

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. Gabriele M. Rune

## **Regulation der Expression von ADAM22 in der Molekularschicht des Gyrus dentatus**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Simon Kohrs

geboren in Henstedt-Ulzburg

Hamburg, 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.05.2013**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Bender**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. E. Mohr**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. H.-J. Kreienkamp**

# Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                    | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b>Einleitung</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Gegenstand der Arbeit/Einführung</b>                         | <b>4</b>  |
| <b>2.2</b> | <b>Anatomie des Hippokampus</b>                                 | <b>5</b>  |
| 2.2.1      | Lagebeziehungen und funktionelle Einordnung des Hippokampus     | 5         |
| 2.2.2      | Neuronale Verschaltung des Hippokampus                          | 5         |
| 2.2.3      | Der Gyrus dentatus  | 7         |
| 2.2.4      | Synaptische Plastizität im Hippokampus                          | 8         |
| <b>2.3</b> | <b>ADAM Familie und ADAM22</b>                                  | <b>10</b> |
| 2.3.1      | Die ADAM Familie  | 10        |
| 2.3.2      | ADAM22 - ein neues Regulatorprotein für synaptische Plastizität | 12        |
| <b>2.4</b> | <b>Fragestellung</b>  | <b>13</b> |
| <b>3</b>   | <b>Material und Methoden</b>                                    | <b>14</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Material</b>   | <b>14</b> |
| 3.1.1      | Arbeitsmaterialien, Geräte                                      | 14        |
| 3.1.2      | Software  | 15        |
| 3.1.3      | Chemikalien   | 15        |
| 3.1.4      | Lösungen  | 17        |
| 3.1.5      | Antikörper  | 18        |
| <b>3.2</b> | <b>Methoden</b>   | <b>19</b> |
| 3.2.1      | Eingesetzte Tiere   | 19        |
| 3.2.2      | Behandlung der Tiere/Gewebe-Fixierung für die Entwicklungsreihe | 19        |
| 3.2.3      | Kryostat-Schnitte   | 20        |
| 3.2.4      | In vitro Experimente: Organotypische Gewebekultur               | 20        |
| 3.2.4.1    | Herstellung der organischen Gewebekulturen                      | 20        |
| 3.2.4.2    | Beeinflussung neuronaler Aktivität                              | 21        |
| 3.2.4.3    | Deafferenzierung  | 22        |
| 3.2.4.4    | Fixierung und Verarbeitung der Gewebekulturen                   | 22        |
| 3.2.5      | Immunhistochemie  | 23        |
| 3.2.5.1    | Immunfärbung für die Lichtmikroskopie                           | 23        |
| 3.2.5.2    | Immunfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie                     | 26        |
| 3.2.6      | Auswertung  | 26        |
| 3.2.6.1    | Lichtmikroskopische Auswertung                                  | 26        |
| 3.2.6.2    | Analyse der Immunfluoreszenz-gefärbten Gewebekulturen           | 27        |
| 3.2.6.3    | Statistik   | 29        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4 Ergebnisse .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.1 Entwicklungsabhängige Expression und spezifische<br/>        Lokalisation von ADAM22 im Gyrus dentatus .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.2 Etablierung eines <i>in vitro</i>-Modells zur Untersuchung<br/>        der Regulation von ADAM22.....</b>   | <b>32</b> |
| 4.2.1 Reproduktion des Expressionsmusters von ADAM22 in<br>entorhino- hippocampalen Gewebekulturen.....  | 32        |
| 4.2.2 Nachweis der neuronal stimulierenden/inhibierenden<br>Wirkung von Kainsäure/Tetrodotoxin .....   | 32        |
| <b>4.3 Auswirkung von veränderter neuronaler Aktivität auf die Expression<br/>        von ADAM22 im Stratum moleculare des Gyrus dentatus .....</b>                      | <b>34</b> |
| <b>4.4 Auswirkung einer Durchtrennung des Tractus perforans (Deafferenzierung)<br/>        auf die Expression von ADAM22 im Stratum moleculare des Gyrus dentatus ..</b> | <b>35</b> |
| <b>5 Diskussion .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>5.1 Die Lokalisation von ADAM22.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>5.2 Die entwicklungsabhängige Expression von ADAM22 im Gyrus dentatus .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>5.3 Regulation der Expression von ADAM22 im Gyrus dentatus<br/>        in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>5.4 Funktionelle Aspekte von ADAM22 .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>6 Zusammenfassung .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>7 Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>8 Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>8.1 Publikationen .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>8.2 Internetquellen.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>9 Danksagung .....</b>  | <b>59</b> |
| <b>10 Eidesstattliche Erklärung .....</b>  | <b>60</b> |

# 1 Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| Abb.             | Abbildung  |
| ABC              | Avidin-Biotin-Complex  |
| ADAM             | A Disintegrin And Metalloproteinase                            |
| ADAMTS           | A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs |
| ADPEAF           | autosomal dominant partial epilepsy with auditory features     |
| AMPA             | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid   |
| AP-1             | Activator Protein-1  |
| aSM              | äußere Schicht des Stratum moleculare                          |
| bzgl.            | bezüglich  |
| bzw.             | beziehungsweise  |
| °C               | Grad Celsius   |
| CA               | Cornu ammonis  |
| Ca <sup>2+</sup> | Calcium  |
| ca.              | circa  |
| CaMKII           | Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II                 |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlenstoffdioxid  |
| DAB              | Diaminobenzidin  |
| DAPI             | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                                    |
| Deaff.           | Deafferenzierung   |
| dest.            | Destillata   |
| d. h.            | das heißt  |
| Dr.              | Doktor   |
| ECM              | Extracellular Matrix   |
| EGFR             | Epidermal Growth Factor Rezeptor                               |
| engl.            | englisch   |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum                                    |
| et al.           | et alii/et aliae   |
| etc.             | et cetera  |
| ETS              | E-twenty six   |
| Fiss. hippoc.    | Fissura hippocampi   |
| GB               | Gigabyte   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| GD                            | Gyrus dentatus  |
| GluR1                         | Glutamatrezeptor Typ 1  |
| gr.                           | griechisch  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  |
| HBSS                          | Hanks Balanced Salts  |
| HCl                           | Chlorwasserstoff  |
| HCN-Kanal                     | hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel |
| hil                           | hilus   |
| HVR                           | hypervariable Region  |
| Ig                            | Immunglobulin   |
| IL-1                          | Interleukin-1   |
| iSM                           | innere Schicht des Stratum moleculare                               |
| K <sup>+</sup>                | Kalium  |
| Ka                            | Kainsäure   |
| kA                            | kommissurale Axone  |
| Kontr.                        | Kontrolle   |
| l                             | Liter   |
| laEC                          | lateral entorhinaler Cortex   |
| Lgi1                          | Leucine-rich, glioma inactivated 1                                  |
| LSM                           | Laser Scanning Microscope   |
| LTD                           | Long- Term Depression   |
| LTP                           | Long- Term Potentiation   |
| laEC                          | lateral entorhinaler Cortex   |
| MAPK                          | Mitogen Activated Protein Kinase                                    |
| MDC                           | Metalloproteinase Disintegrin Cystein- rich                         |
| meEC                          | medialer entorhinaler Cortex  |
| MEM                           | Minimum Essential Medium  |
| Mg <sup>2+</sup>              | Magnesium   |
| ml                            | Milliliter  |
| μl                            | Mikroliter  |
| μM                            | Mikrometer  |
| mM                            | Millimol  |
| mm                            | Millimeter  |
| MS                            | Multiple Sklerose   |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| mSM                              | mittlere Schicht des Stratum moleculare                       |
| MW                               | Mittelwert  |
| n                                | Stichprobenumfang   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Dinatriumhydrogenphosphat                                     |
| Na <sup>+</sup>                  | Natrium   |
| NaCl                             | Natriumchlorid  |
| NaOH                             | Natriumhydroxid   |
| Ncl., Ncll.                      | Nucleus, Nuclei (plural)                                      |
| NGS                              | Normal Goat Serum   |
| NiCl <sub>2</sub>                | Nickel(II)chlorid   |
| NMDA                             | N- Methyl- D- Aspartat  |
| P                                | postnatal   |
| p                                | probability; englisch für Wahrscheinlichkeit, Signifikanzwert |
| PBS                              | Phosphate Buffered Saline                                     |
| PDGF                             | Platelet Derived Growth Factor                                |
| PFA                              | Paraformaldehyd   |
| pH                               | pondus hydrogenii   |
| Prof.                            | Professor   |
| PSD                              | Postsynaptische Dichte  |
| SD                               | Standardabweichung  |
| SE                               | Standardfehler  |
| SG                               | Stratum granulosum  |
| SM                               | Stratum moleculare  |
| sog.                             | sogenannt   |
| Str.                             | Stratum   |
| TGF                              | Transforming Growth Factor                                    |
| TIMP                             | Tissue Inhibitor of Metalloproteinase                         |
| TLE                              | Temporallappenepilepsie                                       |
| TNF                              | Tumornekrosefaktor  |
| TTX                              | Tetrodotoxin  |
| vs.                              | versus  |
| z. B.                            | zum Beispiel  |

## 2 Einleitung

### 2.1 Gegenstand der Arbeit/Einführung

Der Hippokampus erfährt seit Bekanntwerden seiner zentralen Rolle in Gedächtniskonsolidierung und Lernprozessen ein besonderes Interesse in der neurobiologischen Forschung. Physiologische Grundlage dieser Funktionen ist dabei eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Plastizität, die an den Synapsen des hippokampalen Schaltkreises zu beobachten ist. Erste Station dieses exzitatorischen Schaltkreises ist der Gyrus dentatus, der über den Tractus perforans Afferenzen olfaktorischer, somatosensibler, visueller und auditorischer Qualität aus der Area entorhinalis erhält (Segal & Landis, 1974; Witter et al., 2000). Mit diesen Afferenzen und dem Fornix als bedeutender Efferenz nimmt der Hippokampus eine zentrale Rolle in dem 1937 von Papez beschriebenen Neuronenkreis ein und stellt damit eine wichtige anatomische Struktur im limbischen System dar (Papez, 1937).

Die Axone des Tractus perforans bilden Synapsen mit den Dendriten der Körnerzellen im Gyrus dentatus. An diesen Synapsen sind sowohl prä- als auch postsynaptisch zahlreiche Mechanismen synaptischer Plastizität ausgebildet (Bramham, 2007; Pöschel & Stanton, 2007; Bender et al., 2007). Ein relativ neuer Faktor im Rahmen dieser Plastizität stellt ADAM22 dar; ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären Disintegrin-Domäne und einer Metalloproteinase-Domäne, die jedoch katalytisch inaktiv ist (White, 2003). ADAM22 spielt bei Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen eine wichtige Rolle (Snyder, 2006) und wird im Gyrus dentatus als postsynaptisch lokalisierter Regulator synaptischer Plastizität diskutiert (Fukata et al., 2006). Über den genauen Ort, die Entwicklung und die Regulation der ADAM22-Expression im Gyrus dentatus ist jedoch noch wenig bekannt. Ziel dieser Dissertation war es daher, folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- 1) Wo im Gyrus dentatus wird ADAM22 exprimiert?
- 2) Wie ist der zeitliche Verlauf dieser Expression?
- 3) Wird die Expression von ADAM22 im Gyrus dentatus aktivitätsabhängig reguliert?
- 4) Welchen Einfluss haben axonale Afferenzen auf die Expression von ADAM22?

## 2.2 Anatomie des Hippokampus

### 2.2.1 Lagebeziehungen und funktionelle Einordnung des Hippokampus

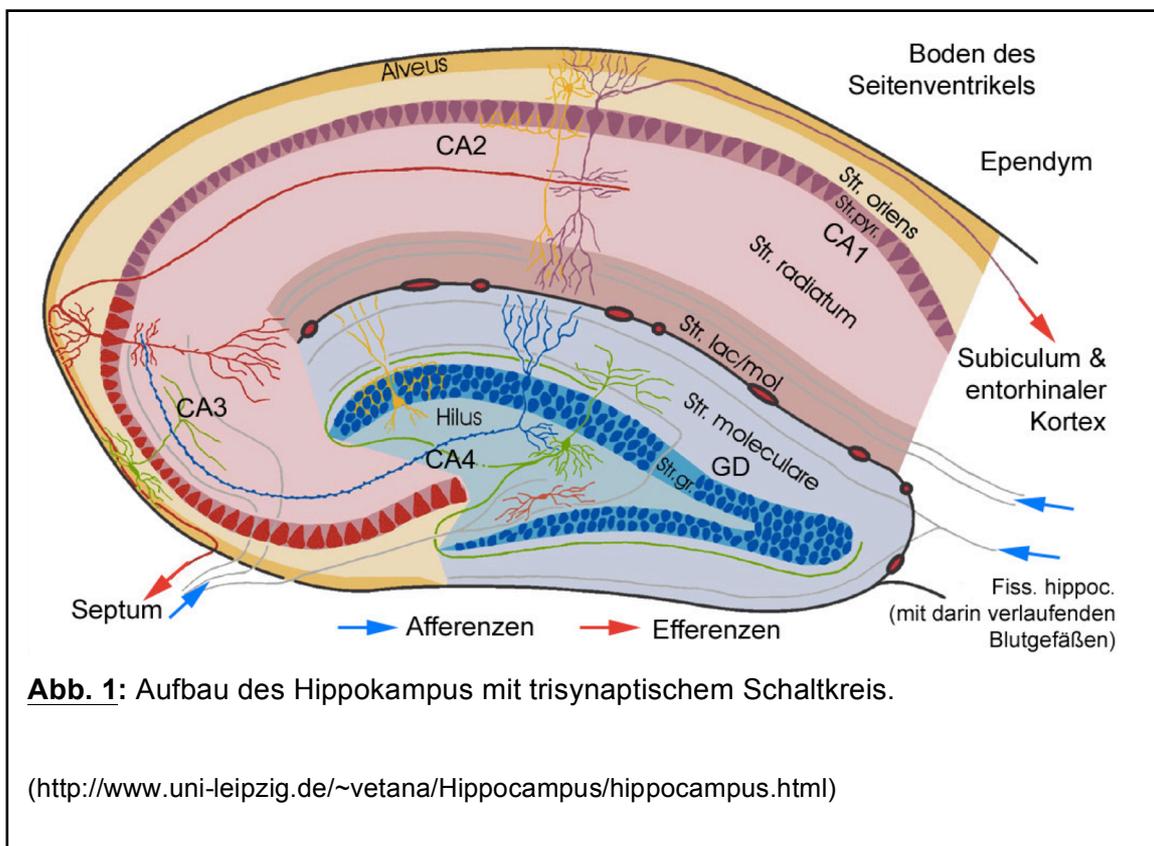
Der Hippokampus wurde im Jahr 1564 von Giulio Cesare Aranzi zuerst beschrieben (Chudler, 2010). Sein Name leitet sich von einem Meeresungeheuer aus der griechischen Mythologie ab („Hippos“-gr.: Pferd, „Kamos“-gr.: Seeungeheuer/Wurm) und nicht, wie man vermuten könnte, von seiner anatomischen Ähnlichkeit zu einem Seepferdchen (gr.: „Hippokamos“).

Der Hippokampus liegt im Schläfenlappen (Lobus temporalis) an der Medialwand des Seitenventrikels und stellt dort den größten Teil des phylogenetisch alten Archikortex dar. Er setzt sich aus dem Cornu ammonis (CA, Hippocampus proprius), dem Gyrus dentatus und dem Subiculum zusammen. Gemeinsam mit der Area entorhinalis des Gyrus parahippocampalis bildet er die Hippokampusformation und ist Teil des inneren Bogens des limbischen Systems. Der Begriff „Limbisches System“ geht auf den von Broca 1878 geprägten Begriff „grand lobe limbique“ zurück und umfasst neo-, archi- und paleokortikale Bezirke sowie subkortikale Kerngebiete (Broca, 1878). Basierend auf dieser großen Ausdehnung können Informationen aus End-, Zwischen- und Mittelhirn (Telencephalon, Diencephalon und Mesencephalon) miteinander verknüpft werden und es wird dadurch verständlich, dass das limbische System bei Affektregulierung, Handlungsplanung, Gedächtniskonsolidierung (d. h. Lernprozessen), der emotionalen Bewertung und Internalisierung moralisch-ethischer Normen, der Steuerung komplexer sozialer Interaktionen sowie bei vielen endokrinen und viszeralen Funktionen eine wichtige Rolle spielt.

### 2.2.2 Neuronale Verschaltung des Hippokampus

Wesentliche Afferenzen erhält der Hippokampus über den Tractus perforans aus der Area entorhinalis (Areae 28 und 34 nach Brodmann), sowie aus dem Thalamus, Amygdala, Gyrus cinguli, Septum und verschiedenen Hirnstammkernen (Steward & Scoville, 1976; Trepel, 2004). Die Area entorhinalis kann als Tor zum Hippokampus angesehen werden, denn sie integriert

sensorische Informationen olfaktorischer, sensibler, visueller und auditorischer Qualität aus zahlreichen Hirnregionen wie dem Riechhirn, dem Neokortex und dem Corpus amygdaloideum. Der Tractus perforans entspringt an Stern- und Pyramidenzellen der Area entorhinalis und ist glutamaterg exzitatorisch (Schwartz & Coleman, 1981). Er durchbricht das Subiculum, welches den Übergang vom sechsschichtigen Neokortex zum dreischichtigen Archikortex darstellt, und terminiert schichtenspezifisch an den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellen in CA3 (Andersen et al., 1971). Die synaptische Verbindung mit den Körnerzellen stellt die 1. Station eines trisynaptischen Schaltkreises durch den Hippokampus dar. Seine 2. Station befindet sich in der CA3-Region, wo die Axone der Körnerzellen (Moosfasern) auf den im Stratum radiatum gelegenen Dendriten der Pyramidenzellen terminieren. Ausgehend von CA3 verbinden Schaffer-Kollateralen die Pyramidenzellen von CA3 und CA1 (3. Station). Über die CA1-Neurone und das Subiculum erreicht die Information dann wieder die Area entorhinalis und der Schaltkreis wird dadurch geschlossen (Benninghoff, 2007).

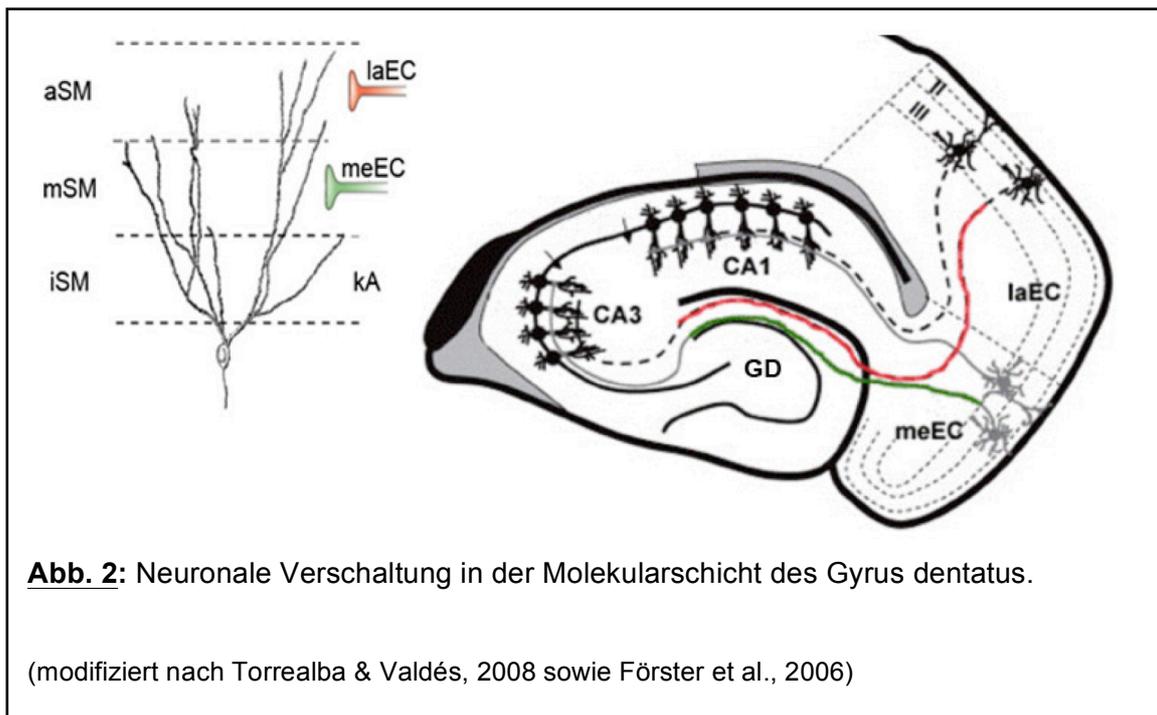


Neben dieser intrinsischen Verschaltung mit der Efferenz zur Area entorhinalis verläuft ein Großteil der Efferenzen von den Pyramidenzellen des Cornu ammonis ausgehend in den Fornix. Dieser projiziert mit präkommissuralen Fornixfasern in Kerngebiete des Septums und des basalen Vorderhirns sowie mit postkommissuralen Fornixfasern in thalamische und hypothalamische Nuclei. Hierbei spielen die Corpora mamillaria eine wesentliche Rolle, denn über die von ihnen ausgehenden Verbindungen zu den Ncll. thalami anteriores und das Cingulum schließt sich der Papez-Neuronenkreis.

### 2.2.3 Der Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus spielt als Bestandteil der hippocampalen Formation eine essentielle Rolle bei der exzitatorischen Weiterleitung. Er bildet die erste Station des trisynaptischen Schaltkreises durch den Hippokampus (siehe oben) und ist damit für Gedächtnis und Lernen von großer Bedeutung. Er umgreift die CA3-Region des Ammonshorns (Abb. 2). Räumlich wird daher, je nach Lage zum Pyramidenzellband der CA-Region, ein suprapyramidales und ein infrapyramidales Blatt des hufeisenförmigen Gyrus dentatus unterschieden (Amaral et al., 2007). Ein dreischichtiger Aufbau untergliedert den Gyrus dentatus weiterhin in den Hilus (= „polymorphe Schicht“; im menschlichen Hippokampus auch als „CA4-Region“ bezeichnet), das Stratum granulare und das Stratum moleculare (Abb. 1, Amaral & Witter, 1989).

Im Stratum moleculare (SM) terminieren afferente Axone in streng schichtenspezifischer Weise (Abb. 2). So wird die innere Schicht (iSM) ausschließlich von assoziativen und kommissuralen Axonen (kA) aus dem Hilus innerviert. Die mittlere Schicht (mSM) erhält ausschließlich Axone aus dem medialen Anteil der Area entorhinalis (medialer entorhinaler Cortex, meEC), während die äußere Schicht (aSM) nur Axone aus dem lateralen Anteil der Area entorhinalis (lateraler entorhinaler Cortex, laEC) erhält. Diese - auch funktionell unterschiedlichen - Anteile des Tractus perforans benennt man entsprechend als medialen und lateralen Tractus perforans. (Förster et al., 2006; Torrealba & Valdés, 2008)



#### 2.2.4 Synaptische Plastizität im Hippokampus

Der Begriff der „synaptischen Plastizität“ bezeichnet die neuronale Fähigkeit zur Regulierung synaptischer Transmission durch eine morphologische und physiologische Adaptation an sich verändernde neuronale Aktivität und Anforderungen. Hierbei kann es sowohl zu prä- als auch postsynaptischen, kurz oder lang andauernden Veränderungen im Sinne einer Potenzierung oder Depression der synaptischen Transmission kommen. Bei der lang andauernden Veränderung werden „Long-Term Potentiation“ (LTP) und „Long-Term Depression“ (LTD) unterschieden. Die LTP konnte im Gyrus dentatus sowie der CA1- und CA3-Region des Hippokampus nachgewiesen werden (Zola-Morgan & Squire, 1993) und spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von kreisender Erregung und somit bei der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten.

Über postsynaptische Mechanismen der Plastizität ist im Gegensatz zu präsynaptischen Mechanismen vieles bekannt. Zur Generierung einer LTP ist eine Aktivierung des ionotropen NMDA-Rezeptors (einem Subtyp der Glutamat-

Rezeptoren und zugleich ein Kanal für monovalente Kationen wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ) durch hochfrequente wiederholte Depolarisation mit dem Verlust der  $\text{Mg}^{2+}$ -Blockierung des NMDA-Rezeptors notwendig (Collingridge et al., 1988). Durch eine sich anschließende Signalkaskade über einen hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und Autophosphorylierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) (Fukunaga et al., 1995; Barria et al., 1997) kommt es durch die CaMKII zu einer Phosphorylierung der GluR1 Untereinheit des ionotropen Glutamatrezeptors AMPA und somit zu einer Erhöhung der AMPA-Leitfähigkeit (z. B. für  $\text{Na}^+$ ) mit der Folge einer gesteigerten Erregbarkeit. Mittel- und langfristig kommt es über die Vermittlung von Signalkaskaden dann auch zu einer Aktivierung der Proteinsynthese und darüber zu einer Stabilisierung der aktivitätsinduzierten Effekte. Mit zunehmender neuronaler Aktivität geht zudem eine Reorganisation der „Postsynaptic Density“ (PSD, postsynaptische Dichte), einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Verdichtung von Proteinen an der postsynaptischen Membran, einher (Lüscher et al., 2000). Die PSD spielt eine große Rolle in der Regulierung der synaptischen Plastizität, indem sie z. B. über die Untereinheit PSD-95 und das Zytoskelettprotein Stargazin den Einbau von AMPA-Rezeptoren in die synaptische Membran reguliert. In diesem Prozess spielt auch ADAM22 eine Rolle, da es über den Kontakt mit Stargazin den Einbau der AMPA-Rezeptoren stimuliert (Snyder, 2006; siehe auch 2.3.2).

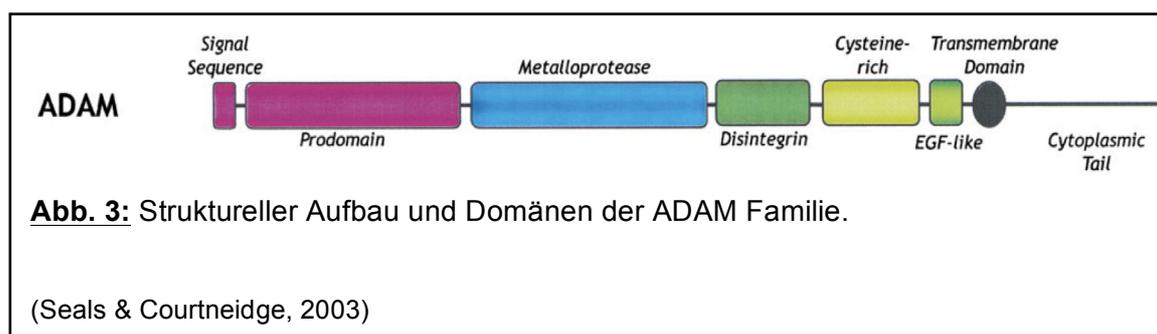
Bezüglich präsynaptischer Mechanismen ging man lange Zeit lediglich davon aus, dass es im Zuge der LTP zu einer Erhöhung der Glutamat-Ausschüttung kommt (z. B. durch erleichterten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Axonterminalen). Neuere Forschungsergebnisse zeigen aber, dass auch die Aktivität spannungsmodulierender, präsynaptischer Ionenkanäle, wie z. B. der HCN-Kanäle (Bender et al., 2007), durch neuronale Aktivität plastisch verändert werden kann.

## 2.3 ADAM Familie und ADAM22

### 2.3.1 Die ADAM Familie

Die „A Disintegrin And Metalloproteinase“ (ADAM) Familie ist eine faszinierend vielseitige Familie von Transmembran- und Sekretproteinen von jeweils ca. 750 Aminosäuren. Sie spielen über die Beeinflussung der Adhäsion und Migration der Zellen sowie über die proteolytische Prozessierung von auf der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptoren und über die Interaktion mit Signaltransduktionsmolekülen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellphänotyps. So wird beispielsweise durch ADAM17 die Bildung der aktiven Form des Liganden des Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) katalysiert (Edwards et al., 2008). Die ADAM Familie gehört nach der MEROPS Klassifikation zu der M12B Adamalysin Protease Subfamilie (<http://merops.sanger.ac.uk/>; Rawlings et al., 2010), in welcher ebenfalls die sehr ähnlichen PIII Schlangengift-Reprolysine und ADAMTSs kategorisiert werden. Es existiert der synonym verwendete Begriff der MDCs (metalloproteinase disintegrin cystein-rich,) (Blobel, 1997), der allerdings zunehmend weniger verwendet wird. Obwohl alle bekannten ADAM Proteine eine Metalloproteinase-Domäne besitzen, ist sie bei einigen katalytisch inaktiv, z. B. bei ADAM22. Bei diesen ADAM Proteinen wird vermutet, dass die Protein-Protein Interaktions-Funktion im Vordergrund steht. (Edwards et al., 2008).

Der generelle Aufbau der ADAM Proteine besteht aus zahlreichen verschiedenen Domänen: einer zytoplasmatischen-, einer transmembranären-, einer EGF-like-, einer Cystein-rich-, einer Disintegrin-, einer Metalloproteinase- und einer Pro-Domäne. Die Signalsequenz am N-Terminus leitet den sekretorischen Weg der ADAM Proteine bei der Proteinbiosynthese ein.



Die von der Signalsequenz in Richtung des C-Terminus folgende Prodomäne hat die Funktion eines intramolekularen Chaperons zur korrekten Proteinfaltung (Roghani et al., 1999). Generell wird die Prodomäne intrazellulär im Golgi-Apparat abgespalten, allerdings gibt es für ADAM8 und ADAM28 Hinweise auf einen autokatalytischen Mechanismus (Howard et al., 2000; Schlomann et al., 2002).

Weiter C-terminal gelegen befindet sich die Metalloproteinase-Domäne. Diese hat wichtige Funktionen bei der Prozessierung von diversen auf der Zelloberfläche lokalisierten Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen.

Es folgt die Disintegrin-Domäne, welche eine Interaktion zwischen ADAM und Integrinen ermöglichen (White, 2003) und somit eine wesentliche Rolle bei Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktionen spielen soll.

Die wiederum C-terminal gelegene Cystein-rich-Domäne wird mit der Regulation der Funktion der ADAM Proteine in Verbindung gebracht und kann mit Proteoglykanen interagieren (Yong, 2005).

Die Länge der intrazellulär gelegenen zytoplasmatischen Domäne variiert je nach ADAM-Protein sehr stark, sie reicht von 11 Aminosäuren bei ADAM11 bis hin zu 231 Aminosäuren bei ADAM19 (Seals & Courtneidge, 2003). Diese Domäne wird als Bindeglied der Signaltransduktion von extrazellulären Vorgängen nach intrazellulär, aber auch als möglicher Regulator der von intrazellulären Vorgängen abhängigen extrazellulären Protease-Aktivität angesehen. Es sind hierfür zahlreiche intrazelluläre Interaktionspartner bekannt, die über SH3-Domänen an PXXP Motiven der ADAM Proteine binden können, wobei ADAM7-10, 12, 15, 17, 19, 22, 29 und 33 diese PXXP Motive besitzen (Edwards et al., 2008). Als Beispiele für derartige Interaktionspartner von beispielsweise ADAM22 können die 14-3-3 Proteinfamilie (Zhu et al., 2005; Godde et al., 2006) sowie die PSD-95 (Postsynaptic Density-95) (Zhu et al., 2003) genannt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne die ADAM Funktion entweder über Regulierung der katalytischen Aktivität oder über die Bestimmung der korrekten zellulären Lokalisierung beeinflusst (Cao et al., 2002).

### 2.3.2 ADAM22 - ein neues Regulatorprotein für synaptische Plastizität

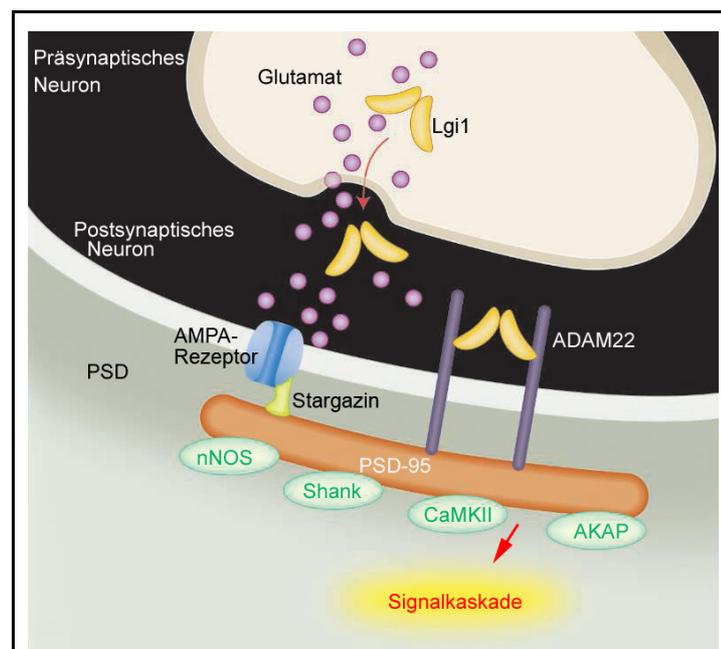
ADAM22 ist ein Transmembranprotein mit extrazellulärer Disintegrin- und Metalloproteinase-Domäne, wobei letztere katalytisch inaktiv ist (White, 2003). Es wird im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert. Verwendete Synonyme sind MDC2 und MGC149832 (Edwards et al., 2008). Es wird funktionell mit Zell-Zell und der Zell-Matrix Interaktion in Verbindung gebracht (Snyder, 2006) und als Regulator synaptischer Plastizität im Hippokampus gehandelt (Fukata et al., 2006). So wurde ADAM22 als postsynaptischer Bindungspartner von PSD-95 (Zhu et al., 2003) und Lgi1 identifiziert (Fukata et al., 2006).

Über die SH3-Domäne der PSD-95 wird eine Bindung an die PXXP-Motive der intrazellulären Domäne von ADAM22 und eine Signaltransduktion nach intrazellulär ermöglicht. Es wird vermutet, dass ADAM22 über diesen Mechanismus, vermittelt durch PSD-95 und das Zytoskelettprotein

Stargazin, die synaptische Expression von AMPA Rezeptoren beeinflusst (Fukata et al., 2006; Snyder, 2006).

Über die Interaktion mit Lgi1 ist weiterhin eine Beeinflussung der präsynaptischen Seite durch ADAM22 möglich.

So wird diskutiert, dass Lgi1 die Funktion von Kaliumkanälen (Kv1) in den Axonterminalen reguliert (Schulte et al., 2006).



**Abb. 4:** ADAM22 und seine Rolle in der Signaltransduktion.

ADAM22 gilt als Rezeptor für Lgi1 und interagiert mit der PSD-95 über welche mittels Stargazin die AMPA-Rezeptorendichte reguliert wird.

(Snyder, 2006)

Die ADAM22-Lgi1-Interaktion stellt somit möglicherweise einen bislang noch unerforschten transsynaptischen Mechanismus der hippocampalen Plastizität dar. Neueste Untersuchungen, die eine direkte Interaktion von ADAM22 mit präsynaptischen Kaliumkanälen belegen (Ogawa et al., 2010) unterstützen diese These.

## 2.4 Fragestellung

Die zunehmenden Hinweise auf eine zentrale Rolle von ADAM22 in Prozessen der synaptischen Plastizität im Hippokampus bilden Hintergrund und Motivation für diese Dissertation. Angesichts eines derzeitigen Mangels an Basisinformationen über Expression und Regulation des Proteins wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Zur Expression: Mittels immunhistochemischer Techniken wurde in den Gehirnen von Ratten verschiedener Altersstufen die genaue Lokalisation der ADAM22-Expression im Gyrus dentatus und der Entwicklungsverlauf dieser Expression bestimmt.

Zur Regulation: Hierfür wurde ein Kulturmodell (organotypische Gewebekultur) etabliert und an diesem *in vitro* die Auswirkungen a) von veränderter neuronaler Aktivität und b) einer Deafferenzierung des Gyrus dentatus auf die ADAM22-Expression untersucht.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Arbeitsmaterialien, Geräte

|  |                        |
|--|------------------------|
| Axioskop (Mikroskop)                         | ZEISS                  |
| Brutschrank, 37 °C                           | MEMMERT                |
| CO <sub>2</sub> Inkubator, 37 °C             | HERAEUS                |
| Cutfix Surgical Disposable Scalpel           | BRAUN                  |
| Deckgläser, 24 x 60 mm                       | MARIENFELD             |
| Desinfektionsmittel (Sterillium)             | BODE                   |
| ep T.I.P.S. Standard, verschiedene Größen    | EPPENDORF AG           |
| Falcon Multiwell Cell Culture Plate (6 well) | BECTON DICKINSON LAB.  |
| Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml                | GREINER BIO-ONE        |
| Färbekästen nach Hellendahl (Küvetten)       | ROTH                   |
| Feuchtkammer                                 | EIGENBAU UKE           |
| Gefrierschrank, -25 °C und -80 °C            | LIEBHERR               |
| Heidemannspatel                              | AESCULAP DE            |
| Kosmetiktücher Clou Prestige                 | WEPA PROFESSIONAL      |
| Kühlschrank, 4 °C                            | BOSCH/LIEBHERR         |
| Lichtmikroskop                               | OLYMPUS/ZEISS          |
| LSM Mikroskop                                | ZEISS                  |
| Macintosh-PC (OS 9.1.)                       | APPLE                  |
| Masterflex L/S Economy Drive                 | COLE PARMER            |
| Microm HM 560                                | MICROM                 |
| Microtome Blade S35                          | FEATHER                |
| Mikroskop Axiovert 200M                      | ZEISS                  |
| Millicell-CM (Biomembran)                    | MILLIPORE              |
| Objektträger SuperFrost/Plus                 | ASSISTENT              |
| Parafilm M                                   | PECHINEY PLASTIC PACK. |
| Pasteurpipetten                              | ASSISTENT              |
| Pinself                                      | DA VINCI/PELIKAN       |
| Pinzette                                     | MERCK                  |
| Pipetten 100 und 2500 ml                     | EPPENDORF AG           |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Pipetten 20, 100, 200 und 1000 µl           | GILSON                |
| Pipettenspitzen für Pipetus 5, 10 und 25 ml | BECTON DICKINSON LAB. |
| Pipetus Akku                                | HIRSCHMANN LABORGER.  |
| Reagiergefäße 1,5 und 2 ml                  | EPPENDORF AG          |
| Rüttler MS2 Minishaker                      | IKA                   |
| Schere                                      | FINE SCIENCE TOOLS    |
| Serologische Pipetten                       | FALCON                |
| Sicherheitswerkbank Stufe 2                 | HERAEUS               |
| Stericup Filter Units                       | MILLIPORE             |
| Tissue Chopper                              | H. SAUR               |
| Untersuchungshandschuhe Peha-soft satin     | HARTMANN              |
| USB-Stick Cruzer 8 GB                       | SANDISK               |
| Vortex Genie 2                              | SCIENRIFIC INDUSTRIES |
| Waage                                       | METTLER               |
| Wasserstoffperoxid                          | MERCK                 |
| Zentrifuge Universal 32R                    | HETTICH               |
| Zellkulturschale                            | FALCON                |

### 3.1.2 Software

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| AxioVision             | ZEISS       |
| Excel 2000             | MICROSOFT   |
| LSM Carl Zeiss         | ZEISS       |
| Openlab 3.1.5          | IMPROVISION |
| Photoshop CS3 Extended | ADOBE       |
| Windows XP             | MICROSOFT   |
| Word 2004              | MICROSOFT   |

### 3.1.3 Chemikalien

|                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| Aceton                        | BAKER              |
| Ammoniumchlorid               | SIGMA              |
| Aqua ad iniectabilia, 1 Liter | BAXTER DEUTSCHLAND |

|                                    |                      |
|------------------------------------|----------------------|
| DAKO Mounting Medium               | DAKO CYTOMATION      |
| DAPI                               | SIGMA                |
| Diaminobenzidin (DAB)              | VECTOR LABORATORIES  |
| Dinatriumhydrogenphosphat          | MERCK                |
| Ethanol, absolut                   | MERCK                |
| Eukitt                             | KINDLER              |
| Glucose, 50 %                      | FRESENIUS KABI       |
| Hanks Balanced Salts (HBSS)        | GIBCO                |
| Horse Serum                        | GIBCO                |
| Kainsäure                          | SIGMA-ALDRICH        |
| Ketamin                            | GRÄUB                |
| L–Glutamin, 200 mM                 | SIGMA                |
| Minimum Essential Medium           | GIBCO                |
| Normal Goat Serum (NGS)            | SIGMA                |
| Natriumchlorid                     | MERCK                |
| Natriumhydroxid                    | MERCK                |
| Nickelsulfat                       | MERCK                |
| Nickelchlorid                      | MERCK                |
| Paraformaldehyd                    | MERCK                |
| Penicillin-Streptomycin Lösung     | GIBCO                |
| Rompun                             | BAYER                |
| Saccharose                         | MERCK                |
| Salzsäure 1 mol                    | MERCK                |
| Sodium Bicarbonate Solution, 7,5 % | SIGMA                |
| Tetrodotoxin                       | SIGMA-ALDRICH        |
| Tissue Tek                         | SAKURA               |
| TritonX-100                        | USB                  |
| Trockeneis                         | HUMANGENETIK DES UKE |
| Vectastain ABC Kit PK-6100         | VECTOR               |
| Xylolersatz XEM-200                | VOGEL                |

### 3.1.4 Lösungen

#### **Anästhesie-Injektionslösung:**

- 2,4 ml Ketamin
- 1,6 ml Rompun
- mit 0,9 % NaCl bis auf 20 ml Volumen aufgefüllt
- 1,2-0,8 ml/Tier

#### **Spülpuffer:**

- 0,9 % NaCl

#### **Perfusionslösung:**

- 2,5 % PFA in PBS gelöst und auf den pH-Wert 7,4 eingestellt (mit HCl und NaOH)

#### **Präparationsmedium (Gewebekultur):**

- 50 ml Minimum Essential Medium (MEM), steril, 2-fach konzentriert
- 1 ml Glutamin(200 mM), steril
- 48 ml Aqua dest.
- Titration bis pH 7,35 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

#### **Inkubationsmedium (Gewebekultur):**

- 25 ml Minimum Essential Medium (MEM), 2-fach konzentriert, steril
- 1 ml L-Glutamin, 200 mM, steril
- 580 µl Sodium Bicarbonate Solution, 7,5 %, steril
- 25 ml Hanks Balanced Salts (HBSS), steril
- 25 ml Horse Serum, steril
- 1 ml Penicillin-Streptomycin Lösung, steril
- 1250 µl Glucose, 50 %, steril
- 19 ml Aqua dest., steril
- Titration bis pH 7,25 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

**PBS:**

- 17,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 16 g NaCl
- in 1,8 l Aqua dest. lösen
- den pH auf 7,4 einstellen mit zunächst 1 ml 25 % HCl, dann mit 2 M HCl
- auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen

**PFA 2,5 %:**

- 2,5 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS lösen

**Blockierungslösung (für Immunhistochemie):**

- 0,3 % Tritonx-100
- 3 % NGS
- in PBS

**3.1.5 Antikörper**

**Erstantikörper**

Anti-ADAM22, mouse monoclonal IgG2b NEUROMAB, UC Davis, California, USA

Anti-c-Fos, rabbit polyclonal SANTA CRUZ BIOTECH (sc-52)

**Zweitantikörper**

Goat polyclonal Anti-Mouse IgG, Cy3-markiert JACKSON IMMUNO RESEARCH

Goat polyclonal Anti-Mouse IgG, Biotin-markiert VECTOR LABORATORIES

Goat polyclonal Anti-Rabbit IgG, Biotin-markiert VECTOR LABORATORIES

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Eingesetzte Tiere

Bei den Versuchen wurden Ratten (*Rattus norvegicus*) des Zuchtstammes Wistar verwendet, welche durch die zentrale Tierhaltung des UKE bereitgestellt wurden. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten und es standen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt.

Für die Bestimmung der altersabhängigen Expression von ADAM22 im Gyrus dentatus wurden jeweils 3 Tiere aus folgender Altersstufe eingesetzt: 10 Tage alt (P10; P= postnatal), 17 Tage alt (P17) sowie 50 Tage alt (P50). Für die Kulturexperimente wurden 3 Tage alte Jungtiere (P3) verwendet (siehe 3.2.4 Gewebekultur).

### 3.2.2 Behandlung der Tiere/Gewebe-Fixierung für die Entwicklungsreihe

Die zur Entwicklungsreihe benötigten Tiere der Altersstufen P10, P17 und P50 wurden zunächst mittels einer intraperitoneal verabreichten Injektionslösung anästhetisiert, welche die Narkotika Ketamin und Rompun enthielt. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere auf dem Rücken liegend fixiert. Mit einer Schere wurden die Bauchdecke und das Peritoneum eröffnet sowie das Diaphragma durchtrennt, wodurch die Herzspitze sichtbar wurde. Daraufhin wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel geschoben, durch welche ein Perfusor den 0,9 % NaCl Spülungspuffer pumpte. Gleichzeitig wurde in das rechte Atrium inzidiert, damit das Blut entweichen konnte. Nachdem das Blut mittels des Spülungspuffers aus dem Körper gespült worden war, wurde anstelle der Spüllösung die 2,5 % PFA-enthaltende Perfusionslösung an den Perfusor angeschlossen und für weitere 5-25 Minuten (je nach Größe bzw. Alter des Tieres) durch den Körper der Ratte gepumpt. Hierdurch wurde eine erste Fixierung des Gehirns gewährleistet. Nach abgeschlossener Perfusion wurde die Ratte dekapitiert und die Haut über der Schädelkalotte resiziert. Nach median sagittaler Eröffnung des Schädeldachs und zwei weiteren lateralen Entlastungsschnitten konnte das Gehirn mit einem

Heidemannspatel entnommen werden. Das entnommene Gehirn wurde für 4 Stunden in einem 50 ml Falcon Tube in 2,5 % PFA nachfixiert und danach für 24-48 Stunden in 25 % Saccharose gelagert. Abschließend wurden die Gehirne in Isopentan bei -50 °C eingefroren und in Parafilm M eingewickelt bei -80 °C gelagert.

### **3.2.3 Kryostat-Schnitte**

Zur Vorbereitung auf die Immunhistochemie mussten die Gehirne geschnitten werden. Hierzu wurden zunächst der Hirnstamm sowie das Kleinhirn mit einem Skalpell entfernt, das tiefgefrorene Gehirn mit seiner dorsalen Seite durch das Gefriermedium (Tissue Tek) auf einer Einspannungsunterlegscheibe fixiert und in horizontaler Richtung von ventral nach dorsal mit einem Microm H560 in 30 µm bei -18 °C geschnitten. Gewebeschnitte, in denen Anteile des Hippokampus vorhanden waren, wurden mit einem Heidemannspatel in mit PBS gefüllte Zellkulturplatten (mit sechs Kavitäten, sog. „Six-wells“) übertragen und gesammelt.

### **3.2.4 In vitro Experimente: Organotypische Gewebekultur**

#### **3.2.4.1 Herstellung der organischen Gewebekulturen**

Für die organotypischen Gewebekulturen wurden 3 Tage alte Tiere zunächst dekapitiert, dann das Schädeldach median sagittal mit einer geraden Schere eröffnet und das Gehirn nach zwei lateralen Entlastungsschnitten mittels eines Heidemannspatels entnommen. Die folgenden Schritte wurden auf einem sterilen mit PBS getränkten Schwamm aufliegend durchgeführt. Zunächst wurden Kleinhirn und Hirnstamm mit einem Skalpell entfernt und die beiden Hemisphären sagittal voneinander getrennt. Der nun sichtbare Hippokampus konnte mit dem angrenzenden entorhinalen Cortex herauspräpariert werden. Anschließend wurden mit Hilfe eines Gewebehackers (Tissue Chopper) senkrecht zur Längsachse des Hippokampus 400 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese konnten, nachdem sie mittels Heidemannspatel in eine mit Präparationsmedium (4°C) gefüllte Glasschale transferiert wurden, unter lichtmikroskopischer Kontrolle

in jeweils lokal benachbarte Pärchen (Schwesterkulturen) eingeteilt werden. Jeweils eine Kultur aus diesen Pärchen wurde dann der experimentellen Bedingung unterworfen, während die andere Kultur stets als Kontrolle (d. h. unbehandelte Vergleichskultur) diente. Durch diese Vorgehensweise wurde die durch morphologische Unterschiede innerhalb des Hippokampus (entlang der Längsachse) bedingte Variabilität möglichst gering gehalten. Von der experimentellen Manipulation abgesehen (Kainsäure, TTX oder Deafferenzierung; siehe unten), wurden die Kontrollkulturen unter identischen Bedingungen wie die behandelten Kulturen des entsprechenden Pärchens gehalten.

Die Gewebeschnitte wurden nach der von Stoppini et al. (1991) beschriebenen Technik kultiviert. Dazu wurden sie auf eine mit Präparationsmedium benetzte Millicell-CM (Biomembran) aufgetragen und überschüssiges Präparationsmedium wurde mittels einer Glaspipette abgesaugt. Unter sterilen Bedingungen wurde in die Kavitäten von Six-Well-Zellkulturplatten jeweils 1 ml Inkubationsmedium eingefüllt und die mit Hippokampus-Schnitten belegten Biomembranen in diese eingelassen. Die Schnitte wurden somit nach unten durch die poröse Biomembran begrenzt, die jedoch für das Inkubationsmedium – und somit die Ernährung der Kulturen – durchlässig war. Experimentell zu behandelnde und Kontrollkulturen wurden in nebeneinander liegenden Kavitäten positioniert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für insgesamt 14 Tage. Das Inkubationsmedium wurde alle 2 Tage abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

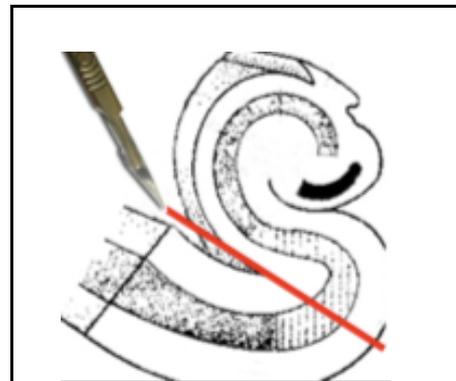
#### 3.2.4.2 Beeinflussung neuronaler Aktivität

Bei den für diesen Versuchsteil vorgesehenen Kulturen wurde am 13. Tag der Inkubation die neuronale Aktivität entweder durch Zugabe von Kainsäure stimuliert oder durch Zugabe von Tetrodotoxin (TTX) inhibiert. Für die Stimulation der neuronalen Aktivität wurden 6 µM Kainsäure dem Inkubationsmedium zugesetzt. Da Kainsäure bei zu langer Gabe für die Kulturen toxisch ist (Routbort et al., 1999; Liu et al., 2001), wurde die Exposition auf 3 Stunden (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) begrenzt und danach die Kainsäurelösung durch frisches Inkubationsmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Kulturen fixiert (siehe unten).

Alternativ wurde, um eine Inhibition neuronaler Aktivität in Kulturen zu bewirken, dem Inkubationsmedium  $0,5 \mu\text{M}$  TTX zugegeben. Bei dieser Konzentration werden nachweislich  $>95\%$  der Aktionspotentiale blockiert (Denac et al., 2000). Da diese Behandlung für die Kulturen relativ unschädlich ist, wurde die Inkubation mit TTX über die gesamte Dauer von 24 Stunden (ebenfalls bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$ ) bis zur Fixierung beibehalten.

### 3.2.4.3 Deafferenzierung

In diesem Experiment wurde am 12. Tag der Inkubation in jeweils einer Kultur eines Pärchens der Gyrus dentatus deafferenziert. Hierfür wurden die dafür bestimmten Kulturen auf ihren Biomembranen dem Brutschrank entnommen und in Glasschälchen mit Präparationsmedium überführt. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde dann der Tractus perforans mit einer feinen Nadel durchtrennt und die Area entorhinalis entfernt (siehe Abb. 5). Danach wurden die deafferenzierten Kulturen sowie die dazugehörigen Kontrollen für weitere 2 Tage nach in 3.2.4.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert und anschließend wie nachfolgend beschrieben fixiert.



**Abb. 5:** Deafferenzierung des Gyrus dentatus durch Durchtrennung des Tractus perforans *in vitro*.

### 3.2.4.4 Fixierung und Verarbeitung der Gewebekulturen

Nach Ablauf der Inkubationsperiode bzw. Durchführung der Experimente wurden die Kulturen aus dem Brutschrank entnommen und zuerst mit  $37^\circ\text{C}$  warmen PBS gespült, gefolgt von einem weiteren Spülschritt mit auf  $4^\circ\text{C}$  gekühltem PBS. Danach folgte die Fixierung: Hierfür wurden die Kulturen mit  $4^\circ\text{C}$  kühlem  $2,5\%$  PFA überschichtet und für 2 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Hiernach wurden die Kulturen erneut mit PBS ( $4^\circ\text{C}$ ) gespült und anschließend in einer  $25\%$

Saccharose enthaltenden PBS-Lösung zur Kryoprotektion des Gewebes für 24 Stunden gelagert. Es folgte eine Erneuerung der 25 % Saccharose/PBS-Lösung. Danach wurden die Gewebeschnitte von den Biomembranen gelöst und auf Deckgläschen aufgelegt. Kultur-Pärchen wurden immer auf dasselbe Deckgläschen aufgelegt und mit „A“ bzw. „B“ kodiert. Dieser Schritt wurde vom Betreuer der Arbeit (Prof. Dr. Bender), durchgeführt, der auch als einzige Person den Schlüssel für die Codierung kannte. Ab diesem Zeitpunkt handelte es sich somit um eine Blindstudie, denn die Codierung blieb mir bis zur Vorlage der endgültigen Auswertung unbekannt. Abschließend wurde überschüssige Saccharose-Lösung mit einem Stück Zellstoff entfernt, ein Tropfen Gefriermedium auf die Kulturen gegeben. Die Deckgläschen mit den Kulturen wurden dann zum Schnellgefrieren auf Trockeneis aufgelegt und nach beendetem Schnellfrost bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

Zur weiteren Bearbeitung wurden von den Gewebekulturen zuerst im Kryostat  $20\text{ }\mu\text{m}$ -dünne Gewebeschnitte hergestellt. Dazu wurden die in Gefriermedium eingebetteten Kulturen zunächst mit einem Tropfen Gefriermedium auf Einspannungsunterlegscheiben fixiert und im Kryostat eingespannt. Mit Hilfe des Microm H560 konnten nun schrittweise  $20\text{ }\mu\text{m}$  Gewebeschnitte gewonnen werden. Mittels eines feinen Spatels wurden diese Schnitte in mit raumtemperiertem PBS gefüllte Kavitäten von Zellkulturplatten überfördert und dort gesammelt. Anschließend wurden sie nach vorbestimmter Ordnung mit einem feinen Pinsel auf Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurde darauf geachtet, dass jeweils Gewebeschnitte von A und von B eines zueinander gehörigen Pärchens gemeinsam aufgetragen wurden. Mit den gewonnenen Gewebeschnitten (4-8 Gewebeschnitte pro Kultur) wurden meist 2 Objektträger bestückt.

#### **3.2.5 Immunhistochemie**

##### 3.2.5.1 Immunfärbung für die Lichtmikroskopie

Die Behandlungen der Entwicklungsreihe (ganze Gehirnschnitte) sowie der Gewebekulturen werden zur Übersichtlichkeit getrennt erläutert.

Entwicklungsreihe:

Für die Entwicklungsreihe wurden 30 µm-dünne, serielle Gewebeschnitte durch das Gehirn in mit PBS gefüllten Kavitäten von Zellkulturplatten gesammelt. Von diesen Schnitten wurden geeignete (d. h. Hippokampus enthaltende) für die immunhistochemische Behandlung ausgewählt. Diese Behandlung wurde „free-floating“ durchgeführt, d. h. die Schnitte wurden nicht auf Objektträgern befestigt, sondern schwammen in den Lösungen. Mit Hilfe einer durch Hitzeeinwirkung zu einem Haken umfunktionierten Glaspipette wurden sie dabei von einer Lösung in die nächste transportiert. Die im Folgenden angegebenen Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität einer Zellkulturplatte, in welcher jeweils 3-5 Gewebeschnitte zugleich behandelt wurden. Die Prozedur dauerte in der Regel 2 Tage:

*Tag 1:* Im ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte zur Absättigung unspezifischer Bindungen in 1,5 ml einer Lösung aus PBS, 0,3 % TritonX-100 sowie 3 % NGS (Blockierungslösung) für ca. 30 Minuten präinkubiert. Daraufhin folgte die eigentliche Inkubation für mindestens 12 Stunden bei 4 °C mit 1,5 ml einer Lösung aus PBS, 0,3%TritonX-100 und 7,5 µl des monoklonalen Antikörpers gegen ADAM22 (Erstantikörper). Dies entspricht einer Antikörperkonzentration von 1:200.

*Tag 2:* Es wurden zwei jeweils 10-minütige Waschgänge in ca. 10 ml PBS durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte für 3 Stunden bei Raumtemperatur mit 1,5 ml einer Lösung aus PBS, versetzt mit Biotin-markierten Zweitantikörpern (polyklonale, gegen Immunglobuline [IgG] der Maus gerichtete Antikörper, Verdünnung 1: 250), inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten in PBS (wie oben) wurden die Schnitte in 1,5 ml einer Lösung überführt, die mit dem Enzym Peroxidase gekoppeltes Streptavidin enthielt. In dieser Lösung wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch konnten sich Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplexe (ABC-Komplexe) an den Stellen, an denen Antikörperbindung stattgefunden hatte, bilden. Der Nachweis dieser Bindungen erfolgte nach erneuten Waschungen über die Zugabe der Peroxidase-Substrate Diaminobenzidin (0,04 %) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 %) zur Waschlösung (PBS). Es wurde

dadurch in den Gewebeschnitten eine kontrollierte Färbereaktion ausgelöst, deren Intensität durch Zugabe von 0,01 % NiCl<sub>2</sub> noch verstärkt wurde. Daraus resultierte ein schwärzlich-brauner Niederschlag. War dieser deutlich sichtbar, wurde die Reaktion durch einen Transfer der Schnitte zu Aqua dest. gestoppt. Die Gewebeschnitte wurden danach auf Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet, am nächsten Tag über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 2x100 %) und Xylol dehydriert, abschließend mit nicht wasserlöslichem Einbettmedium (Eukitt) überschichtet und mit einem dünnen Deckgläschen bedeckt.

#### Gewebekulturen:

*Tag 1:* Die bereits auf Objektträger aufgezogenen und getrockneten Gewebekulturschnitte wurden zunächst für 20 Minuten mit 2 % PFA nachfixiert. Es folgte ein Waschschrift für 5 Minuten in einer mit PBS gefüllten Küvette (ca. 70 ml, unter ständigem Schütteln). Die Objektträger wurden danach in eine Feuchtkammer überführt und dort für 30 Minuten mit 400 µl Blockierungslösung überschichtet. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (250 µl pro Objektträger) für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur. Als Erstantikörper eingesetzt wurden hier: 1) monoklonale Maus-Antikörper gegen ADAM22 (Verdünnung: 1:150) oder 2) aus Kaninchen gewonnene polyklonale Antikörper gegen das menschliche c-Fos (Verdünnung: 1:500), zur Überprüfung der Wirkung von Kainsäure bzw. TTX auf die neuronale Aktivität (siehe Abschnitt 4.2.2).

*Tag 2:* Zweitantikörperbehandlung (gerichtet gegen Mausimmunglobuline für den ADAM22- und gegen Kaninchenimmunglobuline für den c-Fos-Nachweis) und Visualisierung der Antikörperbindung erfolgten im Prinzip wie oben beschrieben, wobei jedoch die auf Objektträger fixierten Kultur-Präparate stets mit den entsprechenden Lösungen überschichtet werden mussten und nicht wie die Gehirnschnitte in Lösung schwimmend behandelt werden konnten. War die Färbereaktion erfolgreich, wurden die Präparate in eine Küvette mit Aqua dest. eingestellt, anschließend wie oben beschrieben dehydriert und mit Eukitt eingebettet.

### 3.2.5.2 Immunfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunfärbungen für Lichtmikroskopie (siehe oben) dienten ausschließlich einer qualitativen Darstellung. Zum Zwecke der Quantifizierung der ADAM22-Expression im Stratum moleculare des Gyrus dentatus wurde die ADAM22-Immunreaktivität in Gewebekulturschnitten mit Hilfe von Immunfluoreszenz dargestellt. Dazu wurden Objektträger mit experimentell behandeltem Kulturgewebe folgendermaßen behandelt:

*Tag 1:* Dieser entspricht der Behandlung für die Lichtmikroskopie.

*Tag 2:* Nach 2 Waschschritten von jeweils 10 Minuten in PBS wurden die Gewebeschnitte in einer Feuchtkammer für 3 Stunden mit 400 µl/Objektträger PBS-Lösung überschichtet, welcher gegen Maus-Immunglobuline (IgG) gerichtete Zweitantikörper (Verdünnung 1:800) zugesetzt waren. Diese Zweitantikörper waren mit dem rotfluoreszierenden Farbstoff Cy3 markiert. Von diesem Schritt an wurde die Feuchtkammer abgedunkelt, um die Objektträger mit den lichtempfindlichen Antikörpern vor einfallendem Licht zu schützen. Auch die Küvetten wurden bei den nachfolgenden Waschschritten stets abgedeckt. Nach dreistündiger Inkubation folgte ein Waschschrift von 5 Minuten. Danach wurden die Objektträger für ca. 1 Minute mit 500 µl einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthaltenden Lösung (Konzentration 1:100 000 in PBS) für eine Kernfärbung überschichtet. Nach einem weiteren Waschschrift von 5 Minuten in Aqua dest. wurden die Objektträger abgedunkelt bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend mit einem - die Fluoreszenz konservierenden Einbettmedium (Dako) - eingedeckelt. Bis zur Auswertung wurden die Schnitte bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

## 3.2.6 Auswertung

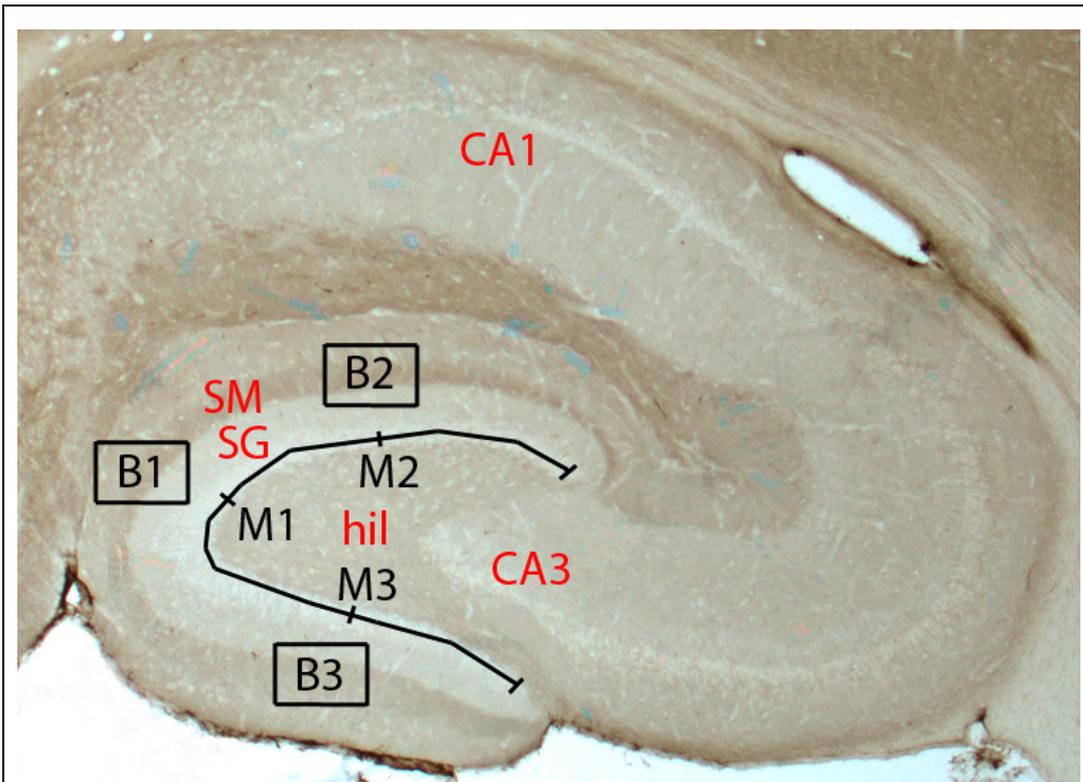
### 3.2.6.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Mit DAB angefärbte Präparate wurden unter Normalbelichtung mit einem Mikroskop der Marke „Zeiss-Axioskop“ in verschiedenen Vergrößerungen

fotografiert, die Bilder wurden auf transportablen Datenträgern abgespeichert und an geeigneten Computern mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms „Adobe Photoshop“ für die Präsentation (Arrangement, Beschriftung, etc.) bearbeitet.

### 3.2.6.2 Analyse der Immunfluoreszenz-gefärbten Gewebekulturen

Auch die für Immunfluoreszenz behandelten Präparate wurden zuerst mit dem Axioskop – unter Verwendung seiner Fluoreszenzfunktion – betrachtet. Die Gewebeschnitte wurden dabei auf Vollständigkeit und auf Gelingen der Antikörperreaktion überprüft. Gleichzeitig wurde bestimmt, welche Gewebeschnitte von A und B (jeweils gleiche Anzahl) ausgewertet werden konnten. Wichtiges Kriterium war dabei, dass die innere, mittlere und äußere Molekularschicht anhand der Färbung deutlich voneinander abzugrenzen waren. Geeignete Gewebeschnitte wurden anschließend auf dem Objektträger markiert. Es folgte die Aufnahme des Stratum moleculare des Gyrus dentatus mit dem angrenzenden Stratum granulosum mit einem konfokalen Laser Scanning Microscope (LSM) bei 600-facher Vergrößerung. Für jede Experimentreihe mussten die einzelnen Parameter wie Helligkeit, Kontrast und Aperturblende neu eingestellt werden, um bei den minimal unterschiedlich hellen Färbungen der einzelnen Experimentreihen optimale Aufnahmen machen zu können. Innerhalb einer Experimentreihe wurden diese Aufnahmeparameter allerdings stets beibehalten. Es wurden von jedem auswertbaren Gewebeschnitt 3 digitale Aufnahmen an definierten Stellen gemacht. Für diese Definition wurde das Stratum granulosum (SG) als Orientierungsstruktur benutzt. Oberhalb von dessen Mittelpunkt (M1) wurde im Stratum moleculare die erste Aufnahme (B1) gemacht. Eine weitere Halbierung der Strecke von M1 zu den jeweiligen Endpunkten des Körnerzellbandes lieferte dann Orientierungspunkte (M2, M3) für die Aufnahmen der weiteren Bilder im Stratum moleculare (B2 bzw. B3; siehe zur Erläuterung Abb. 6).



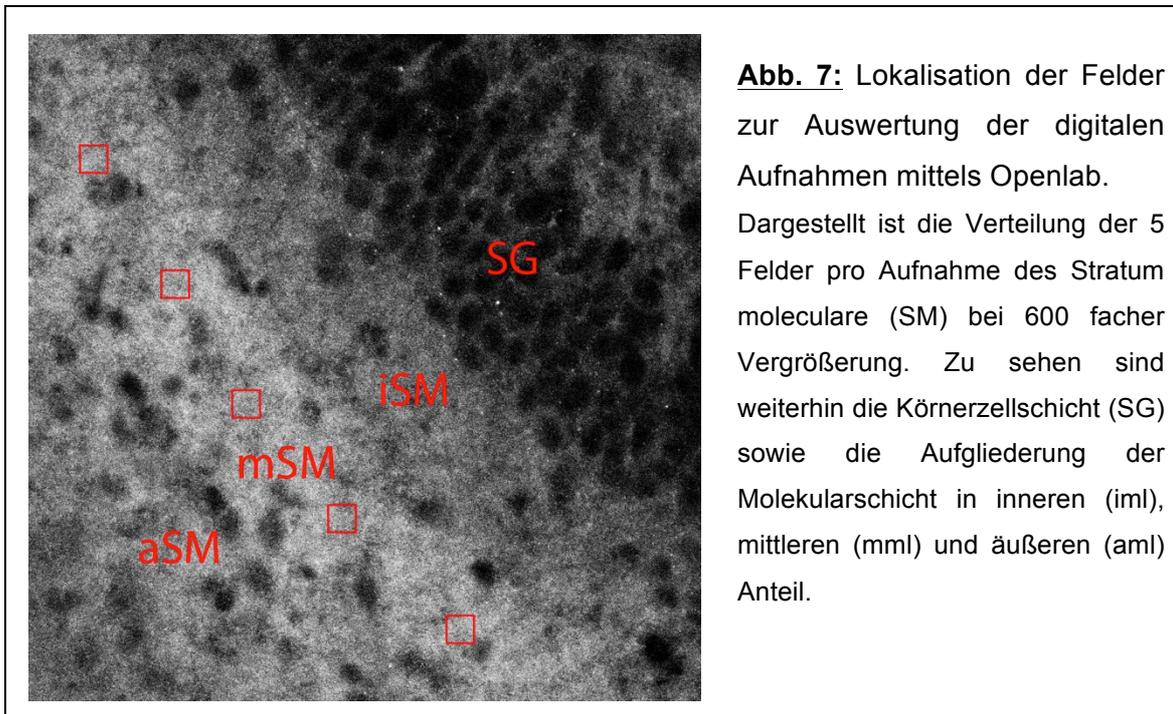
**Abb. 6:** Lokalisation der digitalen Aufnahmen.

Jede digitale Aufnahme B1-B3 wurde orientierend an den Mittelpunkten M1-M3 aufgenommen, wobei M1 die Gesamtstrecke der Körnerzellschicht halbiert und M2 und M3 wiederum die so entstandenen Hälften zu gleichen Teilen trennen.

Um die derart erhaltenen Bilder der Gewebeschnitte quantitativ auswerten zu können, wurde das Programm Openlab 3.1.5 (Improvision) auf einem Macintosh-PC (OS 9.1.) verwendet.

Es wurden von jeder der 3 Aufnahmen pro Gewebeschnitt jeweils 5 repräsentativ und gleichmäßig verteilte Felder der Größe 30x30 Pixel im mittleren Stratum moleculare (mSM) ausgewählt (Abb. 7). In jedem der somit erhaltenen 15 Felder wurde mittels Openlab 3.1.5 die Färbungsintensität, d.h. die Helligkeit, bestimmt. Die erhaltenen Werte (je heller das Bild desto höher der Wert) wurden in eine Excel-Tabelle (Excel 2000, Microsoft) übertragen und anschließend addiert. Dadurch ergab sich ein für die Färbungsintensität (Immunreaktivität) in der mittleren Molekularschicht des analysierten Gewebeschnittes repräsentativer Gesamtwert. Dieser wurde entsprechend für die Gewebeschnitte von A und B ermittelt. War sowohl für A als auch B mehr als ein Gewebeschnitt pro Objektträger auswertbar, so wurde von den erhaltenen Werten für A bzw. B

jeweils der Durchschnitt berechnet. Dieser ging als einziger, repräsentativer Wert für die untersuchte Kultur in die Statistik ein.



### 3.2.6.3 Statistik

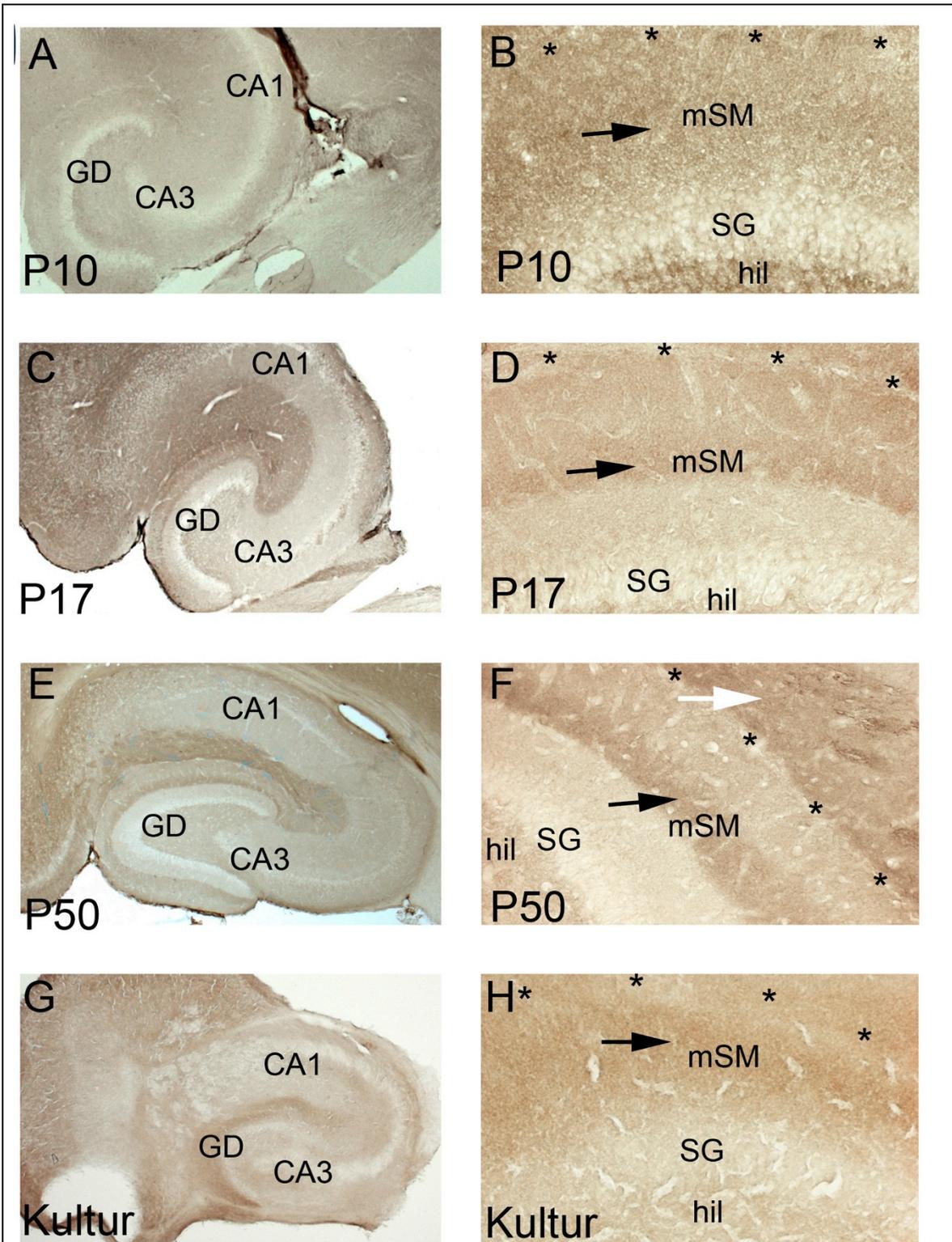
Da in dieser Arbeit in den Analysen stets Paare miteinander verglichen wurden (experimentell behandelte vs. nicht behandelte „Schwesterkultur“), konnte hier bei der statistischen Auswertung der „paired-t-Test“ angewendet werden. Bei diesem Test wird stets der Wert einer experimentell behandelten Gewebekultur nur mit dem Wert der ihr zugeordneten Kontrollkultur verglichen. Es kommt quasi bei jedem Paar zu einem „experimentelle Behandlung“ vs. „Kontrolle“-Abgleich. Die naturgemäße Variabilität, die in Kultur-Experimenten bedingt durch lokale Unterschiede in der Hippokampusarchitektur oder Schwankungen in der Handhabung der Techniken oft zu beobachten ist, wird dadurch deutlich abgemildert. Dargestellt werden die Ergebnisse folglich auch als „Prozent von der Kontrolle“. Signifikanzkriterium ist  $p \leq 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Entwicklungsabhängige Expression und spezifische Lokalisation von ADAM22 im Gyrus dentatus

Um die Frage nach der genauen Lokalisation und des altersabhängigen Expressionsmusters von ADAM22 im Gyrus dentatus zu beantworten, wurde ein immunhistochemischer Nachweis der Expression durchgeführt. Untersucht wurden dabei die Altersstufen P10, P17 sowie P50. Es fiel generell auf, dass ADAM22 im Gyrus dentatus nur sehr selektiv exprimiert wird. ADAM22-Immunreaktivität wurde in messbarem Ausmaß nur im Stratum moleculare gefunden und war dort sogar selektiv auf den mittleren Bereich – die mittlere Molekularschicht (mSM, Abb. 8D, F), die Terminationszone des medialen Tractus perforans - beschränkt.

Weiterhin ergaben diese Untersuchungen, dass die Expression von ADAM22 im Stratum moleculare mit der Entwicklung des Tieres zunimmt. So war im frühesten untersuchten Stadium, P10, noch fast keine Expression nachweisbar (Abb. 8 A, B). In den etwas älteren P17-Tieren war jedoch bereits deutlich ausgeprägte ADAM22-Immunreaktivität sichtbar (Abb. 8 C, D). Diese nahm mit der weiteren Reifung noch an Intensität zu (Abb. 8 E, F). Eine vergleichbar intensive ADAM22-Expression wurde im Hippokampus nur noch im Bereich des Stratum lacunosum-moleculare in CA1 gefunden (weißer Pfeil in Abb. 8 F).



**Abb. 8:** Entwicklungsabhängige Expressionsstärke von ADAM22.

Dargestellt ist in Frontalschnitten des Hippokampus von Ratten die mit zunehmender Entwicklungsstufe (**A, B:** P10; **C, D:** P17; **E, F:** P50; **G, H:** Gewebekultur) zunehmende Expressionsstärke von ADAM22 mit 100-facher auf der linken Seite und 600-facher Vergrößerung auf der rechten Seite.

## **4.2 Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Untersuchung der Regulation von ADAM22**

### **4.2.1 Reproduktion des Expressionsmusters von ADAM22 in entorhino-hippokampalen Gewebekulturen**

Um Regulationsmechanismen untersuchen zu können, sind *in vitro*-Systeme von großem Nutzen. Für die Untersuchung im Hippokampus haben sich dafür in früheren Studien bereits häufig organotypische Gewebekulturen des Hippokampus bewährt (Gähwiler & Hefti, 1985; Stoppini et al., 1991; Frotscher & Heimrich 1993; Heimrich & Frotscher, 1994). Um zu bestimmen, ob derartige Gewebekulturen auch für die Untersuchung von ADAM22 von Nutzen sein könnten, wurde untersucht, ob das *in vivo* gefundene Expressionsmuster auch in den Kulturen beobachtet werden kann. Da die Expression von Proteinen im Stratum moleculare häufig von der Anwesenheit des Tractus perforans abhängt, wurden in diesen Experimenten kombinierte entorhino-hippokamale Kulturen eingesetzt, in denen ein weitgehend intakter Tractus perforans vorhanden ist (Bender et al., 2007).

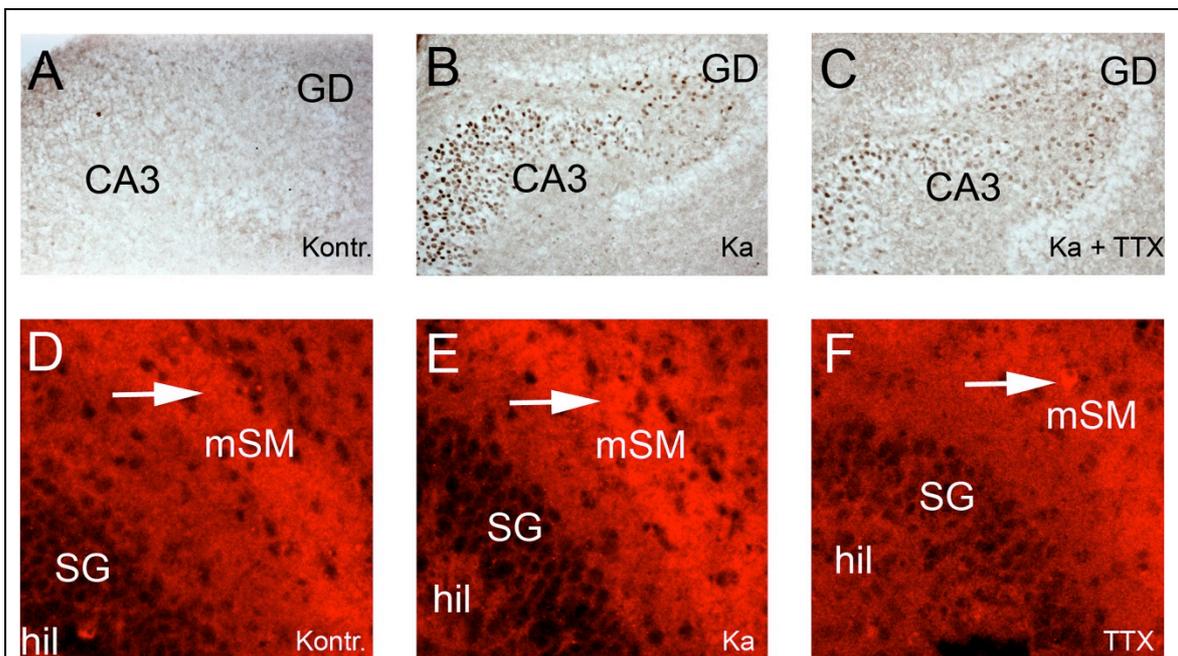
Die Kulturen wurden von 3 Tage alten Ratten angelegt und danach für 14 Tage *in vitro* belassen. Diese Zeit erlaubt es, unter anderem, durchtrennten Tractus perforans-Axonon zu regenerieren (Förster et al., 2005). Wurden die Kulturen nach Ablauf der 14 Tage fixiert und auf Expression von ADAM22 untersucht, so fand sich ein sehr ähnliches Muster wie in der *in vivo*-Situation: Intensive Immunreaktivität war vor allem im Stratum moleculare zu finden. Der übrige Hippokampus – mit Ausnahme des Stratum lacunosum-moleculare – war jedoch nahezu frei davon (Abb. 8 C, D, G, H).

Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass in organotypischen Gewebekulturen des Hippokampus mit intaktem Tractus perforans die native Expression von ADAM22 reproduziert wird.

### **4.2.2 Nachweis der neuronal stimulierenden/inhibierenden Wirkung von Kainsäure/Tetrodotoxin**

Der Tractus perforans ist eine exzitatorische Afferenz zum Gyrus dentatus, an dessen Synapsen aktivitätsabhängig physiologische und molekulare

Veränderungen eintreten (White et al., 1979; Bender et al., 2007). Angesichts der hochspezifischen Lokalisation von ADAM22 in der Terminationszone des Tractus perforans stellt sich die Frage, ob auch ADAM22 solch einer aktivitätsabhängigen Regulation unterliegt. Um zu eruieren, ob die organotypische Gewebekultur für Untersuchungen aktivitätsabhängiger Plastizität geeignet ist, wurde betrachtet, ob die Expression des unmittelbar frühen Gens („immediate early gene“) c-Fos - einem etablierten Marker für frühe neuronale Aktivität (Bullitt, 1990) - durch die Inkubation mit Kainsäure induziert bzw. durch Tetrodotoxin (TTX) reduziert wird.



**Abb. 9:** Nachweis der neuronal stimulierenden/inhibierenden Wirkung von Kainsäure/TTX.

Dargestellt ist die Auswirkung von Kainsäure (**B**) sowie Kainsäure + TTX (**C**) auf die Expression von c-Fos (einem Marker für neuronale Aktivität) im Vergleich zur Kontrolle (**A**). In **E** und **F** wird beispielhaft die Auswirkung von Kainsäure (**E**) und TTX (**F**) auf die Immunreaktivität und somit der Expressionsstärke von ADAM22 in der mittleren Molekularschicht im Vergleich zur Kontrolle (**D**) aufgezeigt.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, konnte anhand des Markers c-Fos gezeigt werden, dass die Verwendung von Kainsäure die neuronale Aktivität steigert (Abb. 9 B). Ein Effekt von TTX auf die Aktivität in unbehandelten Kontrollkulturen konnte nicht festgestellt werden, da in diesen die über c-Fos darstellbare neuronale Grundaktivität nur sehr gering war. Jedoch konnte die durch Kainsäure zuvor gesteigerte neuronale Aktivität durch eine Inkubation mit TTX deutlich reduziert

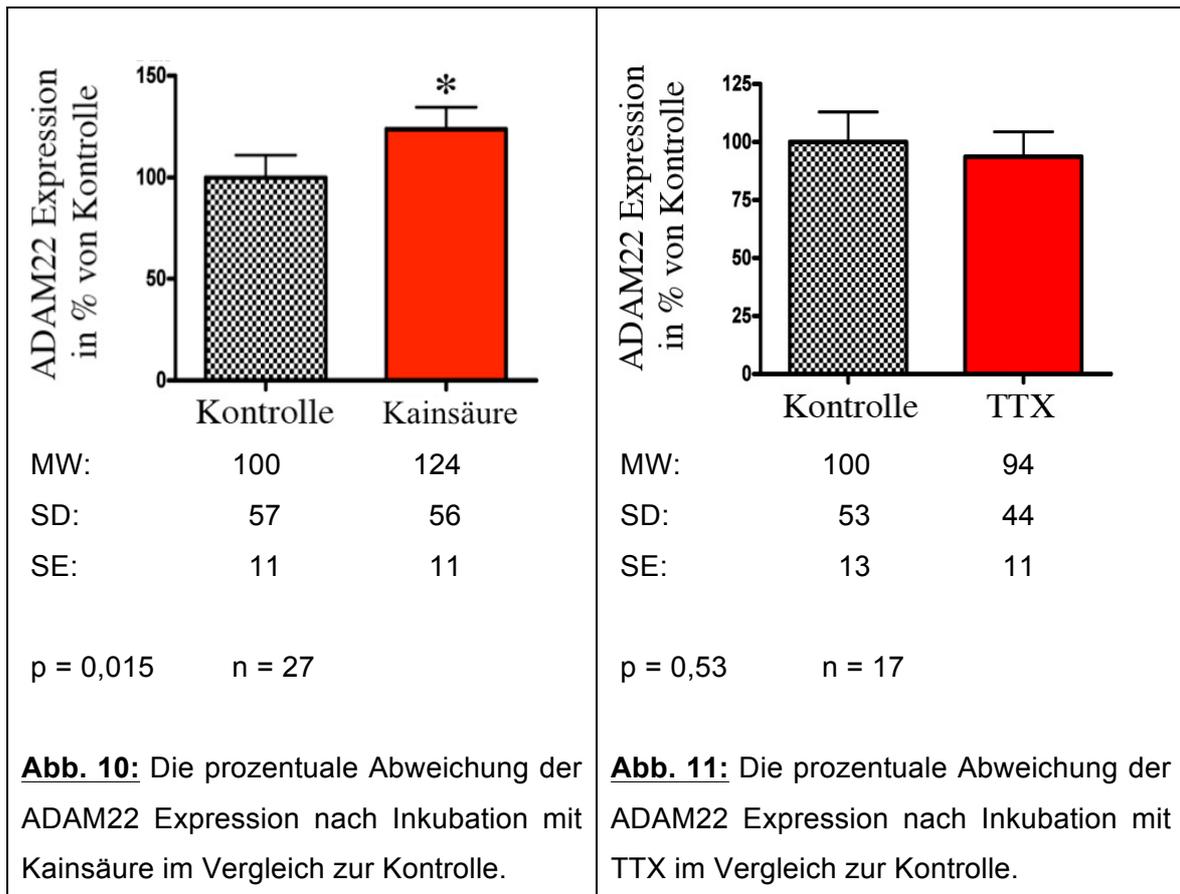
werden (Abb. 9 C), was auf eine aktivitätssenkende Wirkung des TTX rückschließen lässt.

In Abb. 9 D-F wird exemplarisch die Auswirkung der gesteigerten oder gehemmten neuronalen Aktivität durch Kainsäure (Abb. 9 E) bzw. TTX (Abb. 9 F) auf die Expression von ADAM22 im mittleren Stratum moleculare dargestellt. Im Vorgriff auf die Ergebnisse unter 4.3 ist hier bereits eine gesteigerte Expression bei Zunahme der neuronalen Aktivität und eine Abnahme der Expression bei reduzierter neuronaler Aktivität durch eine verstärkte bzw. verringerte Immunreaktivität zu erkennen.

### **4.3 Auswirkung von veränderter neuronaler Aktivität auf die Expression von ADAM22 im Stratum moleculare des Gyrus dentatus**

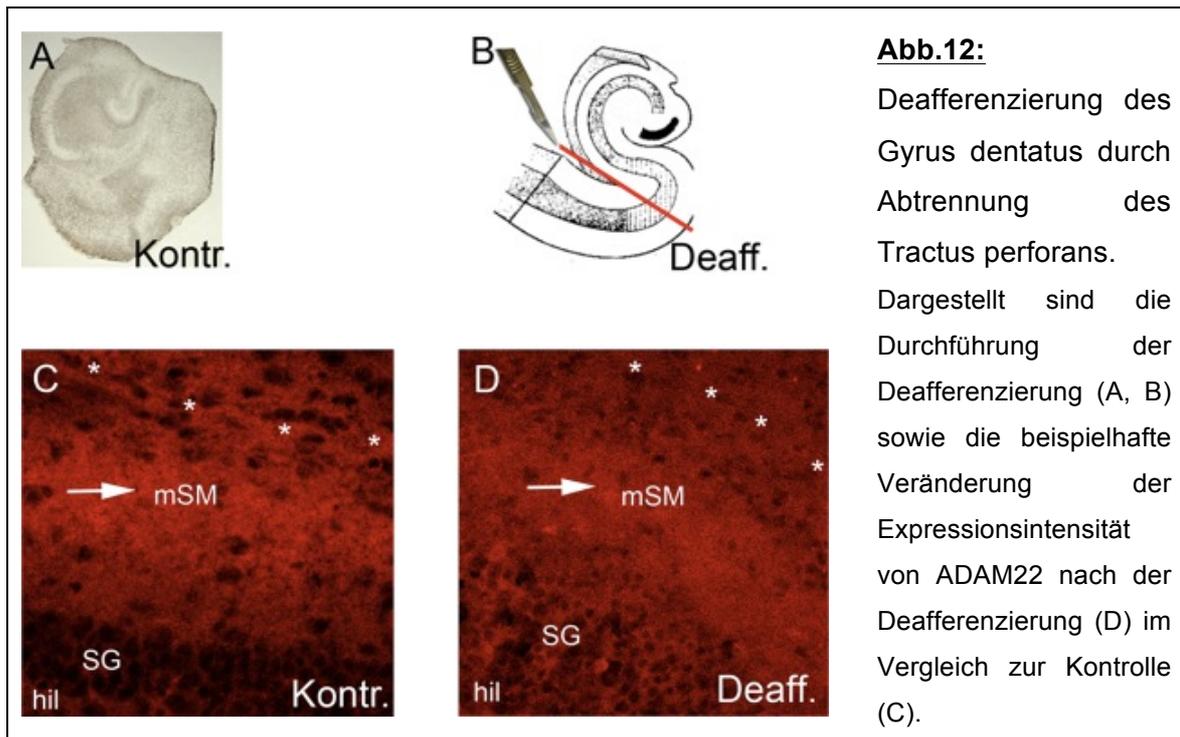
Nachdem in 4.2.2 gezeigt wurde, dass mit Kainsäure bzw. TTX die neuronale Aktivität in organotypischen Gewebekulturen moduliert werden kann, konnte mit Hilfe von diesem Modell der Einfluss veränderter neuronaler Aktivität auf die Expression von ADAM22 im Stratum moleculare des Gyrus dentatus untersucht werden. Hierbei wurde ADAM22 in den unterschiedlich behandelten organotypischen Gewebekulturen mit Antikörpern detektiert und die resultierende Immunfluoreszenz quantitativ analysiert (siehe 3.2 Methoden).

Die Ergebnisse des „paired-t-Tests“ deuten darauf hin, dass eine durch Kainsäure stimulierte Zunahme der neuronalen Aktivität und die Expressionsstärke von ADAM22 (um 24 % erhöht) positiv korrelieren (Abb.10). Dieser Befund war statistisch signifikant ( $p=0.015$ ). Hingegen war nach TTX-Behandlung keine signifikante Veränderung nachweisbar ( $p=0.53$ ), obwohl ein leichter Trend zu einer verringerten Expression (um ca. 6 %) feststellbar war (Abb.11).



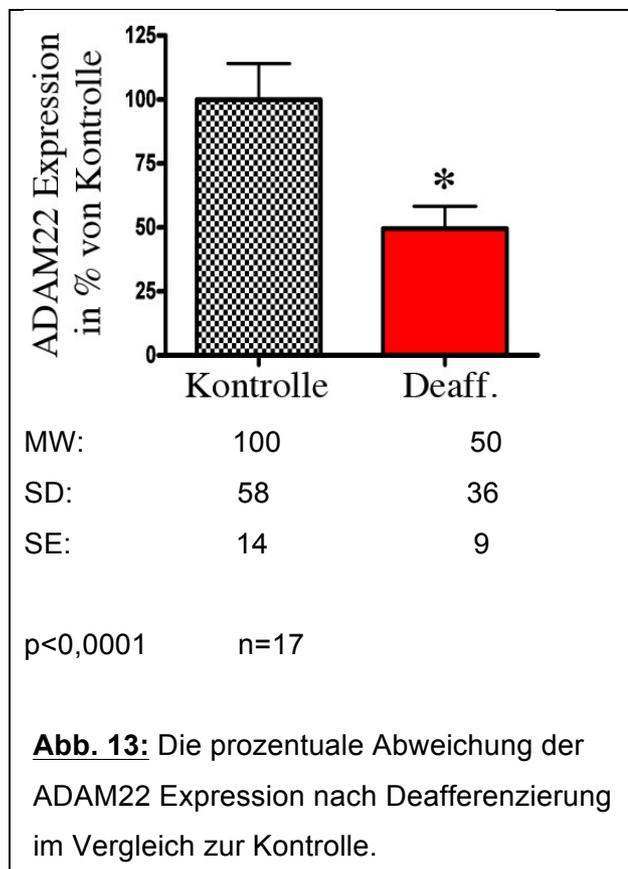
#### 4.4 Auswirkung einer Durchtrennung des Tractus perforans (Deafferenzierung) auf die Expression von ADAM22 im Stratum moleculare des Gyrus dentatus

Die Expression von Proteinen im Stratum moleculare hängt häufig von der Anwesenheit des Tractus perforans und somit von afferenten Signalen aus der Area entorhinalis ab. Um die Auswirkungen einer Deafferenzierung auf die Expressionsstärke von ADAM22 im Stratum moleculare zu untersuchen, wurde der Tractus perforans in organotypischen Gewebekulturen mittels einer feinen Nadel am 12. Tag der 14-tägigen Inkubation durchtrennt (Abb. 12 B).



Mittels einer sich anschließenden quantitativen Auswertung der Gewebekulturen (entsprechend dem vorgehen in 4.3) konnte die Auswirkung einer Deafferenzierung in einem „Paired-t-Test“ statistisch untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen mit einer deutlichen statistischen Signifikanz von  $p < 0,0001$  bei einem Stichprobenumfang von 17, dass die Deafferenzierung der Gewebekulturen negativ mit der Expressionsstärke von ADAM22 korrelieren. Hierbei kam es zu einer durchschnittlichen Reduzierung der Expressionsstärke von 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



## 5 Diskussion

Die Disintegrase und Metalloproteinase ADAM22 gilt als ein interessantes Protein mit Funktionen in der synaptischen Plastizität und transsynaptischen Interaktion über zahlreiche andere prä- bzw. postsynaptische Proteine. Diverse Arbeitsgruppen beschäftigen sich weltweit mit der Identifizierung möglicher Interaktionspartner im zentralen Nervensystem, doch über grundlegende Informationen wie den genauen Ort, die Entwicklung und die Regulation der ADAM22-Expression im Gyrus dentatus ist noch wenig bekannt. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht (1) wo genau im Gyrus dentatus ADAM22 exprimiert wird, (2) welchem Entwicklungsgradienten die Expression folgt und (3) ob die Expression durch neuronale Aktivität oder (4) eine Deafferenzierung der Molekularschicht beeinflusst wird. Die wichtigsten Resultate der Arbeit sind:

- (1) ADAM22 ist im Gyrus dentatus hochspezifisch in der mittleren Molekularschicht exprimiert.
- (2) Die Expression von ADAM22 steigt mit der Entwicklung (neuronale Reife) an.
- (3) Neuronale Aktivität im Hippokampus steigert die Expression von ADAM22.
- (4) Durch eine Deafferenzierung wird die ADAM22-Expression in der mittleren Molekularschicht um ca. 50% reduziert.

### 5.1 Die Lokalisation von ADAM22

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine spezifische Lokalisation von ADAM22 in der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus auf. Diese Schicht ist die Terminationszone des medialen Tractus perforans, dessen Axone Synapsen mit den Dendriten der Körnerzellen ausbilden. Sie entstammen von Stern- und Pyramidenzellen der Schicht II des medialen entorhinalen Cortex (Insausti et al., 1997), die im Gyrus dentatus die erste Station einer trisynaptischen Verschaltung durch den Hippokampus darstellen (Amaral & Witter, 1989). Die einzige weitere

Lokalisation an der ADAM22 durch Immunreaktivität im Hippokampus nachgewiesen werden konnte, war im Bereich des Stratum lacunosum-moleculare in CA1 (weißer Pfeil in Abb. 8 F). Dieses erhält seine Afferenzen unter anderem über Projektionen aus dem Nucleus reuniens des Thalamus (Wouterlood et al., 1990), dem infratemporalen Cortex (Yukie & Iwai, 1988) sowie direkten Faserverbindungen aus der Schicht III des entorhinalen Cortex (Steward & Scoville, 1976), letztere wird auch als temporo-ammonischer Trakt bezeichnet.

Detaillierter untersucht wurde die Expression in der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus. Hier könnte ADAM22 prä- oder postsynaptisch lokalisiert sein. Doch bislang wurde für ADAM22 vorwiegend eine Funktion auf der postsynaptischen Seite diskutiert (Snyder, 2006). So beeinflusst ADAM22 als Transmembranprotein über die PSD-95 und das Zytoskelettprotein Stargazin die synaptische Expression von AMPA Rezeptoren (Snyder, 2006). Über die Steigerung der Expression der postsynaptischen AMPA Rezeptoren durch den Liganden/Rezeptor-Komplex aus Lgi1 und ADAM22 kommt es darüber hinaus zu einer Verstärkung der synaptischen Transmission (Fukata et al., 2006). Neuere Ergebnisse von Ogawa et al. (2010), welche zeigen, dass ADAM22 und Kv1.2 präsynaptische Komplexe im Cerebellum bilden, lassen jedoch prinzipiell auch eine präsynaptische Lokalisation im Gyrus dentatus möglich erscheinen. Um die Frage zu untersuchen, welche Lokalisation in der Molekularschicht vorherrscht, wurde in der vorliegenden Arbeit der Tractus perforans durchtrennt, die Körnerzellendriten somit deafferenziert. Bei einer vorwiegend präsynaptischen Expression von ADAM22 sollte diese Deafferenzierung zu einem Verlust der Immunreaktivität in der Molekularschicht führen, da die durchtrennten Axone degenerieren. Umgekehrt würde man annehmen, dass eine postsynaptische Expression von ADAM22 von der Deafferenzierung nur wenig beeinträchtigt wird. Der Befund einer 50 % Reduktion nach Deafferenzierung legt tatsächlich eine substantielle präsynaptische Expression von ADAM22 nahe. Das positive Resultat einer in einer begleitenden Studie durchgeführten Co-Immunopräzipitation von ADAM22 und ausschließlich präsynaptisch (bzw. axonal) exprimierten Kalium-Kanälen vom Kv1.2-Typus, stützt diese These (Kohrs et al., 2010; siehe dazu auch 5.2). Allerdings deuten die verbleibenden 50 % auch auf eine, wie von Snyder et al. (2006) vermutete, postsynaptische Komponente hin.

Etwas erschwert wird die Interpretation der Daten weiterhin durch den gleichzeitigen Befund einer aktivitätsabhängigen Regulierung der ADAM22-Expression. Denn aufgrund einer Durchtrennung der Axone wird die Aktivität auf der postsynaptischen Seite reduziert, was zu einer Expressionsminderung von ADAM22 führen könnte. Tatsächlich wurde die Notwendigkeit von neuronaler Aktivität für postsynaptische Prozesse in der Molekularschicht schon gezeigt (Drakew et al., 1999). Die Befunde dieser Arbeit lassen somit keine abschließende Beurteilung über die Frage nach einer prä- oder postsynaptischen Lokalisation von ADAM22 zu. Sie sprechen am ehesten für eine Expression sowohl auf der prä- wie der postsynaptischen Seite. Vollständig geklärt werden kann dies jedoch nur durch elektronenmikroskopische Studien, die bislang auf Grund des Fehlens dafür geeigneter Antikörper noch nicht erfolgreich waren.

## **5.2 Die entwicklungsabhängige Expression von ADAM22 im Gyrus dentatus**

Die entwicklungsabhängige Veränderung der Expressionsstärke von ADAM22 im Gyrus dentatus ist mit Sicherheit einer der bisher am wenigsten untersuchten Aspekte.

In 4.1 konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke im mittleren Stratum moleculare des Gyrus dentatus mit dem Alter zunimmt (Abb. 8). So ist erkenntlich, dass in dem frühesten untersuchten Stadium P10 noch fast keine Expression nachweisbar ist (Abb. 8 A, B). Im P17 Stadium ist bereits eine prägnante Expression sichtbar (Abb. 8 C, D), welche im Stadium P50 sogar noch weiter zunimmt (Abb. 8 E, F).

Vom Gyrus dentatus ist bereits aus frühen Studien bekannt, dass die Neurogenese (Altman, 1966; Altman & Bayer, 1975; Kempermann et al., 2004) und synaptische Reifung (Tamamaki, 1999) insbesondere postnatalen Einflüssen unterliegen. Hierbei lassen sich sowohl für funktionell eher unreife als auch für eher reife Synapsen spezifische Strukturen identifizieren. So wurde für HCN1 gezeigt, dass eine postnatal zunächst hohe Expression mit zunehmender

synaptischer Reifung zurückgeht (Bender et al., 2007) und somit HCN1 im Gyrus dentatus als charakteristischer und wichtiger Bestandteil für unreife Synapsen angesehen werden kann.

Für ADAM22 lässt sich aufgrund der zunehmenden Expression in der mittleren Molekularschicht eine entgegengesetzte Funktionalität annehmen. Vermutlich ist ADAM22 ein wichtiger Bestandteil reifer Synapsen und verhält sich daher reziprok zu der entwicklungsabhängigen Expressionsänderung von zum Beispiel HCN1.

Interessanterweise korreliert der Entwicklungszeitverlauf von ADAM22 mit dem Zeitverlauf des präsynaptisch exprimierten Kaliumkanals Kv1.2, der im Tractus perforans altersabhängig exprimiert wird (Klapetke, 2012). Cerebelläre Interaktionen von ADAM22 und Kv1.2 wurden nachgewiesen (Ogawa et al., 2010). Präliminäre Daten aus unserem Labor deuten tatsächlich darauf hin, dass ADAM22 und Kv1.2 auch im Gyrus dentatus direkt interagieren und dass diese Interaktion mit dem Entwicklungsstand zunimmt (Kohrs et al., 2010).

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen mit ADAM22-defizienten (Knockout) Mäusen, so fällt auf, dass Symptome wie Ataxie, Krampfanfälle und reduziertes Körpergewicht insbesondere nach der Entwicklungsstufe P10 auftreten. Alle Homozygoten verstarben, vermutlich aufgrund von Krampfanfällen, vor der Entwicklungsstufe P20. Es konnten jedoch lichtmikroskopisch keine phänotypischen Unterschiede zwischen den cerebellären und hippokampalen Strukturen von Knockout-Mäusen und Wildtypen gefunden werden. Weiterhin fiel bei einer histopathologischen Analyse eine periphere Hypomyelinisierung von Nervus ischiadicus und Nervus trigeminus bei normaler spinaler Myelinisierung auf (Sagane et al., 2005). Wie zuvor diskutiert (siehe 5.1), spielt ADAM22 somit auch in Axonen eine wichtige Rolle. Bezieht man die schnellere Entwicklung von Mäusen im Vergleich zu Ratten mit ein, könnte vermutet werden, dass die Symptome der Knockout-Mäuse zu dem Zeitpunkt auftreten, zu dem ADAM22 vermehrt exprimiert werden müsste.

Es wurde bereits in 2.2.4 und 2.3.2 erwähnt, dass ADAM22 als Rezeptor für den als antiepileptisch wirkenden Liganden Lgi1 (Kalachikov et al., 2002) gehandelt wird (Sagane et al., 2008). Vergleichbar mit den Ergebnissen aus den

Untersuchungen mit den Knockout Mäusen für ADAM22 kam es bei den Versuchen mit Knockout Mäusen für Lgi1 bei fast allen Versuchstieren zum Tod durch Krampfanfälle bis zur Entwicklungsstufe P20 (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010).

Es ließe sich die Hypothese aufstellen, dass der Mangel an ADAM22 in der Hippokampusformation zwar zu keiner lichtmikroskopisch nachweisbaren strukturellen Veränderung führt, aber ebenso wie der Mangel an Lgi1 in einer Beeinträchtigung von funktionell bedeutsamer intersynaptischer Transaktion und Signaltransduktion resultiert. Diese Beeinträchtigung äußert sich in progredienten Krampfanfällen bei zunehmender Reife, welche bis zu der Entwicklungsstufe P20 tödlich sind. Die mit der Reife der Versuchstiere zunehmende Letalität steht offenbar in einem Zusammenhang mit der nicht vorhandenen und ansonsten physiologisch mit dem Alter zunehmenden Expression von ADAM22.

### **5.3 Regulation der Expression von ADAM22 im Gyrus dentatus in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität**

Es ist bekannt, dass die Aktivität spannungsmodulierender, präsynaptischer Ionenkanäle, wie z. B. der HCN-Kanäle (Bender et al., 2007), durch neuronale Aktivität plastisch verändert werden kann. Präsynaptisch lokalisierte HCN1-Kanäle finden sich im Tractus perforans von Ratten insbesondere in frühen Entwicklungsstadien und ihre Expressionsdichte nimmt mit zunehmendem Alter der Tiere ab. Das heißt, ihre Expression verhält sich im Tractus perforans reziprok zur Expression von Kv1.2 (Klapetke, 2012) bzw. ADAM22. Da sowohl die Expression von HCN1 (Bender et al., 2007) als auch die von Kv1.2 (Klapetke, 2012) durch neuronale Aktivität reguliert wird, könnte neuronale Aktivität hier ein wichtiger Entwicklungsfaktor sein, der mit zunehmender Reife die Expression von Kv1.2 fördert und die von HCN1 gleichzeitig hemmt. Das Resultat wären veränderte Eigenschaften der Tractus perforans-Synapsen.

Ob ein solcher Mechanismus auch für ADAM22 eine Rolle spielt, wurde hier untersucht. Diese Fragestellung wurde insbesondere interessant, nachdem die

Assoziation von ADAM22 zu Lgi1 (Sagane et al., 2008) und somit der „autosomal dominanten fokalen Epilepsie mit auditiven Symptomen“ (engl.: „autosomal dominant partial epilepsy with auditory features“- ADPEAF), einer Form der nicht progressiven lateralen Temporallappenepilepsie (TLE), bekannt wurde (Kalachikov et al., 2002). Aktivitätsinduzierte Änderungen der ADAM22-Expression könnten somit - über die Vermittlung von Lgi1 - die Entstehung einer Epilepsie fördern.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit einer durch Kainsäure stimulierten neuronalen Aktivität ergaben bei einem statistisch signifikanten Niveau eine mittlere Steigerung der Expression von ADAM22 um ca. 24 %. Von einer positiven Korrelation von neuronaler Aktivität und ADAM22 Expression in dem mittleren Stratum moleculare ist also auszugehen. Ob die neuronale Aktivität allerdings zu einer verstärkten Proteinbiosynthese von ADAM22 oder zu einer Konzentration von bereits im Zytoplasma vorhandenen ADAM22-Proteinen in der mittleren Molekularschicht führt, ist durch diese Untersuchung nicht zu unterscheiden. Aktivitätsinduzierte (postsynaptische) Anreicherungen/Konzentration von Proteinen in der mittleren Molekularschicht sind nach Stimulation des Tractus perforans beschrieben worden (Miroci et al., 2012). Es wäre denkbar, dass durch eine gesteigerte Expression (oder Konzentration) von ADAM22 in dieser Schicht auch die postsynaptische Expression von AMPA-Rezeptoren und damit die synaptische Transmission langfristig im Sinne einer LTP erhöht wird (Snyder, 2006).

Bei der durch TTX vermittelten Inhibierung neuronaler Aktivität wurde trotz einer erkennbaren Tendenz kein statistisch signifikanter Wert gefunden. Dennoch ist bei einer durchschnittlichen Verminderung der Expression von ADAM22 um 6 % eine negative Korrelation nicht auszuschließen. Es könnte sein, dass die neuronale Grundaktivität in den hippokampalen Gewebekulturen bereits so gering gewesen ist, dass die Behandlung mit TTX die neuronale Aktivität nicht wesentlich weiter senken konnte. Somit wäre denkbar, dass eine abnehmende neuronale Aktivität auch zu einer Reduzierung der Expression von ADAM22 in dem mittleren Stratum moleculare führt, dass allerdings bei dieser speziellen Fragestellung und Methodik die Veränderung der neuronalen Aktivität durch TTX keinen ausreichenden, die

Expression signifikant verändernden, Unterschied zu der neuronalen Grundaktivität der Kontrollgruppe darstellte. So fällt bei der Betrachtung der Abbildung 9 C auf, dass die durch Kainsäure induzierte neuronale Aktivität durch TTX zwar deutlich reduziert wird, die in Abbildung 9 A dargestellte neuronale Grundaktivität aber bereits so gering ist, dass sie vermutlich durch TTX nicht wesentlich weiter gesenkt werden konnte (Abb.9 A,C). Es lässt sich durch diese Ergebnisse keine Aussage bzgl. der Auswirkung einer verminderten neuronalen Aktivität auf die Expressionsveränderung von ADAM22 im Sinne einer LTD machen. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, würde es sich eventuell anbieten *in vivo* Untersuchungen mit Ratten durchzuführen.

#### **5.4 Funktionelle Aspekte von ADAM22**

Metalloproteinasen bilden eine Gruppe von Enzymen, welche wichtige Funktionen in der Zell-Matrix Interaktion ausfüllen. Die ADAM-Proteine sind eine Subfamilie (M12B Adamalysin Protease Subfamilie nach der MEROPS Klassifikation) der Gruppe der Metalloproteinasen und faszinierend vielseitige Transmembran- und Sekretproteine von jeweils ungefähr 750 Aminosäuren (Rawlings et al., 2010). Sie spielen über die Beeinflussung der Adhäsion und Migration der Zellen, über die proteolytische Prozessierung von auf der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptoren und über die Interaktion mit Signaltransduktionsmolekülen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellphänotyps. Alle bekannten Proteine der ADAM Subfamilie besitzen eine Metalloproteinase-Domäne, doch bei einigen ist sie katalytisch inaktiv, z. B. bei ADAM22. Bei den ADAM Proteinen mit katalytisch inaktiver Metalloproteinase wird insbesondere eine Protein-Protein Interaktionsfunktion postuliert (Edwards et al., 2008). Dies bestätigt sich für ADAM22 einerseits in der Komplexbildung mit Kv1.2 (Ogawa et al., 2010) und andererseits in der Rezeptorfunktion für Lgi1 (Snyder, 2006). Gezeigt werden konnte zudem (wie in 5.3 dargestellt) eine dynamische Beeinflussung der Expressionsstärke durch neuronale Aktivität.

Die Krankheiten, die mit ADAM22 assoziiert sind, lassen sich am besten über die Betrachtung der Knockout-Mäuse beschreiben und verstehen. Wie bereits

erwähnt, wurden bei diesen Untersuchungen eine vermutlich todesursächliche Epilepsie, eine periphere Hypomyelinisierung und eine Ataxie beschrieben (Sagane et al., 2005).

ADAM22 ist als Rezeptor für Lgi1 anzusehen, und eine Mutation im Gen für Lgi1 kann eine „autosomal dominante fokale Epilepsie mit auditiven Symptomen“ (engl.: „autosomal dominant partial epilepsy with auditory features“- ADPEAF), eine Form der nicht progressiven lateralen Temporallappenepilepsie (TLE), auslösen (Fukata et al., 2006). Es scheint also nicht verwunderlich, dass eine „künstliche“ Mutation für ADAM22 - nämlich ein Knockout des kodierenden Gens - auch Epilepsien hervorruft. Da nur etwa die Hälfte aller Patienten mit dieser Form der Epilepsie eine Mutation im Gen für Lgi1 haben, wurde vermutet (wie bereits in 5.3 diskutiert), dass ADAM22 ebenfalls ursächlich sein könnte. Allerdings wurden bei genetischen Analysen der Patienten ohne Mutation im Gen für Lgi1 keine krankheitsauslösenden Mutationen im Gen für ADAM22 gefunden (Chabrol et al., 2007; Diani et al., 2008). Somit erwies sich, dass ADAM22 zwar unter Laborbedingungen aber nicht unter klinischen Bedingungen eine Epilepsie auslösen kann. Es ist allerdings gut möglich, dass Mutationen anderer Proteine, welche mit ADAM22 und dessen Signaltransduktion assoziiert sind, ursächlich sein könnten. Von Interesse waren hier bei bisherigen Untersuchungen insbesondere Kv1 und die Kv $\beta$ 1 Untereinheit, doch auch hier konnte keine Mutation gefunden werden (Diani et al., 2008).

Aus pathophysiologischer Sicht scheint noch nicht ganz verstanden, wie eine gestörte Signalweiterleitung durch eine Mutation in Lgi1 eine Epilepsie hervorrufen kann. Denn bei einer durch mangelndes Lgi1 reduzierten ADAM22 Stimulation wird zwar die Expression von AMPA-Rezeptoren beeinflusst, allerdings vermutlich nach unten reguliert. Dies sollte eigentlich zu einer reduzierten synaptischen Transmission führen. Es wirft sich hier die Frage auf, ob dieser Mechanismus nur im Stratum moleculare des Gyrus dentatus greift oder eventuell auch im Stratum lacunosum-moleculare in CA1, in welchem von uns eine ADAM22 Expression gefunden (siehe 4.1) und eine Lgi1 Expression ebenfalls belegt wurde (Schulte et al., 2006). Interessant wäre es hier bei den von Epilepsie betroffenen Patienten zu untersuchen, wie die Signalweiterleitung zwischen Lgi1 und ADAM22 in den inhibitorischen Interneuronen, auf welche der temporo-ammonischen Trakt

exzitatorisch wirkt (Lacaille & Schwartzkroin, 1988; Soltesz & Deschenes, 1993; Empson & Heinemann, 1995a,b; Soltesz & Jones, 1995), beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Lgi1 defizitäre Mäuse eine neuronale Hyperexzitabilität in CA1 bei zeitgleicher Epilepsie haben (Yu et al., 2010). Es könnte sein, dass es hier zu einer dauerhaft gestörten und mangelnden Inhibierung der Pyramidenzellen in CA1 und somit zu epileptiformen Störungen kommt.

Vor dem Hintergrund, dass es sich bei der ADPEAF um eine TLE mit auditiven Symptomen handelt, ist es sicherlich bemerkenswert, dass in der Embryogenese der Cochlea von Hühnern eine deutliche ADAM22 Expression im Ganglion cochleare gefunden wurde (Yan et al., 2010). Es könnte sein, dass hier der Schlüssel zu der Erklärung der gleichzeitigen epileptischen und auditiven Symptome liegt, denn wie in 5.2 diskutiert ist ADAM22 vermutlich wichtiger Bestandteil funktionell reifer synaptischer Transmission.

Neben den zuvor beschriebenen Pathologien des ZNS weist die bei Knockout-Mäusen gefundene periphere Hypomyelinisierung von Nervus ischiadicus und Nervus trigeminus auch auf eine wichtige Rolle von ADAM22 im peripheren Nervensystem hin. So konnte gezeigt werden, dass ADAM22 mit Lgi4 interagiert und eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Schwann-Zellen spielt, welche für die Myelinisierung peripherer Nerven verantwortlich sind. Durch mangelnde Expression von ADAM22 konnten sich die Schwann-Zellen also anscheinend nicht weiter als bis zu den Vorläuferzellen differenzieren (Özkaynak et al., 2010). Ob allerdings ADAM22 tatsächlich ursächlich für gewisse Formen der peripheren Neuropathie ist, müssen weitere Untersuchungen klären. Es könnte sein, dass ADAM22 lediglich im Zusammenhang eines komplexen Systems aus sich gegenseitig beeinflussenden Proteinen steht, von denen ein bisher nicht identifiziertes Protein ursächlich ist.

Weiterhin scheint ADAM22 auch in Gliazellen des ZNS eine Rolle zu spielen. So fehlt eine Expression von ADAM22 in Glioblastomen (Astrozytom Grad IV). *In vitro* wurde jedoch gezeigt, dass ADAM22 die Proliferation der Astrozyten von Glioblastomen unterdrücken kann. Hierbei scheint die Disintegrin-Domäne von

ADAM22 mit spezifischen Integrinen auf der astrozytären Oberfläche zu interagieren (D'Abaco et al., 2006).

ADAM22 scheint also in diversen pathologischen Prozessen eine interessante Position einzunehmen und unsere Ergebnisse bezüglich einer Rolle in funktionell reifer synaptischer Transmission und erhöhter Expression bei neuronaler Aktivität eröffnen zahlreiche interessante Fragestellungen, welche in weitergehenden Studien untersucht werden können.

## 6 Zusammenfassung

Der Hippokampus erfährt seit Bekanntwerden seiner zentralen Rolle in Gedächtniskonsolidierung und Lernprozessen ein besonderes Interesse in der neurobiologischen Forschung. Physiologische Grundlage dieser Funktionen ist eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Plastizität, welche an den Synapsen des hippocampalen Schaltkreises zu beobachten ist. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die Disintegrase und Metalloproteinase ADAM22 als ein Modulator dieser synaptischen Plastizität - insbesondere im Gyrus dentatus - angesehen werden muss.

Über den genauen Ort, die Entwicklung und die Regulation der ADAM22-Expression im Gyrus dentatus ist jedoch noch wenig bekannt. Hintergrund und Motivation dieser Dissertation war es daher zu untersuchen, (1) wo genau im Gyrus dentatus ADAM22 exprimiert wird, (2) welchem Entwicklungsgradienten die Expression folgt und (3) ob die Expression durch neuronale Aktivität oder (4) axonale Afferenzen beeinflusst wird. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden immunhistochemische Untersuchungen an den Gehirnen von Ratten verschiedener Altersstufen sowie an einem Kulturmodell (organotypische Gewebekultur) durchgeführt.

Die wichtigsten Resultate der Dissertation sind:

- (1) ADAM22 ist im Gyrus dentatus hochspezifisch in der mittleren Molekularschicht exprimiert.
- (2) Die Expression von ADAM22 steigt mit der Entwicklung (neuronale Reife) an.
- (3) Neuronale Aktivität im Hippokampus steigert die ADAM22-Expression.
- (4) Eine Deafferenzierung reduziert die ADAM22-Expression.

Die Untersuchungen zeigen somit, dass ADAM22 ein insbesondere durch neuronale Aktivität dynamisch reguliertes Enzym ist, welches verstärkt in funktionell reifen Synapsen exprimiert wird. Eine fehlerhafte Regulation dieser Expression scheint mit zahlreichen komplexen Pathologien, wie z. B. der Temporallappenepilepsie, Ataxie oder mit Glioblastomen, assoziiert zu sein.

## 7 Abbildungsverzeichnis

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <u>Abb. 1:</u>  | Aufbau des Hippokampus mit trisynaptischem Schaltkreis.....  | 6  |
| <u>Abb. 2:</u>  | Neuronale Verschaltung in der Molekularschicht des Gyrus dentatus.....   | 8  |
| <u>Abb. 3:</u>  | Struktureller Aufbau und Domänen der ADAM Familie.....   | 10 |
| <u>Abb. 4:</u>  | ADAM22 und seine Rolle in der Signaltransduktion.....  | 12 |
| <u>Abb. 5:</u>  | Deafferenzierung des Gyrus dentatus durch Durchtrennung des<br>Tractus perforans <i>in vitro</i> .....             | 22 |
| <u>Abb. 6:</u>  | Lokalisation der digitalen Aufnahmen. ....   | 28 |
| <u>Abb. 7:</u>  | Lokalisation der Felder zur Auswertung der digitalen Aufnahmen<br>mittels Openlab. ....                            | 29 |
| <u>Abb. 8:</u>  | Entwicklungsabhängige Expressionsstärke von ADAM22. ....   | 31 |
| <u>Abb. 9:</u>  | Nachweis der neuronal stimulierenden/inhibierenden Wirkung<br>von Kainsäure/TTX.....                               | 33 |
| <u>Abb. 10:</u> | Die prozentuale Abweichung der ADAM22 Expression nach Inkubation<br>mit Kainsäure im Vergleich zur Kontrolle. .... | 35 |
| <u>Abb. 11:</u> | Die prozentuale Abweichung der ADAM22 Expression nach<br>Inkubation mit TTX im Vergleich zur Kontrolle. ....       | 35 |
| <u>Abb. 12:</u> | Deafferenzierung des Gyrus dentatus durch Abtrennung des<br>Tractus perforans. ....                                | 36 |
| <u>Abb. 13:</u> | Die prozentuale Abweichung der ADAM22 Expression nach<br>Deafferenzierung im Vergleich zur Kontrolle.....          | 36 |

## 8 Literaturverzeichnis

### 8.1 Publikationen

Altman J (1966)

*Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions.* J. Comp. Neurol., 128:431-474.

Altman J, Bayer SA (1975)

*Postnatal development of the hippocampal dentate gyrus under normal and experimental conditions.* Isaacson RL & Pribram KH (Eds.), The Hippocampus, Vol. 2. Plenum Press, New York, pp.95-122.

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007)

*The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies).* Prog Brain Res 163:3-22, 2007.

Amaral DG, Witter MP (1989)

*The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data.* Neuroscience, 31, 571-591.

Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK (1971)

*Lamellar Organization of Hippocampal Excitatory Pathways.* Exp. Brain Res. 13,222-238(1971).

Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997)

*Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation.* Science 276, 2042 - 2045.

Bender RA, Kirschstein T, Kretz O, Brewster AL, Richichi C, Rüschemidt C, Shigemoto R, Beck H, Frotscher M, Baram TZ. (2007)

*Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation.* J Neuroscience: 27(17):4697-706.

Benninghoff A:

*Taschenbuch Anatomie.*

Urban & Fischer, München 2007, S. 474-477

Blobel CP (1997)

*Metalloprotease-disintegrins: Links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch.* Cell 90, pp. 589–592.

Bramham CR (2007)

*Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications.* Prog. Brain Res 163: 453-471.

Broca, P (1878)

*Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grand lobe limbique.* Rev. Anthropol. 1878;1:385–498.

Bullit E (1990)

*Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat.* J Comp Neurol. 1990 Jun 22;296(4):517-30.

Cao Y, Kang Q, Zolkiewska A (2002)

*Intracellular processing of metalloprotease disintegrin ADAM12.* J. Biol. Chem. 277 (29), 26403-26411.

Chabrol E, Gourfinkel-An I, Scheffer IE, Picard F, Couarch P, Berkovic SF, McMahon JM, Bajaj N, Mota-Vieira L, Mota R, Trouillard O, Depienne C, Baulac M (2007)

*Absence of mutations in the Lgi1 receptor ADAM22 gene in autosomal dominant lateral temporal epilepsy.* Epilepsy Res. 2007 Aug;76(1):41-8.

Chabrol E, Navarro V, Provenzano G, Cohen I, Dinocourt C, Rivaud-Péchoux S, Fricker D, Baulac M, Miles R, Leguern E, Baulac S (2010)

*Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice.* Brain. 2010 Jul 21.

Collingridge GL, Herron CE, Lester RA (1988)

*Frequency-dependent N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus.* J Physiol. 1988 May;399:301–312.

- D'Abaco GM, Ng K, Paradiso L, Godde NJ, Kaye A, Novak U (2006)  
*ADAM22, expressed in normal brain but not in high-grade gliomas, inhibits cellular proliferation via the disintegrin domain.* *Neurosurgery* 58 (1), 179-186.
- Denac H, Mevissen M, Scholtysik G (2000)  
*Structure, function and pharmacology of voltage gated sodium channels.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:453–479.
- Diani E, Di Bonaventura C, Mecarelli O, Gambardella A, Elia M, Bovo G, Bisulli F, Pinaridi F, Binelli S, Egeo G, Castellotti B, Striano P, Striano S, Bianchi A, Ferlazzo E, Vianello V, Coppola G, Aguglia U, Tinuper P, Giallonardo AT (2008)  
*Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: absence of mutations in ADAM22 and Kv1 channel genes encoding Lgi1-associated proteins.* *Epilepsy Res* 80:1–8.
- Drakew A, Frotscher M, Heimrich B (1999)  
*Blockade of neuronal activity alters spine maturation of dentate granule cells but not their dendritic arborization.* *Neuroscience.* 94(3):767-774.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008)  
*The ADAM metalloproteinases.* *Mol. Aspects Med.* 29 (5): 258–89.  
doi:10.1016/j.mam.2008.08.001. PMID 18762209.
- Empson RM & Heinemann U (1995a)  
*Perforant path connections to area CA1 are predominantly inhibitory in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice preparation.* *Hippocampus* 5, 104-107.
- Empson RM & Heinemann U (1995b)  
*The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice.* *J.Physiol. Lond.* 484, 707-729.
- Förster E, Bartos M, Zhao S (2005)  
*Hippocampal Slice Culture.* Poindron P, Piguët P, Förster E (eds): *New Methods for Culturing Cells from Nervous Tissues.* Bio Valley Monogr. Basel, Karger, 2005, vol 1, pp 1-11.
- Förster E, Zhao S, Frotscher M (2006)  
*Laminating the hippocampus.* *Nature Reviews Neuroscience* 7, 259-268 (April 2006).

Frotscher M, Heimrich B (1993)

*Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 90,10400-10403.

Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M (2006)

*Epilepsy-related ligand/receptor complex Lgi1 and ADAM22 regulate synaptic transmission.* Science. 2006;313:1792–1795.

Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, Shigemoto R, Nicoll RA, Fukata M (2010)

*Disruption of Lgi1–linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 February 23; 107(8): 3799–3804.

Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E (1995)

*Increased phosphorylation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation.* J. Biol. Chem. 270, 6119-6124.

Gähwiler BH, Hefti F (1985)

*Striatal acetylcholinesterase-containing interneurons innervate hippocampal tissue in co-cultured slices.* Brain Res. 1985 Feb;350(1-2):311-4.

Godde NJ, D'Abaco GM, Ng K, Paradiso L, Novak U (2006)

*Efficient ADAM22 surface expression is mediated by phosphorylation-dependant interaction with 14-3-3 protein family members.* J. Cell Sci. 119 (Pt16), 3296- 3305.

Heimrich B, Frotscher M. (1994)

*Slice cultures as a tool to study neuronal development and the formation of specific connections.* Neuroscience Protocols 94-030-05-01-09.

Howard L, Maciewicz RA, Blobel CP (2000)

*Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28.* Biochem. J. 348 (Pt1), 21-267.

Insausti R, Herrero MT, Witter MP (1997)

*Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents.* Hippocampus, 1997. 7(2): p. 146-83.

Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Boneschi FM, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R, Gilliam TC (2002)

*Mutations in Lgi1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features.* Nat Genet. 2002;30:335–341.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004)

*Milestones of neuronal development in the adult hippocampus.* Trends Neurosci., 27:447-452.

Klapetke H (Dissertation eingereicht 2012)

*Untersuchungen zur Expression präsynaptisch lokalisierter Kalium-Kanäle im Tractus perforans.*

Kohrs S, Klapetke H, Wilkers W, Bender R (2010)

*ADAM22 and Kv1.2 are co-expressed and interact in the molecular layer of dentate gyrus.*

Präsentiert auf der "105<sup>th</sup> Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft" in Hamburg.

Lacaille JC, Schwartzkroin PA (1988)

*Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit interactions.* J Neurosci 8: 1411-1424.

Liu W, Liu R, Chun JT, Bi R, Hoe W, Schreiber SS, Baudry M (2001)

*Kainate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures: evidence for multiple apoptotic pathways.* Brain Res 916:239–248.

Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D (2000)

*Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane.* Nat Neurosci 3:545-550.

Miroci H, Schob C, Kindler S, Oelschlaeger-Schuett J, Fehr S, Jungenitz T, Schwarzacher SW, Bagni C, Mohr E (2012)

*Makorin ring zinc-finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells.* The Journal of Biological Chemistry Vol. 287, No. 2, pp. 1322–1334.

Ogawa Y, Osés-Prieto J, Kim MY, Horresh I, Peles E, Burlingame AL, Trimmer JS, Meijer D, Rasband MN (2010)

*ADAM22, A Kv1 Channel-Interacting Protein, Recruits Membrane-Associated Guanylate Kinases to Juxtaparanodes of Myelinated Axons.* The Journal of Neuroscience. 30(3):1038-1048.

Özkaynak E, Abello G, Jaegle M, van Berge L, Hamer D, Kegel L, Driegen S, Sagane K, Bermingham JR, Meijer D (2010)

*Adam22 Is a Major Neuronal Receptor for Lgi4-Mediated Schwann Cell Signaling.* The Journal of Neuroscience, March 10, 2010, 30(10):3857-3864; doi:10.1523/JNEUROSCI.6287-09.

Papez JW (1937)

*A proposed mechanism of emotion.* 1937. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1995 Winter;7(1):103-12.

Pöschel B, Stanton PK (2007)

*Comparison of cellular mechanisms of long-term depression of synaptic strength at perforant path-granule cell and Schaffer collateral-CA1 synapses.* Prog Brain Res 2007;163:473-500

Rawlings ND, Barret AJ, Bateman A (2010)

*MEROPS: the peptidase database.* Nucleic Acids Res\_38, D227-D233.

Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP (1999)

*Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity.* J. Biol. Chem. 274 (6), 3531-3540.

Routbort MJ, Bausch SJ, McNamara JO (1999)

*Seizures, cell death, and mossy fiber sprouting in kainic acid-treated organotypic hippocampal cultures.* Neuroscience. 1999;94:755–765.

Sagane K, Hayakawa K, Kai J, Hirohashi T, Takahashi E, Miyamoto N, Ino M, Oki T, Yamazaki K, Nagasu T (2005)

*Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice.* BMC Neurosci. 6 (1), 33.

Sagane K, Ishihama Y, Sugimoto H (2008)

*Lgi1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11.* Int J Biol Sci. 2008;4:387–396.

Schlomann U, Wildeboer D, Webster A, Antropova O, Zeuschner D, Knight CG, Docherty AJ, Lambert M, Skelton L, Jockusch H, Bartsch JW (2002)

*The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autokatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion.* J. Biol. Chem. 277 (50), 48210-48219.

Schulte U, Thumfart JO, Klöcker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, Dehn D, Deller T, Eble S, Abbass K, Wangler T, Knaus HG, Fakler B (2006)

*The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1.* Neuron. 2006 Mar 2;49(5):697-706.

Schwartz SP, Coleman PD (1981)

*Neurons of origin of the perforant path.* Exp Neurol. 1981 Oct;74(1):305-12.

Seals DF, Courtneidge SA (2003)

*The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions.* Genes Dev 17, 2003, S. 7–30. PMID 12514095.

Segal M, Landis S (1974)

*Afferents to the hippocampus of the rat studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase.* Brain Res. 1974 Sep 20;78(1):1-15.

Snyder SH (2006)

*ADAM finds an exciting mate.* Science 313 (5794): 1744-1745.

Soltész I, Deschenes M (1993)

*Low- and high-frequency membrane potential oscillations during theta activity in CA1 and CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus under ketamine-xylazine anesthesia.* J Neurophysiol 70: 97-116.

Soltész I, Jones RS (1995)

*The direct perforant path input to CA1: excitatory or inhibitory?* Hippocampus 5: 101-103.

Steward O, Scoville SA (1976)

*Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat.* Journal of Comparative Neurology 169, 347-370.

Stoppini L, Buchs PA, Müller D (1991)

*A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.* Journal of Neuroscience Methods 37, 173-182.

Tamamaki N (1999)

*Development of afferent fiber lamination in the infrapyramidal blade of the rat dentate gyrus.* J. Comp Neurol. 23;411(2):257-66.

Torrealba F, Valdés JL (2008)

*The parietal association cortex of the rat.* Biol Res. 41(4):369-77.

Trepel M:

*Neuroanatomie, Struktur und Funktion.*

Urban & Fischer, München 2004, 3. Auflage, S. 204/5

White JM (2003)

*ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions.* Curr Opin Cell Biol. 2003;15:598–606.

White WF, Nadler JV, Cotman CW (1979)

*Analysis of short-term plasticity at the perforant path-granule cell synapse.* Brain Res. 1979 Dec 7;178(1):41-53.

Witter MP, Naber PA, van Haeften T, Machielsen WC, Rombouts SA, Barkhof F, Scheltens P, Lopes da Silva FH (2000)

*Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways.* Hippocampus 10(4):398-410.

Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990)

*Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin.* J. Comp. Neurol. 296: 179-203.

Yan X, Lin J, Wang H, Markus A, Wree A, Rolfs A, Luo J (2010)

*Regional expression of the ADAMs in developing chicken cochlea.* Dev Dyn. 2010 Aug;239(8):2256-65.

Yong VW (2005)

*Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS.* Nat Rev Neurosci. 2005 Dec;6(12):931-44.

Yukie M, Iwai E (1988)

*Direct projections from the ventral TE area of the inferotemporal cortex to hippocampal field CA1 in the monkey.* Neurosci. Lett. 88: 6-10.

Yu YE, Wen L, Silva J, Li Z, Head K, Sossey-Alaoui K, Pao A, Mei L, Cowell JK (2010)

*Lgi1 null mutant mice exhibit myoclonic seizures and CA1 neuronal hyperexcitability.* Hum. Mol. Genet., May 1, 2010; 19(9): 1702-1711.

Zhu P, Sun Y, Xu R, Sang Y, Zhao J, Liu G, Cai L, Li C, Zhao S (2003)

*The interaction between ADAM22 and 14-3-3zeta: regulation of cell adhesion and spreading.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 301 (4), 991-999.

Zhu P, Sang Y, Xu H, Zhao J, Xu R, Sun Y, Xu T, Wang X, Chen L, Feng H, Li C, Zhao S (2005)

*ADAM22 plays an important role in cell adhesion and spreading with the assistance of 14-3-3.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 331 (4): 938–46.

Zola-Morgan S, Squire LR (1993)

*Neuroanatomy of memory.* Annu Rev Neurosci. 1993;16:547–563.

## 8.2 Internetquellen

Chudler EH, Ph.D., University of Washington, History of Neuroscience

URL: <http://faculty.washington.edu/chudler/hist.html>. Stand: 08.04.2010, 11:48.

Rawlings et al., 2010.

URL: <http://merops.sanger.ac.uk/>. Stand : 03.09.2010, 8:15.

URL: <http://www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus/hippocampus.html>. Stand:  
03.09.2010, 9:33.

## 9 Danksagung

Die Verfassung dieser Dissertation wäre ohne die hingebungsvolle und wohlwollende Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen.

Ich danke daher meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Roland Bender für seine intensive, kompetente und stets freundliche wissenschaftliche Betreuung. Seine Tür stand immer offen und Fragen konnte ich ohne zu zögern stellen. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht vorstellen können.

Hatte ich technische Fragen oder benötigte Hilfe bei der Durchführung von Experimenten, so konnte ich immer auf die Erfahrung und beruhigende Zuversicht von Bettina Kruck bauen.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Gabriele Rune für die Bereitstellung aller Räumlichkeiten und technischer Möglichkeiten an dem von ihr geleiteten Institut für Neuroanatomie.

Ich danke meinen Freunden für ihre motivierende Unterstützung, allen voran Henning Klapetke, welcher mir stets neue Denkanstöße gab.

Ohne die liebevolle Unterstützung meiner Familie wäre die Durchführung dieser Dissertation nicht nur komplizierter sondern auch einsamer gewesen. Ich danke daher meinen Eltern Renate und Mathias Kohrs, meinen Schwestern Sarah und Pia Kohrs sowie meiner Tochter Maya und meiner Partnerin Sara Combes für Glück, Halt und Freude an jedem Tag.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Unterschrift: .....