
Aus dem
CC 2 – Charité Centrum für Grundlagenmedizin
Institut für Integrative Neuroanatomie, Charité Campus Mitte
Institutsleiter: Prof. Dr. Rüdiger Veh

Habilitationsschrift

**C3 Proteine und Regeneration im ZNS: Effekte auf die
Struktur und Funktion neuronaler und glialer Zellen**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Anatomie und Zellbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Markus Höltje

geboren am 09.08.1969 in Braunschweig

Eingereicht: Dezember 2008

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1 C3 Proteine: Bakterielle ADP-Ribosyltransferasen	5
1.2 Die Familie der Rho GTPasen	7
1.3 C3 Proteine als neurotrophe Substanzen	8
2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten	10
2.1 Unterschiedliche Effekte von Rho-GTPasen auf die Entwicklung von Axonen und Dendriten hippocampaler Neurone	11
Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.1	13
Ahnert-Hilger, G., Höltje, M. , Grosse, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F., Just, I. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. <i>J. Neurochem.</i> 2004, 90; 9-18	
2.2 Die Bedeutung von Rho GTPasen für die Morphologie und Migration von Astrozyten während der <i>in vitro</i> Wundheilung	14
Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.2	16
Höltje, M. , Hoffmann, A., Hofmann, F., Mucke, C., Große, G., Van Rooijen, N., Kettenmann, H., Just, I., and Ahnert-Hilger, G. The role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during <i>in vitro</i> wound healing <i>J. Neurochem.</i> 2005, 95; 1237-1248	
2.3 Die Aufnahme und Freisetzung von Glutamat durch Astrozyten wird durch <i>Clostridium botulinum</i> C3 Protein verstärkt	17
Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.3	20
Höltje, M. , Hofmann, F., Lux, R., Veh, RW, Just, I. and Ahnert-Hilger, G. Glutamate uptake and release by astrocytes is enhanced by <i>Clostridium botulinum</i> C3 protein. <i>J. Biol. Chem.</i> 2008, 283; 9289-9299	

2.4	Die Hemmung Rho-abhängiger Prozesse durch <i>Clostridium botulinum</i> C3 Protein induziert eine proinflammatorische Antwort in Mikroglia	21
	Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.4	23
	Hoffmann, A., Hofmann, F., Just, I., Lehnardt, S., Hanisch, U.K., Brück, W., Ahnert-Hilger, G., and Höltje, M. Inhibition of Rho-dependent pathways by <i>Clostridium botulinum</i> C3 protein induces a proinflammatory profile in microglia <i>GLIA</i> 2008, 56; 1162-1175	
2.5	Ein 29 Aminosäuren langes Fragment von <i>Clostridium botulinum</i> C3 Protein fördert neuronales Wachstum, Konnektivität und Regeneration	24
	Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.5	27
	Höltje, M. , Djalali, S., Hofmann, F., Münster-Wandowski, A., Hendrix, S., Boato, F., Dreger, S.C., Große, G., Henneberger, C., Grantyn, R., Just, I., and Ahnert-Hilger G. A 29- amino acid fragment of <i>Clostridium botulinum</i> C3 protein enhances neuronal outgrowth, connectivity, and reinnervation <i>The FASEB Journal</i> , 2009, 23; 1115-1126	
3.	Diskussion	28
3.1	Die Wirkung von C3 Proteinen auf neuronale Zellen	30
3.2	Die Wirkung von C3 Proteinen auf gliale Zellen	32
3.3	C3bot als Agens zur Förderung neuronaler Regeneration: Enzymkompetent oder -defizient?	34
4.	Zusammenfassung	37
5.	Literaturverzeichnis	39
	Tierversuchsgenehmigungen	46
	Danksagung	47
	Erklärung	48

Abkürzungsverzeichnis

der wichtigsten verwendeten Abkürzungen (aus dem Englischen)

C3bot	<i>Clostridium botulinum</i> C3 protein
C3lim	<i>Clostridium limosum</i> C3 protein
C3stau2	<i>Staphylococcus aureus</i> C3 protein 2
Cdc42	cell division cycle 42 GTPase
GAP	GTPase-activating protein
GDI	GDP-dissociation inhibitor
GEF	guanine-nucleotide exchange factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLAST	glutamate-aspartate transporter
GLT-1	glial glutamate transporter 1
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LPS	lipopolysaccharide
NF κ B	nuclear factor kappa-B
NO	nitric oxide
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rho	Ras-homologe GTPase
ROCK	Rho-kinase
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor
TNF- α	tumor necrose factor-alpha
VGLUT	vesicular glutamate transporter

1. Einleitung

1.1 C3 Proteine: Bakterielle ADP-Ribosyltransferasen

C3-Proteine - häufig als C3 Exoenzyme oder C3 Transferasen bezeichnet - bilden eine Familie von bislang sieben bekannten ADP-Ribosyltransferasen aus unterschiedlichen Bakterienstämmen. Es handelt sich um Proteine, die aus einer einzelnen Peptidkette bestehen und ein Molekulargewicht von etwa 24 kDa aufweisen. Der Name bezieht sich dabei auf den „Prototyp“ der Familie, der neben C1 Neurotoxin und binär modifizierendem C2 Toxin als drittes Toxin aus Überständen von *Clostridium botulinum* isoliert wurde (C3bot1, Aktories et al., 1987). Weitere C3 Isoformen konnten ebenfalls von *Clostridium botulinum* (C3bot2, Nemoto et al., 1991), *Clostridium limosum* (C3lim, Just et al., 1992), *Bacillus cereus* (C3cer, Just et al., 1995) sowie *Staphylococcus aureus* (C3stau1, Inoue et al., 1991; C3stau2, Wilde et al., 2001; C3stau3, Yamaguchi et al., 2001) charakterisiert werden. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie ADP-ribosylieren selektiv die kleinen GTP-bindenden Proteine RhoA, B, C und hemmen so nachgeschaltete Signalwege, weshalb sie seit ihrer Entdeckung als Werkzeuge zur Erforschung von Rho-abhängigen Prozessen verwendet werden. Andere Proteine der Rho-Subfamilie, wie z.B. Rac1 oder Cdc42 sind dagegen so gut wie keine Substrate für C3-Proteine (Just et al., 1992 und 1995; Wilde et al., 2003). Bei der enzymatischen Inaktivierung kommt es zum Transfer von ADP-Ribose des Co-Substrats Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) auf Asparagin an Position 41 von Rho (Sekine et al., 1989). Funktionell kommt es dadurch zu einer Inaktivierung von Rho (**Abbildung 1**): Zum einen wird die über Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) vermittelte Konversion von GDP zu GTP (und damit die Aktivierung) verhindert (Sehr et al., 1998). Zum anderen wird die inaktive GDP-gebundene Form in einem Komplex mit dem Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI) im Zytosol stabilisiert (Genth et al., 2003). Aus der Tatsache, dass Rho-Proteine in praktisch allen eukaryontischen Zellen als Hauptregulatoren insbesondere des Aktin-Zytoskeletts fungieren (siehe 1.2), ergeben sich somit häufig umfangreiche zelluläre Antworten als Reaktion auf die Hemmung der Rho-Aktivität.

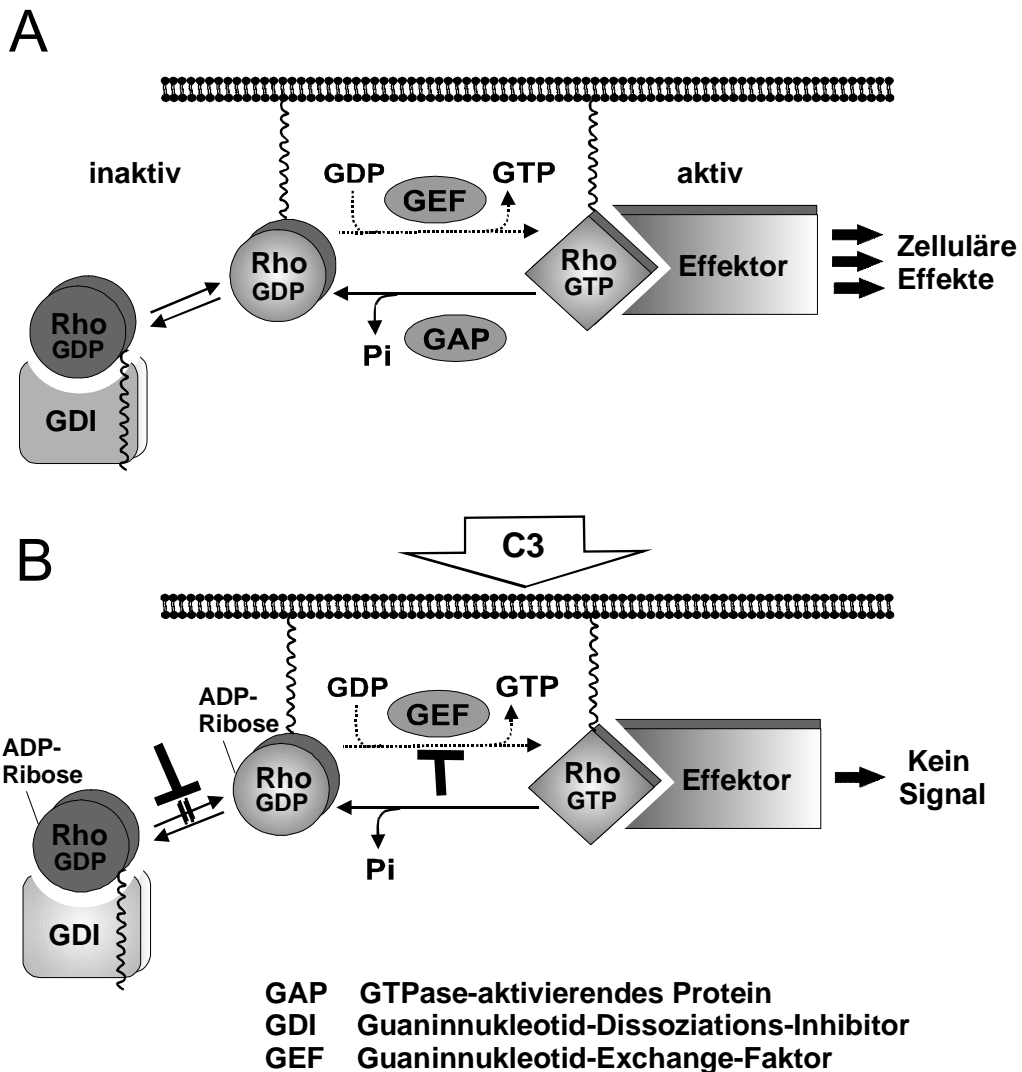


Abbildung 1

Rho GTPase-Zyklus und enzymatischer Wirkmechanismus der C3 Transferasen

Zyklus in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von C3 Transferasen
 Erläuterungen im Text (1.1 und 1.2)

nach Vogelsgesang et al., 2007

Eine Ursache für die bislang wenig verstandene Pathogenität von C3 Proteinen liegt sicherlich im nur unzureichend vorhandenen Wissen über den zellulären Aufnahme-mechanismus begründet. Anders als beispielsweise die clostridialen Neurotoxine weisen C3 Proteine keine Trennung in eine katalytisch aktive und eine Translokations

domäne zum Zelleintritt auf. Nachweislich kommt es jedoch zum Verlust von epithelialen und endothelialen Barrierefunktionen durch C3-vermittelte Hemmung von Rho Proteinen (Nusrat et al., 1995; Boyer et al., 2006).

In den letzten Jahren konnten von uns sowie anderen Arbeitsgruppen zusätzlich für einige C3 Proteine nicht-enzymatische Interaktionen bzw. zelluläre Effekte nachgewiesen werden. So bindet C3bot (wie auch C3lim) via Protein-Protein-Interaktion hochaffin an die kleine GTPase Ral, ohne sie zu ADP-ribosylieren (Wilde et al., 2002, Pautsch et al., 2005). Die Ral-Bindung führt jedoch zu einer Hemmung der C3-vermittelten ADP-Ribosylierung von Rho und einer blockierten Aktivierung von Effektoren durch Ral. In eigenen Arbeiten an hippocampalen Kultursystemen konnten wir erstmals zeigen, dass C3bot, nicht jedoch C3lim oder C3stau, eine neurotrophe Aktivität aufweist, die völlig unabhängig von der enzymatischen Aktivität auftritt ([Beiträge 2.1 und 2.5](#)).

1.2 Die Familie der Rho GTPasen

Die Ras-homologe (Rho) GTPase-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine besteht aus den Vertretern RhoA, B, C, D, G, und T. Sie stellen die Rho-Proteine im engeren Sinne dar. Zur Rho-Subfamilie gehören weiterhin Rac (1, 2, 3), Cdc42, Rnd (1, 2, 3/RhoE), TC10, TCL, Wrch1+2, RhoBTB- sowie die Miro-Unterfamilie (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Rivero et al., 2001; Fransson et al., 2003; BurrIDGE und Wennerberg, 2004). Bekannt sind zurzeit 22 Gene des menschlichen Genoms, die für sämtliche Rho-Proteine kodieren. Rho-Proteine repräsentieren molekulare Schalter, die extrazelluläre Signale an intrazelluläre Signalkaskaden koppeln. Reguliert wird dabei vor allem die Dynamik des Aktin-Myosin-Zytoskeletts, (Nobes und Hall, 1995; Hall, 1998). Bisher am besten untersucht sind RhoA, Rac1 und Cdc42. In der GDP-gebundenen Form sind sie inaktiv, nach Bindung von GTP werden sie aktiv und geben die Signale an nachgeschaltete Effektoren weiter. Die Umwandlungen zwischen aktiver und inaktiver Form wird durch die bereits erwähnten Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren katalysiert (GEFs; Rossman et al., 2005), die die Austauschraten von GDP gegen GTP dramatisch erhöhen und somit als Aktivatoren fungieren. Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs; DerMardirossian und Bokoch, 2005), wirken dem entgegen, indem sie Rho-GDP durch Komplexbildung im Zytosol

stabilisieren (siehe **Abbildung 1**). Die Signaltransduktion wird durch Hydrolyse von GTP zu GDP beendet; hier stimulieren die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs; Zalzman et al., 1999; Moon und Zheng, 2003) die Reaktion.

Rho-Proteine sind die Schlüssel-Regulatoren des Zytoskeletts eukaryontischer Zellen (Hall, 1998; Burridge und Wennerberg, 2004). Es werden das dynamische Gleichgewicht des Aktin-Zytoskeletts (wie Stress-Fasern, Zellwachstum, Zytokinese, Adhäsionskontakte, Zellmigration) und Aktin-assoziierte Vorgänge (wie Ausbildung der Zellpolarität, Zellzyklus und Vesikeltransport) reguliert, aber auch Aktin-unabhängige Vorgänge (wie Enzymaktivierung, Gentranskription, inflammatorische und apoptotische Prozesse) unterliegen der Modulation durch Rho-GTPasen (Abo et al., 1991; Bishop und Hall, 2000; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffé und Hall, 2005; Wennerberg und Der, 2004; Etienne-Manneville, 2004).

Etwas vereinfachend kann gesagt werden, dass bezüglich der zytoskelettalen Dynamik Rho (A, B, C) GTPasen vorwiegend in die Regulation von Stressfasern und fokalen Adhäsionen, Rac in die Organisation von Lamellipodien, und Cdc42 in die Ausbildung von Filopodien involviert sind (Hall, 2005). Ein gut charakterisierter RhoA nachgeschalteter Signalweg führt über die Rho-Kinase ROCK, die die regulatorische leichte Myosinkette über Phosphorylierung direkt aktiviert oder indirekt über die Inaktivierung der Phosphatase der leichten Myosinkette für deren Aktivierung sorgt (Amano et al., 1996). Daraus resultiert eine auf der Interaktion von Aktin und Myosin basierende kontraktile Kraft, die u. a. für die Zellmotilität entscheidend ist. Ein weiterer RhoA abhängiger Signalweg führt über ein Protein aus der Familie der Diaphanous-verwandten Formine (Dia), welches die Aktinpolymerisierung sowie die Mikrotubuli-stabilisierung fördert (Fujiwara et al., 2000).

1.3 C3 Proteine als neurotrophe Substanzen

Die Ausbildung von neuronalen Zellfortsätzen, die sich zu Axonen und Dendriten entwickeln und zielgerichtet auswachsen, erfordert das Zusammenspiel von extrazellulären attraktiven oder repulsiven Faktoren und intrazellulären Differenzierungsprogrammen von Neuronen und glialen Zellen. In eingeschränktem Maße trifft das ebenfalls für die Plastizität des adulten Nervensystems unter physiologischen Bedingungen, aber auch nach Schädigungen zu. Rho Proteine sind

stark in diese Prozesse involviert. In einer Reihe von Arbeiten zunächst an Zelllinien konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von RhoA über Transfektion von konstitutiv aktiven Konstrukten zur Hemmung von Neuritenwachstum führt (Kranenburg et al., 1997; Sebök et al., 1999). Die Rho-Hemmung über C3 von *Clostridium botulinum* sowie der Einsatz von dominant negativem RhoA bewirkte dagegen ein verstärktes Neuritenwachstum (Kozma et al., 1997). Ebenso konnte an primär kultivierten sensiblen Neuronen das Auswachsen von Neuriten durch C3bot gefördert werden (Jin und Strittmatter, 1997). Teilweise wurden in denselben Arbeiten zu Rho antagonistische, fördernde Effekte auf neuronales Fortsatzwachstum durch Rac1 und Cdc42 nachgewiesen. In den folgenden Jahren konnte weiterhin ein regenerationsfördernder Effekt durch C3 Proteine an verschiedenen *in vivo* Läsionsmodellen, wie etwa dem *Nervus opticus* (Lehmann et al., 1999; Fischer et al., 2004, Bertrand et al., 2005, 2007) oder nach spinalen Läsionen (Dergham et al., 2002; Dubreuil et al., 2003) aufgezeigt werden. Gegenteilige Belege existieren jedoch auch für einen fördernden Einfluss von Rho auf axonales und dendritisches Wachstum, wie anhand von Transfektionsstudien mit Rho oder C3 Konstrukten an primären kortikalen Neuronenkulturen nachgewiesen wurde (Threadgill et al., 1997). Ebenfalls existieren Hinweise auf eine unterschiedliche Bedeutung von Rho(A) für das Auswachsen von Axonen und Dendriten z.B. in *Drosophila* (Lee et al., 2000).

Insgesamt ergibt sich also überwiegend das Bild einer hemmenden Wirkung von Rho Aktivität auf neuronales Wachstum. Es existieren jedoch auch Anhaltspunkte für gegensätzliche Wirkungen, möglicherweise in Abhängigkeit vom neuronalen Zelltyp und Differenzierungsstatus.

In der aktuellen Forschung zu wachstumsfördernden Effekten von C3 Proteinen im Nervensystem ist allerdings bislang die Wirkung auf gliale Zellen, die besonders in der *in vivo* Situation entscheidend am Erfolg oder Misserfolg neuronaler Regeneration beteiligt sind, unzureichend untersucht. Vor diesem Hintergrund wurde ein beträchtlicher Teil der nachfolgend vorgestellten Arbeiten auch mit dem Ziel durchgeführt, mögliche C3-vermittelte Effekte auf gliale Zellen aufzuzeigen und sie in den Kontext von beobachteten C3 Protein Effekten etwa auf Neurone einzuordnen. Ein weiterer Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung enzymunabhängiger Effekte insbesondere auf strukturelle und funktionelle Eigenschaften im Hinblick auf die Förderung zentralnervöser regenerativer Fähigkeiten gesetzt.

2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten

Die im Folgenden vorgestellten Arbeiten befassen sich zunächst mit einer differenziellen Betrachtung von C3 Protein-Effekten auf das Auswachsen von Axonen und Dendriten hippocampaler Neurone unter morphologischen Gesichtspunkten. Besondere Beachtung findet dabei eine neu entdeckte nicht-enzymatische neurotrophe Wirkung von C3bot ([Beitrag 2.1](#)).

Nachfolgend wurden die Effekte von C3bot – enzymatisch aktiv versus inaktiv - auf die Morphologie kultivierter Astrozyten sowie das Migrationsverhalten innerhalb eines „scratch-wound“ Assays als Modell für gliale Narbenbildung quantitativ untersucht ([Beitrag 2.2](#)).

Ebenfalls an Astrozyten wurden die funktionellen Konsequenzen einer Hemmung Rho-abhängiger Signalwege durch C3bot hinsichtlich der Aufnahme und Freisetzung von Glutamat – den wichtigsten Stellgliedern der Glutamat-Homöostase im ZNS - untersucht ([Beitrag 2.3](#)).

An einem zweiten glialen Zelltyp, der Mikroglia, wurde der Einfluss von enzymkompetentem sowie -defizientem C3bot auf die Morphologie und insbesondere die Freisetzung von Mediatoren im Rahmen einer proinflammatorischen Antwort erforscht ([Beitrag 2.4](#)).

Nach der in den vorangestellten Beiträgen erfolgten Charakterisierung von C3 Protein Effekten auf neuronale und gliale Zellen wurde die für den nicht-enzymatischen neurotrophen Effekt verantwortliche Region von C3bot identifiziert. Durch Inkubation mit einem von C3bot abgeleiteten, 29 Aminosäuren langen, enzymatisch inaktiven Fragment wurde zusätzlich zu den morphometrischen Analysen der Einfluss auf die Konnektivität hippocampaler Neurone mit einbezogen. Weiterhin wurde an organotypischen Kultursystemen der Einfluss dieses Fragments auf das Wiederauswachsen bzw. die Reinnervation hippocampaler Zielgebiete durch Axone des entorhinalen Cortex untersucht ([Beitrag 2.5](#)).

2.1 Unterschiedliche Effekte von Rho-GTPasen auf die Entwicklung von Axonen und Dendriten hippocampaler Neurone

In den meisten der in der Einleitung (1.3) aufgeführten Arbeiten zur Untersuchung von Rho-abhängigen und C3 Protein-vermittelten Effekten auf das Fortsatzwachstum von Neuronen wurde zum einen mit Serum versetztes Medium und zumindest in den *in vitro* Versuchen häufig relativ undifferenzierte Neurone verwendet.

Um unbekannte Einflüsse von Serumkomponenten auszuschließen, wurde ein Hippocampus-Kulturmodell der Maus gewählt, in dem die Neurone am Embryonaltag 16-17 präpariert, dissoziiert und in serumfreiem Medium für bis zu 14 Tage in Kultur gehalten wurden. Über immunzytochemische Markierungen mittels der für Axone und Dendriten etablierten Marker (NFP, Neurofilamentprotein bzw. Map2, Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) konnte bereits nach Tag 6 in Kultur eine ausreichende Differenzierung in beide Kompartimente sichergestellt werden.

Zunächst wurde über Transfektionsstudien mit Wildtyp-, konstitutiv aktiven, sowie dominant negativen RhoA-Konstrukten und anschließender morphometrischer Analyse von Axonlänge und Gesamtanzahl der Verzweigungen der Einfluss dieser GTPase auf die Morphologie der untersuchten Neurone analysiert. Dabei zeigte sich, dass RhoA auf Axone und Dendriten gegensätzliche Effekte hatte ([Beitrag 2.1](#)). Während es nach Transfektion mit dominant negativem RhoA-N19 zu hemmenden Effekten auf die Axonlänge und die Anzahl der Verzweigungen kam, wurden dendritisches Wachstum und Verzweigung insbesondere durch konstitutiv aktives RhoA-V14 gehemmt. Im Folgenden wurden verschiedene Isoformen von C3 Proteinen (C3bot, C3lim, C3stau2) sowie zwei komplett enzymatisch inaktive Mutanten von C3bot, in denen die katalytische Aminosäure Glutamat an Position 174 gegen Alanin bzw. Glutamin (C3bot E174A, Q) ausgetauscht wurde, in nanomolaren Konzentrationen extrazellulär appliziert. Erstaunlicherweise ergaben sich bei der morphometrischen Analyse der axonalen Morphologie positive Effekte der beiden enzymdefizienten Mutanten bezüglich Länge und Verzweigungsgrad, die vergleichbar zum enzymatisch aktiven Wildtyp waren ([Beitrag 2.1](#)). Über die Methode der Nach-ADP-Ribosylierung mittels [³²P]-markiertem NAD konnte eine verbleibende Enzymaktivität von internalisiertem C3bot E174A und E174Q zweifelsfrei ausgeschlossen werden ([Beitrag 2.1](#)). C3lim und C3stau2 wiesen keine Effekte auf die Axonlänge und eher

negative auf die axonalen Verzweigungen auf. Ergänzt wurden diese Befunde durch weitere Transfektionsexperimente mit C3bot und C3bot E174Q Konstrukten. Die beobachteten Effekte unterstützen die Transfektionsdaten, die mit dominant negativen RhoA-Konstrukten erhoben wurden: Intrazellulär exprimiertes C3bot bewirkte eine Hemmung von Axonlänge und Verzweigungsanzahl. C3bot E174Q blieb jedoch ohne Effekt ([Beitrag 2.1](#)).

Die Analyse der Morphologie der Dendriten ergab im Gegensatz dazu eine strikte Abhängigkeit eines wachstumsfördernden Effekts von der enzymatischen Aktivität der untersuchten Medium-applizierten C3 Isoformen ([Beitrag2.1](#)).

Zusammenfassend führten diese Experimente zur Entdeckung einer bis dahin unbekanntes nicht-enzymatischen neurotrophen Aktivität von C3bot. Sie zeigen weiterhin, dass sich die Aktivität von RhoA in dem untersuchten Modellsystem eher positiv auf axonales Wachstum auswirkt, hingegen hemmend auf dendritische Komplexität. Sie lassen weiterhin vermuten, dass zumindest ein Teil der bislang gemachten Beobachtungen zu Effekten von C3 Proteinen auf neuronales Wachstum nicht allein auf enzymatischer Inaktivierung von Rho beruht, sondern von nicht-enzymatischen neurotrophen Effekten überlagert ist.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.1

Ahnert-Hilger, G., **Höltje, M.**, Grosse, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F., Just, I.

Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones.

J. Neurochem. 2004, 90; 9-18

2.2 Die Bedeutung von Rho GTPasen für die Morphologie und Migration von Astrozyten während der *in vitro* Wundheilung

Die Morphologie von Astrozyten ist in der *in vivo* Situation variabel. Sie ergibt sich zum großen Teil aus einer der Hirnaktivität angepassten Interaktion mit anderen Zellpopulationen, wie etwa Neuronen oder Endothelzellen (Barres und Barde, 2000, Mi et al., 2001). Infolge von Läsionen im ZNS wird typischerweise eine reaktive Gliose im Bereich der Schädigung beobachtet. Dabei kommt es vornehmlich zu einer Aktivierung von Astrozyten, gekennzeichnet durch eine verstärkte Expression von saurem Gliafaser-Protein (GFAP), der Bildung von hypertrophen Fortsätzen, Proliferation und einer verstärkten Migration der Zellen an den Ort der Läsion (Ridet et al., 1997; Sofroniew, 2005). Im Zuge dieses komplexen Geschehens, das als Mechanismus zum Erhalt bzw. zur Wiederherstellung von Gewebeintegrität interpretiert wird, kommt es häufig zur Ausbildung einer glialen Narbe, die ein Haupthindernis für wieder auswachsende Axone darstellt (Nieto-Sampedro, 1999; Silver und Miller, 2004; Sandvig et al., 2004).

An primär kultivierten Maus-Astrozyten wurde von uns zunächst der Effekt einer Hemmung Rho-abhängiger Signalwege durch C3bot quantitativ morphometrisch erfasst ([Beitrag 2.2](#)). Nach Inkubation mit sehr niedrigen Konzentrationen von C3bot (<50 nM) kam es zum bereits vorher qualitativ beschriebenen Effekt der „Stellation“ (Ramakers und Moolenaar, 1998), bei dem zuvor fibroblastenartige Astrozyten stark verzweigte Fortsätze entwickeln, die dem *in vivo* Erscheinungsbild ähneln. Die Gesamtlänge und Anzahl der Verzweigungen konnten dabei konzentrations- und zeitabhängig gesteigert werden. In parallel dazu durchgeführten biochemischen Analysen konnten wir zeigen, dass das Proteinniveau von RhoA ebenfalls konzentrations- und zeitabhängig durch C3bot-vermittelte ADP-Ribosylierung und anschließenden vermutlich proteasomalen Abbau gesenkt wurde ([Beitrag 2.2](#)). Vor dem Hintergrund der an hippocampalen Neuronen erhobenen Befunde einer nicht-enzymatischen neurotrophen Aktivität von C3bot wurde nun untersucht, ob die mutierten Proteine C3bot E174A/Q die astrogliale Morphologie ebenfalls beeinflussen. Aus den durchgeführten morphometrischen Analysen ergaben sich jedoch keinerlei Hinweise auf einen Effekt ([Beitrag 2.2](#)). Die Inkubation mit enzymkompetenten C3lim

und C3stau2 ergab fördernde Effekte auf die Fortsatzbildung, die jedoch schwächer ausfielen als nach Applikation von C3bot.

Weiterhin wurde die Frage untersucht, ob die bereits bei geringen nanomolaren Konzentrationen auftretenden morphologischen und biochemischen Veränderungen möglicherweise auf einem indirekt vermittelten Effekt beruhen, etwa durch die in der Kultur noch zu 2-3 % vorhandene Mikroglia. Durch Vorbehandlung der Astrozyten-Kulturen mit liposomal verpacktem Clodronat, einem von Makrophagen aufgenommenen Apoptose-induzierenden Agens, wurden Mikroglia-freie Kulturen erzeugt. Auch an diesen Kulturen konnte weiterhin eine Stellation nach Inkubation mit C3bot induziert werden. Eine eingehende quantitative Erfassung der Effekte erfolgte jedoch nicht ([Beitrag 2.2](#)).

Die beschriebenen Astrozytenkulturen wurden nun für „scratch-wound“ Experimente benutzt. Hierbei werden konfluente Zellmonolayer z.B. mit abgefeilten Skalpellspitzen linienförmig geschädigt und so zellfreie Flächen generiert (Nobes und Hall, 1999). In unseren Versuchen wurde der Verlauf der Repopulation der zellfreien Fläche in Abhängigkeit von Rho-Aktivität untersucht. Generell werden *in vitro* „scratch-wound“ Systeme als Modelle zur Untersuchung von Mechanismen zum Wundverschluss bzw. der Narbenbildung eingesetzt. An C3bot-behandelten Kulturen konnte ein im Vergleich zur Kontrolle beschleunigter Verschluss der zellfreien Fläche durch Astrozyten beobachtet werden ([Beitrag 2.2](#)). Dieser Effekt trat ebenso nach Hemmung der Rho-abhängigen Kinase (ROCK) durch den spezifischen Inhibitor Y27632 auf. Messungen der metabolischen Aktivität der Zellen ergaben dabei keine Hinweise auf eine verstärkte Proliferation der Zellen nach Inkubation mit C3bot. Die Begutachtung der Morphologie der Zellen im Wundbereich in Kombination mit durchgeführten Zellkernzählungen deuten eher darauf hin, dass die beschleunigte Wiederherstellung eines intakten Monolayers zum einen auf einer vermehrten Ausbildung hypertropher Fortsätze in Richtung der zellfreien Fläche sowie einer verstärkten Migration der Zellen beruhen ([Beitrag 2.2](#)).

Diese Ergebnisse belegen eine zentrale Bedeutung von Rho für das Fortsatzwachstum von Astrozyten. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass eine durch C3bot (oder durch Inhibition nachgeschalteter Effektoren) bedingte Hemmung der Rho-Aktivität die Migration von Astrozyten beschleunigt und somit möglicherweise auch *in vivo* eine gliale Narbenbildung nach Läsionsereignissen fördert.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.2

Höltje, M., Hoffmann, A., Hofmann, F., Mucke, C., Große, G., Van Rooijen, N., Kettenmann, H., Just, I., and Ahnert-Hilger, G.

Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during *in vitro* wound healing

J. Neurochem. 2005, 95; 1237-1248

2.3 Die Aufnahme und Freisetzung von Glutamat durch Astrozyten wird durch *Clostridium botulinum* C3 Protein verstärkt

Glutamat repräsentiert den wichtigsten exzitatorischen Transmitter im ZNS. Gleichzeitig wirken hohe extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen neurotoxisch. Störungen in der zerebralen Glutamat-Homöostase werden ursächlich mit einer Reihe schwerer neurodegenerativer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Danboldt, 2001). Astrozyten kommt in der Regulation der Verfügbarkeit von extrazellulärem Glutamat die entscheidende Rolle zu. Über hochaffine Transportsysteme entfernen sie z.B. überschüssiges Glutamat in Synapsennähe. Nach der Aufnahme kann die Speicherung im Zytoplasma und sekretorischen Vesikeln sowie die (zytoplasmatische) Umwandlung in Glutamin erfolgen. Tatsächlich sind Astrozyten in der Lage, durch freigesetztes Glutamat aktiv die synaptische Transmission zu beeinflussen (Jourdain et al., 2007).

Nach den in Beitrag 2.2 erhobenen Befunden zur Bedeutung von Rho-abhängigen Prozessen für die Morphologie und Motilität von Astrozyten wurde nun der bislang weitestgehend unerforschten Frage nach funktionellen Konsequenzen einer Behandlung von Astrozyten mit C3bot bezüglich der Aufnahme und Freisetzung von Glutamat nachgegangen. Zunächst wurde der Effekt von C3bot auf die Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten mittels Tritium-markiertem Glutamat untersucht. Die Messung der aufgenommenen Menge an Radioaktivität ergab eine deutliche Steigerung nach Inkubation mit C3bot ([Beitrag 2.3](#)). Im Folgenden wurde die Expression und Lokalisation der glialen Glutamat-Transporter der Plasmamembran, GLAST (Glutamat-Aspartat-Transporter) und GLT-1 (Glutamat-Transporter 1) im Hinblick auf einen C3bot-Effekt untersucht. Unter Kontrollbedingungen ließ sich praktisch ausschließlich GLAST an der Plasmamembran nachweisen. Nach Inkubation mit C3bot konnte jedoch zusätzlich zu GLAST eine sehr deutliche Hochregulation von GLT-1 in den stellaren Zellen nachgewiesen werden ([Beitrag 2.3](#)). Über die spezifische pharmakologische Hemmung der Transportaktivität von GLT-1 mittels Dihydrokainat konnte die erhöhte Glutamat-Aufnahme nach C3bot-Behandlung auch funktionell eindeutig GLT-1 zugeordnet werden. Auf der Suche nach molekularen Mechanismen für die verstärkte GLT-1 Expression zeigte sich in C3bot-behandelten ebenso wie in mit RhoAN19 transfizierten Zellen eine verstärkte

Aktivierung (nukleäre Lokalisation) des Transkriptionsfaktors NF κ B. (Beitrag 2.3). In unterschiedlichen Kontrollversuchen konnte gezeigt werden, dass die durch GLT-1 bedingte verstärkte Glutamat-Aufnahme nicht allein ein sekundärer Effekt der starken morphologischen Veränderungen war, sondern tatsächlich einen primär NF κ B-abhängigen Prozess darstellt.

Aus diesen Befunden ergaben sich weitere Fragestellungen: Astrozyten weisen neben den Transportern der Plasmamembran auch vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUTs, Bezzi et al., 2004) auf. In Western-Blot Studien konnte von uns zwar kein Effekt von C3bot auf das Proteinniveau der Transporter VGLUT1-3 nachgewiesen werden. Pharmakologische Versuche wiesen jedoch auf eine verstärkte Beteiligung einer vesikulären Glutamat-Speicherung in behandelten Astrozyten hin und lassen eine regulatorische Beeinflussung vermuten (Beitrag 2.3).

Geht eine gesteigerte Glutamat-Aufnahme möglicherweise auch mit einer verstärkten Freisetzung einher? Wenn ja, findet diese aus dem Zytoplasma oder vesikulär statt? In Sekretionsexperimenten konnte tatsächlich eine stark vermehrte Ca²⁺-stimulierte Freisetzung von Radioaktivität nach Behandlung mit C3bot gemessen werden (Beitrag 2.3). Erste Hinweise auf eine unter C3bot stattfindende verstärkte exozytotische Aktivität lieferte die Beobachtung eines signifikant gesteigerten Proteinniveaus des SNARE-Proteins Synaptobrevin. Über vesikuläre Färbungen mittels eines aktivitäts-abhängig aufgenommenen fixierbaren Farbstoffs (AM1-43) konnte außerdem eine verstärkte exo-endozytotische Aktivität in Astrozyten nach C3bot-Behandlung nachgewiesen werden. Den letztendlichen Beweis für eine unter C3bot deutlich gesteigerte, vorwiegend exozytotisch ablaufende Glutamat-Freisetzung lieferten Experimente, in denen die Exozytose durch Vorbehandlung der Zellen mit Botulinum Neurotoxin D (welches hochselektiv Synaptobrevin bzw. Cellubrevin spaltet) blockiert wurde (Beitrag 2.3). In Kombination mit der Technik der Ionenaustausch-Chromatografie, die eine präzise Trennung von freigesetztem Glutamat und Glutamin ermöglichte, konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von Ca²⁺-abhängig sezerniertem Glutamat zu Glutamin durch C3bot deutlich zu Gunsten von Glutamat verschoben war.

Diese Daten ergänzen die überwiegend strukturellen Befunde des vorangegangenen Beitrags. Wir konnten erstmalig aufzeigen, dass eine - hier durch C3bot-vermittelte - Hemmung von Rho in Astrozyten auch zu erheblichen funktionellen Veränderungen

bezüglich der Kapazität zur Speicherung und Freisetzung von Glutamat führt, die für die Kontrolle der Glutamathomöostase, und damit auch für die Funktionsweise von Neuronen im Hinblick auf re- bzw. degenerative Prozesse bedeutsam sein dürften.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.3

Höltje, M., Hofmann, F., Lux, R., Veh, R.W, Just, I. and Ahnert-Hilger, G.

Glutamate uptake and release by astrocytes is enhanced by *Clostridium botulinum* C3 protein.

J. Biol. Chem. 2008, 283; 9289-9299

2.4 Die Hemmung Rho-abhängiger Prozesse durch *Clostridium botulinum* C3 Protein induziert eine proinflammatorische Antwort in Mikroglia

Die Mikroglia repräsentiert den immun-kompetenten Zelltyp im ZNS. Eine Aktivierung kann über eine Vielzahl von Mechanismen erfolgen, die zu einer Transformation in einen motilen, sekretorisch tätigen und phagozytierenden Phänotyp resultieren (Kreutzberg, 1996; van Rossum und Hanisch, 2004). Eine auf der Aktivität von Mikroglia basierende proinflammatorische Antwort ist in eine Vielzahl von neurodegenerativen Kaskaden involviert (Orr et al., 2002; Streit, 2002). Auf der anderen Seite existieren ebenfalls Befunde, die eine unterstützende Rolle der Mikroglia in regenerativen Prozessen im ZNS aufzeigen (Yin et al., 2003; Streit, 2005).

In jedem Fall lassen sowohl die starken morphologischen Veränderungen als auch die Vielzahl der durch aktivierte Mikroglia potentiell freigesetzten Mediatoren auf eine Beteiligung von Rho-Proteinen, ähnlich wie in anderen Zelltypen, schließen.

Am Beginn der Untersuchungen zu Effekten von C3 Proteinen auf kultivierte Maus-Mikroglia stand erneut die Betrachtung von potentiellen Wirkungen auf die Morphologie. Dosisabhängig (5-50 nM) konnten durch C3bot starke morphologische Veränderungen induziert werden, die durch die vermehrte Ausbildung feiner Fortsätze sowie das Auftreten von vesikulären Strukturen im Zytoplasma gekennzeichnet waren (Beitrag 2.4). Beides sind Merkmale einer Aktivierung kultivierter Mikroglia, wie sie auch in der als Positivkontrolle mitgeführten LPS-Stimulation (Lipopolysaccharid, ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien) auftraten. Weiterhin wurde untersucht, ob diese beobachteten morphologischen Veränderungen zu einer aktivierten Form auch von der Sekretion typischer proinflammatorischer Mediatoren, wie etwa Stickstoffmonoxid (NO), begleitet wurden. So konnte die Expression des NO-synthetisierenden Enzyms iNOS (induzierbare NO-Synthase) nach Behandlung mit C3bot nachgewiesen werden (Beitrag 2.4). Zusätzlich wurde die Produktion von NO aus Zellkultur-Überständen bestimmt. Sie erreichte maximal etwa 60% des LPS-Niveaus. Die ebenfalls applizierten enzymdefizienten Mutanten C3bot E174A/Q bewirkten im Gegensatz dazu keine iNOS Expression und konsequenterweise damit auch keine NO-Freisetzung. Weiterhin belegt es, dass die durch C3bot bedingte Aktivierung sehr wahrscheinlich nicht auf einer generellen Kontamination der C3 Präparationen mit Endotoxin (LPS) beruht. Da dies in allen Versuchsansätzen, die

eine Aktivierung von Mikroglia mit bakteriellen Substanzen beinhalten, absolut sicher ausgeschlossen werden sollte, wurden weitere Kontrollexperimente mit Polymyxin B, einem etablierten LPS-Inhibitor, durchgeführt. Im Gegensatz zu den LPS-induzierten Effekten wurde die C3bot-vermittelte iNOS-Expression und NO-Freisetzung durch Polymyxin B jedoch nicht beeinträchtigt ([Beitrag 2.4](#)). Anschließend wurde das sekretorische Profil der typischen proinflammatorischen Zytokine und Chemokine Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1alpha (MIP-1 α) sowie das Maus-Homologe von CXCL-1 (KC) in den Überständen mittels Sandwich-Elisa abgefragt. Für alle Mediatoren konnte durch C3bot eine deutlich gesteigerte Freisetzung erzielt werden, die zwischen 70% und 90% (TNF- α , MIP-1 α , KC) oder, schwächer ausgeprägt, bei 40% der LPS-induzierten (IL-6) lagen ([Beitrag 2.4](#)). Für C3bot E174A/Q konnten erwartungsgemäß keine Effekte beobachtet werden.

Die Analyse des Proteinniveaus der Rho-GTPasen ergab wie in Astrozyten eine verringerte RhoA Expression nach Behandlung mit C3bot, sowie ein leicht angehobenes RhoB Signal, das komplett ADP-ribosyliertes Protein darstellt. Die Signale für Rac1 und Cdc42 blieben weitgehend unverändert ([Beitrag 2.4](#)). Untersuchungen bezüglich involvierter nachgeschalteter Effektoren ergaben für ROCK keine Beteiligung an den beobachteten Sekretionseffekten. Morphologisch erschienen die Zellen etwas stärker ramifiziert als unter Kontrollbedingungen ([Beitrag 2.4](#)). In Analogie zu den bereits vorgestellten Versuchen an Astrozyten ([Beitrag 2.3](#)) wurde eine mögliche Aktivierung von NF κ B durch C3bot auch in Mikroglia untersucht. Tatsächlich ließ sich immunzytochemisch ebenfalls eine verstärkte nukleäre Lokalisation von NF κ B sowohl nach Inkubation mit C3bot als auch (bekanntermaßen) nach Stimulation mit LPS nachweisen ([Beitrag 2.4](#)). Durch die gleichzeitige Applikation von C3bot bzw. LPS mit einem NF κ B-Inhibitor ([Beitrag 2.3](#)) konnte dann auch eine dosisabhängige Reduktion der NO-Freisetzung beobachtet werden.

Die durchgeführten Versuche belegen also eindeutig eine entscheidende Bedeutung von Rho für Mechanismen, die eine proinflammatorische Antwort in Mikroglia induzieren. Sie legen weiterhin nahe, dass der Einsatz von C3bot zu starken Effekten auf Mikroglia führt, die auch neuronale Regeneration beeinflussen könnten.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.4

Hoffmann, A., Hofmann, F., Just, I., Lehnardt, S., Hanisch, U.K., Brück, W., Ahnert-Hilger, G., and **Höltje, M.**

Inhibition of Rho-dependent pathways by *Clostridium botulinum* C3 protein induces a proinflammatory profile in microglia

GLIA 2008, 56; 1162-1175

2.5 Ein 29 Aminosäuren langes Fragment von *Clostridium botulinum* C3 Protein fördert neuronales Wachstum, Konnektivität und Regeneration

In den bislang vorgestellten Arbeiten konnte eine nicht-enzymgebundene Aktivität von C3bot nachgewiesen werden, die sich als spezifisch für Neurone (Beitrag 2.1), unwirksam jedoch an Astrozyten und Mikroglia erwies (Beiträge 2.2, 2.3, 2.4). Im Folgenden sollte versucht werden, einen neurotroph wirksamen Bereich von C3bot für diese Effekte zu identifizieren. Hierfür wurden zunächst im *E. coli* Expressionssystem überlappende Peptidfragmente aus der Gesamtsequenz von C3bot generiert und auf ihre Wirksamkeit auf axonales und dendritisches Wachstum kultivierter hippocampaler Neurone überprüft. Sämtliche Peptide wiesen keinerlei enzymatische Aktivität auf. Von den zunächst eingesetzten Peptiden erwies sich ein Sequenzbereich, der die Aminosäuren 97 bis zum c-Terminus an Position 211 beinhaltet, tatsächlich als wirksam (Beitrag 2.5). Sowohl die Gesamtlänge als auch die Anzahl an axonalen Verzweigungen mittlerer und höherer Ordnung wurden vergleichbar zur Wirkung des Gesamtproteins C3bot erhöht. Die Verwendung eines nochmals auf den Sequenzbereich der Aminosäuren 154-211 verkürzten C3 Fragments führte weiterhin zu fördernden Effekten auf axonales Auswachsen. Letztendlich konnte mit dem (synthetisch hergestellten) Peptid C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² ein 29 Aminosäuren umfassender Sequenzbereich identifiziert werden, der in sehr niedrigen Konzentrationen (maximale Effekte konnten in einem Konzentrationsbereich zwischen 25 und 50 nM erzielt werden) Axonwachstum und die Ausbildung von Verzweigungen vergleichbar dem Gesamtprotein förderte. In anschließenden Experimenten wurde nun die Frage nach möglichen Effekten auf die Anzahl der ausgebildeten synaptischen Kontakte untersucht, die die morphologischen Veränderungen begleiten könnten. Hierfür wurden zunächst immunzytochemisch Synaptophysin-positive Terminalien an proximalen Dendriten von eGFP-transfizierten hippocampalen Neuronen mittels einer für diesen Zweck entwickelten Software (Henneberger et al., 2005) quantifiziert. Nach Inkubation mit C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² kam es zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl dieses präsynaptischen Markerproteins um etwa 30% (Beitrag 2.5). Damit einher ging eine Steigerung in der Fähigkeit der Neurone zur Aufnahme des Transmitters Glutamat. In weiteren Versuchen sollte zwischen Effekten auf exzitatorische (glutamaterge) sowie inhibitorische (GABAerge) synaptische Kontakte differenziert werden. Für den *brain*

derived neurotrophic factor (BDNF) konnten in vergleichbaren Untersuchungen beispielweise gegenteilige Effekte auf glutamaterge und GABAerge Kontakte nachgewiesen werden (Singh et al., 2006). Die immunzytochemische Markierung mittels einer kollektiven Färbung gegen die vesikulären Glutamat-Transporter VGLUT1 und 2 sowie den vesikulären GABA-Transporter VGAT zeigten jedoch, dass die durch C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² vermittelte Steigerung der Anzahl synaptischer Terminalien auf einer vermehrten Expression beider Systeme beruhte (Beitrag 2.5). Die bislang vorgestellten, durch C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² nicht-enzymatisch vermittelten Wirkungen wurden an hippocampalen Primärkulturen beobachtet. Sie beruhten also auf Effekten an dissoziierten Zellen. In einem weiteren Schritt wurden mögliche C3 Protein-vermittelte Wirkungen an organotypischen Hirnschnitt-Kulturen untersucht. Sie erlauben die Untersuchung unter Bedingungen, die der *in vivo* Situation zumindest stärker angenähert sind. An Schnittkulturen des entorhinalen Cortex neonataler Mäuse (Wolf et al., 2002) wurde zunächst der Einfluss von C3bot und C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² auf das Wiederauswachsen von Axonen des *Tractus perforans* aus dem Explantat hinsichtlich der Länge und Dichte der Fasern analysiert (Beitrag 2.5). Die Auswertung ergab sowohl für C3bot als auch für das Peptid fördernde Effekte auf beide Parameter. Motiviert durch diese Ergebnisse wurde ein weiterer experimenteller Ansatz benutzt, in dem die Reinnervation des Hippocampus einer Wildtyp-Maus durch Fasern des *Tractus perforans* aus dem entorhinalen Cortex einer β -actin-eGFP transgenen Maus (Frotscher und Heimrich, 1993, Hechler et al., 2006) unter dem Einfluss von C3bot sowie C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² verfolgt wurde (Beitrag 2.5). An diesem zweiten organotypischen Läsionsmodell kann das Ausmaß der wieder einwachsenden eGFP positiven Fasern über die Fluoreszenzintensität quantifiziert werden. Auch an diesem Modellsystem konnte für beide C3 Präparationen eine verstärkte Regeneration des perforanten Fasertraktes nachgewiesen werden, die mit 40% sowohl für das Gesamtprotein als auch das Peptid sehr deutlich ausfiel.

Zusammenfassend belegen die in dieser Studie vorgestellten Daten eine innerhalb des Sequenzbereichs der Aminosäuren 154 bis 182 lokalisierte neurotrophe Aktivität von C3bot, die die Morphologie und Konnektivität dissoziierter Neurone positiv beeinflusst. Weiterhin können durch C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² an organotypischen Modellsystemen neuronales Auswachsen und Reinnervation gefördert werden. Diese Befunde lassen

C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² als hochattraktiven Kandidaten zur spezifischen Förderung neuronaler Regeneration erscheinen.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.5

Höltje, M., Djalali, S., Hofmann, F., Münster-Wandowski, A., Hendrix, S., Boato, F., Dreger, C.S., Große, G., Henneberger, C., Grantyn, R., Just, I., and Ahnert-Hilger, G.

A 29-amino acid fragment of *Clostridium botulinum* C3 protein enhances neuronal outgrowth, connectivity, and reinnervation

The FASEB Journal, 2009, 23; 1115-1126

3. Diskussion

Die vorgestellten Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, strukturelle und funktionelle Konsequenzen der Behandlung von Neuronen und glialen Zellen mit bakteriellen Proteinen der C3 Familie aufzuzeigen. Die Analyse der Wirkungen auf neuronale Zellen erbrachte dabei die Erkenntnis, dass nicht allein die bis dahin als einzig biologisch wirksames Prinzip beschriebene enzymatische Aktivität von *Clostridium botulinum* C3 Protein für die beobachteten neurotrophen Effekte verantwortlich gemacht werden kann. An Dissoziationskulturen und organotypischen Modellsystemen konnten wachstumsfördernde Effekte dargestellt werden, die mit einer erhöhten Anzahl synaptischer Kontakte einhergingen und eindeutig nicht auf einer ADP-Ribosylierung von Rho beruhten ([Beiträge 2.1 und 2.5](#)). In weiteren Studien wurde der Einfluss von C3 Proteinen auf gliale Funktionen, wie etwa die Narbenbildung und Aufrechterhaltung der Glutamat-Homöostase durch Astrozyten untersucht, die sich in der *in vivo* Situation als bedeutsam für den Erfolg oder Misserfolg von neuronalem Wachstum und Regeneration erwiesen haben ([Beiträge 2.2 und 2.3](#)). An dem immunkompetenten Zelltyp des ZNS, der Mikroglia, gelang es zudem, durch C3bot eine proinflammatorische Antwort hervorzurufen, eine Tatsache, die ebenfalls beachtenswert vor dem Hintergrund einer Modulation von neuronalen Regenerationsprozessen und generell Inflammation im ZNS erscheint ([Beitrag 2.4](#)). In **Abbildung 2** sind die C3-vermittelten Effekte an den untersuchten Zelltypen noch einmal zusammenfassend dargestellt.

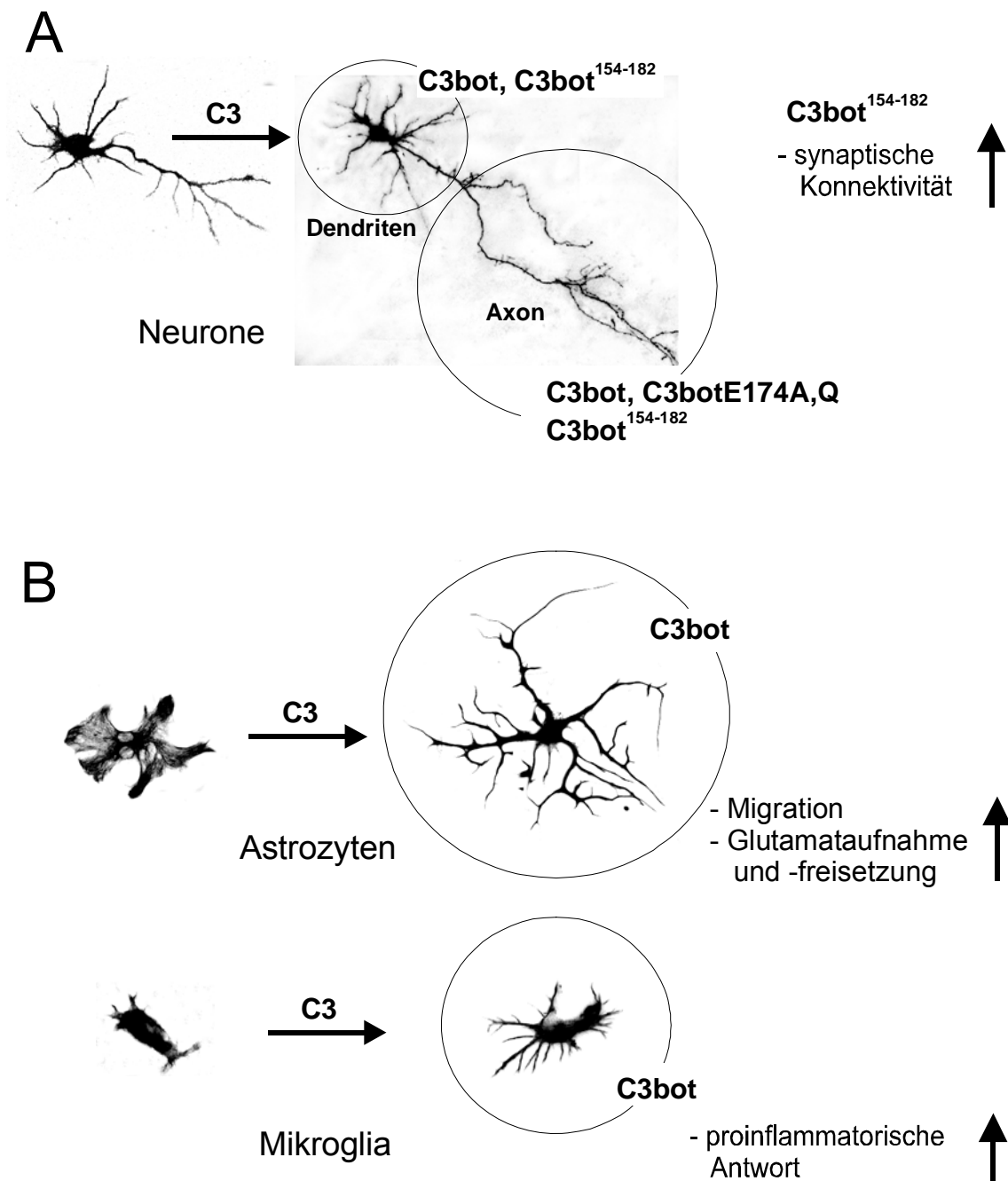


Abbildung 2

Nachgewiesene Effekte verschiedener C3 Präparationen auf Neurone (A), Astrozyten und Mikroglia (B)

Erläuterungen im Text

3.1 Die Wirkung von C3 Proteinen auf neuronale Zellen

Die Analyse der Wirkung von C3 Proteinen auf das Fortsatzwachstum von Neuronen belegte zum einen eine neurotrophe, regenerationsfördernde Wirkung von enzymatisch aktivem C3bot an den untersuchten Modellsystemen (Beiträge 2.1, 2.5). Wir konnten somit Effekte, die bislang in der Literatur für kultivierte Zellen oder *in vivo* Läsionsmodelle wie den Nervus opticus beschrieben waren (Fischer et al., 2004; Hu et al., 2007), bestätigen und ergänzen. Der Nachweis einer zusätzlich vorhandenen, vergleichbar starken, jedoch enzymunabhängigen Wirkung war überraschend. Durch den Einsatz von überlappenden Peptidfragmenten, die auf der Sequenz von C3bot beruhten, konnte diese nicht-enzymatische biologische Aktivität bislang auf einen Bereich der Aminosäuren von 154 bis 182 eingegrenzt werden (Beitrag 2.5).

Relativ gut charakterisiert erscheint bislang der enzymatische Wirkmechanismus, der zu Veränderungen der Morphologie führt. Rho Proteine üben ihre Funktionen über nachgeschaltete Effektoren, wie die p160 Rho Kinase (ROCK) aus, die die regulatorische leichte Myosinkette über Phosphorylierung direkt aktiviert oder über die Inaktivierung der inhibitorischen Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP) für deren Aktivierung sorgt (Amano et al., 1996). Ein weiteres Effektor-Protein stammt aus der Familie der Diaphanous-verwandten Formine (Dia), welches über weitere charakterisierte Schritte die Aktinquervernetzung oder direkt die Mikrotubulistabilisierung fördert (Fujiwara et al., 2000; Govek et al., 2005). Als Konsequenz der Aktivierung beider Signalwege durch RhoA ergibt sich zumeist eine Hemmung der Aktin-Mikrotubuli Dynamik und damit eine Arretierung von Fortsatzwachstum und Neuriten-Komplexität, hervorgerufen u.a. durch den Zusammenbruch von Wachstumskegeln (Wahl et al., 2000). Die Hemmung Rho-abhängiger Signalwege (durch C3bot) führt somit umgekehrt zu verstärktem neuronalen Auswachsen. Die Identifizierung der an der nicht-enzymatischen Wirkung beteiligten Signaltransduktionselemente steht bislang noch aus. Aufgrund der sehr niedrigen wirksamen Konzentrationen im nanomolaren Bereich muss von einer Bindung an eine, wegen des beobachteten biphasischen Effekts vermutlich sogar an zwei Bindungsstrukturen ausgegangen werden. Im Gegensatz zu den clostridialen Neurotoxinen, die, eines Doppel-Rezeptoren-Modells zufolge, sowohl an Ganglioside als auch an Proteine wie Synaptotagmin oder SV2 binden (Rummel et al., 2004; Dong et al., 2006), ist für C3

Proteine bislang keine Bindungs- oder Translokationsdomäne bekannt. Von uns bereits durchgeführte präliminäre Versuche zur Bindung von C3bot an Membranpräparationen hippocampaler Neurone scheinen die Existenz von unterschiedlichen Bindungsstrukturen zu unterstützen. Nach Inkubation von Zellhomogenaten mit C3bot ließen sich wiederholt zwei C3bot immunreaktive Banden bei etwa 35 bzw. 55kDa im Western Blot darstellen. Die massenspektroskopische Analyse der Banden wird zurzeit durchgeführt. Sequenzvergleiche zur Identifizierung potentieller Bindungspartner für C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² ergaben bislang jedoch keine stärkere Übereinstimmung des Peptids mit bekannten Neurotrophinen wie NGF, BDNF, NT-3 oder NT-4. Weiterhin ist geplant, zur Aufklärung der durch C3bot, C3bot E174Q und C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² induzierten neurotrophen Wirkung die zeitabhängige Änderung der Gentranskription in primär kultivierten Hippocampusneuronen der Maus mittels DNA-Microarrays durchzuführen. Hieraus gewonnene Ergebnisse sollen auch dabei helfen, die Mechanismen, die zur verstärkten Ausprägung synaptischer Kontakte durch C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² führen, besser zu verstehen. Denkbar sind transkriptionelle präsynaptische Regulationsmechanismen, wie sie für neurotrophe Faktoren beschrieben sind (Rind et al., 2005; Singh et al., 2006). Ebenso denkbar wäre auch eine Erhöhung der synaptischen Konnektivität als sekundärer Effekt einer komplexeren axonalen und/oder dendritischen Morphologie, durch die die Wahrscheinlichkeit einer Begegnung von Axonen mit Dendriten und damit der Ausdifferenzierung von Synapsen erhöht wird. Ein weiteres Ziel laufender Untersuchungen ist die Klärung der Frage, ob die enzymunabhängigen Effekte lediglich durch Bindung an extrazelluläre Rezeptorstrukturen und nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskaden hervorgerufen werden, oder auch auf der Internalisierung und Bindung an intrazelluläre Partner beruhen. Gegenwärtig laufen Experimente zum Nachweis der Internalisierung von in nanomolaren Dosen angebotenen C3 Proteinen (in der Literatur wird zumeist eine unspezifische Aufnahme über Pinozytose bei extrazellulär mikromolar vorhandenen Konzentrationen oder über die Mithilfe von porenbildenden Toxinen diskutiert, siehe Vogelsong et al., 2007). Über Alexa488 gekoppeltes C3bot/C3bot E174Q konnte eine Internalisierung beider Proteine für hippocampale Neurone bestätigt werden. Für C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² stehen die Befunde noch aus. Für biochemische Nachweisverfahren zur Bindung und Internalisierung wurde zusätzlich ein an ein myc-Tag gekoppeltes Peptid synthetisiert, um die Visualisierung von gebundenem oder aufgenommenem C3bot¹⁵⁴⁻

¹⁸² zu ermöglichen. Erste Ergebnisse zum Aufnahmeweg von C3bot, die mit Inhibitoren der klassischen Aufnahmewege durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass weder die durch Bafilomycin hemmbare, rezeptorvermittelte Endozytose („short trip“), noch der durch Brefeldin hemmbare, retrograde Transport innerhalb der Zelle („long trip“) in die Aufnahme von C3bot involviert sind.

3.2 Die Wirkung von C3 Proteinen auf gliale Zellen

Neuronale Ausdifferenzierung und Regeneration hängen von einer ausgewogenen Homöostase ab, die sich in wechselseitigen Interaktionen zwischen Neuronen, Neuroglia (Astrozyten, Oligodendrozyten) und Mikroglia manifestiert. An allen diesen Interaktionen sind Rho-Proteine beteiligt. Für die Entwicklung neuroregenerativer Therapien ist es wichtig, die Reaktionen einzelner Zellgruppen, sowie ihr Zusammenspiel im Gewebe zu kennen. Nach Läsionen im Rückenmark kommt es zu einer verstärkten Proliferation, Hypertrophie und Fortsatzbildung durch Astrozyten. Im Zusammenspiel mit Oligodendrozyten, Mikroglia und Bindegewebszellen erzeugen sie eine gliale Narbe, die sowohl ein physikalisches Hindernis (Reier et al., 1983) als auch durch die Expression von wachstumshemmenden Faktoren wie Chondroitin-Sulfat Proteoglykane (Asher et al., 2002) oder Semaphorine (de Winter et al., 2002) eine biochemische Barriere aufbauen. In dem von uns verwendeten *in vitro* Modell für astrogliale Narbenbildung konnte nach Hemmung Rho-abhängiger Signalwege durch C3bot oder den ROCK-Inhibitor Y27632 ein verstärktes Fortsatzwachstum sowie ein beschleunigter Wundverschluss beobachtet werden ([Beitrag 2.2](#)). Aus zellbiologischer Sicht konnten damit die morphometrischen Untersuchungen zeigen, dass die aus Hemmung Rho-abhängiger Signalwege resultierende astrogliale Stellation in der Tat auf dem verstärkten Wachstum von Fortsätzen beruht, und nicht lediglich das Resultat einer Retraktion des Zytoplasmas um die perinukleäre Region darstellt. Bezüglich der Regulation von Zellmotilität im Kontext von glialer Narbenbildung konnte in diesem Zusammenhang ein über die p160 Rho-Kinase (ROCK) als Effektor vermittelter hemmender Einfluss von Rho auf den Zeitverlauf des Wundverschlusses dargestellt werden. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang die gezielte Inaktivierung von Rho durch Ubiquitinylierung und proteasomalen Abbau am sich in

Bewegungsrichtung befindlichen Pol migrierender Tumorzellen nachgewiesen werden (Wang et al., 2003). An Endothelzellen der Kornea konnte durch den Einsatz des ROCK-Inhibitors Y27632 ebenfalls ein beschleunigter Wundverschluss beobachtet werden (Lee und Kay, 2006). Im Gegensatz dazu konnte für epitheliale Zellen eine fördernde Wirkung von Rho-Aktivität auf die Heilung von Gewebedefekten nachgewiesen werden (Santos et al., 1997; Brock et al., 1996). In jedem Fall unterstreichen diese Ergebnisse die zentrale Bedeutung von Rho für die Wundheilung bzw. Narbenbildung in unterschiedlichen Zelltypen.

Begleitet wurden diese C3bot-vermittelten Effekte auf die Morphologie und das Migrationsverhalten von Astrozyten von beträchtlichen Veränderungen in der Kapazität zur Aufnahme und Freisetzung von Glutamat durch diesen Zelltyp (Beitrag 2.3). Auch in diese Prozesse sind Rho Proteine offensichtlich stark involviert. Die beobachtete NF κ B-abhängige Induktion der Proteinexpression von GLT-1 durch C3bot bestätigte insofern bereits in der Literatur vorhandene Ergebnisse, als dass sich dieser Transportersubtyp als hochvariabel bezüglich des Proteinniveaus und der Transportaktivität zeigt. So beeinflussen Mediatoren wie der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α , Yamamoto und Gaynor, 2004), Cortisol (Zschocke et al., 2005) ebenso wie Endothelin B und neurotrophe Faktoren (Torres et al., 2003; Escartin et al., 2006) die Expression zumeist hinsichtlich einer Aktivierung des Transporters. Ca²⁺-abhängig stimuliert konnte außerdem eine signifikant erhöhte exozytotische Freisetzung von Glutamat nach Inkubation mit C3bot gemessen werden (Beitrag 2.3). Begleitet wurde diese Tatsache von einer verstärkten Expression des für die Exozytose essentiellen SNARE-Proteins Synaptobrevin. In den letzten Jahren haben sich die Evidenzen für eine Exozytosekompetenz von Astrozyten kumuliert (Bezzi et al., 2004; Cali et al., 2008). Der von uns beobachtete Effekt einer verstärkten exozytotischen Freisetzung von Glutamat dürfte sich über eine Kombination von Mechanismen erklären lassen. Zum einen gibt es Hinweise, dass es vermutlich aufgrund des vermehrten Angebots an zytoplasmatischem Glutamat auch zu einem erhöhten Transport von Glutamat in Speicherorganellen kommt (Beitrag 2.3) und somit ein erhöhtes Angebot an vesikulärem Glutamat besteht. Weiterhin existieren Belege für eine gesteigerte Exozytose nach Hemmung von Rho-Aktivität bzw. Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts in Neuronen und neuroendokrinen Zellen (Vitale et al., 1995; Bernstein et al., 1998; Harada et al., 2000). Die Inkubation mit C3bot könnte in Astrozyten eine

ähnliche Auswirkung haben. Auf welchem Weg es C3bot-abhängig zu einer verstärkten Expression von Synaptobrevin kommt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

An einem anderen glialen Zelltyp, der Mikroglia, konnte durch Behandlung mit C3bot eine Aktivierung im Sinne einer proinflammatorischen Antwort hervorgerufen werden, die qualitativ der durch LPS ausgelösten sehr ähnlich war (Beitrag 2.4). Die beteiligten Signaltransduktionswege mögen dabei unterschiedlich getriggert sein, konvergieren jedoch sowohl für die Rho-Hemmung durch C3bot (wie in Astrozyten) als auch LPS auf eine Aktivierung von NF κ B. Befunde an Zelllinien bestätigen eine Hemmung der Aktivierung von NF κ B durch RhoA im Zusammenhang mit der Freisetzung von NO (Rattan et al., 2003). Für RhoB konnte ebenso ein inhibitorischer Einfluss auf NF κ B gezeigt werden (Fritz und Kaina, 2001). Insgesamt erscheint der Beitrag inflammatorischer Kaskaden zu neuronaler Schädigung komplex. Für verschiedene neurodegenerative Krankheitsbilder, wie die Multiple Sklerose oder den Morbus Parkinson, ist der schädigende Einfluss einer mikroglialen proinflammatorischen Antwort belegt (Martino et al., 2002, Orr et al., 2002). Andererseits kann die Sekretion von Mediatoren auch neuroprotektiv wirken (Streit, 2005; Kim und de Vellis, 2005). Für mikroglial freigesetztes TNF- α ist zwar bekannt, den neuronal exprimierten Glutamat-Transporter EAAC1 hochzuregulieren. Die (neuroprotektive) Bedeutung eines gesteigerten EAAC1-vermittelten Transports für die Absenkung der extrazellulären Glutamatkonzentration und damit auch Exzitotoxizität erscheint jedoch gering, da die für die Glutathomöostase im ZNS entscheidenden astroglialen Glutamattransportsysteme im Gegensatz zu EAAC1 durch TNF- α herunterreguliert werden, und somit neuronaler Degeneration Vorschub geleistet wird (siehe Tillieux und Hermans, 2007).

3.3 C3bot als Agens zur Förderung neuronaler Regeneration: Enzymkompetent oder -defizient?

Die Bedeutung von enzymatisch aktivem C3bot ergibt sich aus der Verwendung als pharmakologisches Werkzeug zur gezielten Inaktivierung von Rho Proteinen und damit zum Verständnis Rho-abhängiger Prozesse aus zellbiologischer Sicht. Aus der Erkenntnis, dass die Aktivität von Rho im neuronalen Kontext zumeist mit der

Hemmung von Wachstumsprozessen einhergeht, resultiert der erfolgreiche Einsatz als regenerationsfördernde Substanz in eine Vielzahl von Modellsystemen. Die von uns durchgeführten Versuche belegen dies ebenfalls für primäre neuronale Dissoziationskulturen sowie organotypische *in vitro* Modelle. Gleichzeitig zeigen sie, dass der genaue Wirkmechanismus bislang unverstanden ist und auf einer Kombination von Rho-ADP-Ribosylierung sowie einer mechanistisch bislang weitgehend unbekanntem, jedoch auf eine definierte Region innerhalb des C3-Proteins von *Clostridium botulinum* beschränkte, neurotrophen Aktivität beruht. Mögliche Vorteile im therapeutischen Einsatz gegenüber dem Gesamtprotein könnten sich für C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² aufgrund des kleineren Molekulargewichts und der daraus resultierenden geringeren Immunogenität in der *in vivo* Situation ergeben. Ein zusätzlicher Vorteil könnte eine erleichterte Diffusion des Peptids in geschädigte Areale darstellen. Bedeutsam erscheint nicht zuletzt die Tatsache, dass die von uns bisher untersuchten glialen Zelltypen Reaktionen ausschließlich nach Verwendung von enzymatisch aktiven C3 Präparationen zeigten (Oligodendrozyten wurden noch nicht eingehend untersucht). Die nicht-enzymgebundene neurotrophe Aktivität scheint also spezifisch für Neurone zu sein. Vor dem Hintergrund der Induktion einer mikroglialen Aktivierung im Sinne einer proinflammatorischen Antwort, die alleine bereits zu einer Beeinflussung der Transportrate von Glutamat durch Astrozyten führt (Tillieux und Hermans, 2007), ist dieser Faktor in jedem Fall beachtenswert. Dass in der Tat eine Hemmung von Rho-Aktivität in Astrozyten auch negative Folgen für Neuritenwachstum haben kann, wurde kürzlich gezeigt. So kommt es nach Inhibition der Rho-Kinase ROCK in Astrozytenkulturen zu einer vermehrten Expression von wachstumshemmenden sauren Chondroitin-Sulfat Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix. Diese auch in glialen Narben stark vorhandenen Matrixkomponenten führten zu einem verminderten Auswachsen der anschließend auf dem Astrozytenlayer aufgebrauchten co-kultivierten Neurone (Chan et al., 2007). Auf das Axonwachstum direkt positiv wirkende Effekte sind so offensichtlich verstärkt hemmenden Einflüssen innerhalb glialer Narben entgegengestellt.

Nachfolgende Studien sollen potentielle Bindungspartner für C3bot oder C3 Peptide auf der neuronalen Plasmamembran über Bindungsassays und massenspektrometrische Methoden identifizieren, sowie mögliche Internalisierungsschritte und intrazelluläre Signalkaskaden charakterisieren. Weiterhin wird der Einsatz von C3 Peptiden

im Vergleich zum Gesamtprotein an *in vivo* Läsionsmodellen vermehrt im Fokus der weiteren Untersuchungen stehen. Aus diesen Ergebnissen sollen dann definiertere Aussagen über die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen C3 Präparationen getroffen werden.

4. Zusammenfassung

In den vorgestellten Studien wurde der Einfluss von C3 Proteinen auf die Morphologie und Funktion von Neuronen und glialen Zellen des ZNS untersucht. Im Zentrum der Untersuchungen standen dabei enzymvermittelte sowie enzymunabhängige Effekte. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass *Clostridium botulinum* C3 Protein (C3bot) neben der bekannten ADP-Ribosyltransferase Aktivität eine zusätzliche neurotrophe Aktivität aufweist, die nicht enzymatisch vermittelt ist. An murinen hippocampalen Primärkulturen konnte durch enzymkompetentes C3 Protein die Länge und die Anzahl von axonalen und dendritischen Verzweigungen gesteigert werden. Durch die Herstellung verschiedener überlappender Peptidfragmente aus der Gesamtsequenz von C3bot wurde ein Bereich innerhalb der Aminosäuren 154-182 identifiziert, der vergleichbare neurotrophe Effekte aufwies, die jedoch nicht auf einer enzymatischen Inaktivierung von Rho beruhten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die erhöhte strukturelle Komplexität hippocampaler Neurone auch von einer vermehrt ausgebildeten Anzahl synaptischer Kontakte begleitet wurde. An organotypischen Kultursystemen konnten die an dissoziierten Zellen beobachteten Effekte bestätigt und ergänzt werden. An Hirnschnitten des entorhinalen Cortex der Maus wurde sowohl durch C3bot als auch durch enzymdefizientes C3bot¹⁵⁴⁻¹⁸² das Wiederauswachsen von Axonen gesteigert. An einem hippocampal-entorhinalen Läsionsmodell konnte zudem eine verbesserte Reinnervierung von hippocampalen Zielgebieten durch Axone des entorhinalen Tractus perforans dargestellt werden. An Astrozytenkulturen konnten ausschließlich durch enzymkompetentes C3bot bzw. durch Hemmung von Rho nachgeschalteten Signalwegen fördernde Effekte auf die zelluläre Fortsatzbildung und die Migrationsgeschwindigkeit beim Wundverschluss als Modell für gliale Narbenbildung festgestellt werden. Weiterhin wiesen mit C3bot behandelte Astrozyten eine erhöhte Glutamataufnahme auf, die auf einer Rho/NFκB-abhängig induzierten Expression des glialen Glutamat-Transporters GLT-1 beruhte. Gleichzeitig wurde die Fähigkeit von Astrozyten gesteigert, vermehrt vesikulär gespeichertes Glutamat exozytotisch freizusetzen. An kultivierter Mikroglia konnte durch C3bot, ebenfalls ausschließlich enzymgebunden, eine proinflammatorische Antwort hervorgerufen werden. Eine deutliche morphologische Aktivierung wurde

begleitet von der vermehrten Freisetzung von charakteristischen Mediatoren wie NO, TNF- α und weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.

Insgesamt liefern die Ergebnisse einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der zentralen Bedeutung von Rho GTPasen für morphogenetische und funktionelle Mechanismen in Neuronen und glialen Zellen. Weiterhin konnte ein Peptid aus der Sequenz von C3bot identifiziert werden, das ein hohes Potential zur Förderung neuronaler Regeneration aufweisen dürfte.

5. Literaturverzeichnis

- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG and Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 1991, 266; 668-670
- Aktorics K, Weller U, Chhatwal GS. Clostridium botulinum type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Lett.* 1987, 212; 109-13
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-Kinase). *J. Biol. Chem.* 1996, 271; 20246-20249
- Asher RA, Morgenstern DA, Shearer MC, Adcock KH, Pesheva P, Fawcett JW. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci.* 2002, 22; 2225-36
- Barres BA and Barde Y. Neuronal and glial cell biology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000, 10; 642-648
- Bernstein BW, DeWit M and Bamberg JR. Actin disassembles reversibly during electrically induced recycling of synaptic vesicles in cultured neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998, 53; 236-251
- Bertrand J, Winton MJ, Rodriguez-Hernandez N, Campenot RB, McKerracher L. Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats. *J Neurosci.* 2005, 25; 1113-21
- Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol Dis.* 2007, 25; 65-72
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 2004, 7; 613-20
- Bishop AL and Hall A. RhoGTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 2000, 348; 241-255
- Boyer L, Turchi L, Desnues B, Doye A, Ponzio G, Mege JL, Yamashita M, Zhang YE, Bertoglio J, Flatau G, Boquet P, Lemichez E. CNF1-induced ubiquitylation and proteasome destruction of activated RhoA is impaired in Smurf1^{-/-} cells. *Mol Biol Cell.* 2006, 17; 2489-97
- Brock J, Midwinter K, Lewis J, Martin P. Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation. *J Cell Biol.* 1996, 135; 1097-107
- Burrige K and Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004, 116; 167-179

- Cali C, Marchaland J, Regazzi R, Bezzi P. SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: Imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J Neuroimmunol.* 2008, 198; 82-91
- Chan CC, Wong AK, Liu J, Steeves JD, Tetzlaff W. ROCK inhibition with Y27632 activates astrocytes and increases their expression of neurite growth-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* 2007, 55; 369-84
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 2001, 65; 1-105
- DerMardirossian C and Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 2005, 15; 356-363
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD and McKerracher L. Rho signalling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J. Neurosci.* 2002, 22; 6570-6577
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenberg MJ, Pasterkamp RJ, Gispens WH, Verhaagen J. Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp Neurol.* 2002, 175; 61-75
- Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 2006, 312; 592-6
- Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol.* 2003, 162; 233-43
- Escartin C, Brouillet E, Gubellini P et al. Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLT-1 and GLAST to raft micro-domains, and improves glutamate handling in vivo. *J. Neurosci.* 2006, 26; 5978-5989
- Etienne-Manneville S and Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002, 420; 629-635
- Etienne-Manneville S. Cdc42--the centre of polarity. *J. Cell Sci.* 2004, 117; 1291-1300
- Fischer D, Petkova V, Thanos S, Benowitz LI. Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci.* 2004, 24; 8726-40
- Fransson A, Ruusala A and Aspenstrom P. Atypical Rho Gtpases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol. Chem.* 2003, 278; 6495- 6502
- Fritz G and Kaina B. Ras-related GTPase RhoB represses NF- κ B signaling. *J. Biol. Chem.* 2001, 276; 3115-3122
- Frotscher M and Heimrich B. Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, 90; 10400-3
- Fujiwara T, Mammoto A, Kim Y and Takai Y. Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 271; 626-629

- Genth H, Gerhard R, Maeda A, Amano M, Kaibuchi K, Aktories K, Just I. Entrapment of rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J. Biol. Chem.* 2003, 278; 28523-28527
- Govek EE, Newey SE and Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 2005, 19; 1-49
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998, 279; 509-514
- Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 2005, 33; 891-5
- Harada A, Furuta B, Takeuchi K, Itakura M, Takahashi M and Umeda M. Nadrin, a novel neuron-specific GTPase-activating protein involved in regulated exocytosis. *J. Biol. Chem.* 2000, 275; 36885-36891
- Henneberger C, Kirischuk S, Grantyn R. Brain-derived neurotrophic factor modulates GABAergic synaptic transmission by enhancing presynaptic glutamic acid decarboxylase 65 levels, promoting asynchronous release and reducing the number of activated postsynaptic receptors. *Neuroscience* 2005, 135; 749-63
- Hechler D, Nitsch R, Hendrix S. Green-fluorescent-protein-expressing mice as models for the study of axonal growth and regeneration in vitro. *Brain Res Rev.* 2006, 52; 160-9
- Hu Y, Cui Q, Harvey AR. Interactive effects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci.* 2007, 34; 88-98
- Inoue S, Sugai M, Murooka Y, Paik SY, Hong YM, Ohgai H, Suginaka H. Molecular cloning and sequencing of the epidermal cell differentiation inhibitor gene from Staphylococcus aureus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, 174; 459-64
- Jaffé AB and Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005, 21; 247-269
- Jin Z and Strittmatter SM. Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci.* 1997, 17; 6256-63
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 2007, 10; 331-339
- Just I, Mohr C, Schallehn G, Menard L, Didsbury JR, Vandekerckhove J, van Damme J, Aktories K. Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by Clostridium limosum. *J. Biol. Chem.* 1992, 267; 10274-10280
- Just I, Selzer J, Jung M, Van Damme J, Vandekerckhove J, Aktories K. Rho-ADP ribosylating exoenzyme from Bacillus cereus - Purification characterization and identification of the NAD-binding site. *Biochemistry* 1995, 34; 334-340
- Kim SU and de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.*, 2005, 81; 302-13
- Kozma R, Sarnar S, Ahmed S, Lim L. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and

