchführung	Dauer	Zweck
I	Paraformaldehyd	4% in PBS	Inkubation bei 6°C	über Nacht	Fixierung
II	Leitungswasser		fließend Wässern	2 h	Entfernung von Restbestandteilen
III			Ränder für Einbettung zuschneiden		glatte Schnittkante im Paraffinblock
IV	aufsteigende Ethanolreihe	50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	Einlegen, je x 2	je 30 min	Dehydrierung
Va	Methylbenzozat	100%	Einlegen	über Nacht	Intermedium
Vb	Methylbenzozat	100%	Einlegen, x 2	je 30 min	Intermedium
VI	Paraffin	100%	Wärmeschrank, bei 60°C	über Nacht	Einbettung
VII			Präparat ausrichten, auskühlen lassen		

3.2.1.2. Rattendarm

3.2.1.2.1. Zellkultur enterischer Neurone aus Rattendarm

Zur Kultivierung enterischer Neurone wurden Därme von zwei Tage alten Wistarratten isoliert und in MEM + Antibiotika (Refobacin 40 mg/ml + Metronidazol 500 mg/ml) auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Darm vom Mesenterium befreit und die Tunica muscularis von der Mucosa und Submucosa von distal nach proximal abpräpariert. Eine Genehmigung von der Tierschutzkommission Kiel zur Tötung und Organentnahme lag vor. Zur Isolierung der myenterischen Nervenplexus wurde die Tunica muscularis in 900 µl HBSS (Hanks Balanced Salt Solution +100 µl Collagenase-SL (≥ 1250 collagen digesting units (CDU)/ml) bei 37°C im Brutschrank für 2 h verdaut. Die abgelösten Nervenzellplexus konnten dann mittels einer Pipette eingesammelt und in MEM auf Eis gelagert werden. Die Plexusnetze wurden dann für 5 min bei 184 g zentrifugiert. Daraufhin wurden diese zu Einzelzellen verdaut, indem sie mit 500 µl 0.25% Trypsin-EDTA vermischt und für 1.5 min bei 37°C inkubiert wurden. 5 µl der Zellsuspension wurden mit 5 µl Trypanblau vermengt und für 5 min bei 184 g zentrifugiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in der Neubauer Zählkammer, einem Hämozytometer. Es folgte die Zählung und Addition der Zellen von 16 kleinen Eckquadraten (16 kleine Eckquadrate entsprechen einem Großquadrat). Aus der errechneten Summe wurde der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Zellzahl in der Suspension konnte dann anhand folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \text{MW aus 2 Großquadranten} / (\text{gezählte Fläche} * \text{Kammerhöhe} * \text{Verdünnung})$$

Für die Beschichtung der Deckgläser wurde 100 µl PDL/Deckglas verwendet und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Deckgläschen für 30 min zum Trocknen in den Brutschrank gelegt. Von der Laminin Fertiglösung (1 mg/ml) wurden 5 µg/ml in Medium angesetzt und 2 h im Brutschrank bei 37°C gelagert, mit H₂O_{monodest} dreimal gespült und für 6 h bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurden ungefähr 100.000 Einzelzellen, pro auf ein mit Poly-D-Lysin (PDL) und Laminin beschichtet Deckgläschen ausgesät und in 1 ml definiertem Medium, welches aus Neurobasalmedium + B27 bestand, kultiviert. Die Stimulation zum Wachstum der Zellen erfolgte anhand von Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), wobei Konzentrationen von 0, 2, 10, und 50 ng/ml verwendet wurden. Für die Immunohistochemie betrug die Kultivierungsdauer drei Wochen. Das Nährmedium wurde jeden zweiten Tag erneuert um Stoffwechselabbauprodukte der Zellen zu beseitigen.

3.2.2. Laser Capture-Microdissection (LCM)

3.2.2.1. Prozessierung von humanem Darmwandgewebe für die Laser Capture-Microdissection (LCM)

Für die Prozessierung der mRNA mittels Laser Capture Microdissection (LCM) wurden die aufbereiteten Darmwandvollstreifen möglichst zügig nach der Gewebebegewinnung in eine Cryolösung (Polymer aus Polyvenylalkohol und Polyethylenglykol) eingebettet und bei -80°C aufbewahrt. Die möglichst schnelle Einbettung soll den Abbau der RNA durch RNasen und Proteindegradierung durch unspezifische Proteasen verhindern. Mittels eines Cryostaten (Reichert-JUNG 2800 Frigocut N) wurde das Gewebe zu $16\ \mu\text{m}$ dünnen Schnitten verarbeitet und auf einen mit Polyethylen Naphtalat (PEN) beschichteten Objektträger gelegt. Das PEN dient als stabilisierendes Gerüst. Daraufhin wurden die Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur in einem Umluftschrank (Memmert, Schwabach, D) zum Trocknen gelagert. Anschließend erfolgte eine Schnellfärbung mit Kristall-Violett. Dazu wurden die Schnitte nach dem Trocknen für 2 min in 70% Ethanol gestellt. Darauf folgte die Färbung mit 1% Kristall-Violett Lösung für 30 sek, Restbestände waren nach Ablauf der Zeit abzukippen. Der Färbung folgte ein Eintauchen in 70% und anschließend 100% Ethanol für je 10 sek Die gefärbten Schnitte wurden an der Luft getrocknet.

3.2.2.2. Laser Capture- Microdissection (LCM)

Die LCM-Methode besteht im Wesentlichen aus mikroskopischer Visualisierung der gesuchten Zellpopulation und Transfer von Laserenergie auf ein thermolabiles Polymer mit Entstehung eines Polymer-Zell Verbundes und Zellextraktion. Bei dem LCM-Instrument (Zeiss MicroImaging, Göttingen, D) ist der Laser an ein inverses Mikroskop und einen Computer gekoppelt. Als Auffangvorrichtung wurden mit Öl beschichtete Microfuge Tubes (Adhesive Caps, Zeiss MicroImaging, München, D) verwendet. Anschließend wurde unter dem Mikroskop speziell nach myenterischen Ganglien (zwischen der Ring- und Längsmuskulatur) gesucht. Einmal detektiert, konnte deren Lokalisation anhand des Computers markiert werden. Das durch den Laser herausgeschnittene Gewebe wurde mittels eines gepulsten Laserstrahls in die Auffangkappe des Microfuge Tubes katapultiert. Auf diese Weise wurden pro Probe $2 \times 10^6\ \mu\text{m}^2$ myenterische Ganglien gesammelt und anschließend für mRNA Expressionsstudien verwendet.

3.2.3. RNA-Isolierung

3.2.3.1. RNA-Isolierung aus Ganglien des Plexus myentericus des humanen Kolons

Die Isolierung der RNA aus laser-mikrodissektierten humanen myenterischen Ganglien erfolgte anhand des NucleoSpin® XS-Kits (Macherey-Nagel GmbH & CoKG, Düren, D) nach Angaben des Herstellers. Das Gewebe wurde in 350 µl Lysis-Puffer, der mit 1% Mercaptoethanol komplettiert wurde, homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat fünf Mal durch eine 0,9 mm Kanüle passagiert, um die DNA zu scheren. Danach wurde die Suspension auf eine vom Hersteller mitgelieferten Säule gegeben und abzentrifugiert, sodass das nicht benötigte Zellmaterial entfernt werden konnte. Das Filtrat wurde mit 350 µl 70% Ethanol gemischt und auf eine RNA bindende Säule gegeben, welche anschließend nach dem Waschprotokoll des Herstellers gewaschen wurde. Die RNA wurde mit 15 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Um den Gehalt der RNA zu optimieren, wurde das Eluat ein zweites Mal auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

3.2.3.2. RNA-Isolierung aus humanen Vollwandbiopsien des Kolons

Die Isolierung der RNA aus humanen Vollwandbiopsien des Kolons wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel GmbH & CoKG, Düren, D) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Verfahren gleicht dem in 3.2.3.1. beschriebenen Prozedere. In diesem Falle wurde mittels RNase-freiem Wasser zu einem finalen Volumen von 30 µl eluiert. Daraufhin wurde die RNA Konzentration gemessen, sodass 400 ng RNA aufgereinigt und asserviert werden konnte. Die auf diese Weise gewonnene RNA wurde aufgereinigt und anschließend wurde cDNA hergestellt.

3.2.3.3. RNA-Isolierung aus Resektaten des Dün- und Dickdarms der Ratte

Die Isolierung der RNA aus den Darmresektaten richtete sich nach dem Standard des TRizol® Reagenz Protokolls, die durch den Hersteller mitgeliefert wird. TRizol® ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat und wird verwendet, um Gesamt-RNA von Zellen oder Gewebe zu isolieren. In dieser Arbeit wurde TRizol® anhand eines Standardprotokolls des Herstellers verwendet, um die Gesamt-RNA aus dem Dün- und Dickdarm verschieden alter Ratten (P 0 = Tag der Geburt, P 3 = Postnataltag 3, P 6 = Postnataltag 6, P 21 = Postnataltag 21, adult) isolieren zu können. Das Gewebe wurde in 1 ml TRizol® homogenisiert, eingefroren und anschließend aufgetaut verarbeitet.

3.2.4. mRNA-Expressionsstudien

3.2.4.1. Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription (RT) dient der Umschreibung von messenger RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA), um eine *in vitro* Vervielfältigung der DNA mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zu ermöglichen. Die Transkription erfolgt mittels reverser Transkriptase. Reverse Transkriptasen sind Enzyme, die die Umschreibung von RNA zu cDNA katalysieren. Dazu wird zunächst ein einzelner RNA-DNA-Hybridstrang durch eine RNA abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) synthetisiert. Durch den RNase-H Anteil des Proteins wird die RNA abgebaut und mittels einer DNA abhängigen DNA-Polymerase der DNA Einzelstrang zu einem Doppelstrang komplettiert. Als Startermolekül wird ein random-Hexamer-Primer (6bp DNA Fragmente mit zufälliger Basenpaarung) eingesetzt. Diese Nukleotidsequenzen werden vorab bestimmt und synthetisch hergestellt. Für die erste Verknüpfung benötigen DNA-Polymerasen eine Hydroxygruppe als Startpunkt. Primer stellen mit ihrem 3'-OH-Ende eine passende Hydroxyfunktion. Als Produkt der RT erhält man eine relativ stabile cDNA, die bei -20°C gelagert wird.

Tabelle 10: Arbeitsprotokoll für den DNase Verdau und die cDNA Synthese mittels reverser Transkription

Substanz	Menge [µl]	Durchführung	Dauer	Zweck
RNA in H ₂ O	12	Inkubation	bei 15 min	Verhinderung der Amplifizierung genomischer DNA
DNase Puffer	1,5	Raumtemperatur		
DNase	1,5			
EDTA [20mM]	1,5			Verhindert Degradierung von Nukleinsäuren
		Thermocycler	10 min, 70°C	Denaturierung der Sekundärstruktur u. Inaktivierung der DNase

5x RT - Puffer (one 6
step reaction)

DTT [0,1mM]	3			Supprimierung der RNase - Aktivität
dNTP's [19mM]	1,5			Kettenverlängerung
N6 Primer (250ng/μl)	1,5			Primer
	30 total	Thermocycler	10 min, 25°C	Primer Annealing
			50 min, 42°C	Kettenverlängerung Transkription
			15 min, 70°C	Denaturierung der RNA/cDNA - Hybride

3.2.4.2. Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan Sonde

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ermöglicht die Amplifikation und den simultanen (relativen) quantitativen Nachweis des entsprechenden Genabschnittes. Dieses auf dem TaqMan™ Assay (Lee et al., 1993) beruhende Verfahren basiert auf dem ursprünglichen 5' Nuklease Assay (Holland, 1991), bei dem eine spezielle, aus einem Oligonukleotid bestehende, fluorogene Sonde verwendet wird. Dessen 5'-Ende ist mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszin-Derivat) markiert. Das 3'-Ende ist mit einem Quencher-Farbstoff versehen und mit einem Phosphatrest blockiert. Wird die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch die unmittelbare Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) supprimiert.

Während der PCR hybridisieren Sonde und Primer zunächst an der Matrize. In der Elongationsphase trifft die thermostabile Taq-Polymerase auf diese und beginnt selbige zu verdrängen. Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird aktiviert und es kommt zur Hydrolyse der hybridisierten Sonden. Dies führt zur Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher und somit auch der FET. Nicht hybridisierte Sonden werden hingegen nicht hydrolysiert. Abhängig von der Menge des PCR Produktes steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR Zyklus an, da die Fluoreszenzintensität in Korrelation zur

hydrolysierten Sonde steht und die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter aufgehoben wird, womit der Quencher das Signal nicht mehr unterdrücken kann und damit die Fluoreszenzintensität als Maß für den Gehalt der Primerprodukte dient. Das dabei gebildete Signal folgt einer stringenten Sequenzspezifität, da nicht vollständig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden.

Für die quantitativen mRNA-Expressionsstudien wurden die Proben-Tubes der 96 Well Platte, wie in Tabelle 11 dargestellt, komplettiert und mit einer selbstklebenden Abdeckfolie (AMPLIseal) verschlossen. Die Real-time PCR fand im Thermocycler ABI PRISM Sequence Detection System statt. Das verwendete Protokoll beinhaltet folgende Schritte, wobei Schritte 2-4 40 mal wiederholt wurden:

1. 2 min Denaturierung der cDNA und Aktivierung der Polymerase bei 95°C
2. 15 sek Denaturierung der cDNA
3. 60 sek Annealing der Primer an die cDNA
4. Elongation der Polymerase bei 60°C

Durch die mehrfache Wiederholung dieses Zyklus erfolgte eine exponentielle Vermehrung der Sequenzen. Zur Detektion der PCR-Amplifikate wurde eine Hydrolyse-Sonde (TaqMan-Sonde) eingesetzt, die aus einem doppelt fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid bestand. Das 5' Ende der Sonde trägt den Reporter (Reporter: 6FAM (6-[Carboxy-Fluoreszein])). An dem 3' Ende befindet sich der Quencher (Quencher: TAMRA (Tetramethylrhodamin)). Die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus durch das ABI PRISM Sequence Detection System gemessen.

Das qPCR Verfahren diente der Ermittlung der mRNA Expression von Reelin, seinen Rezeptoren VLDLR und Lrp8 und deren intrazellulärem Adapterprotein Dab1 (siehe 1.2.3) in diversen Schichten des humanen Kolons (Ganzwandschicht, Tunica muscularis, Mucosa, n = 8-9 pro experimentelle Gruppe für Reelin, VLDLR und Lrp8, n = 2-5 für Dab1 pro experimentelle Gruppe). Auch bei der Ontogenese studie am Dick- und Dünndarm der Ratte kam dieses Verfahren zum Einsatz, wobei die Därme von Ratten verschiedener Altersstadien (P 0 = Geburt, P 3 = dritter Lebenstag, P 6 = sechster Lebenstag, P 21 = einundzwanzigster Lebenstag, n = 7-12, pro experimentelle Gruppe) verwendet wurden. Die relative mRNA Expression von Reelin, seinen Rezeptoren und Dab1 wurde in den verschiedenen Altersstadien und Darmabschnitten ermittelt und graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden mikrodissizierte myenterische Ganglien auf ihre relative mRNA Expression bezüglich Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 untersucht (n = 7-11 pro experimentelle Gruppe).

Tabelle 11: Arbeitsprotokoll der qPCR

Substanz	Menge [μ l]	Durchführung	Dauer	Zweck
cDNA	2			Template
qPCR MasterMix Plus (2x)	10			Enthält Taq-Polymerase, Nukleotide, Puffer u. Ionen
Primer sense [100nM]	0.18			Markiert 5'-Ende der Zielsequenz
Primer antisense [100nM]	0.18			Markiert 3'-Ende der Zielsequenz
Sonde [10nM]	0.448			Detektion
RNase-freies H ₂ O	7.19			
	20 total	ABI PRISM Sequence Detection System	140 min	qPCR

Tabelle 12: Verwendete Primersequenzen in der qPCR

Primer	Orientierung	Sequenz	Sequenz
		human	Ratte
HPRT	sense	5'-tgaacgtcttgctcgagatgtg-3'	5'-cgccagcttctcctcaga-3'
	antisense	5'-ccagcaggtcagcaaagaattt-3'	5'-ggtcataacctgggtcatcact-3'
	Sonde	5'-tgggaggccatcacattgtagcc-3'	5'-tttcccgcgagccgaccgg-3'
Reelin	sense	5'-tccagtgtcttcggatttg-3'	5'-acgggcaactggcttttctt-3'
	antisense	5'-ttggtgtgggcaggtgact-3'	5'-ttgagctggcttctctcatttc-3'

	Sonde	5'-ttatgtgcagtggtgtagcctctc-3'	5'-agcaacggtcaagcacagctgcca-3'
VLDLR	sense	5'-gctgggtatgacgatgat-3'	5'-attgatagacgtccactggtgaca-3'
	antisense	5'-ttcgctggctggacacttg-3'	5'-gcaactggaatccagccagta-3'
	Sonde	5'-agtgtggccgtcagccagtcatac-3'	5'-tccaatggcctaataatggaattaccct-3'
Lrp8	sense	5'-gccaaggattgcaaaaagga-3'	5'-tggtgcagaccggcaaac-3'
	antisense	5'-tcgctgtggtctaagcagtcac-3'	5'-gcttgagtcacccagtatac-3'
	Sonde	5'-atcccctctgtgtggagatgcga-3'	5'-cagcaacatcgagtggcccaacgg-3'
Dab1	sense	5'-cgtcccaggcacgagtga-3'	5'-ggtacaaagccaagctgattgg-3'
	antisense	5'-gctgggcatctgaaatc-3'	5'-gccagcaacaacaccctga-3'
	Sonde	5'-cacagaccgacaagcccaggcagaa-3'	5'-atcgatgaactgtccgagctcg-3'

3.2.5. Immunohistochemische Verfahren

3.2.5.1. Prinzip der Immunohistochemie

Diese Methode, die auf hochspezifischen Antigen-Antikörperreaktionen basiert, dient dem Nachweis von speziellen, vorher durch die Wahl des Primärantikörpers bestimmten, Proteinen, die vornehmlich in bestimmten Zelltypen oder Gewebekompartimenten vorkommen. Der Nachweis beruht auf einer Bindung zwischen Antikörper (AK) und Epitopen des Antigens (AG). Der unkonjugierte Primärantikörper bindet spezifisch an Epitope des Antigens und sollte sich möglichst durch hohe Spezifität und Affinität auszeichnen. Der konjugierte Sekundärantikörper (der sekundäre Antikörper kann hierfür mit verschiedenen Substanzen, wie z.B. kleinen Molekülen, Enzymen oder Fluoreszenzfarbstoffen, gekoppelt sein) bindet an das Fc-Fragment (Fragment crystallizable) des Primärantikörpers. Durch chromogene Substratlösungen oder Enzymumsetzung können diese dann sichtbar gemacht und das gesuchte Antigen detektiert werden. Da jedes Antigen mehrere Epitope aufweist und somit mehrere Antikörper Bindungsstellen hat, können schon geringe Mengen an Antigenen so verstärkt dargestellt werden.

3.2.5.2. Prinzip der Dual-Label-Fluoreszenz-Immunohistochemie

Diese Methode gleicht im Wesentlichen dem Prinzip der konventionellen Immunohistochemie (3.2.5.1). Jedoch wird bei der Dual-Label-Fluoreszenz-Immunohistochemie der Antigen-Antikörperkomplex durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper detektiert und zwei primär Antikörper verwendet, welche durch Licht einer charakteristischen Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200) sichtbar gemacht werden können.

3.6.3. Entparaffinierung und Supprimierung der endogenen Peroxidase

Die Anhaftung der Schnitte auf dem Objektträger wurde durch Beschichtung mit Histobond®, eine silianisierte Oberfläche, gewährleistet. Vor der Hitzebehandlung wurden die Schnitte zunächst mittels Einlegen in eine Xylolreihe (3 x für jeweils 10 min) und nachfolgender absteigender Alkoholreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 90%, 1 x 80%, 1 x 70%, 1 x 50%, jeweils 3 min pro Stufe) entparaffiniert, gefolgt von einer dreimaligen Spülung mit destilliertem Wasser. Um eine unerwünschte, unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, musste die im Zellmaterial enthaltene endogene Peroxidase unterdrückt werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte für 10 min in eine frisch angesetzte 3%ige Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Lösung gelegt. Das Prinzip der endogenen Peroxidasehemmung beruht auf einer reversiblen kompetitiven Hemmung der endogenen Peroxidasen der Zellen durch den Überschuss an H_2O_2 , wodurch die Oxidation und damit die Umsetzung von hinzugefügtem Chromogen in einen Farbstoff supprimiert wird. So wird der Farbstoff spezifisch von der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase umgesetzt. Auf diesen Schritt folgte wiederum die dreimalige Spülung mit destilliertem Wasser.

3.2.5.3. Hitzevorbehandlung zur Antigendemaskierung mittels Wasserbad oder Mikrowelle

Die Verwendung von formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten ist eine sehr gute Methode, um die Morphologie der Schnitte zu erhalten. Jedoch kann die FFPE bei formalin-sensitiven Epitopen (Antigenbindungsstellen) von Gewebeproteinen zur Konformationsänderung dieser führen und damit einen Verlust der Immunreaktivität bewirken (Boenisch, 2011). Zur Wiederherstellung der verloren gegangenen Immunreaktivität wurden die verwendeten FFPE Gewebeschnitte mit Hitze in wässriger Lösung (Mikrowelle 2 x 5 min, in Zitronenpuffer und Wasserbad 95°C, in Zitronenpuffer für 45 min) ausgesetzt.

3.2.5.4. Detektion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Hämalaun Kernfärbung

Die Avidin-Biotin-Komplex Methode (ABC-Methode) nutzt die starke Affinität von Avidin für Biotin zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundärantikörper, wobei das Biotin kovalent an den AK gebunden ist. Die ABC-Methode zeigt eine hohe Sensitivität. Das aus Hühnereiweiß gewonnene Glykoprotein Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Nach der Inkubation mit einem Avidin-Enzym-Konjugat bindet Avidin an Biotin. Als Enzym innerhalb des Avidin-Biotin-Komplexes diente die Meerrettichperoxidase, die als Oxidoreduktase das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in einen braunen Farbstoff überführt. Durch diese Braunfärbung ließ sich der Antikörper-Antigenkomplex indirekt lokalisieren.

Um die DAB Lösung anzusetzen, wurde 1 ml Puffer mit einem Tropfen Chromogen (DAB) vermischt und die Schnitte wurden 5 min mit dieser Lösung inkubiert. Zur Kernfärbung wurden direkt aus der letzten Waschung (siehe Tabelle 14) heraus die Schnitte für 30 sek in eine vorher filtrierte und nicht verdünnte Hämalaun-Fertiglösung nach Mayer (Roth, Karlsruhe, D) gegeben und anschließend dreimal mit zweifach destilliertem Wasser (H_2O_{bidest}) gespült. Die Bindung des Farbstoffes erfolgt im stark sauren Milieu. Um die blaue Färbung zu erhalten, wird ein pH-Wert > 3 eingestellt (durch intensives Spülen mit Leitungswasser für 10 min (Bläuen)). Anschließend erfolgte wiederum eine dreimalige Spülung mit H_2O_{bidest} und Eindeckung mit Isomount (Labonord, Templemars, Frankreich). Zur Herstellung der DAB-Färbungen wurden die humanen Paraffinschnitte gemäß dem Protokoll aus Tabelle 14 behandelt und anschließend lichtmikroskopisch begutachtet (Nikon 6000, Tokyo, Japan). Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 13 aufgeführt. Tabelle 14 zeigt die Arbeitsschritte der Immunohistochemie.

Tabelle 13: Verwendete Antikörper in der Immunohistochemie

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung
primär		
Anti-Reelin monoklonal	Mouse	1:200
sekundär		
Alpha E 0433 monoklonal	goat, anti-mouse, biotyniliert	1:400
für Zellkultur:		
Alpha E 0433 monoklonal	goat, anti-mouse, biotyniliert	1:1000

Tabelle 14: Arbeitsprotokoll der Immunohistochemie nach ABC-Methode und mit DAB als Chromogen an paraffineingebetteten Schnitten des humanen Kolons

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
I	Xylol	>99,9%	3 x 10 min	Deparaffinierung
II	absteigende Ethanolreihe	2 x 100%, 2x 96%, 90%, 80%, 70%, 50%	je 3 min	Dehydrierung
III	H ₂ O seradest		3 x je 5 min	Spülen
IV	H ₂ O ₂	3%	10 min	Supprimierung der endogenen Peroxidase
V	H ₂ O seradest		3 x je 5 min	Spülen
Vla	Citrat-Puffer	pH 6,1	2 x 5 min in der Mikrowelle	Permeabilisierung, AG Demaskierung

VIb			30 min bei RT	Abkühlung
VII	H ₂ O bidest		3 x je 5 min	Spülen
VIII	TBS		3 x je 5 min	Spülen
IX	Anti-Reelin (mouse)	1:200	über Nacht	Primärantikörper
X	TBS		3 x je 5 min	Spülen
XI	Goat, anti- mouse, biotyni- liert	1:400	45 min	Sekundärantikörper
XII	TBS		3 x je 5 min	Spülen
XIII	ABC-Elite Kit		45 min	Avidin-Biotin- Peroxidase Kom- plex
XIV	TBS		3 x je 5 min	Spülen
XV	Liquid DAB+		5 min	Chromogen, Vi- sualisierung des AG-AK Komple- xes
XVI	H ₂ O seradest		3 x je 5 min 3 x je 5 min	Spülen Spülen
XVII	aufsteigende Ethanolreihe	50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	je 3 min	Dehydrierung
XVIII	Isomount			Fixierung

3.2.5.5. Immunohistochemie mit DAB als Chromogen an kultivierten enterischen Nervenzellen

Die Deckgläser wurden am Vortag der Aussaat mit Polylysin/Laminin (PDL) beschichtet. Diese Beschichtung fördert die Anhaftung, Differenzierung und Adhäsion der kultivierten enterischen Nervenzellen. In den Kulturschalen erfolgte die Fixierung der enterischen Zellen mittels 4% Paraformaldehyd-Lösung für 30 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit TBS gespült und dann für 10 min in 99,9%, 4°C kaltem Methanol permeabilisiert. Daraufhin folgte eine erneute dreimalige Spülung mit TBS. Für die weitere Aufbereitung, wie in Tabelle 15 aufgeführt, wurden die Deckgläser aus den Kulturschalen entfernt. Anschließend wurden die Zellkulturen lichtmikroskopisch begutachtet (Nikon 6000 Tokyo, Japan).

Tabelle 15: Arbeitsprotokoll der Immunohistochemie nach der ABC-Methode und mit DAB als Chromogen an kultivierten enterischen Nervenzellen

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
I	normal goat serum	Se- 1:10	30 min	Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung
II	anti Reelin (mouse)	1:200	1 h	Primärantikörper zur Bildung eines AG-AK Komplexes
III	TBS		3x je 5 min	Spülen
IV	goat, anti-mouse, biotinyliert	1:1000	30 min	Sekundärantikörper zur Bindung an Primärantikörper
V	TBS		3x je 5 min	Spülen
VI	ABC-Elite Kit		30 min	Avidin-Biotin Peroxidase Komplex
VII	TBS		3x je 5 min	Spülen
VIII	Liquid DAB+		5 min	Chromogen zur Visualisierung des AG-AK Komplexes
IX	H ₂ O Seradest		3x je 5 min	Spülen
X	Aquatex			Eindeckung

3.2.5.6. Dual-Label-Fluoreszenz-Immunohistochemie für humanes Gewebe

Es wurden pro Versuchsreihe jeweils zwei Primärantikörper verwendet. Die Sekundärantikörper wurden in einer standardisierten Verdünnung aufgetragen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper und die darauf folgenden Schritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Da die Fluorophore Alexa Fluor 488 (grün) und Alexa Fluor 546 (rot) unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen, kann die Kolokalisation zweier unterschiedlicher Proteine in einem einzigen Schnitt erfolgen. Die Kernfärbung erfolgte anhand des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI), welcher an DNA bindet und sich unter dem Fluoreszenzmikroskop als blaue Fluoreszenzabsonderung der Kerne darstellt. Nach fotografischer Abbildung der jeweiligen Fluoreszenz wurden diese mittels des Ko-Lokalisationstools (AxioVision, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, D) softwaregesteuert übereinander gelegt (merge). Eine etwaige Kolokalisation stellte sich in Häufigkeit und Intensität durch eine gelbe Färbung dar.

3.2.5.7. Dual-Label-Fluoreszenz-Immunohistochemie zur Detektion von Reelin und PGP 9.5

Diese Versuchsreihe beinhaltete als Primärantikörper den monoklonalen Antikörper mouse-anti-Reelin in Kombination mit dem polyklonalen Antikörper rabbit-anti- PGP 9.5 (Pan-neuronaler Marker), welcher zur Visualisierung neuronaler Somata und Fortsätze verwendet wurde. Als Sekundärantikörper diente gegen Reelin Alexa Fluor 488 (grün) und gegen PGP 9.5 Alexa Fluor 546 (rot).

3.2.5.8. Dual-Label-Fluoreszenz-Immunohistochemie zur Detektion von Reelin und Synaptophysin

Eine weitere Versuchsreihe bestand aus dem monoklonalen Antikörper mouse-anti- Reelin in Kombination mit dem polyklonalen Antikörper rabbit-anti-Synaptophysin, welcher gegen den Vesikelmarker Synaptophysin gerichtet ist, als Primärantikörper. Als Sekundärantikörper diente gegen Reelin Alexa Fluor 488 (grün), gegen Synaptophysin kam Alexa Fluor 546 (rot) zur Verwendung. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnung sind in Tabelle 16 aufgelistet. Zur Herstellung der Fluoreszenz-Immunohistochemie wurden die humanen Paraffinschnitte gemäß dem Protokoll aus Tabelle 17 aufbereitet.

Tabelle 16: Verwendete Antikörper in der Dual-Label Fluoreszenz-Immunohistochemie

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung
primär		
Anti-PG P9.5 polyklonal	goat, anti-rabbit	1:2000
Anti-Reelin monoklonal	goat, anti-mouse	1:200
Anti-Synaptophysin polyklonal	goat, anti-rabbit	1:200
sekundär		
Alexa Fluor 488	goat, anti-mouse	1:250
Alexa Fluor 546	goat, anti-rabbit	1:250

Tabelle 17: Arbeitsprotokoll der Dual-Label Fluoreszenz-Immunohistochemie an paraffineingebetteten Schnitten des humanen Kolons

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
I	Xylol	>99,9%	3 x 10 min	Deparaffinierung
II	absteigende Ethanolreihe	100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%	je 3 min	Dehydrierung
III	H ₂ O seradest		3 x je 5 min	Spülen
IV	Citrat-Puffer	pH 6,1	2 x 5 min in der Mikrowelle	Permeabilisierung, AG Demaskierung
V	H ₂ O seradest		3 x je 5 min	Spülen
VI	TBS		3 x je 5 min	Spülen
VII	Anti-Reelin (mouse)	142 1:100	über Nacht	Primärantikörper zur AG-Bindung

	Anti-PGP 9.5 (rabbit) 1:2000		
	oder Anti- 1:200		
	Synaptophysin (rabbit)		
VIII	TBS	3 x je 5 min	Spülen
IX	Alexa Fluor 488 (goat- 1:250 anti-mouse)	30 min	Fluoreszenzmarkier- te Sekundär-AK zur Kopplung an Primär- AK
	Alexa Fluor 546 (goat- anti-rabbit)		
X	TBS	3 x je 5 min	Spülen
XI	DAPI	30 min	Kernfärbung
XII	TBS	3 x je 5 min	Spülen
XIII	H ₂ Omonodest	3 x je 5 min	Spülen

3.2.6. Statistische Verfahren

Zur Auswertung der RT-qPCR wurde die jeweilige mRNA Expression die Expression des house-keeping Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) normalisiert. Hierfür errechnete man ΔCt (Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) -Werte mit Hilfe folgender Formel: $\Delta Ct = 2^{-(Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ HPRT})}$. Der errechnete Wert stellt die relative mRNA Expression dar. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen One-Way-Anova-Test mit nachfolgender Newman-Keuls Post-hoc-Analyse. Die ermittelten Werte wurden graphisch mittels GraphPadPrism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, U.S.A) Software, + / - SEM, als relative mRNA Expression dargestellt. Die p-Werte in der Ontogenesestudie wurden wie folgt dargestellt: * = $p < 0,05$ gegen P 0 (gelten als statistisch signifikant).

4. Ergebnisse

4.1. mRNA Expressionsstudien an humanem Gewebe

Zur Untersuchung von Reelin und dessen Rezeptoren VLDLR und Lrp8, sowie dem intrazellulären Adapterprotein Dab1 im humanen Kolon, wurde zunächst die mRNA Expression der einzelnen Komponenten in Ganzwandresektaten, sowie in der isolierten Tunica muscularis und Mucosa und in myenterischen Ganglien bestimmt.

4.1.1. mRNA Expression des Reelin-Systems im humanen Kolon

Die mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 ließ sich sowohl in den Ganzwandresektaten als auch in der Mucosa und Tunica muscularis nachweisen (Abb. 5, A-D). Die relative mRNA Expression von Reelin war in der Ganzwandschicht und in der Tunica muscularis etwa gleich stark, während in der Mucosa niedrigere Werte zu beobachten waren (Abb. 5 A). Für VLDLR zeigte sich bezüglich der Genexpression ein ähnliches Muster. In der Ganzwandschicht und in der Tunica muscularis ließen sich vergleichbar hohe Werte der mRNA Expression beobachten, wogegen VLDLR in der Mucosa niedriger exprimiert wurde. Der Rezeptor Lrp8 wies in den Ganzwandresektaten, Mucosa und Tunica muscularis vergleichbare mRNA Spiegel auf (Abb. 5 C). Das Expressionsmuster von Dab1 zeigte ähnlich hohe Werte in der Mucosa und Tunica muscularis, während eine niedrigere Expression in der Ganzwandschicht zu beobachten war (Abb. 5 D). Bemerkenswert für das gesamte Reelin-System ist die ausgeprägte mRNA Expression in der Tunica muscularis, d.h. dem Kompartiment der Darmwand, welches die motilitätsvermittelnden Zellpopulationen umfasst.

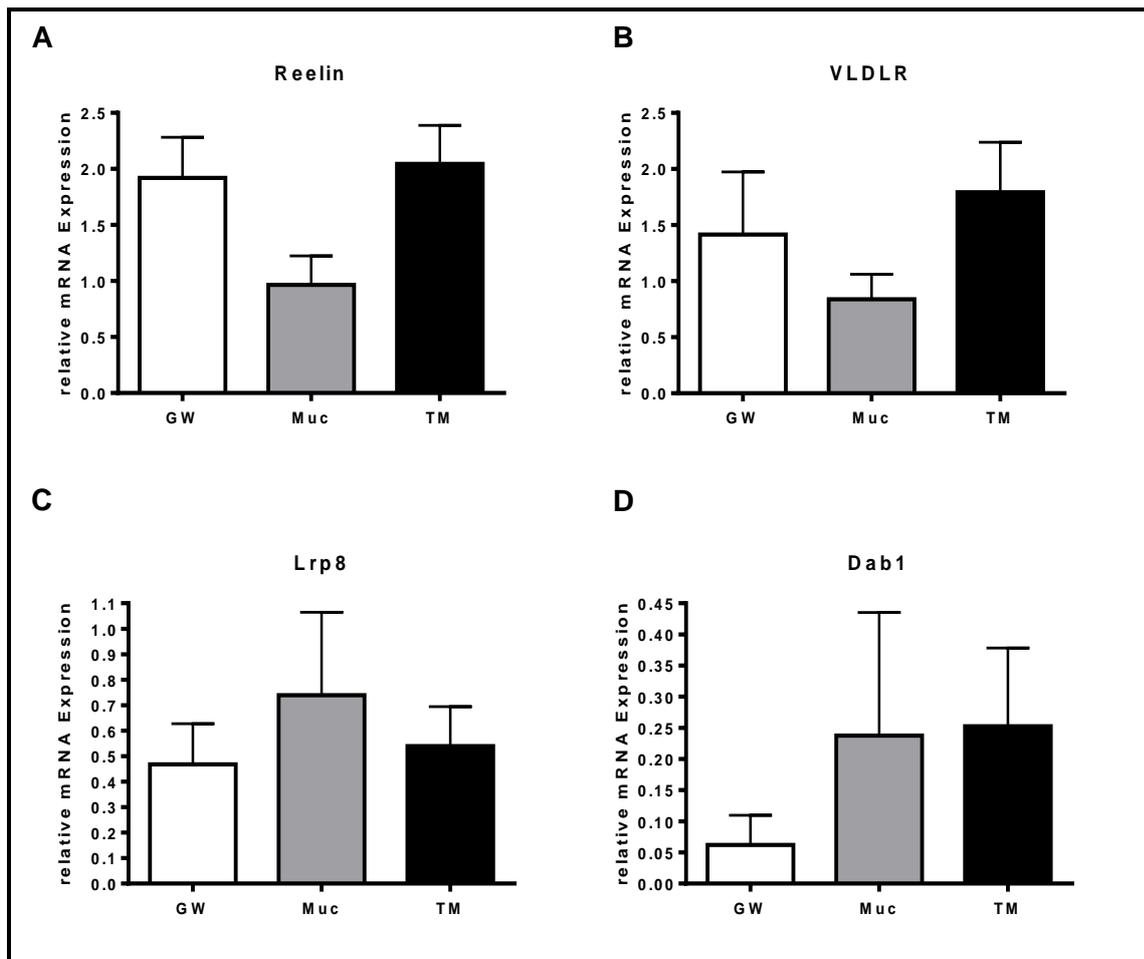


Abbildung 5: mRNA Expression des Reelin-Systems in Ganzwandresektaten und intestinalen Gewebeschichten des humanen Kolons. mRNA Expression von Reelin (A), VLDLR (B), Lrp8 (C) und Dab1 (D) konnte sowohl in Ganzwandresektaten (GW) als auch in separierten Schichten, d.h. in der Mucosa (Muc) und Tunica muscularis (TM) detektiert werden. Die mRNA Expression wurde mittels qPCR bestimmt und auf die Expression des House-keeping Gens HPRT normalisiert. Reelin: n = 9, VLDLR und Lrp8: GW n = 8, Muc und TM n = 9, Dab1: GW n = 2, Muc n = 5, TM n = 4, pro experimentelle Gruppe. Fehlerbalken entspricht den statistischen Fehlern des Mittelwertes (+ / - SEM).

4.1.2. Genexpression des Reelin-Systems in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons

In, mittels Laser-capture Microdissection gewonnenen, isolierten myenterischen Ganglien (Plexus myentericus) des humanen Kolons, konnte die Genexpression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 nachgewiesen werden (Abb.6). Die Expressionsmuster von Reelin und seinen Rezeptoren VLDLR und Lrp8 zeigten annähernd gleich hohe Werte. In Relation zu oben genannten Expressionsmustern zeigten sich für Dab1 geringere Werte (Abb.6).

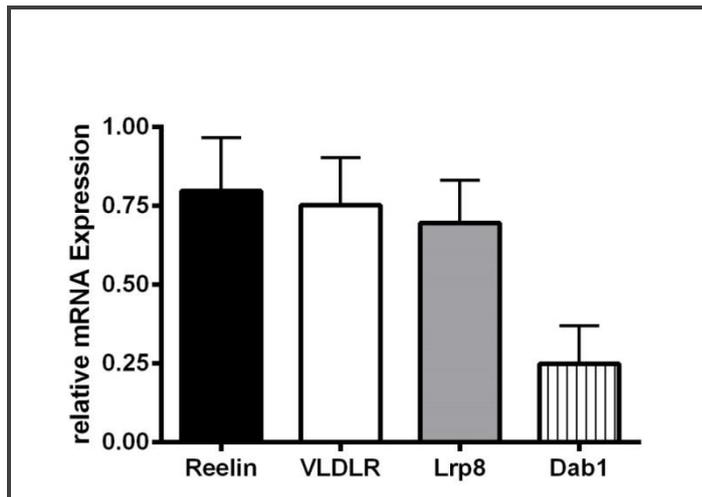


Abbildung 6: mRNA Expression des Reelin-Systems in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons. Die mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 konnte in Laser-mikrodissezierten, isolierten Ganglien des humanen Kolons detektiert werden. Die mRNA Spiegel der Zielgene wurden auf die Genexpression des House-keeping Gens HPRT normalisiert, Reelin: n = 11, VLDLR: n = 11, Lrp8: n = 10, Dab1: n = 7. Fehlerbalken entspricht den statistischen Fehlern des Mittelwertes (+ / - SEM).

4.2. Lokalisation von Reelin im humanen Kolon

Nachdem die mRNA Expression von Reelin, seinen Rezeptoren und Dab1 mittels RT-qPCR bestimmt wurde, erfolgte die Lokalisation von Reelin im humanen Kolon durch immunohistochemische Nachweisverfahren an Paraffinschnitten. Die Detektion erfolgte durch die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex-Methode). Als Enzym innerhalb des Avidin-Biotin-Komplexes diente die Meerrettichperoxidase, die als Oxidoreduktase das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in einen braunen Farbstoff überführt. Zur besseren Unterscheidung der verschiedenen Darmwandschichten wurde eine Hämalan Kernfärbung nach Meyer (siehe Kap. 3.2.5.1.) durchgeführt.

4.2.1. Immunohistochemie für Reelin an humanem Kolon mittels Detektion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Hämalan Kernfärbung

Reelin ließ sich in allen Bestandteilen des enterischen Nervensystems im humanen Kolon nachweisen. In den Übersichtsaufnahmen zeigte sich eine deutliche Reelin-Immunreaktivität im Plexus myentericus (Abb. 7 A) und Plexus submucosus (Abb. 7 C). In der Detailansicht des Plexus myentericus (Abb. 7 B) und des Plexus submucosus (Abb. 7 D) konnten Aussparungen der Nuklei, eine homogene somatische Färbung und granuläre Anreicherungen im

restlichen Neuropil beobachtet werden. Auch im Bereich der Nervenfasern in der Ringmuskulatur (Abb. 7 E) und in Nervenfasern in der Längsmuskulatur (Abb. 7 F) ließen sich braune granuläre Anreicherungen detektieren, die sich deutlich von den Muskelfasern abhoben.

4.2.2. Dual-Label-Immunohistochemie

Zum Nachweis der neuronalen Lokalisation von Reelin wurde eine Ko-Lokalisationsstudie für Reelin (grün) mit dem pan-neuronen Marker PGP 9.5 (rot), welcher zur Visualisierung neuronaler Somata und Fortsätze verwendet wird, durchgeführt. Für eine weitere Ko-Lokalisationsfärbung wurde der synaptische Vesikelmarker Synaptophysin (rot) verwendet. Zur Darstellung der Kerne wurde mit DAPI (blau) inkubiert. Die anschließende Überlagerung (merge) der einzelnen Fluoreszenz-Bilder zeigte die Ko-Lokalisation der immunreaktiven Signale an.

4.2.2.1. Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin und PGP 9.5 im humanen Kolon

Im myenterischen Plexus zeigte sich eine Immunreaktivität für Reelin (grün). Es zeigten sich Aussparungen der Nuclei und granuläre Anreicherungen im Soma der Neurone und im Neuropil des Plexus myentericus (Abb. 8 A). Es konnte eine deutliche Akkumulation von PGP 9.5 (rot) im Bereich der Perikarya (8 B), aber auch Immunreaktivität im Bereich des Neuropils festgestellt werden. Die Ko-Lokalisation von Reelin und PGP 9.5 (gelb) im Bereich der Perikarya, wobei in den Zellkernen keine überlagernden Signale zu detektieren waren, ist in Abbildung 8 D dargestellt.

Im Plexus submucosus war eine Immunreaktivität für Reelin (grün) mit Aussparungen der Nuclei und granulärem Färbemuster im Neuropil (Abb. 9 A) zu detektieren. Die PGP 9.5 Lokalisation (rot), durch die Immunfluoreszenz im Bereich der neuronalen Somata des Plexus submucosus, ist in Abbildung 9 B dargestellt. Auch dort waren deutliche granuläre Anreicherungen detektierbar. Abbildung 9 D zeigt die Ko-Lokalisation von Reelin und PGP 9.5 im Plexus submucosus. Im Bereich der neuronalen Somata und vereinzelt granulär im Neuropil zeigte sich eine simultane Lokalisation von Reelin und PGP 9.5 (gelb).

In den Nervenfasern der Ringmuskulatur fielen prägnante granuläre Anreicherungen von Reelin auf (Abb. 10 A, grün dargestellt). Auch bei der Immunreaktivität für PGP 9.5 (Abb. 10 B, rot dargestellt) zeigten sich deutlich granuläre Färbemuster in den Nervenfasern. Zusätzlich konnte eine prägnante granuläre Ko-Lokalisation von Reelin und PGP 9.5 im Bereich der Nervenfasern des enterischen Nervensystems (gelb) ermittelt werden (Abb. 10 D).

4.2.3. Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin und Synaptophysin im humanen Kolon

Reelin und der Vesikelmarker Synaptophysin wurden in Paraffinschnitten des humanen Kolons mittels Dual-Label-Immunohistochemie detektiert (Abb. 11 A -D). Es zeigten sich Anreicherungen in den Perikarya und granuläre Färbemuster im Neuropil. In Abbildung 11 A sieht man die Immunreaktivität für Reelin (grün). Es zeigten sich granuläre Anreicherungen (siehe Pfeil), aber auch Aussparungen der Zellkerne. Synaptophysin konnte in neuronalen Somata, insbesondere in Form von granulären Akkumulationen (Abb. 11 B), detektiert werden. Es konnte eine partielle Ko-Lokalisation (gelb) von Reelin und Synaptophysin in Neuronen und deren Fortsätzen (11 D) und partielle Überlagerungen granulärer Art detektiert werden.

Im Plexus submucosus zeigten sich für Reelin (Abb. 12 A) deutliche granuläre Anreicherungen um die Zellkerne herum. Die Zellkerne zeigten Aussparungen. Auch für Synaptophysin (Abb. 12 B) ließen sich granuläre Anreicherungen zirkulär der neuronalen Somata mit Aussparungen der Nuclei beobachten. Im Bereich der Perikarya konnten, wie in Abbildung 12 D dargestellt, granuläre Überlagerungen (gelb) detektiert werden. Auch hier wurde wiederum die nucleäre Aussparung sichtbar.

In den Nervenfasern, die sich durch die Ringmuskulatur ziehen, ließen sich deutliche granuläre Färbemuster von Reelin (Abb. 13 A, grün dargestellt) und Synaptophysin (Abb. 13 B, rot dargestellt) ermitteln. Die Immunreaktivität zog sich entlang der gesamten Faser. In Abbildung 13 D zeigte sich prägnant die Ko-Lokalisation (gelb) von Reelin und Synaptophysin entlang der gesamten Länge der Nervenfasern. Auch die Überlagerungen wiesen granulären Charakter auf.

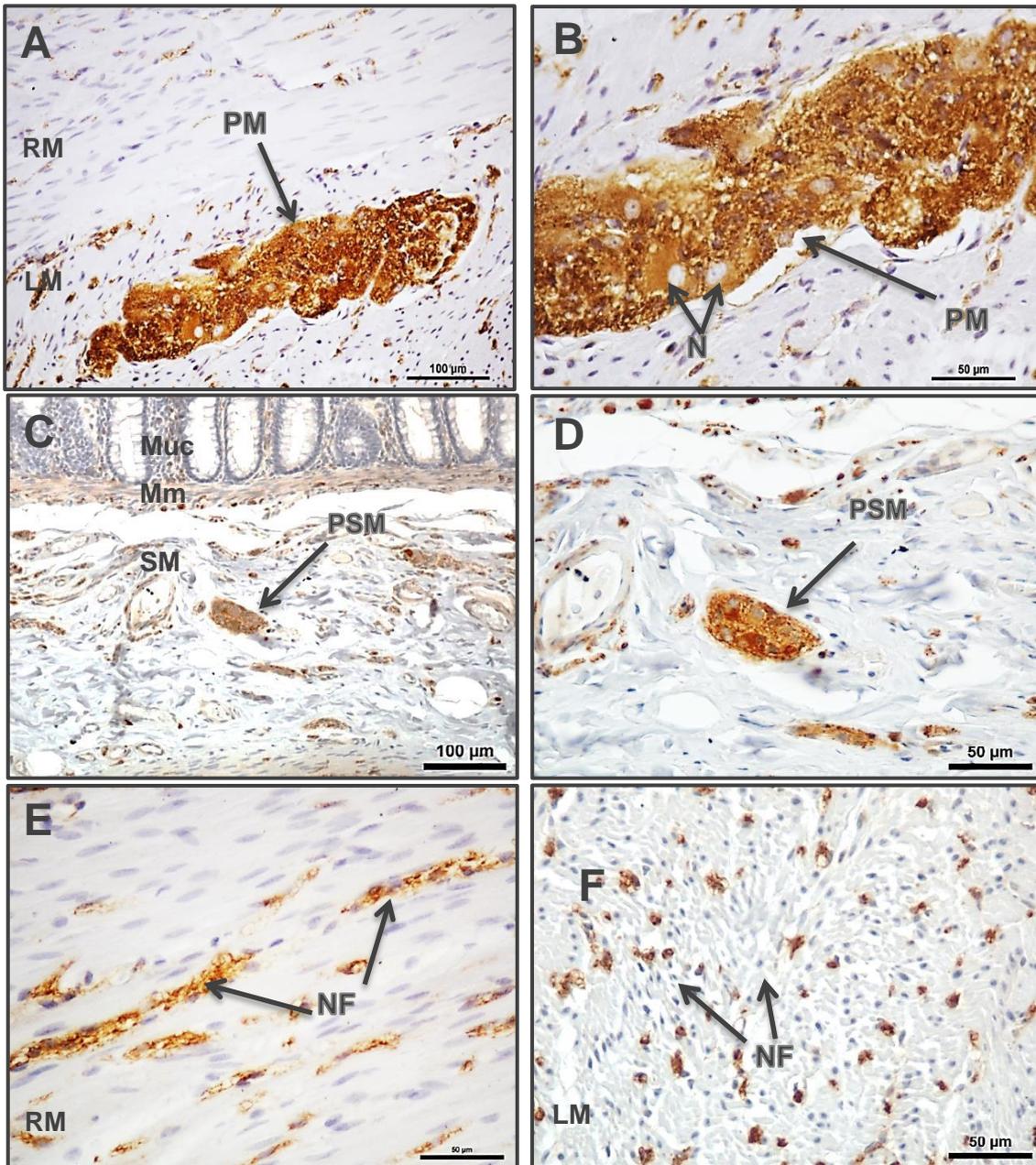


Abbildung 7: Lokalisation von Reelin im humanen Kolon. Immunohistochemie für Reelin, Visualisierung von Reelin mittels DAB, Gegenfärbung der Nuclei mit Hämalaun (blau). Plexus myentericus(A-B), Plexus submucosus(C-D), Nervenfasern in der Ringmuskulatur(E), Nervenfasern in der Längsmuskulatur(F). Muc = Mucosa, Mm = muscularis mucosae, SM = Submucosa, PSM = Plexus submucosus, PM = Plexus myentericus, NF = Nervenfasern, RM = Ringmuskulatur, LM = Längsmuskulatur.

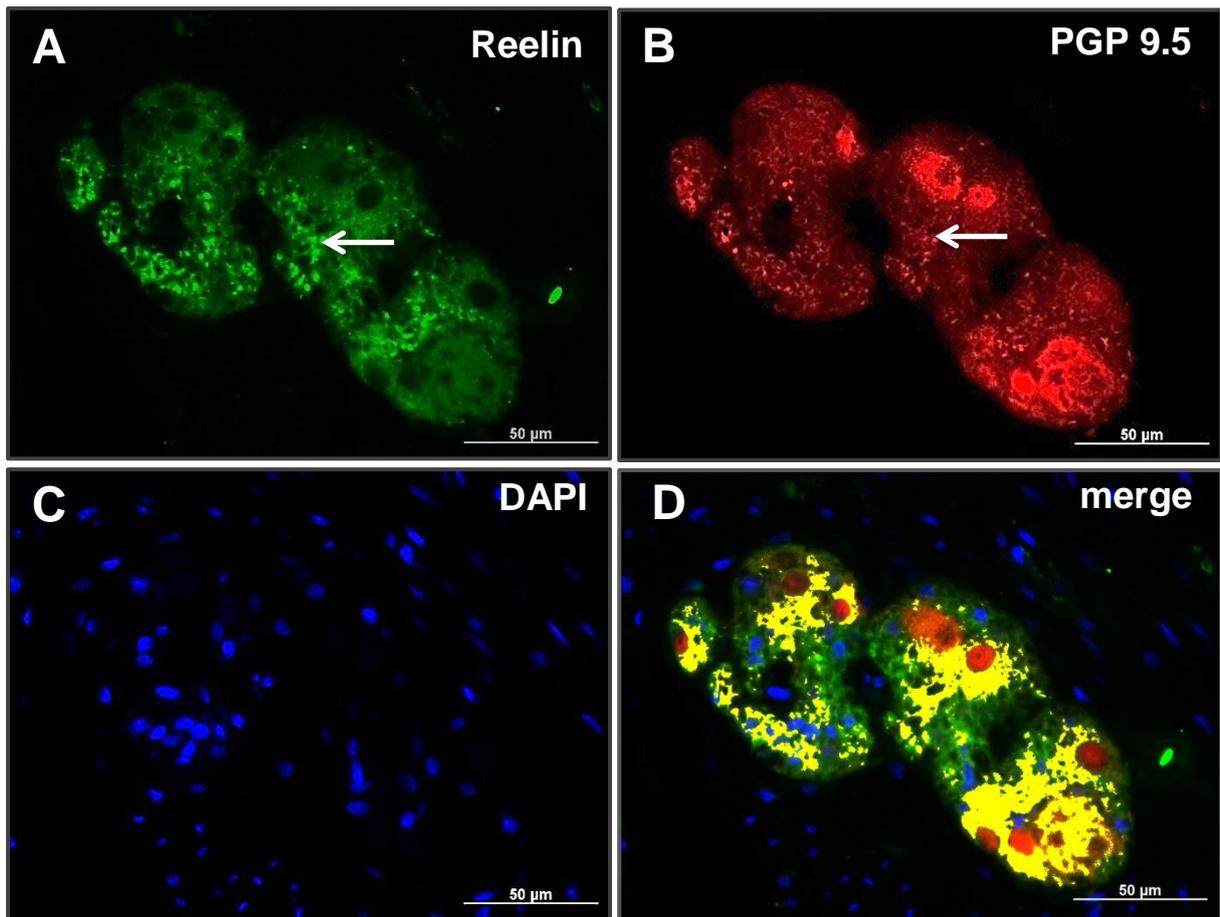


Abbildung 8: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und PGP 9.5 (rot) im Plexus myentericus des humanen Kolons. (A), Lokalisation von Reelin in Ganglien des Plexus myentericus. (B), Lokalisation von PGP 9.5. (C), DAPI-Kernfärbung. (D), Überlagerung der immunreaktiven Signale. Pfeile (A, B) zeigen ein granuläres Färbemuster.

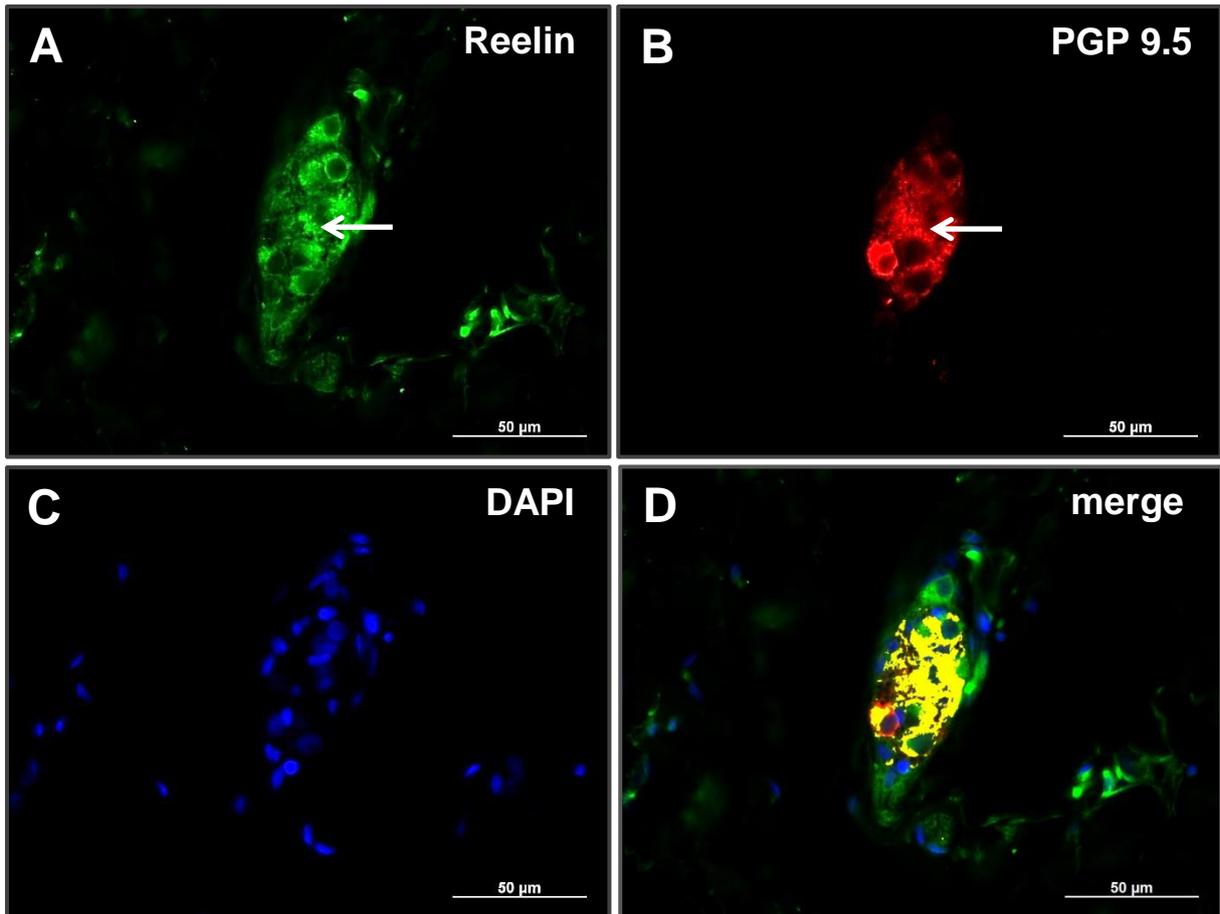


Abbildung 9: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und PGP 9.5 (rot) im Plexus submucosus des humanen Kolons. Lokalisation von Reelin (A) und PGP 9.5 (B) in Ganglien des Plexus submucosus. (C), DAPI-Kernfärbung.(D), Überlagerung der immunreaktiven Signale. Pfeile (A, B) zeigen ein granuläres Färbemuster.

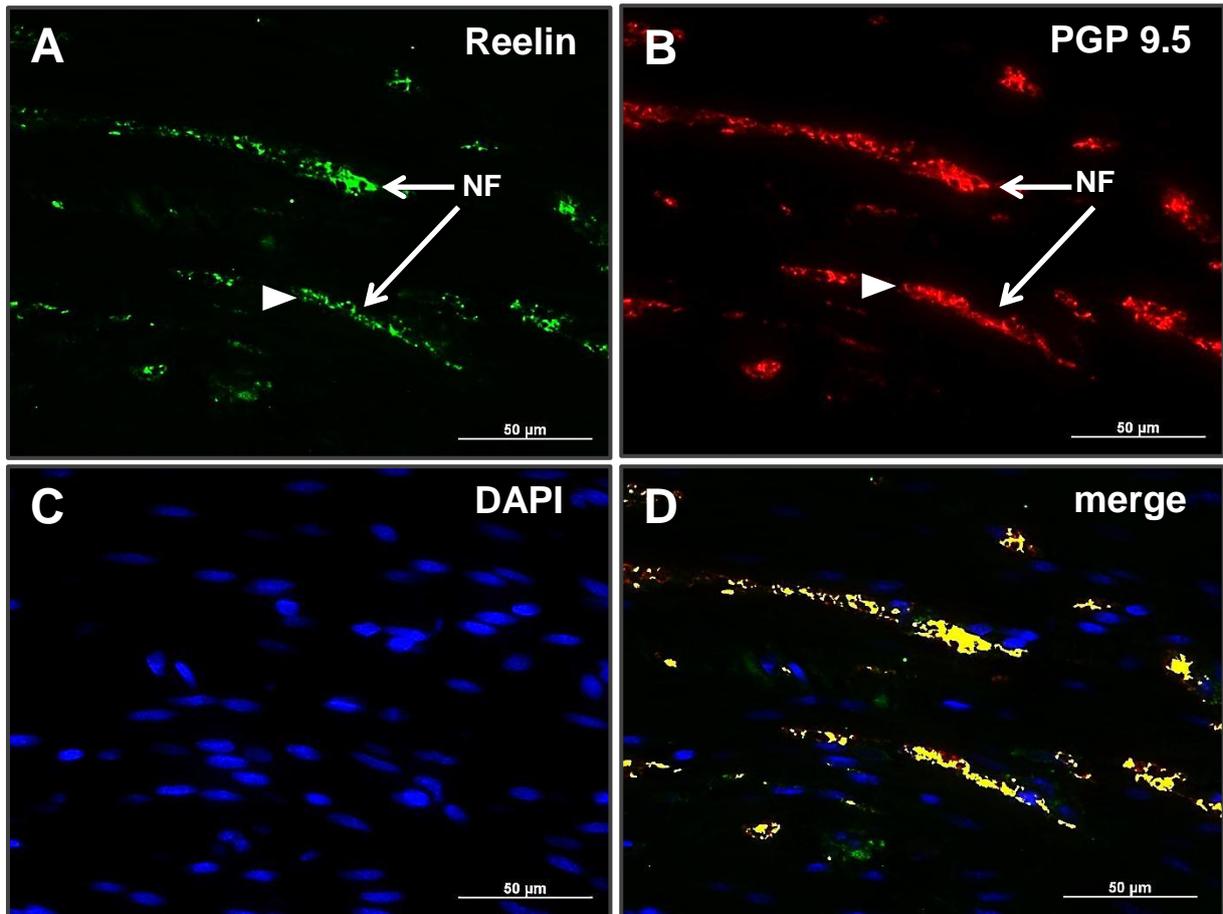


Abbildung 10: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und PGP 9.5 (rot) in Nervenfasern der Tunica muscularis des humanen Kolons. (A), Lokalisation von Reelin in Nervenfasern. (B), Lokalisation von PGP 9.5, (C), DAPI-Kernfärbung. (D), Überlagerung der immunreaktiven Signale. NF, Nervenfasern. Pfeilköpfe in (A) und (B) zeigen ein granuläres Färbemuster.

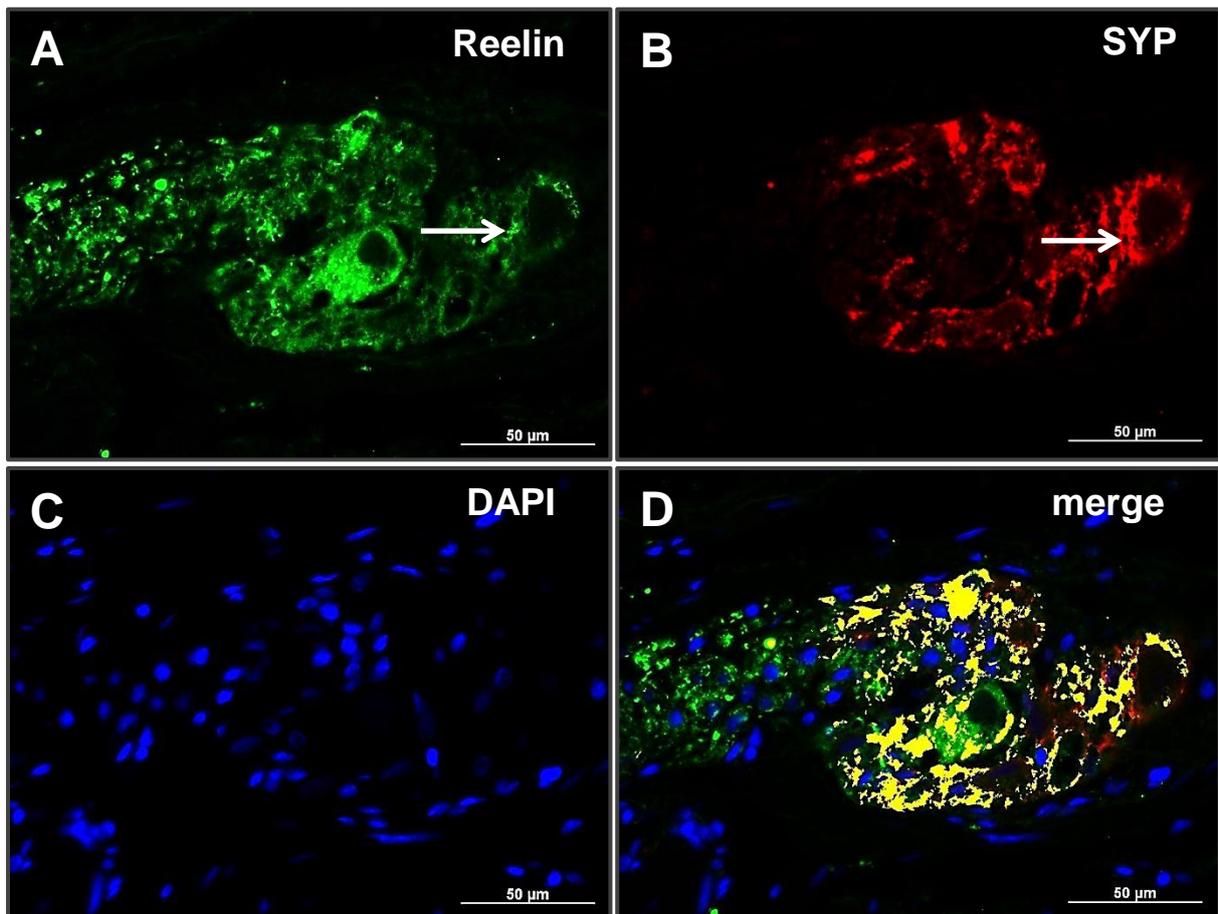


Abbildung 11: Dual-Label-Immunocytochemie für Reelin (grün) und Synaptophysin (rot) im Plexus Myentericus des humanen Kolons. (A), Lokalisation von Reelin in Ganglien des Plexus Myentericus. (B), Lokalisation von Synaptophysin. (C), Kernfärbung. (D), Überlagerung der immunreaktiven Signale. Pfeile in (A) und (B) zeigen ein granuläres Färbemuster.

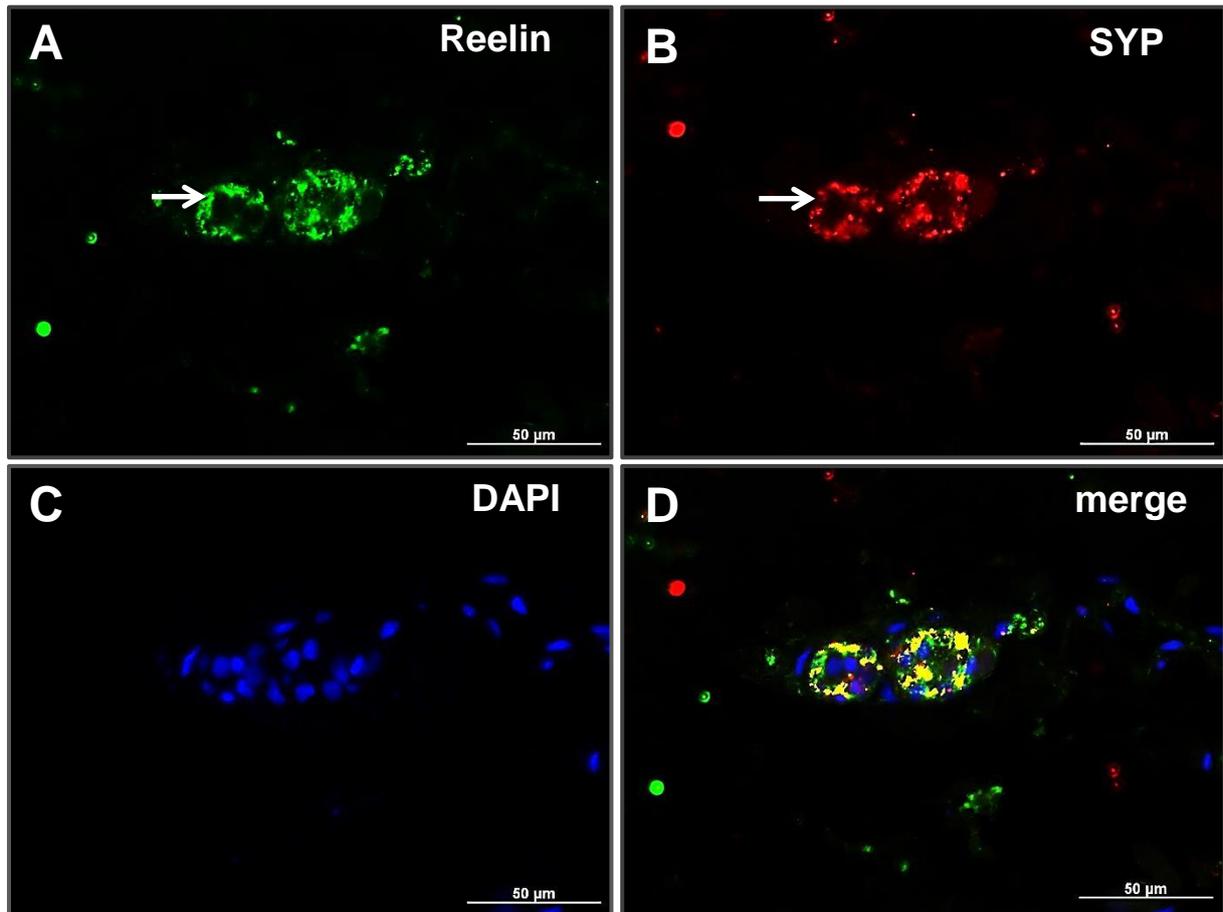


Abbildung 12: Dual-Label-Immunocytochemie für Reelin (grün) und Synaptophysin (rot) im Plexus submucosus des humanen Kolons. (A), Lokalisation von Reelin in Ganglien des Plexus submucosus. (B), Lokalisation von Synaptophysin. (C), Kernfärbung. (D): Überlagerung der immunreaktiven Signale. Pfeile (in A und B) zeigen ein granuläres Färbemuster.

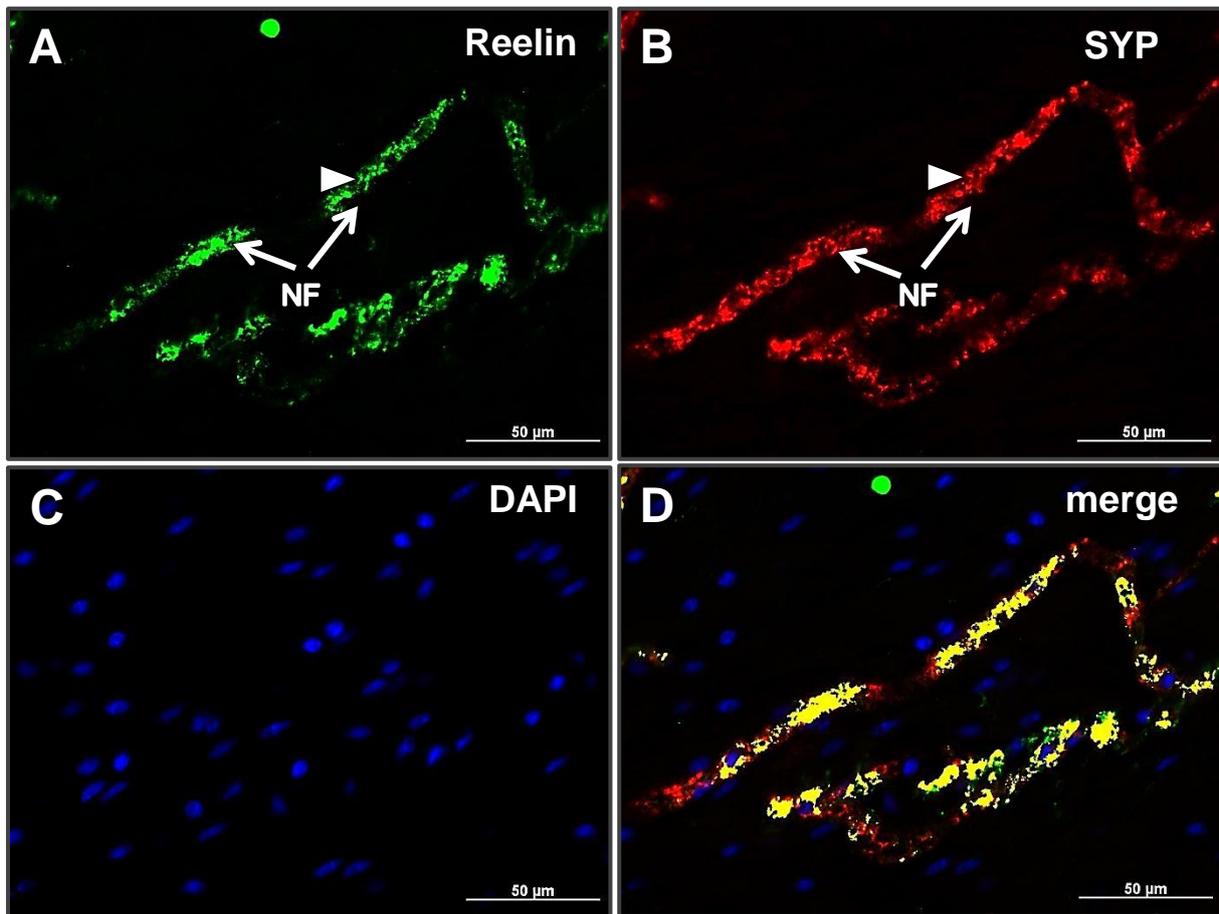


Abbildung 13: Dual-Label-Immunohistochemie für Reelin (grün) und Synaptophysin (rot) in Nervenfasern der Tunica muscularis des humanen Kolons. (A); Lokalisation von Reelin in Nervenfasern. (B), Lokalisation von Synaptophysin. (C): Kernfärbung. (D): Überlagerung der immunreaktiven Signale. NF = Nervenfasern. Pfeilköpfe zeigen auf das granuläre Färbemuster.

4.3. Ontogenetische Studie der mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im Dün- und Dickdarm der Ratte

Anhand einer Ontogenesestudie wurde die mRNA Expression von Reelin, dessen Rezeptoren und dem intrazellulären Adapterprotein Dab1 in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere und damit dem Entwicklungsgrad des Dick- und Dünndarms ermittelt. Analysiert wurde die mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im Dün- und Dickdarm von Ratten des postnatalen Tages P 0 (Geburtstermin), P 3 (3. postnataler Tag), P 6 (6. postnataler Tag) und P 21 (21. postnataler Tag), sowie von adulten Tieren. Es konnte gezeigt werden, dass Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 sowohl im Dünndarm (Abb. 14 A-D) als auch im Dickdarm (Abb. 14 E-H) der Ratte in allen untersuchten Altersstadien exprimiert wurden.

Im Dünndarm zeigten sich signifikante Erhöhungen von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1. Alle Expressionsgipfel manifestierten sich bei P 3 und P 6. Reelin und seine Rezeptoren zeigten eine sinkende Tendenz zum adulten Stadium hin (Abb. 14 A-C), wogegen das Expressionsmuster von Dab1, nach einer Abnahme bei P 21, im adulten Stadium einen Wiederanstieg aufwies (Abb. 14 D). Für Reelin konnte im Kolon jedoch für die unterschiedlichen Altersstadien keine nennenswerten Unterschiede in der mRNA Expression ermittelt werden (Abb. 14 E). Die mRNA Expression der Rezeptoren VLDLR und Lrp8 zeigten sich mit zunehmendem Alter steigend, jedoch konnte erst im Kolon adulter Tiere eine signifikante Erhöhung gegenüber P 0 ermittelt werden (Abb. 14 F-G). Dab1 zeigte bei P 0 äußerst geringe Expressionsmuster (Abb. 14 H). Es zeigte sich aber eine deutliche Erhöhung im Stadium P 3 und eine signifikante Erhöhung gegenüber P 0 und gleichzeitig auch das Expressionsmaximum für Dab1 im Kolon bei P 6 (Abb. 14 H).

Im Vergleich der mRNA Expression von Reelin im Dünndarm (Abb. 14 A) und im Dickdarm (Abb. 14 E) zeigte sich in beiden Darmabschnitten zwar eine Expression an P 0, jedoch fand sich nur im Dünndarm eine signifikante Erhöhung der Reelin Expression im Stadium P 3 gegenüber P 0. Zusätzlich fiel im direkten Vergleich von P 3 Dünndarm (Abb. 14 A) und P 3 Dickdarm (Abb. 14 E) die deutlich höhere mRNA Expression Reelins im Dünndarm auf. Für P 21 ließ sich im Dünndarm zwar ein deutlicher Rückgang beobachten, während dies im Kolon nicht der Fall war, jedoch zeigten sich im direkten Vergleich dieser Altersstadien keine bedeutenden Unterschiede im Expressionsgrad der mRNA. Für das adulte Stadium ließen sich etwas höhere Werte im Dickdarm beobachtet (Abb. 14 A u. E).

Im Dünndarm zeigte sich das Expressionsmaximum von VLDLR (Abb. 14 B) an P 6 erreichte mit signifikant höheren Werten gegen P 0. Nach dem Erreichen seines Maximums zeigte sich eine Herrunterregulation von VLDLR, wobei bei der adulten Ratte höhere Werte gemessen

sen wurden als an P 0. Der Rezeptor VLDLR zeigte im Dickdarm (Abb. 14 F) eine stetige Erhöhung der Expression bis zu einem höheren Wert im adulten Alter, der im Vergleich zu P 0 signifikant war. Für P 0 ließen sich sowohl im Dickdarm als auch im Dünndarm relativ ähnliche Werte beobachten. Im Stadium P 3 zeigten sich auch relativ nahe beieinander liegende Expressionsgrade, jedoch im Vergleich zum jeweiligen P 0 Stadium des Dickdarms und des Dünndarms zeigte sich im Dünndarm eine etwas höhere Steigerung der Expression. Während im Stadium P 6 im Dickdarm zwar eine Erhöhung der Expression in Bezug auf P 0 ermittelt werden konnte, erreichte diese jedoch keinen statistisch signifikanten Wert (Abb. 14 F). Im Dickdarm ließ sich im Stadium P 21 eine deutliche Zunahme der VLDLR mRNA Expression nachweisen (Abb. 14 F), während sich im Dünndarm ein Rückgang der Werte ermitteln ließ (Abb. 14 B). Im adulten Stadium zeigte sich im Dickdarm sowohl der Expressionsgipfel von VLDLR als auch im Vergleich zum Dünndarm ein deutlich höherer Wert, wo sich abnehmende Tendenzen beobachten ließen (Abb. 14 B und F).

Bezüglich Lrp8 zeigte sich im Dünndarm das Expressionsmaximum an P 3 mit einer deutlich signifikanten Erhöhung gegenüber P 0 (Abb. 14 C). Anschließend zeigte sich eine Rückläufigkeit in der Expression über P 21 bis zur adulten Ratte (Abb. 14 C). Die relative mRNA Expression von Lrp8 im Dickdarm zeigte in den frühen postnatalen Stadien geringe zunehmende Tendenzen, jedoch eine signifikante Erhöhung gegenüber P 0 im adulten Zustand (Abb. 14 G). Die Expressionswerte bei P 0 im Dünndarm und Dickdarm zeigten relativ geringe Unterschiede (Abb. 14 C und G). Während sich im Stadium P 3 im Dickdarm nur eine geringfügige Erhöhung ermitteln ließ, so zeigte sich im Dünndarm eine signifikante Erhöhung gegenüber P 0 (Abb. 14 C und G). Im Stadium P 6 im Dünndarm (Abb. 14 C) ließ sich ein Abfall der Expression von Lrp8 beobachten, welcher etwas unter dem Wert im Dickdarm fiel (Abb. 14 G). Während die Werte im Stadium P 21 und im adulten Tier im Dünndarm gleich blieben (Abb. 14 C), zeigte sich im Dickdarm zunächst ein sehr leichter Anstieg bei P 21 und eine signifikante Erhöhung im adulten Stadium gegen P 0 mit einem Expressionsmaximum (Abb. 14 G) und deutlich höheren Werten als im Vergleich zum adulten Stadium im Dünndarm (Abb. 14 C und G).

Die mRNA Expression von Dab1 im Dünndarm der Ratte konnte in allen untersuchten Stadien nachgewiesen werden (Abb. 14 D). Vor allem bei P 3 und im adulten Stadium zeigten sich statistisch signifikante Werte gegenüber P 0. Nachdem Dab1 sein Expressionsmaximum an P 3 erreichte, zeigte sich eine leicht abnehmende Expressionsrate, um dann wieder im adulten Alter einen Anstieg und signifikanten Wert zu erreichen (Abb. 14 D). Im Dickdarm ließen sich bei P 0 nur äußerst geringe Expressionswerte ermitteln, gefolgt von einem deutlichen Anstieg bei P 3 und anschließendem signifikantem Wert gegenüber P 0 bei P 6 (Abb.

14 H). Nach Erlangen seines Expressionsmaximums an P 6 zeigte sich ein drastischer Abfall der Werte mit einer nur geringen Expressionsrate bei P 21 und im adulten Alter (Abb. 14 H).

Im direkten Vergleich zwischen Dünndarm und Dickdarm (Abb. 14 D und H) fiel auf, dass die Expressionsrate von Dab1 bei P 0 im Dickdarm kaum nennenswert erschien, während sich im Dünndarm bereits deutlich die Expression von Dab1 abzeichnete. Im Stadium P 3 zeigten beide Darmabschnitte einen Anstieg der Expression. Aber nur im Dünndarm zeigte sich in diesem Stadium eine statistische Signifikanz und auch im direkten Vergleich deutlich höhere Werte. Im Stadium P 6 konnte eine signifikante Erhöhung gegen P 0 im Dickdarm ermittelt werden (Abb. 14 G), wogegen im Dünndarm bei P 6 keine signifikanten Werte erreicht wurden (Abb. 14 D). In der direkten Gegenüberstellung fielen annähernd gleiche Werte auf. Zusätzlich war der drastische Expressionsunterschied im adulten Alter zwischen dem hohen Expressionswert im Dünndarm und dem sehr geringen Wert im Dickdarm auffällig (Abb. 14 D und G).

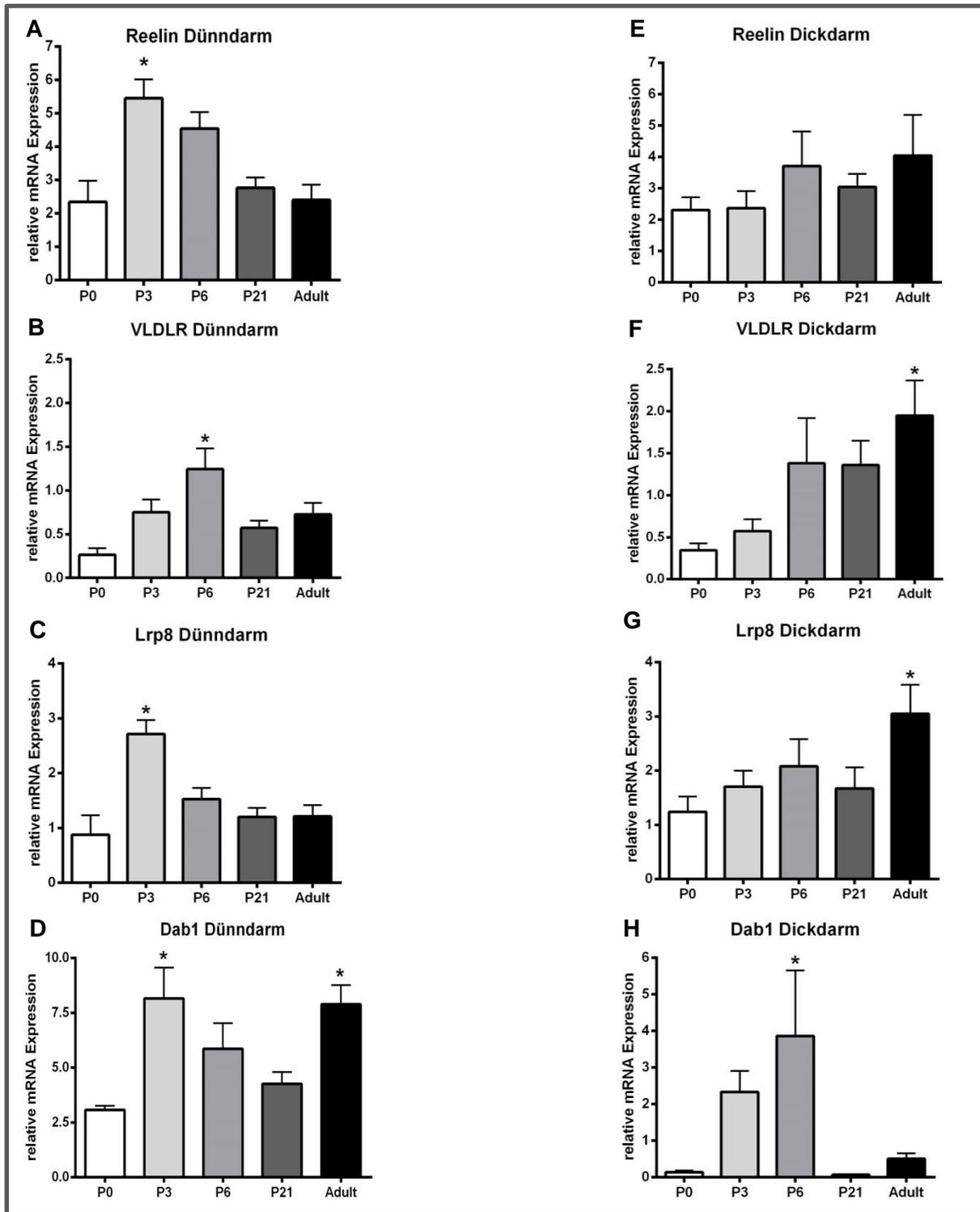


Abbildung 15: Ontogenetische Studie zur relativen mRNA-Expression von Reelin, VLDLR, Lrp 8 und Dab1 im Dünndarm (A-D) und Dickdarm (E-H) der Ratte. P 0 = Geburtstermin, P 3 = postnatal Tag 3, P 6 = postnatal Tag 6, P 21 = postnatal Tag 21. * = $p < 0,05$ gegen P 0. Dünndarm: Reelin, $n=7-8$, VLDLR, $n=7-8$, Lrp8, $n=8$, Dab1, $n=8-12$ pro experimentelle Gruppe. Dickdarm: Reelin, VLDLR, Lrp8, $n=8$, Dab1, $n=8-12$ pro experimentelle Gruppe. Die Daten sind auf die mRNA Expression des House-keeping Gens HPRT normalisiert. Fehlerbalken entsprechen den statistischen Fehlern des Mittelwertes (+ / - SEM)

4.4. Zellkultur

Zum spezifischen Nachweis von Reelin in Kulturen enterischer Ganglienzellen von Ratten wurde eine Immunohistochemie für Reelin durchgeführt, die durch das Chromogen DAB visualisiert wurde (siehe Kap. 3.2.5.5.). Mit dieser Methode konnte an 3 Wochen alten enterischen Zellkulturen der Nachweis erbracht werden, dass Reelin in kultivierten Ganglienzellen des ENS exprimiert wird (Abb. 15). Während in den Kulturen ohne GDNF-Zusatz nur runde, unverzweigte, einzelne Zellen immunohistochemisch detektiert werden konnten (Abb. 15 A), stellten sich in den Kulturen nach GDNF-Zusatz Netzwerke aus Ganglien und dazwischen liegenden Nervenfasern dar (Abb. 15 B-D). Die Ergebnisse zeigten, dass die GDNF-Behandlung eine konzentrationsabhängige Netzwerkformation beeinflusste. Die Reelin-Immunreaktivität war im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen nicht nur auf Perikarya beschränkt, sondern erstreckte sich auch auf verzweigte neuronale Fortsätze, wodurch die einzelnen Neurone in Verbund miteinander treten.

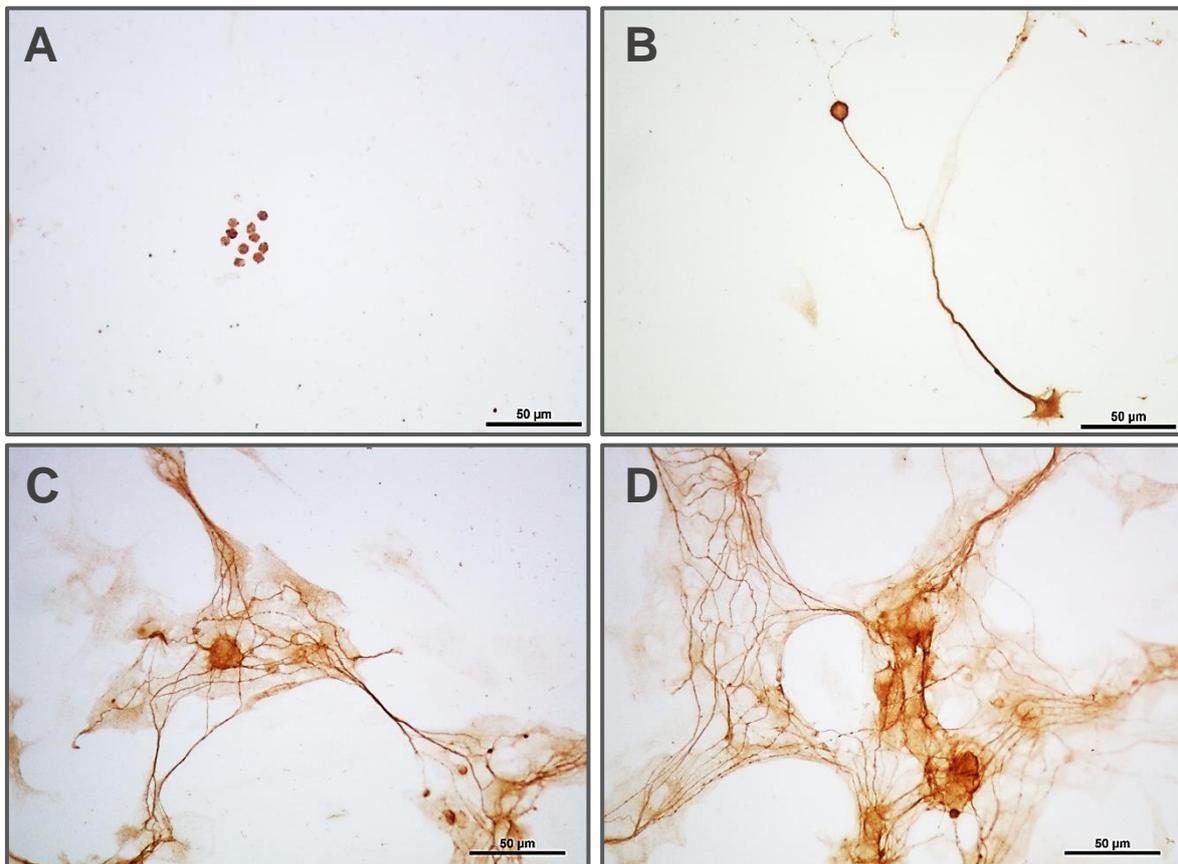


Abbildung 16: Immunohistochemie für Reelin in für 3 Wochen kultivierten enterischen Ganglienzellen von Ratten. (A), Visualisierung der Reelin-Immunreaktivität mit DAB in kultivierten enterischen Neuronen ohne GDNF-Behandlung. (B) mit 2 ng/ml GDNF-Behandlung. (C), mit 10 ng/ml GDNF-Behandlung (D) mit 50 ng/ml GDNF-Behandlung.

5. Diskussion

5.1. Wesentliche Erkenntnisse

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten zum ersten Mal die Expression und das Verteilungsmuster des Reelinsystems sowohl im humanen ENS als auch im ENS der Ratte nachgewiesen werden. Aus den Daten ergaben sich folgende Erkenntnisse:

1. Die mRNA-Expression von Reelin und dessen Rezeptoren VLDLR und Lrp8 sowie Dab1 ist sowohl in Vollwandpräparaten als auch in der Mukosa und Tunica muscularis des humanen Kolons detektierbar.
2. Die mRNA Expression von Reelin, dessen Rezeptoren und Dab1 ist in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons detektierbar.
3. Reelin lässt sich in submukösen und myenterischen Ganglien (Plexus submucosus und Plexus myentericus) sowie in Nervenfasern lokalisieren und ist begrenzt auf neuronale Somata und deren Fortsätze.
4. Die Immunreaktivität von Reelin zeigt eine Kolo-kalisation mit dem synaptischen Vesikel Marker Synaptophysin und dem pan-neuronalen Marker PGP 9.5.
5. Während der postnatalen Ontogenese der Ratte zeigten sich im Dünndarm mRNA-Expressionsmaxima von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 vor allem in frühen postnatalen Stadien, Dab1 zusätzlich im adulten Stadium. Im Dickdarm zeigten VLDLR und Lrp8 ihre mRNA-Expressionsmaxima im adulten Stadium und das Expressionsmaximum für Dab1 ließ sich in frühen postnatalen Stadien detektieren.
6. Reelin konnte spezifisch in kultivierten enterischen Neuronen nachgewiesen werden, welche unter Behandlung mit dem neurotrophen Faktor GDNF Reelin-immunreaktive neuronale Netzwerke ausbilden.

5.2. Methodik

5.2.1. Lokalisationsstudien

Zur Visualisierung und Detektion der strukturellen Organisation des ENS muss man spezifische histologische Färbemethoden anwenden. So können antizipierte Strukturen effizienter dargestellt werden, während Gewebekomponenten, die für das jeweilige Experiment von nachrangiger Bedeutung sind, in den Hintergrund treten. Als effektive Methode erwiesen sich dazu immunohistochemische Nachweisverfahren.

Mittels des pan-neuronalen Markers PGP9.5 ließen sich sowohl Perikarya als auch die neuronalen Fortsätze in der Muscularis darstellen, damit deutlich abgrenzen und eindeutig identifizieren. PGP 9.5 ist ein Protein, welches in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vorkommt (Thompson et al., 1983). Ein weiterer verwendeter Antikörper in dieser Arbeit war ein Antikörper gegen Synaptophysin. Auch dieser Antikörper erwies sich in der Versuchsreihe als zufriedenstellend. Synaptophysin ist ein Glykoprotein, welches in präsynaptischen Vesikeln lokalisiert ist (Wiedenmann and Franke, 1985). So kann der Antikörper gegen dieses Protein als präsynaptischer Vesikelmarker verwendet werden.

Die Dual-Label-Immunocytochemie für Reelin und PGP 9.5 bzw. Synaptophysin zeigte jedoch eine gewisse Empfindlichkeit, sodass diverse Vorversuche von Nöten waren, um geeignete Antikörper und Antigendemaskierungs-Methoden zu eruieren. Antigendemaskierungen, mittels kurzzeitiger Erhitzung in der Mikrowelle unter Verwendung von Zitronenpuffer, erwiesen sich in diesem Falle als gewebeschonender, im Vergleich zu der Verwendung eines „Decloaking-Chamber“ oder der Behandlung im Wasserbad. Die ersten Versuche bezüglich der Ko-Lokalisation, vor allem mit Synaptophysin, brachten nicht direkt zufriedenstellende Ergebnisse. Es wurde beispielsweise dann auch der Versuch unternommen schonender zu arbeiten, indem bei den Reelin/Synaptophysin Versuchen eine sequentielle „Färbung“ ausprobiert wurde. Bei der sequentiellen Bearbeitung wurden, im Gegensatz zu dem Standardverfahren (wie in Kap. 3.2.5.8, Tabelle 17 dargestellt), die Arbeitsschritte auf drei Tage verteilt, wobei das Auftragen der Primärantikörper dementsprechend sequentiell durchgeführt wurde. Der Reelin Antikörper (AK) wurde an Tag 1, der AK für Synaptophysin an Tag 2 aufgetragen. Jedoch zeigten sich keine nennenswerten Verbesserungen der Ergebnisse, sodass wieder das Standardverfahren für die Durchführung dieser Versuchsreihe gewählt wurde.

Als etwaige Ursachen für oben aufgeführte Problematik könnten die Fixierungsmethode oder aber auch mögliche Kreuzreaktionen zwischen den Antikörpern in Frage kommen. Denn bei dieser Methode wird das Probenmaterial zunächst mit Paraformaldehyd fixiert, anschließend dehydriert und dann in Paraffin eingebettet. Diese Methode verleiht dem Gewebe zwar Stabilität, jedoch kann sie auch zur Maskierung der zu erkennenden nativen Epitope führen. Jedoch soll die Demaskierung durch „Antigen retrieval“ genau dem entgegenwirken (siehe Kap. 3.2.3.5). Die Quantifizierung durch immunocytochemische Nachweisverfahren stellt sich zwar als problematisch dar, aber von Vorteil ist, dass bei dieser Methode die Struktur erhalten bleibt und so die Lokalisierung der Proteine untersucht werden kann.

5.2.2. Expressionsstudien

Um die quantitative Expression des Reelin-Systems darstellen zu können, wurde die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet. Wie bereits in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben, ermöglicht die Methode der qPCR simultan die Amplifikation und den relativen quantitativen Nachweis eines bestimmten Genabschnittes. Des Weiteren ermöglicht diese Methode den Nachweis geringer Mengen an mRNA. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen, welche sich dann, trägt man die Messpunkte als Fluoreszenz über dem CT Wert auf, in einer Kurve widerspiegelt, anhand derer die relative Expression sensitiv erfasst werden kann. Von großem Vorteil erwies sich die qPCR bei der Ontogenesestudie am Rattendarm, da so Veränderungen im Expressionsmuster, in Abhängigkeit vom Alter der Ratte und vom Darmabschnitt, sich zufriedenstellend darstellen ließen. Valide Daten lieferte die qPCR auch für mRNA, gewonnen aus humanen Kolon-Ganzwandbiopsaten, wobei dadurch ein Überblick über die jeweiligen Anteile der mRNA Expression in der Mucosa und Tunica muscularis im humanen Kolon gewonnen werden konnte. Eine Bestätigung der mRNA Expression auf Proteinebene erfolgte mittels immunzytochemischer Nachweisverfahren.

5.3. Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im humanen ENS

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Reelin als auch die Rezeptoren VLDLR, Lrp8 und das Adapterprotein Dab1 exprimiert werden. Die mRNA Expression konnte sowohl in Ganzwandschichten als auch in einzelnen separaten Schichten, vordergründig der Mucosa und der Tunica muscularis, nachgewiesen werden. Betrachtet man die Ergebnisse (siehe Kapitel 4.1.1., Abb. 5) so zeigen sich besonders hohe Expressionsraten der mRNA von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 in der Tunica muscularis. Ursächlich dafür sei aufzuführen, dass in der Tunica muscularis der Plexus myentericus und zugehörige Nervenfasern in Längs- und Ringmuskulatur lokalisiert sind und somit das anteilige Expressionsmuster der hier vorkommenden Proteine höher ist. Anschließende Experimente an, mittels LCM-gewonnenen, isolierten myenterischen Ganglien (Kapitel 4.1.2., Abb. 6) untermauerten diese ortsspezifische mRNA Expression von Reelin und seinen Rezeptoren sowie Dab1.

Es ist bekannt, dass Reelin im ZNS von Cajal-Retzius-Zellen des Neocortex und Hippocampus von Subpopulationen GABAerger Interneurone und von Körnerzellen des Cerebellums synthetisiert wird (Alcántara et al., 1998; D'Arcangelo et al., 1997; Nakajima et al., 1997; Pesold et al., 1998). Es bindet dort an VLDLR und Lrp8, welche wiederum an das intrazelluläre Adapterprotein Dab1 (Disabled 1) binden (Benhayon et al., 2003; D'Arcangelo et al.,

1999; Hiesberger et al., 1999). Jedoch werden VLDLR, Lrp8 und Dab1 nur von Zellen exprimiert, die ihrerseits kein Reelin synthetisieren (Pesold et al., 1999; Trommsdorff et al., 1999). Diese Erkenntnisse setzen eine parakrine Aktivität von Reelin voraus. Geht man nun von diesen parakrinen Mechanismen im ZNS aus und betrachtet gleichzeitig die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse anhand der mRNA Expression aus isolierten myenterischen Gangli- en, welche zeigten, dass sowohl Reelin als auch VLDLR, Lrp8 und Dab1 exprimiert werden, so erhärtet sich die Annahme, dass auch im ENS, spezifisch betrachtet in myenterischen Ganglien, zum einen Reelin exprimierende Zellen und zum anderen aber auch deren Zielzel- len vorzufinden sein könnten. Somit würde Synthese, Sekretion und parakrine Wirkung in enterischen Ganglien vonstattengehen.

5.4. Lokalisation von Reelin im humanen Kolon

Um den Nachweis zu erbringen, dass Reelin in Ganglien des ENS lokalisiert ist, wurden im- munohistochemische Versuche an Paraffinschnitten aus humanem Kolongewebe durchge- führt (siehe Kapitel 3.2.5.). Dabei konnte Reelin im Plexus submucosus, Plexus myentericus und auch in Nervenfasern lokalisiert werden (siehe Kapitel 4.2.1.). Die Verifizierung der ge- nauen neuronalen Lokalisation von Reelin wurde anhand von Dual-Label- Immunohistochemie realisiert.

5.4.1. Kollokalisierung von Reelin mit PGP 9.5

Wie bereits in Kapitel 5.2.1. erwähnt, so erwies sich das ca. 25 kDa schwere zytoplasmati- sche Protein PGP 9.5 als idealer Ko-Marker für den neuronalen Lokalisationsnachweis von Reelin. Da es in großen Mengen in Nerven vorzufinden ist, eignet es sich besonders gut zur Detektion peripherer Nerven. PGP 9.5 ist eine Ubiquitin C-terminal Hydrolase 1 (UCHL-1) (Wilkinson et al., 1992). Die Expression von PGP 9.5 ist hochspezifisch für Neurone und für diffuse Zellen des neuroendokrinen Systems und seiner Tumoren (Rode J et al., 1985). Des Weiteren kodiert das *pgp9.5* Gen für zwei divergente Enzymaktivitäten, welche 1) die Degrada- tion von alpha-Synuclein (Liu et al., 2002) und 2) die Anfälligkeit für Morbus Parkinson (Farrer, 2006; Lowe J et al., 1990; Setsuie et al., 2007), beeinflussen. PGP 9.5 soll ca. 1-3% aller Proteine des ZNS repräsentieren (Doran JF et al., 1983). Zusätzlich zum Vorkommen von PGP 9.5 in Neuronen findet man dieses Protein auch im Nierentubulus, Spermatoogo- nien, Ovar und Corpus luteum (Luo et al., 2006; Wilson et al., 1988).

In Konklusion der vorhergegangenen Versuche ließ sich anhand der immunohistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit, nämlich der Kolokalisation von PGP 9.5 und Reelin im ENS, verifizieren, dass Reelin speziell in Neuronen und den dazugehörigen Nervenfasern vorzufinden ist.

5.4.2. Kolokalisation von Reelin mit Synaptophysin

Die interneuronale Kommunikation erfolgt an Synapsen (Sherrington, 1906). Synapsen stellen die kommunikativen Verbindungspunkte (Axon, Synaptischer Spalt und Dendrit) zweier Neurone dar. Die Informationsweiterleitung an chemischen Synapsen erfolgt mittels der Freisetzung diverser Neurotransmitter. Ein eintreffendes Aktionspotential führt kurzzeitig zu der Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (Hodgkin and Huxley, 1952). Dieser Vorgang führt über mehrere Mechanismen und der Konformationsänderung diverser Vesikelproteine zur Exozytose (Vesikelverschmelzung mit der Membran) von synaptischen Vesikeln an der präsynaptischen aktiven Zone der Nervenendigungen (Südhof, 2004, 1995) und anschließender Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt.

Neben anderen Proteinen, welche für die Membranfusion unerlässlich sind (Bennett et al., 1993; Oylar et al., 1989; Trimble et al., 1988), findet man das Strukturprotein Synaptophysin. Dieses 38 kDa große Membranprotein ist in reichlichen Mengen als integrales synaptisches Vesikelprotein in neuroendokrinen Zellen und allen Neuronen vorzufinden (Jahn et al., 1985). Da Synaptophysin das am meisten verbreitetste synaptische Vesikelprotein ist, wird es häufig und effektiv zur Quantifizierung von Synapsen verwendet (Calhoun et al., 1996). Die exakte Funktion von Synaptophysin ist nicht genau geklärt. Da es aber mit dem essentiellen Vesikelprotein Synaptobrevin (Baumert et al., 1989; Trimble et al., 1988) interagiert (Calakos and Scheller, 1994), lässt dies auf eine mögliche Funktion Synaptophysins bei der Fusion von Vesikel und Membran schließen (Edelman et al., 1995). Jedoch scheint Synaptophysin selbst nicht essentiell für die Neurotransmitterfreisetzung zu sein (McMahon et al., 1996). Weitere Versuche zeigten, dass Synaptophysin-defiziente Mäuse sich zwar normal entwickelten, jedoch Verhaltensauffälligkeiten und Lerndefizite aufwiesen (McMahon et al., 1996; Schmitt et al., 2009).

Die in Kapitel 4.2.3. dargestellten Ergebnisse zeigen prägnanterweise granuläre immunreaktive Signale für Synaptophysin zirkulär der neuronalen Somata im Plexus myentericus (siehe Kapitel 4.2.3., Abb. 12 B) und des Plexus submucosus (Kap. 4.2.3., Abb. 13 B) sowie entlang der enterischen Nervenfasern (Kap. 4.2.3., Abb. 14 B). Für Reelin ergab sich ein vergleichbares, feingranuläres immunreaktives Färbemuster im Plexus myentericus (Kap.

4.2.3., Abb. 12 A), Plexus submucosus (Kap. 4.2.3., Abb. 13 A) und entlang der Nervenfasern (Kap. 4.2.3., Abb. 14 A). Reelin und Synaptophysin zeigten eine partielle Ko-Lokalisation in Perikarya des Plexus myentericus, des Plexus submucosus und innerhalb der Nervenfasern (siehe Kap. 4.2.3., Abb. 12 D, 13 D, 14 D). Das jeweils granuläre Färbemuster lässt darauf schließen, dass Reelin und Synaptophysin in den sog. enterischen neuronalen Varikositäten vorkommen. Varikositäten sind eine Ansammlung von synaptischen Vesikeln und stellen den Ort der Neurotransmitterfreisetzung im ENS dar (Burnstock, 2008). Diese Beobachtungskonstellation deutet auf eine präsynaptische Lokalisation von Reelin und damit auf mögliche Funktionen in der enterischen Neurotransmission hin.

Bislang sind Einflüsse Reelins auf die Differenzierung und Funktionen postsynaptischer Strukturen, wie zum Beispiel Dendriten, postsynaptischer Densität und den Dornfortsätzen, bekannt (Beffert et al., 2005; Hellwig et al., 2011; Niu et al., 2004; Niu et al., 2008). Andere Untersuchungen zeigten, dass Reelin Defizienz vor allem postsynaptische Malformation und Dysfunktion zur Folge hat, indem die molekulare Komposition Veränderungen aufweist (Ventrucci et al., 2011). Eine neuere Studie impliziert, dass Reelin im ZNS durchaus auch eine Rolle in der Neurotransmitterfreisetzung zu spielen scheint, aber nicht mittels der konventionellen Signalkaskade (Vldlr, Lrp8, Dab1), sondern durch die Bindung an Integrine (Hellwig et al., 2011). Jedoch weisen wiederum andere Studien darauf hin, dass Reelin selbst aber konstitutiv und damit abhängig vom endoplasmatischen Retikulum/Golgi-Komplex sezerniert wird und nicht einem Calcium abhängigen Mechanismus zu unterliegen scheint, damit nicht in präsynaptischen Vesikeln gespeichert wird, sondern in Vesikeln des Golgi-Apparates. Diese Befunde beruhen auf hippocampalen Zellen und Körnerzellen (Lacor et al., 2000; Tinnes, 2009). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, dass Reelin produzierende Interneurone durchaus die kompensatorische Fähigkeit zur zell-autonomen Regulation ihrer Erregbarkeit besitzen (Karayannis et al., 2012).

So scheint die Reelinsekretion selbst nicht Calcium abhängig zu sein, trotzdem könnte Reelin Einfluss nehmen auf die Vesikel-Membranfusion durch Regulation der Expression von Snap 25 und damit indirekt auf die Ca⁺ abhängige Neurotransmitterfreisetzung. So erhöhte sich die Anzahl präsynaptischer Vesikel in CA1 (Cornu ammonis 1) Synapsen signifikant und es zeigte sich eine Abnahme der SNAP 25 Expression in der *Reeler* Mutante (Hellwig et al., 2011). Geht man nun davon aus, dass Reelin auch im ENS eine präsynaptische Funktion einnimmt, so scheinen weitere Versuche von Nöten, um zu eruieren, ob Reelin auch im ENS an der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt ist. Zu prüfen wäre insbesondere, ob die Signalkaskade konventionell verläuft oder entlang einer Integrin-Signalkaskade. Auch die Frage nach der konstitutiven Reelin Sekretion im ENS scheint klärungsbedürftig.

5.5. Ontogenesestudie: mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im Rattendarm

Anhand der Ontogenesestudie am Dünndarm und Dickdarm der Ratte konnte die mRNA-Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 zu unterschiedlichen postnatalen Lebensphasen (P 0, P 3, P 6, P 21, adult) beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3.). Im Dünndarm zeigten sich die Expressionsmaxima für Reelin und auch VLDLR und Lrp8 vor allem in frühen postnatalen Phasen. So zeigte sich das Expressionsmaximum für Reelin bei P 3, für VLDLR bei P 6, für Lrp8 bei P 3 und für Dab1 zeigte sich das Maximum bei P 3 und im adulten Stadium (Abb. 14 A-D).

Im ZNS ist Reelin in frühen postnatalen Phasen beteiligt an weiteren Schritten neuronaler Entwicklungen sowie der Differenzierung der Dendriten und der Ausbildung von Dornfortsätzen (Niu et al., 2004; Niu et al., 2008). Weitere Analysen der *Reeler*-Mutante zeigten, dass Reelin bei der Entwicklung synaptischer Konnektivität vor allem im Hippocampus (Borrell et al., 2007; Borrell et al., 1999; Del Rio et al., 1997) und des Kleinhirns (Mariani, 1982; Mariani et al., 1977) von Bedeutung ist. Unter anderem fungiert Reelin in postnatalen Stadien im ZNS auch als eine Art „Abkopplungs“-Signal für migrierende Neurone (Hack et al., 2002). Die Bildung von Synapsen, welche vorwiegend in postnatalen Stadien zu beobachten sind und das Fundament der neuronalen Konnektivität darstellen, ist von entscheidender Bedeutung für die neuronale Reifung im ZNS. Zieht man nun Schlüsse aus der Funktion Reelins in frühen postnatalen Stadien im ZNS und wendet diese auf ENS an unter Betrachtung der Expressionsmuster, so ergibt sich die Frage, ob Reelin während der frühen postnatalen Stadien im Dünndarm der Ratte auch involviert sein könnte in die Maturation, Dendritogenese und letztendlich die Etablierung synaptischer Konnektivität im ENS, was den Informationsaustausch und die regelrechte Funktion ermöglichen würde.

Bezüglich der Expression der Lipoproteinrezeptoren VLDLR und Lrp8 ist bereits bekannt, dass diese im ZNS vor allem in pränatalen Stadien unterschiedliche Rollen wahrnehmen. So stellte sich heraus, dass VLDLR, in Kombination mit Reelin, unter anderem als eine Art „Stop“-Signal für migrierende Neurone fungiert, während Lrp8 essentiell für die regelrechte Migration von Neuronen ist (Benhayon et al., 2003; Frotscher, 1998; Hack et al., 2007). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zudem in postnatalen Untersuchungen zeigen, dass Lrp8/VLDLR/Dab1 unabhängig von Reelin die Migration und Formation von Neuroblasten aus der subventrikulären Zone (SVZ) Richtung Bulbus Olfactorius beeinflussen (Andrade et al., 2007). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, so wirft sich die Frage auf, ob das frühe Expressionsmaximum der Lipoproteinrezeptoren auf eine mögliche Funktionalität die-

ser Rezeptoren im ENS in frühen postnatalen Phasen hinweist. Und sollte dies der Fall sein, entsprechen diese Funktionen denen im ZNS? Könnten die frühen Maxima eine Involvierung von Reelin in die Ausbildung neuronaler Netzwerke darstellen?

Im Dickdarm der Ratte zeigten sich bei den mRNA Expressionsstudien hohe Expressionsraten von Reelin, VLDLR und Lrp8 vorwiegend im adulten Stadium (siehe Kap. 4.3., Abb. 14 E-G). Für Dab1 ließ sich ein Expressionsgipfel an P 6 beobachten (siehe Kap. 4.3., Abb. 14 H). Untersuchungen im adulten hippocampalen Gyrus dentatus zeigten weiterhin stattfindende Neurogenese (Altman J and Das GD, 1965; Cameron et al., 1993; Kuhn et al., 1996). Auch die Expression von Reelin konnte in diesen Strukturen nachgewiesen werden (Alcántara et al., 1998; Pesold et al., 1998). Zusätzlich scheint die Reelin-Signalkaskade die Neurogenese im Gyrus dentatus zu regulieren. Eine Reelin Überexpression führte in diesem Falle zu einer beschleunigten Dendritogenese, während eine Unterbrechung der Signalkaskade zu einer von der Norm abweichenden Entwicklung und Formation von Dendriten führt, aber auch den synaptischen Kreislauf verändert (Teixeira et al., 2012) und vor allem postsynaptische Veränderungen herbeiführt (Ventruti et al., 2011). Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass Reelin bei der Aufrechterhaltung der gebildeten ZNS-Architektur von Bedeutung zu sein scheint (Heinrich et al., 2006). So zeigten Heinrich et al., dass bei der Körnerzelldispersion nicht zwangsläufig eine erhöhte Neurogenese die Ursache zu sein scheint, sondern vielmehr eine lokale Reelin Defizienz (Heinrich et al., 2006).

Die Annahme der Einflussnahme Reelins auf Neurone im ZNS konnte unter anderem auch durch Beobachtungen bezüglich weiterer neuropsychiatrischer Erkrankungen, welche mit einer Reelin-Defizienz assoziiert werden, gemacht werden (Folsom and Fatemi, 2013). So zeigten sich zum Beispiel erniedrigte Reelinwerte bei der der Bipolaren Störung und auch bei der Schizophrenie (Fatemi et al., 2001; Teixeira et al., 2011; Torrey et al., 2005). Eine beschleunigte Entstehung von β -Amyloid-Plaques bei der Alzheimer Erkrankung wird auch in Verbindung mit einer erniedrigten Reelin-Expression gebracht (Kocherhans et al., 2010). Diese Beobachtungen im ZNS, in Kombination mit den Befunden zum ontogenetischen Expressionsmuster von Reelin und seiner Rezeptoren im ENS, wirft die Hypothese auf, dass Reelin auch im ENS eine Beteiligung bei der Aufrechterhaltung enterischer Neurone und deren Netzwerke; der Dendritogenese und der regelrechten Ausbildung synaptischer Kreisläufe zugesprochen werden könnte.

Erwähnenswert ist auch, dass die Rezeptoren VLDLR und vor allem Lrp8 in der Ontogenese studie im Kolon ihr Expressionsmaximum im adulten Stadium aufweisen (siehe Kap. 4.3., Abb. 14 F-G). Diese Rezeptoren gehören zu einer multifunktionellen Lipoproteinrezeptor-

Familie, deren unterschiedliche Angehörigen, auch unterschiedliche, bisweilen divergente Funktionen haben (Strickland et al., 2002). So wird ApoER4 mit dem hereditären early-onset Alzheimer assoziiert (Bu, 2009; Corder et al., 1993; Poirier, 2000), während Lrp8 eher mit einem geringeren Risiko in Verbindung gebracht werden kann (Herz, 2009; Marzolo and Bu, 2009). Im ZNS ist Lrp8 von Bedeutung für die Langzeitpotenzierung (LZP) (Weeber et al., 2002), indem es postsynaptisch funktionale Komplexe mit den NMDA-Rezeptoren bildet. Zudem ist es auch von Bedeutung für deren Homöostase (Beffert et al., 2005; Campo et al., 2009) und dadurch beteiligt an synaptischer Plastizität und räumlichem Lernen (Beffert et al., 2005; Myant, 2010). In Anbetracht dessen ergibt sich die Vermutung, dass dieser Rezeptor auch im ENS an der Ausbildung synaptischer Plastizität beteiligt sein könnte, indem es auf die LZP enterischer exzitatorischer Neurone Einfluss nimmt.

Interessanter Weise zeigte das intrazelluläre Adapterprotein Dab1, an welches die zytoplasmatischen Anteile der zwei Rezeptoren binden (siehe Kap. 1.2.3.), im adulten Stadium im Dünndarm ein deutliches Expressionsmaximum, während die Werte für VLDLR und Lrp8 keine Signifikanz und eine sinkende Tendenz aufwiesen (Abb. 14 B-D). Im Dickdarm verhielt es sich genau gegenteilig. Während VLDLR und Lrp8 hohe Werte im adulten Stadium aufwiesen, so zeigte sich für Dab1 ein bemerkenswertes Expressionstief mit nur minimalen Werten (Abb. 14 F-H). Einen möglichen Erklärungsansatz bieten Untersuchungen, die zeigten, dass Dab1, in Abwesenheit von VLDLR und Lrp8, eine deutliche Hochregulation in neuronalen Zellen von Ratten erfährt. Trommsdorff et. al. zeigten zudem auch, dass die sogenannte *scrambler* Maus, welcher durch Mutation das Dab1 Gen fehlt, den gleichen Phänotyp zeigt wie die *Reeler*-Maus (Trommsdorff et al., 1999). Des Weiteren untermauert die erhobene Datenlage dieser Arbeit, dass die Expression von Dab1 auch im enterischen ENS für die Signaltransduktion Reelins via VLDLR und Lrp8 nötig zu sein scheint. Neuere Experimente zeigten, dass Dab1 auch im adulten Gehirn synaptische Funktionen zu übernehmen scheint und bedeutend ist für die Ausbildung synaptischer Plastizität und anderen Lernprozessen (Trotter et al., 2013). So stellt sich die Frage, ob diese Funktionen auch auf das ENS übertragbar sein könnten.

5.6. Reelin-Lokalisation in Kulturen enterischer Ganglienzellen

Da Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 hohe Expressionsraten vor allem in frühen postnatalen Stadien aufweisen (siehe Kapitel 4.3.), wurden enterische Nervenzellen, welche von 2 Tage alten Ratten stammen, 3 Wochen lang kultiviert und mit steigenden Konzentrationen von GDNF behandelt (siehe Kapitel 4.4.). GDNF ist ein maßgeblicher Wachstumsfaktor für ente-

rische Neurone und beeinflusst nicht nur die Proliferation, sondern auch deren Überleben (Heuckeroth et al., 1998; Lin et al., 1993). Eine Defizienz von GDNF, aber auch von GFR α (GDNF-family Rezeptor α 1) oder RET (rearranged during transfection) führt zu intestinaler Aganglionose und Defekten im sympathischen, parasympathischen und sensorischen Nervensystem (Enomoto et al., 1998; Moore et al., 1996; Schuchardt et al., 1994).

Es zeigte sich eine deutliche Immunreaktivität, welche sich bei GDNF behandelten Kulturen auch entlang der aussprossenden Nervenfasern manifestierte. Unter GDNF Behandlung bildeten die enterischen Nervenzellkulturen Netzwerke, bestehend aus Ganglien und verbindenden Nervenfasern, welche der *in vivo* Situation entsprechen. So zeigten *in vivo* Studien von Moore et al. Aganglionosen bei GDNF knock-out Mäusen (Moore et al., 1996). Die weitere Behandlung mit GDNF führte zu einer Zunahme neuronaler Aggregate sowie vermehrter Ausbildung kaliberstarker Nervenfaserbündel (siehe Kap. 4.4., Abb. 15). Es zeigte sich eine deutliche Immunreaktivität für Reelin, dessen Verteilungsmuster mit Kaliberzunahme der Nervenfasern und der Zunahme neuronaler Aggregate korrelierte. Diese erhobenen Daten weisen auf eine mutmaßliche Rolle des Reelin-Signalweges in der Entwicklung von enterischen Neuronen und Ausbildung neuronaler Verbindungen hin.

Im ZNS ist Reelin während der Entwicklung an der Regulation radialer Migration von Neuronen im Neocortex und Hippocampus (D'Arcangelo et al., 1995; Drakew et al., 1997) und von Purkinje Zellen im Cerebellum beteiligt (Larouche et al., 2008; Miyata et al., 2010). Es ist jedoch auch bekannt, dass Reelin in postnatalen Stadien von Bedeutung ist für die Aufrechterhaltung synaptischer Konnektivität und Einfluss nimmt auf postsynaptische Morphologien (Ventrucci et al., 2011). So konnte beobachtet werden, dass in Reelin-defizienten Mutanten, bei denen die Signalkaskade gestört ist, führende neuronale Ausläufer Missorientierungen aufwiesen und auch die Dendriten von Pyramidenzellen ihre regelrechte Ausrichtung nicht entwickelten (Landrieu and Goffinet, 1981; Olson et al., 2006). Zudem spielt Reelin in der Stabilisierung des Aktin- Zytoskeletts eine bedeutende Rolle, indem es die n-Cofilin Phosphorylierung beeinflusst (Chai et al., 2009b; Frotscher, 2010). Diese oben aufgeführten Mechanismen legen die Überlegung nahe, dass Reelin auch im ENS an der Stabilisierung und regelrechten Ausrichtung der Neurone beteiligt sein könnte. Daneben induziert Reelin im ZNS die Ablösung migrierender Neurone von radialen Glia, die während der Entwicklung als Leitstruktur dienen (Sanada et al., 2004). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass radiale Glia als Leitstruktur für die regelrechte Migration von Interneuronen von Nöten sind (Poluch and Juliano, 2007; Yokota et al., 2007) und dass Reelin, in Zusammenarbeit mit seinem Rezeptor Lrp8, die Migration von Interneuronen in den Bulbus olfactorius beeinflusst (Hellwig et

al., 2012). Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob Reelin auch für enterische Interneurone diese Aufgabe übernimmt.

5.7. Mögliche synaptische Funktionen von Reelin im ENS

Die Beobachtungen, dass Reelin im adulten humanen Kolon eine partielle Ko-Lokalisation mit dem synaptischen Vesikelmarker Synaptophysin aufweist, deuten auf eine Rolle Reelins in präsynaptischen Funktionen im ENS hin. Diese Hypothese wird untermauert durch eine neuere Studie, welche zeigte, dass Reelin bei der Neurotransmitterfreisetzung von Belang ist. So erhöhte sich die Anzahl präsynaptischer Vesikel in CA 1 Synapsen signifikant und eine Abnahme der SNAP 25 Expression in der *Reeler*-Mutante war zu beobachten. Gab man aber Reelin hinzu, so ließ sich eine Reversion dieses Zustandes beobachten (Hellwig et al., 2011). Darüber hinaus zeigte sich in der *Reeler*-Maus auch bezüglich der paired-pulsed Bahnung, was ein präsynaptischer Mechanismus ist, der mit Transmitterfreisetzung assoziiert wird, eine Abnahme in CA 1 Synapsen. Eine andere Studie zeigte, dass Reelin-Defizienz eine veränderte Neurotransmitterrezeptordichte und deren Verteilung in der *Reeler*-Maus zur Folge hat (Cremer et al., 2011), was wiederum die synaptische neuronale Plastizität beeinflusst. Auch, wie bereits mehrfach erwähnt, zeigt die *Reeler*-Maus postsynaptische Auffälligkeiten; wie zum Beispiel Defekte in Gerüst-bildenden Proteinen, Neurotransmitterrezeptoren und Signal-Proteinen (Ventrucci et al., 2011), was den Einfluss Reelins auf synaptische Konnektivität und Plastizität untermauert und auch zusätzlich Einfluss nimmt auf das vor allem räumliche Lernverhalten und Gedächtnis (Brosda et al., 2011; Stranahan et al., 2011). Für die LZP scheinen aber auch vor allem bestimmte „Splicing“- Variationen des Lrp8 Rezeptors, in Kombination mit Reelin, von Bedeutung zu sein (Beffert et al., 2005; Weeber et al., 2002).

Reelin beeinflusst zudem die Formation und Stabilisierung von dendritischen Fortsätzen im postnatalen Hippocampus (Niu et al., 2004; Niu et al., 2008). Diese Funktion der Formation und Stabilisierung von Synapsen könnte Reelin auch im ENS übernehmen. Verminderte Dichte von Dornfortsätzen konnte in apikalen Dendriten von *Reeler*- Mäusen festgestellt werden. Dieser Zustand konnte *in vitro* durch die Applikation von rekombinantem Reelin revidiert werden, was einen interessanten Blick auf den möglichen therapeutischen Nutzen Reelins aufwirft. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass heterozygote *Reeler*-Mäuse einen Verlust kortikaler Dornfortsätze aufweisen (Liu et al., 2001), während sezerniertes Reelin eine extrazelluläre Konzentration um die Dendriten und Dornfortsätze kortikaler Pyramidzellen herum (Rodriguez et al., 2000) aufzeigt. Diese Beobachtungen weisen auf

eine Beteiligung von Reelin bei der Regulierung der neuronalen Plastizität und präsynaptischer Einflussnahme im ENS hin.

Sollte Reelin die synaptische Kommunikation im ENS beeinflussen, so wie es für Reelin im ZNS gezeigt werden konnte, könnte ein verändertes Reelin-System von pathogenetischer Bedeutung sein für intestinale Motilitätsstörungen, bei denen eine gestörte enterische Neurotransmission vorliegt. So zeigten sich beispielsweise an Ganzwandresektaten aus dem humanen Kolon signifikant veränderte mRNA Expressionsspiegel von Reelin bei Patienten mit Morbus Hirschsprung (Saeed et al., 2012). Der M. Hirschsprung ist eine kongenitale Fehlbildung des ENS. Charakterisiert ist diese Erkrankung durch das fehlende Einwandern der Neurone in der 6.-12. SSW, die später die beiden *Plexus myentericus* und *submucosus* bilden. Dies führt zu einer intestinalen Aganglionose mit funktioneller Stenose des betroffenen Darmabschnittes (Amiel and Lyonnet, 2001; Grünbaum, 1909).

5.8. Ausblick

Daten zu wesentlichen Funktionen und dem Verständnis des Reelin-Systems stammen bisher fast ausnahmslos aus dem ZNS. Mit dem in diesen Untersuchungen erbrachten Nachweis von Reelin und seinen Rezeptoren sowohl im humanen ENS als auch in enterischen Nervenzellkulturen ist die Grundlage dafür geschaffen, die durch Reelin vermittelten Funktionen und Effekte auch im peripheren ANS näher zu charakterisieren. Neben den physiologischen Aufgaben des Reelin-Systems im ENS des GIT sollte auch eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese von intestinalen Innervationsstörungen überprüft werden, die häufig zu schweren Einschränkungen der intestinalen Motilität führen können. Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass eine - z.B. pharmakologische - Beeinflussung des Reelin-Systems möglicherweise therapeutisch zu nutzen ist. So konnte bereits gezeigt werden, dass im ZNS Reelin bei der post-lesionalen Zellmigration von Bedeutung ist (Courtès et al., 2011), auf die LZF und die Neurotransmitterfreisetzung (Beffert et al., 2005; Hellwig et al., 2011; Weeber et al., 2002) Einfluss nehmen kann. Eine Supplementierung von Reelin führt darüber hinaus zur Wiedererlangung der Fähigkeit zum sensomotorischen „Gating“ und zu einer Verbesserung des assoziativen Lernens (Rogers et al., 2013). Diese für das ZNS gezeigten Eigenschaften könnten sich ggf. auch nutzen lassen für therapeutisch intendierte Anwendungen am ENS.

6. Zusammenfassung

Reelin ist ein sezerniertes Protein, das seine Signaltransduktion über die Rezeptoren VLDLR (Very low density-lipoprotein receptor) und Lrp8 (Low density lipoprotein receptor related protein 8) vermittelt. Diese wiederum binden an das Adapterprotein Dab1. Im zentralen Nervensystem koordiniert Reelin die Wanderung und Laminierung von neokortikalen Neuronen und reguliert die synaptische Plastizität. Pathologisch wurde Reelin bedeutsam, als nachgewiesen werden konnte, dass eine Reelin-Dysregulation mit vielen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen assoziiert ist. Somit spielt Reelin nicht nur in der Entstehung, sondern auch in der funktionellen Instandhaltung neuronaler Netzwerke eine zentrale Rolle.

Während die Bedeutung von Reelin im zentralen Nervensystem ausgiebig untersucht worden ist, liegen zur Expression und Funktion von Reelin im enterischen Nervensystem kaum Daten vor. Ziel dieser Arbeit war es daher, das Reelin-System im humanen enterischen Nervensystem hinsichtlich der Genexpression und Lokalisation zu charakterisieren, den Zeitverlauf der mRNA Expression des Reelin-Systems im Rattendarm zu beschreiben und die Modulation der Reelin-Expression durch den neurotrophen Faktor GDNF (Glial cell line derived neurotrophic factor) in kultivierten enterischen Neuronen der Ratte zu untersuchen.

Zunächst wurde die mRNA Expression von Reelin und dessen korrespondierenden Rezeptoren mittels qPCR in Ganzwandresektaten und separierten Darmwandschichten des humanen Kolons ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 in Ganzwandschnitten, Mucosa und Tunica muscularis nachweisbar war. Die höchsten mRNA-Spiegel waren in der Tunica muscularis detektierbar, die auch den Plexus myentericus beinhaltet und maßgeblich an der Vermittlung der Darmmotilität beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob das Reelin-System auch in myenterischen Ganglien des humanen Kolons nachweisbar ist, wurde die mRNA Expression von Reelin, dessen Rezeptoren und Dab1 nachfolgend in Laser-mikrodissezierten Ganglien des Plexus myentericus mittels qPCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im isolierten Gangliengewebe nachweisbar ist.

Um Aufschluss über die Lokalisation von Reelin im humanen Kolon zu erhalten, wurden immunohistochemische Färbungen durchgeführt. Reelin-immunreaktive Signale ließen sich sowohl in den Ganglien des Plexus myentericus und des Plexus submucosus als auch in den Nervenfasern der Ring- und Längsmuskulatur nachweisen. Eine Dual-Label-Immunohistochemie mit Reelin und dem pan-neuronalen Marker PGP 9.5 bestätigte, dass Reelin innerhalb des enterischen Nervensystems in neuronalen Somata und Fortsätzen lokalisiert ist. Um eine potenzielle Funktion von Reelin in der Regulation synaptischer Plastizität

des enterischen Nervensystems zu überprüfen, wurden Ko-Lokalisationsstudien von Reelin mit dem synaptischen Vesikelmarker Synaptophysin durchgeführt, welche zeigten, dass Reelin teilweise mit Synaptophysin ko-lokalisiert ist.

Der Zeitverlauf der Genexpression des Reelin-Systems im Rahmen der postnatalen Ontogenese wurde im Tiermodell untersucht. Dazu wurde die mRNA Expression von Reelin, VLDLR, Lrp8 und Dab1 im Dün- und Dickdarm der Ratte am Postnataltag 0 (P 0), P 3, P 6, P 21 und in adulten Tieren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass im Dünndarm die maximalen Expressionsspiegel für Reelin und Lrp8 an P 3 und die für VLDLR an P 6 detektierbar waren. Dab1 zeigte Expressionsmaxima an P 3 und im adulten Stadium. Im Kolon der Ratte war der Reelin mRNA Gehalt während der Ontogenese annähernd konstant, wogegen für VLDLR und Lrp8 die höchsten Spiegel in adulten Tieren und für Dab1 an P 3 gemessen wurden.

Um abschließend die Modulation der Reelin-Expression in enterischen Neuronen durch GDNF zu untersuchen, wurden kultivierte myenterische Neurone, die aus dem Dünndarm von Ratten des Postnataltages 2 gewonnen wurden, mit dem neurotrophen Faktor GDNF behandelt, der eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Differenzierung des enterischen Nervensystems spielt. Nachfolgend wurden die kultivierten Neurone einer Immunohistochemie für Reelin unterzogen. Die Ergebnisse zeigten, dass die GDNF-Behandlung eine konzentrationsabhängige Ausbildung von enterischen Nervengeflechten mit steigender Immunreaktivität für Reelin induzierte. Die Reelin-Immunreaktivität war im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen nicht nur auf neuronale Somata beschränkt, sondern erstreckte sich auch auf verzweigte neuronale Fortsätze.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass Reelin und dessen Rezeptoren VLDLR, Lrp8 und das intrazelluläre Adapterprotein Dab1 im enterischen Nervensystem ubiquitär exprimiert, durch neurotrophe Faktoren reguliert werden und möglicherweise eine Rolle für die neuronale Plastizität des enterischen Nervensystems spielen. Falls Reelin die synaptische Kommunikation im enterischen Nervensystem auf ähnliche Weise wie im zentralen Nervensystem beeinflusst, könnte eine veränderte Reelin-Signaltransduktion eine pathogenetische Bedeutung bei Störungen der enterischen Neurotransmission haben, die klinisch zu intestinalen Motilitätsstörungen führt.

7. Literaturverzeichnis

- Alcántara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., Soriano, E. (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J. Neurosci.* 18, 7779-7799
- Altman J and Das GD. (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207(5000), 953-956
- Amiel, J. and Lyonnet, S. (2001) Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J. Med. Genet.* 38, 729-739
- Andrade, N., Komnenovic, V., Blake, S.M., Jossin, Y., Howell, B., Goffinet, A., Schneider, W.J., Nimpf, J. (2007) ApoER2/VLDL receptor and Dab1 in the rostral migratory stream function in postnatal neuronal migration independently of Reelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8508-8513
- Anitha, M., Chandrasekharan, B., Salgado, J.R., Grouzmann, E., Mwangi, S., Sitaraman, S.V., Srinivasan, S. (2006) Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y. *Gastroenterology* 131, 1164-1178
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., Caroni, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809
- Ballif, B.A., Arnaud, L., Cooper, J.A. (2003) Tyrosine phosphorylation of disabled-1 is essential for reelin-stimulated activation of akt and src family kinases. *Mol. Brain. Res.* 117, 152-159
- Baumert, M., Maycox, P., Navone, F., De Camilli, P., Jahn, R. (1989) Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J.* 8(2), 379-384
- Bayliss, W.M. and Starling, E.H. (1899) The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* 24, 99-143
- Bayliss, W.M. and Starling, E.H. (1900) The movements and the innervation of the large intestine. *J. Physiol.* 26, 107-118
- Beffert, U., Durudas, A., Weeber, E.J., Stolt, P.C., Giehl, K.M., Sweatt, J.D., Hammer, R.E., Herz, J. Functional dissection of reelin signaling by site-directed disruption of disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 26, 2041-2052

- Beffert, U., Morfini, G., Bock, H.H., Reyna, H., Brady, S.T., Herz, J. (2002) Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase b/akt and glycogen synthase kinase 3 β . *J. Biol. Chem.* 277, 49958-49964
- Beffert, U., Weeber, E.J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J.D., Li, W.-P., Adelmann, G., Frotscher, M., Hammer, R.E., Herz, J. (2005) Modulation of synaptic plasticity and memory by reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor ApoER2. *Neuron* 47, 567-579
- Benhayon, D., Magdaleno, S., Curran, T. (2003) Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of disabled-1. *Mol. Brain. Res.* 112, 33-45
- Bennett, M.K., Garcia-Arrarás, J., Elferink, L.A., Peterson, K., Fleming, A.M., Hazuka, C.D., Scheller, R.H. (1993) The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74, 863-873
- Bock, H.H. and Herz, J. (2003) Reelin activates src family tyrosine kinases in neurons. *Curr. Biol.* 13, 18-26
- Bock, H.H., Jossin, Y., Liu, P., Förster, E., May, P., Goffinet, A.M., Herz, J. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to reelin signaling and is required for normal cortical lamination. *J. Biol. Chem.* 278, 38772-38779
- Boenisch, e.a. (2011) *Dako Handbuch Immunchemische Färbemethoden* pp. 30-31,
- Bornstein, J.C. (2009) Autonomic Nervous System: Gastrointestinal Control. in *Encyclopedia of Neuroscience* (Editor-in-Chief: Larry, R.S.), pp. 929-939, Oxford, Academic Press
- Borrell, V., Pujadas, L., Simó, S., Durà, D., Solé, M., Cooper, J.A., Del Río, J.A., Soriano, E. (2007) Reelin and mDab1 regulate the development of hippocampal connections. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 158-173
- Borrell, V.c., Del Río, J.A., Alcántara, S., Derer, M., Martínez, A., D’Arcangelo, G., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Derer, P., Curran, T., Soriano, E. (1999) Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *J. Neurosci.* 19, 1345-1358
- Brookes, S.J.H., Meedeniya A. C. B., Jobling P. (1997) Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J. Physiol.* 505.2, 473-491
- Brookes, S.J.H., Steele, P. A., Costa, M. . (1991) Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 42, 863-878

- Brosda, J., Dietz, F., Koch, M. (2011) Impairment of cognitive performance after reelin knockdown in the medial prefrontal cortex of pubertal or adult rats. *Neurobiol. Dis.* *44*, 239-247
- Bu, G. (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 333-344
- Burns, A.J. and Le Douarin, N.M. (1998) The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* *125*, 4335-4347
- Burnstock, G. (2008) Non-synaptic transmission at autonomic neuroeffector junctions. *Neurochem. Int.* *52*, 14-25
- Calakos, N. and Scheller, R.H. (1994) Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J. Biol. Chem.* *269*, 24534-24537
- Calhoun, M., Jucker, M., Martin, L., Thinakaran, G., Price, D., Mouton, P. (1996) Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J. Neurocytol.* *25*, 821-828
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* *56*, 337-344
- Campo, C.G., Sinagra, M., Verrier, D., Manzoni, O.J., Chavis, P. (2009) Reelin secreted by GABAergic neurons regulates glutamate receptor homeostasis. *PLoS ONE* *4*, e5505
- Caviness Jr, V.S. (1982) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: A developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Dev. Brain. Res.* *4*, 293-302
- Chai, X., Förster, E., Zhao, S., Bock, H.H., Frotscher, M. (2009a) Reelin acts as a stop signal for radially migrating neurons by inducing phosphorylation of n-cofilin at the leading edge. *Commun. Integr. Biol.* *2*, 375-377
- Chai, X., Förster, E., Zhao, S., Bock, H.H., Frotscher, M. (2009b) Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine 3. *J. Neurosci.* *29*, 288-299
- Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T.-S., Kavalali, E.T., Bezprozvanny, I., Herz, J. (2005) Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J. Neurosci.* *25*, 8209-8216

- Cooper, J.A. (2008) A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci.* 31, 113-119
- Corder, E., Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Small, G., Roses, A., Haines, J., Pericak-Vance, M. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261(5123), 921-923
- Costa, M., Brookes, S.J.H., Hennig, G.W. (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47, iv15-iv19
- Costa, M., Brookes, S.J.H., Steele, P.A. (1996) Neurochemical classification of myenteric Neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75, 949-967
- Costa, M., Furness, J. B. and Llewellyn-Smith, I. J. (1987) Histochemistry of the enteric nervous system. In: *Physiology of the gastrointestinal tract.*,
- Courtès, S., Vernerey, J., Pujadas, L., Magalon, K., Cremer, H., Soriano, E., Durbec, P., Cayre, M. (2011) Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS ONE* 6, e20430
- Cremer, C., Lübke, J.R., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K. (2011) Laminar distribution of neurotransmitter receptors in different reeler mouse brain regions. *Brain Struct Funct* 216, 201-218
- D'Arcangelo, G., G. Miao, G., Chen, S.-C., Scares, H.D., Morgan, J.I., Curran, T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719-723
- D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., Curran, T. (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471-479
- 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. *J. Neurosci.* 17, 23-31
- Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., Soriano, E. (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385, 70-74
- DeSilva, U., D'Arcangelo, G., Braden, V.V., Chen, J., Miao, G.G., Curran, T., Green, E.D. (1997) The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. *Genome Res.* 7, 157-164

- Doran JF, Jackson P, Kynoch PA, RJ., T. (1983) Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J. Neurochem.* *40*, 1542-1547
- Drakew, A., Frotscher, M., Deller, T., Ogawa, M., Heimrich, B. (1997) Developmental distribution of a reeler gene-related antigen in the rat hippocampal formation visualized by CR-50 immunocytochemistry. *Neuroscience* *82*, 1079-1086
- Durbec, P., Marcos-Gutierrez, C.V., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiovaara, K., Suvanto, P., Smith, D., Ponder, B., Costantini, F., Saarma, M., Sariola, H., Pachnis, V. (1996) GDNF signalling through the ret receptor tyrosine kinase. *Nature* *381*, 789-793
- Edelman, L., Hanson P I, Chapman, E., Jahn, R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* *14*, 224-231
- Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R.O., Snider, W.D., Johnson Jr, E.M., Milbrandt, J. (1998) GFR α 1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* *21*, 317-324
- Falconer, D. (1951) Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological actions in the house mouse (&i&t;Mus musculus L.). *J. Genet.* *50*, 192-205
- Farrer, M.J. (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 306-318
- Fatemi, S.H., Kroll, J.L., Stary, J.M. (2001) Altered levels of reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport* *12*, 3209-3215
- Folsom, T.D. and Fatemi, S.H. (2013) The involvement of reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* *68*, 122-135
- Förster, E., Bock, H.H., Herz, J., Chai, X., Frotscher, M., Zhao, S. (2010) Emerging topics in reelin function. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 1511-1518
- Förster, E., Tielsch, A., Saum, B., Weiss, K.H., Johanssen, C., Graus-Porta, D., Müller, U., Frotscher, M. (2002) Reelin, disabled 1, and β 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 13178-13183
- Forster, E., Zhao, S., Frotscher, M. (2006) Laminating the hippocampus. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 259-268
- Frieling, T. (1993) The enteric nervous system as the "little brain" of the gastrointestinal tract. *Z. Gastroenterol.* *31*,

- Frotscher, M. (1998) Cajal-Retzius cells, reelin, and the formation of layers. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 570-575
- Frotscher, M. (2010) Role for reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends Neurosci.* 33, 407-414
- Frotscher, M., Haas, C.A., Förster, E. (2003) Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb. Cortex.* 13, 634-640
- Furness, J.B. and Costa, M. (1987) *The enteric nervous system*, Edinburgh: Churchill Livingstone
- Furness, J.B., Kunze, W.A.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., Bornstein, J.C. (1998) Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54, 1-18
- Gianino, S., Grider, J.R., Cresswell, J., Enomoto, H., Heuckeroth, R.O. (2003) GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development* 130, 2187-2198
- 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. *Pharmacol. Ther.* 111, 272-286
- Grünbaum, O. (1909) Hirschsprung's disease. *Proc. R. Soc. Med.* 2, 132-134
- Guidotti A, J., A., M., D.J. (2000) Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (gad67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: A postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 1061-1069
- Gunn, M. (1968) Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *J. Anat.* 102, 223-239
- Haas, C. and Frotscher, M. (2010) Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Exp. Brain. Res.* 200, 141-149
- Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., Cremer, H. (2002) Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 5, 939-945
- Hack, I., Hellwig, S., Junghans, D., Brunne, B., Bock, H.H., Zhao, S., Frotscher, M. (2007) Divergent roles of ApoER2 and VLDLR in the migration of cortical neurons. *Development* 134, 3883-3891

- Hartfuss, E., Förster, E., Bock, H.H., Hack, M.A., Leprince, P., Luque, J.M., Herz, J., Frotscher, M., Götz, M. (2003) Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* 130, 4597-4609
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M.R., Bartley, C.M., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Šestan, N., Rakic, P. (2008) Interaction between reelin and notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60, 273-284
- Heinrich, C., Nitta, N., Flubacher, A., Müller, M., Fahrner, A., Kirsch, M., Freiman, T., Suzuki, F., Depaulis, A., Frotscher, M., Haas, C.A. (2006) Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 4701-4713
- Hellwig, S., Hack, I., Kowalski, J., Brunne, B., Jarowyj, J., Unger, A., Bock, H.H., Junghans, D., Frotscher, M. (2011) Role for reelin in neurotransmitter release. *J. Neurosci.* 31, 2352-2360
- Hellwig, S., Hack, I., Zucker, B., Brunne, B., Junghans, D. (2012) Reelin together with ApoER2 regulates interneuron migration in the olfactory bulb. *PLoS ONE* 7, e50646
- Herz, J. (2009) Apolipoprotein E receptors in the nervous system. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 190-196
- Herz, J. and Chen, Y. (2006) Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 850-859
- Heuckeroth, R.O., Lampe, P.A., Johnson Jr, E.M., Milbrandt, J. (1998) Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev. Biol.* 200, 116-129
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., Herz, J. (1999) Direct binding of reelin to VLDL receptor and apoe receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481-489
- Hirst, G.D.S., Garcia-Londoño, A.P., Edwards, F.R. (2006) Propagation of slow waves in the guinea-pig gastric antrum. *J. Physiol.* 571, 165-177
- Hirst, G.D.S. and Suzuki, H. (2006) Involvement of interstitial cells of Cajal in the control of smooth muscle excitability. *J. Physiol.* 576, 651-652
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500-544

- Holland, e.a. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing 5' to 3' exonuclease activity of thermus aquaticus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7276-7280
- Hong, S.E., Shugart, Yin Yao, Huang, David T., Al Shahwan, Saad P., Grant, Ellen, O'B. Hourihane, Jonathan, Martin Neil D.T. & Walsh, Christopher A. (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* 26, 93-96
- Howell, B.W., Gertler, F.B., Cooper, J.A. (1997a) Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J.* 16, 121-132
- Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P., Cooper, J.A. (1997b) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389, 733-737
- Howell, B.W., Herrick, T.M., Hildebrand, J.D., Zhang, Y., Cooper, J.A. (2000) Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr. Biol.* 10, 877-885
- Huizinga, J.D., Martz, S., Gil, V., Wang, X.-Y., Jimenez, M., Parsons, S. (2011) Two independent networks of interstitial cells of Cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. *Front. Neurosci.* 5,
- Ichihara, H., Jingami, H., Toh, H. (2001) Three novel repetitive units of reelin. *Mol. Brain. Res.* 97, 190-193
- Ignatova, N., Sindic, C.J.M., Goffinet, A.M. (2004) Characterization of the various forms of the reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. *Neurobiol. Dis.* 15, 326-330
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C., Greengard, P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4137-4141
- Jiang, Y., Liu, M.-t., Gershon, M.D. (2003) Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev. Biol.* 258, 364-384
- Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J.-C., Hu, S., Altmann, B.W., Fox, G.M. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113-1124
- Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, A.M. (2004) The central fragment of reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J. Neurosci.* 24, 514-521

- Karayannis, T., De Marco Garcia, N.V., Fishell, G.J. (2012) Functional adaptation of cortical interneurons to attenuated activity is subtype-specific. *Front. Neural. Circuits.* 6,
- Kim, D.-H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H.-J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S., Yamamoto, T. (1996) Human apolipoprotein E receptor 2: a novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain *J. Biol. Chem.* 271, 8373-8380
- Klar, A., Baldassare, M., Jessell, T.M. (1992) F-spondin: A gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell* 69, 95-110
- Kocherhans, S., Madhusudan, A., Doehner, J., Breu, K.S., Nitsch, R.M., Fritschy, J.-M., Knuesel, I. (2010) Reduced reelin expression accelerates amyloid- β plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* 30, 9228-9240
- Kuhn, H., Dickinson-Anson, H., Gage, F. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033
- Lacor, P.N., Grayson, D.R., Auta, J., Sugaya, I., Costa, E., Guidotti, A. (2000) Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3556-3561
- 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. *Exp. Neurol.* 156, 214-217
- Landrieu, P. and Goffinet, A. (1981) Inverted pyramidal neurons and their axons in the neocortex of reeler mutant mice. *Cell Tissue Res.* 218 (2), 293-301
- Langley, J.N. (1921) *The autonomous nervous system, Part 1*, Cambridge: Helfer, W. and sons
- Larouche, M., Beffert, U., Herz, J., Hawkes, R. (2008) The reelin Receptors ApoER2 and VLDLR coordinate the patterning of Purkinje cell Topography in the developing mouse cerebellum. *PLoS ONE* 3, e1653
- Le Douarin, N.M. and Teillet, M.-A.M. (1974) Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev. Biol.* 41, 162-184

- Le Douarin, N.M., Teillet, M.A. (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30, 31-48
- Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl. Acids. Res.* 21, 3761-3766
- Lin, L., Doherty, D., Lile, J., Bektesh, S., Collins, F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132
- Liu, W.S., Pesold, C., Rodriguez, M.A., Carboni, G., Auta, J., Lacor, P., Larson, J., Condie, B.G., Guidotti, A., Costa, E. (2001) Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3477-3482
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., Lansbury, P.T. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect \pm -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111, 209-218
- Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, KD., W. (1990) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J. Pathol.* 161, 153-160
- Lugli, G., Krueger, J., Davis, J., Persico, A., Keller, F., Smalheiser, N. (2003) Methodological factors influencing measurement and processing of plasma reelin in humans. *BMC Biochem* 4, 1-13
- Lüllmann-Rauch, R. (2003) Taschenbuch Histologie. Thieme,
- Luo, J., Megee, S., Rathi, R., Dobrinski, I. (2006) Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: Application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1531-1540
- MacLaurin, S.A., Krucker, T., Fish, K.N. (2007) Hippocampal dendritic arbor growth in vitro: Regulation by reelin–disabled-1 signaling. *Brain Res.* 1172, 1-9
- Mariani, J. (1982) Extent of multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the olivocerebellar system of weaver, reeler, and staggerer mutant mice. *J. Neurobiol.* 13(2), 119-126
- Mariani, J., Crepel, F., Mikoshiba, K., Changeux, J.P., Sotelo, C. (1977) Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from reeler mutant mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 281, 1-28

- Martínez-Cerdeño, V., Galazo, M.J., Clascá, F. (2003) Reelin-immunoreactive neurons, axons, and neuropil in the adult ferret brain: Evidence for axonal secretion of reelin in long axonal pathways. *J. Comp. Neurol.* 463, 92-116
- Marzolo, M.-P. and Bu, G. (2009) Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 20, 191-200
- McConalogue, K. and Furness, J.B. (1994) Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillière's Clin. Endocrinol. Metab.* 8 (1), 51-76
- McMahon, H.T., Bolshakov, V.Y., Janz, R., Hammer, R.E., Siegelbaum, S.A., Südhof, T.C. (1996) Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4760-4764
- Miyata, T., Ono, Y., Okamoto, M., Masaoka, M., Sakakibara, A., Kawaguchi, A., Hashimoto, M., Ogawa, M. (2010) Migration, early axonogenesis, and reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural Dev.* 5, 23
- Moore, M.W., Klein, R.D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L.F., Ryan, A.M., Carver-Moore, K., Rosenthal, A. (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76-79
- Myant, N.B. (2010) Reelin and apolipoprotein E receptor 2 in the embryonic and mature brain: effects of an evolutionary change in the ApoER2 gene. *Proc. Biol. Sci.* 277, 345-351
- Nakajima, K., Mikoshiba, K., Miyata, T., Kudo, C., Ogawa, M. (1997) Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAb against reelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8196-8201
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., D'Arcangelo, G. (2004) Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* 41, 71-84
- Niu, S., Yabut, O., D'Arcangelo, G. (2008) The reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 28, 10339-10348
- Nogi, T., Yasui, N., Hattori, M., Iwasaki, K., Takagi, J. (2006) Structure of a signaling-competent reelin fragment revealed by x-ray crystallography and electron tomography. *EMBO J.* 25, 3675-3683

- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajimat, K., Yagy, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., Mikoshibat, K. (1995) The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899-912
- Ohkubo, K. (1936) Studies on the intrinsic nervous system of the digestive tract. I. The submucous plexus of guinea pig. *Jpn. J. Med. Sci. Anat.* 6, 1-20
- Olson, E.C., Kim, S., Walsh, C.A. (2006) Impaired neuronal positioning and dendritogenesis in the neocortex after cell-autonomous Dab1 suppression. *J. Neurosci.* 26, 1767-1775
- Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E., Wilson, M.C. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell. Biol.* 109, 3039-3052
- Pappas, G.D., Kriho, V., Pesold, C. (2002) Reelin in the extracellular matrix and dendritic spines of the cortex and hippocampus: a comparison between wild type and heterozygous <i>reeler</i> mice by immunoelectron microscopy. *J. Neurocytol.* 30, 413-425
- 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 γ -aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3221-3226
- Pesold, C., Liu, W.S., Guidotti, A., Costa, E., Caruncho, H.J. (1999) Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3217-3222
- Poirier, J. (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease a role in amyloid catabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 924, 81-90
- Poluch, S. and Juliano, S.L. (2007) A normal radial glial scaffold is necessary for migration of interneurons during neocortical development. *Glia* 55, 822-830
- Pomeranz, H.D. and Gershon, M.D. (1990) Colonization of the avian hindgut by cells derived from the sacral neural crest. *Dev. Biol.* 137, 378-394
- Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, C.M., Rossi, D., de Lecea, L., Martínez, A., Delgado-García, J.M., Soriano, E. (2010) Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30, 4636-4649

- Quattrocchi, C.C., Wannenes, F., Persico, A.M., Ciafré, S.A., D'Arcangelo, G., Farace, M.G., Keller, F. (2002) Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 277, 303-309
- Rakic, P. and Caviness Jr, V.S. (1995) Cortical development: View from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14, 1101-1104
- Rode J, Dhillon AP, Doran JF, Jackson P, RJ., T. (1985) PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology* 9, 147-158
- Rodriguez, M.A., Pesold, C., Liu, W.S., Kriho, V., Guidotti, A., Pappas, G.D., Costa, E. (2000) Colocalization of integrin receptors and reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3550-3555
- Rogers, J.T., Rusiana, I., Trotter, J., Zhao, L., Donaldson, E., Pak, D.T.S., Babus, L.W., Peters, M., Banko, J.L., Chavis, P., Rebeck, G.W., Hoe, H.-S., Weeber, E.J. (2011) Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density. *Learn. Mem.* 18, 558-564
- Rogers, J.T., Zhao, L., Trotter, J.H., Rusiana, I., Peters, M.M., Li, Q., Donaldson, E., Banko, J.L., Keenoy, K.E., Rebeck, G.W., Hoe, H.-S., D'Arcangelo, G., Weeber, E.J. (2013) Reelin supplementation recovers sensorimotor gating, synaptic plasticity and associative learning deficits in the heterozygous reeler mouse. *J. Psychopharmacol.* 27, 386-395
- Saeed, A., Barreto, L., Neogii, S.G., Loos, A., McFarlane, I., Aslam, A. (2012) Identification of novel genes in Hirschsprung disease pathway using whole genome expression study. *J. Pediatr. Surg.* 47, 303-307
- Sanada, K., Gupta, A., Tsai, L.-H. (2004) Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron* 42, 197-211
- Scheuermann D. W. und Stach, W. (1984) Fluorescence microscopic study of the architecture and structure of an adrenergic network in the plexus myentericus (Auerbach), plexus submucosus externus (Schabadasch) and plexus submucosus internus (Meissner) of the porcine small intestine. *Acta Anat. (Basel)* 119 (1), 49-59
- Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F., Leube, R.E. (2009) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162, 234-243

- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., Pachnis, V. (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor *ret*. *Nature* 367, 380-383
- Šestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., Rakic, P. (1999) Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286, 741-746
- Setsuie, R., Wang, Y.-L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.-J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., Wada, K. (2007) Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int.* 50, 119-129
- Sherrington, C.S. (1906) *The integrative Action of the Nervous System*. New Haven Yale University Press MDCCCCVI,
- Snoek, S.A., Verstege, M.I., Boeckxstaens, G.E., van den Wijngaard, R.M., de Jonge, W.J. (2010) The enteric nervous system as a regulator of intestinal epithelial barrier function in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 637-651
- Stanfield, B.B., Caviness, V.S., Cowan, W.M. (1979) The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.* 185, 461-483
- Steele, P., Brookes, S., Costa, M. . (1991) Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 45, 227-239
- Stranahan, A.M., Salas-Vega, S., Jiam, N.T., Gallagher, M. (2011) Interference with reelin signaling in the lateral entorhinal cortex impairs spatial memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 150-155
- Strickland, D.K., Gonias, S.L., Argraves, W.S. (2002) Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends in Endocrinol. Metab.* 13, 66-74
- Südhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509-547
- Südhof, T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. *Nature* 375, 645-653
- Suprenant, A. (1994) Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 117-140
- Teixeira, C.M., Kron, M.M., Masachs, N., Zhang, H., Lagace, D.C., Martinez, A., Reillo, I., Duan, X., Bosch, C., Pujadas, L., Brunso, L., Song, H., Eisch, A.J., Borrell, V., Howell,

- B.W., Parent, J.M., Soriano, E. (2012) Cell-autonomous inactivation of the reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus. *J. Neurosci.* 32, 12051-12065
- Teixeira, C.M., Martin, E.D., Sahun, I., Masachs, N., Pujadas, L., Corvelo, A., Bosch, C., Rossi, D., Martinez, A., Maldonado, R., Dierssen, M., Soriano, E. (2011) Overexpression of reelin prevents the manifestation of behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 36, 2395-2405
- Thompson, R.J., Doran, J.F., Jackson, P., Dhillon, A.P., Rode, J. (1983) PGP 9.5-a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res.* 278, 224-228
- Thuneberg, L. (1982) Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, 1-130
- Tinnes, S. (2009) Untersuchungen zur Sekretion und proteolytischen Prozessierung von Reelin in organotypischen Schnittkulturen des Nagerhippocampus^{eds}, *Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Br.*
- Tissir, F. and Goffinet, A.M. (2003) Reelin and brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 496-505
- Torrey, E.F., Barci, B.M., Webster, M.J., Bartko, J.J., Meador-Woodruff, J.H., Knable, M.B. (2005) Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol. Psychiatry* 57, 252-260
- Treanor, J.J.S., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D.M., Poulsen, K.T., Beck, C.D., Gray, C., Armanini, M.P., Pollock, R.A., Hefti, F., Phillips, H.S., Goddard, A., Moore, M.W., Buj-Bello, A., Davies, A.M., Asai, N., Takahashi, M., Vandlen, R., Henderson, C.E., Rosenthal, A. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382, 80-83
- Trimble, W.S., Cowan, D.M., Scheller, R.H. (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4538-4542
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Herz, J. (1999) Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689-701
- Trotter, J., Lee, G.H., Kazdoba, T.M., Crowell, B., Domogauer, J., Mahoney, H.M., Franco, S.J., Müller, U., Weeber, E.J., D'Arcangelo, G. (2013) Dab1 is required for synaptic plasticity and associative learning. *J. Neurosci.* 33, 15652-15668

- Utsunomiya-Tate, N., Kubo, K.-i., Tate, S.-i., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 9729-9734
- Ventrucci, A., Kazdoba, T.M., Niu, S., D'Arcangelo, G. (2011) Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain. *Neuroscience* *189*, 32-42
- Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J.M., Förster, E., Sweatt, J.D., Herz, J. (2002) Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol. Chem.* *277*, 39944-39952
- Wiedenmann, B. and Franke, W.W. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* *41*, 1017-1028
- Wilkinson, K., Deshpande, S., Larsen, C. (1992) Comparisons of neuronal (PGP 9.5) and non-neuronal ubiquitin c-terminal hydrolases. *Biochem. Soc. Trans.* *20*, 631-637
- Wilson, P.O., Barber, P.C., Hamid, Q.A., Power, B.F., Dhillon, A.P., Rode, J., Day, I., Thompson, R., Polak, J. (1988) The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. *Br. J. Exp. Pathol.* *69*, 91-104
- Wood, J.D. (2004) Autonomic Innervation. in *Encyclopedia of Gastroenterology* (Editor-in-Chief: Johnson, L.), pp. 126-130, New York, Elsevier
- Wood, J.D. (1999) Enteric nervous control of motility in the upper gastrointestinal tract in defensive states. *Dig. Dis. Sci.* *44*, 44-52
- Yabut, O., Renfro, A., Niu, S., Swann, J.W., Marín, O., D'Arcangelo, G. (2007) Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. *Brain Res.* *1140*, 75-83
- Yip, Y.P., Kronstadt-O'Brien, P., Capriotti, C., Cooper, J.A., Yip, J.W. (2007) Migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord is regulated by reelin-dependent Dab1 tyrosine phosphorylation and CrkL. *J. Comp. Neurol.* *502*, 635-643
- Yokota, Y., Ghashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J., Anton, E.S. (2007) Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS ONE* *2*, e794

Zhao, S. and Frotscher, M. (2010) Go or stop? Divergent roles of reelin in radial neuronal migration. *Neuroscientist* 16, 421-434

8. Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die durch ihre vielfältigen und unterschiedlichsten Einflüsse zum Gelingen und zur Vollendung dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei PD Dr. rer. nat. Martina Böttner bedanken, die mir nicht nur das Thema dieser Arbeit zur Verfügung stellte, sondern auch eine großartige Doktor-Mutter war.

Prof. Dr. med. Thilo Wedel, dem Leiter dieser Arbeitsgruppe, danke ich für die Bereitstellung der Gerätschaften und Materialien und für den geduldigen letzten Feinschliff dieser Arbeit. Zusätzlich danke ich ihm und der gesamten Arbeitsgruppe Wedel/Böttner für die fachlichen Anregungen und die herausragende Betreuung beim Entstehen und Verfassen dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. rer. nat. Martina Barrenschee, die mir die Welt des wissenschaftlichen Verfassens näher brachte und stets Zeit fand für meine Fragen und Belange, so banal sie auch sein mochten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Karin Stengel, Inka Geurink, Miriam Lemmer und Bettina Facompré für die fachliche Unterstützung und die praktische Ausbildung, die ich erfahren durfte.

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Michael Schünke möchte ich danken, weil er den Stein ins Rollen brachte und den Anfang dieses Prozesses darstellt.

Danke an Pariya Ghorbani für die abschließende Fehlersuche und vielen Dank an Babak Ghorbani für die Hilfe in unzähligen IT-Belangen - er hatte es nicht leicht.

Meiner Familie, meinen Geschwistern Babak und Pariya und vor allem meinen Eltern Parvin und Reza bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Jahre der Unterstützung und des Zuspruchs.

Zu guter Letzt vielen Dank an meine Freunde für die Geduld und das Verständnis.

9. Lebenslauf

Puya Ghorbani Fidkouhi

21.09.1983

geboren in Ahwaz, Iran

Schulbildung

1990-1994

St. Andreas Grundschule, Velen

1994-2003

Privates altsprachiges und neusprachiges
Gymnasium der Marianhiller Missionare,
Maria Veen

2000-2001

Academic Magnet High School, South Caro-
lina, USA

Berufsausbildung

2003-2006

Ausbildung zur Gesundheits-und Kranken-
pflegerin, Ev. Krankenhaus Weyertal, Köln

Hochschulbildung

2008-2014

Studium der Humanmedizin an der Christi-
an- Albrechts- Universität zu Kiel

25.08.2010

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

30.10.2014

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Poster:

Ghorbani, P., Egberts, J-H., Becker, T., Wedel, T., Böttner, M., First Evidence of site-specific gene expression of the Reelin system in the human enteric nervous system. 28. Arbeitsta-
gung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 28.09.-30.09.2011

Originalarbeit:

Böttner, M., Ghorbani, P., Harde, J., Barrenschee, M., Hellwig, I., Vogel, I., Ebsen, M., För-
ster, E., Wedel, T., (2014). Expression and regulation of reelin and its receptors in the enteric
nervous system. Molecular and Cellular Neuroscience, 61: 23–33.

(Impact-Faktor: 3,8)