

Das hämatopoetische Adapterprotein ADAP in neuronalen Zellen
und seine Rolle beim Neuritenwachstum hippokampaler Neurone

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom Biologin Marlen Thiery
geb. am 15.08.1981 in Greifswald

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Stork
Prof. Dr. rer. nat. Roland Bender

eingereicht am: 20.06.2017

verteidigt am: 07.12.2017

-Für Frederik Emil-

Zusammenfassung

Die Funktion des Hippokampus ist assoziiert mit dem Lernen und der Gedächtnisbildung. Patienten mit neuropsychiatrischen Störungen, wie Epilepsie, Depression und Schizophrenie, weisen Veränderung im Hippokampus auf. Einige dieser Veränderungen sind auf Schädigungen während der hippokampalen Entwicklung zurückzuführen. Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion beeinflusst nicht nur die Migration sondern auch die Differenzierung der Neurone während der Entwicklung. Integrine wirken in Neuronen sowohl auf das Neuritenlängenwachstum als auch auf die Verzweigungen der Neuriten ein. Ähnlich wie in den Zellen des hämatopoetischen Systems können Integrine durch den *inside-out*-Signalweg aktiviert werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss des hämatopoetischen Adapterproteins ADAP (*adhesion and degranulation promoting adaptor protein*) während des Wachstums und der Differenzierung von hippokampalen Neuronen untersucht werden. Lokalisationsstudien in dissoziierten hippokampalen Neuronen zeigen eine Expression von ADAP sowohl in den Wachstumskegeln von Neuriten als auch in den Axonen und Dendriten. Mit Fortschreiten der Entwicklung ist ADAP auch in den Synapsen zu finden. Im adulten Hippokampus ist ADAP sowohl im *Gyrus dentatus* als auch im ammonischen Horn exprimiert.

In T-Zellen kommt ADAP in einem Komplex mit SKAP-HOM (*src-transducing kinase-associated phosphoprotein-homolog*), RAPL (*Rap1 effector protein*) und MST1 (*hippo kinase macrophage-stimulating 1*) vor, der involviert ist in die *inside-out* Aktivierung von Integrinen. Ein Knock-down der ADAP-Expression reduziert die Aktivierung von β 1-Integrin in den Dendriten und führt zu einer verminderten neuronalen Differenzierung. Die ADAP-reduzierten Neurone zeigen ein reduziertes Dendritenwachstum und eine verminderte Expression des Dendritenmarkers MAP2. Die Daten aus der Primärkultur zeigen, dass ADAP an der Integrin-vermittelten neuronalen Differenzierung beteiligt sein könnte.

Anatomische Untersuchungen des adulten Hippokampus von ADAP-Knock-out-Mäusen weisen in der Übersicht keine Veränderungen der Cytoarchitektur auf. Die Timm-Färbung zeigt ein schmaleres suprapyramidales Band in der CA2-Region und eine erhöhte Intensität des intra/infrapyramidalen Bandes. Expressionsanalysen von ADAP nach der Furchtkonditionierung zeigen, dass ADAP während der Gedächtnisbildung dynamisch

Zusammenfassung

reguliert wird. Nach der Furchtkonditionierung zeigen ADAP-Mutanten ein verringertes Erstarren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dieser Effekt wird durch ein *spaced* Training wieder aufgehoben. Die ADAP^{-/-}-Mäuse zeigen nach der Furchtkonditionierung eine Erhöhung von p65 im Nucleus sowie eine erhöhte Phosphorylierung der *Focal adhesion kinase* (FAK) im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* scheint ADAP in das Neuritenwachstum involviert zu sein. Die Primärkultur gibt einen ersten Hinweis, dass das Neuritenwachstum über den Integrin-vermittelten Signalweg durch ADAP reguliert wird. In weiteren *in vivo*-Studien muss gezeigt werden, ob ADAP das Neuritenwachstum über den Integrin-vermittelten Signalweg reguliert.

Summary

The hippocampus is functionally associated with learning and memory. Anatomical abnormalities in the hippocampus are observed in patients with epilepsy, schizophrenia and depression. Some of the changes are associated with a defective hippocampal development. Integrin-mediated cell adhesion is required for migration and differentiation of neurons during development. In neurons integrins are involved in neurite outgrowth and neurite branching. This study investigated the role of the hematopoietic adaptor protein ADAP during the differentiation of hippocampal neurons. In dissociated hippocampal neurons ADAP is localized in growth cones axons and dendrites. Later in development ADAP is localized in synapses. In the adult hippocampus ADAP is expressed in granular, pyramidal cells and some interneurons.

In T cells ADAP occurs in a complex with another adaptor protein like SKAP-HOM (*src - transducing kinase associated phosphoprotein-homolog*), RAPL (*Rap1 effector protein*) and MST1 (*hippo kinase macrophage-stimulating 1*) and is critically involved in inside-out activation of integrins. ADAP knock down leads to a reduced activation of β 1-integrin in the dendrites and a reduced differentiation. ADAP-reduced neurons show a reduction in dendritic growth and a reduced expression of the dendritic specific protein MAP2. These findings suggest that ADAP is involved in the integrin-mediated differentiation of hippocampal neurons.

Anatomical studies of the adult hippocampus using Nissl staining show no abnormalities in the hippocampal formation. A Timm staining shows a reduction of thickness in the CA2 region of the suprapyramidal band. The infra/intrapyrarnidal band shows an increased intensity. Expression analyses after fear conditioning reveal that ADAP is dynamically regulated during memory formation. ADAP mutants show a reduced freezing in a fear conditioning paradigm which could be rescued with a spaced training.

After fear conditioning p65 is increased in the nucleus of ADAP deficient mice and the phosphorylation of FAK (*focal adhesion kinase*) is higher in comparison to wildtype mice. Both *in vitro* as *in vivo* ADAP is involved in regulation of neurite outgrowth.

First evidences of primary culture suggest that ADAP regulates the neurite outgrowth via integrin- mediated pathway. *In vivo* the mechanism is so far unclear and needs further investigations.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Summary	5
Abbildungsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	14
1. Einleitung	18
1.1 Die Entwicklung des Hippokampus	18
1.2 Das Zelladhäsionsmolekül Integrin	23
1.2.1 Die Bedeutung der Integrine im Nervensystem	23
1.2.2 Die Regulation der Aktivierung der Integrine	26
1.3 Das hämatopoetische Adapterprotein ADAP	30
1.3.1 Die funktionelle Bedeutung von ADAP im Immunsystem	30
1.3.2 Integrinaktivierung durch ADAP	34
1.3.3 NF- κ B-Aktivierung durch ADAP in T-Zellen	35
1.3.4 Die Tyrosinproteinkinase Fyn.....	36
1.4 Zielstellung.....	38
2. Material und Methoden.....	39
2.1 Material und Geräte	39
2.2 Methoden	39
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	39
2.2.1.1 Hippokampale Primärkultur.....	39
2.2.1.1.1 Poly-D-Lysin-Beschichtung.....	39
2.2.1.1.2 Herstellung und Kultivierung von hippokampalen Primärkulturen.....	40
2.2.1.1.3 Transfektion hippokampaler Primärkulturen	40
2.2.1.1.4 Sholl-Analyse.....	41
2.2.1.1.5 Luciferase-Reporterstudie	41
2.2.1.1.6 Beta1-Integrin-Expression und Aktivierung	42
2.2.1.1.7 In-Cell Western™.....	43
2.2.2 Immortalisierte Zellkulturen	44
2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von HEK-293T-Zellen	44
2.2.2.2 Kultivierung von HEK-293T-Zellen.....	44
2.3 Immunhistologische/ Immuncytochemische Methoden.....	44
2.3.1 Immuncytochemie	44
2.3.2 Immunhistochemische Färbungen	45
2.3.2.1 Herstellung von hippokampalen Gewebeschnitten	45

Inhaltsverzeichnis

2.3.3 Timm-Färbung.....	47
2.3.4 DAB-Färbung.....	49
2.3.5 Nissl-Färbung.....	50
2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Hippokampuschnitten.....	51
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	51
2.4.1 Plasmidpräparation.....	51
2.4.2 Konstrukte.....	52
2.4.3 Reverse Transkription.....	53
2.4.4 Quantitative PCR.....	53
2.4.5 Zellyse.....	54
2.4.6 Nukleäre Fraktionierung.....	55
2.4.7 Proteinbestimmung.....	57
2.4.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.4.9 Western Blot / Immunoblot.....	59
2.4.10 Immunologische Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine.....	60
2.5 Tierexperimentelle Methoden.....	61
2.5.1 Mäusestämme.....	61
2.5.2 Furchtkonditionierung.....	61
2.5.2.1 Die auditorische Furchtkonditionierung.....	61
2.5.2.2 Das <i>spaced</i> -Training.....	62
2.5.3 Der Offenfeldtest.....	63
2.6 Statistik.....	64
3. Ergebnisse.....	65
3.1 Ergebnisse der Primärkultur.....	65
3.1.1 ADAP wird im Hippokampus exprimiert.....	65
3.1.2 Lokalisation von ADAP in der frühen hippokampalen Primärkultur.....	67
3.1.3 ADAP-mRNA-Expression in der hippokampalen Primärkultur.....	69
3.1.4 ADAP-abhängige β 1- Aktivierung.....	70
3.1.5 ADAP fördert das Neuritenwachstum.....	73
3.1.6 Quantitative Bestimmung der β 1-Integrin-mRNA-Expression.....	74
3.1.7 ADAP-Knock-down reduziert die Immunreaktivität des Dendritenmarkers MAP2.....	76
3.1.8 NF- κ B Expression in der hippokampalen Primärkultur.....	78
3. 2 Analyse von ADAP-Mutanten.....	80
3.2.1 Histologische Analyse der ADAP-Mutanten.....	80
3.3.1 Verhaltenstest.....	82
3.3.1.1 Die Expression von ADAP nach der Furchtkonditionierung.....	82

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.2 Kontextuelle Furchtkonditionierung.....	84
3.3.1.3 <i>Spaced</i> -Training.....	86
3.3.1.4 Das Offenfeld	87
3.3.2 ADAP-abhängige Integrinaktivierung nach der Furchtkonditionierung.....	88
3.3.3 ADAP-abhängige NMDA-Rezeptoraktivierung nach der Furchtkonditionierung.....	89
3.4. ADAP und der NF- κ B-Signalweg.....	90
3.4.1 NF- κ B-Aktivierung in ADAP-Mutanten nach der Furchtkonditionierung.....	90
3.4.2 Expression von IKK α und IKK β nach der Furchtkonditionierung	93
4. Diskussion	95
4.1.1 Der ADAP-SKAP-HOM-Komplex	95
4.1.2 ADAP beeinflusst die β 1-Integrin-Aktivierung in den Dendriten	96
4.1.3 ADAP-knock-down reduziert die MAP2-Expression in sich entwickelnden Neuronen.....	98
4.1.4 ADAP beeinflusst die NF- κ B-Aktivität	99
4.2.1 ADAP im adulten Hippokampus.....	101
4.2.2 Die funktionelle Relevanz von ADAP <i>in vivo</i>	102
4.2.3 ADAP ist nicht an der Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren beteiligt.....	106
4.3. Ausblick	106
Referenzen.....	109
Anhang.....	122
Anhang I.....	122
Geräte	122
Verbrauchsmaterial	123
Chemikalien	124
Anhang II.....	130
Anhang III.....	132

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Der sich entwickelnde Hippokampus nach Altman & Bayer⁷, Belvindrah *et al.*⁸ und Khalaf-Nazzal⁹: Die Radialgliazellen (grau) mit ihren Somata in der ventrikulären Zone und ihren langen Fortsätzen, die bis in die Marginalzone reichen, fungieren als Hilfslinien für die Migration. Die Cajal-Retzius-Zellen sind in braun dargestellt; die hippocampale Platte in weiß; grau und schwarz zeigt die Kompartimente CA1, CA2, CA3. Die Pfeile markieren die Migration über die intermediäre Zone. Der *Gyrus dentatus* ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig entwickelt. Im Gegensatz zum superioren Blatt (grau) ist das inferiore Blatt noch nicht vollständig ausgebildet (hellgrau). Die hippocampale Entwicklung vollzieht sich in fünf aufeinanderfolgenden Schritten. Zuerst findet die Zellproliferation und Neurogenese in der ventrikulären Zone statt (1). Im Anschluss liegen die Zellen für eine gewisse Zeit multipolar oberhalb der ventrikulären Zone vor (2). Während der bipolaren Phase migrieren die Zellen durch die intermediäre Zone (3) und fügen sich in die hippocampale Platte ein (4+5). Die CA1-Region wird einen Tag vor der CA3 aufgrund der kürzeren Migrationszeit sichtbar. So haben Pyramidenzellen sich schon in der CA1-Region angeordnet, während sich die Zellen der CA3-Region noch in der intermediären Zone befinden. 19
- Abbildung 2: Die Moosfasern des Hippokampus nach Wiera *et al.*¹²: Die Moosfaserprojektionen bestehen aus den unmyelinisierten Axonen der Körnerzellen des *Gyrus dentatus*. Das suprapyramidale Band projiziert in das *Stratum lucidum* und das intra-/infrapyramidale Band in das *Stratum oriens*. Das suprapyramidale Band hat Kontakt mit den proximalen Teilen der apikalen Dendriten, wohingegen das infrapyramidale Band die proximalen Teile der basalen Dendriten berührt. 21
- Abbildung 3: Die bidirektionale Integrinaktivierung (Modell nach Shattil *et al.*⁶⁸): Durch die Bindung von extrazellulären Liganden können Integrine von der geschlossenen, inaktiven Konformation in die offene, aktivierte Konformation übergehen. Viele Liganden sind multivalent, so dass es zur Clusterbildung der Integrine kommt. Intrazelluläre Signale aktivieren Prozesse wie die Zellpolarität, Proliferation, Genexpression und Umstrukturierung des Cytoskelettes. Das *Inside-out Signaling* wird durch intrazelluläre Aktivatoren wie Talin aktiviert. Über diesen Weg werden die Stärke der Adhäsion sowie die Migration kontrolliert. Beide Wege sind oft eng miteinander verbunden. 27
- Abbildung 4: Schematischer Aufbau von ADAP nach Engelmann *et al.*, 2015⁹⁰: Es existieren zwei Isoformen von ADAP p120/p130. Diese beiden Isoformen unterscheiden sich in einer Insertion von 46 Aminosäuren an Aminosäureposition 637. In dieser Abbildung ist die Struktur des humanen ADAP 130kDa dargestellt. ADAP besitzt eine Prolin-reiche Domäne (PxxP), zwei helikale SH3-Domänen (hSH3), eine Bindungsdomäne (FPPPP) für die Ena/Vasp-Proteine (EHV1) und mehrere Tyrosin-basierte Phosphorylierungsstellen (Y). Die Prolin-reiche Domäne vermittelt die konstitutive Interaktion von ADAP mit SKAP55/SKAP-HOM und somit Proliferation und Integrin-Aktivierung. SLP-76, NCK und Fyn erkennen die Sequenzmotive YDGI, YDDV und aktivieren so Proliferation, Integrin-Aktivierung und Aktin-Reorganisation. Die N-terminale SH3-Domäne von ADAP assoziiert mit CARMA1, BCL-10 und MALT1, die zusammen im CBM-Komplex NF- κ B aktivieren. Innerhalb des CBM-Komplexes bindet ADAP ebenfalls TAK1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*). 32
- Abbildung 5: ADAP in der T-Zell- und Chemokininrezeptor-vermittelte Signalkaskade nach Zou *et al.*, und Witte *et al.*,^{88,107}: In ruhenden T-Zellen befindet sich SLP-76 im Zytosol und bindet konstitutiv Gads. Nach der T-Zellrezeptoraktivierung (TCR) und der Aktivierung von Lck und ZAP70 wird LAT phosphoryliert und erzeugt eine Bindungsstelle für Gads. Gads wird zum phosphorylierten LAT rekrutiert und bringt SLP-76 mit in diesen aktivierten Komplex. PLC γ bindet stabil an SLP-76 und phosphoryliertes LAT. Daraus resultieren eine Calciumfreisetzung, die Aktivierung von NFAT und die Produktion von DAG. Durch DAG wird Ras und PKC θ aktiviert. Ein kleiner Teil des ADAP-Pools ist involviert in der Gruppierung von PKC θ /CBM/TRAF6/ADAP/TAK1 zu einem Signalkomplex. ADAP reguliert die Ubiquitinierung von IKK γ durch TRAF6 und die IKK β -Phosphorylierung durch TAK1, so dass I κ B α phosphoryliert wird und es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt. Durch die

Interaktion von ADAP mit CARMA1 und TAK1 wird die Expression von CDK2 und Cyclin E beeinflusst. ADAP ist auf diesem Weg an der Zellzyklusregulation beteiligt. Die TCR-Aktivierung resultiert in der Phosphorylierung von SLP-76 durch ZAP-70 und ermöglicht so die Bindung von Nck und ADAP an SLP-76. Der größere Teil von ADAP ist konstitutiv an SKAP55 gebunden und SKAP55 bindet RIAM und RAPL und aktiviert Integrine an der T-Zelloberfläche (*inside-out*-Aktivierung der Integrine). Die Aktivierung der α -Kette via RAPL scheint unabhängig von der β -Kette via Kindlin-3 zu erfolgen. ADAP kann auch infolge einer Chemokinrezeptoraktivierung (CXCR4/7) Integrine aktivieren. 36

Abbildung 6: Die auditorische Furchtkonditionierung: Am ersten Tag des Trainings wird der CS- jeweils 6mal für 10 s mit einem Abstand von 20 s präsentiert. An den beiden darauffolgenden Tagen wird den Tieren der CS+ gepaart mit dem US präsentiert. Am vierten Tag wird das kontextuelle Gedächtnis abgefragt. Am fünften Tag wird die Reaktion der Tiere auf den CS- und den CS+ in einem neuen Kontext gemessen. 62

Abbildung 7: Das *spaced Training*: Bei dieser Trainingsmethode wird der CS+ mit US zusammen nur einmal pro Trainingseinheit präsentiert. Das Training besteht insgesamt aus drei Trainingseinheiten, die im Abstand von einer Stunde erfolgen. 63

Abbildung 8: ADAP-Expression in neuronalen Zellen und Antikörperevaluierung: (A) Die Expression von ADAP wurde mit Hilfe eines Immunoblots in PC-12-Zellen als auch im juvenilen und adulten Hippokampuslysaten mit Hilfen von zwei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen. (B) Zeigt die Spezifität des Schafserums in der Immuncytochemie. HEK-293T-Zellen wurden mit einem ADAP-überexprimierenden Konstrukt transfiziert und mit dem Schafserum immuncytochemisch gefärbt. HEK-293T-Zellen exprimieren kein ADAP, so dass die Färbung als spezifisch angesehen werden kann. Maßstab 100 μ m. (C) Zur Validierung des anti-ADAP-Schafserums im Immunoblot wurde ein Hippokampuslysate von ADAP-Wildtypen (+/+) und Knock-out (-/-)-Mäusen verwendet. Im Hippokampuslysate der Knock-out-Mäuse fehlt eine ADAP-Bande bei etwa 120 kDa. 66

Abbildung 9: ADAP bildet zusammen mit SKAP-HOM einen Komplex in Neuronen:(A) ADAP ist an DIV 7 vor allem in MAP2 positiven Regionen lokalisiert aber auch in den MAP2-negativen Segmenten (Pfeil) zu finden. SKAP-HOM als Komplexpartner kommt hingegen fast ausschließlich nur in MAP2-positiven Arealen des Neurons vor; Maßstab 100 μ m. Die Immunpräzipitation (IP) mit ADAP aus einem Hippokampuskomplettlysate (B) zeigt, dass ADAP im Hippokampus in einem Komplex bestehend aus SKAP-HOM, MST1 und RAPL vorkommt, aber nicht mit RIAM. (KL-Komplettlysate)..... 67

Abbildung 10: ADAP-Lokalisation in hippokampalen Neuronen: Dissoziierte hippokampale Neuronen exprimieren ADAP an DIV 3 (A) und DIV 10 (B) sowohl im Soma als auch in den MAP2-positiven Neuriten. In den frühen Stadien der Entwicklung ist ADAP auch in den Wachstumskegeln zu finden (A). Maßstab 100 μ m. 68

Abbildung 11 ADAP-Lokalisation im axonalen Wachstumskegel: ADAP lokalisiert an DIV 7 in axonalen, Gap43-positiven Wachstumskegeln. Maßstab 30 μ m. 68

Abbildung 12: ADAP kolokalisiert mit Talin: An DIV 7 ist ADAP zusammen mit Talin in den Neuriten dissoziierter Neurone zu finden. ADAP kolokalisiert mit Talin im Axon (Pfeil). Maßstab 100 μ m..... 69

Abbildung 13 mRNA-Expression von ADAP in der sich entwickelnden Primärkultur: Die ADAP-mRNA-Expression verändert sich während der Entwicklung der Kultur. Von DIV 3 zu DIV 7 kommt es zu einer Reduktion der mRNA-Expression, die dann bis DIV 14 wieder ansteigt. An DIV 21 liegt das Niveau der mRNA-Expression etwa wieder auf der Höhe von DIV 7. MW \pm SFM..... 70

Abbildung 14: Integrinaktivierung durch ADAP: ADAP reguliert in T-Zellen die Integrinaktivierung: Für die Analyse des Einflusses von ADAP auf die Integrinaktivierung wurden hippokampale Neurone an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 mit dem 9EGF-Antikörper gefärbt (A). Für die Analyse wurde die Pixelintensität pro μ m² gemessen (B, C). In den Dendriten führte der ADAP-Verlust zu einer signifikanten Reduktion in der Integrinaktivierung, die durch eine Rekonstitution wieder aufgehoben werden konnte. (B) Im Soma hingegen führte der ADAP-Reduktion zu einem nicht-signifikanten Anstieg in der Integrinaktivierung. Maßstab 100 μ m. 71

Abbildung 15 Analyse der totalen beta1-Integrinexpression: In den Dendriten kommt es in Folge der ADAP-Reduktion zu einer Erhöhung der β 1-Integrinintensität (B). Die Somata der ADAP-Knock down-Zellen weisen hingegen eine Reduktion der β 1-Integrinintensität auf (C) MW \pm SFM. Maßstab 100 μ m..... 72

Abbildung 16: Morphologische Untersuchung mittels Sholl-Analyse: Für die morphologische Analyse wurden hippocampale Neurone an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 fixiert und mit MAP2 gefärbt. Maßstab 100 μm (A). Mit der Sholl-Analyse wurde die Länge sowie die Anzahl der Verzweigung der Neuriten gemessen. Die Quantifizierung der Gesamtanzahl der Neuriten zeigt, dass eine Reduktion der ADAP-Expression zu einer Reduzierung der Gesamtanzahl der Schnittpunkte führt (B). Die Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz zum Soma dargestellt, zeigt eine Reduktion der Schnittpunkte am Soma im Vergleich zur Kontrolle und eine Rekonstitutionsbedingung. Im weiteren distalen Verlauf befinden sich die Schnittpunkte der konzentrischen Kreise auf dem Niveau der Kontroll- und Rekonstitutionsbedingung (C). MW \pm SFM. 74

Abbildung 17: Itgb1-mRNA-Expression: Die Evaluierung der Itgb1-Expression in der dissoziierten Neuronenkultur erfolgte mit Hilfe der qPCR (relative Quantifizierung zu DIV 3). Von DIV 3 zu DIV 7 kommt es zu einem leichten Anstieg in der Itgb1-Expression. Im weiteren Verlauf der Kultivierung steigt die Expression weiter an und erreicht an DIV 14 ihren Höhepunkt, bevor sie an DIV 21 unter das Expressionsniveau von DIV 3 fällt. MW \pm SFM 75

Abbildung 18: ADAP-Lokalisation an DIV 14: An DIV 14 zeigt ADAP (rot) eine vorwiegend punktierte Verteilung in den Neuriten, wie auch das β 1-Integrin (grün). ADAP reichert sich in Synapsen an (Synaptophysin-positiv; blau) und kolokalisiert dort mit β 1-Integrin (grün) und ADAP (Pfeil). Maßstab 100 μm 76

Abbildung 19: Der Einfluss von ADAP auf die MAP2-Expression: Neurone mit einer ADAP-Reduktion, die an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 fixiert wurden, zeigen eine reduzierte MAP2-Expression in den Dendriten und im Soma im Vergleich zu der Kontrollbedingung. Maßstab 100 μm (A). Die Quantifizierung der MAP2-Intensität normalisiert auf die Intensität des Cell StainTM mit dem In-Cell WesternTM zeigt, dass sowohl der ADAP-Knock-down als auch die Rekonstitution zu einer Intensitätsreduktion des MAP2-Signals im Vergleich zur Kontrolle führt (B). MW \pm SFM. 77

Abbildung 20: p65-mRNA-Expression in hippocampalen Primärneuronen: Die relative Quantifizierung (normiert auf DIV 3) der p65-Werte zeigt, dass die Expression von p65 von DIV 3 zu DIV 7 stark ansteigt und dann bis DIV 14 leicht abfällt und an DIV 21 leicht unter dem Ausgangswert von DIV 3 liegt. MW \pm SFM 78

Abbildung 21: Einfluss von ADAP auf die NF- κ B-Aktivierung: Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde an DIV 10 in Kultur sowohl unstimuliert als auch unter Insulin- und TNF- α -Stimulation untersucht. Ohne Stimulation zeigen sowohl der Knock-down als auch die Rekonstitution eine verminderte Basalaktivität des Transkriptionsfaktors. Unter dem Einfluss von Insulin bleibt die NF- κ B-Aktivität nach ADAP-Knock-down weiter vermindert wohingegen die Aktivität der Rekonstitution unter Insulineinfluss auf Kontrollniveau ansteigt. Die Stimulation mit TNF- α führt in allen Bedingungen zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivierung im Vergleich zu der unstimulierten Kontrollbedingung. MW \pm SFM. 79

Abbildung 22: Histologische Färbung der ADAP-Mutanten: Die DAB-Färbung für ADAP zeigt in den Wildtyp-Mäusen eine Färbung der Zellkörper des *Stratum pyramidale* in der CA1-CA3-Region des Hippokampus sowie im Hilus. Die ADAP-Knock-out-Maus als Negativkontrolle zeigt keine Färbung für ADAP in den hippocampalen Strukturen. Die Nissl-Färbung zeigt sowohl für die Wildtypmaus als auch für die ADAP-Knock-out Maus eine normale hippocampale Cytoarchitektur. Maßstab 500 μm 80

Abbildung 23: MAP2-Färbung Die immunzytologische Färbung für MAP2 zeigt in den Wildtyp-Mäusen und in den ADAP-defizienten Mäusen keine strukturellen Unterschiede in der Übersicht. Maßstab 500 μm 81

Abbildung 24: Die Moosfasern des Hippokampus: Die Timm-Färbung zeigt eine Reduktion der Dicke des suprapyramidalen Bandes in der CA2-Region in den ADAP^{-/-} (grauer Pfeil) und eine Erhöhung der Intensität des infra/intrapramidale Bandes (IIPB; weißer Pfeil). Maßstab 300 μm 82

Abbildung 25: ADAP-mRNA-Expression nach der Furchtkonditionierung: Gruppe A (assoziert) erhielt den Fußschock gepaart mit einem Ton 5mal, während die Gruppe NA (nicht assoziiert) erst 5mal den Ton und dann 5mal den Fußschock präsentiert bekam. Die mRNA-Expression sinkt 30 min nach der Furchtkonditionierung in beiden Gruppen drastisch. In der assoziierten Gruppe steigt die mRNA-Expression von ADAP dann bis 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung langsam an und erreicht 6 Stunden später ihren Höhepunkt, bevor sie dann wieder leicht sinkt. In der nicht-assozierten Gruppe

verringert sich die mRNA von ADAP 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung weiter, bevor sie nach 6 Stunden ihr Maximum erreicht. 24 Stunden nach der Furcht-konditionierung liegt das mRNA-Niveau von ADAP in der NA-Gruppe leicht unter dem der A-Gruppe. 14 Tage nach der Furchtkonditionierung unterscheidet sich die mRNA-Expression in den beiden Gruppen nicht. 83

Abbildung 26: ADAP-Proteinexpression nach der Furchtkonditionierung: Die Menge an ADAP wurde während der verschiedenen Phasen der Gedächtnisbildung bestimmt. 6 Stunden nach der Akquisition kommt es zu einem Anstieg der ADAP-Expression, die 24 Stunden später wieder auf Kontrollniveau sinkt. 6 Stunden nach der Abfrage der Erinnerung ist die Proteinmenge von ADAP signifikant reduziert $p < 0,05$. $MW \pm SFM$ 84

Abbildung 27: Die kontextuelle Furchtkonditionierung: An Tag 1 erfolgte die Adaptation der Mäuse. Dafür erhielten sie 2x je 6x den CS-. An Tag 2 und 3 wurde jeweils 3x der CS+ mit dem US gepaart präsentiert. An Tag 4 wurde die Erinnerung an den Kontext abgerufen, indem die Mäuse 6 min in die Trainingsbox gesetzt und die Erstarrungszeiten gemessen wurden (A). Die ADAP-defizienten Mäuse zeigen über die gesamten 6 min weniger *Freezing*. Am fünften Tag wurden die Mäuse in eine neue Box gesetzt und die Zeit der Erstarrung während der Präsentation des CS- und CS+ gemessen. In der neuen Umgebung zeigen beide Genotypen das gleiche Niveau an Immobilisierung sowohl während der Präsentation des CS- als auch des CS+ (B). $MW \pm SFM$ 85

Abbildung 28: Das *spaced*-Training: Bei dieser Furchtkonditionierungsmethode erfolgt die Präsentation des CS+/US dreimal an einem Tag mit einem Abstand von einer Stunde. Die kontextuelle Testung erfolgte an Tag 2 und die Erinnerung an den Stimulus wird an Tag 3 abgefragt. Hier unterscheiden sich die Erstarrungszeiten der beiden Genotypen bei der Testung des Kontextes nicht (A). Auch bei der Testung in einem neuen Kontext unterscheiden sich die Genotypen weder bei der Präsentation des CS- noch des CS+. $MW \pm SFM$ 87

Abbildung 29: Offenfeld: Im Offenfeld wurde die total zurückgelegte Distanz der Mäuse sowie die Anzahl der Zentrumseintritte quantifiziert. An beiden Tagen im Offenfeld legen beide Genotypen etwa die gleiche Distanz zurück. Die ADAP^{-/-} zeigen einen leichten, nicht-signifikanten Trend eine größere Distanz im Offenfeld zurückzulegen (A, B). Die Anzahl der Zentrumseintritte ist an Tag 1 nicht signifikant verschieden zwischen den Genotypen. Am zweiten Tag im Offenfeld kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Zentrumseintritte der Wildtypen gegenüber den ADAP-defizienten Mäusen. $MW \pm SFM$ 88

Abbildung 30: pFAK-Niveau 5 min nach der Furchtkonditionierung: 5 min nach der Furchtkonditionierung kommt es in den Proteinlysaten der ADAP-defizienten Mäuse zu einer signifikanten Erhöhung von pFAK im Vergleich zu den ADAP-exprimierenden Mäusen. $MW \pm SFM$ 89

Abbildung 31: pNMDAR2B: Die Quantifizierung der Phosphorylierungsstelle Tyrosin 1336 des NMDAR2B-Rezeptors 5 min nach der Furchtkonditionierung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen der Mäuse. $MW \pm SFM$ 90

Abbildung 32: Western-Blot p65 nach der Furchtkonditionierung: 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung wurden die Hippocampi der Mäuse isoliert und das Proteinlysate in cytosolische und nucleäre Fraktion aufgeteilt. Mit Hilfe eines p65-Antikörpers wurde quantitativ die Mengen an p65 bestimmt. Als Marker für die nucleäre Fraktion diente Histon H4. Die p65-Intensität wurde für die Auswertung auf die Intensität des α -Tubulin normiert..... 91

Abbildung 33: p65-Verteilung nach der Furchtkonditionierung: 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung unterscheidet sich die relativ integrierte Intensität von p65 im Cytosol nicht zwischen den Genotypen. In beiden Gruppen ist die p65-Intensität im Cytosol höher als im Nucleus. Im Nucleus weisen die ADAP-defizienten Mäuse eine signifikante Erhöhung der p65-Intensität im Vergleich zu den Wildtypen auf. $MW \pm SFM$ 92

Abbildung 34: p65-Verteilung nach dem Händeln: Als Kontrolle zu den furchtkonditionierten Mäusen wurde, die Menge an p65-Protein in 'gehändelten' Tieren bestimmt. Diese Mäuse wurden nur in die Furchtkonditionierungskammer gesetzt, bekamen aber keinen Ton oder Fußschock präsentiert. Die Expression von p65 ist den ADAP-defizienten Mäusen leicht reduziert, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren. ($MW \pm SFM$)..... 93

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 35: IKK α -Expression 5 min nach der Furchtkonditionierung: Unmittelbar nach der Furchtkonditionierung kommt es in den ADAP-defizienten Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der IKK α -Proteinmenge. Die Intensität von IKK α wurde auf die Intensität von α -Tubulin normiert. Mittelwert \pm SFM. 94
- Abbildung 36: IKK β -Expression 5 min nach der Furchtkonditionierung. In den Wildtypen kommt es unmittelbar nach der Furchtkonditionierung zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung von IKK β . Die IKK β -Intensität wurde auf die integrierte Intensität von α -Tubulin normiert. (MW \pm SFM) 94
- Abbildung 37: ADAP in Neuronen: In hippocampalen Neuronen existiert ADAP in einem Komplex mit SKAP-HOM, RAPL und MST1, der β 1-Integrine über den *inside-out*-Mechanismus aktiviert und auf diesem Wege das dendritische Wachstum in der hippocampalen Primärkultur vermittelt. ADAP scheint an der Modulation der NF- κ B-Aktivierung und der MAP2-Expression beteiligt zu sein. 100

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADAP	<i>adhesion and degranulation promoting adaptor protein</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP-2	<i>adaptor related protein complex 2</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	1- β -D-Arabinofuranosylcytosin
ARF	Adenosyl-Ribosylierungsfaktor (ADP-Ribosylierungsfaktor)
Ascl1	<i>achaete-scute homolog 1</i>
BCL-10	B-cell lymphoma/leukemia 10
BCR	<i>B-cell receptor</i>
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CARMA1	CARD-containing MAGUK protein 1; Caspase recruitment domain-containing protein 11
CBM	CARMA1-BCL-10-MALT1
ciAP1	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	Cajal-Retzius
CS+	konditionierter Stimulus, <i>conditioned Stimulus</i>
ct	<i>cycle threshold</i> , Zykluswellenwert)
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
Cxcr4	Chemokinrezeptor 4
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
Dab1	<i>disabled-1</i>
DAG	Diacylglycerol
Dapi	4,6Diamindin2-phenylindol
dct	delta Ct, <i>cycle threshold</i>
DIV	<i>day in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium und Ham's F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA/DNS	Desoxyribonucleinsäure / desoxyribo nuclein acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EHV1	<i>Ena (enabled)–VASP (vasodilator-stimulated phospho protein) homology-1</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal–regulated kinases 1/2</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FYB	<i>Fyn-binding protein</i>
GAP-43	<i>growth associated protein 43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GTM	<i>Greenwich mean time</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hSH3	helikale Src-Homology 3
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IKK	I κ B-Kinase
IL-2	Interleukin-2
INF γ	Interferon γ
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
Itgb1	Integrin beta 1
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
L1	<i>neural cell adhesion molecule L1</i>
LAT	<i>linker of activated T-cells</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LTP	Langzeitpotenzierung, <i>long term potentiation</i>
MALT1	<i>mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MHC	<i>major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
mM	Millimolar
M-MLV-	
Reverse Transkriptase	<i>Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
MST1	<i>mammalian STE20-like protein kinase 1</i>
MW	Mittelwert

Abkürzungsverzeichnis

NBM	Neurobasalmedium
NCK	<i>non-catalytic region of tyrosin kinase adaptor protein 1</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKD	Proteinkinase
PLC	Phospholipase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rap1/2	<i>Ras related protein 1/ 2</i>
RAPL	<i>regulator for cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues, RASSF5 (Ras association domain-containing protein 5)</i>
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adapter molecule</i>
s	Sekunde
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFM	Standardfehler des Mittelwertes
SKAP55	<i>src-kinase associated protein of 55 kDa</i>
SKAP-HOM	SKAP55-Homolog
<i>Slap130</i>	<i>SLP-76 associated phosphoprotein</i>
SLP-76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAK1	<i>transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factors 6</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (THAM)
U/ μ l	Units/microliter
US	unkonditionierte Stimulus, <i>unconditioned stimulus</i>

Abkürzungsverzeichnis

VCAM	<i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VLDLR	<i>very low-density lipoprotein receptor</i>
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklung des Hippokampus

Der Hippokampus liegt im medialen Teil des Telencephalon und bildet zusammen mit dem *Gyrus parahippocampalis* und dem *Gyrus cinguli* den Archicortex. Er besteht aus mehreren Substrukturen (dem *Gyrus dentatus*, dem *Cornu ammonis* (Ammonshorn) und dem *Subiculum*), weswegen man auch von der Hippokampusformation oder hippokampalen Formation (*Formatio hippocampi*) spricht.

Die *Formatio hippocampi* wird während der embryonalen und der frühen postnatalen Entwicklung im Telencephalonbläschen gebildet. So generiert der dorsomediale Teil des Bläschens Teile des *Subiculi* und des Ammonshorns sowie den *Gyrus dentatus* und sein dorsoposteriorer Teil den entorhinalen Cortex und Teile des *Para-* und des *Präsubiculi*.¹

In der Maus beginnt die Entwicklung des *Gyrus dentatus* um den Embryonaltag 13 (E13,5)². Diese Organanlage ist initial mit Cajal-Retzius-Zellen (CR-Zellen) und Radialglia besiedelt. Die Radialgliazellen proliferieren in der ventrikulären Zone, die auch als Neuroepithelium (primäre Matrix) bezeichnet wird. Am Embryonaltag 15,5 beginnen die neuronalen Stammzellen durch die suprafimbriale Region auf die gegenüberliegende subpiaie Region zu dem sich bildenden *Gyrus dentatus* zu migrieren (1. Migrationsphase) und bilden die sekundäre Matrix^{3,4}. Zellen, die die subpiaie Region erreichen, migrieren radial zum supragranulären Blatt des *Gyrus dentatus*. Die Körnerzellen der subpiaien Regionen bilden zuerst den äußeren Rand des supragranulären Bandes und dann schrittweise die äußere Hülle des infragranulären Bandes. Zwischen E17,5 und E18,5 ist ein Vorläufer der beiden *Gyri dentati* in der Maus erkennbar⁵. In der späten embryonalen und der frühen postnatalen Migrationsphase wandern die Zellen in die Region des späteren *Hilus* ein (2. Migrationsphase). Diese Zellen behalten ihre Proliferationsfähigkeit bis ins Erwachsenenalter und bilden die tertiäre Matrix, die den inneren Teil der *Gyri dentati* darstellen. Dabei befinden sich früher entstandene Neurone im äußeren Teil, wohingegen die später entstandenen Neurone im Inneren der Hilusregion zu finden sind⁶.

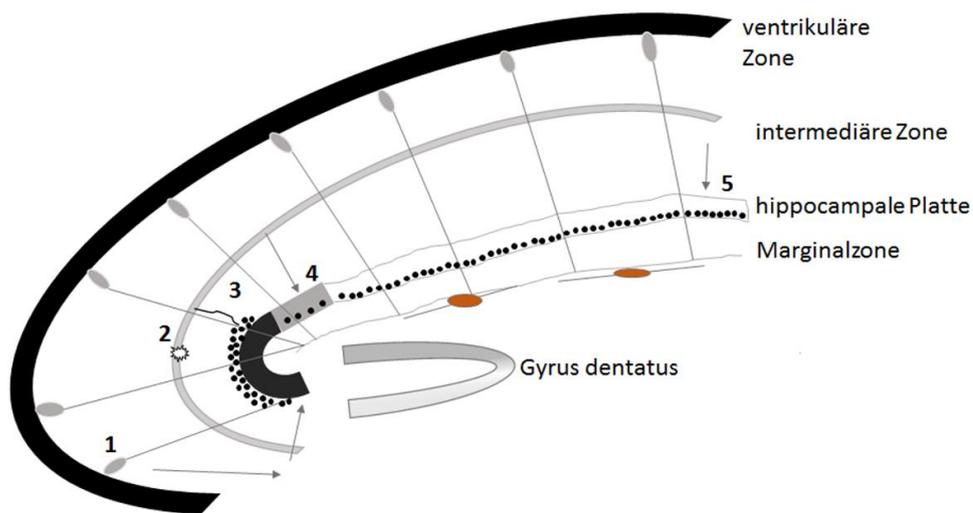


Abbildung 1: Der sich entwickelnde Hippokampus nach Altman & Bayer⁷, Belvindrah *et al.*⁸ und Khalaf-Nazzal⁹: Die Radialgliazellen (grau) mit ihren Somata in der ventrikulären Zone und ihren langen Fortsätzen, die bis in die Marginalzone reichen, fungieren als Hilfslinien für die Migration. Die Cajal-Retzius-Zellen sind in braun dargestellt; die hippocampale Platte in weiß; grau und schwarz zeigt die Kompartimente CA1, CA2, CA3. Die Pfeile markieren die Migration über die intermediäre Zone. Der *Gyrus dentatus* ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig entwickelt. Im Gegensatz zum superiores Blatt (grau) ist das inferiore Blatt noch nicht vollständig ausgebildet (hellgrau). Die hippocampale Entwicklung vollzieht sich in fünf aufeinanderfolgenden Schritten. Zuerst findet die Zellproliferation und Neurogenese in der ventrikulären Zone statt (1). Im Anschluss liegen die Zellen für eine gewisse Zeit multipolar oberhalb der ventrikulären Zone vor (2). Während der bipolaren Phase migrieren die Zellen durch die intermediäre Zone (3) und fügen sich in die hippocampale Platte ein (4+5). Die CA1-Region wird einen Tag vor der CA3 aufgrund der kürzeren Migrationszeit sichtbar. So haben Pyramidenzellen sich schon in der CA1-Region angeordnet, während sich die Zellen der CA3-Region noch in der intermediären Zone befinden.

Das *Cornu ammonis* (CA) ist entlang der transversalen Achse in die Kompartimente CA1, CA2 und CA3 sowie horizontal in die Schichten *oriens*, *pyramidalis*, *radiatum* und *lacunosum-moleculare* unterteilt (nur in der CA3-Region findet man zwischen dem *Stratum pyramidalis* und dem *Stratum radiatum* das *Stratum lucidum*). Die Pyramidenzellen der CA1-Region werden in der ventrikulären und subventrikulären Zone zwischen dem E12 und E18 gebildet und verweilen nach dem Verlassen der ventrikulären Zone als post-mitotischen Neurone oberhalb der ventrikulären Zone. Von dort aus migrieren sie langsam in die intermediäre Zone. Neurone, die an E12,5 entstanden sind, zeigen eine multipolare Morphologie und verweilen für einen Tag oberhalb der ventrikulären Zone. Im Gegensatz dazu akkumulieren sich Neurone, die an E15,5 entstanden sind und eine bipolare-spindelförmige Morphologie besitzen, für drei bis vier Tag oberhalb der ventrikulären Zone.

Hippokampale CA1-Neurone wandern an den Radialgliafasern entlang in die hippokampale Platte ein und bilden später das *Stratum pyramidale*. Die Schichtung des *Cornu ammonis* erfolgt wie auch im *Gyrus dentatus* von innen nach außen; früh entstandene Neurone befinden sich im *Stratum pyramidale* und die später generierten Neurone an der Oberfläche.

Die Neurogenese der Pyramidenzellen der CA3-Region beginnt an E14. Sie behalten ihre multipolare Morphologie bis zum Embryonaltag 18 und migrieren tangential in das subpiaale Areal. Einige Neurone lösen sich von diesem Migrationsstrom und migrieren dann radial mit einer unipolaren Morphologie entlang der Radialgliafaser direkt in die hippokampale Platte (Abbildung 1).

Am Embryonaltag 17 beginnt die Entwicklung der sogenannten Moosfasern. Die unmyelinisierten Axone der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* ziehen durch den *Hilus*, wo sie sich stark verzweigen und projizieren als dichte axonale Bündel in das *Stratum lucidum* und das *Stratum oriens* der CA3-Region und bilden mit den Dendriten der Pyramidenzellen Synapsen^{10,11}. Die Moosfasern bilden zwei Bündel; das suprapyramidale Band, das ins *Stratum lucidum* projiziert und das intra/infrapyramidale Band, das erst durch das *Stratum pyramidale* und das *Stratum oriens* zieht und dann in das *Stratum lucidum* der CA3-Region kreuzt (Abbildung 2). Das suprapyramidale Band hat Kontakt mit den proximalen Teilen der apikalen Dendriten, während das infrapyramidale Band die proximalen Teile der basalen Dendriten berührt¹¹. Die Länge des infrapyramidalen Bandes variiert über verschiedene Spezies und Stämme¹¹.

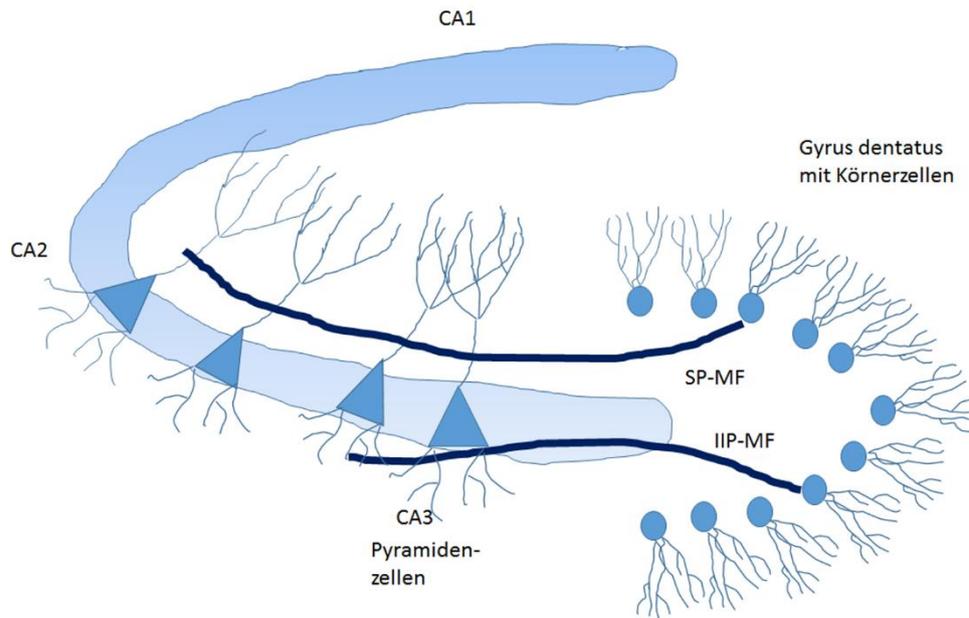


Abbildung 2: Die Moosfasern des Hippokampus nach Wiera *et al.*¹²: Die Moosfaserprojektionen bestehen aus den unmyelinisierten Axonen der Körnerzellen des *Gyrus dentatus*. Das suprapyramidale Band projiziert in das *Stratum lucidum* und das intra-/infrapyramidale Band in das *Stratum oriens*. Das suprapyramidale Band hat Kontakt mit den proximalen Teilen der apikalen Dendriten, wohingegen das infrapyramidale Band die proximalen Teile der basalen Dendriten berührt.

Eine bedeutende Rolle bei der Migration der Neurone im sich entwickelnden Hippokampus kommt den Cajal-Retzius-Zellen (CR-Zellen) und den Radialgliazellen zu. Die CR-Zellen befinden sich in der Marginalzone und befestigen die Radialgliazellen an der Basalmembran und unterstützen somit die Migration der Neurone. Die Radialgliazellen sind die Vorläufer der Pyramidenzellen¹³. Cajal-Retzius-Zellen sekretieren SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*; Cxcl12 genannt (CXC-Motiv-Chemokin 12)) und Reelin. Beide Proteine sind für das Neuritenwachstum¹⁴ sowie die Migration der Neurone während der Entwicklung bedeutend¹⁵ und beeinflussen Integrin-vermittelte Signalwege.

Das Chemokin SDF-1 wird nicht nur von den CR-Zellen, sondern auch von meningealen Zellen exprimiert und bindet an Cxcr4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4), der seinerseits von den migrierenden Körnerzellen in der sekundären Matrix und im Migrationsstrom exprimiert wird¹⁶. Veränderungen des SDF-1-Gradienten führen zu einer gestörten Migration der Körnerzellen. SDF-1 ist somit ein wichtiges Chemokin für die neuronale Migration¹⁶. Cxcr4^{-/-}-Mäuse zeigen aufgrund einer gestörten Migration der Körnerzellen entlang des subpialen Stroms eine veränderte Morphologie des *Gyrus dentatus*^{15,16,17}.

Die Expression von Reelin beeinflusst die radiale Migration der Neurone. So zeigen Reelin-defiziente Mäuse eine Veränderung in der Laminierung des Hirns. Die Migration der Neurone erfolgt nicht von innen nach außen, sondern von außen nach innen^{15,18}. Reelin bindet neben den Cadherin verwandten neuronalen Rezeptoren, ApoER2 (*Apolipoprotein E Receptor 2*) und VLDLR (*very low-density lipoprotein receptor*) auch an Integrine. So konnte gezeigt werden, dass Reelin die neuronale Migration durch die Bindung an $\alpha3\beta1$ -Integrin inhibiert¹⁹. Intrazellulär vermittelt Dab1 (*Disabled 1*), ein Adapterprotein, das mit der zytosolischen Domäne von $\beta1$ -Integrin, den durch Reelin aktivierten Signalweg vermittelt. Es wird angenommen, dass die Interaktion von Reelin mit $\alpha3\beta1$ -Integrin einen Signalweg aktiviert, der die Internalisierung von Integrienen veranlasst und so die Ablösung der migrierenden Neurone von der Radialglia veranlasst²⁰.

Die Radialgliazellen haben ihre Somata in der ventrikulären Zone und spannen ihre Fortsätze, die Neurone für die Migration nutzen, durch den gesamten sich entwickelnden Kortex. Die Interaktion von migrierenden Neuronen und den Radialgliafasern wird durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel den Integrienen, vermittelt²¹. Eine Blockierung von $\alpha3$ -Integrin reduziert die Migrationsgeschwindigkeit und löst migrierende Neurone von den Fasern der Radialglia²¹. Ein konditionaler Verlust von $\beta1$ -Integrin führt aufgrund einer gestörten Verankerung der Radialglia an der Basalmembran zu einer veränderten Schichtung des Kortexes¹³.

Die Integrine nehmen während der Entwicklung nicht nur Einfluss auf die Migration der Neurone sondern auch auf das Neuritenwachstum. Neben den Syndecanen und Dystroglycanen sind die Integrine die bedeutendste Lamininrezeptorfamilie. Die verschiedenen Laminin-Isoformen beeinflussen sowohl die axonale als auch dendritische Entwicklung von hippokampalen Neuronen über Integrin-abhängige und Integrin-unabhängige Signalwege. Die Interaktion der Laminin-Isoform-511 mit den Integrienen vermittelt beispielsweise das Auswachsen des Axons und die dendritische Entwicklung²².

1.2 Das Zelladhäsionsmolekül Integrin

1.2.1 Die Bedeutung der Integrine im Nervensystem

Die Integrine bilden eine große Klasse der Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl die Zell-Zell-Adhäsion als auch die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix vermitteln. In den Säugetieren sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten der Integrine bekannt, die über nicht-kovalente Bindungen 24 verschiedene Heterodimere bilden²³. Die Integrine gehören zu den Transmembranproteinen und binden über ihre extrazelluläre Domäne an Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen I bis IV, Fibronectin, Laminin, aber auch an die Transmembranproteine der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Metalloproteasefamilie und andere Zelladhäsionsmoleküle, wie Cadherine oder an die Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), VCAM (*vascular cell adhesion protein 1*) und L1 (L1-CAM)^{24,25}. Mit der cytosolischen Domäne sind die Integrine über Adaptermoleküle wie Talin und Vincullin mit dem Aktincytoskelett verbunden. Integrine können über ihre cytosolische Domäne cytosolische Tyrosinkinase, wie FAK (*focal adhesion kinase*), Src und PI3 (Phosphatidylinositol3-Kinase) aktivieren²⁶ und somit das Aktincytoskelett reorganisieren.

Integrine spielen eine elementare Rolle in der Entwicklung des Nervensystems^{27,28}. Sie sind nicht nur an der Proliferation neuronaler Stammzellen und der neuronalen Migration während der Hippokampusentwicklung beteiligt, sondern beeinflussen auch das Auswachsen der Neuriten, die Synaptogenese²⁹ und die Entwicklung der Gliazellen.

Während der embryonalen Entwicklung des Gehirns werden vor allem die Untereinheiten $\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ und αv exprimiert, die dann folgende Integrinrezeptoren bilden: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ und $\alpha v\beta 1$ ³⁰. Von diesen Rezeptoren interagieren $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ vornehmlich mit Laminin, wohingegen die Rezeptoren $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 1$ an Fibronectin binden. Alpha8 $\beta 1$ -Integrin interagiert sowohl mit Fibronectin als auch mit Tenascin. Alpha9 $\beta 1$ bildet hingegen einen Tenascinrezeptor, während die Integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ im Nervensystem auch an Kollagen binden³¹.

Während der Entwicklung wird neben der Expression der Integrine auch die Expression der Integrinliganden räumlich und zeitlich reguliert³². Laminin wird in der Basalmembran, die

mit den Meningen assoziiert ist, in der ventrikulären Zone und der Marginalzone der sich entwickelnden zerebralen Wand entlang des Migrationsstroms der Neurone exprimiert. Glial-sekretiertes Laminin fungiert als ein Substrat für die neuronale Adhäsion. Fibronektin ist initial in der ventrikulären Zone zu finden und beeinflusst dort die Neurogenese³³. Im Gegensatz zu Laminin und Fibronektin wird Tenascin erst später in der Entwicklung exprimiert, wenn die Radialgliazellen zu Astrozyten differenzieren³⁴. Die Migration der Neurone wird auch durch die Interaktion von L1-CAM mit β 1-Integrin in der intermediären Zone und der Marginalzone vermittelt³⁵⁻³⁷.

Neurone exprimieren verschiedene β 1- und β 3-Integrine, die durch ihre Interaktion mit der extrazellulären Matrix (Fibronektin, Laminin, Kollagen)^{38,31} neben der Migration auch das Auswachsen der Neuriten vermitteln. So regulieren α 3 β 1- und α 9 β 1-Integrin über die Bindung an Laminin und Tenascin das Auswachsen von Axonen in den dorsalen Wurzelganglionneuronen^{39,40}. Aber auch für die dendritische Differenzierung sind β -Integrine substantiell. Sie sind beteiligt an der Adhäsion der Neurone und vermitteln Signale für die Reorganisation des Aktinzytoskelettes^{32,38,41}. Eine Stimulation der Integrine mit Laminin oder Semaphorin 7A verstärken das Wachstum von Dendriten in der kortikalen Primärkultur⁴². Eine Blockade der Integrine führt zu einer Retraktion der Dendriten in retinalen Ganglionzellen *in vivo*.⁴³ In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass auch in hippokampalen Neuronen β 1-Integrin für die Differenzierung der Dendriten sowohl in der hippokampalen Kultur als auch *in vivo* benötigt wird^{27,38,41,43,44}. Eine Reduktion der β 1-Integrin-Expression reduziert sowohl das dendritische als auch das axonale Wachstum⁴¹. Es konnte gezeigt werden, dass Semaphorin 3A das dendritische Wachstum in hippokampalen Neuronen über die Stimulierung der FAK (*focal adhesion kinase*)-Phosphorylierung sowie über die Erhöhung der intrazellulären cGMP- (cyclisches Guanosinmonophosphat)-Konzentration und unter gleichzeitiger Aktivierung der Integrine fördert. Eine konditionale Reduktion der β 1-Integrin- und FAK-Expression hemmt den positiven Effekt von Semaphorin 3A auf das Dendritenwachstum⁴⁴.

Ein Verlust von β 1-Integrin verstärkt die Expression von *Ascl1* (*achaete-scute homolog 1*), einem Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung GABAerger Neurone moduliert^{45,46}. Mit Hilfe der hippokampalen Primärkultur konnte belegt werden, dass β 1-Integrine die Astrozyten-abhängige exzitatorische Synaptogenese vermitteln⁴⁷.

Ein Verlust der β 1-Integrinuntereinheit im embryonalen Stadium beeinträchtigt den Pool an synaptischen Vesikeln, die notwendig sind für eine kontinuierliche Neurotransmitterfreisetzung in akuten Hippokampuschnitten^{23,48}. Synaptische Vesikel in der Präsynapse durchlaufen einen zyklischen Prozess in dem geleerte Vesikel durch aufgefüllte Vesikel aus einem zurückgehaltenen Vesikelpool und/oder durch Endozytose ersetzt werden. Beta1-Integrin-defiziente Neurone besitzen einen kleineren Pool an zurückgehaltenen Vesikeln und/oder einen Mobilisierungsdefekt der Vesikel. Dieser präsynaptische Defekt in der Entwicklung besteht auch im Erwachsenenalter weiter fort⁴⁸. Beta3-Integrine vermitteln die entwicklungsabhängige Reduktion der präsynaptischen Transmitterfreisetzung und den Wechsel der postsynaptischen NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoruntereinheit von GluN2B zu GluN2A. Der Wechsel der NMDA-Rezeptoruntereinheiten ist ein Merkmal der reifen Synapse⁴⁹.

Im adulten Hirn sind die Integrine bedeutend für die synaptische Plastizität sowie für Lern- und Gedächtnisvorgänge^{29,50}. So zeigten Warren *et al.*, dass ein Verlust von β 1-Integrinen in exzitatorischen Neuronen zu einer Reduktion der hippokampalen Synapsendichte und der dendritischen Verzweigungen in der späten Adoleszenz führt. Diese strukturellen Veränderungen beeinträchtigen die hippokampusabhängige Gedächtnisbildung.²⁷

In der reifen Synapse regulieren die Integrine die basale synaptische Transmission. So konnte in kultivierten Neuronen des Rückenmarks gezeigt werden, dass β 1- und β 3-Integrine die Anzahl an Glycinrezeptoren in der inhibitorischen Synapse kontrollieren und auf diese Weise die synaptische Stärke und die neuronale Erregbarkeit beeinflussen. Beta1-Integrine erhöhen die Anzahl an Glycinrezeptoren, während β 3-Integrine die Anzahl der Rezeptoren reduzieren^{51,23}.

Untersuchungen in hippokampalen Primärneuronen zeigten, dass β 3-Integrine eine bedeutende Rolle in der Regulierung der AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)-Rezeptoren in der exzitatorischen Synapse spielen. Verhindert man die Bindung von β 3-Integrinen an die extrazelluläre Matrix durch die Verwendung des RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure)-Peptides oder durch Überexpression einer dominant-negativen Form der β 3-Untereinheit, kommt es zu einer Reduktion der postsynaptischen AMPA-Rezeptoren und infolgedessen zu einer Abnahme der synaptischen Stärke⁵². Dieser stabilisierende Effekt der β 3-Integrine auf die AMPA-Rezeptoren ist spezifisch für GluA2-

enthaltende AMPA-Rezeptoren und scheint unabhängig von dem Aktivierungsgrad der β 3-enthaltenden Integrine oder des Aktinfilamentes zu sein⁵³. Für den stabilisierenden Effekt wird aber eine basale NMDA-Rezeptoraktivität, Ca^{2+} -Influx und die Aktivierung der kleinen GTPase *RAS-related protein* RAP1A benötigt⁵².

In den Pyramidalneuronen des Hippokampus sind auch β 1-Integrine zu finden. Sie regulieren dort die *Spine*-Morphologie durch Aktivierung der NMDA-Rezeptor-abhängigen Aktinremodellierung⁵⁴. Die β 1-Integrine sind angereichert in der postsynaptischen Dichte zu finden, wo sich auch die AMPA-Rezeptoren konzentrieren^{55,23}.

Mit Hilfe des RGD-Peptides konnte in akuten Hippokampusschnitten gezeigt werden, dass die Integrine an der Langzeitpotenzierung (LTP, *long term potentiation*) beteiligt sind. So kommt es bei der Applikation hoher Konzentrationen des RGD-Peptides zu einer Beeinträchtigung der Aufrechterhaltung der LTP in der CA1-Region des Hippokampus. Analysen mit Antikörpern gegen β 1- und α 5-Integrin^{54,56,57,23} sowie Studien an Mäusen mit einer spezifisch veränderten Integrinexpression haben gezeigt, dass α 3-, α 5-, α 8- und β 1-enthaltende Integrine bei der LTP-Aufrechterhaltung mitwirken^{26,48,50,58–60,23}.

Beta1-Integrine sind beteiligt an der Aufrechterhaltung der Synapsen und der basalen synaptischen Transmission in CA1-Neuronen des Hippokampus^{26,27,48}. Diese Funktionen sind jedoch unabhängig von der Funktion der β 1-Integrine bei der LTP. So konnte durch eine Deletion der β 1-Integrinuntereinheit in der zweiten postnatalen Woche eine Beeinträchtigung in der LTP gezeigt werden, wohingegen die synaptischen Eigenschaften unter basalen Bedingungen unverändert waren.^{26,48} In akuten Hippokampusschnitten von β 3-Integrin-defizienten Mäusen konnte eine normale LTP in den CA1-Neuronen nachgewiesen werden. Beta3-Integrine sind somit nicht essentiell für die Langzeitpotenzierung; spielen aber eine bedeutende Rolle in der synaptischen Homöostase^{60,23}.

1.2.2 Die Regulation der Aktivierung der Integrine

Integrine agieren bidirektional, um die mechanischen Signale zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zellinneren zu vermitteln (Abbildung 3). Diese Signaltransduktion erfolgt durch eine allosterische Konformationsänderung der Integrine. Inaktive Integrine liegen in einer geschlossenen Konformation vor (sowohl in der extra- als auch intrazellulären

Domäne). Die Bindung der intrazellulären Liganden Talin und Kindlin an die β -Untereinheit bzw. die Bindung von RAPL (*regulator for cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues*) an die α -Untereinheit öffnet den extrazellulären Teil der Integrine und ermöglicht die Bindung an die extrazelluläre Matrix⁶¹. Dieser Prozess wird *inside-out-Signaling* genannt und durch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Im Anschluss daran bindet beim *outside-in-Signaling* der extrazelluläre Ligand an die Schnittstelle zwischen den beiden extrazellulären Domänen der α - und β -Untereinheiten, öffnet auf diese Weise deren zytoplasmatischen Domänen und ermöglicht so die Bindung von verschiedenen Adapter- und Signalproteinen, die wiederum eine Assoziation mit dem Aktinzytoskelett vermitteln^{62,63}. Nach der Aktivierung nehmen die extrazellulären Domänen der Untereinheiten die offene Konformation ein. Infolgedessen kommt es zu einer Aktin-vermittelten Aggregation der Integrine an der Plasmamembran, die eine verstärkte Zelladhäsion ermöglicht. Der Grad der Aktivierung der Integrine kann durch die Dichte der extrazellulären Matrixproteine beeinflusst werden^{64,65,66}.

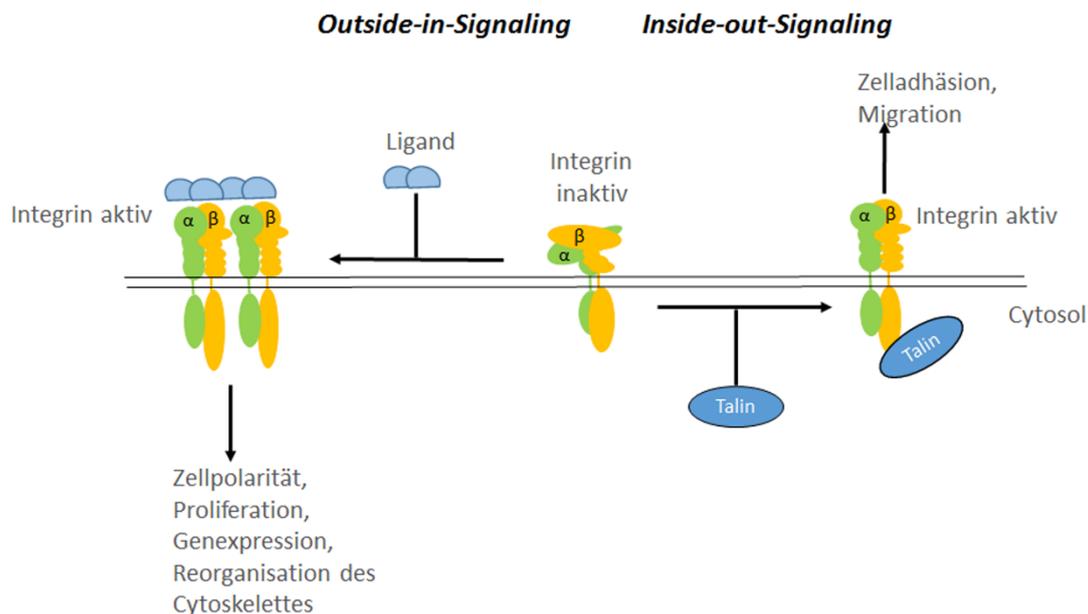


Abbildung 3: Die bidirektionale Integrinaktivierung (Modell nach Shattil *et al.*⁶¹): Durch die Bindung von extrazellulären Liganden können Integrine von der geschlossenen, inaktiven Konformation in die offene, aktivierte Konformation übergehen. Viele Liganden sind multivalent, so dass es zur Clusterbildung der Integrine kommt. Intrazelluläre Signale aktivieren Prozesse wie die Zellpolarität, Proliferation, Genexpression und Umstrukturierung des Cytoskelettes. Das *Inside-out Signaling* wird durch intrazelluläre Aktivatoren wie Talin aktiviert. Über diesen Weg werden die Stärke der Adhäsion sowie die Migration kontrolliert. Beide Wege sind oft eng miteinander verbunden.

Durch das *inside-out signaling* werden Konformationsänderungen der Integrine induziert, die die Affinität der Integrine an ihre Liganden zu binden erhöhen (Integrinaktivierung) und zu einer Clusterbildung der Integrine führen. Die Integrinaktivierung und das *Integrin-clustering* modulieren zusammen die Avidität der Integrine und ermöglichen die Zelladhäsion. Im ersten Schritt der Integrinaktivierung werden die cytoplasmatischen Enden der Integrine separiert, so dass die Ektodomänen ungefaltet vorliegen. In Folge der Konformationsänderung binden die Integrine hoch-affin an ihre Liganden und erleichtern die Akkumulation der Integrine an der Oberfläche^{67,68,69,70}.

In Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die Rap-GTPasen ein bedeutender Regulator des *Inside-out*-Signalweges sind. Über den T-/B-Zellrezeptor oder Chemokinrezeptor werden Rap1/Rap2 (*ras-related protein 1/2*) aktiviert und ermöglichen die LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) und $\alpha 4$ -Integrin vermittelte Adhäsion^{71,72}. Die Aktivierung der Rap-GTPasen erfolgt über einen *Guanine nucleotid exchange factor* (GEF), der durch die Proteinkinase C und D (PKC/PKD), cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) und cytosolisches Ca^{2+} aktiviert wird⁷⁰. Während des *inside-out-Signalings* bindet der Rap1-Effektor RAPL an die α -Untereinheit der Integrine. RAPL bildet einen Komplex mit der Serin/Threonin-Kinase MST 1 (*mammalian STE20-Like Protein Kinase 1*). Aktiviertes Rap1 rekrutiert RAPL und MST1 zu LFA-1 an die Membran⁷³.

Mit der β -Untereinheit interagieren während des *Inside-out Signalings* Talin, α -Actinin und die Mitglieder der Kindlin-Familie. Die Talin-Integrin-Interaktion ist komplex und benötigt die komplette Aktivierung von Talin über Mechanismen wie Calpain-vermittelte Spaltung, Bindung von Phosphoinositolphosphaten und Phosphorylierung. Alpha-Actinin bindet an die $\beta 2$ -Untereinheit und stabilisiert die offene Konformation. Die Mitglieder der Kindlin-Familie sind FERM-Domänen enthaltende Proteine, die mit der $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Untereinheit interagieren. Kindlin fungiert als Co-Aktivator der Integrinaktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass eine Co-Expression von Talin mit der Kindlin-2 FERM-Domäne einen synergetischen Effekt auf die Integrinaktivierung hat⁷⁴. Die Aktivierung von $\alpha \text{IIb}\beta 3$ -Integrin ist abhängig von der Interaktion von Talin mit der $\beta 3$ -Integrinuntereinheit. Rap1 ist der Phospholipase (PLC) nachgeschaltet und kann durch DAG (Diacylglycerin) und cytosolisches Ca^{2+} aktiviert werden. Rap1 induziert die Bildung eines Komplexes der Talin und den RAP1-Effektor RIAM (*rap1-GTP-interacting adapter molecule*) enthält und $\alpha \text{IIb}\beta 3$ -Integrin

aktiviert. RIAM vermittelt die Rekrutierung von Talin und demaskiert die β 3-Bindungsseite in der Talin F3-Domäne. RIAM verbindet Rap1 mit ADAP (*adhesion and degranulation promoting adaptor protein*) und SKAP55 (*Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa*), die beide für die TCR-vermittelte Integrinaktivierung essentiell sind. ADAP und SKAP55 rekrutieren aktiviertes Rap1 zur Membran⁷⁵. Die Bildung des Rap1/RIAM/ADAP/SKAP55-Komplexes an der Membran ist ein wichtiger Schritt insofern Talin aktiviert wird und die Integrinenden entfaltet werden.

Viele Integrine erkennen in ihren Liganden der extrazellulären Matrix die RGD-Sequenzen über die eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden aktiviert werden, die wiederum die Adhäsion, Proliferation, Cytokinproduktion sowie die Migration und die Differenzierung vermitteln (*outside-in-signaling*)²⁸. Die Aktivierung der Src-Kinase-Familie ist ein wichtiger Schritt im *outside-in*-Signalweg der Integrine. Src-Kinase phosphorylieren unter anderem ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*)-enthaltende Adapterproteine, die Syk/Zap-70 rekrutieren und aktivieren. Syk/ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) phosphoryliert seinerseits Slp-76 (*SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa*) und Vav. Vav aktiviert Rho-GTPasen, die das Aktincytoskelett reorganisieren. In T-Zellen wird ADAP benötigt um β 1- und β 2-Integrine nach TCR (*T cell-receptor*)-Stimulation zu aktivieren. In neutrophilen Granulozyten ist ADAP bedeutend für *outside-in*-Aktivierung der Integrine. ADAP-defiziente neutrophile Granulozyten zeigen eine gestörte Adhäsions-induzierte Superoxid-produktion⁷⁶.

Die Wege der Integrinaktivierung sind eng miteinander verbunden. So führt beispielsweise eine intrazelluläre Aktivierung zu einer verstärkten Bindung des Liganden und zieht dann eine *Outside-in*-Aktivierung nach sich. Darüber hinaus können die Integrine auch durch die Bindung divalenter Kationen, wie Magnesium und Mangan, aktiviert werden. Durch die Bindung der Katione an die α -Untereinheit der Integrine wird eine Konformationsänderung induziert, die die Affinität der Ligandenbindung erhöht und so die Aktivierung verstärkt^{77,78}.

Im Nervensystem scheinen die meisten Integrine in aktiver Form vorzuliegen, so dass nicht nur die Aktivierung der Integrine wesentlich ist, sondern auch die Inaktivierung von Integrinen. So wurde in verschiedenen Zelltypen gezeigt, dass die Aktivierung von ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) die Integrinaktivierung supprimiert. Ein weiterer Negativregulator ist Filamin A, das mit Talin um die Bindung an die β -Untereinheit

konkurriert⁶¹. Die Inaktivierung der Integrine kann an jedem Schritt des *inside-out*-Signalweges erfolgen⁶¹. Über die Regulation der Integrinaktivität durch den *inside-out*-Signalweg in Neuronen ist bisher jedoch wenig bekannt.

Während der neuronalen Migration werden Integrine in der Plasmamembran ständig umverteilt und vermitteln so die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskelettes. Die Zusammensetzung von Lipiden und Proteinen in der Plasmamembran wird durch Endo-/Exozytose-Signalwege reguliert. Diese Signalwege beeinflussen somit die Verfügbarkeit von Integrinen in der Plasmamembran⁷⁹. Die Endozytose von Integrinen erfolgt durch Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Signalwege. Die Clathrin-Adapterproteine DAB2 (*disabled homologue 2*), NUMB und AP2 regulieren die Endozytose der Integrine indem sie Clathrin zu den Integrinen rekrutieren. Die GTPase Dynamin induziert die Abschnürung der Clathrin-umhüllten Plasmamembran. Die Phosphorylierung von NUMB reguliert die Internalisierung der Integrine⁷⁹. Die GTPase Rab5 und EEA1 (*early endosome antigen1*) transportieren die internalisierten Vesikel zu den frühen endosomalen Kompartimenten in denen die Sortierung der Integrine für den lysosomalen Abbau oder den endosomalen Recyclingweg erfolgt. Über Rab4 bzw. Rab11 und Arf6 (*ADP-ribosylation factor 6*) werden die Integrine wieder zu der Plasmamembran transportiert und durch Exozytose wieder in die Plasmamembran integriert⁷⁹. Durch die Endo- und Exozytose der Integrine können Neurone beim Auswachsen und der Migration ihre Bindung an die extrazelluläre Matrix regulieren⁸⁰.

1.3 Das hämatopoetische Adapterprotein ADAP

1.3.1 Die funktionelle Bedeutung von ADAP im Immunsystem

Das Immunsystem und das Nervensystem teilen sich mehrere Mechanismen sowohl in Bezug auf die Erkennung und Interaktion von Zellen und der extrazellulären Matrix als auch in Bezug auf die daran anschließenden intrazellulären Signalkaskaden.

Wie auch im Nervensystem sind dabei die Integrine von großer Bedeutung. Sie vermitteln die Interaktion der T-Zellen mit Endothelzellen oder Antigen-präsentierenden Zellen (APC *antigen-presenting cells*). Durch Stimulation des T-Zellrezeptors, den Peptid-MHC-Komplex (*major histocompatibility complex*) oder durch Stimulation von Chemokinrezeptoren wird

die Konformationsänderung der Integrine induziert, die die Ligandenbindung (Affinität) erhöht und die Gruppierung von Integrinen an der Zelloberfläche (Avidität) vermittelt. Aber auch hier können die Integrine durch direkte Ligandenbindung von außen aktiviert werden und Signale an die T-Zelle weitergeben. Auf diese Weise wird die T-Zelle co-stimuliert, um die Signale zu verstärken und die Proliferation und Migration von T-Zellen zu aktivieren. Für diese bidirektionale Signalkaskade ist die Bildung eines Signalosoms (makromolekularen Komplexes) bestehend aus Tyrosinkinase, wie den Src-Kinase-familienmitgliedern Fyn und Lck sowie RIAM und RAPL (*regulator for cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues*), und verschiedenen Adaptermolekülen notwendig.

Das Adapterprotein ADAP (*adhesion and degranulation promoting adaptor protein*) ist ein bekanntes Adaptermolekül des hämatopoetischen Systems und spielt bei der Regulierung der Integrinaktivierung in T-Zellen eine wichtige Rolle^{75,81-86}. ADAP wurde als ein Interaktionspartner der Src-Kinase Fyn und des zytosolischen Adapterproteins Slp-76 (*SH2-domain-containing Leucocyte Protein of 76 kDa*) identifiziert. Häufig verwendete Synonyme für ADAP sind Fyb (*Fyn-binding protein*), und Slap-130 (*Slp-76 associated phosphoprotein of 130 kDa*). ADAP wird neben den T-Zellen auch in den Makrophagen, Thrombocyten, Monozyten, Mastzellen und natürlichen Killerzellen exprimiert. Während der B-Zellentwicklung ist ADAP in den frühen Stadien im Knochenmark zu finden, wird aber nicht in den reifen B-Zellen exprimiert^{85,87}.

Es existieren zwei Isoformen von ADAP, die durch alternatives *Splicen* erzeugt werden und sich durch eine Insertion von 44 Aminosäuren im Molekulargewicht von 120 kDa bzw. 130 kDa unterscheiden. Das 130 kDa große ADAP (ADAP p130) wird vor allem in den peripheren T-Zellen exprimiert; ADAP p120 kDa hingegen in den Thymocyten. Ein funktioneller Unterschied zwischen den beiden Isoformen wurde bisher nicht beschrieben⁸⁵.

Als cytosolisches Adapterprotein besitzt ADAP keine katalytischen Domänen und verfügt so weder über eine enzymatische Aktivität noch eine Kinase- oder Transkriptionsaktivität. ADAP selbst besitzt aber verschiedene Domänen und Motive, die die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen^{85,86,88} (Abbildung 4).

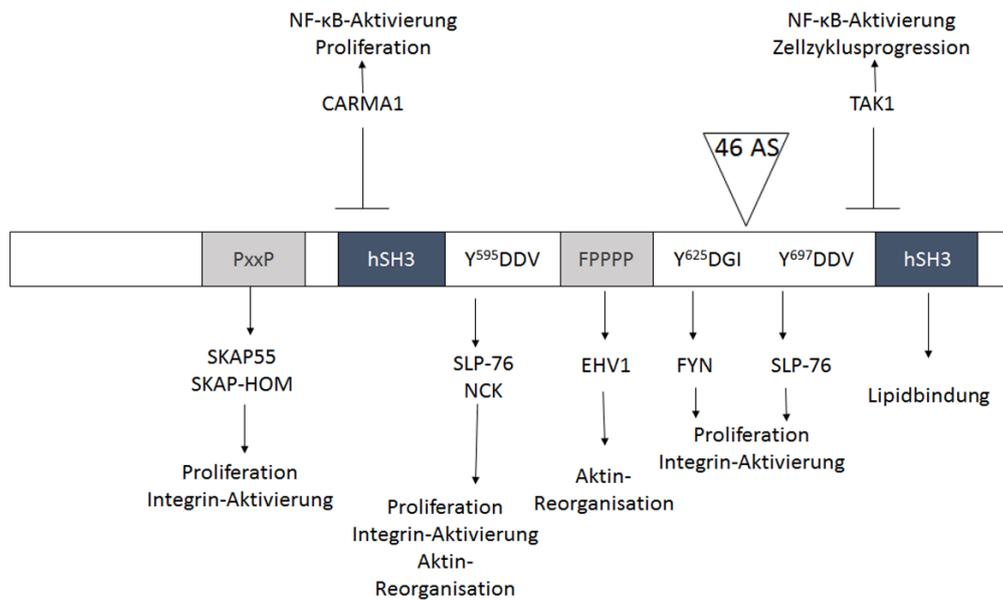


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von ADAP nach Engelmann *et al.*, 2015⁸⁸: Es existieren zwei Isoformen von ADAP p120/p130. Diese beiden Isoformen unterscheiden sich in einer Insertion von 46 Aminosäuren an Aminosäureposition 637. In dieser Abbildung ist die Struktur des humanen ADAP 130kDa dargestellt. ADAP besitzt eine Prolin-reiche Domäne (PxxP), zwei helikale SH3-Domänen (hSH3), eine Bindungsdomäne (FPPPP) für die Ena/Vasp-Proteine (EHV1) und mehrere Tyrosin-basierte Phosphorylierungsstellen (Y). Die Prolin-reiche Domäne vermittelt die konstitutive Interaktion von ADAP mit SKAP55/SKAP-HOM und somit Proliferation und Integrin-Aktivierung. SLP-76, NCK und Fyn erkennen die Sequenzmotive YDGI, YDDV und aktivieren so Proliferation, Integrin-Aktivierung und Aktin-Reorganisation. Die N-terminale SH3-Domäne von ADAP assoziiert mit CARMA1, BCL-10 und MALT1, die zusammen im CBM-Komplex NF-κB aktivieren. Innerhalb des CBM-Komplexes bindet ADAP ebenfalls TAK1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*).

ADAP besitzt eine N-terminale Prolin-reiche Domäne (PxxP), die die Interaktion mit SKAP55 (*Src-kinase associated phosphoprotein of 55 kDa*) / SKAP-HOM (SKAP55-Homolog) vermittelt und für die Proliferation und Integrinaktivierung bedeutend ist^{85,86,88}. Durch die N-terminale helikale SH3 (*src-homology 3*) (hSH3) assoziiert ADAP mit CARMA1, BCL-10, und MALT1, die zusammen den CBM-Komplex bilden, und trägt so zur Aktivierung von NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) nach der T-Zellrezeptorstimulation bei. ADAP assoziiert innerhalb dieses Komplexes mit TAK1 (*transforming growth facctor β activated kinase*) und reguliert dann ebenfalls die NF-κB-Aktivierung und die Zellzyklusprogression. Fyn, Slp-76 und NCK (*non-catalytic region of tyrosin kinase adaptor protein1*) erkennen die Motive YDDV (Tyrosin-Asparaginsäure-

Asparaginsäure-Valin) und YDGI (Tyrosin-Asparaginsäure-Glycin-Isoleucin) und vermitteln darüber die Aktivierung von Integrinen, Proliferation und die Reorganisation des Aktinzytoskelettes. Über die Aminosäuresequenz FPPPPP (Phenylalanin-Prolin-Prolin-Prolin-Prolin-Prolin) wird zudem die Interaktion mit den Ena-VASP-Homologie-Proteinen (EHV) vermittelt, die für die Reorganisation des Aktinzytoskelettes von Bedeutung sind. Die C-terminale SH3-Domäne von ADAP ermöglicht die Bindung von sauren Lipiden, wie den Phosphatidyl-inositolphosphaten PIP₂ und PIP₃ *in vitro*^{89,90}.

Weitere Adaptermoleküle, die vorwiegend in T-Zellen exprimiert werden, sind SKAP55 und SKAP-HOM. Im Gegensatz zu SKAP55 wird SKAP-HOM nicht nur in T-Zellen exprimiert, sondern auch in vielen anderen Zelltypen.

In Jurkat-T-Zellen konnte durch Depletionsexperimente gezeigt werden, dass ca. 70 % des endogen exprimierten ADAP konstitutiv an SKAP55 gebunden vorkommt^{86,91}. Ein Verlust von ADAP führt in Jurkat-T-Zellen zu einem Verlust des SKAP55-Proteins. Die mRNA von SKAP55 bleibt hingegen nachweisbar. Der Verlust von SKAP55/SKAP-HOM konnte auch in den T-Zellen von ADAP-defizienten Mäusen belegt werden. Huang *et al.*, berichten, dass ADAP SKAP55 vor einer Proteasom- und Caspase-induzierten Degradation schützt, indem es SKAP55 von einer detergenzlöslichen in eine detergenzunlösliche Fraktion überführt^{92;86}. Aufgrund der stabilisierenden Eigenschaften von ADAP auf die SKAP55/ SKAP-HOM-Expression sind ADAP-defiziente Mäuse dreifache Knock-out Mäuse. In diesen Mäusen ist weder ADAP noch SKAP55/SKAP-HOM detektierbar. ADAP-Knock-out-Mäuse weisen eine reduzierte totale Zellzahl der periphere T-Zellen auf, während der prozentuale Anteil an CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nicht beeinflusst ist^{82;86}. Verschiedene Studien an transgenen Mäusen zeigen, dass ADAP für die positive und negative Selektion der T-Zellen notwendig ist⁹³. Die peripheren ADAP-defizienten T-Zellen zeigen nach einer T-Zellrezeptorstimulation mit CD3/CD28 eine Beeinträchtigung der Interleukin-2 (IL-2)- und Interferon γ (IFN γ)-Produktion sowie eine verminderte Proliferation. Auch die NF- κ B- und die MAPK-JNK-Aktivierung ist in ADAP-Knock-out-T-Zellen nach CD3/CD28 Stimulation beeinträchtigt, wohingegen die Aktivierung von ERK1/2 und p38 nicht beeinflusst ist. Ein Verlust von ADAP führt zu einer verminderten Interaktion der T-Zellen mit den Antigen-präsentierenden Zellen, sowie zu einer Veränderung in der TCR-vermittelten Adhäsion der β 1- und β 2-

Integrine und einer verminderten Cluster-Bildung von LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*)^{82,94}.

Diese Studien belegen, dass ADAP in den T-Zellen die Aktivierung von Integrinen und NF- κ B sowie die Zellzyklusprogression und die Cytokinproduktion (IL-2 und IFN γ) wesentlich beeinflusst.

1.3.2 Integrinaktivierung durch ADAP

Mit Hilfe von Immunpräzipitationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Rap1 Effektor-Proteine RIAM⁹⁵ und RAPL⁹⁶ mit dem ADAP/SKAP55-Modul assoziiert sind. SKAP55 agiert als der Bindungspartner von RIAM und RAPL. Die Chemokinrezeptor-vermittelte Affinitäts- und Aviditätsregulierung erfolgt über zwei unabhängige Komplexe des ADAP/SKAP55-Moduls. Der eine Komplex besteht aus RIAM, MST1, Rap1, Talin und Kindlin-3. Der zweite Komplex enthält RAPL, MST1 und Rap1. Beide Komplexe benötigen das ADAP/SKAP55-Modul um LFA-1 nach der Chemokinrezeptoraktivierung zu binden. Dabei interagiert die α -Kette (CD11a) von LFA-1 über RAPL und die β -Kette über Kindlin-3 mit dem ADAP/SKAP55-Modul. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Assoziation des ADAP/SKAP55-Moduls mit RIAM und RAPL bedeutend für die Chemokinrezeptor-vermittelte Integrinaktivierung ist⁸⁶. Aber auch nach der T-Zellrezeptoraktivierung spielen die beiden Komplexe eine entscheidende Rolle. So wurde gezeigt, dass eine fehlende Interaktion von SKAP55 mit RIAM zu einer verminderten T-Zellrezeptor-vermittelten Adhäsion und T-Zellinteraktion mit den Antigen-präsentierenden Zellen führt. Desweiteren führt der Verlust des ADAP/SKAP55-Modules zu einer abgeschwächten Rekrutierung von RIAM an die Plasmamembran. Auch in ruhenden T-Zellen konnte eine konstitutive Interaktion des ADAP/SKAP55-Moduls mit den beiden einerseits aus RAPL/MST1 oder andererseits aus RIAM/MST1/Kindlin-3 bestehenden Komplex gezeigt werden. Das ADAP/SKAP55-Modul ist damit auch ein kritischer Faktor für die T-Zelladhäsion und die Interaktion von T-Zellen mit den Antigen-präsentierenden Zellen.

1.3.3 NF- κ B-Aktivierung durch ADAP in T-Zellen

Nach der T-Zellrezeptoraktivierung kann ADAP auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren⁹⁷⁻¹⁰⁰. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt dabei über einen Pool von ADAP, der nicht an SKAP55 gebunden ist¹⁰¹. Es konnte gezeigt werden, dass ADAP zu 70 % im Komplex mit SKAP55 vorkommt und für die Integrinaktivierung verantwortlich ist und die anderen 30 % von ADAP in die NF- κ B-Aktivierung involviert sind. Die CD3/ CD28-Stimulation führt in T-Zellen zur Aktivierung der IKK-Kinase (IKK-Komplex). Dieser Komplex besteht aus den katalytischen Untereinheiten IKK α , IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ . Die Aktivierung von IKK führt zur Phosphorylierung von IKK α . Die anschließende Ubiquitinierung ermöglicht die Degradation von IKK α und die Translokation von NF- κ B in den Kern und die Transkription initiiert wird⁸⁶.

Nach der CD3/CD28-Stimulation wird durch die aktivierte Proteinkinase theta (PKC θ) CARMA1 (*caspase recruitment domain-containing protein 11*) phosphoryliert. Phosphoryliertes CARMA1 rekrutiert Bcl10 (*B-cell lymphoma/leukemia 10*) und MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) und es entsteht der CARMA1-Bcl10-MALT1 (CBM)-Komplex. TRAF6, eine E3-Ubiquitinligase, interagiert mit dem CBM-Komplex und polyubiquitiniert die IKK γ -Untereinheit. PKC θ führt zur Aktivierung der TAK-1 Kinase, die die IKK β -Untereinheit phosphoryliert. Sowohl die Polyubiquitinierung von IKK γ als auch die Phosphorylierung von IKK β sind elementar für die IKK-Aktivierung^{102,103}.

Ein Verlust von ADAP führt in T-Zellen zu einer Beeinträchtigung der Polyubiquitinierung von IKK γ und der Phosphorylierung von IKK β ⁹⁸. ADAP ist bedeutend für die Bildung des CBM-Komplexes und kontrolliert über die Interaktion mit CARMA die Polyubiquitinierung von IKK γ sowie die TAK1-vermittelte Phosphorylierung von IKK β . Für diese Interaktionen sind zwei unabhängige Regionen von ADAP verantwortlich (Abbildung 5)^{93,94}.

Durch die Interaktion von ADAP mit CARMA1 wird ebenfalls die Expression von Cyclin E und Cdk2 (*cycline dependent kinase*) beeinflusst¹⁰⁴. Diese beiden Cycline sind wichtig für die Zellzyklusprogression, denn sie vermitteln den Übergang von der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase. In ADAP-defizienten T-Zellen kommt es nach TCR/CD28 Stimulation zu einer

Blockade der Zellzyklusprogression während des Überganges von der G1-Phase in die S1-Phase⁸⁶.

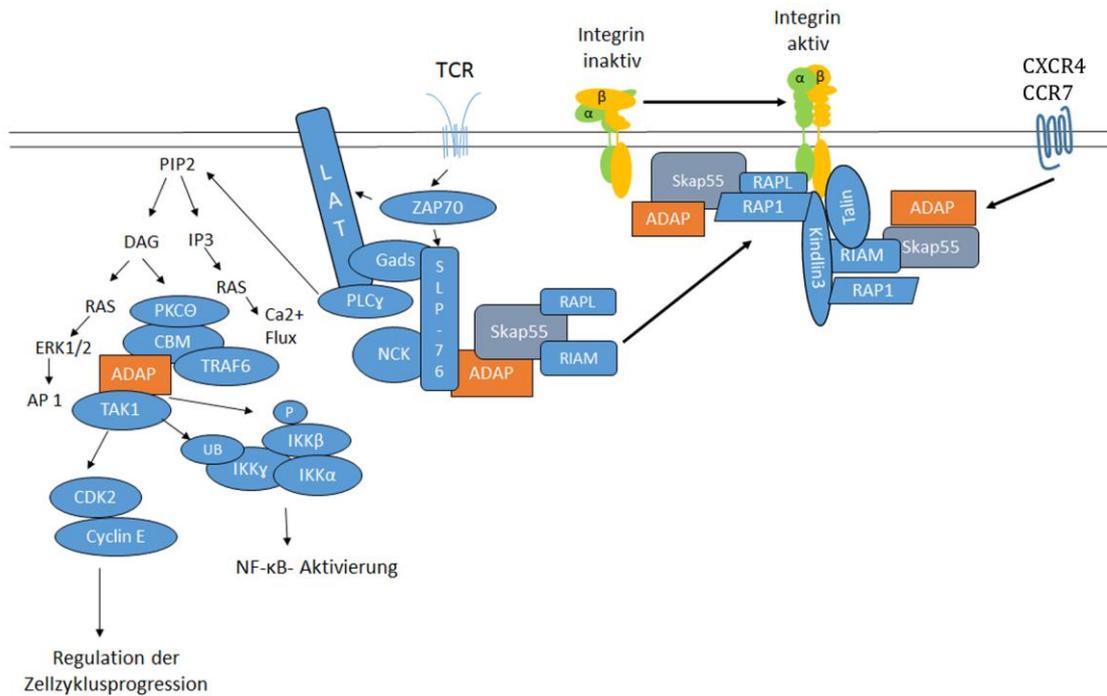


Abbildung 5: ADAP in der T-Zell- und Chemokinrezeptor-vermittelte Signalkaskade nach Zou *et al.*, und Witte *et al.*,^{86,105}: In ruhenden T-Zellen befindet sich SLP-76 im Zytosol und bindet konstitutiv Gads. Nach der T-Zellrezeptoraktivierung (TCR) und der Aktivierung von Lck und ZAP70 wird LAT phosphoryliert und erzeugt eine Bindungsstelle für Gads. Gads wird zum phosphorylierten LAT rekrutiert und bringt SLP-76 mit in diesen aktivierten Komplex. PLCγ bindet stabil an SLP-76 und phosphoryliertes LAT. Daraus resultieren eine Calciumfreisetzung, die Aktivierung von NFAT und die Produktion von DAG. Durch DAG wird Ras und PKCθ aktiviert. Ein kleiner Teil des ADAP-Pools ist involviert in der Gruppierung von PKCθ/CBM/TRAF6/ADAP/TAK1 zu einem Signalkomplex. ADAP reguliert die Ubiquitinierung von IKKγ durch TRAF6 und die IKKβ-Phosphorylierung durch TAK1, so dass IKKα phosphoryliert wird und es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB kommt. Durch die Interaktion von ADAP mit CARMA1 und TAK1 wird die Expression von CDK2 und Cyclin E beeinflusst. ADAP ist auf diesem Weg an der Zellzyklusregulation beteiligt. Die TCR-Aktivierung resultiert in der Phosphorylierung von SLP-76 durch ZAP-70 und ermöglicht so die Bindung von Nck und ADAP an SLP-76. Der größere Teil von ADAP ist konstitutiv an SKAP55 gebunden und SKAP55 bindet RIAM und RAPL und aktiviert Integrine an der T-Zelloberfläche (*inside-out*-Aktivierung der Integrine). Die Aktivierung der α-Kette via RAPL scheint unabhängig von der β-Kette via Kindlin-3 zu erfolgen. ADAP kann auch infolge einer Chemokinrezeptoraktivierung (CXCR4/7) Integrine aktivieren.

1.3.4 Die Tyrosinproteinkinase Fyn

Die Expression und Funktion von ADAP ist für das Nervensystem bisher nicht beschrieben worden. Es gibt jedoch Studien, die die Bedeutung der Fyn-Kinase, einem Bindungspartner von ADAP, im Nervensystem belegen. Fyn ist eine Protoonkogen-Tyrosinproteinkinase und

ein Mitglied der Src-Kinasefamilie, die in T-Zellen und in neuronalen Zellen verantwortlich für die Entwicklung und die normale Zellphysiologie ist^{106,107}.

Im Immunsystem ist Fyn bedeutend für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, Migration, Adhäsion und die Cytokinproduktion¹⁰⁶. Über die Integrin-vermittelte Aktivierung des PI3K/Rac2-abhängigen Signalweges ist Fyn an der Reorganisation des F-Aktins und der Chemotaxis der Mastzellen beteiligt^{106,107}. In Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass Fyn mit $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin interagiert¹⁰⁸. Im Immunsystem wird ADAP durch Fyn phosphoryliert¹⁰⁹. Fyn und ADAP sind an vielen Prozessen zusammen beteiligt.

Im Nervensystem ist Fyn bedeutend für die Migration, die Myelinisierung, das Neuritenwachstum, die synaptischen Plastizität und die Regulation von exzitatorischen und inhibitorischen Rezeptoren¹¹⁰.

Ein Verlust von Fyn führt in der Entwicklung zu einer verminderten Myelinisierung durch die Reduktion des Myelin-basischen Proteins, sowie zu einer Reduktion in der Zahl der Oligodendrocyten.¹¹¹

In anatomischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von Fyn zu einer erhöhten Anzahl an Körnerzellen im *Gyrus dentatus* sowie zu einer erhöhten Anzahl an Pyramidalneuronen in der CA3-Region des temporalen Hippokampus führt¹¹². Im medialen Kortex sind die Dendriten der Pyramidenzellen in der Schicht V nicht richtig angeordnet und später generierte Neurone befinden sich in tieferen Schichten als in den Kontrollmäusen. Die Fyn-Mutanten weisen einen neuronalen Phänotyp auf, der an die Reelin-defizienten Mäuse erinnert. Mit Hilfe biochemischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Fyn an der Reelin-induzierten Phosphorylierung von Dab1 beteiligt ist und auf diese Weise die Positionierung von radial migrierenden Neuronen in vielen Hirnregionen kontrolliert¹¹². Fyn-defiziente Mäuse zeigen zudem Veränderungen in den Moosfasern. Die Timm-Färbung zeigt eine wellenartige Veränderung der Moosfaserprojektion sowohl im *Gyrus dentatus* als auch in der CA3-Region¹¹³. In Fyn^{-/-}-Mäusen ist die Anzahl der Körnerzellen im *Gyrus dentatus* reduziert^{113,110}.

In kultivierten Neuronen konnte gezeigt werden, dass Fyn für das Neuritenwachstum benötigt wird¹¹⁴. So ist das NCAM-abhängige Neuritenwachstum in Fyn-defizienten zerebellaren Neuronen reduziert¹¹⁴. Im Alter von 3 Monaten und einem Jahr weisen Fyn-

Knock-out-Mäuse eine Reduktion der *Spineanzahl* im Hippokampus auf¹¹³. *Fyn*^{-/-}-Mäuse zeigen Defizite bei der Gedächtnisbildung¹¹³.

1.4 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionelle Relevanz des hämatopoetischen Adapterprotein ADAP, dem *fyn binding protein*, im Hippokampus zu untersuchen. Dazu wurde zunächst die Expression und Lokalisation von ADAP in dissoziierten hippokampalen Neuronen in verschiedenen Entwicklungsstufen in Kultur überprüft. Mit Hilfe einer akuten Manipulation der ADAP-Expression wurde dann der Einfluss des Proteins auf das Neuritenlängenwachstum in diesem System bestimmt. Schließlich untersuchte ich die an den beobachteten Effekten auf das Neuritenwachstum beteiligten zellulären Mechanismen; insbesondere die Aktivierung und Expression von β 1-Integrin und die Stimulation der NF- κ B-Aktivierung.

In einem zweiten Schritt begann ich damit die mögliche Relevanz der neuronalen ADAP-Funktionen für die Entwicklung des Hippokampus *in vivo* zu überprüfen. Hierbei fokussierte ich mich auf eine Analyse der Struktur des adulten Hippokampus, insbesondere im Hinblick auf bereits beschriebenen Veränderungen der Moosfaserprojektion in *Fyn*-defizienten Mäusen.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

Alle verwendeten Geräte und Materialien sind im Anhang I aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen durch die Nutzung einer sterilen Sicherheitswerkbank und der Nutzung von sterilen Arbeitsmaterialien und Reagenzien durchgeführt. Alle Zellen wurden bei 37°C Grad, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem Kohlenstoffdioxidgehalt (CO₂) von 5 % inkubiert.

2.2.1.1 Hippokampale Primärkultur

2.2.1.1.1 Poly-D-Lysin-Beschichtung

Für die bessere Adhäsion der Neurone an die Zellkulturware wurden die Deckgläschen und die 96 Lochplatten mit 0,05 mg/ml Poly-D-Lysin-Lösung (gelöst in 0,14 M Borsäure, Tabelle 1) überzogen. Die Deckgläschen werden vor der Beschichtung mit 70 %igem Ethanol abgesprüht. Das Poly-D-Lysin wurde für 2 Stunden bei 37°C appliziert und anschließend mit sterilem Wasser abgewaschen (4 x 15 min bei Raumtemperatur; RT), gefolgt von einem 30 minütigen Waschschrift mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

Tabelle 1 Borsäure

Borsäure
0,14 M Borsäure in Aqua dest. pH=8,4

2.2.1.1.2 Herstellung und Kultivierung von hippokampalen Primärkulturen

Für die Gewinnung hippokampaler dissoziierter Neurone wurden die Hippokampi von C57/BL6-Mäusen an Embryonaltag 18 präpariert. Die Aufarbeitung der Hippokampi erfolgte mit dem *Neural Tissue Dissociation Kit (P)* der Firma Miltenyi Biotech entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Dissoziation mit Papain erfolgte mit dem *gentleMACS Dissociator* und einer anschließenden Inkubation für 15 min bei 37°C unter Verwendung des MACSmix Tube Rotators. Mit Hilfe eines Filters mit der Maschenweite 70 µm wurden die Neurone vereinzelt. Die hippokampalen Neurone werden in DMEM + 10 % FKS (fetales Kälberserum) (v/v) +2 mM Glutamin resuspendiert und auf Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen oder in 96iger Multiwellplatte ausgesät. Die Dichte der ausgesäten Neurone betrug experimentabhängig 20.000 Zellen/cm² bis 80.000 Zellen/cm². Nach 4 Stunden wurde das Medium durch Neurobasalmedium (NBM)+2 % B27 (v/v) +0,5 mM Glutamin ersetzt. 48 Stunden nach der Präparation wurde das Gliawachstum in der Kultur durch die Zugabe von 10 µM AraC (Cytosin β-D-arabinofuranosid) gehemmt. Nach 24 Stunden erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. An DIV (*day in vitro*) 7 erfolgte ein Mediumwechsel auf NBM+2 % B27. Die Vitalität der Neurone wurde anhand der Entwicklungsstadien, die von Kaech und Banker¹¹⁵ definiert wurden, überwacht. Weiterhin wurden Kriterien wie eine regelmäßige, glatte Form des Somas, sowie ein gleichmäßiger Durchmesser der Neuriten herangezogen, um die Vitalität der Neurone zu beurteilen¹¹⁶.

2.2.1.1.3 Transfektion hippokampaler Primärkulturen

Die hippokampalen Primärkulturen wurden an *day in vitro* 7 (DIV 7) mit Lipofectamine® 2000 transfiziert. Mindestens eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt (DMEM/F12+10 % FKS). Die DNS (Tabelle 2) wurde in vorgewärmten Opti-MEM® (Modifikation von Eagle's Minimum Essential Medium) gelöst. Die Lipofectamine® 2000-Reagenz wurde ebenfalls in Opti-MEM® gelöst und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 2). Im Anschluss wurden die DNS und die verdünnte Lipofectamine®2000-Reagenz miteinander vermischt und nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. 4 Stunden nach dem der

Transfektionskomplex auf die Zellen gegeben wurde, erfolgte ein kompletter Mediumwechsel (NBM+2 % B27).

Tabelle 2 Zusammensetzung des Transfektionskomplexes

	96-Multiwellplatte	24-Multiwellplatte
Opti-MEM	2 x 10 µl	2 x 50 µl
DNA	0,25 µg	1,25 µg
Lipofectamine® 2000	0,75 µl	3,75 µl

2.2.1.1.4 Sholl-Analyse

Die Sholl-Analyse dient der morphologischen Quantifizierung von Neuronen¹¹⁷. Von einem zentralen Punkt im Soma aus werden konzentrische Kreise mit einem definierten Abstand von 10 µm gelegt. Durch die Zählung der Schnittpunkte der Neuriten mit den konzentrischen Kreisen erhält man eine qualitative Aussage über die Morphologie des Neurons. Für die Sholl-Analyse wurden hippokampale Neurone an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 fixiert und immunocytochemisch gegen MAP2 gefärbt. Die dendritischen Verzweigungen von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*)-gefüllten Neuronen an DIV 9 wurden mit Hilfe des DMI6000-Mikroskopes und der QWin-Software von Leica evaluiert. Die Diskriminierung von Axonen und Dendriten erfolgte durch eine MAP2-Färbung. Es wurden acht bis zwölf Neurone pro Bedingung und je Experiment ausgewertet. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

2.2.1.1.5 Luciferase-Reporterstudie

Die Evaluierung der NF-κB-Aktivierung erfolgte mithilfe eines Luciferase-Reporters (Dual Glow®-Luciferase-Assay). Durch die katalytische Aktivität der Luciferase reagiert Luciferin mit Sauerstoff zu Dioxetanen. Für die weiteren Analysen wird die beim Zerfall der Dioxetane auftretende Biolumineszenz herangezogen. Hippokampale Neurone wurden an DIV 7 sowohl mit den Targetplasmiden als auch mit dem NF-κB-Reporterplasmid (pGL4.3luc2p) und der internen Renilla-Kontrolle (pRL-TK) transfiziert und an DIV 9

analysiert. Für die NF- κ B-Aktivierung wurde eine Stimulation mit 10 μ g/ml Insulin und 100 ng/ml TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) für 90 min bei 37°C durchgeführt. Gemessen wurden je Stimulationsbedingung Triplikate der Lumineszenz, die dann auf die interne Kontrolle und die Kontrollbedingungen normiert wurden. Ausgewertet wurden drei unabhängige Experimente.

2.2.1.1.6 Beta1-Integrin-Expression und Aktivierung

Für die Analyse der β 1-Integrin-Aktivierung wurden die dissoziierten Neurone an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 erfolgte eine Lebendfärbung der Neurone mit dem Ratte- α -CD29-Antikörper. Dafür wurden die Neurone mit vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und der Antikörper im Anschluss mit einer Verdünnung von 1:50 in das Kulturmedium gegeben. Der Antikörper inkubierte 30 min bei 37°C und wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit Medium entfernt. Die Neurone wurden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)/Saccharose für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit Maus- α -MAP2 (1:1000 in 5% BSA (*bovine serum albumin*) /PBS (*phosphate buffered saline*); 1 h, RT) gegengefärbt. Totales β 1-Integrin wurde mit dem Antikörper β 1-Integrin von Abcam (1:500; in 5 % BSA /PBS; 1 h; RT) gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS inkubierten die Sekundärenantikörper (Esel- α -Ratte-Cy3 (1:1000) und Esel- α -Maus Alexa 647 (1:1000) in 2,5 %BSA/PBS) eine Stunde bei Raumtemperatur.

Mit Hilfe des Lichtmikroskops DMI6000 von Leica wurden 30 Bilder im Abstand von 0,2 μ m aufgenommen und anschließend mit der *blind deconvolution*- Methode dekonvuliert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte unter gleichen Belichtungsbedingungen (Tabelle 3). Nach der Dekonvulierung wurde die Pixelintensität in den Somata, Axonen und Dendriten mit Hilfe der LASF-Software (Leica) bestimmt. Eine MAP2-Färbung ermöglichte die Unterscheidung von Axonen und Dendriten der EGFP-gefüllten Neuronen. Die einzelnen Kompartimente sind umrandet worden und die Fläche sowie die Pixelintensität der *region of interest* bestimmt worden. Für die Auswertung wurde die Pixelintensität pro μ m² kalkuliert. Für die Statistik wurden pro Bedingung und je Experiment zehn Neurone ausgewertet. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Tabelle 3 Belichtungsbedingungen für die Integrinanalyse

	EGFP	Itgb1–Cy3	MAP2-Alex 647
Belichtungszeit	160 ms	567 ms	450 ms
Intensität	4	4	4
Helligkeit	5	5	5

2.2.1.1.7 In-Cell Western™

Zur Quantifizierung der MAP2-Intensität wurde die In-Cell Western™-Methode verwendet. Dissoziierte hippocampale Neurone wurden hierzu in einer 96 Multiwellplatte mit einer Zelldichte von 56.000 Zellen pro Loch ausgesät und an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 mit 4 % PFA (Paraformaldehyd)/Saccharose fixiert. Die Zellen wurden mit PBS+0,1 % Triton-X (5 x 5 min) permeabilisiert und anschließend mit Odyssey® Blocking Puffer inkubiert. Der Primärantikörper Maus-anti-MAP2 wurde im Odyssey® Blocking Puffer im Verhältnis 1:200 verdünnt und inkubiert auf den Zellen über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde der Antikörper mit PBS+0,1 % Tween-20 (5 x 5 min) von den Zellen entfernt. Der sekundäre Antikörper Ziege-anti-Maus 800 CW (1:1000) wurde zusammen mit dem CellTag™700-Stain (1:500), der zur Normalisierung auf die Zellzahl diente, im Odyssey® Blocking Puffer mit 0,2 % Tween-20 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellen nochmals mit PBS/Tween-20 5 x 5 min gewaschen und einmal mit 1 x PBS. Die Analyse erfolgte mit dem Infrarot Scanner Odyssey® von LI-COR®. Die integrierte Intensität des MAP2-Signals (800 nm) und des CellTag™700-Stain-Farbstoffes (700 nm) wurde von mindestens 4 Löchern pro Bedingung und pro Experiment erfasst und für jedes Experiment gemittelt. Die *intraassay*-Variabilität lag zwischen 1,4 % und 8,7 %. Das MAP2 Signal wurde auf Signal des CellTag™700-Stain normalisiert. Die statistische Analyse der Signale von drei unabhängigen Experimenten erfolgte mit der einfaktoriellen Varianzanalyse.

Tabelle 4 Zusammensetzung 10 X PBS

10 X PBS
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10,1 mM NaHPO ₄
1,8 mM KH ₂ PO ₄
Add 1000 ml Aqua dest.; pH=7,4

Material und Methoden

2.2.2 Immortalisierte Zellkulturen

2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von HEK-293T-Zellen

Um tiefgefrorene HEK-293T (*human embryonic kidney 293 cells*)-Zellen in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryoröhrchen mit HEK-293T-Zellen kurz angetaut und die Zellsuspension in ein mit 10 ml Medium (DMEM+10 %FKS) gefülltes Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 300xg, 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine T25-Flasche überführt.

Zum Einfrieren von HEK-293T-Zellen wurden 1×10^6 -Zellen bei 300xg 5 min zentrifugiert und die Zellen in 1 ml Einfriermedium (70 % DMEM +20 % FKS+10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt.

2.2.2.2 Kultivierung von HEK-293T-Zellen

Die HEK-293T-Zellen wurden in 90 % DMEM + 10 % FKS bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Das Medium der Zellen wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen mit einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen pro 25 cm^2 neu ausgesät.

Die HEK-293T-Zellen wurden mit Lipofectamine® 2000 für Proteinanalysen transfiziert. Dafür wurden die Zellen in einer 6 Multiwellplatte mit einer Dichte von 900.000 Zellen pro well am Tag vor der Transfektion ausgesät. Die Transfektion erfolgte dem Herstellerprotokoll entsprechend mit einer Zugabe von 2,5 µg DNS gelöst in 125 µl Opti®-MEM und 10 µl Lipofectamine® 2000 in 125 µl Opti®-MEM. Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches Kulturmedium (3ml) ersetzt.

2.3 Immunhistologische/ Immuncytochemische Methoden

2.3.1 Immuncytochemie

Für die Immuncytochemie wurden hippokampale Neurone an DIV 3,7,9 mit 4 % PFA /4 % Saccharose für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 x PBS 3mal 10 min gewaschen und mit PBS + 0,3 % Triton-X permeabilisiert

(10 min; Raumtemperatur). Eine Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte mit 10 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die primären Antikörper inkubierten in 5 % BSA/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (10 min, RT), erfolgte die Inkubation der passenden, mit einem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper in 2,5 % BSA/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Vor dem Eindecken der Deckgläschen mit Immumount™ wurden die Deckgläschen 3 x 10 min mit PBS gewaschen.

2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

2.3.2.1 Herstellung von hippokampalen Gewebeschnitten

Für die immunhistochemische Färbung wurden PFA-fixierte Hippokampuschnitte verwendet. Für die Herstellung dieser Schnitte wurden adulte Mäuse mit Ketanest S (15 mg/kg) und Rompun (0,5 %) mittels interperitonealer Injektion narkotisiert. Für die anschließende transkardinale Perfusion wurde ein Tyrodepuffer (Tabelle 5) verwendet, dem frisches Heparin-Natriumsulfat 0,2 % zugesetzt wurde sowie eine PFA-haltige Fixierlösung. Nach der Perfusion wurde das Gehirn aus dem Schädel herauspräpariert und über Nacht in der PFA-Fixierlösung (Tabelle 6) nachfixiert.

Tabelle 5 Zusammensetzung Tyrodepuffer

Tyrodepuffer
4 g Natriumchlorid
0,1 g Kaliumchlorid
0,05 g Magnesiumchlorid
0,5 g Natriumhydrogencarbonat
0,1 g Calciumchlorid
0,025 g Natriumdihydrogencarbonat
0,5 g Glucose
add 500 ml mit dd H ₂ O

Tabelle 6 Zusammensetzung der Fixierlösung

PFA-Fixierlösung
4 % PFA (w/v)
0,1 M PBS pH=7,4

Im Anschluss wurden die Gehirne in eine Saccharoselösung (Tabelle 7) überführt, um das Gewebe vor Gefrierschäden zu schützen. Wenn die Gehirne auf den Boden des Glasgefäßes gesunken waren, wurden sie mit TissueTekO.C.T. compund in kaltem 2-Metylbutan auf Korkplättchen aufgefroren.

Tabelle 7 Zusammensetzung Saccharoselösung

Saccharoselösung
30 % Saccharose (w/v)
0,1 M PBS

Tabelle 8 Zusammensetzung der Natriumazidlösung

Natriumazid-Lösung
0,02 % Natriumazid (w/v)
0,1 M PBS

Mit Hilfe des CM1950 Kryostaten wurde 30 µm dicke Gewebeschnitte erstellt, die entweder direkt auf PLL (Poly-L-Lysin)–beschichtete Objektträger aufgezogen oder in einer Natriumazidlösung (Tabelle 8) bei 4°C aufbewahrt wurden.

Für die PLL-beschichteten Objektträger wurden Superfrost-Objektträger mit saurem Alkohol (Tabelle 9) gereinigt, getrocknet und für 5 min in eine PLL-Lösung (0,01 %) (Tabelle 10) getaucht und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Tabelle 9 Zusammensetzung Alkohollösung

Alkohollösung
1 % HCl (v/v)
70 % Ethanol (v/v)

Tabelle 10 Zusammensetzung 0,01 % PLL-Lösung

0,01 % PLL-Lösung
0,1 % PLL (v/v)
ddH ₂ O

2.3.3 Timm-Färbung

Die Moosfasern des Hippokampus lassen sich sehr gut mit Hilfe der Timm-Färbung, einer Zinksulfidfärbung, sichtbar machen. Das Prinzip der Färbung basiert auf einer Sulfidpräzipitation. Metallionen aus dem Gewebe können in Metallsulfide umgewandelt werden. Die Metallsulfide katalysieren die Reduktion von Silberionen durch eine reduzierende Lösung. Dabei entsteht ein dunkelbrauner bis schwarzer Niederschlag, der gut im Lichtmikroskop sichtbar ist^{118,119}. Die Moosfasern des Hippokampus enthalten in ihren Terminalen viele zinkhaltige synaptische Vesikel, die für diese Färbung genutzt werden. Für diese Färbemethode dürfen nur metallfreie Plastik- und Glasgegenstände (Pinzetten etc.) verwendet werden, um die Bildung von unspezifischen Silberpräzipitaten während der Färbung zu vermeiden.

Um die Küvetten sowie die Objektträger von Metallen zu befreien, wurden sie eine Stunde lang in Chromschwefelsäure (92 % Schwefelsäure mit 1,3 % Chrom) eingelegt und anschließend mit ddH₂O gespült.

Herstellung von Kryostatschnitten auf Chrom-Kalium-Gelatine-beschichteten Objektträgern

Die vom Metall befreiten Objektträger wurden mit einer Gelatinelösung (0,5 % Gelatine (w/v), 0,05 % Chromalaun (w/v), ddH₂O) beschichtet und anschließend im Wärmeschrank über Nacht bei 40°C getrocknet.

Für die Timm-Färbung müssen für die Perfusion der Tiere spezielle Puffer verwendet werden. Die Blutgefäße werden mit dem Sulfidpuffer (0,15 M Natriumsulfid, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat) gespült, bevor das Gewebe mit dem Phosphat/Glutaraldehydpuffer (2 % Glutaraldehyd, 0,2 M Phosphatpuffer) (Tabelle 11) fixiert wird. Für die Nachfixierung werden die Hirne in eine Glucose/Glutaraldehydlösung (20 % D-Glucose (w/v), 2 % Glutaraldehyd (v/v)) gelegt.

Tabelle 11 Phosphatpuffer für die Timm-Färbung

0,2 m Phosphatpuffer pH 7,4 (PB)
0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat
pH-Wert mit 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat eingestellt

Die Gehirne wurden auf Trockeneis angefroren und anschließend mit der Schnellfrostfunktion des Kryostaten horizontal auf den Objektkopf aufgefroren. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 40 µm beginnend in der midseptotemporalen Ebene bis hin zum Ende des ventralen Hippokampus angefertigt. Jeder zweite Schnitt wurde auf die Gelatine-beschichteten Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet.

Timm-Silbersulfid-Färbung

Die Timm-Färbung erfolgte in einem Wärmeschrank bei 25°C-30°C. Die aufgezogenen Gewebeschnitte wurden für 30 min in die Timm-Färbelösung (Tabelle 12) getaucht und im Anschluss zum Beenden der Färbereaktion in ddH₂O überführt. Die Fixierung der Färbung erfolgt mit 1 % Natriumthiosulfat (w/v) für 5 min. Danach wurden die Schnitte noch zweimal kurz mit ddH₂O gespült bevor die Färbung der Nuclei mit 3 % Methylenblau (w/v) für 10 s erfolgte. Die anschließende Entwässerung der Schnitte erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Erst wurden die Schnitte kurz in 70 % Ethanol (v/v), dann je 5 Minuten in 95 % Ethanol (v/v), 2 x 5 min in 100 % Ethanol und 2 x 5 min in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurden mit Entellan™ und einem Deckgläschen eingedeckt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle 12 Zusammensetzung der Timm-Färbelösung

Timm-Färbelösung
80 ml ddH ₂ O
5,1 g Zitronensäure
4,7 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
3,4 g Hydrochinon
120 ml 50 % Gummi Arabicum (w/v), versetzt mit 0,02 % Thymol (w/v)
0,17 g Silbernitrat (in 1 ml ddH ₂ O gelöst, frisch dazugeben)

Für die Auswertung wurde der ventrale Hippokampus aller Timm-gefärbten Schnitte mit einer fünffachen Vergrößerung mit Hilfe des Zeiss-Mikroskopes AxioOmager Z1 und der Software AxioVision aufgenommen. Die Bilddateien wurden im JPEG-Format exportiert und die RGB-Farbkodierung des Bildes mit der QWin-Software in Grauwerte umgewandelt. Für die Auswertung wurden nur kontrastreiche Bereiche berücksichtigt. Durch manuelles Umranden wurde die Fläche der Axonterminalen des suprapyramidalen und des

intra/infrapyramidalen Bandes unterteilt und separate ROI's (*regions of interest*) festgelegt. Das Programm ermittelte dann automatisch die Fläche der ROI's und die Pixeldichte.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des t-Testes (Es wurden die gemittelten Werten aus zwei Schnitten pro Tier, für elf ADAP^{-/-} und sechs ADAP^{+/+}-Mäuse verwendet.)

2.3.4 DAB-Färbung

Die DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Färbung beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Das farblose DAB kann in Anwesenheit von Peroxidasen, wie der Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase* (HRP)) und Wasserstoffperoxid, oxidiert werden. Es bildet sich dann ein brauner, wasserunlöslicher Niederschlag. Da die Meerrettich-Peroxidase dabei selbst nicht verbraucht wird, kann sie mehrere Reaktionen katalysieren und das Signal verstärken. Um die endogenen Peroxidasen im Gewebe zu inaktivieren, wurden die Schnitte für 10 min in 0,3 % Wasserstoffperoxid und 5 % Methanol im Phosphatpuffer (PB; Tabelle 13) inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal 10 min lang in PB gewaschen und die Schnitte für eine Stunden mit 10 % Ziegennormalserum und 10 % BSA in PB+0,3 % Triton-X blockiert. Das Rattenserum gegen ADAP (1:10), das von Dr. Stefanie Kliche zur Verfügung gestellt wurde, inkubierte anschließend für 48 Stunde bei 4 C in 1 % BSA/PB-T. Die Schnitte wurden dreimal für 10 min bei Raumtemperatur mit Phosphatpuffer (PB) gewaschen (Tabelle 13).

Tabelle 13 Rezeptur des Phosphatpuffers für die DAB-Färbung

0,1 M Phosphatpuffer
0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat mit 0,2 M Natriumdihydrogen- phosphat auf pH-Wert 7,4 titrieren
Arbeitslösung 1:1 verdünnen mit Wasser

Tabelle 14 Zusammensetzung DAB-Lösung

DAB-Lösung
0,5 mg/ml DAB
0,025 % Cobalt-II-chlorid
0,05 % Ammoniumnickelsulfat

Der Biotin-gekoppelte Sekundärantikörper (Ziege-anti-Ratte; 1:200 in 2 % BSA/PB) wurde für eine Stunde auf die Schnitte gegeben und anschließend durch dreimaliges Waschen mit PB entfernt. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex des Vecatstain® Elite ABC-Kits wurde eine halbe Stunde vor dem Gebrauch gemäß dem Herstellerprotokoll angesetzt und inkubierte dann eine Stunde auf den Schnitten. Die Schnitte wurden erneut gewaschen (3 x 10 min in PB) und dann mit der DAB-Lösung (Tabelle 14) präinkubiert (5 min, RT). Die enzymatische Reaktion der HRP wurde durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid (Endkonzentration 0,006 %) gestartet. Die Reaktion wurde nach 1-5 min mit PB gestopt und die Schnitte wurden erneut dreimal gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet, bevor sie mit Entellan™ eingedeckelt wurden. Die Schnitte wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen der ADAP-DAB-Färbung des Hippokampus erfolgten mit Hilfe des DMI 6000-Lichtmikroskops von Leica.

2.3.5 Nissl-Färbung

Für eine Übersichtsfärbung des Hippokampus eignet sich die Nissl-Färbung. Bei dieser Färbung binden basische Farbstoffe wie Kresylviolett oder Toluidinblau an die negativen Reste der DNA und RNA. Mit dieser Färbung werden die Zellkerne und die Ribosomen angefärbt.

Auf PLL-beschichtete Objektträger aufgezogene Hirnschnitte wurden für eine Minute in die Kresylviolettlösung (Tabelle 15) getaucht. Mit Hilfe des Acetatpuffers (Tabelle 16) wurden die Schnitte gewaschen bis eine spezifische Färbung sichtbar war. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgt für 5 min in 100 % Ethanol und 5 min in Xylol. Mit Hilfe des Leica DMI 6000-Mikroskopes wurden Übersichtsbilder des Hippokampus aufgenommen.

Tabelle 15 Rezeptur der Kresylviolettlösung

Kresylviolettlösung
0,5 % Kresylviolett (w/v)
Acetatpuffer

Tabelle 16 Rezeptur des Acetatpuffers

Acetatpuffer (pH 3,8-4,0)
0,544 % Natriumacetat (w/v)
0,96 % Essigsäure (v/v)

2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Hippokampuschnitten

Für die Fluoreszenzfärbung der Hippokampuschnitte wurden naive ADAP^{+/+}- und ADAP^{-/-}-Mäuse verwendet. Die Schnitte wurden 5 min in PBS gewaschen und anschließend 1 Stunde in 5 % BSA/PBS-T (0,3 %) blockiert. Der primäre Antikörper Maus-anti-MAP2 (HM-2, Abcam 1 : 200 in 5 % BSA/PBS-T) inkubierte über Nacht bei 4°C und wurde am darauffolgenden Tag durch 3maliges Waschen mit PBS entfernt. Der sekundäre Antikörper Esel-anti-Maus-Alex 647 (1 : 200 in 2 % BSA/PBS) inkubierte eine Stunde bei Raumtemperatur bevor er mit PBS wieder entfernt wurde. Im Anschluss wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und luftgetrocknet bevor sie mit Fluoromount™ eingedeckt werden. Mikroskopiert wurden die Schnitte mit dem Leica DMI 6000-Lichtmikroskop.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmidpräparation

Die für die Transfektion verwendeten Plasmide wurden mit Hilfe einer Midi-Präparation mit dem Kit *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit* von Thermo Scientific Fischer aus *E.coli* (*Escherichia coli*) aufgereinigt. Die *E.coli*-Bakterien wurden aus dem Glycerolstock mit Hilfe einer Impföse auf LB (*lysogeny broth*) -Agarplatten mit Ampicillin (100µg/ml) zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Morgen wurden einzelne Bakterienkolonien in 3 ml LB-Medium+Ampicillin (100 µg/ml) für die Starterkultur

überführt. Mit Hilfe der Starterkultur wurden nach 8 Stunden die Übernachtskulturen 100 ml (1:1000) angeimpft. Die Bakterienkulturen inkubierten über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator und wurden am Morgen bei 4000xg für 10 min zentrifugiert. Die optische Dichte der Bakterienkultur betrug bei 600 nm 2.0, was in etwa einer Zelldichte von 10^9 Zellen /ml entspricht. Die Bakterienplasmide wurden entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Resuspensionspuffer R3 resuspendiert und durch Zugabe des alkalischen Puffers L7 (4 ml) lysiert. Mit Hilfe des Neutralisierungspuffers (N3; 4 ml), der SDS enthält, wird die Plasmid-DNA renaturiert und durch Zentrifugation (12000xg, 10 min) von den bakteriellen Proteinen und genomischer DNA getrennt. Die DNA wurde durch eine Anionenaustauschsäule weiter aufgereinigt. Mit Hilfe einer Alkoholfällung wurde die Plasmid-DNA konzentriert, von Salzen befreit und zum Schluss in 100 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektrometrisch mit dem NanoPhotometer (Implen, München) bestimmt. Die optische Dichte von doppelsträngiger DNS wird bei 260 nm bestimmt, die von Proteinen bei 280 nm und daraus die Konzentration bestimmt. Durch Bildung des Verhältnisses von OD_{260}/OD_{280} wurde die Reinheit der Plasmide bestimmt. Für die Transfektionen wurden nur die Plasmide verwendet, die $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$ besaßen.

2.4.2 Konstrukte

Für die Klonierung der ADAP shRNA wurde der pI3.7-Expressionsvektor¹²⁰ von Addgene verwendet. Die verwendete ADAP-shRNA-Sequenz erkennt beide Isoformen der Maus-ADAP mRNA (NM_011815.5/NM_001278269.1) und wurde mit dem *shRNA retriever online tool* (katahdin.mssm.edu) erstellt. Die Haarnadelstruktur mit der Schleifensequenz 5'TTCAAGAGA3' wurde in den pI3.7-Vektor unterhalb des U6-Promotors kloniert. Die shRNA mit der exprimierten Sequenz 5' GCCAGGATTCTCAAAGGTAGC 3' erkennt die Nucleotide 572-593. Als Kontrollen dienten in allen Experimenten ein pI3.7-Leervektor und ein *nonsense*-Konstrukt (pI3.7-sh-random 5' TCGTCATGACGTGCATAGG 3'). Die Kontrollen unterschieden sich in den von mir analysierten Parametern nicht und wurden deshalb für

die statistische Analyse und die Datenpräsentation zusammengefasst. Für die Rekonstitution wurde ein cDNA-Klon des humanen ADAP mit einem Flag-Tag¹²¹ verwendet, der nicht von der shRNA gegen das *murine*-ADAP erkannt wurde. Alle Konstrukte exprimierten unter dem Promotor des Cytomegalovirus das *enhanced green fluorescence protein*, um die transfizierten Zellen zu visualisieren.

Für die Antikörpervalidierung in HEK-293T-Zellen wurde ein *murines* ADAP mit einem His-Tag in ein pCMS4-Vektor kloniert. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Stefanie Kliche zur Verfügung gestellt. Für die Luciferase-Reporter-Analysen wurden die Plasmide pGL4.32 [luc2P/NF-kB-RE/Hygro] und pRL-TK von Promega verwendet.

2.4.3 Reverse Transkription

Die Gewinnung der cDNA erfolgte aus lysierten hippokampalen Primärkulturen an vier verschiedenen Zeitpunkten in Kultur (DIV 3, DIV 7, DIV 14, DIV 21) mit Hilfe des Cell-to-cDNA KIT™ von Ambion®.

Zuerst wurden die Zellen nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C mit 2,5x Trypsin/EDTA mit einem Zellschaber abgelöst und anschließend mit dem Cell-to cDNA-Puffer bei 75°C für 10 min lysiert. Nach dem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurde die DNS mit DNase I (0,04 U/µl) bei 37°C für 15 min verdaut. Bei 75°C für 5°min erfolgte die Inaktivierung der DNase.

Für die Reverse Transkription wurden 5 µl des Zelllysates mit 2,5 µM oligo-dT-Primern, 2,5 µM *random decamer*-Primern, 2,5 mM von jedem dNTP, 1 x Reverse Transkriptions-Puffer, 1 U/µl RNase-Inhibitor, M-MLV Reverse Transkriptase gemischt und für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 10 min bei 95°C.

2.4.4 Quantitative PCR

Die quantitative-Echtzeit-PCR (*real-time quantitative PCR; qPCR*) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht durch die Verwendung von fluoreszierenden Sonden die Detektion und Quantifizierung von spezifischen PCR-Produkten. Für die quantitative PCR wurden pro Ansatz 100 µg cDNA mit dem 1 x *TaqMan*®-Gene-Expression-

Master-Mix, 1 x genspezifische TaqMan®-Gene-Expression-Primern und 1 x Primermix für die endogene Kontrolle Gapdh-Vic® (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet (Tabelle 17). Für die Quantifizierung der DNA wurden die ct-Werte (*cycle threshold*) ermittelt. Der ct-Wert gibt an, wann die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Für die Auswertung wurden die dct-Werte (ct Gapd-ct-Target) gebildet. Es wurden für jede Bedingung pro Experiment Triplikate gemessen. Die statische Analyse der Ergebnisse erfolgt mit der einfaktoriellen Varianzanalyse.

Tabelle 17 Probenansatz für die qPCR

2xTaqMan Gene expression Mastermix	5 µl
Primer/Sonde Haushaltsgen (Gapdh)	0,5 µl
Primer/Sonde Zielgen	0,5 µl
cDNA	3 µl
Nukleasefreies Wasser	1 µl
Gesamtvolumen pro Probenansatz	10 µl

Tabelle 18 Programm für den qPCR-Cycler

SCHRITT	ZEIT	TEMPERATUR	
INITIALE DEURIDINIERUNG	2 min	50°C	
INITIALE DENATURIERUNG	10 min	95°C	
DENATURIERUNG	15 sec	95°C	} 40x
HYBRIDISIERUNG/ANNEALING	1 min	60°C	

2.4.5 Zellyse

Zur Gewinnung von Gesamtzelllysaten aus HEK-293T-Zellen wurden die Zellen in einem Laurymaltosidpuffer (Tabelle 19) lysiert. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und der Zellrasen kurz mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellen mit 1 x PBS von der Zellkulturplastik abgespült und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 300xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Laurymaltosidpuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 16000xg, 30 min, 4°C wurde die gelöste Proteine auf kleinere Aliquote aufgeteilt, eingefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 19 Rezeptur des Laurylmaltosidpuffers

Laurylmaltosidpuffer
1 % Laurylmaltosid (N-dodocyl-D-Maltosid)
1 % NP-40
1 mM Natriumorthovanadat
1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
50 mM Tris-HCl, pH=7,4
10 mM NaF (Natriumfluorid)
10 mM EDTA
160 mM NaCl

2.4.6 Nukleäre Fraktionierung

Die nukleäre Fraktionierung basiert auf dem Protokoll der subzellulären Fraktionierung von Dieterich *et al.* ¹²². Für die nukleäre Fraktionierung wurden je 6 Mäusen pro Gruppe die Hippokampi entnommen. Die Hippokampi wurden im Puffer NP 0.32h (circa 6ml/g) (Tabelle 20) mit 25 Stößen mit Hilfe des *Wheaton manual homogenizer* homogenisiert und bei 4°C und 200xg für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand S₀ wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet erneut im Puffer NP 0.32h resuspendiert. Die Zentrifugation erfolgte nun bei 400xg, 4°C für 15 min. Der entstandene Überstand wurde mit dem S₀-Überstand zusammengeführt. Das Zellpellet, das die Nuclei und Zelltrümmer enthielt, wurde in 840 µl NP 0.32h-Puffer und 2,66 ml NP 2.4 (Tabelle21) (Verhältnis 1:3,16) gelöst. Die finale Saccharosekonzentration lag bei 1,9 M.

Tabelle 20 Rezeptur des NP 0.32h-Puffers

NP 0.32h
20 mM HEPES
320 mM Saccharose
1 mM MgCl ₂
43 mM β-Mercaptoethanol
Protease Inhibitor (EDTA-frei)
Add 10 ml , pH =7,4

Tabelle 21 Rezeptur des NP 2.4-Puffers

NP 2.4
20 mM HEPES
2,4 M Saccharose
1 mM MgCl ₂
Add 15 ml

Für die Gewinnung der nukleären Fraktion wird das gelöste Zellpellet in der Ultrazentrifuge bei 70.000xg, 4°C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 550 µl NP 0.32h mit 2,31 ml NP 2.4 (im Verhältnis 1 : 4,2; finale Saccharosekonzentration 2,0 M) resuspendiert. Das gelöste Pellet wurde mit 640 µl NP 2.15 (Tabelle 22) überschichtet und erneut bei 70.000xg und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf die abzentrifugierten Kerne 100-250 µl NP 0.32 (Tabelle 23) (inklusive Proteaseinhibitor) gegeben. Die Kerne quollen über Nacht bei 4°C und wurden am nächsten Tag in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die aufgequollenen Kerne wurden erneut bei 1000xg, 4°C für 15 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in 50 µl NP 0.32 resuspendiert. Mit DNase I erfolgte für 30 min bei 37°C ein DNA-Verdau. Die DNase wurde bei 75°C für 5 min inaktiviert. Im Anschluss erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung der nukleären Fraktion.

Tabelle 22 Puffer für die Gewinnung der nukleären Fraktion

NP 2.15
20 mM HEPES
2,15 M Saccharose
1 mM MgCl ₂
Add 5 ml pH=7,4

Tabelle 23 Rezeptur des NP 0.32-Puffers

NP 0.32
20 mM HEPES
320 mM Saccharose
1 mM MgCl ₂
Add 2 ml pH=7,4

Die in S_0 enthaltene cytosolische Fraktion wurde bei 1000xg für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut bei 12.000xg für 20 min (4°C) zentrifugiert. Der Überstand S_1 enthielt die cytosolischen Proteine, deren Konzentration nun bestimmt wurde. Das Pellet enthielt die Bestandteile der Plasmamembran.

Tabelle 24 HEPES-Stammlösung

HEPES-Stammlösung
1 M HEPES; pH7,4

Tabelle 25 Magnesiumchloridlösung

MgCl ₂ -Stammlösung
2 M (9,52 g in 50 ml MgCl ₂ -freiem Wasser)

Tabelle 26 Zusammensetzung der verschiedenen Saccharoselösungen

Saccharoselösung

320 mM	10,95 g/100 ml
2,15 M	36,8 g/100 ml
2,4 M	41,08 g/100 ml

2.4.7 Proteinbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde der DC™-Protein-Assay von Biorad verwendet, der auf der Proteinbestimmung nach Lowry¹²³ beruht. Hierzu wurden 1 Teil der Probe oder des Proteinstandards in eine 96-well-Mikrotiterplatte zusammen mit 5 Teilen der Reagenz A gegeben. Nach der Zugabe der Reagenz B wurde die Platte für 5 s geschüttelt und die Absorption nach 15 min bei 750nm mit dem Tecan infinite® gemessen.

2.4.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld¹²⁴. Für die SDS-Page wurde das Mini-PROTEAN- System der Firma Biorad verwendet. Es wurde ein 8 oder 10 %iges Trenngel gegossen (Tabelle 27), das mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden in der Zwischenzeit mit dem 4 x SDS-Ladepuffer (Tabelle 28) versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert und dann auf Eis gestellt. Von jeder verwendeten Probe wurde 30 µg Protein aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine und des Proteinstandards erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung von 100 V (1x SDS-Ladepuffer 25 mM Tris, 0,25 M Glycin, 0,1 % SDS).

Tabelle 27 Zusammensetzung der SDS-Gele

	Trenngel		Sammelgel
	8 %	10 %	
H ₂ O	8,37 ml	7,12 ml	3,4 ml
Acrylamid	4,77 ml	6 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH=8,8	4,5 ml	4,5 ml	-
1,0 M Tris pH=6,8	-	-	0,63 ml
10 % SDS	180 µl	180 µl	50 µl
10 % APS	180 µl	180 µl	50 µl
TMED	18 µl	18 µl	5 µl

Tabelle 28 Zusammensetzung des SDS-Ladungspuffers

SDS-Probenladungspuffer
40 % Glycerol
8 % SDS
0,04 % Bromphenolblau
5 % Mercaptoethanol
240 mM Tris-HCl pH=6,8
Add 100 ml Aqua dest.

2.4.9 Western Blot / Immunoblot

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zu detektieren, wurden die Proteine mit Hilfe der Western-Blotting-Methode auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert und immobilisiert. Der Transfer der Proteine beruht auf dem von Towbin *et al.*,¹²⁵ beschriebenen Protokoll.

Die PVDF-Membran wurde auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des PVDFs wurde die Membran für 30 s in 100% Methanol aktiviert und dann für 2 min in Wasser (ddH₂O) gewaschen. Im Anschluss wurden die Membran, sowie das SDS-Gel und das Filterpapier in gekühltem Transferpuffer für 5 min äquilibriert. Für den Aufbau des Blottes wurden zwei in transferpuffer-getränkte Filterpapiere luftblasenfrei auf die Anodenplatte der Blotapparatur (Mini- Transblot® Cell der Firma Biorad) gelegt. Dann folgten die äquilibrierte Membran, das SDS-Gel und zwei weitere Filterpapiere. Zum Schluss wurde das Modul mit der Kathodenplatte geschlossen und in die mit Transferpuffer (Tabelle 30) gefüllte Transferkammer eingespannt. Der Transfer erfolgte in einem Eisbad für eine Stunde bei konstant 100 V.

Tabelle 29 Rezeptur 10 x SDS-Transferpuffers

10 x SDS-Transferpuffer
250 mM Tris-Base
1,92 M Glycin

Tabelle 30 Rezeptur des SDS-Transferpuffers

1 x SDS-Transferpuffer
100 ml 10 x Transferpuffer
10 ml SDS
200 ml Methanol
Add 1000 ml Aqua dest.

2.4.10 Immunologische Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde die Membran kurz in ddH₂O gewaschen und anschließend luftgetrocknet, um die aufgetrennten Proteine vollständig zu fixieren. Für die Detektion der Proteine musste die Membran wieder mit 100 % Methanol aktiviert werden. Um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver oder 5 % BSA in TBS (Tabelle 32) inkubiert. Je nach der Zusammensetzung der Blockierungslösung wurde der Primärantikörper entweder in 5 % Milchpulver in TBS + 0,1 % Tween oder in 5 % BSA/TBS + 0,1 % Tween über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T (5 x 5 min) entfernt und anschließend inkubierte der Sekundärantikörper (IRDye®Ziege-anti-Maus 680LT und IRDye®Ziege anti-Kaninchen 800CW) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 2,5 % Milchpulver/TBS + 0,01 % SDS oder in 2,5 % BSA/TBS-T + 0,01 % SDS. Der Sekundärantikörper wurde durch 5 maliges Waschen für 5 min bei Raumtemperatur entfernt. Im Anschluss wurde die Membran in 1 x TBS aufbewahrt. Die sekundären Antikörper trugen ein Fluorochrom, das die Detektion mit dem Infrarot-Scanner von Li-COR® ermöglichte.

Tabelle 31 TBS-Puffer

20 x TBS
1 M Tris-HCl
3 M NaCl
Add 1000 ml Aqua dest. pH=7,4

Tabelle 32 1 X TBS-T-Puffer

1 X TBS-T
1 x TBS
0,1 % Tween

2.5 Tierexperimentelle Methoden

2.5.1 Mäusestämme

Für die dissoziierte hippocampale Neuronenkultur wurden C57Bl/6JBomTAC-Mäuse der Firma M&BTaconic verwendet. Das Muttertier wurde nach einer Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Embryone wurden dekapitiert.

Für die biochemischen Experimente und die Verhaltensexperimente wurden ADAP/OT2-Knock-out-und Wildtyp-Mäuse⁸² verwendet. Die ADAP-Mäuse wurden von Dr. Stefanie Kliche zur Verfügung gestellt.

Die Zucht der Tiere erfolgte in der Tierhaltung der Medizinischen Hochschule Magdeburg und in der Tierhaltung des Institutes für Biologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen in einem 12 Stunden hell/12 Stunden dunkel-Zyklus (Licht aus um 6.30 GTM+1) gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß den rechtlichen Vorgaben des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalts.

2.5.2 Furchtkonditionierung

2.5.2.1 Die auditorische Furchtkonditionierung

Um die Relevanz von ADAP auf die Gedächtnisbildung zu testen, wurden ADAP-defiziente und ADAP-Wildtypmäuse furchtkonditioniert (je Genotyp zehn Tiere im Alter von 3 Monaten; je sieben Weibchen und drei Männchen). Das Paradigma der auditorischen Furchtkonditionierung beruht auf dem von Iwan Pawlow entwickelten Modell der klassischen Konditionierung¹²⁶. Ein unbedingter Reiz löst eine unbedingte Reaktion aus. Durch Kopplung des unbedingten Reizes mit einem neutralen Reiz wird der ursprünglich neutrale Reiz zum bedingten Reiz, der eine bedingte Reaktion auslöst.

Die Mäuse wurden mit dem auditorischen Protokoll nach Laxmi *et al.*¹²⁷ konditioniert (Abbildung 6). Am ersten Tag wurden die Tiere zweimal in die Trainingsapparatur gesetzt und mit der Präsentation neutraler Töne (CS-; 2,5kHz Sinuston, 85dB, für 10 s) adaptiert. Der CS- wurde pro Adaption insgesamt 6mal mit einem Interstimulusintervall von 20 s präsentiert. Am zweiten und dritten Trainingstag erfolgte nach einer je zweiminütigen

Habituation die Furchtkonditionierung der Mäuse. Hierzu wurde je dreimal der konditionierte Stimulus (CS+; 10kHz, 85dB, für 10 s) verbunden mit dem unkonditionierten Stimulus (US; elektrischer Fußschock mit 0,4 mA) präsentiert. Das Interstimulusintervall zwischen einzelnen CS+ betrug dabei 20 s. An Tag 4 wurden die Mäuse in die Trainingsapparatur gesetzt und ihr Verhalten über 6 min gemessen. Insbesondere das *Freezing*verhalten (Erstarren) wurde dabei als Maß für das erworbene Furchtgedächtnis quantifiziert. Am fünften Tag wurden die Mäuse in eine leere Käfigschale gesetzt, die so als neutraler Kontext fungierte und die Erstarrungszeit gemessen, wenn der CS- und der CS+ präsentiert wurden.

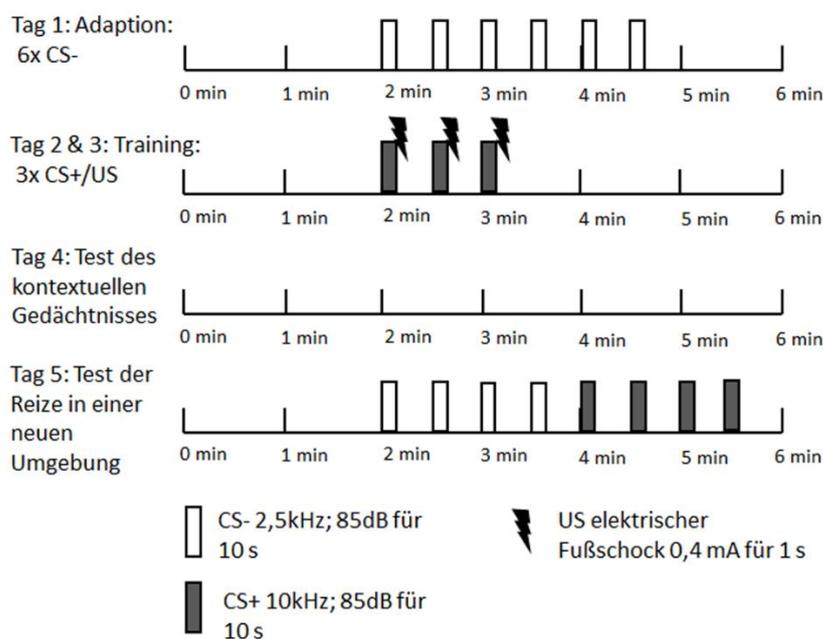


Abbildung 6: Die auditorische Furchtkonditionierung: Am ersten Tag des Trainings wird der CS- jeweils 6mal für 10 s mit einem Abstand von 20 s präsentiert. An den beiden darauffolgenden Tagen wird den Tieren der CS+ gepaart mit dem US präsentiert. Am vierten Tag wird das kontextuelle Gedächtnis abgefragt. Am fünften Tag wird die Reaktion der Tiere auf den CS- und den CS+ in einem neuen Kontext gemessen.

2.5.2.2 Das *spaced*-Training

Eine andere Methode die Gedächtnisbildung durch Furchtkonditionierung zu trainieren ist das *spaced*-Training¹²⁸. Hier erfolgt das Training weniger verdichtet (Abbildung 7). Es wurden je Genotyp 8 Tiere (je 4 Weibchen und 4 Männchen) getestet.

Material und Methoden

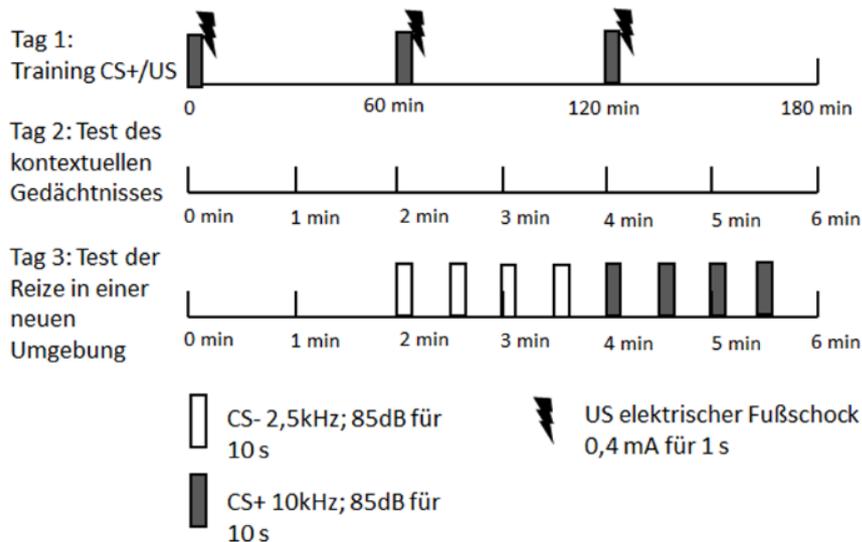


Abbildung 7: Das spaced-Training: Bei dieser Trainingsmethode wird der CS+ mit US zusammen nur einmal pro Trainingseinheit präsentiert. Das Training besteht insgesamt aus drei Trainingseinheiten, die im Abstand von einer Stunde erfolgen.

Das Training wird hierbei dreimal an einem Tag mit einem Abstand von einer Stunde durchgeführt. Während dieser Trainingseinheiten wird der CS+ verbunden mit dem US jedoch jeweils nur einmal präsentiert. Am zweiten Tag wird das kontextuelle Gedächtnis und am dritten Tag das auditorische Furchtgedächtnis wie oben beschrieben getestet.

2.5.3 Der Offenfeldtest

Der Offenfeldtest misst die allgemeine lokomotorische Aktivität der Versuchstiere in einer neuen Umgebung. Zudem vermeiden Tiere den exponierten inneren Bereich der Apparatur, der ihnen keinerlei Rückzugsmöglichkeiten bietet, was Rückschlüsse auf das Angstniveau der Tiere erlaubt. So ist ein erhöhtes exploratives Verhalten im Zentrum des Offenfeldes mit einer verminderten Angst assoziiert, wohingegen ein vermindertes exploratives Verhalten dort auf ein erhöhtes Angstniveau schließen lässt¹²⁹.

Je zehn ADAP^{+/+}- und ADAP^{-/-}-Mäuse wurden an zwei Tagen für je 20 min in eine schwarze Box (50 cm x 50 cm x 35 cm) gesetzt. Am ersten Tag wurden die Tiere bei 10 Lux getestet und am zweiten Tag im Licht (100 Lux). Die Bewegung der Tiere wurde mit der Software ANY-Maze aufgenommen und analysiert.

2.6 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS der Firma IBM durchgeführt. Dafür wurden die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und der t-test verwendet. Die Voraussetzungen der Normalverteilung der abhängigen Variablen und der Varianzhomogenität sind vor der Verwendung der ANOVA kontrolliert worden. Konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden, erfolgte mit dem *Fisher's least difference significant test* (PLSD) die *Post-hoc*-Testung.

Der t-Test für unabhängige Stichproben wurde verwendet, um Unterschiede zwischen den Genotypen der ADAP-Mäuse zu finden. Ein p-wert $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Auch für die Verwendung des t-Testes ist die Voraussetzung der Normalverteilung und der Varianzhomogenität kontrolliert worden.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Primärkultur

3.1.1 ADAP wird im Hippokampus exprimiert

Verschiedene Studien berichten, dass ADAP in vielen Zellen des hämatopoetischen Systems einschließlich T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und Thrombozyten vorkommt, jedoch nicht in reifen B-Zellen. Funktionelle Analysen in T-Zellen zeigen, dass ADAP von großer Bedeutung für die „*inside-out*“-Aktivierung von Integrinen und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist^{75,86}. Es gibt bisher keine Studien, die den funktionellen Einfluss von ADAP in neuronalen Strukturen analysiert haben. Datenbanken zeigen lediglich eine ubiquitäre Expression von ADAP-mRNA im Gehirn (Allen Brain Atlas), so dass nun die Expression von ADAP im Hippokampus gezeigt werden soll und eine erste Analyse der funktionellen Bedeutung von ADAP in neuronalen Strukturen erfolgen soll.

Die Expression von ADAP wurde in Kooperation mit Dr. Stefanie Kliche mittels Western Blot sowohl in juvenilen als auch adulten Hippokampi sowie in PC12-Zellen (Phäochromocytom-Zellen) getestet. Als Positivkontrolle dienten CD3 (*cluster of differentiation*)-stimulierte Maus-T-Zellen (Abbildung 8A). Die Expressionsanalyse wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern (ein kommerziell erworbener Maus-monoklonaler-Antikörper von BD Bioscience und ein Schafserum, das von Musci *et al.*¹²¹, beschrieben wurde) gegen ADAP überprüft. Als interne Kontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass signifikante Mengen von ADAP sowohl im juvenilen als auch im adulten Hippokampus und den PC-12 Zellen exprimiert werden. Die Spezifität des ADAP-Schafserums wurde auf Proteinlysaten von ADAP-Wildtyp (WT;^{+/+})-Mäusen und ADAP-Knock-outs (KO;^{-/-}) (Abbildung 8C) überprüft, wobei die Lysate der Knock-out-Mäuse einen Verlust der ADAP-Banden bei etwa 120 kDa (Kilodalton) zeigen.

Die weitere Etablierung des Antikörpers für die immunocytochemischen Färbungen erfolgte in HEK-293T-Zellen. HEK-293T-Zellen exprimieren kein endogenes ADAP, so dass für die Färbungen *murines* His-(Polyhistidin)-markiertes ADAP in die HEK-293T-Zellen mittels einer Transfektion eingebracht wurde (Abbildung 8B). Die fixierten Zellen wurden mit einem

Ergebnisse

Antikörper gegen den His-Tag und mit dem Schafserum gegen ADAP gefärbt. Das ADAP-Schafserum zeigt eine Färbung nur in den Zellen, die auch eine positive Färbung für den His-Tag zeigen. Nicht transfizierte Zellen zeigen nur eine Kernfärbung durch den Dapi-(4,6-Diamindin 2- phenylindol) Farbstoff.

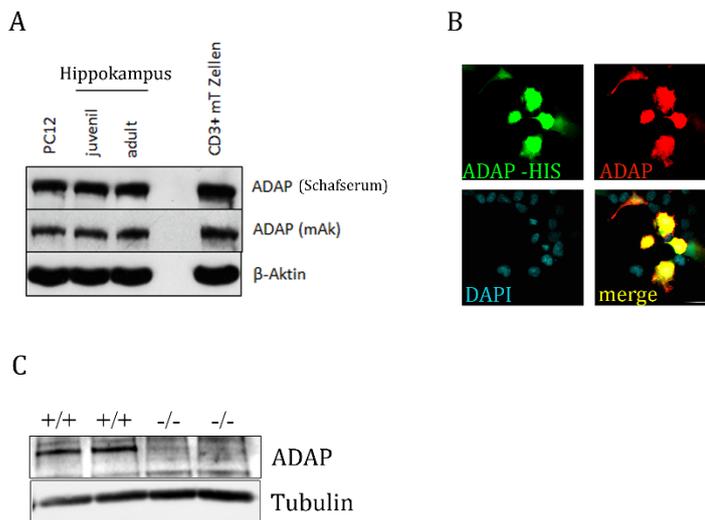


Abbildung 8: ADAP-Expression in neuronalen Zellen und Antikörperevaluierung: (A) Die Expression von ADAP wurde mit Hilfe eines Immunoblots in PC-12-Zellen als auch im juvenilen und adulten Hippokampuslysaten mit Hilfen von zwei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen. (B) Zeigt die Spezifität des Schafserums in der Immunocytochemie. HEK-293T-Zellen wurden mit einem ADAP-überexprimierenden Konstrukt transfiziert und mit dem Schafserum immunocytochemisch gefärbt. HEK-293T-Zellen exprimieren kein ADAP, so dass die Färbung als spezifisch angesehen werden kann. Maßstab 100 μm . (C) Zur Validierung des anti-ADAP-Schafserums im Immunoblot wurde ein Hippokampuslysate von ADAP-Wildtypen (+/+) und Knock-out (-/-)-Mäusen verwendet. Im Hippokampuslysate der Knock-out-Mäuse fehlt eine ADAP-Bande bei etwa 120 kDa.

In den T-Zellen kommt ADAP in zwei verschiedenen Pools vor. So existiert ADAP zu einem großen Teil im Komplex gebunden an SKAP-HOM und zu einem kleineren Teil allein⁸⁶. Beide Pools vermitteln verschiedene zelluläre Prozesse. Der aus ADAP und SKAP-HOM bestehende Komplex vermittelt die Integrinaktivierung der Zellen, während ADAP allein bedeutend für die NF- κ B-Aktivierung und die Zellzyklusprogression ist⁸⁶. Auch in den neuronalen Zellen findet man ADAP in einem Komplex mit SKAP-HOM (Abbildung 9B). Mit Hilfe der Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass ADAP in hippocampalen Proteinlysaten in einem Komplex mit MST1, SAKP-HOM und RAPL vorkommt. Es existiert jedoch kein Komplex, in dem ADAP und RIAM zusammen vorkommen, wie es für die T-

Ergebnisse

Zellen beschrieben wurde. Als Kontrolle für die Komplexbestandteile diente ein Hippokampuskomplettlysate.

Auch in der hippocampalen Primärkultur ist ADAP zusammen mit SKAP-HOM zu finden. An DIV 7 ist ADAP vermehrt in MAP2-positiven Dendriten exprimiert. Eine schwächere immunocytochemische Färbung ist in den MAP2-negativen Regionen (Pfeil Abbildung 9) zu finden. Die immunocytochemische Färbung für SKAP-HOM zeigt eine Lokalisation von SKAP-HOM zusammen mit ADAP in MAP2-positiven Strukturen (Abbildung 9A).

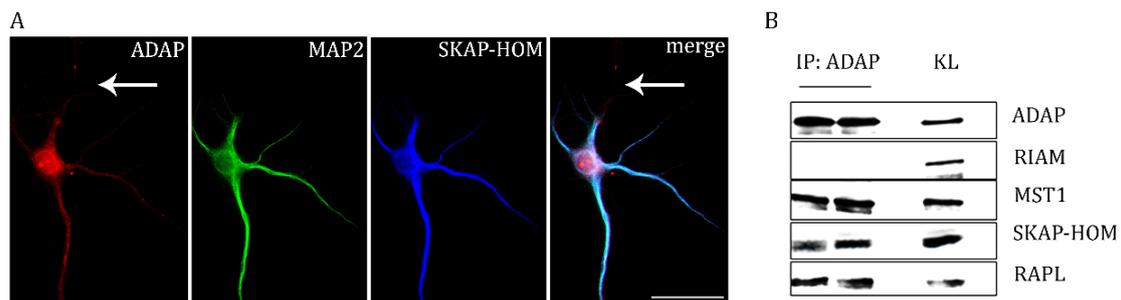


Abbildung 9: ADAP bildet zusammen mit SKAP-HOM einen Komplex in Neuronen:(A) ADAP ist an DIV 7 vor allem in MAP2 positiven Regionen lokalisiert aber auch in den MAP2-negativen Segmenten (Pfeil) zu finden. SKAP-HOM als Komplexpartner kommt hingegen fast ausschließlich nur in MAP2-positiven Arealen des Neurons vor; Maßstab 100 μ m. Die Immunpräzipitation (IP) mit ADAP aus einem Hippokampuskomplettlysate (B) zeigt, dass ADAP im Hippokampus in einem Komplex bestehend aus SKAP-HOM, MST1 und RAPL vorkommt, aber nicht mit RIAM. (KL-Komplettlysate)

3.1.2 Lokalisation von ADAP in der frühen hippocampalen Primärkultur

Mit Hilfe der dissoziierten hippocampalen Primärkultur kann die Lokalisation von ADAP in der sich entwickelnden Kultur analysiert werden. An DIV 3 und DIV 10 findet man ADAP sowohl im Soma als auch in den Neuriten (Abbildung 10, Abbildung 12). Eine genauere Analyse der Neuriten zeigt, dass ADAP auch in den auswachsenden Strukturen des Wachstumskegels zu finden ist (Abbildung 10A, Abbildung 11). ADAP kolokalisiert an DIV 7 und DIV 10 hauptsächlich mit MAP2. Man findet ADAP aber auch in MAP2-negativen Segmenten.

Ergebnisse

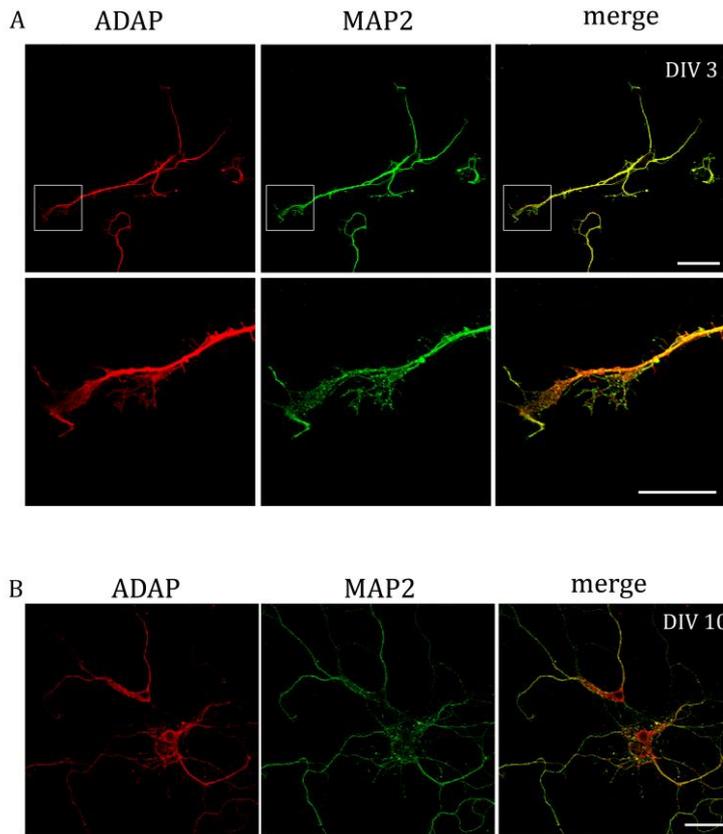


Abbildung 10: ADAP-Lokalisation in hippocampalen Neuronen: Dissoziierte hippocampale Neuronen exprimieren ADAP an DIV 3 (A) und DIV 10 (B) sowohl im Soma als auch in den MAP2-positiven Neuriten. In den frühen Stadien der Entwicklung ist ADAP auch in den Wachstumskegeln zu finden (A). Maßstab 100 μm .

Eine Färbung von ADAP und Gap43, einem Protein, das vor allem in axonalen Wachstumskegeln zu finden ist, zeigt, dass ADAP auch in den auswachsenden Axonen zu finden ist (Abbildung 11).

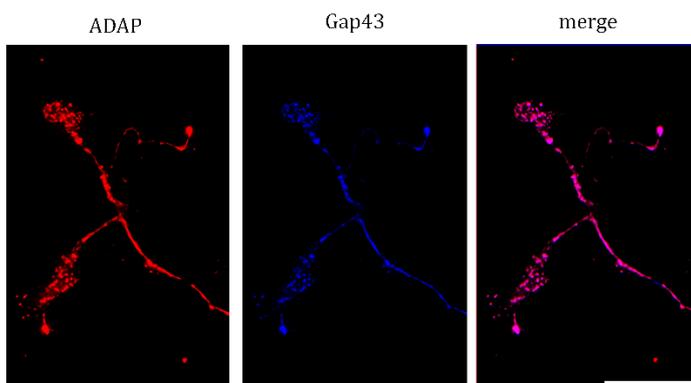


Abbildung 11 ADAP-Lokalisation im axonalen Wachstumskegel: ADAP lokalisiert an DIV 7 in axonalen, Gap43-positiven Wachstumskegeln. Maßstab 30 μm .

Ergebnisse

Für die Regulation der *inside-out*-Aktivierung der Integrine ist Talin ein entscheidender Faktor. Tan *et al.*¹³⁰ zeigte, dass Talin das Neuritenwachstum in PC-12 verstärkt. ADAP kolokalisiert in der dissoziierten hippocampalen Primärkultur mit Talin in den auswachsenden Neuriten (Abbildung 12).

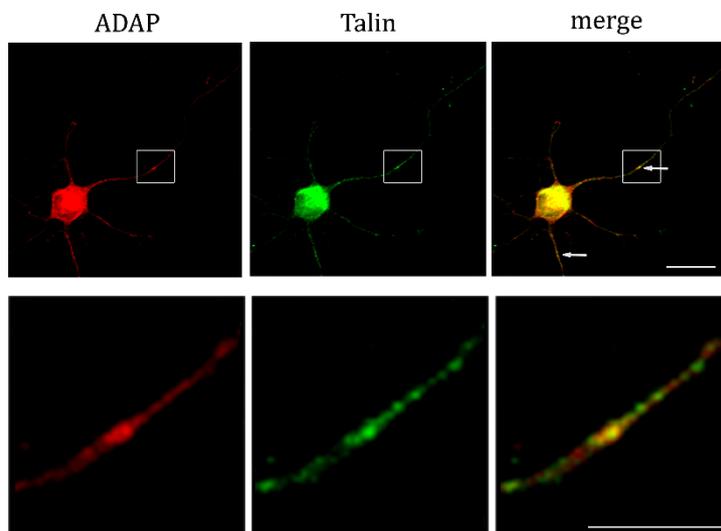


Abbildung 12: ADAP kolokalisiert mit Talin: An DIV 7 ist ADAP zusammen mit Talin in den Neuriten dissoziierter Neurone zu finden. ADAP kolokalisiert mit Talin im Axon (Pfeil). Maßstab 100 μm .

3.1.3 ADAP-mRNA-Expression in der hippocampalen Primärkultur

Während der Entwicklung durchlaufen die Neurone in der dissoziierten hippocampalen Primärkultur verschiedene Stadien. Zu Beginn der Entwicklung kommt es vor allem zu einer Differenzierung der Neuriten in Axone und Dendriten. Im weiteren Verlauf der Entwicklung steht das Längenwachstum der Neuriten und die Ausbildung von Synapsen im Vordergrund.

In Abbildung 13 ist der Verlauf der mRNA-Expression in der sich entwickelnden Kultur dargestellt. Die mRNA-Niveaus wurden mit Hilfe der quantitativen PCR bestimmt. Es sind die gemittelten *dct*-Werte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt, die sich aus der Subtraktion der *ct* (*cycle threshold*)-Werte von *Gapdh* und ADAP ergeben. Für jeden Zeitpunkt wurden je Experiment Triplikate gemessen. Die ADAP-mRNA-Expression befindet sich während der gesamten Entwicklung der Kultur auf relativ niedrigem Niveau. Von DIV 3 zu DIV 7 kommt es zu einem Abfallen der mRNA-Expression. Danach steigt die ADAP-

Ergebnisse

Expression im weiteren Verlauf der Entwicklung der Kultur an. An DIV 14 erreicht die mRNA-Expression ihren Höhepunkt, bevor sie an DIV 21 auf den niedrigsten Wert über den gesamten Zeitraum fällt (Einweg-ANOVA $F(3,16)=5,762$ $p \leq 0,05$; DIV 3 vs. DIV 21 $p \leq 0,05$; DIV 7 vs. DIV 14 $p \leq 0,005$; DIV 14 vs. DIV 21 $p \leq 0,005$; Fischers PLSD).

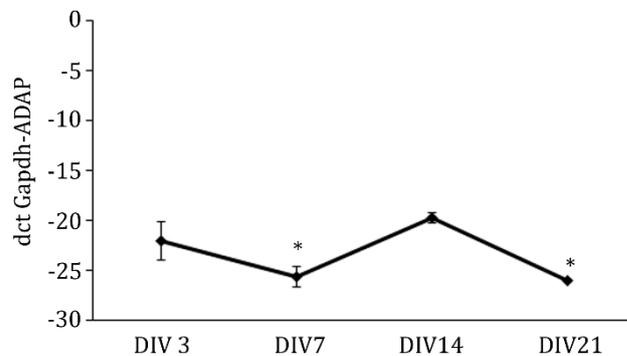


Abbildung 13 mRNA-Expression von ADAP in der sich entwickelnden Primärkultur: Die ADAP-mRNA-Expression verändert sich während der Entwicklung der Kultur. Von DIV 3 zu DIV 7 kommt es zu einer Reduktion der mRNA-Expression, die dann bis DIV 14 wieder ansteigt. An DIV 21 liegt das Niveau der mRNA-Expression etwa wieder auf der Höhe von DIV 7. $MW \pm SFM$; * $p < 0,005$; $N=9$ je Zeitpunkt.

3.1.4 ADAP-abhängige $\beta 1$ - Aktivierung

ADAP ist in T-Zellen bedeutend für die vollständige Aktivierung der Integrine, um so die Zelladhäsion und Migration zu vermitteln⁸⁵. Auch in den Neuronen sind die Integrine für das Auswachsen der Neuriten und die Migration der Neurone bedeutend. Beta1-Integrin ist in der primären hippokampalen Kultur während der frühen neuronalen Entwicklung die vorherrschende Form der Integrine und bedeutend für die dendritische Differenzierung^{27,38,41,44}. Mit Hilfe eines $\beta 1$ -Integrin-Antikörpers (Klon 9EG7), der nur die vollständig aktivierte Konformation von $\beta 1$ -Integrin erkennt, wurden hippokampale Primärkulturen an DIV 9, nach einer akuten ADAP-Manipulation an DIV 7, gefärbt. Diese Lebendfärbung erfolgte nach dem Protokoll von Rehberg *et al.*⁴¹. Nach der Fixation wurden die Neurone noch mit einem Antikörper gegen MAP2 gefärbt, um Dendriten und Axone zu unterscheiden. Für die Analyse wurde die Pixelintensität/ μm^2 für das Soma, die Dendriten und das Axon berechnet und verglichen (Abbildung 14). Je Experiment wurden pro

Ergebnisse

Bedingung zehn Neurone ausgewertet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Tatsächlich weisen die Dendriten nach einem ADAP-Knock-down auf verglichen mit den Kontrollzellen und der Rekonstitutionsbedingung (Einweg-ANOVA $F(2,145) = 3,208$ $p < 0,05$; Kontrolle versus Knock-down $p < 0,05$ Fischers PLSD) (Abbildung 14B) eine verminderte Färbeintensität. Im Gegensatz zu den Dendriten sind in den Somata (Kontrolle $303,305 \pm 24,39$; Knock-down $202,32 \pm 40,75$; Rekonstitution $284,86 \pm 79,41$; $F(2,70) = 2,026$ $p > 0,05$) und Axonen (Abbildung 14C) ($F(2,65) = 0,339$ $p > 0,05$) keine signifikanten Unterschiede in der $\beta 1$ -Integrin-Intensität zu finden.

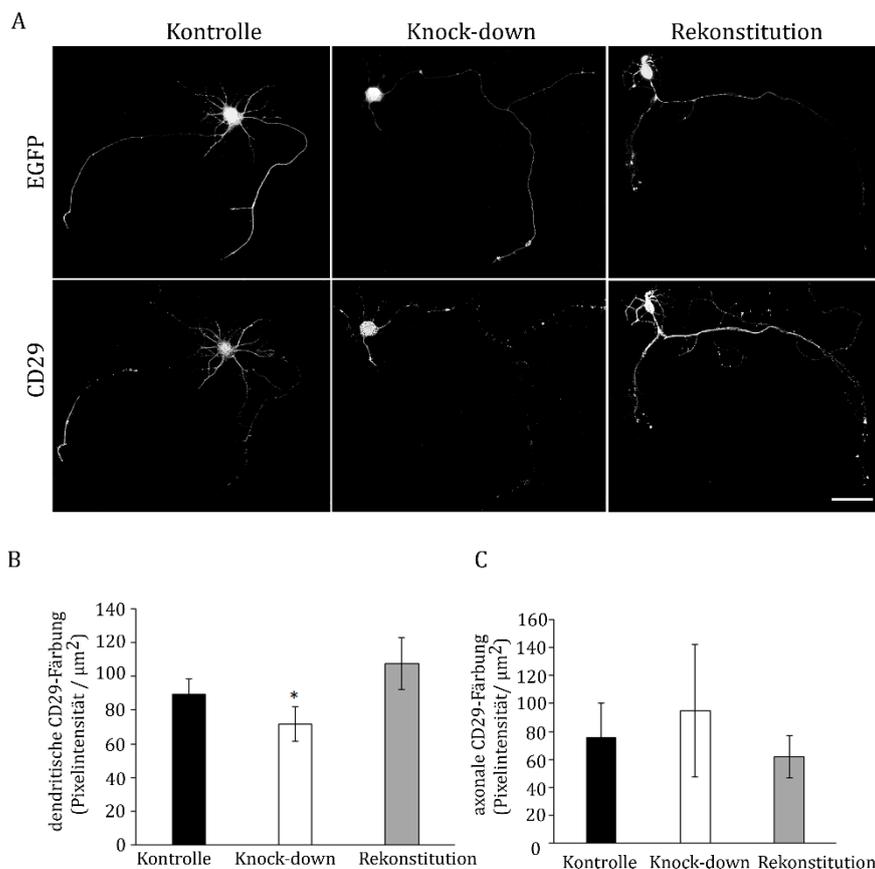


Abbildung 14: Integrinaktivierung durch ADAP: ADAP reguliert in T-Zellen die Integrinaktivierung: Für die Analyse des Einflusses von ADAP auf die Integrinaktivierung wurden hippocampale Neurone an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 mit dem 9EGF-Antikörper gefärbt (A). Für die Analyse wurde die Pixelintensität pro μm^2 gemessen (B, C). In den Dendriten führte der ADAP-Verlust zu einer signifikanten Reduktion in der Integrinaktivierung, die durch eine Rekonstitution wieder aufgehoben werden konnte. (B) Im Soma hingegen führte der ADAP-Reduktion zu einem nicht-signifikanten Anstieg in der Integrinaktivierung. Maßstab 100 μm . $MW \pm \text{SFM}$; * $p < 0,05$; $N = 30-32$ pro Bedingung

Da die verminderte $\beta 1$ -Integrinaktivierung auf einer verminderten $\beta 1$ -Integrinexpression beruhen könnte, wurde mit Hilfe eines aktivitätsunabhängigen Antikörpers die totale $\beta 1$ -

Ergebnisse

Integrinexpression auf die gleiche Art und Weise analysiert wie die $\beta 1$ -Integrinaktivierung. Es wurde ebenfalls die Pixelintensität pro μm^2 in den drei verschiedenen Kompartimenten Dendriten, Axon und Soma verglichen (Abbildung 15). Die Dendriten von ADAP-Knock-down-Zellen weisen im Vergleich zu den Kontrollzellen und der Rekonstitutionsbedingung eine erhöhte $\beta 1$ -Integrinintensität auf (Abbildung 15B) (Einweg-ANOVA $F(2,204) = 10,32$, $p \leq 0,005$; Fischers PLSD Knock-down vs. Kontrolle $p \leq 0,05$; Knock-down vs. Rekonstitution $p \leq 0,005$; Rekonstitution vs. Kontrolle $p \leq 0,005$). Die Soma der ADAP-Knock-down-Zellen zeigen hingegen eine Reduktion der $\beta 1$ -Integrinintensität (Abbildung 15C) ($F(2,103)=6,307$ $p \leq 0,005$, Fischers PLSD: Knock-down vs. Kontrolle $p \leq 0,005$; Knock-down vs. Rekonstitution $p \leq 0,005$). In den Axonen konnte keine signifikante Veränderung der $\beta 1$ -Integrinintensität gefunden werden. (Kontrolle $9,27 \pm 1,21$; Knock-down $11,09 \pm 1,28$; Rekonstitution $8,35 \pm 1,31$; $F(2,110)=1,153$ $p \geq 0,05$).

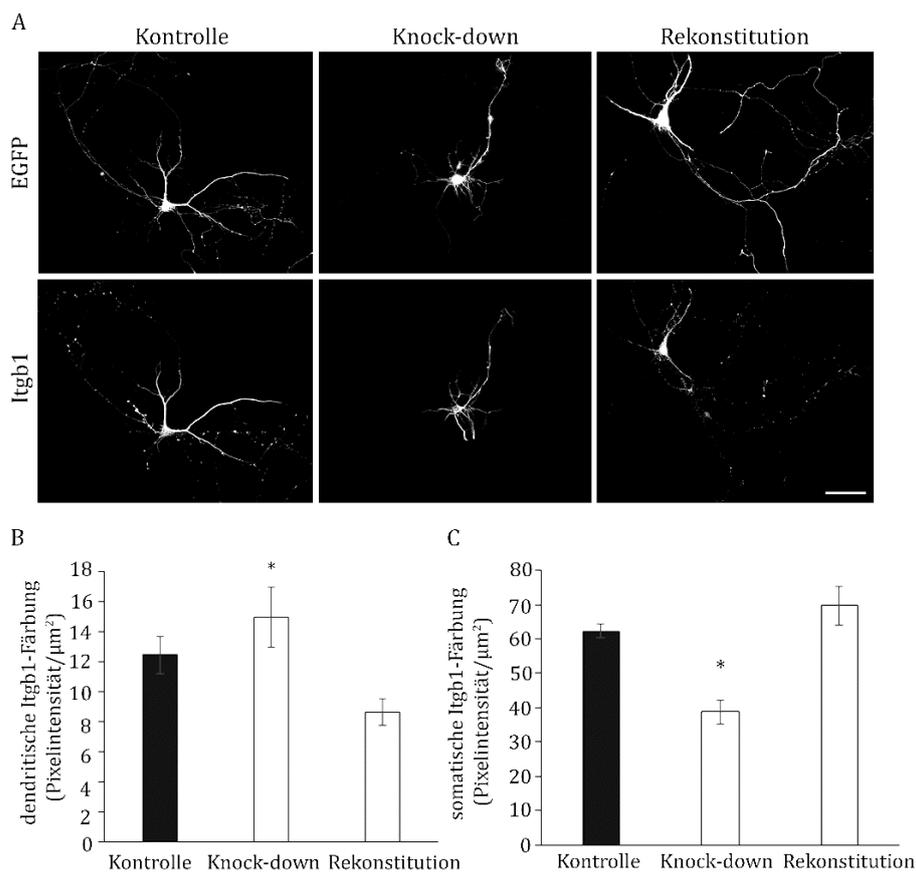


Abbildung 15 Analyse der totalen beta1-Integrinexpression: In den Dendriten kommt es in Folge der ADAP-Reduktion zu einer Erhöhung der $\beta 1$ -Integrinintensität (B). Die Somata der ADAP-Knock down-Zellen weisen hingegen eine Reduktion der $\beta 1$ -Integrinintensität auf (C) Maßstab $100 \mu\text{m}$. $\text{MW} \pm \text{SFM}$; * $p < 0,05$, $N=30-32$.

3.1.5 ADAP fördert das Neuritenwachstum

Die Integrine sind nicht nur für die Synapsenbildung bedeutend, sondern spielen auch beim Neuritenwachstum eine Rolle. Mit Hilfe der Sholl-Analyse wurde die Morphologie der hippocampalen Neurone nach einer akuten Manipulation der ADAP-Expression an DIV 9 analysiert (Abbildung 16). Dafür wurden hippocampale Neurone an DIV 7 transfiziert, an DIV 9 fixiert und anschließend immunocytochemisch gefärbt. Für die Unterscheidung von Dendriten und Axon, wurde eine MAP2/Tau-Färbung verwendet. Für die Sholl-Analyse wurden die Schnittpunkte der konzentrischen Kreise mit den Neuriten gezählt. Das Zentrum der konzentrischen Kreise liegt gewöhnlich in der Mitte des Soma. Für die Auswertung wurden 8-12 Neurone pro Bedingung und je Experiment ausgewertet. Zuerst wurden die Schnittpunkte aller Neuriten quantifiziert. Hier führt eine Reduktion der ADAP-Expression zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Neuritenschnittpunkten. Diese Reduktion konnte durch eine Rekonstitution der ADAP-Expression wieder auf das Kontrollniveau angehoben werden (Abbildung 16 B, C). Ein Verlust von ADAP reduziert die Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz vom Soma auf den ersten 150 μm im Vergleich zu der Kontroll- und Rekonstitutionsbedingung. Im weiteren distalen Bereich gibt es keine Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Bedingungen. Bei der Unterscheidung der Neuriten in Dendriten und Axone zeigt sich, dass die Reduktion der Gesamtschnittpunkte durch eine Reduktion der Verzweigung der Dendriten verursacht wird. Der ADAP-Knock-down führt hier zu einer reduzierten Anzahl an Dendriten, die im weiteren Verlauf auch weniger Verzweigungen aufzeigen. Diese Reduktion wird durch eine Re-Expression von ADAP wieder aufgehoben (Einweg-ANOVA $F(2,108)=4,327$ $p \leq 0,05$; Kontrolle vs. Knock-down $p \leq 0,05$; Knock-down vs. Rekonstitution $p \leq 0,05$ Fischers PLSD). Die genauere Betrachtung der Axone zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Morphologie zwischen den drei Bedingungen gab (Kontrolle $355,06 \pm 32,86$; Knock-down $180,3 \pm 112,26$; Re-Expression $307,3 \pm 175,16$; $F(2,98)=2,321$ $p \geq 0,05$).

Ergebnisse

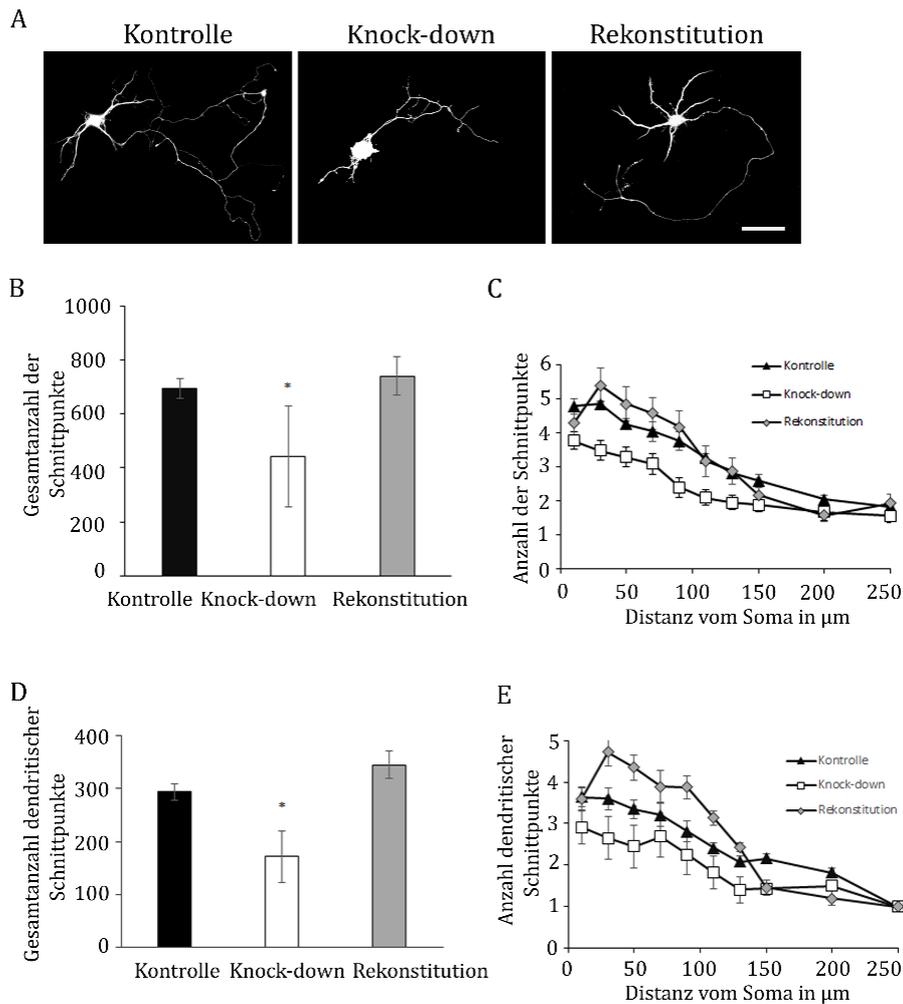


Abbildung 16: Morphologische Untersuchung mittels Sholl-Analyse: Für die morphologische Analyse wurden hippocampale Neurone an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 fixiert und mit MAP2 gefärbt. Maßstab 100 μm (A). Mit der Sholl-Analyse wurde die Länge sowie die Anzahl der Verzweigung der Neuriten gemessen. Die Quantifizierung der Gesamtanzahl der Neuriten zeigt, dass eine Reduktion der ADAP-Expression zu einer Reduzierung der Gesamtanzahl der Schnittpunkte führt (B). Die Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz zum Soma dargestellt, zeigt eine Reduktion der Schnittpunkte am Soma im Vergleich zur Kontrolle und eine Rekonstitutionsbedingung. Im weiteren distalen Verlauf befinden sich die Schnittpunkte der konzentrischen Kreise auf dem Niveau der Kontroll- und Rekonstitutionsbedingung (C). MW \pm SFM. * $p < 0,05$ N=28-32

3.1.6 Quantitative Bestimmung der β 1-Integrin-mRNA-Expression

Mit Hilfe der quantitativen PCR wurde die Expression von β 1-Integrin-mRNA in der sich entwickelnden Primärkultur überprüft. Als interne Kontrolle diente Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Abbildung 17 zeigt das mRNA-Niveau von

β 1-Integrin an vier verschiedenen Zeitpunkten (DIV 3, DIV 7, DIV 14, DIV 21). Pro Zeitpunkt wurden die Triplikate aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Werte wurden in Relation zu DIV 3 gesetzt. Von DIV 3 zu DIV 7 kommt es zu einem leichten Anstieg der β 1-Integrin-mRNA um das 1,5fache, bevor sie an DIV 14 ihr Maximum erreicht. Von DIV 7 zu DIV 14 steigt die mRNA-Expression etwa um das 340fache an. An DIV 21 fällt die mRNA-Expression unter das Ausgangsniveau von DIV 3 (Einweg-ANOVA $F(3,12)=3,581$ $p \leq 0,05$; Fischers PLSD: DIV 3 vs. DIV 14 $p \leq 0,05$; DIV 7 vs. DIV 14 $p \leq 0,05$; DIV 14 vs. DIV 21 $p \leq 0,05$).

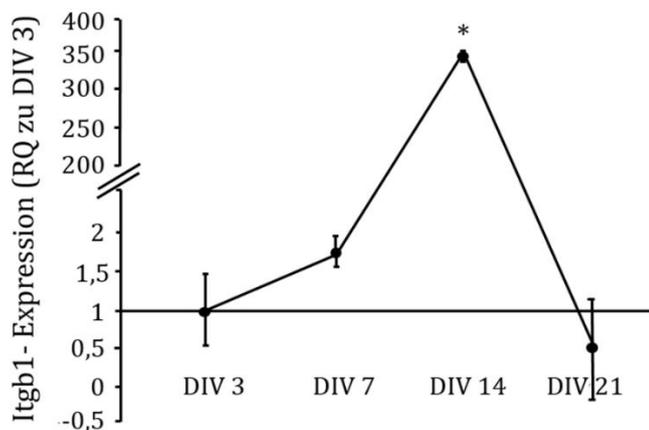


Abbildung 17: Itgb1-mRNA-Expression: Die Evaluierung der Itgb1-Expression in der dissoziierten Neuronenkultur erfolgte mit Hilfe der qPCR (relative Quantifizierung zu DIV 3). Von DIV 3 zu DIV 7 kommt es zu einem leichten Anstieg in der Itgb1-Expression. Im weiteren Verlauf der Kultivierung steigt die Expression weiter an und erreicht an DIV 14 ihren Höhepunkt, bevor sie an DIV 21 unter das Expressionsniveau von DIV 3 fällt. $MW \pm SFM$ * $p < 0,05$ $N=9$ pro Zeitpunkt

Während der 21 Tage in Kultur durchlaufen die Neurone verschiedene Entwicklungsstadien. Während die ersten Tage vor allem durch das Neuritenlängenwachstum und die Differenzierung von Dendriten und Axonen gekennzeichnet sind, kommt es zwischen DIV 5 und DIV 8 zu ersten Synapsenbildungen. Nach etwa 12 Tagen in Kultur zeigen Neurone eine reife neuronale Morphologie mit postsynaptischen Elementen entlang der Dendriten¹³¹.

Da Integrine für die Synapsenbildung von Bedeutung sind, wurden auch Neurone an DIV 14 immunocytochemisch für ADAP (rot), β 1-Integrin (grün) und Synaptophysin (blau) gefärbt. Abbildung 18 zeigt deutlich eine punktierte Verteilung von ADAP und β 1-Integrin entlang

Ergebnisse

des Neuritens. Diese ADAP- und β 1-Integrin-positiven Strukturen sind ebenfalls positiv für Synaptophysin. An DIV 14 ist ADAP in den Synaptophysin-positiven Synapsen lokalisiert (Abbildung 18).

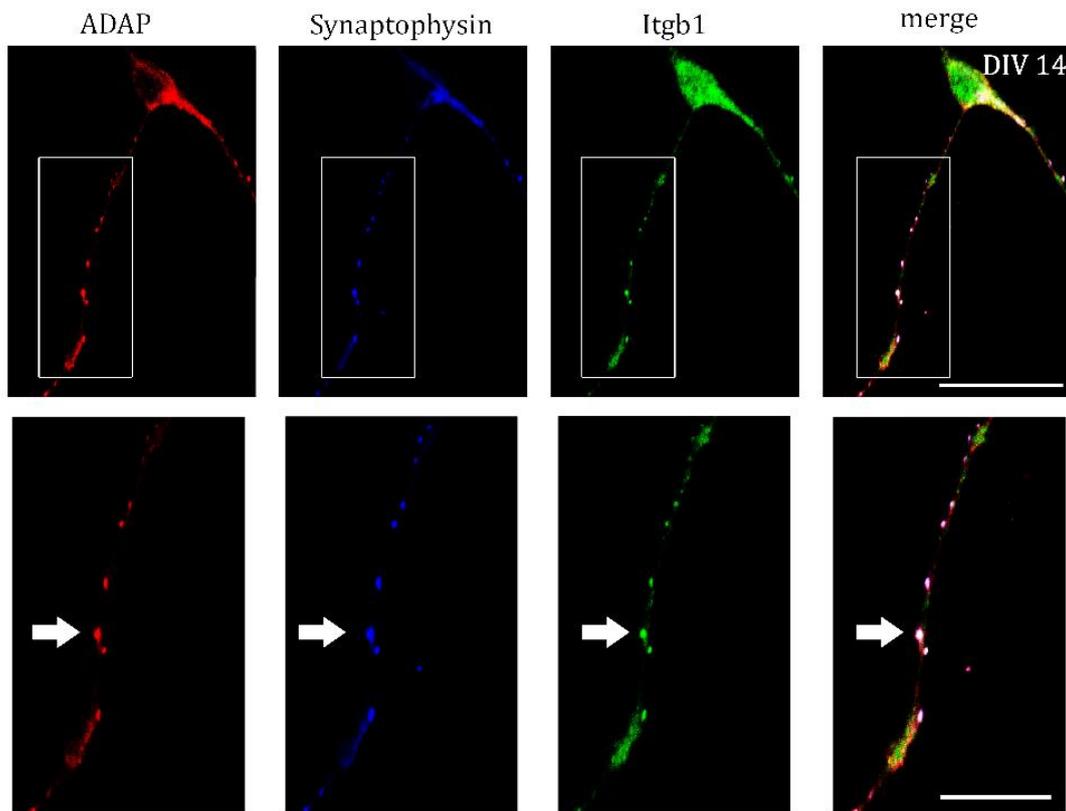


Abbildung 18: ADAP-Lokalisation an DIV 14: An DIV 14 zeigt ADAP (rot) eine vorwiegend punktierte Verteilung in den Neuriten, wie auch das β 1-Integrin (grün). ADAP reichert sich in Synapsen an (Synaptophysin-positiv; blau) und kolokalisiert dort mit β 1-Integrin (grün) und ADAP (Pfeil). Maßstab 100 μ m.

3.1.7 ADAP-Knock-down reduziert die Immunreaktivität des Dendritenmarkers MAP2

MAP2 hat entscheidenden Einfluss auf die Stabilisierung von Mikrotubuli während der Neurogenese. Eine starke Expression von MAP2 in den Dendriten impliziert, dass MAP2 eine Rolle bei der Stabilisierung der Dendriten spielt.

Ergebnisse

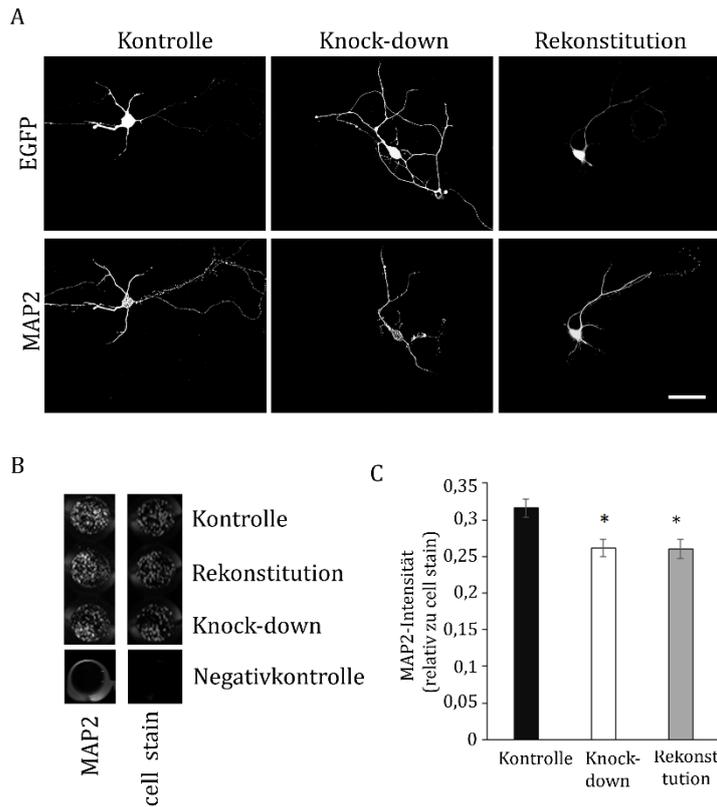


Abbildung 19: Der Einfluss von ADAP auf die MAP2-Expression: Neurone mit einer ADAP-Reduktion, die an DIV 7 transfiziert und an DIV 9 fixiert wurden, zeigen eine reduzierte MAP2-Expression in den Dendriten und im Soma im Vergleich zu der Kontrollbedingung. Maßstab 100 μ m (A). Die Quantifizierung der MAP2-Intensität normalisiert auf die Intensität des Cell Stain™ mit dem In-Cell Western™ zeigt, dass sowohl der ADAP-Knock-down als auch die Rekonstitution zu einer Intensitätsreduktion des MAP2-Signals im Vergleich zur Kontrolle führt (B). MW \pm SFM; *p < 0,05 N=18-24 wells pro Bedingung

Während der morphologischen Analyse der hippocampalen Neurone zeigte sich eine Assoziation von ADAP mit MAP2-positiven Strukturen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Kultur. Ferner zeigten die vorangegangenen Analysen eine Reduktion der MAP2-Immunreaktivität in ADAP-Knock-down-Zellen. Dieser Effekt wurde mit der In-Cell-Western™-Methode quantifiziert. Hierfür wurden Zellen in einer 96 well-Platte ausgesät und an DIV 7 transfiziert. An DIV 9 wurden die Zellen fixiert und MAP2 gefärbt. Der *Cell Tag™ 700 Stain* akkumuliert sich im Nucleus und im Zytoplasma der Zellen und erlaubt somit die Normalisierung der MAP2-Intensität auf die Zellzahl. Pro Experiment und Bedingung wurde der Mittelwert aus 4-6 Wiederholungen gebildet (Abbildung 19). Die MAP2-Intensität relativ zur Intensität des *Cell Tag™ 700 Stain* zeigt eine signifikante Reduktion der MAP2 Intensität nach ADAP-Knock-down im Vergleich zu der

Kontrollbedingung (Abbildung 19C). Diese Reduktion konnte im Gegensatz zur Integrintfärbung und dem Neuritenwachstum durch eine Re-Expression von ADAP nicht aufgehoben werden. Auch die Rekonstitutionsbedingung zeigte eine Reduktion der MAP2-Intensität (Einweg-ANOVA $F(2,72)=6,034$ $p < 0,005$; *Post-hoc*-Vergleich mit Fischers PLSD: Knock-down versus Kontrolle $p < 0,05$; Rekonstitution vs. Kontrolle $p < 0,05$).

3.1.8 NF- κ B Expression in der hippokampalen Primärkultur

In T-Zellen konnte gezeigt werden, dass ADAP auch an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist ^{97–99,131}. Verschiedene Studien zeigen, dass NF- κ B auch in den neuronalen Zellen von entscheidender Bedeutung während der Differenzierung und Plastizität ist. Eine quantitative PCR für p65, einem Mitglied der NF- κ B-Familie, an DIV 3, DIV 7, DIV 14 und DIV 21 zeigt, dass sich die Menge an p65-mRNA während der Entwicklung der hippokampalen Primärkultur verändert (Abbildung 20). Nach einer Normalisierung der p65-Expression auf DIV 3, steigt die Expression an DIV 7 um das 12fache an und bleibt auch an DIV 14 auf hohem Niveau bestehen, bevor die Expression an DIV 21 leicht unter die Werte von DIV 3 fällt (Einweg-ANOVA $F(3,32)=3,741$ $p < 0,05$; Fischers PLSD $p < 0,05$ (DIV 7 vs. DIV 21) und $p < 0,05$ (DIV 14 vs. DIV 21)).

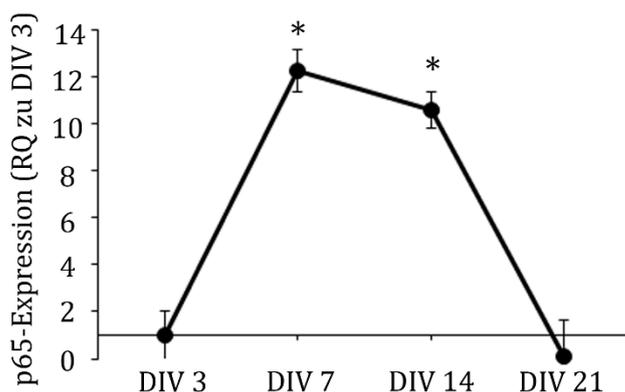


Abbildung 20: p65-mRNA-Expression in hippokampalen Primärneuronen: Die relative Quantifizierung (normiert auf DIV 3) der p65-Werte zeigt, dass die Expression von p65 von DIV 3 zu DIV 7 stark ansteigt und dann bis DIV 14 leicht abfällt und an DIV 21 leicht unter dem Ausgangswert von DIV 3 liegt. MW \pm SFM; * $p < 0,05$ N=9 pro Zeitpunkt

Im Gegensatz zu p65 war c-Rel in der hippokampalen Primärkultur nicht nachweisbar.

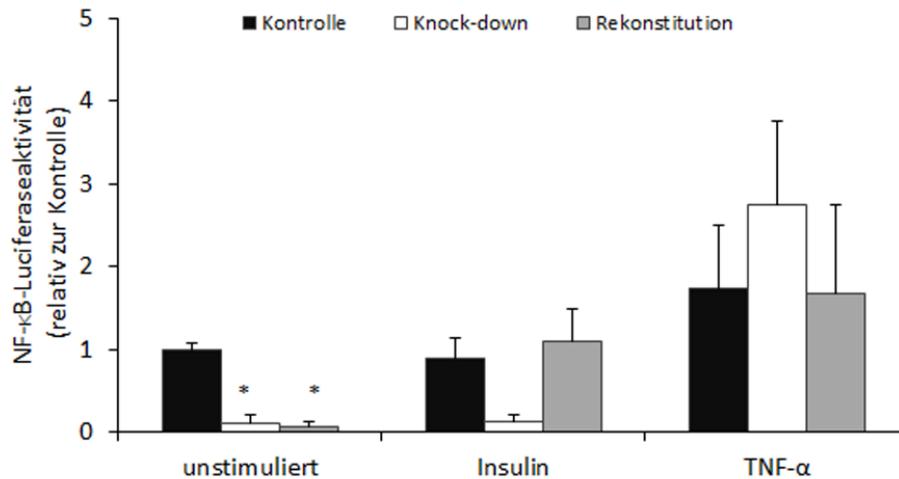


Abbildung 21: Einfluss von ADAP auf die NF-κB-Aktivierung: Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB wurde an DIV 10 in Kultur sowohl unstimuliert als auch unter Insulin- und TNF-α-Stimulation untersucht. Ohne Stimulation zeigen sowohl der Knock-down als auch die Rekonstitution eine verminderte Basalaktivität des Transkriptionsfaktors. Unter dem Einfluss von Insulin bleibt die NF-κB-Aktivität nach ADAP-Knock-down weiter vermindert wohingegen die Aktivität der Rekonstitution unter Insulineinfluss auf Kontrollniveau ansteigt. Die Stimulation mit TNF-α führt in allen Bedingungen zu einer erhöhten NF-κB-Aktivierung im Vergleich zu der unstimulierten Kontrollbedingung. MW±SFM; *p < 0,05 N=18-24 wells pro Bedingung

Um einen potentiellen Einfluss von ADAP auf die NF-κB-Aktivierung in der neuronalen Differenzierung zu untersuchen, wurde ein Luciferase-Reporter für NF-κB verwendet (Abbildung 21). Es wurde die Aktivierung von NF-κB unter Basalbedingung (ohne Stimulation), nach Insulinstimulation (10 µg/µl) und nach Stimulation mit TNF-α (100 ng/µl) analysiert. Pro Bedingung wurde der Mittelwert aus den gemessenen Triplikaten gebildet. Die Aktivität des Luciferase-NF-κB-Reporters wurde auf die interne Renillaaktivität normalisiert. Unter basalen Bedingungen führt eine Reduktion von ADAP im Vergleich zu der Kontrollbedingung (Einweg-ANOVA $F(2,8)=29,558$; $p<0,001$; Fischers PLSD: Kontrolle vs. Knock-down $p<0,01$;) zu einer signifikanten Reduktion der NF-κB Aktivierung. Auch die Rekonstitution von ADAP führt zu einer signifikant verminderten NF-κB-Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle ($p<0,01$). Im Hippokampus werden Insulinrezeptoren exprimiert¹³², so dass Insulin als Aktivator für NF-κB über den nicht-kanonischen Weg verwendet werden

kann. Hier zeigt sich, dass ADAP-Knock-down zu einer nicht-signifikanten Reduktion der NF- κ B-Aktivierung im Vergleich zu der Kontrollbedingung führt. TNF- α als Aktivator des kanonischen Weges führt unabhängig von der ADAP-Expression zur stärksten Aktivierung von NF- κ B. ADAP-Knock-down-Zellen zeigen eine leicht erhöhte, nicht signifikante Aktivierung von NF- κ B im Vergleich zu den Kontrollzellen nach der Stimulation mit TNF- α .

3. 2 Analyse von ADAP-Mutanten

3.2.1 Histologische Analyse der ADAP-Mutanten

Um die Relevanz von ADAP *in vivo* zu testen, wurde die ADAP-Knock-out-Maus verwendet, die erstmals von Peterson *et al.*, beschrieben wurde⁸².

Eine DAB-Färbung zeigt, dass die ADAP-Knock-out-Maus kein ADAP im Hippokampus exprimiert, während die Wildtypmaus eine Färbung der Zellkörper des *Stratum pyramidale* in der CA1-CA3-Region und im Hilus des Hippokampus zeigt (Abbildung 22). Die Nissl-Färbung zeigt eine normale Cytoarchitektur des Hippokampus.

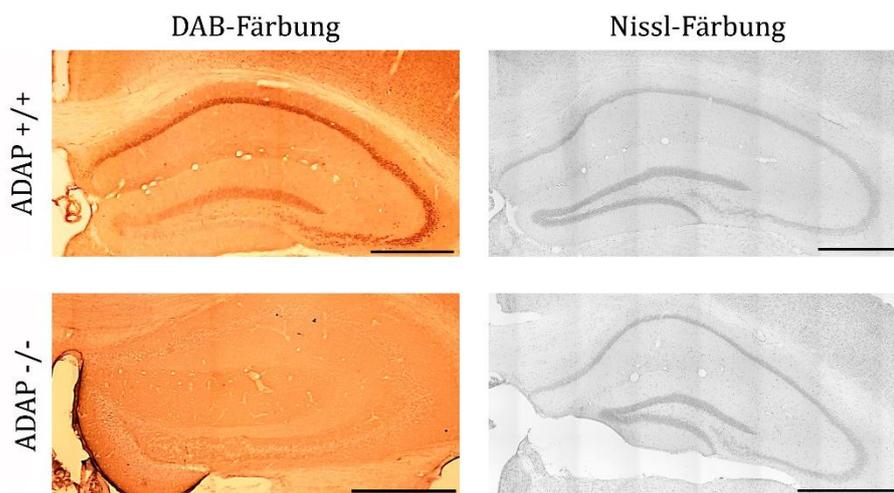


Abbildung 22: Histologische Färbung der ADAP-Mutanten: Die DAB-Färbung für ADAP zeigt in den Wildtyp-Mäusen eine Färbung der Zellkörper des *Stratum pyramidale* in der CA1-CA3-Region des Hippokampus sowie im Hilus. Die ADAP-Knock-out-Maus als Negativkontrolle zeigt keine Färbung für ADAP in den hippokampalen Strukturen. Die Nissl-Färbung zeigt sowohl für die Wildtypmaus als auch für die ADAP-Knock-out Maus eine normale hippokampale Cytoarchitektur. Maßstab 500 µm.

Über *Fyn*^{-/-}-Mäusen wurde berichtet, dass sie eine Veränderung in der Verzweigung der apikalen Dendriten der CA1-Region aufweisen¹¹³. Mit Hilfe einer immunocytoologischen MAP2-Übersichtsfärbung der ADAP-Mäuse konnten in der geringen Vergrößerung keine strukturellen Veränderungen gefunden werden (Abbildung 23).

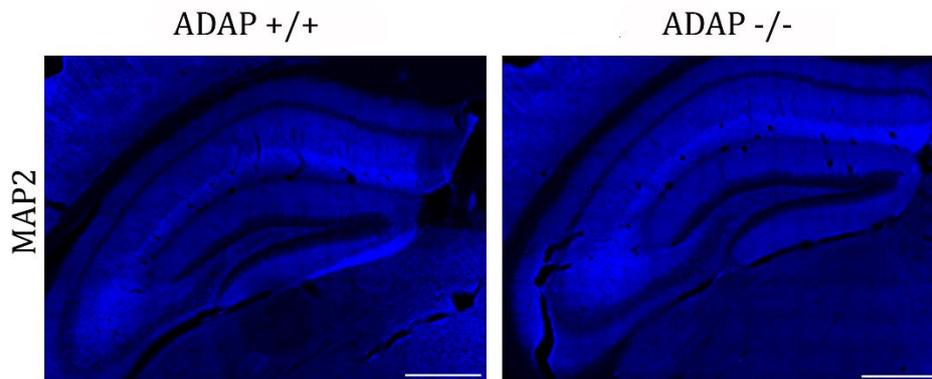


Abbildung 23: MAP2-Färbung Die immunocytoologische Färbung für MAP2 zeigt in den Wildtyp-Mäusen und in den ADAP-defizienten Mäusen keine strukturellen Unterschiede in der Übersicht. Maßstab 500 μ m

Analysen in *Fyn*-defizienten Mäusen zeigen Veränderungen in der Moosfaserprojektion. Sowohl im *Gyrus dentatus* als auch in der CA3-Region sind wellenartige Strukturen mit Hilfe der Timm-Färbung sichtbar¹¹³. Aufgrund dieser publizierten Ergebnisse wurden auch die Moosfasern der ADAP-defizienten Mäuse untersucht (Abbildung 24). Diese wellenartigen Veränderungen der Moosfasern der *Fyn*-defizienten-Mäusen waren weder in der CA3-Region noch im *Gyrus dentatus* der ADAP^{-/-}-Mäuse sichtbar. Eine detaillierte Analyse der Moosfasern zeigte jedoch, dass auch in den ADAP-Mutanten Veränderungen zu finden sind. Eine Messung der Dicke des suprapyramidalen Bandes zeigte, dass in der CA2-Region die Dicke des Bandes in den ADAP-Knock-out Mäusen reduziert ist (Abbildung 24B) (Wildtypen MW=63,132; SFM= 1,88; Knock-outs MW= 54,65 SFM=6,63 $t(8)=-2,749$ $p < 0,05$; ungepaarter t-Test). Andererseits ist die Intensität des infra/intrapiramidalen Bandes in den ADAP-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen erhöht (Wildtypen MW=1883,93 SFM=922,96; Knock-out MW= 6000,97 SFM= 2571,736 $t(58,157)=3,928$ $p < 0,005$; ungepaarter t-Test) (Abbildung 24C). Auch im suprapyramidalen Band waren signifikante Intensitätsunterschiede zwischen den Genotypen zu finden (Wildtypen

Ergebnisse

MW=9302,56 SFM=1482,0844 und den Knock-outs MW=23451,897 SFM=869,59975
 $t(54,678) = 4,236$ $p < 0,005$).

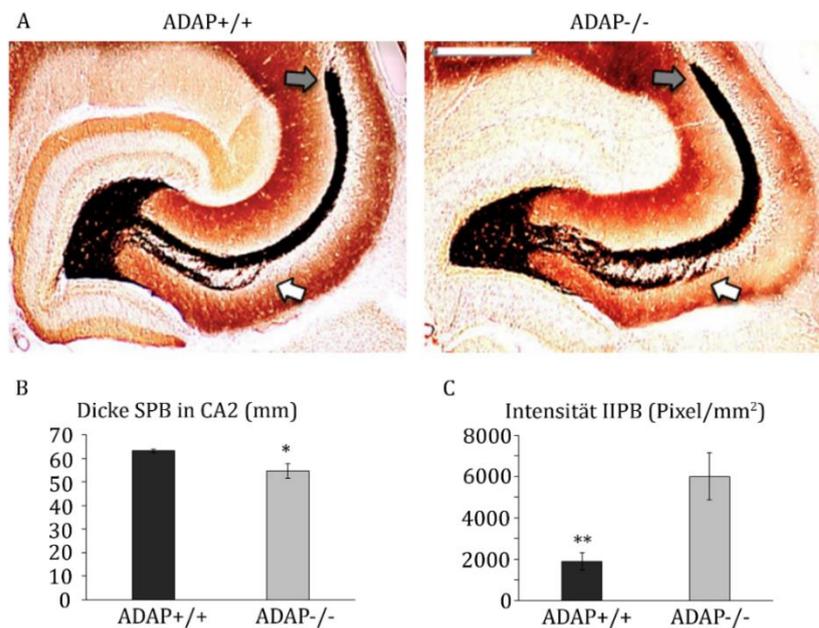


Abbildung 24: Die Moosfasern des Hippokampus: Die Timm-Färbung zeigt eine Reduktion der Dicke des suprapyramidalen Bandes in der CA2-Region in den ADAP^{-/-} (grauer Pfeil) und eine Erhöhung der Intensität des infra/intrapiramidalen Bandes (IIPB; weißer Pfeil). Maßstab 300 μ m. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$; KO: N=11; WT: N=6; pro Tier zwei Schnitte

3.3.1 Verhaltenstest

3.3.1.1 Die Expression von ADAP nach der Furchtkonditionierung

Veränderungen der Moosfasern können zu einer Beeinträchtigung des Hippokampus-abhängigen Lernens führen. Fyn^{-/-}-Mäuse weisen eine Beeinträchtigung in der kontextuellen Furchtkonditionierung auf¹³³. Mit Hilfe der quantitativen PCR wurde in naiven und furchtkonditionierten Mäusen die mRNA-Expression von ADAP bestimmt, um zu ermitteln, ob die Furchtkonditionierung Einfluss auf die ADAP-mRNA-Expression hat (Abbildung 25). Die Mäuse wurden mit dem auditorischen Hinweisprotokoll von Laxmi *et al.*¹²⁷ trainiert. An fünf Zeitpunkten (30 min, 2 h, 6 h, 24 h und 14 Tage) nach der Furchtkonditionierung wurden die Hippokampi entnommen und für die Expressionsanalyse aufgearbeitet. Für die Analyse wurden 12-Wochen-alte Black6-Mäuse verwendet, die in zwei Gruppen aufgeteilt wurden. Eine Gruppe (A, assoziiertes Training) erhielt ein assoziiertes Training; das heißt, es wurde der Ton zusammen mit dem Fußschock fünfmal

präsentiert. Die nicht-assoziierte Gruppe (NA) bekam erst fünfmal den Ton und im Anschluss fünfmal den Fußschock präsentiert. Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden 6 Mäuse verwendet. Das Training und die Entnahme der Hippokampi erfolgt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Oliver Stork.

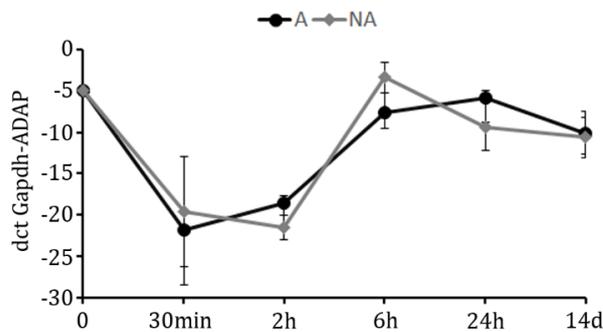


Abbildung 25: ADAP-mRNA-Expression nach der Furchtkonditionierung: Gruppe A (assoziiert) erhielt den Fußschock gepaart mit einem Ton 5mal, während die Gruppe NA (nicht assoziiert) erst 5mal den Ton und dann 5mal den Fußschock präsentiert bekam. Die mRNA-Expression sinkt 30 min nach der Furchtkonditionierung in beiden Gruppen drastisch. In der assoziierten Gruppe steigt die mRNA-Expression von ADAP dann bis 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung langsam an und erreicht 6 Stunden später ihren Höhepunkt, bevor sie dann wieder leicht sinkt. In der nicht-assoziierten Gruppe verringert sich die mRNA von ADAP 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung weiter, bevor sie nach 6 Stunden ihr Maximum erreicht. 24 Stunden nach der Furchtkonditionierung liegt das mRNA-Niveau von ADAP in der NA-Gruppe leicht unter dem der A-Gruppe. 14 Tage nach der Furchtkonditionierung unterscheidet sich die mRNA-Expression in den beiden Gruppen nicht. N=5-6 pro Zeitpunkt und Trainingsgruppe

Die Expression der ADAP-mRNA veränderte sich nach der Furchtkonditionierung signifikant (Einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung: $F(10, 62) = 19,971$ $p < 0,005$) (Auflistung der *Post-hoc*-Teste im Anhang). So sank die Expression 30 Minuten nach der Furchtkonditionierung in der assoziierten Gruppe auf den Tiefpunkt und stieg dann wieder leicht an (Fischers PLSD: naiv vs. 30 min A $p < 0,005$; 30 min A vs. 2 h A $p < 0,005$). In der nicht-assoziierten Gruppe sank die Expression ebenfalls 30 Minuten nach der Furchtkonditionierung; erreichte aber den Tiefpunkt erst zwei Stunden nach der Furchtkonditionierung (naiv vs. 30 min NA $p < 0,005$; 30 min NA vs. 2 h NA $p < 0,005$). Sechs Stunden nach der Furchtkonditionierung erreicht die ADAP-mRNA in der nicht-assoziierten Gruppe ihr Maximum und sank dann wieder leicht. In der assoziierten Gruppe stieg die Expression zwei Stunden nach der Furchtkonditionierung wieder an und lag nach 24 Stunden in etwa auf dem Niveau der naiven Tiere. 14 Tage nach der

Ergebnisse

Furchtkonditionierung wiesen beide Gruppen ein ähnliches ADAP-mRNA-Niveau auf; lagen aber leicht unter der mRNA-Expression der untrainierten Mäuse. Alle Signifikanzen der *Post-hoc*-Testung sind im Anhang III aufgelistet.

In Kooperation mit Dr. Lin Li, Universität Wien, wurde die Proteinmenge von ADAP in den verschiedenen Phasen der Gedächtnisbildung bestimmt (Abbildung 26). 6 Stunden nach der Akquisition erreichte die ADAP-Expression ihren Höhepunkt und ging 24 Stunden später wieder auf das Kontrollniveau zurück (Konsolidierung). 6 Stunden nachdem die Mäuse wieder in die Trainingsbox gesetzt wurden, ist die ADAP-Expression signifikant reduziert (Einweg-ANOVA $F(3,19)=8,529$ $p<0,05$; Fischers PSD: (Akquisition vs. Abfrage der Erinnerung $p<0,005$; Konsolidierung vs. Abfrage der Erinnerung $p<0,05$; Abfrage der Erinnerung vs. Kontrolle $p<0,05$).

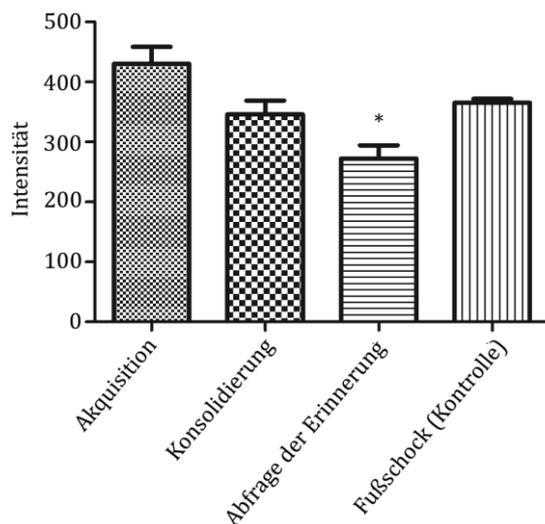


Abbildung 26: ADAP-Proteinexpression nach der Furchtkonditionierung: Die Menge an ADAP wurde während der verschiedenen Phasen der Gedächtnisbildung bestimmt. 6 Stunden nach der Akquisition kommt es zu einem Anstieg der ADAP-Expression, die 24 Stunden später wieder auf Kontrollniveau sinkt. 6 Stunden nach der Abfrage der Erinnerung ist die Proteinmenge von ADAP signifikant reduziert $MW\pm SFM$; * $p<0,05$.; $N=5-6$ Tiere pro Gruppe

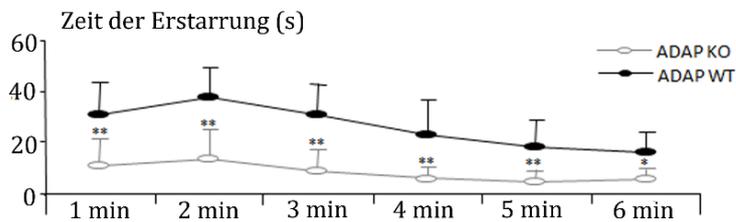
3.3.1.2 Kontextuelle Furchtkonditionierung

Mit Hilfe der quantitativen PCR konnte gezeigt werden, dass die ADAP-mRNA-Expression nach der Furchtkonditionierung reguliert wird. Mit Hilfe der kontextuellen Furchtkonditionierung sollte nun das Lernen von ADAP-Knock-out-Mäusen mit

Ergebnisse

Wildtypmäusen verglichen werden. Die Verhaltenstests erfolgten in Kooperation mit Dr. Jorge Bergado-Acosta.

A



B

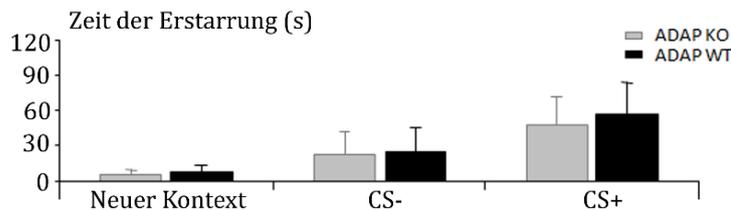


Abbildung 27: Die kontextuelle Furchtkonditionierung: An Tag 1 erfolgte die Adaptation der Mäuse. Dafür erhielten sie 2x je 6x den CS-. An Tag 2 und 3 wurde jeweils 3x der CS+ mit dem US gepaart präsentiert. An Tag 4 wurde die Erinnerung an den Kontext abgerufen, indem die Mäuse 6 min in die Trainingsbox gesetzt und die Erstarrungszeiten gemessen wurden (A). Die ADAP-defizienten Mäuse zeigen über die gesamten 6 min weniger *Freezing*. Am fünften Tag wurden die Mäuse in eine neue Box gesetzt und die Zeit der Erstarrung während der Präsentation des CS- und CS+ gemessen. In der neuen Umgebung zeigen beide Genotypen das gleiche Niveau an Immobilisierung sowohl während der Präsentation des CS- als auch des CS+ (B). MW±SFM **p<0,005; *p<0,05. N=10 pro Genotyp

Im Rahmen der kontextuellen Furchtkonditionierung wurden die Mäuse am ersten Tag an die Trainingsbox adaptiert und bekamen den CS- präsentiert. An den zwei folgenden Tagen wurde dreimal der CS+ mit dem US gepaart präsentiert. Am folgenden Tag wurde die Erinnerung der Mäuse an die Umgebung getestet. Für die Quantifizierung der kontextuellen Erinnerung wurde die Zeit der Erstarrung über 6 min gemessen. Hier zeigen beide Genotypen einen leichten Anstieg der Erstarrungszeit nach 2 Minuten, bevor sie dann wieder mobiler werden. Über die gesamten 6 min zeigten die ADAP^{-/-}-Mäuse eine signifikant reduzierte Zeit der Erstarrung (ungepaarter t-Test (Kontext (ctx):ctx 1 min: MW

Ergebnisse

(WT)= 31,1, SFM=4,49061; MW (KO)= 11 SFM=4,5 $t(18) = -3,161$ $p \leq 0,005$; ktx 2 min: MW (WT)= 37,6, SFM=4,60241; MW (KO)= 13,5 SFM=4,08588 $t(18) = -3,916$ $p \leq 0,005$; ktx 3 min: MW (WT)= 30,7, SFM=4,94874; MW (KO)= 8,9 SFM=3,18137 $t(18) = -37,06$ $p \leq 0,005$; ktx 4 min: MW (WT)= 22,9, SFM=5,30293; MW (KO)= 5,9 SFM=1,50148 $t(10,434) = -3,085$ $p \leq 0,05$; ktx 5 min: MW (WT)= 18,4, SFM=4,60483; MW (KO)= 4,7 SFM=1,74611 $t(18) = -2,825$ $p \leq 0,05$; ktx 6 min: MW (WT)= 16,1, SFM=3,53538; MW (KO)= 5,6 SFM=4,08588 $t(18) = -2,663$ $p \leq 0,05$) (Abbildung 27A). Bei der Erinnerung an den Ton zeigten sowohl ADAP^{+/+}-Mäuse als auch ADAP^{-/-}-Mäuse ein ähnliches Verhalten (Abbildung 27B). Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede im *Freezing*-Verhalten zwischen den Genotypen bei der Präsentation des CS- und des CS+.

3.3.1.3 Spaced-Training

Eine andere Methode die Furchtkonditionierung zu testen, ist das *Spaced-Training*. Hier werden die Stimuli dreimal an einem Tag in einem Abstand von einer Stunde präsentiert. Die Abfrage des kontextuellen Gedächtnisses erfolgte am zweiten Tag und das Abfragen der Erinnerung an die Stimuli an Tag 3. Auch hier wurde das *Freezing*-Verhalten der Mäuse über sechs Minuten gemessen, nachdem sie wieder zurück in die Trainingsbox gesetzt wurden (Abbildung 28A). Bei diesem Furchtkonditionierungstraining zeigen die ADAP-Knock-out-Mäuse in der ersten Minuten eine geringfügig kürzere Erstarrungszeit als die Wildtypen, die aber nicht signifikant wurde. Im Verlauf der folgenden 5 Minuten zeigten beide Genotypen eine ähnlich lange Erstarrungszeit. Es gab hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch der Test in einem neuen Kontext zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen bei der Präsentation des CS- und CS+ (Abbildung 28B) auftreten.

Ergebnisse

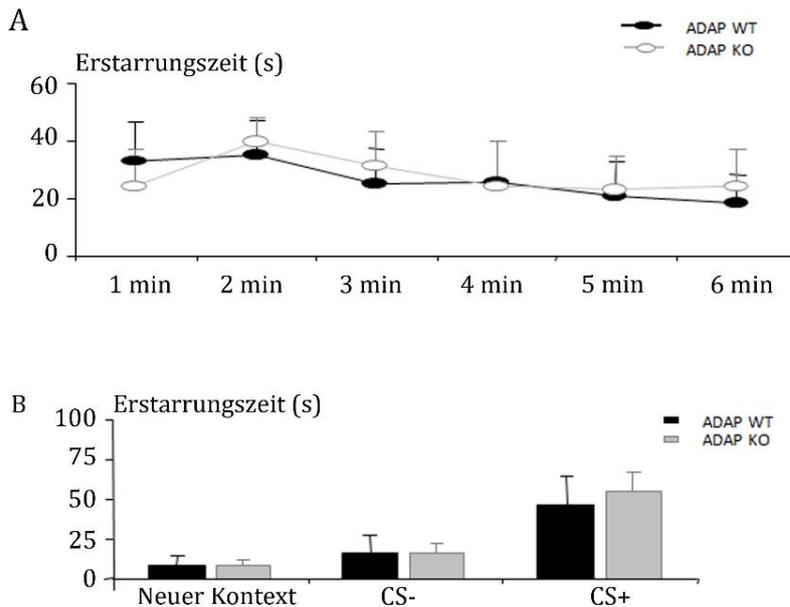


Abbildung 28: Das *spaced-Training*: Bei dieser Furchtkonditionierungsmethode erfolgt die Präsentation des CS+/US dreimal an einem Tag mit einem Abstand von einer Stunde. Die kontextuelle Testung erfolgte an Tag 2 und die Erinnerung an den Stimulus wird an Tag 3 abgefragt. Hier unterscheiden sich die Erstarrungszeiten der beiden Genotypen bei der Testung des Kontextes nicht (A). Auch bei der Testung in einem neuen Kontext unterscheiden sich die Genotypen weder bei der Präsentation des CS- noch des CS+. MW±SFM; N=8 pro Genotyp

3.3.1.4 Das Offenfeld

Das Offenfeld ermöglicht die Analyse der lokomotorischen Aktivität von Mäusen. Eine verminderte lokomotorische Aktivität kann ein Hinweis auf ein erhöhtes Angstniveau sein. Im Offenfeld wurde die totale zurückgelegte Distanz der Mäuse sowie die Anzahl der Zentrumseintritte an den zwei Trainingstagen bei unterschiedlichen Lichtbedingungen (A, B) erfasst.

Die Analyse der totalen zurückgelegten Distanz zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen und den ADAP-Knock-out-Mäusen. Es gibt lediglich einen leichten Trend, dass die ADAP-Knock-out-Mäuse insgesamt sowohl an Tag 1 (Licht aus) als auch an Tag 2 (Licht an) eine größere Distanz im Offenfeld zurücklegen (Abbildung 29A, B). Auch die Quantifizierung der Zentrumseintritte zeigt, dass die ADAP-Mutanten an beiden Tagen im Offenfeld etwa gleich oft in das Zentrum des Offenfelds eintreten. Die Wildtypen zeigen an

Ergebnisse

Tag zwei im Licht eine leicht verringerte Anzahl an Zentrumseintritten im Vergleich zu den Mutanten (Abbildung 29C, D) (WT: MW = 74,00 SFM = 6,7; KO: MW = 125,583 SFM = 21,9 $t(13,068) = 2,249$ $p < 0,05$; ungepaarter t-Test).

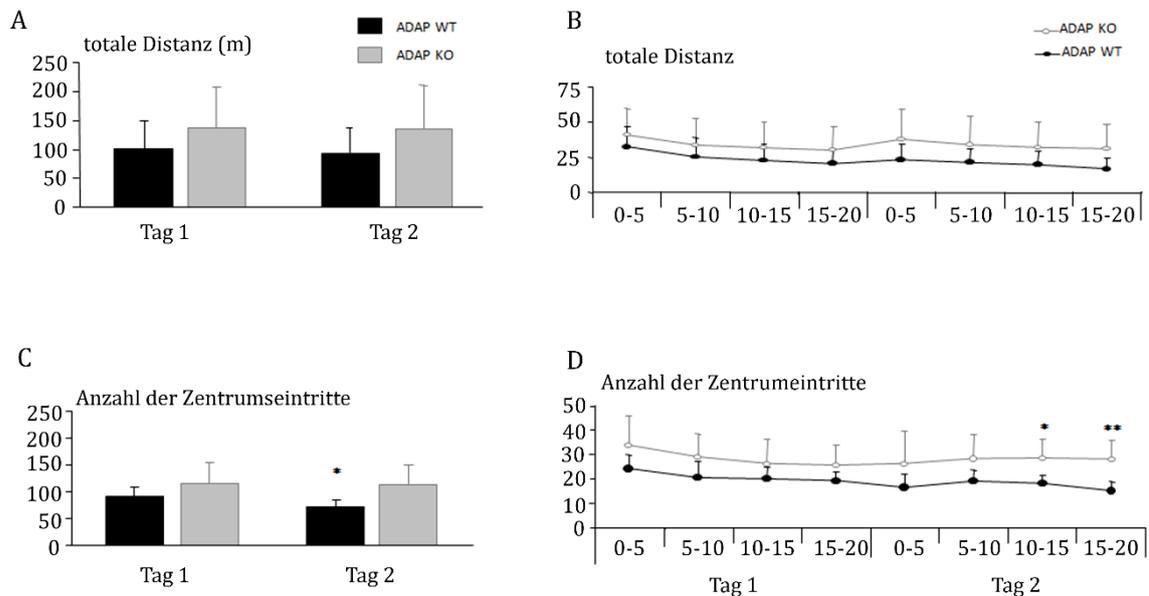


Abbildung 29: Offinfeld: Im Offinfeld wurde die total zurückgelegte Distanz der Mäuse sowie die Anzahl der Zentrumseintritte quantifiziert. N= 10 An beiden Tagen im Offinfeld legen beide Genotypen etwa die gleiche Distanz zurück. Die ADAP^{-/-} zeigen einen leichten, nicht-signifikanten Trend eine größere Distanz im Offinfeld zurückzulegen (A, B). Die Anzahl der Zentrumseintritte ist an Tag 1 nicht signifikant verschieden zwischen den Genotypen. Am zweiten Tag im Offinfeld kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Zentrumseintritte der Wildtypen gegenüber den ADAP-defizienten Mäusen. MW±SFM * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

3.3.2 ADAP-abhängige Integrinaktivierung nach der Furchtkonditionierung

Einen wichtigen Hinweis für die Integrinaktivierung liefert der Phosphorylierungsstatus der *Focal adhesion Kinase* (pFAK). Integrine beeinflussen die synaptische Plastizität und somit auch das Lernen⁵⁰. Um zu testen, ob nach der Furchtkonditionierung Integrine in ADAP-defizienten Mäuse aktiviert werden, wurde die Proteinmenge an phosphorylierter *Focal Adhesion Kinase* 5 min nach Furchtkonditionierung bestimmt (Abbildung 30). Es erwies sich, dass die relativ integrierte Intensität von pFAK in den Knock-out-Mäusen im Vergleich

Ergebnisse

zu den Wildtypen etwa um das Doppelte erhöht ist (ADAP^{+/+} MW=0,1411 SFM= 0,05; ADAP^{-/-} MW= 0,344 SFM= 0,079; ungepaarter t-Test t(6)= -4,329 p≤0,005).

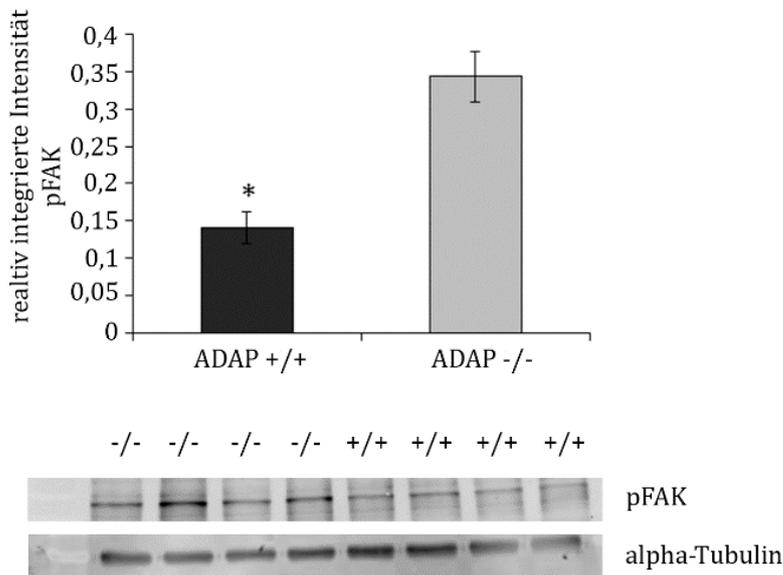


Abbildung 30: pFAK-Niveau 5 min nach der Furchtkonditionierung: 5 min nach der Furchtkonditionierung kommt es in den Proteinlysaten der ADAP-defizienten Mäuse zu einer signifikanten Erhöhung von pFAK im Vergleich zu den ADAP-exprimierenden Mäusen. MW ± SFM * p<0,05; N=3 pro Genotyp

3.3.3 ADAP-abhängige NMDA-Rezeptoraktivierung nach der Furchtkonditionierung

NMDA-Rezeptoren sind in der Langzeitpotenzierung involviert und kontrollieren so die synaptische Plastizität und die Gedächtnisbildung¹³⁴. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Fyn-Kinase bedeutend für die Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten ist. Eine Quantifizierung der Phosphorylierungsstelle Tyrosin 1336 zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen ADAP^{+/+}- (MW 12,77; SFM=3,5) und ADAP^{-/-}-Mäusen (MW=10,002; SFM=2,78) (ungepaarter t-Test t(4)= 1,072 p>0,05) (Abbildung 31).

Ergebnisse

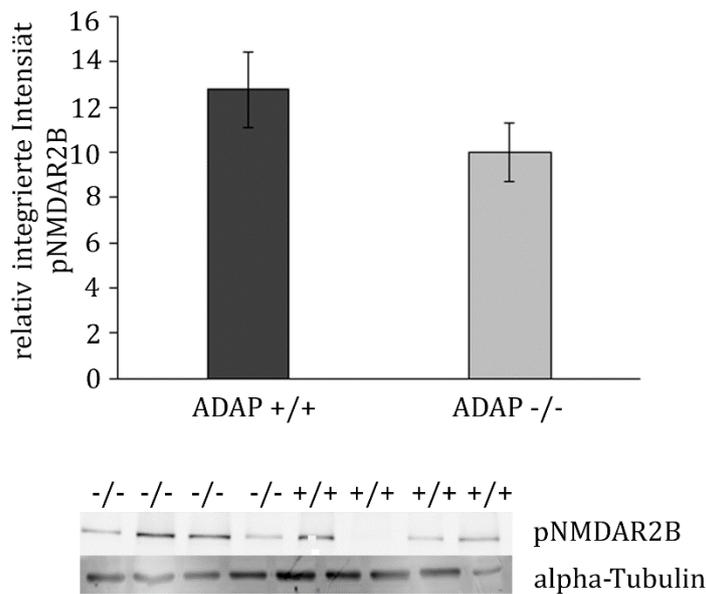


Abbildung 31: pNMDAR2B: Die Quantifizierung der Phosphorylierungsstelle Tyrosin 1336 des NMDAR2B-Rezeptors 5 min nach der Furchtkonditionierung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen der Mäuse. $MW \pm SFM$; $N=3$ pro Genotyp

3.4. ADAP und der NF- κ B-Signalweg

3.4.1 NF- κ B-Aktivierung in ADAP-Mutanten nach der Furchtkonditionierung

Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B nach der Furchtkonditionierung aktiviert wird¹³⁵. Die ersten Ergebnisse der Verhaltensanalyse deuten auf eine mögliche Beeinträchtigung der NF- κ B-Aktivierung hin. In Zusammenarbeit mit Dr. Jan Teuber wurde die Verteilung von p65 im Cytosol und Nucleus 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung in ADAP-Mutanten untersucht (Abbildung 32, Abbildung 33, Abbildung 34).

Für die Analyse wurde je sechs Wildtypmäuse und sechs ADAP-Knock-out-Mäuse verwendet. Der Antikörper für p65 zeigt im Immunoblot eine Bande bei etwa 65 kDa und im höheren Massebereich zwei Banden für die NF- κ B-Vorläufer p100 und p105. Histon H4 diente als Marker für die nucleäre Fraktionierung. Zur Quantifizierung der p65-Verhältnisse wurde die Intensität der p65 Bande gemessen und auf die Intensität von α -Tubulin normalisiert (Abbildung 32).

Ergebnisse

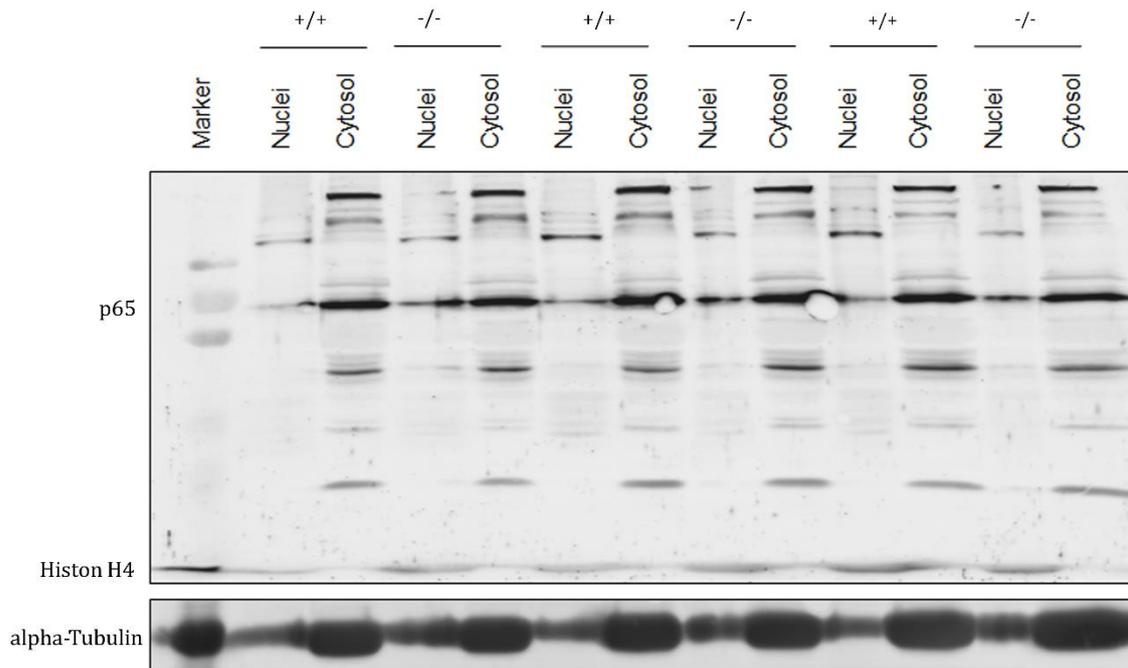


Abbildung 32: Western-Blot p65 nach der Furchtkonditionierung: 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung wurden die Hippokampi der Mäuse isoliert und das Proteinlysate in cytosolische und nukleäre Fraktion aufgeteilt. Mit Hilfe eines p65-Antikörpers wurden die Mengen an p65 quantitativ bestimmt. Als Marker für die nucleäre Fraktion diente Histone H4. Die p65-Intensität wurde für die Auswertung auf die Intensität des α -Tubulin normiert.

Beim Vergleich der p65-Intensität der nukleären und der cytosolischen Fraktion zeigt sich eine Erhöhung von p65 im Cytosol sowohl in den ADAP^{+/+} (Nucleus MW=0,1631 SFM=0,33; Cytosol MW=0,339 SFM=0,63; ungepaarter t-Test $t(10)=-6,089$ $p<0,005$) als auch in den ADAP^{-/-} (Nucleus MW=0,257 SFM=0,023; Cytosol MW=0,3457 SFM=0,075; $t(10)=-2,761$ $p<0,005$). Das cytosolische Niveau von p65 unterscheidet sich nicht zwischen den Genotypen (ADAP^{+/+}: MW=0,339 SFM=0,063; ADAP^{-/-}: MW=0,3457 SFM=0,074; $t(10)=-0,168$ $p>0,05$) (Abbildung 33).

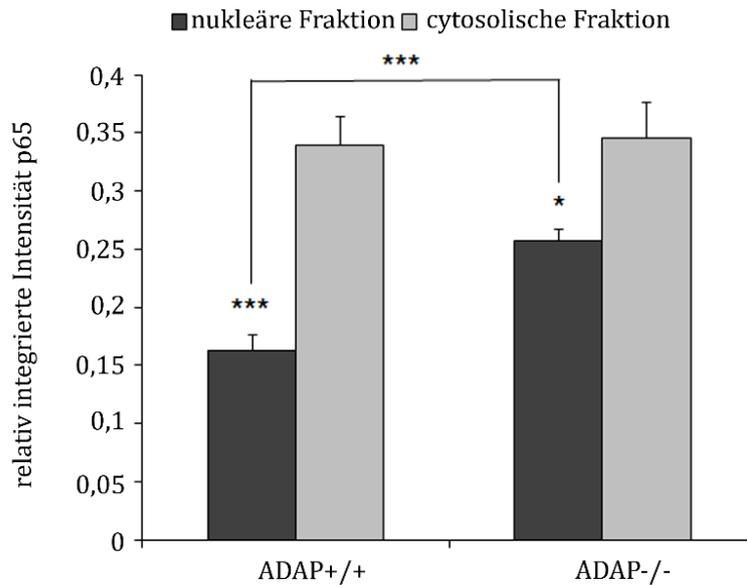


Abbildung 33: p65-Verteilung nach der Furchtkonditionierung: 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung unterscheidet sich die relativ integrierte Intensität von p65 im Cytosol nicht zwischen den Genotypen. In beiden Gruppen ist die p65-Intensität im Cytosol höher als im Nucleus. Im Nucleus weisen die ADAP-defizienten Mäuse eine signifikante Erhöhung der p65-Intensität im Vergleich zu den Wildtypen auf. MW \pm SFM * $p < 0,05$; *** $p > 0,005$ N=6 pro Genotyp

Zur Überprüfung, ob die p65-Erhöhung im Nucleus der ADAP-Knock-out-Mäuse aus der Furchtkonditionierung resultiert, wurde die subzelluläre Fraktionierung mit Tieren wiederholt, die keine Furchtkonditionierung durchlaufen haben und nur der Trainingsbox ausgesetzt wurden. Die Bestimmung der p65-Verteilung im Nucleus und im Cytosol erfolgte zwei Stunden nachdem die Mäuse in der Trainingsbox saßen. Abbildung 34 zeigt, dass es keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der cytosolischen (ADAP^{-/-}: MW=0,169 SFM=0,034; ADAP^{+/+}: MW=0,187 SFM=0,12; ungepaarter t-Test $t(10)=-1,245$ $p > 0,05$) und der nukleären Fraktion (ADAP^{-/-}: MW=0,203 SFM=0,18; ADAP^{+/+}: MW=0,223 SFM=0,18 $t(10)=-0,196$ $p > 0,05$) gibt.

Ergebnisse

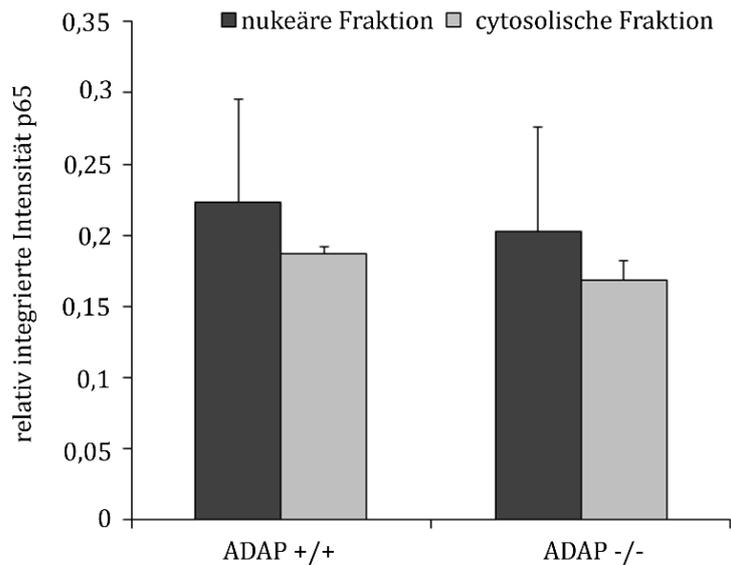


Abbildung 34: p65-Verteilung nach dem Händeln: Als Kontrolle zu den furchtkonditionierten Mäusen wurde, die Menge an p65-Protein in 'gehändelten' Tieren bestimmt. Diese Mäuse wurden nur in die Furchtkonditionierungskammer gesetzt, bekamen aber keinen Ton oder Fußschock präsentiert. Die Expression von p65 ist den ADAP-defizienten Mäusen leicht reduziert, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren. (MW±SFM).N=6 pro Genotyp

3.4.2 Expression von IKK α und IKK β nach der Furchtkonditionierung

Der Verlust von ADAP führt in T-Zellen zu einer Beeinträchtigung der NF- κ B-Aktivierung^{97,98}. Die Proteinlysate der ADAP-defizienten Mäuse zeigen aber eine Erhöhung von p65 im Nucleus. Um zu testen, ob es Veränderungen im NF- κ B-Signalweg gibt, wurde die Proteinmenge von IKK α (Abbildung 35) und IKK β (Abbildung 36), den zwei katalytischen Untereinheiten des I κ B-Komplexes, bestimmt. Die Proteinmenge der regulatorischen Untereinheit IKK γ konnte aufgrund von unspezifischen Bindungen des Antikörpers nicht bestimmt werden. IKK α ist etwa doppelt so stark in den ADAP-Wildtypmäusen exprimiert wie in den ADAP-Knock-out-Mäusen (ADAP^{+/+}: MW=0,059244225 SFM=0,0134; ADAP^{-/-}: MW=0,2778 SFM=0,131; t(6)= 3,360 p=0,015 (ungepaarter t-Test)).

Ergebnisse

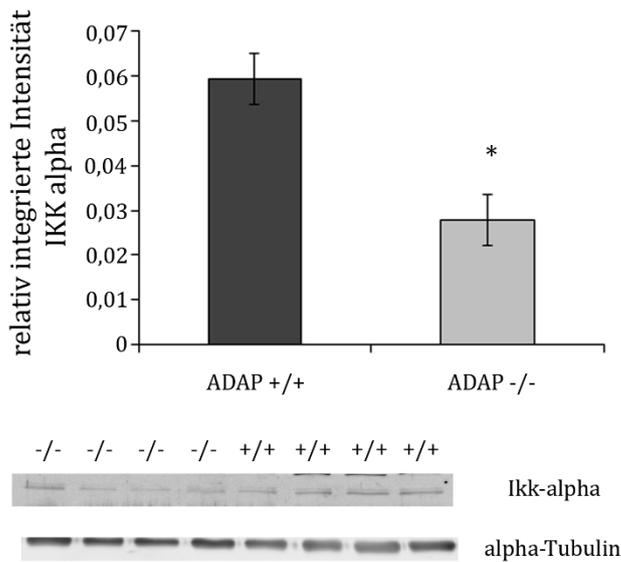


Abbildung 35: IKK α -Expression 5 min nach der Furchtkonditionierung: Unmittelbar nach der Furchtkonditionierung kommt es in den ADAP-defizienten Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der IKK α -Proteinmenge. Die Intensität von IKK α wurde auf die Intensität von α -Tubulin normiert. Mittelwert \pm SFM * $p < 0,05$. N=3 pro Genotyp

Die zweite katalytische Untereinheit IKK β scheint in den ADAP-defizienten Mäusen leicht reduziert zu sein. Dieser Trend wird aber nicht signifikant (ADAP $^{+/+}$: MW=0,1344 SFM=0,0568; ADAP $^{-/-}$: MW = 0,1060 SFM = 0,0199; $t(6) = 0,945$ $p > 0,05$).

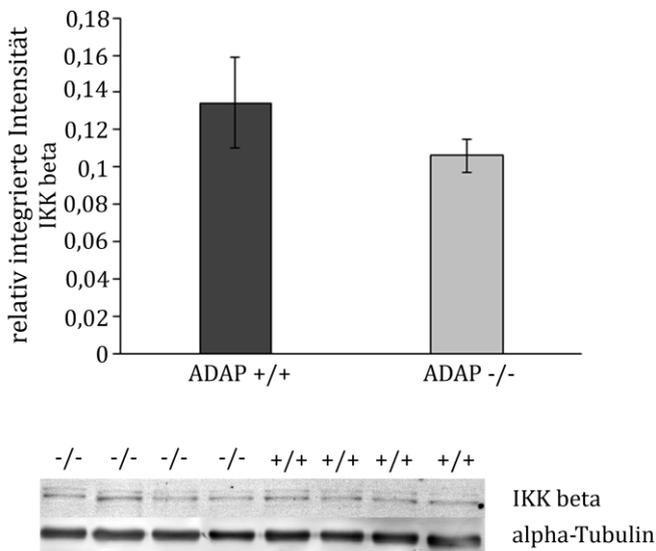


Abbildung 36: IKK β -Expression 5 min nach der Furchtkonditionierung. In den Wildtypen kommt es unmittelbar nach der Furchtkonditionierung zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung von IKK β . Die IKK β -Intensität wurde auf die integrierte Intensität von α -Tubulin normiert. (MW \pm SFM) N=3 pro Genotyp

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das hämatopoetische Adapterprotein ADAP nicht nur in den Zellen des Immunsystems exprimiert wird, sondern auch in Neuronen und hier eine wichtige Rolle bei deren Differenzierung spielt. Dabei wirkt es durch die Aktivierung der β 1-Integrine und der basalen NF- κ B-Aktivität auf das dendritische Wachstum sowie die dendritische Differenzierung.

Eine erste Charakterisierung der ADAP-defizienten Mäuse zeigte eine leichte Veränderung in der Moosfaserprojektion des *Gyrus dentatus* und nach der Furchtkonditionierung ein reduziertes *Freezing*, das durch *spaced*-Training wieder aufgehoben werden konnte. Nach der Furchtkonditionierung zeigten die ADAP^{-/-}-Mäuse eine erhöhte *Focal adhesion* Kinase-Phosphorylierung und einen Verlust der IKK α -Untereinheit sowie eine erhöhte p65-Lokalisation im Nucleus, was auf Veränderungen in den Integrin- und NF- κ B-Signalwegen hindeutet.

4.1.1 Der ADAP-SKAP-HOM-Komplex

Eine Reihe von Studien in T-Zellen belegen, dass ADAP ein bedeutender Faktor für die Integrinaktivierung ist. So bilden ADAP und SKAP-HOM zusammen den ADAP-SKAP-HOM-Komplex, der die Rap1-Effektoren RAPL und RIAM, die *Ste20-like kinase* MST1 sowie die FERM-Domäne enthaltenden Proteine Talin und Kindlin-3 zur Plasmamembran rekrutiert^{81,96,136}. Die Bildung dieses makromolekularen Komplexes ist entscheidend für die Integrinaktivierung, die zur Adhäsion und Migration von T-Zellen führt. Auf diese Weise wird die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen vermittelt^{86,137}. In verschiedenen Zelltypen des Immunsystems wie T-Zellen, Thrombocyten, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulocyten sind ADAP und/oder SKAP55, ein Homolog von SKAP-HOM wichtig für die rezeptorvermittelte Integrinaktivierung^{82,138–144}. ADAP und SKAP55 kontrollieren in T-Zellen die Adhäsion und die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen sowie die T-Zellmigration *in vitro* und *in vivo*^{81,142,145–148}. Im Hippokampuslysat konnte die Expression von ADAP, SKAP-HOM, RAPL, RIAM und MST1 nachgewiesen werden

(Abbildung 9 S.67). Mit Hilfe der Co-Präzipitation konnte gezeigt werden, dass ADAP, SKAP-HOM, RAPL und MST1 in einem Komplex auch im Hippokampus vorkommen. Das deutet daraufhin, dass auch in Neuronen ADAP in einem Komplex existiert, der vergleichbar ist mit dem ADAP/SKAP55/RAPL/MST1-Komplex in T-Zellen und möglicherweise die Aktivität der Integrine während der neuronalen Entwicklung kontrolliert ²⁷.

4.1.2 ADAP beeinflusst die β 1-Integrin-Aktivierung in den Dendriten

Neurone exprimieren verschiedene β 1- und β 3-Integrine³¹, die durch ihre Interaktion mit der extrazellulären Matrix (Fibronektin, Laminin oder Kollagen) und verschiedenen löslichen Faktoren, wie Semaphorine, Ephrine, und Netrine, die die Migration der Neurone und das Neuritenwachstum vermitteln⁶⁷. Insgesamt kommen die Integrine in den Neuronen selten in der offenen aktivierten Konformation vor. Die Aktivierung erfolgt dann entweder über den *inside-out*-Weg durch Exzitation oder durch eine hohe Konzentration der Liganden in der extrazellulären Matrix über den *outside-in*-Mechanismus^{149,150}. Neben der lokalen Aktivierung von Integrinen kann auch durch Integrinrecycling das Auswachsen von Axonen oder die Bildung von Wachstumskegeln initiiert werden⁶⁷. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Arf, Ras und Rho GTPasen, sowie die *Integrin-linked kinase* und die *focal adhesion kinase* und die FERM-Domäne enthaltenden Proteine Talin und Kindlin-1 die Funktion der Integrine regulieren ^{67,130,151,152}.

Sowohl ADAP als auch SKAP-HOM werden im Soma und in den Dendriten sich entwickelnder Neurone exprimiert. In der frühen Entwicklung ist ADAP in den dendritischen (Abbildung 10 S.68) und axonalen Wachstumskegel zu finden. Später in der Entwicklung ist ADAP in MAP2-positiven Segmenten lokalisiert (Abbildung 9 S.67, Abbildung 10 S.68). Eine Assoziation mit den Mikrotubuli wurde auch schon für RAPL und MST1 in anderen Zelltypen gezeigt^{153,154}. Mit Hilfe der quantitativen PCR konnte eine Regulation der ADAP-mRNA-Expression in der sich entwickelnden hippokampalen Primärkultur gezeigt werden (Abbildung 13 S.70). Zusammen mit den Ergebnissen aus der Immunocytochemie legen die Daten der quantitativen PCR nahe, dass ADAP eine Rolle in der Entwicklung von Neuronen spielt. Als Adapterprotein verfügt ADAP selbst über keinerlei Kinase- oder enzymatische Aktivität; demnach erfolgt auch keine Regulation der Aktivität

von ADAP, so dass Veränderungen in der Expression sich direkt funktional abbilden müssten.

In der frühen Entwicklung der hippokampalen Primärkultur werden hauptsächlich β 1-Integrine exprimiert (Abbildung 14 S.71, Abbildung 15 S.72, Abbildung 17 S.75). Sie sind zu diesem Zeitpunkt bedeutend für die dendritische Differenzierung^{27,41,44}. Die Aktivierung der Integrine in den auswachsenden Neuriten beinhaltet die Phosphorylierung der cytosolischen Kette, das Verpacken der Integrine in recycelbaren Endosomen und den Transport zur Plasmamembran^{44,151}. In Neuronen des Hippokampus und des Kortexes konnte die Relokalisation der Integrine vom Soma zum Dendriten während der Bildung und der Reifung der Dendriten gezeigt werden¹⁵⁵. In T-Zellen ist der ADAP/SKAP55/RAPL/MST1-Komplex mit der α -Kette von LFA-1 assoziiert⁸¹. In hippokampalen Primärkulturen konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der ADAP-Expression zu einer verringerten Menge an aktivierten β 1-Integrinen in den Dendriten führt, wobei die totale Menge an β 1-Integrinen in den Dendriten erhöht ist (Abbildung 14 S.71, Abbildung 15 S.72). Die Sholl-Analyse der Neurone zeigte desweiterm eine Reduktion des dendritischen Wachstum nach einer Suppression der ADAP-Expression (Abbildung 16 S.74) und unterstützt somit die Hypothese, dass ADAP/SKAP-HOM an der *inside-out*-Aktivierung der Integrine während der dendritischen Differenzierung beteiligt ist. Die ADAP-reduzierten Neurone zeigen eine Erhöhung der totalen β 1-Integrine-Expression in den Dendriten und eine Reduktion im Soma (Abbildung 15 S.72). Diese Integrinumverteilung könnte eine kompensatorische Veränderung sein, um die negativen Folgen der verminderten *inside-out*-Aktivierung der Integrine zu minimieren. Inwieweit die Integrine hier in der inaktiven Konformation in der Plasmamembran vorliegen oder sich in den endosomalen Vesikeln des Integrinrecyclingweges befinden ist unklar.

Die Integrine stabilisieren nicht nur Dendriten, sondern auch dendritische Dornfortsätze. Eine quantitative Bestimmung des β 1-Integrin-mRNA-Niveaus in der sich entwickelnden Primärkultur zeigte einen Anstieg der β 1-mRNA an DIV 7 und erreichte ihren Höhepunkt an DIV 14 (Abbildung 17 S.75). In diesem Zeitraum werden vor allem dendritische *spines* und Synapsen gebildet. Die immuncytochemische Färbung zeigte eine Kolokalisation von ADAP und β 1-Integrin in einer Synapsen-ähnlichen Struktur (Abbildung 18 S.76). ADAP scheint

somit nicht nur die dendritische Differenzierung zu beeinflussen, sondern ist möglicherweise auch an der Synaptogenese oder synaptischen Reifung beteiligt.

4.1.3 ADAP-knock-down reduziert die MAP2-Expression in sich entwickelnden Neuronen

Der Einfluss von ADAP auf die neuronale Entwicklung wurde mit Hilfe der Sholl-Analyse (Abbildung 16 S.74) und der Expression des dendritischen Markers MAP2 (Abbildung 19 S.77) analysiert. Die Sholl-Analyse zeigte ein vermindertes dendritisches Wachstum und ein verminderte Expression von MAP2. Auch ADAP-defiziente T-Zellen zeigen eine reduzierte Produktion von Differenzierungsmarkern.

MAP2 ist ein entscheidender Faktor für die Dendritogenese und das Auswachsen von Dendriten^{156,157}. Die Expression von MAP2 in sich entwickelnden Neuronen wird durch die Stimulation der Integrine kontrolliert^{158,159}. Beta1-defiziente Neurone zeigen auf Gelatine-beschichteten Deckgläschen eine Reduktion des Neuritenlängenwachstums sowie eine reduzierte Expression von MAP2. Durch Kultivierung der Neurone auf den β 1-Integrin-abhängigen Substraten Laminin und Fibronectin konnte die Reduktion des Neuritenwachstums und der MAP2-Expression teilweise aufgehoben werden¹⁶⁰. Dabei fördert Laminin die Differenzierung stärker als Fibronectin. Ob die Reduktion der Dendritendifferenzierung in den ADAP-reduzierten Neuronen durch die Kultivierung auf β 1-abhängigen Substraten aufgehoben werden kann, muss daher noch untersucht werden.

ADAP bildet in T-Zellen Module mit SKAP55/RAPL/MST1 und SKAP55/RIAM/MST/Kindlin-3/Talin, welche mit der α - oder β -Kette von α L β 2-Integrin assoziiert sind⁸¹. Die Co-Präzipitation zeigte die Assoziation von ADAP mit SKAP-HOM/RAPL/MST1; jedoch nicht mit dem Talin-bindenden Rap1-Effektor RIAM (Abbildung 9 S.67). Die Daten der Sholl-Analyse sowie der β 1-Integrin-Aktivierung deuten zusammen mit dem Ergebnis der Co-Präzipitation darauf hin, dass ADAP mit SKAP-HOM/RAPL/MST1 interagiert und über die Integrinaktivierung die Dendritendifferenzierung vermittelt.

Die einzigartige Morphologie der Neurone beruht auf der Bildung von Neuriten, die anschließend zu Axonen und Dendriten differenzieren¹⁶¹. Die Entwicklung von Neuriten

setzt die Dynamik des Aktincytoskeletts voraus, die auf zwei Wegen reguliert werden kann. Ein Weg nutzt die Integrin-abhängige Aktivierung von FAK und Src und die Aktivität des Arp2/3-Komplexes während der andere die Aktindynamik über die Ena/VASP-Proteine reguliert. In aktivierten T-Zellen bindet ADAP an die Mitglieder der Ena/VASP-Familie und beeinflusst die Reorganisation des Aktincytoskeletts¹⁶². Über die Interaktion mit Ena/VASP kann ADAP die Neuritogenese möglicherweise durch die Reorganisation des Aktincytoskeletts in der An- und Abwesenheit von Integrinsubstraten regulieren¹⁶¹.

Nck2 ist ein möglicher Assoziationspartner von ADAP, der nach einer Phosphorylierung durch c-Fyn binden kann⁸⁴ und in PC12-Zellen an der durch Wachstumsfaktoren induzierten Neuritogenese beteiligt ist¹⁶³. C-Fyn wiederum aktiviert im Hippokampus der Maus Integrine¹⁶⁴ und beeinflusst das Neuritenwachstum sowie das Semaphorin 3A-induzierte Verzweigen der Dendriten¹⁶⁵. Semaphorin 3A inhibiert das axonale Wachstum und fördert das Wachstum apikaler Dendriten. Semaphorin 7A vermittelt das axonale Wachstum über die Integrine¹⁶⁶.

4.1.4 ADAP beeinflusst die NF- κ B-Aktivität

Die verminderte neuronale Differenzierung in ADAP-reduzierten Zellen könnte möglicherweise auch eine Störung der bekannten NF- κ B-Aktivierung durch ADAP beinhalten. In T-Zellen aktiviert ADAP ohne seinen Bindungspartner SKAP-HOM den kanonischen NF- κ B-Signalweg⁹⁷. NF- κ B ist konstitutiv aktiv in den glutamatergen Neuronen des Hippokampus^{167,168,169} und ist von großer Bedeutung für das dendritische Wachstum. So beeinflusst NF- κ B das Auswachsen und das Verzweigen von Dendriten und die Anzahl der Dornfortsätze¹⁷⁰⁻¹⁷².

Durch das Glia-freie Primärkultursystem war es möglich, die ADAP-Effekte auf die NF- κ B-Aktivierung ohne den Einfluss glialer Cytokine, wie TNF- α und Interleukin 1 β , zu testen. TNF- α als pro-inflammatorisches Cytokine beeinflusst das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Neurone¹⁷³. Über die NF- κ B-Aktivierung unterstützt TNF- α das Neuritenlängenwachstum¹⁷⁴. Es wurde deshalb neben der basalen NF- κ B-Aktivität auch die Aktivierung von NF- κ B nach TNF- α - und Insulinstimulation bestimmt. TNF- α ist ein Aktivator des kanonischen Signalweges, wohingegen Insulin über den nicht-kanonischen

Signalweg aktiviert. ADAP-defiziente Zellen zeigten keine Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nach der TNF- α -Stimulation, aber eine starke Reduktion der basalen NF- κ B-Aktivität (Abbildung 21 S.79). Das deutet daraufhin, dass ADAP in sich entwickelnden Neuronen NF- κ B aktiviert, aber wahrscheinlich keine Rolle bei der Aktivierung durch die von der Glia sekretierten Cytokine spielt. Die Re-Expression von ADAP konnte die NF- κ B-Aktivität nicht wiederherstellen; das liegt möglicherweise an einem nicht ausreichenden Re-Expressionsniveau von ADAP oder daran dass für die NF- κ B-Aktivität eine dynamische ADAP-Expression benötigt wird.

Verglichen mit anderen Effekten einer reduzierten ADAP-Expression scheint die ADAP-abhängige NF- κ B- Aktivität nicht bedeutend für das dendritische Längenwachstum zu sein; könnte aber die Expression des dendritischen Markers MAP2 beeinflussen und auf diesem Wege die Dendritogenese beeinflussen.

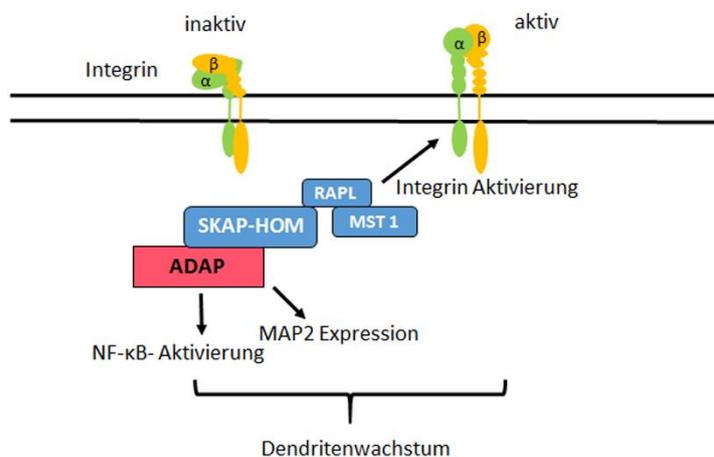


Abbildung 37: ADAP in Neuronen nach Thiere *et al.*³⁸: In hippocampalen Neuronen existiert ADAP in einem Komplex mit SKAP-HOM, RAPL und MST1, der β 1-Integrine über den *inside-out*-Mechanismus aktiviert und auf diesem Wege das dendritische Wachstum in der hippocampalen Primärkultur vermittelt. ADAP scheint an der Modulation der NF- κ B-Aktivierung und der MAP2-Expression beteiligt zu sein.

Die Daten der hippocampalen Primärkultur zeigen, dass ADAP ein wichtiger Faktor für die *inside-out*-Aktivierung der β 1-Integrine und die Integrin-abhängige dendritische Differenzierung der hippocampalen Neurone ist.

4.2.1 ADAP im adulten Hippokampus

ADAP wird sowohl während der postnatalen Entwicklung als auch nach deren Abschluss im Hippokampus exprimiert (Abbildung 22 S.80). Im adulten Hippokampus ist ADAP sowohl in dem *Cornu ammonis* als auch im superioren Blatt des *Gyrus dentatus* und einigen Interneuronen zu finden. Um die Relevanz der beobachteten Entwicklungsdefizite in ADAP-defizienten isolierten Neuronen auch *in vivo* zu überprüfen, wurden die Struktur des Hippokampus sowie dendritische und axonale Marker untersucht. Der adulte Hippokampus der ADAP-Mutante zeigte in den Übersichtsfärbungen jedoch keine morphologischen Veränderungen. Auch mit einer immunhistochemischen MAP2-Färbung wurden keine Veränderungen in der Dendritendifferenzierung erkennbar. Um einen Effekt auf die Dendritendifferenzierung komplett ausschließen zu können, sind weitere hochauflösendere Analysen notwendig. Die MAP2-Expression wird *in vitro* durch die β 1-Integrin-Liganden Laminin und Fibronectin beeinflusst. Im Gehirn befinden sich diese beiden Integrinliganden im extrazellulären Raum und könnten möglicherweise kompensatorisch wirken. Möglicherweise werden auch *in vivo* Defizite des *inside-out*-Signalweges durch den *outside-in*-Signalweg kompensiert oder durch Cytokine wie TNF- α , die von den Gliazellen sekretiert werden.

In der Timm-Färbung hingegen zeigten die ADAP-defizienten Mäuse eine Reduktion der Dicke des suprapyramidalen Bandes in der CA2-Region des Hippokampus im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Gleichzeitig zeigte das infra/intrapramidale Band eine erhöhte Intensität. Während der Moosfaserentwicklung wächst das infra/intrapramidale Band erst lang aus und zieht sich dann wieder zurück¹⁷⁵. Ein Effekt der durch die Semaphorine vermittelt wird¹⁷⁶. Die Länge des infrapyramidalen Bandes variiert über verschiedene Spezies und Stämme¹¹. Veränderungen in den Moosfaserprojektionen korrelieren mit Veränderungen im Hippokampus-abhängigen Verhalten¹⁷⁷. Auch in *Fyn*^{-/-}-Mäusen wird ein Effekt auf die Moosfasern beobachtet. So zeigt die Timm-Färbung von *Fyn*-Knock-out-Mäusen eine wellenartige Form in der CA3-Region¹¹³. Die allgemeine Projektion der Moosfasern in diesen Tieren ist jedoch nicht weiter beeinträchtigt. Die *Fyn*^{-/-}-Mäuse weisen eine erhöhte Neuronenanzahl in der CA3-Region auf; jedoch nicht in der CA1-Region. Grant *et al.* postulieren, dass *Fyn* möglicherweise an der Regulierung der Apoptose beteiligt ist¹¹³. Während der T-Zellentwicklung ist für die Apoptose eine Erhöhung der freien

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration notwendig. In $\text{Fyn}^{-/-}$ -Thymocyten ist der Ca^{2+} -Flux vermindert, so dass die Fähigkeit auf bestimmte Antigene mit dem programmierten Zelltod zu antworten, vermindert ist. ADAP ist in den T-Zellen an der Zellzyklusprogression beteiligt⁸⁶. Ob der Effekt auf die Moosfasern in den $\text{ADAP}^{-/-}$ -Mäusen abhängig ist von Apoptose, Proliferation oder Migration während der Entwicklung, muss in künftigen Arbeiten genauer untersucht werden. Des Weiteren ist unklar, ob das ADAP-abhängige axonale Wachstum der Moosfaser durch die Integrin-vermittelte Adhäsion oder durch die Aktivierung von NF- κ B beeinflusst wird. NF- κ B ist nicht nur bedeutend für das dendritische Wachstum und die Anzahl der dendritischen Dornfortsätze, sondern auch relevant für das axonale Wachstum¹⁷⁸. So zeigen Studien, dass ein Verlust von NF- κ B zu einer Reduktion in der Moosfaserprojektion führt¹⁷⁸. I κ B/tTA-Mäuse weisen ein schmaleres suprapyramidales Blatt im *Gyrus dentatus* auf¹⁷⁹. Auch eine Aktivierung von NF- κ B durch β 1-Integrine ist möglich¹⁸⁰. Untersuchungen in Fibroblasten zeigen, dass α 5 β 1-Integrin, das auch im Hippokampus vorkommt, die NF- κ B-abhängige Transkription aktiviert¹⁸¹.

4.2.2 Die funktionelle Relevanz von ADAP *in vivo*

Um die funktionelle Relevanz von ADAP *in vivo* zu zeigen und die ADAP-bekanntes Effektorwege auf eine mögliche Beteiligung zu überprüfen, wurden ADAP-Mutanten im Offenfeld getestet und furchtkonditioniert. Die Dichte des infra/intrapyramidalen Bandes korreliert mit dem Explorationsverhalten von Mäusen im Offenfeld¹⁷⁷. Die ADAP-defizienten Mäuse zeigten am zweiten Tag ein leicht erhöhtes Explorationsverhalten im Vergleich zu den Wildtypen (Abbildung 29 S.88).

Für die Furchtkonditionierung wurden zwei verschiedene Trainingsmethoden verwendet. Bei dem sogenannten *massed*-Training erfolgte das Training an zwei Tagen, wobei während jeder Trainingssitzung der US gepaart mit CS+ dreimal präsentiert wurde. Hier zeigten die ADAP-defizienten Mäuse eine Reduktion in der Erstarrungszeit, nachdem sie wieder in den Trainingskontext gesetzt wurden (Abbildung 27 S.85). Bei der Präsentation des CS- und CS+ gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Nach einem *spaced*-Training, bei dem das Training an einem Tag erfolgte und der US gepaart mit CS+ dreimal im Abstand von einer Stunde präsentiert wurde, zeigten $\text{ADAP}^{-/-}$ -Mäuse jedoch

keine Reduktion mehr in der Erstarrungszeit (Abbildung 28 S.87). Ein ähnlicher Effekt wurde schon in der Krabbe *Chasmagnathus* beschrieben¹⁸². Freudenthal *et al.* zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B hier eine Rolle spielt. So induziert das *spaced*-Training eine verstärkte Bindung von NF- κ B an die DNA. Das lässt vermuten, dass eine Störung der NF- κ B-Aktivierung der ADAP^{-/-}-Mäuse für die beobachtete Reduktion des Furchtgedächtnisses nach *massed*-Training verantwortlich sein könnte; bzw. dass die erhöhte Aktivierung von NF- κ B nach *spaced*-Training durch die ADAP-Defizienz hervorgerufenene Lerndefizite aufhebt.

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über den kanonischen (klassischen) oder den nicht-kanonischen (alternativen) Signalweg. Der klassische Signalweg wird durch eine Liganden-Rezeptorbindung aktiviert, infolge dessen es zur Aktivierung des IKK-Komplexes kommt. Der IKK-Komplex besteht aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit Nemo. Der IKK-Komplex phosphoryliert I κ B. I κ B wird ubiquitiniert und degradiert, so dass p50/p65 in den Nucleus translozieren können.

Der nicht-kanonische Weg agierte über die NF- κ B-*inducing kinase* (NIK) und einen IKK-Komplex, der nur aus zwei IKK α -Untereinheiten besteht. Nik phosphoryliert IKK α , die wiederum p100 phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung von p100 wird p100 prozessiert und der Heterodimer p52/RelB wird frei.

Proteinanalysen nach der Furchtkonditionierung zeigten, dass in ADAP-defizienten Mäusen die IKK α -Proteinmenge im Hippokampus reduziert war (Abbildung 35 S.94), die IKK β -Expression (Abbildung 36 S.94) jedoch unverändert blieb. Dies könnte auf eine Störung im alternativen Weg der NF- κ B-Aktivierung in den ADAP-knock-out-Mäusen hinweisen. Ob die Reduktion von IKK α aus der Furchtkonditionierung resultiert oder generell in ADAP^{-/-}-Mäusen vorliegt, sollte in der Zukunft überprüft werden.

IKK α ist nicht nur bedeutend für die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs, sondern ist auch involviert in die negative Feedback-Regulation des nicht-kanonischen Signalwegs¹⁸³. Der entscheidende Schritt in der Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges ist die Stabilisierung der *NF- κ B inducing kinase*, die normalerweise in ruhenden Zellen durch einen Komplex aus TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*), TRAF3, cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis 1*) und cIAP2 degradiert

wird und nicht nachweisbar ist. Nach einer Rezeptorstimulation akkumuliert NIK und phosphoryliert IKK α , die dann den C-Terminus von p100 phosphoryliert, dem NF- κ B-Vorläufer¹⁸⁴.

So ist in Fibroblasten gezeigt worden, dass IKK α NIK phosphoryliert und dadurch auch destabilisiert. In der Abwesenheit der IKK α -vermittelten negativen Feedback-Schleife kommt es zu einer Erhöhung von NIK nach der Rezeptorligation. Eine IKK α -abhängige Destabilisierung von NIK verhindert die unkontrollierte Aktivität des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweges nach Rezeptorligation¹⁸³.

IKK α ist aber auch bedeutend für die Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges. Eine optimale Aktivierung der Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen benötigt eine Translokation von IKK α in den Nucleus¹⁸⁵. So vermittelt IKK α über die Phosphorylierung von Histon H3 die Acetylierung von Histon H13 durch das *IKK α -associated histone acetyltransferase CREB-binding protein*, einem kritischen Schritt in der Modulierung der Chromatinzugänglichkeit an NF- κ B-empfindlichen Promotoren^{186,187}. IKK α limitiert die NF- κ B-Aktivierung in LPS (Lipopolysaccharid)-stimulierten Makrophagen durch Kontrolle des p65 und c-Rel-Umsatzes durch die Phosphorylierung der C-Termini¹⁸⁸. In HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass IKK α direkt die Bindung von p65 an die DNA vermittelt^{189,190}. So konnte mit Hilfe eines ChiP-assays gezeigt werden, dass IKK α bedeutend ist für die Bindung von p65 an die κ B-Bindungsstelle von *icam-1 (intracellular adhesion molecule-1)* ist¹⁸⁵. Die IKK α -abhängige Aktivierung von p52/RelB ist bedeutend für CXCL12/SDF-1-Produktion, damit Zellen zu HMGB1 (*high mobility group box 1*) migrieren¹⁹¹.

Nach der Furchtkonditionierung lag in den ADAP-defizienten Mäusen eine erhöhte Menge an p65 in der nukleären Fraktion vor (Abbildung 33 S.92). P65 transloziert nach der Aktivierung des klassischen NF- κ B durch TNF- α in den Kern. Die Ergebnisse der NF- κ B-Aktivierung in der Primärkultur zeigten, dass ein ADAP-Verlust in keiner verminderten NF- κ B-Aktivierung nach TNF- α -Stimulation resultiert. Diese beiden Ergebnisse deuten daraufhin, dass ADAP nicht an der NF- κ B-Aktivierung über den kanonischen Weg beteiligt ist. Ob allerdings die reduzierte Menge an IKK α im Cytosol auch auf eine verminderte Menge an IKK α im Nucleus schließen lässt, ist unklar. Es müsste getestet werden, ob die Translokation von IKK α in den ADAP-defizienten Mäusen beeinträchtigt ist und ob es infolge dessen in den ADAP^{-/-}-Mäusen zu einer verminderten Transkription von NF- κ B-

abhängigen Genen kommt. NF- κ B-abhängige Targets in den Neuronen sind das Zelladhäsionsmolekül NCAM, der metabotrope Glutamatrezeptor mGluR1 und der Chemokinrezeptor CXCR2.

Ob es aufgrund der IKK α -Reduktion zu einer verminderten Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs kommt oder aufgrund der fehlenden negativen Feedbackregulierung gar zu einer gesteigerten Aktivierung könnte mit Hilfe einer Quantifizierung von Rel-B und p52 analysiert werden.

Nach der Furchtkonditionierung konnte eine erhöhte Phosphorylierung der *Focal adhesion kinase* (FAK) in den ADAP-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abbildung 30 S.89). FAK spielt eine Schlüsselrolle in der Cytoskelettorganisation, die wichtig für das Neuritenlängenwachstum ist. So führt die Deletion von FAK zu einer abnormalen Dendritenmorphologie⁴⁴, aber nicht zu einer veränderten Positionierung der Neurone. Die Phosphorylierung von FAK gilt als Indikator für eine Integrinaktivierung. So zeigen Jee *et al.*, dass TNF- α FAK aktivieren kann¹⁹². Es besteht somit auch die Möglichkeit, dass ADAP durch die Aktivierung der Integrine auf den NF- κ B-Signalweg einwirkt.

FAK ist nicht nur im Cytoplasma lokalisiert, sondern transloziert auch in den Nucleus. Im Nucleus bewirkt FAK eine Degradation von p53 und verstärkt so die Zellproliferation und kann als Co-Faktor die Transkription beeinflussen¹⁹³. Die FAK-Phosphorylierung wurde in einem Proteintotalysat bestimmt, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob FAK nach der Furchtkonditionierung im Cytosol oder im Nucleus vorliegt. Ob die erhöhte Phosphorylierung von FAK ein Effekt der Furchtkonditionierung ist oder generell in den ADAP-Knock-out-Mäusen vorliegt, muss verifiziert werden. In *Fyn*^{-/-}-Mäusen liegt eine Hypophosphorylierung der FAK vor¹⁹⁴ und ein Mutationsexperiment zeigt, dass die Blockierung der Phosphorylierungsstelle Ser 21 die Kinaseaktivität von *Fyn* verändert und es infolgedessen zu einer reduzierten Phosphorylierung der FAK kommt¹⁹⁵. ADAP besitzt als Adapterprotein keine Kinaseaktivität, ist aber ein Bindungspartner von *Fyn*. Möglicherweise moduliert ADAP die FAK-Phosphorylierung durch *Fyn*.

4.2.3 ADAP ist nicht an der Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren beteiligt

Im C-terminalen Teil von GluN2B wurden drei Fyn-abhängige Phosphorylierungsstellen Tyr 1252, Tyr 1336 und Tyr 1472 gefunden¹⁹⁶. Die Phosphorylierung an Tyr 1336 vermittelt die Calpain-vermittelte Spaltung von GluN2A und GluN2B. Die Phosphorylierung an Tyr 1336 war nach der Furchtkonditionierung weder in den Wildtypen noch in den ADAP knock-out-Mäusen nachweisbar. Ebenso wenig konnte erhöhte Phosphorylierung am Tyrosinrest Tyr 1472 in den ADAP-defizienten Mäusen beobachtet werden. Diese Phosphorylierung soll synaptische NMDA-Rezeptoren stabilisieren. Die Fyn-vermittelte Phosphorylierung von GluN2B soll während der kontextuellen und auditorischen Furchtkonditionierung eine Rolle spielen. So ist in Fyn^{-/-}-Mäusen sowohl das Kurzzeitgedächtnis als auch das Langzeitgedächtnis während der kontextuellen Furchtkonditionierung beeinträchtigt. So induziert die Furchtkonditionierung eine Fyn-Aktivierung und eine vermehrte Phosphorylierung von GluN2B im Hippokampus von Wildtypen, aber nicht in Fyn-negativen Mäusen¹⁹⁷. Durch die kontextuelle Furchtkonditionierung kommt es zu einer transienten Aktivierung von Fyn. ADAP scheint als Bindungspartner von Fyn nicht an der Fyn-abhängigen Phosphorylierung und Stabilisierung der NMDA-Rezeptoren beteiligt zu sein.

4.3. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADAP die β 1-abhängige Dendritendifferenzierung *in vitro* beeinflusst. Mit Hilfe der Primärkultur und einer Manipulation in der frühen Kultur kann das ADAP-abhängige axonale Wachstum untersucht werden. Mit Hilfe von Integrin- und NF- κ B-Aktivatoren und -Inhibitoren kann überprüft werden, ob das Auswachsen der Axone über den NF- κ B-Signalweg oder den Integrinweg vermittelt wird.

Ferner konnte gezeigt werden, dass ADAP zusammen mit β 1-Intgrin in Synapsen-ähnlichen Strukturen während der neuronalen Entwicklung *in vitro* vorkommt. ADAP scheint also ähnlich wie Fyn an der Synapsenbildung beteiligt zu sein. Es muss untersucht werden, ob ADAP über die Integrine an der Synapsenbildung und -differenzierung beteiligt ist. Die

Entwicklung der Synapsen kann in hippokampalen Primärkulturen mit synaptischen Markern überprüft werden. Ebenso kann in der dissoziierten Primärkultur die Synaptotagminaufnahme analysiert werden. Eine Synaptotagminaufnahme erfolgt nur in aktiven Synapsen¹⁹⁸. Eine Golgi-Färbung ermöglicht die Untersuchung eines möglichen ADAP-abhängigen Effekt auf die Synapsenentwicklung *in vivo*.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente zeigen, dass ADAP nicht nur in der Zellkultur für die Integrin-vermittelten Signalwege und die Aktivierung von NF- κ B relevant ist. Die konkreten Mechanismen wie ADAP diese Signalwege reguliert muß in zukünftigen Arbeiten untersucht werden. Aus den T-Zellen ist bekannt, dass ADAP und Fyn miteinander interagieren und die ADAP^{-/-}-Mäuse zeigen einen ähnlichen neurologischen Phänotyp wie die Fyn-Mutanten. Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen kann die mögliche Interaktion von ADAP und Fyn in Wildtypen gezeigt werden. In Proteinlysaten der Fyn^{-/-}-Mäusen kann die ADAP-Phosphorylierung untersucht werden. Veränderungen in der nukleären und cytosolischen Lokalisation von IKK α und FAK lassen sich durch weitere zelluläre Fraktionierungen untersuchen. Veränderungen in der Transkription NF- κ B-abhängiger neuronaler Targetgene, wie NCAM und mGluR1, lassen sich mit Hilfe des ChiP-*assays* oder der quantitativen PCR überprüfen.

In der Übersicht war die Cytoarchitektur des Hippokampus in den ADAP-negativen Mäusen unverändert. Es müsste allerdings noch untersucht werden, wie β 1-Integrin im Hippokampus der ADAP-Mutanten exprimiert wird. Ebenfalls sollte noch eine Quantifizierung von MAP2 im Hippokampus erfolgen.

Die Timm-Färbung zeigte Veränderungen im axonalen Wachstum der Moosfasern. Mit Hilfe eine BrdU-Markierung während der hippokampalen Entwicklung kann getestet werden, ob die Veränderung der Moosfasern auf Migrationseffekte zurückzuführen ist. In Kombination mit einer Ki67-Färbung kann das Verhältnis an BrdU⁺/Ki67⁺-Zellen zu BrdU⁺/Ki67⁻-Zellen bestimmt werden und so ein möglicher Proliferationseffekt gefunden werden. Durch die Färbung mit Apoptosemarkern, wie Caspase3 oder dem Fluoro-Jade[®] C, einem Marker für die Degeneration von Neuronen¹⁹⁹, kann ein möglicher Einfluss von ADAP auf den Zelltod während der hippokampalen Entwicklung untersucht werden.

Diskussion

Mit Hilfe von kürzlich generierten ADAPflox/flox-Mäusen könnten auch *in vivo* Veränderungen von neuronalen und nicht-neuronalen Prozessen differenziert betrachtet werden.

Referenzen

1. Bayer, S. A. Development of the hippocampal region in the rat II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.* **190**, 115–134 (1980).
2. Li, G. & Pleasure, S. J. Morphogenesis of the dentate gyrus: What we are learning from mouse mutants. *Dev. Neurosci.* **27**, 93–99 (2005).
3. Pleasure, S. J. *et al.* Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* **28**, 727–740 (2000).
4. Altman, J. & Bayer, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* **301**, 365–381 (1990).
5. Seki, T. Sato, T. Toda, K. Osumi, N. Imura, T. Shioda, S. Distinctive population of Gfap-expressing neural progenitors arising around the dentate notch migrate and form the granule cell layer in the developing hippocampus. *J Comp Neurol.* **Feb 1;522**, 261–83 (2014).
6. Altman, J. & Bayer, S. A. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* **301**, 325–342 (1990).
7. Altman, J. & Bayer, S. A. Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J. Comp. Neurol.* **301**, 343–364 (1990).
8. Belvindrah, R., Nosten-Bertrand, M. & Francis, F. Neuronal migration and its disorders affecting the CA3 region. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 63 (2014).
9. Khalaf-Nazzal, R. & Francis, F. Hippocampal development - Old and new findings. *Neuroscience* **248**, 225–242 (2013).
10. Koyama, R., Yamada, M. K., Nishiyama, N., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. Developmental switch in axon guidance modes of hippocampal mossy fibers in vitro. *Dev. Biol.* **267**, 29–42 (2004).
11. Blaabjerg, M. & Zimmer, J. The dentate mossy fibers: structural organization, development and plasticity. *Prog. Brain Res.* **163**, (2007).
12. Wiera, G. & Mozrzymas, J. W. Extracellular proteolysis in structural and functional plasticity of mossy fiber synapses in hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–21 (2015).
13. Oscar Marín, Manuel Valiente, Xuecai, G. & Tsai, Li-Huei. Guiding Neuronal Cell Migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–21 (2010).
14. Hoe, H. *et al.* Interaction of Reelin with APP promotes neurite outgrowth. **29**, 7459–7473 (2009).
15. Hayashi, K., Kubo, K. I., Kitazawa, A. & Nakajima, K. Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Front. Neurosci.* **9**, 1–11 (2015).

16. Bagri, A. *et al.* The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development* **129**, 4249–4260 (2002).
17. Lu, M., Grove, E. A. & Miller, R. J. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7090–5 (2002).
18. Stanfield, B. B. & Cowan, W. M. The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler Mice. 393–422 (1979).
19. Magdaleno, S. M. & Curran, T. Brain development: Integrins and the Reelin pathway. *Curr. Biol.* **11**, 1032–1035 (2001).
20. Schmid, R. S., Jo, R., Shelton, S., Kreidberg, J. A. & Anton, E. S. Reelin, integrin and Dab1 interactions during embryonic cerebral cortical development. *Cereb. Cortex* **15**, 1632–1636 (2005).
21. Anton, E. S., Kreidberg, J. A & Rakic, P. Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* **22**, 277–289 (1999).
22. Fusaoka-Nishioka, E. *et al.* Differential effects of laminin isoforms on axon and dendrite development in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* **71**, 421–426 (2011).
23. Park, Y. K. & Goda, Y. Integrins in synapse regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* (2016). doi: 10.1038/nrn.2016.138
24. Felding-Habermann, B. *et al.* A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J. Cell Biol.* **139**, 1567–1581 (1997).
25. Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* **119**, 3901–3903 (2006).
26. Chan, C.-S. *et al.* β 1-integrins are required for hippocampal AMPA receptor-dependent synaptic transmission, synaptic plasticity, and working memory. *J. Neurosci.* **26**, 223–232 (2006).
27. Warren, M. S. *et al.* Integrin β 1 signals through Arg to regulate postnatal dendritic arborization, synapse density, and behavior. *J. Neurosci.* **32**, 2824–34 (2012).
28. Nikonenko, I. *et al.* Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, and adhesion in the postnatal brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **140**, 185–94 (2003).
29. Li Z, Sheng. M. Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 833–841 (2003).
30. Rout, U. K. Roles of Integrins and Intracellular Molecules in the Migration and Neuritogenesis of Fetal Cortical Neurons: MEK Regulates Only the Neuritogenesis. *Neurosci. J.* **2013**, 1–15 (2013).
31. Wu, X. & Reddy, D. S. Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* **134**, 68–81 (2012).
32. Schmid, R. S. & Anton, E. S. Role of integrins in the development of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* **13**, 219–224 (2003).

33. Hunter, D. D., Llinas, R., Ard, M., Merlie, J. P. & Sanes, J. R. Expression of S-laminin and laminin in the developing rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **323**, 238–251 (1992).
34. Sheppard, A. M., Hamilton, S. K. & Pearlman, A. L. Changes in the distribution of extracellular matrix components accompany early morphogenetic events of mammalian cortical development. *J. Neurosci.* **11**, 3928–42 (1991).
35. Silletti, S., Mei, F., Sheppard, D. & Montgomery, A. M. P. Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J. Cell Biol.* **149**, 1485–1501 (2000).
36. Thelen, K. *et al.* The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J. Neurosci.* **22**, 4918–4931 (2002).
37. Demyanenko, G. P., Tsai, A. Y. & Maness, P. F. Abnormalities in Neuronal Process Extension, Hippocampal Development, and the Ventricular System of L1 Knockout Mice. *J. Neurosci.* **19**, 4907–4920 (1999).
38. Thiere, M. *et al.* Integrin Activation Through the Hematopoietic Adapter Molecule ADAP Regulates Dendritic Development of Hippocampal Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 1–14 (2016).
39. Andrews, M. R. *et al.* $\alpha 9$ Integrin Promotes Neurite Outgrowth on tenascin-C and Enhances Sensory Axon Regeneration. **29**, 5546–5557 (2009).
40. Plantman, S. *et al.* Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 50–62 (2008).
41. Rehberg, K. *et al.* The serine/threonine kinase ndr2 controls integrin trafficking and integrin-dependent neurite growth. *J. Neurosci.* **34**, 5342–54 (2014).
42. Moresco, E. M. Y. Integrin-Mediated Dendrite Branch Maintenance Requires Abelson (Abl) Family Kinases. *J. Neurosci.* **25**, 6105–6118 (2005).
43. Marrs, G.S., Honda, T., Fuller L, Thangavel, R., Balsamo, J., Lilien, J., Dailey, M.E, Arregui, C. Dendritic arbors of developing retinal ganglion cells are stabilized by beta 1-integrins. *Mol Cell Neurosci.* **23**, 230–41 (2006).
44. Schlomann, U., Schwamborn, J. C., Müller, M., Fässler, R. & Püschel, A. W. The stimulation of dendrite growth by Sema3A requires integrin engagement and focal adhesion kinase. *J. Cell Sci.* **122**, 2034–42 (2009).
45. Rohwedel, J. *et al.* Loss of $\beta 1$ integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Dev. Biol.* **201**, 167–184 (1998).
46. Xu, Z. *et al.* Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* **73**, 23–33 (1993).
47. Hama, H., Hara, C., Yamaguchi, K. & Miyawaki, A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact

- with astrocytes. *Neuron* **41**, 405–15 (2004).
48. Huang, Z. *et al.* Distinct roles of the β 1-class integrins at the developing and the mature hippocampal excitatory synapse. *J. Neurosci.* **26**, 11208–11219 (2006).
 49. Chavis, P. & Westbrook, G. Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* **411**, 317–321 (2001).
 50. Chan, C.-S., Weeber, E. J., Kurup, S., Sweatt, J. D. & Davis, R. L. Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J. Neurosci.* **23**, 7107–7116 (2003).
 51. Charrier, C. *et al.* A crosstalk between β 1 and β 3 integrins controls glycine receptor and gephyrin trafficking at synapses. *Nat. Neurosci.* **13**, 1388–1395 (2010).
 52. Cingolani, L. A. *et al.* Activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor composition and abundance by β 3 integrins. *Neuron* **58**, 749–62 (2008).
 53. Pozo, K. *et al.* β 3 integrin interacts directly with GluA2 AMPA receptor subunit and regulates AMPA receptor expression in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 1323–1328 (2012).
 54. Kramár, E.A., Bernard, J.A., Gallb, C.M., Lynch, G. α 3 integrin receptors contribute to the consolidation of long-term potentiation. *Neuroscience* **110**, 29–39 (2002).
 55. Mortillo, S. Elste, A. Ge, Y. Patil, S.B., Hsiao, K., Huntley, G.W., Davis, R.L., Benson, D.L. Compensatory redistribution of neuroligins and N-cadherin following deletion of synaptic β 1-integrin. *J Comp Neurol.* **520**, 2041–2052 (2012).
 56. Kramár, E. A., Lin, B., Rex, C. S., Gall, C. M. & Lynch, G. Integrin-driven actin polymerization consolidates long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5579–84 (2006).
 57. Shi, Y. & Ethell, I. M. Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J. Neurosci.* **26**, 1813–1822 (2006).
 58. Chan, C.S, Chen, H., Bradley, A., Dragatsis, I., Rosenmund, C., Davis, R. L. α 8-integrins are required for hippocampal long-term potentiation but not for hippocampal-dependent learning. *Genes Brain Behav* **9**, 402–410 (2010).
 59. Chan, C.S. *et al.* α 3-integrins are required for hippocampal long-term potentiation and working memory. *Learn. Mem.* **14**, 606–615 (2007).
 60. McGeachie, A.B., Skrzypiec A.E., Cingolani L.A., Letellier, M., Pawlak, R., Goda, Y. β 3 integrin is dispensable for conditioned fear and hebbian forms of plasticity in the hippocampus. *Eur J Neurosci* **36**, 2461–2469 (2012).
 61. Shattil, S. J., Kim, C. & Ginsberg, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 288–300 (2010).
 62. Legate, K. R., Wickström, S. A. Fässler, R., Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. 397–418 (2009). doi:10.1101/gad.1758709
 63. Kim, M. Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins. *Science (80-.).* **301**, 1720–1725 (2003).

64. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
65. Luo, B.H., Carman, C.V., Springer, T A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**, 619–647 (2007).
66. Kim, C., Ye, F., Ginsberg, M.H. Regulation of integrin activation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 321–345 (2011).
67. Myers, J. P., Santiago-Medina, M. & Gomez, T. M. Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions. *Dev. Neurobiol.* **71**, 901–23 (2011).
68. Kuroпка, B. *et al.* Analysis of Phosphorylation-dependent Protein Interactions of Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein (ADAP) Reveals Novel Interaction Partners Required for Chemokine-directed T cell Migration. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2961–72 (2015).
69. Clegg, D.O.*et al.* Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front. Biosci. ...* 723–750 (2003).
70. Abram, C. L. and Lowell, C. A. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annu Rev Immunol* **27**, 339–362 (2009).
71. McLeod, S. J., Shum, A. J., Lee, R. L., Takei, F. & Gold, M. R. The Rap GTPases Regulate Integrin-mediated Adhesion, Cell Spreading, Actin Polymerization, and Pyk2 Tyrosine Phosphorylation in B Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 12009–12019 (2004).
72. Katagiri, K., Shimonaka, M. & Kinashi, T. Rap1-mediated Lymphocyte Function-associated Antigen-1 Activation by the T Cell Antigen Receptor Is Dependent on Phospholipase C-gamm1. *J. Biol. Chem.* **279**, 11875–11881 (2004).
73. Katagiri, K., Imamura, M. & Kinashi, T. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat. Immunol.* **7**, 919–28 (2006).
74. Montanez, E. *et al.* Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* **22**, 1325–1330 (2008).
75. Kliche, S. *et al.* The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7130–44 (2006).
76. Bezman, N. & Koretzky, G. A. Compartmentalization of ITAM and integrin signaling by adapter molecules. *Immunol. Rev.* **218**, 9–28 (2007).
77. Gotwals, P. J. *et al.* Divalent cations stabilize the $\alpha 1\beta 1$ integrin I domain. *Biochemistry* **38**, 8280–8 (1999).
78. Zhang, K. & Chen, J. The regulation of integrin by divalent cations. *Cell Adh. Migr.* **6**, 20–29 (2012).
79. Bridgewater, R. E., Norman, J. C. & Caswell, P. T. Integrin trafficking at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 3695–3701 (2012).
80. Eva, R. *et al.* Rab11 and its effector Rab coupling protein contribute to the trafficking of $\beta 1$ integrins during axon growth in adult dorsal root ganglion neurons

- and PC12 cells. *J. Neurosci.* **30**, 11654–69 (2010).
81. Kliche, S. *et al.* CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. *Blood* **119**, 777–785 (2012).
 82. Peterson, E. J. *et al.* Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* **293**, 2263–2265 (2001).
 83. Peterson, E. J. The TCR ADAPts to integrin-mediated cell adhesion. *Immunol. Rev.* **192**, 113–121 (2003).
 84. Sylvester, M. *et al.* Adhesion and degranulation promoting adapter protein (ADAP) is a central hub for phosphotyrosine-mediated interactions in T cells. *PLoS One* **5**, e11708 (2010).
 85. Wang, H. & Rudd, C. E. SKAP-55-, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. **18**, 486–493 (2008).
 86. Witte, A. Emerging Roles of ADAP, SKAP55, and SKAP-HOM for Integrin and NF- κ B Signaling in T cells. *J. Clin. Cell. Immunol.* **1**, (2013).
 87. Togni, M., Engelmann, S., Reinhold, D., Schraven, B. & Reinhold, A. The adapter protein ADAP is required for selected dendritic cell functions. *Cell Commun Signal* **10**, 14 (2012).
 88. Engelmann, S. *et al.* The Adhesion- and Degranulation-Promoting Adaptor Protein and Its Role in the Modulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **35**, 1–14 (2015).
 89. Heuer, K. *et al.* Lipid-binding hSH3 Domains in Immune Cell Adapter Proteins. *J. Mol. Biol.* **361**, 94–104 (2006).
 90. Heuer, K., Arbuzova, A., Strauss, H., Kofler, M. & Freund, C. The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain. *J. Mol. Biol.* **348**, 1025–1035 (2005).
 91. Marie-Cardine, A. *et al.* Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J. Biol. Chem.* **273**, 25789–25795 (1998).
 92. Huang, Y. *et al.* Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 23576–23583 (2005).
 93. Wu, J. N. *et al.* Adhesion- and degranulation-promoting adapter protein is required for efficient thymocyte development and selection. *J. Immunol.* **176**, 6681–6689 (2006).
 94. Griffiths, E. K. *et al.* Positive Regulation of T Cell Activation and Integrin Adhesion by the Adapter Fyb / Slap. **293**, 2260–2263 (2001).
 95. Menasche, G. *et al.* RIAM Links the ADAP/SKAP-55 Signaling Module to Rap1, Facilitating T-Cell-Receptor-Mediated Integrin Activation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4070–4081 (2007).
 96. Raab, M., Smith, X., Matthes, Y., Strebhardt, K. & Rudd, C. E. SKAP1 protein PH domain determines RapL membrane localization and Rap1 protein complex formation for T cell receptor (TCR) activation of LFA-1. *J. Biol. Chem.* **286**, 29663–

- 29670 (2011).
97. Medeiros, R. B. *et al.* Regulation of NF- κ B activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1. *Science* **316**, 754–758 (2007).
 98. Srivastava, R., Burbach, B. J. & Shimizu, Y. NF- κ B activation in T cells requires discrete control of I κ B kinase α/β (IKK α/β) phosphorylation and IKK γ ubiquitination by the ADAP adapter protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 11100–11105 (2010).
 99. Thaker, Y. R. & Rudd, C. E. Distinct NF- κ B activation pathways engaged by T-cell receptor and co-receptor CD28 on T-cells. *Inflamm. Cell Signal.* 1–6 (2015). doi:10.14800/ics.613
 100. Thaker, Y. R., Schneider, H. & Rudd, C. E. TCR and CD28 activate the transcription factor NF- κ B in T-cells via distinct adaptor signaling complexes. *Immunol. Lett.* **163**, 113–119 (2015).
 101. Burbach, B. J., Srivastava, R., Ingram, M. a, Mitchell, J. S. & Shimizu, Y. The pleckstrin homology domain in the SKAP55 adapter protein defines the ability of the adapter protein ADAP to regulate integrin function and NF- κ B activation. *J. Immunol.* **186**, 6227–6237 (2011).
 102. Cheng J, Montecalvo A, K. L. Regulation of NF- κ B induction by TCR/CD28. *Immunol Res.* **50**, 113–7 (2011).
 103. Blonska, M. & Lin, X. CARMA1-mediated NF- κ B and JNK activation in lymphocytes. *Immunol. Rev.* **228**, 199–211 (2009).
 104. Srivastava, R., Burbach, B. J., Mitchell, J. S., Pagan, A. J. & Shimizu, Y. ADAP Regulates Cell Cycle Progression of T Cells via Control of Cyclin E and Cdk2 Expression through Two Distinct CARMA1-Dependent Signaling Pathways. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1908–1917 (2012).
 105. Zou, L., Mendez, F., Martin-Orozco, N. & Peterson, E. J. Defective positive selection results in T cell Lymphopenia and increased autoimmune diabetes in ADAP deficient BDB2.5-Bl/6 mice. *Eur. J. Immunol.* **38**, 986–994 (2008).
 106. Gerbec, Z.J., Thaker, M. S, Malarkannan, S. The Fyn-ADAP axis: Cytotoxicity versus cytokine production in killer cells. *Frontiers in Immunology* **6**, (2015).
 107. Injury, I. B. HHS Public Access. **37**, 311–320 (2016).
 108. Reddy, K. B., Smith, D. M. & Plow, E. F. Analysis of Fyn function in hemostasis and α IIb β 3-integrin signaling. *J. Cell Sci.* **121**, 1641–8 (2008).
 109. Kuropka, B. *et al.* Analysis of Phosphorylation-dependent Protein Interactions of Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein (ADAP) Reveals Novel Interaction Partners Required for Chemokine-directed T cell Migration. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2961–2972 (2015).
 110. Knox, Renatta and Jiang, X. Fyn in Neurodevelopment and Ischemic Brain Injury. *Dev Neurosci.* **37**, 311–320 (2015).
 111. Krämer-Albers, E.M., White, R. From axon-glia signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cell Mol Life Sci.* **68**, 2003–2012

- (2011).
112. Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P. & Cooper, J. A. Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *J. Neurosci.* **25**, 8578–8586 (2005).
 113. Grant, S. G. *et al.* Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* **258**, 1903–10 (1992).
 114. Beggs, H. E., Soriano, P. & Maness, P. F. NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J. Cell Biol.* **127**, 825–833 (1994).
 115. Kaech, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–15 (2006).
 116. Xiang, H. *et al.* Evidence for p53-mediated modulation of neuronal viability. *J. Neurosci.* **16**, 6753–6765 (1996).
 117. Sholl, D. A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* **87**, 387–406.1 (1953).
 118. Danscher G, Z. J. An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry.* **55**, 27–40 (1978).
 119. Timm, F. Zur Histochemie der Schwermetalle; das Sulfid-Silberverfahren. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* **46**, 706–11 (1958).
 120. Rubinson, D. A. *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* **33**, 401–406 (2003).
 121. Musci, M. a. *et al.* Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **272**, 11674–11677 (1997).
 122. Dieterich, D. C. *et al.* Caldendrin-Jacob: A protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol.* **6**, 0286–0306 (2008).
 123. Lowry, O.H. *et al.* Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
 124. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 125. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4 (1979).
 126. Pawlow, J. P. Experimental psychology and the psycho-pathology of animals. *Bull. Imp. Med. Acad.* **7**, (1903).
 127. Laxmi, T. R., Stork, O. & Pape, H.-C. Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behav. Brain Res.* **145**, 89–98 (2003).
 128. Kogan, J. H. *et al.* Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr. Biol.* **7**, 1–11 (1997).
 129. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiol*

- Behav. Aug*, 135:55-71 (2014).
130. Tan, C. L. *et al.* Full length talin stimulates integrin activation and axon regeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* **68**, 1–8 (2015).
 131. van Spronsen, M. *et al.* Developmental and Activity-Dependent miRNA Expression Profiling in Primary Hippocampal Neuron Cultures. *PLoS One* **8**, (2013).
 132. Zhao, W. *et al.* Brain Insulin Receptors and Spatial Memory. *J. Biol. Chem.* **274**, 34893–34902 (1999).
 133. Trepanier, C. H., Jackson, M. F. & MacDonald, J. F. Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *FEBS J.* **279**, 12–9 (2012).
 134. Li, F. & Tsien, J. Z. Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* **361**, 302–303 (2009).
 135. Lubin, F. D. & Sweatt, J. D. The I κ B Kinase Regulates Chromatin Structure during Reconsolidation of Conditioned Fear Memories. *Neuron* **55**, 942–957 (2007).
 136. Kasirer-Friede, A. *et al.* ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin α IIb β 3 activation and stable fibrinogen binding. *Blood* (2014). doi:10.1182/blood-2013-08-520627
 137. Ménasché, G., Kliche, S., Bezman, N. & Schraven, B. Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules. *Immunol. Rev.* **218**, 82–91 (2007).
 138. Griffiths, E. K. & Penninger, J. M. Communication between the TCR and integrins: Role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 317–322 (2002).
 139. Griffiths, E. K. & Penninger, J. M. ADAP-ting TCR signaling to integrins. *Sci. STKE* **2002**, re3 (2002).
 140. Togni, M. *et al.* Regulation of in vitro and in vivo immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8052–8063 (2005).
 141. Kasirer-Friede, A. *et al.* ADAP is required for normal α IIb β 3 activation by VWF/GP Ib-IX-V and other agonists. *Blood* **109**, 1018–25 (2007).
 142. Wang, H. *et al.* Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6863–6875 (2007).
 143. Reinhold, A., Reimann, S., Reinhold, D., Schraven, B. & Togni, M. Expression of SKAP-HOM in DCs is required for an optimal immune response in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 61–71 (2009).
 144. Block, H. *et al.* Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Exp. Med.* **209**, 407–421 (2012).
 145. Kliche, S. *et al.* The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7130–7144 (2006).
 146. Wang, H., Wei, B., Bismuth, G. & Rudd, C. E. SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

- S. A. **106**, 12436–12441 (2009).
147. Mitchell, J. S., Burbach, B. J., Srivastava, R., Fife, B. T. & Shimizu, Y. Multistage T cell-dendritic cell interactions control optimal CD4 T cell activation through the ADAP-SKAP55-signaling module. *J. Immunol.* **191**, 2372–83 (2013).
 148. Burbach, B. J. *et al.* Distinct Regulation of Integrin-Dependent T Cell Conjugate and NF- κ B activation by the adapter protein ADAP. *J. Immunol.* **181**, 4840–4851 (2008).
 149. Lin, C.-Y., Lynch, G. & Gall, C. M. AMPA receptor stimulation increases α 5 β 1 integrin surface expression, adhesive function and signaling. *J. Neurochem.* **94**, 531–546 (2005).
 150. Sekine, K. *et al.* Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin α 5 β 1. *Neuron* **76**, 353–69 (2012).
 151. Tan, C. L. *et al.* Kindlin-1 enhances axon growth on inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans and promotes sensory axon regeneration. *J. Neurosci.* **32**, 7325–35 (2012).
 152. Kerstein, P. C. *et al.* Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. *J. Neurosci.* **33**, 273–85 (2013).
 153. Fujita, H. *et al.* Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAPL, a Rap1-associating molecule, localizes. *J. Biol. Chem.* **280**, 5022–5031 (2005).
 154. Oh, H. J. *et al.* Role of the tumor suppressor RASSF1A in Mst1-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **66**, 2562–2569 (2006).
 155. Bi, X., Lynch, G., Zhou, J. & Gall, C. M. Polarized distribution of α 5 integrin in dendrites of hippocampal and cortical neurons. *J. Comp. Neurol.* **435**, 184–193 (2001).
 156. Bernhard Robert, Huber Gerda, M. A. Differences in the Developmental Patterns of Three Microtubule-associated Proteins in the Rat Cerebellum. *J. Neurosci.* **5**, 977–991 (1985).
 157. Harada, A. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J. Cell Biol.* **158**, 541–549 (2002).
 158. Jeon, W. B., Park, B. H., Choi, S. K., Lee, K.-M. & Park, J.-K. Functional enhancement of neuronal cell behaviors and differentiation by elastin-mimetic recombinant protein presenting Arg-Gly-Asp peptides. *BMC Biotechnol.* **12**, 61 (2012).
 159. Domingo-Espín, J. *et al.* RGD-based cell ligands for cell-targeted drug delivery act as potent trophic factors. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **8**, 1263–1266 (2012).
 160. Andressen, C., Adrian, S., Fässler, R., Arnhold, S. & Addicks, K. The contribution of β 1 integrins to neuronal migration and differentiation depends on extracellular matrix molecules. *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 973–82 (2005).
 161. Gupton, S. L. & Gertler, F. B. Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis. *Dev. Cell* **18**, 725–736 (2010).
 162. Krause, M. *et al.* Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP),

- Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **149**, 181–94 (2000).
163. Guan, S., Chen, M., Woodley, D. & Li, W. Nck β Adapter Controls Neuritogenesis by Maintaining the Cellular Paxillin Level. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6001–6011 (2007).
164. Bourgin, C., Murai, K. K., Richter, M. & Pasquale, E. B. The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting β 1-integrin signaling pathways. *J. Cell Biol.* **178**, 1295–1307 (2007).
165. Morita, A. Regulation of Dendritic Branching and Spine Maturation by Semaphorin3A-Fyn Signaling. *J. Neurosci.* **26**, 2971–2980 (2006).
166. Pasterkamp, R. J., Peschon, J. J., Spriggs, M. K. & Kolodkin, A. L. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* **424**, 398–405 (2003).
167. O’Neill, L. A. & Kaltschmidt, C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* **20**, 252–8 (1997).
168. Kaltschmidt, B. & Kaltschmidt, C. NF- κ B in the nervous system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001271 (2009).
169. Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Neumann, H., Wekerle, H. & Baeuerle, P. a. Constitutive NF- κ B activity in neurons. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3981–3992 (1994).
170. Gutierrez, H., Hale, V. A., Dolcet, X. & Davies, A. NF- κ B signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* **132**, 1713–26 (2005).
171. Salama-Cohen, P., Arévalo, M. Á., Grantyn, R. & Rodríguez-Tébar, A. Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3. *J. Neurochem.* **97**, 1269–1278 (2006).
172. O’Sullivan, N. C., Croydon, L., McGettigan, P. A. Pickering, M. & Murphy, K. J. Hippocampal region-specific regulation of NF- κ B may contribute to learning-associated synaptic reorganisation. *Brain Res. Bull.* **81**, 385–390 (2010).
173. Bernardino, L. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Modulates Survival, Proliferation, and Neuronal Differentiation in Neonatal Subventricular Zone Cell Cultures. *Stem Cells* **26**, 2361–2371 (2008).
174. Saleh, A. *et al.* Tumor necrosis factor- α elevates neurite outgrowth through an NF- κ B-dependent pathway in cultured adult sensory neurons: Diminished expression in diabetes may contribute to sensory neuropathy. *Brain Res.* **1423**, 87–95 (2011).
175. Bagri, A., Cheng, H. J., Yaron, A., Pleasure, S. J. & Tessier-Lavigne, M. Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* **113**, 285–299 (2003).
176. Cheng, H. J. *et al.* Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* **32**, 249–263 (2001).
177. Crusio WE, S. H. Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field

- habituation in the mouse. *Behav Brain Res*- **26**, 153–8 (1987).
178. Imielski, Y. *et al.* Regrowing the adult brain: NF- κ B controls functional circuit formation and tissue homeostasis in the dentate gyrus. *PLoS One* **7**, e30838 (2012).
 179. Widera, D. *et al.* Methods for the Modulation and Analysis of NF- κ B-dependent Adult Neurogenesis. *J. Vis. Exp.* **84**, 1–11 (2014).
 180. Reyes-Reyes, M., Mora, N., Zentella, A. & Rosales, C. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF- κ B and MAPK activation through separate signaling pathways. *J. Cell Sci.* **114**, 1579–1589 (2001).
 181. Klein, S. *et al.* α 5 β 1-integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5912–22 (2002).
 182. Freudenthal, R. & Romano, A. Participation of Rel/NF- κ B transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res.* **855**, 274–281 (2000).
 183. Razani, B. *et al.* Negative Feedback in Noncanonical NF- κ B Signaling Modulates NIK Stability Through IKK α -Mediated Phosphorylation Negative Feedback in Noncanonical NF- κ B Signaling Modulates NIK Stability Through IKK α -Mediated Phosphorylation. *Science* **3**, (2011).
 184. Qing, G., Qu, Z. & Xiao, G. Stabilization of basally translated NF- κ B-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF- κ B2 p100. *J. Biol. Chem.* **280**, 40578–40582 (2005).
 185. Gloire, G. *et al.* Promoter-dependent effect of IKK α on NF- κ B/p65 DNA binding. *J. Biol. Chem.* **282**, 21308–21318 (2007).
 186. Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y.-T. & Gaynor, R. B. Histone H3 phosphorylation by IKK α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* **423**, 655–659 (2003).
 187. Gye, Y. P. *et al.* NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKK α . *J. Biol. Chem.* **281**, 18684–18690 (2006).
 188. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, K. M. IKKalpha limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* **434**, 1138–43 (2005).
 189. Takaesu, G., Surabhi, R.M., Park, K.J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Gaynor, R.B. TAK1 is Critical for I κ B Kinase-mediated Activation of the NF- κ B Pathway. *J Mol Biol* **326**, 105–15 (2003).
 190. Li, Z. W. *et al.* The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor κ B activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* **189**, 1839–45 (1999).
 191. Kew, R. R., Penzo, M., Habel, D. M. & Marcu, K. B. The IKK α -dependent NF- κ B p52/RelB noncanonical pathway is essential to sustain a CXCL12 autocrine loop in cells migrating in response to HMGB1. *J. Immunol.* **188**, 2380–2386 (2012).
 192. Jee, B.K., Surendran, S., Park, K.M., Lee, W.K., Han, C.W., Kim, Y.Y., Patinharayil, G., Kim, Y.H., Lee, K.H. Role of tumor necrosis factor- α , interleukin-8, and dexamethasone in the focal adhesion kinase expression by human nucleus

- pulposus cells. *Spine (Phila Pa 1976)*. **32.**, 30–5 (2007).
193. Lim, S. T. S. Nuclear FAK: A new mode of gene regulation from cellular adhesions. *Mol. Cells* **36**, 1–6 (2013).
194. Grant, S. G. N., Karl, K. A., Kiebler, M. A. & Kandel, E. R. Focal adhesion kinase in the brain: novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice. *Genes Dev.* **9**, 1909–1921 (1995).
195. Yeo, M. G. *et al.* Phosphorylation of Ser 21 in Fyn regulates its kinase activity, focal adhesion targeting, and is required for cell migration. *J. Cell. Physiol.* **226**, 236–247 (2011).
196. Trepanier, C. H., Jackson, M. F. & MacDonald, J. F. Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *FEBS J.* **279**, 12–9 (2012).
197. Isosaka, T. *et al.* Activation of Fyn tyrosine kinase in the mouse dorsal hippocampus is essential for contextual fear conditioning. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 973–81 (2008).
198. Kraszewski, K. *et al.* Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J. Neurosci.* **15**, 4328–4342 (1995).
199. Ehara, A. & Ueda, S. Application of Fluoro-Jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *Acta Histochem. Cytochem.* **42**, 171–9 (2009).

Anhang

Anhang I

Geräte

Geräte	Firma, Firmensitz
-86°C Gefrierschrank	Sanyo; Moriguchi; JPN
Biorad Power PAC 300	Biorad, Hercules; USA
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf; Hamburg; D
Eppendorf Zentrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg; D
Eppendorf Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg; D
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg; D
Gentle Macs Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; D
Glasküvetten	Wheaton, Millville; USA
Inkubator	Thermo Scientific, Waltham; USA
Inkubator Shaker innovo 4200	New Brunswick Scientific, Edison Now York, USA
Inkubator C60/ C200	Labotec, Midrand; Südafrika
Konfokales Mikroskop DMIRE2	Leica, Wetzlar; D
Lichtmikroskop DMI600	Leica, Wetzlar; D
Lichtmikroskop Eclipse TS100	Nikon; Tokio JPN
MACSmix	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach; D
Neubauer-Zählkammer	Carl Zeiss, Jena; D
Odyssey-Near Infrared Scanner	Licor, Lincoln; USA
Pipettboy accu jet pro	Brand, Wertheim; D
StepOne Plus	Applied Biosystems, Waltham; USA
Stereomikroskop S6D	Leica, Wetzlar; D
Sterilwerkbank Biowizard	Kojar, Vilppula; FIN
Stickstofftank Biosafe®	Cryotherm®; Kirchen; D
Tecan Infinite M200	Tecan; Männedorf; CH
Ultrazentrifuge Optima Max-XP	Beckman Coulter Inc., Brea, USA

Anhang

Ultrazentrifugenrotor MLS-50	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Vakuumpumpe Vacusafe	IBS integra, Zürich; CH
Veriti 96-well Fast Thermocycler	Applied Biosystems, Waltham; USA
VWR Power Source 300V	VWR; Radnor; USA
Zellkulturwerkbank	Kojair, Vilppula; FIN

Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Firma, Firmensitz</u>
10 ml Petrischale	Corning; Corning; USA
15 ml, 50 ml Falcon	Corning; Corning; USA
24 Lochplatten Costar	Corning; Corning; USA
96 Lochplatten Costar	Corning; Corning; USA
Adhesive Film	Applied Biosystems; Waltham; USA
Beckmann Zentrifugenröhrchen 13x51	Beckmann Coulter; Brea; USA
Brand Transferpipette	Brand; Wertheim; D
Costar steril Pipetten 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning; Corning; USA
Deckgläschen	VWR; Darmstadt; D
Gentle Macs tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; D
Immobilon®P-PVDF-Membran	Merck Millipore, Darmstadt; D
Isofluran	Nicolas Pirmal; London, UK
MACS smart strainers 70µm (Filter)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; D
MicroAmp Platten	Applied Biosystems; Waltham; USA
Nunc™ Microwell™96-well	Thermo Scientific; Waltham; USA
Objektträger Super Frost	Carl Roth; Karlsruhe; D
Pasteurpipetten Einweg, graduiert	Carl Roth, Karlsruhe; D
Pasteurpipetten kapillar	WU, Mainz; D
Präparationsbesteck	F.S.T Fine Science Tool, Heidelberg; D
Röhrchen 13 ml	Sarstedt; Nümbrecht; D
Rotilab Einmalwägeschälchen	Carl Roth; Karlsruhe; D
Sicherheitsreaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml 2 ml	Sarstedt; Nümbrecht; D

Anhang

Sterilfilter 0,2 µm	Corning; Corning; USA
Sterilfilter 0,45 µm	Corning; Corning; USA
Surgical OP/Dental Mundschutz Care & serve	Wilfried Rosbach GmbH; Willich; D
Tissue Box	Carl Roth, Karlsruhe; D
Whatman-Filterpapier	Sigma-Aldrich; München; D
Zellschaber	Corning; Corning; USA

Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Firma, Firmensitz</u>
96 % Ethanol	Carl Roth; Karlsruhe; D
Acrylamid/ Rotiphorese Gel 30	Carl Roth; Karlsruhe; D
Ammoniumnickelsulfat	Sigma-Aldrich; München; D
Ampicillin	Sigma-Aldrich; München; D
APS (Amoniumpersulfat)	Carl Roth; Karlsruhe; D
AraC (1-β-D-Arabinofuranosylcytosin)	Sigma-Aldrich; München; D
Bacillol	Bode-Chemie; Hamburg; D
Borsäure	Serva; Heidelberg; D
Bromphenolblau	Serva; Heidelberg; D
BSA (Bovine Serum Albumin Fraktion V)	Carl Roth; Karlsruhe; D
Chromalaun	Merck; Darmstadt; D
Chromschwefelsäure	Sigma-Aldrich; München; D
Cobalt-II-chlorid	Carl Roth; Karlsruhe; D
Complete Proteinaseinhibitor	Roche; Basel; CH
DAB	Sigma Aldrich; München; D
Dapi (4,6 Diamindin2-phenylindol)	Sigma-Aldrich; München; D
D-Glucose	Sigma-Aldrich; USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth; Karlsruhe; D
DMEM	Invitrogen; Waltham; USA
DMEM/F12	Invitrogen; Waltham; USA
DMSO	Carl Roth; Karlsruhe; D

Anhang

DNase	Roche; Basel; CH
EDTA	Sigma-Aldrich; München; D
Entellan	Merck; Darmstadt; D
Essigsäure	Carl Roth; Karlsruhe; D
Fetales Kälberserum	Invitrogen; Waltham; USA
Gelatine Typ A (aus Schweine Haut)	Sigma-Aldrich; München; D
Glutamax	Invitrogen; Waltham; USA
Glutaraldehydlösung	Sigma-Aldrich; München; D
Glycin	Serva; Heidelberg; D
Gummi Arabicum	Sigma-Aldrich; München; D
HBSS Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen; Waltham; USA
HBSS-Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen; Waltham; USA
Heparin-Natriumsulfat	Braun-Melsungen; Melsungen; D
HEPES	Carl Roth; Karlsruhe; USA
Hydrchinon	Sigma-Aldrich; München; D
Immobilon	Millipore; Darmstadt; D
Immu-Mount™	Thermo Scientific Fischer; Waltham USA
Insulin	Sigma-Aldrich; München; D
Isopropanol	Carl Roth; Karlsruhe; D
Kaliumchlorid	Carl Roth; Karlsruhe; D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck; Darmstadt; D
Ketanest S	Pfizer Pharma GmbH; Berlin; D
Kresylviolettacetat	Sigma-Aldrich; München; D
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth; Karlsruhe; D
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth; Karlsruhe; D
Magnesiumchlorid	Carl Roth; Karlsruhe; D
Mercaptoethanol	Carl Roth; Karlsruhe; D
Methanol	Carl Roth; Karlsruhe; D
Methylenblau	Sigma-Aldrich; München; D
Milchpulver (blotting grade)	Carl Roth; Karlsruhe; D
Milchpulver	Carl Roth; Karlsruhe; D
Natriumacetat	Fluka; München; D

Anhang

Natriumdihydrogenphosphat	Fluka; München; D
Natriumdodecylsulfat als Pellet (SDS)	Serva; Heidelberg; D
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich; München; D
Natriumsulfid	Carl Roth; Karlsruhe; D
Nomidet-40 (NP-40)	Serva; Heidelberg; D
Nucleasefreies Wasser	Ambion®; Waltham; USA
Opti-MEM®	Invitrogen; Waltham; USA
Paige Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas,; Waltham; USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich; München; D
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, München, D
Pentobarbital	Sigma-Aldrich; München; D
PLL-Lösung (Poly-L-Lysin) (0,1 %)	Sigma-Aldrich; München; D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich; München; D
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich; München; D
Proteinase Inhibitor (EDTA frei)	Pierce; Waltham; USA
Rompun	Bayer Vital GmbH; Leverkusen; D
Saccharose	Carl Roth; Karlsruhe; D
Silbernitrat	Carl Roth; Karlsruhe; D
steriles PBS	Invitrogen; Waltham; USA
steriles Wasser	Invitrogen; Waltham; USA
Thymol	Sigma-Aldrich; München; D
TMED	Carl Roth; Karlsruhe; D
TNF- α	Sigma-Aldrich; München; D
Tri-Natriumdihydrat	Carl Roth; Karlsruhe; D
Tris	Carl Roth; Karlsruhe; D
Tris-HCl	Carl Roth; Karlsruhe; D
Triton-X 100	Sigma-Aldrich; München; D
Tween-20	Carl Roth; Karlsruhe; D
Tyrpsin/EDTA	Invitrogen; Waltham; USA
Wasserstoffperoxid	Carl Roth; Karlsruhe; D
Xylol	Applied Chemical; Santa Rosa; USA
Zitronensäure	Carl Roth; Karlsruhe; D

B-Mercaptoethanol

Serva; Heidelberg; D

Antikörper:

CellTag700- stain

Li-Cor; Lincoln; USA

Kaninchen anti-Gap43

Millipore; Darmstadt; D

Kaninchen anti-His-Taq/Sonde (H-15)

Santa Cruz; Dallas; USA

Kaninchen anti p65 (c-20)

Santa Cruz; Dallas; USA

Kaninchen anti- β 1-Integrin

Abcam; Cambridge; UK

Kaninchen anti-IKK-beta

Santa Cruz; Dallas; USA

Kaninchen anti-pNMDAR

Millipore; Darmstadt; D

Kaninchen anti-pFAK(Tyr397)

Invitrogen; Waltham; USA

Kaninchen anti-FYB

BD Pharmingen; UK

Maus anti-Map2 (HM-2)

Abcam; Cambridge; UK

Maus anti - β 1-Integrin (P5D2)

Santa Cruz; Dallas; USA

Maus anti-IKK-alpha

BD Pharmingen; UK

Maus anti-Talin

Sigma-Aldrich; München; D

Maus anti-Histon H4

Sigma-Aldrich; München; D

Mause anti- MAP2

Millipore; Darmstadt; D

Mause anti - α -Tubulin

Sigma-Aldrich; München; D

Meerschweinchen anti-Synaptophysin

Synaptic Systems Göttingen; D

Meerschweinchen anti-Tau

Synaptic Systems ; Göttingen; D

Ratte anti-CD29

BD-Bioscience; Franklin Lakes; USA

Rattenserum-anti ADAP

Stefanie Kliche, Magdeburg ;D

Schaf anti- Slap-130

Gary Koretzky; New York; USA

Sekundäre Antikörper

Esel anti -Meerschwein Alexa 647

Invitrogen; Waltham; USA

Esel anti-Maus Alexa 488

Invitrogen; Waltham; USA

Esel anti-Rabbit Alexa 647

Invitrogen; Waltham; USA

Esel anti-Ratte Cy3

Dianova; Hamburg; D

Esel anti-Schaf Cy3

Dianova; Hamburg; D

IRDye® Ziege anti-Maus LT680

Li-Cor; Lincoln; USA

Anhang

IRDye® Ziege anti-Kaninchen CW 800

Li-Cor; Lincoln; USA

Ziege anti Ratte Biotin

Dako; Santa Clara; USA

Primer

Fyb (Mm00803629_m1)

Thermo Scientific Fischer; Waltham;
USA

GADH (4352923E)

Thermo Scientific Fischer; Waltham;
USA

Itgb1 (Mm01253230_m1)

Thermo Scientific Fischer; Waltham;
USA

Rel A (Mm00501346_m1)

Thermo Scientific Fischer; Waltham;
USA

Zelllinien

HEK 293-T

DSMZ; Braunschweig; D

PC-12

DSMZ; Braunschweig; D

Kits

Cell-to cDNA™ kit II

Ambion®; Waltham; USA

Dual-Glo® Luciferase Assay System

Promega; Mannheim; D

Lipofectamine® 2000

Thermo Scientific; Waltham; USA

Neural Tissue Dissociation Kit (P)

Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach; D

Protein Assay

Biorad; Hercules; USA

PureLink®-HiPure Plasmid Midiprep Kit

Invitrogen; Waltham; USA

SensiScript

Qiagen; Venlo; NL

Vectastain® Elite ABC Kit Vector

Laboratories, Inc., Burlingame; USA

Software

ANY-Maze VideotrackingSystem V 4.50

Stoelting, Wood Dale; USA

AxioVision V 4.0 Zeiss,

Zeiss; Jena, D

AxioVision V 4.63 SP1b

Zeiss, Jena, D

Anhang

ImageJ

National Institutes of Health,
Bethesda; USA

Mendeley Desktop

Mendeley Ltd. London, UK

Office 2013

Microsoft; Redmond; USA

Photoshop CS2

Adobe Systems Inc., San Jose CA, USA

Qwin V3.5

Leica; Wetzlar; D

SPSS

IBM; Armonk; USA

TSE Fear Conditioning Software V 08.03

TSE Systems; Bad Homburg, D

Anhang II

Tabelle 33 Verwendete Verdünnungen der Primärantikörper

ICC Immuncytochemie, ICH Immunhistochemie, ICW In-Cell Western, WB Western Blot

Primärantikörper	ICC	IHC	ICW	WB
Kaninchen anti-Gap43	- 1/100			
Kaninchen-anti Taq/Sonde (H-15)	His- 1/500			1/500
Kaninchen anti-p65 (c-20)				1/1000
Kaninchen anti- β 1-Integrin	1/500			
Kaninchen anti-IKK-beta				1/1000
Kaninchen anti-pNMDAR				1/1000
Kaninchen anti-pFAK(Tyr397)				1/1000
Kannichen anti-FYB	1/1000			
Maus anti-Map2 (HM-2)		1/200		
Maus anti- β 1-Integrin	1/500			
Maus anti-IKK-alpha				1/1000
Maus anti-Talin	1/500			
Maus anti-Histon H4				1/1000
Mause anti-MAP2	1/1000		1/200	
Maus anti- α -Tubulin				1/1000
Meerschweinchen anti-Synaptophysin	1/1000			
Meerschweinchen anti-Tau	1/1000			
Ratte anti-CD29	1/50			
Rattenserum anti-ADAP		1:10		
Schaf anti-Slap-130	1/1000			

Tabelle 34 Verwendete Verdünnungen der Sekundärantikörper

ICC Immuncytochemie, ICH Immunhistochemie, ICW In-Cell Western, WB Western Blot

Sekundärantikörper	ICC	ICH	ICW	WB
Esel anti- Maus Alexa 488	1/1000			
Esel anti-Maus Alexa 647		1/200		
Esel anti-Schaf Cy3	1/1000			
Esel anti-Ratte Cy3	1/1000			
Esel anti- Kaninchen Alexa 555	1/1000			
Esel anti- Kaninchen Alexa 647	1/1000			
Esel anti- Meerschwein Alexa 647	1/1000			
IRDye Ziege anti- Kaninchen 800CW				1/10000
IRDye Ziege anti- Maus 680LT				1/10000
IRDye Ziege anti- Maus 800CW			1/1000	
Ziege anti-Ratte- Biotin		1/200		

Anhang III

Tabelle 35 Signifikanzen des Posthoc-Testes mRNA-Niveau nach der Furchtkonditionierung

Gruppe 1	Gruppe 2	Signifikanzen des LSD Posthoc-Testes
Naiv	30 min A	p<0,005
	30 min NA	p<0,005
	2 h A	p<0,005
	2 h NA	p<0,005
30 min A	2 h A	p<0,005
	2 h NA	p<0,005
	6 h A	p<0,005
	6 h NA	p<0,005
	24 h A	p<0,005
	24 h NA	p<0,005
	14 d A	p<0,005
	14 d NA	p<0,005
30 min NA	2 h A	p<0,005
	2 h NA	p<0,005
	6 h A	p<0,005
	6 h NA	p<0,005
	24 h A	p<0,005
	24 h NA	p<0,005
	14 d A	p<0,005
	14 d NA	p<0,005
2 h A	6 h A	p<0,05
	6 NA	p<0,005
	24 h A	p<0,005
	24 h NA	p<0,05
2 h NA	6 h A	p<0,005

Anhang

	6 h NA	p<0,005
	24 h A	p<0,005
	24 h NA	p<0,05
	14 d A	p<0,05
	14 d NA	p<0,05

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei vielen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Stork für die Vergabe des interessanten Themas bedanken. Seine Anregungen und kritischen Kommentare haben zum guten Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich danke meinen Kollegen der Abteilung für Genetik und molekulare Neurobiologie für die Unterstützung bei den Experimenten. Im Besonderen möchte ich bei mich Dr. Jorge Bergado-Acosta, Dr. Jan Teuber, Deniz A. Madencioglu, Simone Stork, Franziska Webers und Antje Koffi von Hoff für die unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke Dr. Stefanie Kliche für die Anregungen und Unterstützung beim Bearbeiten des Projektes.

Dr. Roland Hartig danke ich für die Einführung in die Konfokalmikroskopie und Patricia Gintschel für die unkomplizierte Hilfe, wenn der Antikörper mal wieder verbraucht war.

Ich danke Jan Handke für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit sowie Anne, Ralf, Ramona und Nicole für ihre aufmunternden Worte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Carla & Olaf, meiner Schwester Franziska und meinem Freund Witali für ihre großartige Unterstützung, ihr unendliches Verständnis und ihr vorbehaltloses Vertrauen in mich!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Marlen Thiere, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema:

Das hämatopoetische Adapterprotein ADAP in neuronalen Zellen und seine Rolle beim Neuritenwachstum hippocampaler Neuronen

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg,

Dipl.-Biol. Marlen Thiere

Publikationsliste

Integrin Activation through the hematopoietic adapter molecule ADAP regulates dendritic development of hippocampal neurons.

Thiere M, Kliche S, Müller B, Teuber J, Nold I, Stork O.
Front Mol Neurosci. 2016 Sep 30;9:91

The serine/threonine kinase ndr2 controls integrin trafficking and integrin-dependent neurite growth.

Rehberg K, Kliche S, Madencioglu DA, Thiere M, Müller B, Meineke BM, Freund C, Budinger E, Stork O.
J Neurosci. 2014 Apr 9;34(15):5342-54. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2728-13.2014.

Circadian modulation of anxiety: a role for somatostatin in the amygdala.

Albrecht A, Thiere M, Bergado-Acosta JR, Poranzke J, Müller B, Stork O.
PLoS One. 2013 Dec 20;8(12):e84668. doi: 10.1371/journal.pone.0084668. eCollection 2013

MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas.

Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, Thorns C, Ziepert M, Wesche KO, Thiere M, Loeffler M, Klapper W, Pfreundschuh M, Matolcsy A, Bernd HW, Reiniger L, Merz H, Feller AC.
Br J Haematol. 2008 Sep;142(5):732-44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07237.x. Epub 2008 Jun 3

Unlocking pathology archives for microRNA-profiling.

Hoefig KP, Thorns C, Roehle A, Kaehler C, Wesche KO, Repsilber D, Branke B, Thiere M, Feller AC, Merz H.
Anticancer Res. 2008 Jan-Feb;28(1A):119-23