

Aus dem Institut für integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Effekte der Inhibition von ROCK und Rac1 auf Neuronen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Svetla Kosarev

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2013

*Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden; es ist nicht genug, zu wollen,
man muss auch tun.*

Johann Wolfgang von Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	VII
1 ABSTRAKT	1
2 EINLEITUNG	1
2.1 Neurone.....	1
2.1.1 Zytoskelett.....	2
2.1.1.1 Mikrotubuli	2
2.1.1.2 Intermediärfilamente	2
2.1.1.3 Mikrofilamente	3
2.2 Tau.....	4
2.2.1 Struktur	4
2.2.2 Funktionen	4
2.2.3 CDK5	5
2.2.4 GSK3 β	5
2.3 Rho GTPasen.....	6
2.3.1 Struktur	7
2.3.2 Zyklus und Regulation.....	7
2.3.2.1 Guanin dissociation inhibitors (GDIs).....	8
2.3.2.2 Guanine nucleotide exchange factors (GEFs)	8
2.3.2.3 GTPase-activating proteins (GAPs).....	9
2.4 RhoA.....	9
2.5 Rac1.....	10
2.6 ROCK und Tau.....	11
2.7 Rac1 und Tau.....	12
2.8 Zielsetzung	13
3 METHODIK.....	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Chemikalien	14
3.1.2 Antikörper.....	16
3.1.3 Geräte	17
3.1.4 Kits	18
3.1.5 Materialien.....	18
3.1.6 Puffer und Lösungen.....	19
3.2 Methoden	21
3.2.1 Neuronale Zellkultur	21

3.2.2	Inkubation mit den Inhibitoren	21
3.2.2.1	GGTI286	21
3.2.2.2	ROCK-Inhibitor Y-27632	21
3.2.2.3	Rac1-Inhibitor NSC 23766	22
3.2.3	MTT-Assay	22
3.2.4	Immunofluoreszenz	23
3.2.5	Kriterien zur morphologischen Auswertung	23
3.2.6	Zellextrakte für die Analyse der Tau-Phosphorylierung	24
3.2.7	Proteinbestimmung	24
3.2.8	SDS-Page und Immunoblotting	25
3.2.9	Statistische Auswertung	26
4	ERGEBNISSE	27
4.1	Neuronales Überleben	27
4.1.1	GGTI286	27
4.1.2	ROCK-Inhibition mit Y-27632	28
4.1.3	Rac1-Inhibition mit NSC 23766	29
4.2	Immunohistochemie	30
4.2.1	Veränderungen im Mikrofilament- und Mikrotubulussystem	30
4.2.1.1	GGTI286	31
4.2.1.2	ROCK-Inhibition mit Y-27632	31
4.2.1.3	Rac1-Inhibition mit NSC 23766	31
4.3	Untersuchung der Tau-Phosphorylierung mit Westernblot	49
4.3.1	GGTI286	49
4.3.2	ROCK-Inhibition mit Y-27632	54
4.3.3	Rac1-Inhibition mit NSC 23766	59
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	65
5	DISKUSSION	67
5.1	GGT, ROCK, Rac1 und das neuronale Überleben	67
5.2	Untersuchungen zum Zytoskelett	68
5.2.1	GGT und das Zytoskelett	68
5.2.2	ROCK und das Zytoskelett	68
5.2.3	Rac1 und das Zytoskelett	69
5.3	GGT, ROCK, Rac1 und Tau	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	75
7	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	86
8	LEBENS LAUF	87

9 DANKSAGUNG..... 88

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	engl. <i>APP intracellular domain</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	engl. <i>amyloid precursor protein</i>
APPsβ	engl. <i>APP surface β</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	engl. <i>Actin-related-protein-2/3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Aβ	Amyloid-β
BCA	engl. <i>bicinchoninic acid assay</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CaaX	C = Cystein ,a = aliphatische Aminosäure, X = Serin, Methionin, Glutamin, Alanin oder Threonin
Cdc42	engl. <i>cell division protein 42 homologues</i>
CDK5	engl. <i>cyclin-dependent kinase 5</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CRMP-2	engl. <i>collapsin response mediator protein-2</i>

dd	engl. <i>double distilled</i>
DH	engl. <i>double homology</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOCK7	Dedicator of cytokinesis 7
DRF	engl. <i>diaphanous-related proteins</i>
DTT	1,4-Dithiotreit
F-Aktin	Fibrilläres Aktin
FH2	engl. <i>formin homology proteine 2</i>
FITC	engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>
g	engl. <i>gravitation</i> oder Gramm
G-Aktin	Globuläres Aktin
GAP	engl. <i>GTPase-activating protein</i>
GDI	engl. <i>Guanin dissociation inhibitors</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	engl. <i>Guanin nucleotide exchange factor</i>
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGT	Geranylgeranyltransferase
GGTI	Geranylgeranyltransferase Inhibitor
GP	Gelpuffer
GSK3 β	engl. <i>glycogen synthase kinase 3β</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HMG	3-Hydroxyl-3-Methyl-Glutaryl
HMG-CoA	3-Hydroxyl-3-Methyl-Glutaryl-CoA
kDa	Kilodalton
LDL	engl. <i>low density lipoprotein</i>

LIMK	engl. <i>LIM-domain-containing protein kinases</i>
M	molar
mA	Milliampere
MAP	engl. <i>mitogen-activated protein</i>
MAPKAP	engl. <i>mitogen-activated protein kinase-activated protein</i>
mDia	engl. <i>mammalian diaphanous</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	engl. <i>myosin light chain</i>
MLCP	engl. <i>myosin light chain phosphatase</i>
mM	Millimolar
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MSK	engl. <i>mitogen- and stress-activated protein kinase</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Umfang der Stichprobe
NaCl	Natriumchlorid
NFT	neurofibrilläre Tangles
nm	Nanometer
Op18	engl. <i>oncoprotein 18</i>
p	engl. <i>probability</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	engl. <i>p21-activated kinase</i>
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PHF	engl. <i>paired helical filaments</i>
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRK	engl. <i>protein kinase C-related kinase</i>

PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rac1	engl. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rce1	engl. <i>Ras-converting enzyme</i>
Rho	engl. <i>Ras homologues</i>
RhoA	engl. <i>Ras homologues gene family member A</i>
ROCK	engl. <i>Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase</i>
SDS	engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>
Ser	Serin
STEF	engl. <i>still life and Tiam1-like exchange factor</i>
TBS	engl. <i>tris-buffered saline</i>
Thr	Threonin
Tiam1	engl. <i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
Tris	engl. <i>tris(hydroxymethyl)-aminomethane</i>
V	Volt
WASP	engl. <i>Wiskott Aldrich syndrome proteins</i>
WAVE	engl. <i>WASP family verprolin homologues proteins</i>
WHO	engl. <i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Abstrakt

Our experiments on microtubules and microfilaments on primary mice neurons reveal new aspects regarding the cell type, tau epitopes and the duration of inhibition of GGT, ROCK and Rac1 and analyze a potential connection between that inhibition and tau hyperphosphorylation.

We showed that Rac1 and GGT are essential to neuronal survival, whereas the inhibition of ROCK had no such effect. In our immunohistochemical experiments Rac1 inhibition resulted in a reduced size of growth cones and eventually in damages of the cytoskeleton, e.g. fragmentation of dendrites and axons and damages of the phalloidin-positive f-actin structures up to the total destruction of the cells. The effects of GGT inhibition were similar to the ones with the Rac1 inhibitor except from a longer incubation period of approximately two hours of treatment. The ROCK inhibition had a slightly positive effect on the development of microfilaments in the growth cones.

In addition, we examined the connection between a specific inhibition of GGT, ROCK and Rac1 and the hyperphosphorylation of tau. In previous studies of this group on primary rat neurons there was evidence that incubation with Lovastatin and inhibition of GGT led to transient higher phosphorylation of some of the tau epitopes. Consequently, the focus of our analyses was the connection between the well-known damages on neuronal cell cultures after statin incubation and a specific inhibition of GGT, ROCK and Rac1. Hence, we analyzed if the inhibition of GGT, ROCK and Rac1 leads to a higher phosphorylation of tau as observed in the Alzheimer's disease.

Therefore, we selected to examine the tau epitopes ser262, ser202 thr205 und ser396 ser404 and incubated primary mice neurons with the inhibitor of GGT, ROCK and Rac1 for up to 24 hours and run a western blot analysis. We could not find any effect on the phosphorylation of the tau epitopes in primary mice neurons except from a reduced phosphorylation of the tau fragmentation.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten an primären Mäuseuronen geben hinsichtlich der untersuchten Zellart und Tau-Epitope sowie der Untersuchungszeiträume einen neuen Einblick in die Effekte nach spezifischer Hemmung von GGT, ROCK und Rac1 und untersuchen mögliche Zusammenhänge einer Hyperphosphorylierung von Tau.

Während Rac1 und GGT essentiell für das neuronale Überleben waren, hatte die Inhibition von ROCK keinen Effekt darauf. Bei den immunohistochemischen Experimenten der neuronalen Zellkulturen wurden nach Rac1-Inhibition zunächst kleinere Wachstumskegel beobachtet, später massive Schäden am Zytoskelett, wie z.B. die Fragmentierung der Zellfortsätze, Schäden an den Phalloidin-positiven F-Aktinstrukturen bis hin zur vollständigen Zerstörung von Zellen. Die Untersuchungen nach Hemmung von GGT zeigten die gleichen Effekte wie nach Rac1-Inhibition, wobei die beobachteten Effekte erst nach einer etwa 2h längeren Inkubationszeit im Vergleich zur Rac1-Inhibition auftraten. Die ROCK-Inhibition führte zu keinen Schäden sondern bewirkte besser entwickelte Mikrofilamente insbesondere im Bereich der Wachstumskegel.

Anschließend wurde untersucht, inwieweit die spezifische Inhibition von GGT, ROCK und Rac1 zu einer Hyperphosphorylierung von Tau führt. In einer vorherigen Publikation der Arbeitsgruppe an primären Rattenneuronen wurde gezeigt, dass die Inkubation mit Lovastatin und die Inhibition von GGT zu einem transienten Anstieg der Phosphorylierung an bestimmten Tau epitopen von Rattenneuronen führten. Ziel der Experimente war es zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den bekannten konzentrations- und zeitabhängigen Schädigungen von neuronalen Zellkulturen nach Statinbehandlung sowie GGT, ROCK und Rac1-Inhibition besteht. Dazu wurde untersucht, ob es nach Inhibition von GGT, ROCK und Rac1 zu einer erhöhten Tau-Phosphorylierung kommt wie beispielsweise bei der Alzheimerschen Krankheit.

Die Untersuchungen zur Phosphorylierung der Tau epitope Ser262, Ser202 Thr205 und Ser396 Ser404 zeigten nach Inhibition von ROCK, GGT und Rac1 und der Westernblotanalyse keine erhöhte Phosphorylierung innerhalb des untersuchten Zeitraums von 24h. Die Phosphorylierung von Tau scheint, mit Ausnahme einer Phosphorylierungsabnahme bei der Tau-Fragmentierung, nicht an den hier untersuchten Epitopen durch Inhibition von ROCK, GGT und Rac1 in primären Mäuseuronen beeinflusst zu werden.

2 Einleitung

2.1 Neurone

Neurone haben eine spezifische Grundstruktur. Ein reifes Neuron besitzt in der Regel mehrere Dendriten und ein Axon. Dendriten stellen die afferenten Strukturen eines Neurons dar, die die Signale anderer Nervenzellen empfangen. Das Axon dient hingegen als efferente Struktur eines Neurons, das die Signale des Neurons auf andere Neuronen weiterleitet. Die Fähigkeit zu dieser Polarisierung ist essentiell für die biologischen Funktionen wie die Organisation eines neuronalen Netzwerkes. Dotti und Sullivan haben die Differenzierung von einem unreifen Neuron bis zur vollen Ausbildung anhand von hippocampalen Neuronen untersucht und in fünf Phasen unterteilt. In Phase 1 werden kurze Zeit nach Aussaat der Neuronen flache, breite Lamelliopodien als Ausstülpungen der Zellmembran gebildet. In Phase 2, ab 12 Stunden nach Aussaat, entwickeln sich diese Lamelliopodien zu unreifen Zellfortsätzen. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine Polarisierung erkennbar. Aus welchem Fortsatz das Axon gebildet wird, ist noch unklar. Nach 36 Stunden erfolgt in Phase 3 ein starkes Wachstum eines Zellfortsatzes sowie dessen Differenzierung zum Axon. In Phase 4 beginnen auch die anderen Fortsätze mit dem Wachstum und es folgt die Ausbildung und Differenzierung der Dendriten. In Phase 5 bildet das Axon vermehrt Synapsen aus. Dabei entsteht ein neuronales Netzwerk (Dotti & Sullivan, 1988).

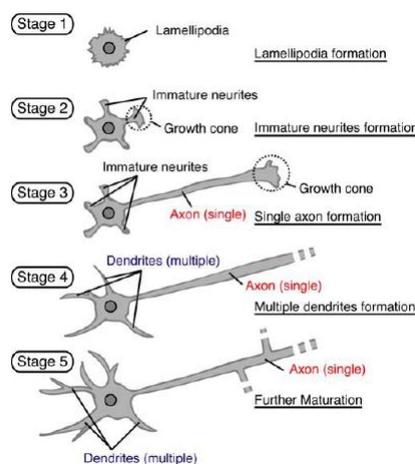


Abbildung 1-1: Dargestellt ist die Differenzierung von hippocampalen Neuronen in 5 Phasen innerhalb der ersten 7 Tage (Yoshimura et al., 2006).

2.1.1 Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein hochdynamisches System und hat zahlreiche Funktionen, z.B. die innere Stützung der Zelle, die Zellbewegung und Transportvorgänge in der Zelle. Hauptbestandteile des Zytoskeletts der Zelle sind die Mikrotubuli, die Intermediärfilamente und die Mikrofilamente.

2.1.1.1 Mikrotubuli

Die Mikrotubuli bestehen aus unverzweigten Röhren unterschiedlicher Länge mit einem Durchmesser von 25nm und einer Wandstärke von 5nm. Hauptbestandteil ist das Protein Tubulin. Es bildet Dimere aus α -Tubulin und β -Tubulin, die sich zu länglichen Protofilamenten aneinanderfügen. An α -Tubulin ist ein GDP-Molekül und an β -Tubulin ein GTP-Molekül gebunden, die Bildung der Dimere erfolgt unter Hydrolyse des GTP am β -Tubulin. 13 dieser länglichen Tubulinprotofilamente bilden die Wand eines Mikrotubulus. Jedes Protofilament besitzt ein schnell wachsendes Plus-Ende (vornehmlich mit β -Tubulin) und ein langsam wachsendes Minus-Ende (hauptsächlich bestehend aus α -Tubulin). Die dynamischen Prozesse der Polymerisation und Depolymerisation werden durch diesen Aufbau ermöglicht, z.B. beim Wachstum von Axonen. Mikrotubulus-assoziierte Proteine wie Tau stabilisieren die Mikrotubuli und beschleunigen die Polymerisation. Mikrotubuli dienen der Zellbewegung, der Aufrechterhaltung der Zellform und dem Transport von Zellorganellen und Vesikeln.

2.1.1.2 Intermediärfilamente

Die Intermediärfilamente liegen mit einem Durchmesser von 8 bis 12nm hinsichtlich ihrer Größe zwischen Mikrotubuli und Mikrofilamenten und werden deshalb als Intermediärfilamente bezeichnet. Sie bilden viele Untergruppen und werden nach ihrem Molekulargewicht unterschieden. Allen gemeinsam ist die α -helikale Struktur. Diese besteht aus einer Polypeptidkette und hat ein N- und C-terminales Ende. Zwei α -Helices verdrillen sich umeinander und bilden ein Dimer, wobei die Ausrichtung gleichsinnig ist und die Polarität erhalten bleibt. Mehrere Dimere ordnen sich ungleichsinnig zu Protofilamenten zusammen und bilden Ketten, die sich ihrerseits wieder zusammenlagern und schließlich die Intermediärfilamente bilden. Sie umgeben den Zellkern und strahlen in die Zellperipherie aus und dienen der Verteilung und dem Abbau der mechanischen Belastung. Die Intermediärfilamente sind sehr heterogen und

jeder Zelltyp bildet eigene spezifische Intermediärfilamente wie z.B. die Neurofilamente in Neuronen.

2.1.1.3 Mikrofilamente

Die Mikrofilamente haben mit 5 bis 8nm den kleinsten Durchmesser unter den drei Zytoskelettstrukturen. Der wichtigste Bestandteil ist Aktin, das in globulärer Form als G-Aktin und fibrillärer Form als F-Aktin vorkommt. Ca. 250 Moleküle G-Aktin bilden das F-Aktin, zwei Stränge F-Aktin bilden zusammen eine Doppelhelix – das Mikrofilament. Sie besitzen ein Plus-Ende, an dem unter ATP-Verbrauch die Polymerisation erfolgt, und ein Minus-Ende, an dem die Depolymerisation stattfindet. In Muskelzellen dient Aktin zusammen mit Myosin als kontraktilem Apparat. In Zellen mit geringen kontraktilem Eigenschaften, wie z.B. Neuronen, bilden die Aktinfilamente Netze. Diese dienen der Aufrechterhaltung der Zellform, der Versteifung und der Stabilität von Zellen sowie der Zellverankerung und Zellbewegung. Es gibt eine Reihe von Proteinen, die die Aktindynamik steuern. Dazu gehört Gelsolin, das kalziumabhängig die Länge der Aktinfilamente reduziert. Den gleichen Effekt hat Cofilin, das durch Depolymerisation des F-Aktin und Komplexbildung mit G-Aktin die Länge der Aktinfilamente reduziert.

In Neuronen ist die Aktinpolymerisation treibende Kraft für die Ausbildung von Wachstumskegeln, die ihrerseits als sehr dynamische Strukturen am Zellkörper der Neurone den Ursprung zur Ausbildung eines Axons darstellen. Es sind kegelförmige Auftreibungen mit zwei verschiedenen Arten von Fortsätzen: dünne, sehr lange Ausstülpungen der Zellmembran, sogenannte Filopodien, und zwischen den Filopodien liegende breitere Ausstülpungen der Zellmembran, sogenannte Lamelliopodien. In den Filopodien befinden sich Aktinfilamente, die während des Axonwachstums ständig polymerisiert und depolymerisiert werden. Es kommt dabei zu einer abwechselnden Protrusion und Retraktion der Wachstumskegel. Neben den Aktinfilamenten durchspannen zahlreiche Mikrotubuli die Axone und sorgen für Stabilität und den axonalen Transport.

2.2 Tau

2.2.1 Struktur

Tau stellt eine Familie hauptsächlich neuronaler Proteine dar. Tau entsteht durch alternatives mRNA-splicing eines Gens auf dem Chromosom 17q21.1 (Neve et al., 1986). Beim Menschen existieren 6 Isoformen mit 3 oder 4 mikrotubulusbindenden Regionen am C-terminalen Ende, mit denen Tau an die Mikrotubuli bindet. Am N-terminalen Ende befindet sich die Projektionsdomäne, über die Tau mit der Zellmembran interagieren kann (Brandt et al., 1995)

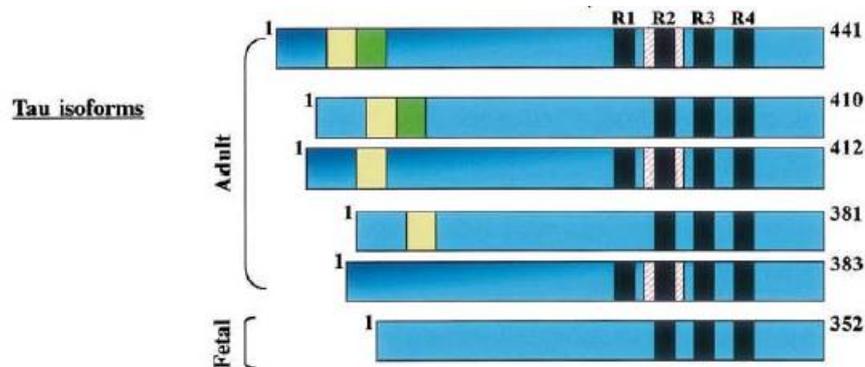


Abbildung 1-2: Dargestellt sind die 6 humanen Isoformen des Tau-Proteins. Die mikrotubulusbindenden Regionen befinden sich am C-terminalen Ende und sind mit R1, R2, R3 und R4 gekennzeichnet (Bueé et al., 2000)

2.2.2 Funktionen

Tau dient der Stabilisierung neuronaler Mikrotubuli und fördert die Polymerisation von Tubulin-Dimeren. Daneben spielt es eine Rolle bei der Anordnung der Mikrotubulifilamente (Drubin et al., 1985, Drechsel et al., 1992, Esmali-Azad et al., 1994, Trinczek et al., 1995, Panda et al., 1995). Die Funktion von Tau wird hauptsächlich über den Grad der Phosphorylierung bestimmter Epitope reguliert. So kann die Hyperphosphorylierung bestimmter Tau-epitope zur Reduktion der Tau-Tubulin-Bindung und zur Destabilisierung des Mikrotubulussystems führen (Drechsel et al., 1992). Es existieren bis zu 79 Serin-Threonin-Epitope, an denen Tau phosphoryliert werden kann. Davon werden 30 als physiologische Epitope angesehen und 25 als pathologische Phosphorylierungsstellen angesehen (Buée et al., 2000). Erkrankungen, bei denen es zur Hyperphosphorylierung und anschließenden Aggregation von Tau

kommt, werden als Tauopathien bezeichnet. Dazu zählen die Alzheimersche Krankheit, Niemann Pick Typ C, Amyotrophische Laterale Sklerose und Progressive Supranukleäre Lähmung. Die beiden am Häufigsten untersuchten Kinasen der Phosphorylierung von Tau sind die glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) und die cyclin-dependent kinase 5 (CDK5). Die gegenregulierende Phosphatase von GSK3 β und CDK5 ist die Protein Phosphatase 2A (PP2A). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Apoptose von Neuronen und der reduzierten Bindungskapazität von Tau zum Mikrotubulussystem (Davis & Johnson, 1999). Zu Beginn der Apoptose dephosphoryliert PP2A Tau (Mills et al., 1998).

2.2.3 CDK5

CDK5 ist für das neuronale Überleben und die neuronale Entwicklung essentiell (Grant et al., 2001). CDK5 wird durch die Bindung an die regulierenden Untereinheiten p35 oder p39 aktiviert. Diese beiden Proteine werden fast ausschließlich in postmitotischen Neuronen exprimiert (Tsai et al., 1994). Kalzium triggert über die kalziumabhängige Protease Calpain den Abbau von p35 und p39 zu den stabileren Formen p25 und p29 (Patzke & Tsai, 2002). Diese kürzeren Formen erhöhen die Aktivität der CDK5. Vor allem p25 ist an den pathologischen Prozessen der Tau-Hyperphosphorylierung beteiligt (Lee et al., 2000).

2.2.4 GSK3 β

GSK3 β spielt neben CDK5 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit. Es sind spezifische Epitope z.B. Ser262 und Thr231 bekannt, an denen GSK3 β Tau hyperphosphoryliert. Eine erhöhte Aktivität von GSK3 β wurde in Neuronen mit ersten Zeichen einer abnormen Hyperphosphorylierung von Tau epitopen, sogenannten pre-tangle-Neuronen, beobachtet (Muñoz-Montaño et al., 1997).

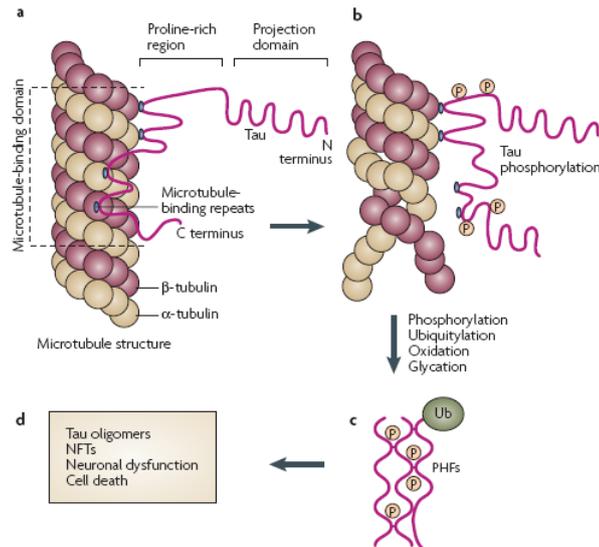


Abbildung 1-3: Dargestellt ist das Mikrotubulussystem und Tau sowie eine Hypothese wie Tau-Hyperphosphorylierung zum Zelltod führen könnte. (Mazanetz & Fischer, 2007)

- Mikrotubuli sind zylindrische Polymere aus α - und β -Tubulin: Tau ist ein mikrotubulusassoziiertes Protein in Neuronen und stabilisiert die Mikrotubuli indem es an bestimmten Stellen daran bindet.
- Die übermäßige Phosphorylierung von Tau durch Kinasen wie GSK3 β und CDK5 kann die Bindung von Tau an die Mikrotubuli verringern und so zu deren Destabilisierung führen.
- Hyperphosphoryliertes Tau dissoziiert von den Mikrotubuli und kann unlösliche Aggregate von PHF bilden.
- Als Folge dessen kann es zur Bildung neurofibrillärer Tangles kommen. Diese können ein Ursache für neuronale Dysfunktionen und schließlich Zelltod sein.

2.3 Rho GTPasen

Die Rho GTPasen gehören zur Ras-Superfamilie und sind Bestandteile aller eukaryotischen Zellen. Sie wurden 1985 erstmals als Rho (Ras homologues) in der Seeschnecke *Aplysia California* beschrieben (Madaule & Axel, 1985). Mindestens 9 Rho GTPasen sind bisher in Säugetieren bekannt, einige in mehreren Isoformen: Rho (A, B, C), Rac (1, 2, 3), Cdc 42 (Cdc42Hs, G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, TC10, TTF. Die am Besten untersuchten sind RhoA, Rac1 und Cdc42 (Ridley, 2000).

2.3.1 Struktur

Rho GTPasen sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 bis 30kDa. Strukturell stimmen sie zu 50% bis 55% miteinander überein. Die meisten GTPasen bestehen nur aus der GTPase-Region und kurzen N- oder C-terminalen Enden und durchlaufen posttranslational eine Modifikation durch Isoprenoide am C-terminalen Ende (Wennerberg & Der, 2004). Rho GTPasen werden durch die Membranassoziation aktiviert, d. h. wenn eine Prenylierung posttranslational stattgefunden hat (Magee & Marshall, 1999). Diese erfolgt am C-terminalen Ende an der CaaX-Box. Die CaaX-Box besteht aus Cystein, zwei aliphatischen Aminosäuren, sowie dem X das für Serin, Methionin, Glutamin, Alanin oder Threonin stehen kann. Die Abspaltung des aaX erfolgt durch die Endoprotease Rce1, der Cysteinrest wird mit seiner Carboxylgruppe carboxymethyliert (Kawata et al., 1990, Stephenson & Clarke, 1990). Die meisten Rho GTPasen werden durch die Geranylgeranyltransferase geranylgeranyliert (20 C-Atome) (Harris & Poulter, 2000, Guida et al., 2005). Daneben existieren jedoch auch Rho GTPasen wie Rnd, die durch die Farnesyltransferase farnelysiert (15 C-Atome) werden (Adamson et al., 1992).



Abbildung 1-4: Gezeigt wird am Beispiel von Rac1 die Struktur der Rho GTPasen. Der C-Terminus wird posttranslational für die Membranassoziation geranylgeranyliert und carboxymethyliert (Wennerberg & Der, 2004).

2.3.2 Zyklus und Regulation

Wie alle Vertreter der Ras-Superfamilie können die Rho GTPasen zwischen einem aktivierten GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand wechseln. Die Hydrolyse von GTP wird durch 3 Proteinklassen gesteuert. Guanin dissociation inhibitors (GDIs) inhibieren die Aktivierung der GTPasen. Guanin nucleotide exchange factors (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und aktivieren die Rho GTPasen. Die Hydrolyse vom GTP und damit die Inaktivierung erfolgt durch die GTPase-activating proteins (GAPs) (Aspenström et al., 1999).

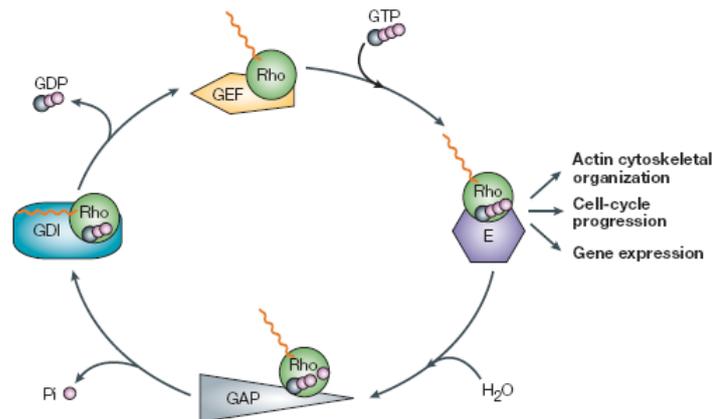


Abbildung 1-5: Dargestellt ist der Zyklus zwischen aktivem und inaktivem Zustand der Rho GTPasen. An GDIs gebunden, sind sie im Zytosol und inaktiv. Orange dargestellt ist das isoprenylierte Ende, das von den GDIs abgeschirmt wird. GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und führen zur Aktivierung der vielfältigen Funktionen der Rho GTPasen. Die Hydrolyse und damit die Inaktivierung wird wiederum von GAPs katalysiert (Rossman et al., 2005).

2.3.2.1 Guanin dissociation inhibitors (GDIs)

Bisher wurden beim Menschen 3 GDIs beschrieben, die mit RhoA, Rac1, Rac2 und Cdc42 interagieren (Garcia-Mata et al., 2011). 3 Mechanismen wirken über die GDIs. Sie haben eine hohe Affinität zu GTPasen und bilden mit ihnen einen Komplex im Cytosol, bei dem das isoprenylierte, hydrophobe Ende der GTPase, das für die Aktivierung mit der Membran interagieren muss, abgeschirmt wird. Weiterhin hemmen GDIs direkt GEFs und damit die Aktivierung der Rho GTPasen durch GEFs. Sie blockieren die Signaltransduktion von aktivierten GTPasen und die Interaktion mit Effektorproteinen. Wird die Rho GTPase rezeptorvermittelt aktiviert, transloziert der Komplex aus Rho GTPase und GDI an die Plasmamembran (Dransart et al., 2005).

2.3.2.2 Guanine nucleotide exchange factors (GEFs)

Der nächste Schritt wird als geschwindigkeitsbestimmend bei der Aktivierung der Rho GTPasen angesehen. An der Plasmamembran löst sich die GTPase vom GDI und es erfolgt der Austausch von GDP gegen GTP. Diese Reaktion ist sehr langsam und wird von GEFs katalysiert, indem sie den GDP-freien Zustand der Rho GTPase stabilisieren. Unterstützt durch die intrazellulär hohe Konzentration von GTP kommt es zu einer Aktivierung der GTPase. Mehr als 60 GEFs sind bisher bekannt. Sie haben eine DH-Domäne (double homology), die den Austausch von GDP zu GTP katalysiert. Eine

Pleckstrin-Domäne direkt neben der DH-Domäne dient der Regulation der GEFs (Buchsbaum 2007).

2.3.2.3 GTPase-activating proteins (GAPs)

Rho GTPasen haben eine intrinsische GTPase-Region, an der die Hydrolyse von GTP stattfindet. Da diese Reaktion langsam verläuft, wird sie von GAPs katalysiert. Bei der Bindung von GAPs mit einer GTPase erfolgt zwischen den beiden Molekülen eine Rotation um 20°, die es einem „Argininfinger“ ermöglicht, in das aktive Zentrum der GTPase zu gelangen und das Übergangsstadium bis zur Bindung von GDP zu stabilisieren (Bishop & Hall, 2000). Im Zuge dessen erfolgt die Inaktivierung der GTPase. Diese löst sich von der Membran und befindet sich anschließend wieder inaktiviert im Zytosol (Bernards & Settleman, 2004).

2.4 RhoA

Die Rho GTPase RhoA hat ein Molekulargewicht von 24kDa. Die CaaX-Box des RhoA besteht aus den Aminosäuren Cystein, Leucin, Valin und Leucin und wird im Cytosol durch die Geranylgeranyltransferase am C-terminalen Ende geranylgeranyliert (Katayama et al., 1991). Anschließend wird RhoA carboxymethyliert. In dieser Form erfolgt die Membranassoziiierung und in Folge dessen die Signaltransduktion (Lane & Beese, 2006). Hauptfunktion von RhoA in Neuronen ist die Inhibition des Wachstums von Dendriten und Axonen durch Effektormoleküle. RhoA fördert die Polymerisation von Aktinfilamenten, die Inhibition der Mikrotubulipolymerisation und die Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Die am Besten untersuchten Zielproteine von RhoA sind die Rho-associated coiled-coil-containing protein kinases (ROCKs). Es existieren 2 Isoformen, wobei ROCK2 vornehmlich in neuronalem und kardialem Gewebe auftritt, ROCK1 hingegen in allen anderen Gewebearten. ROCKs besitzen 3 Domänen: eine Bindungsdomäne für RhoA, eine katalytische und eine weitere, die die Proteinlokalisierung steuert. Durch die Bindung von RhoA an die entsprechende Domäne wird ROCK aktiviert (Riento & Ridley, 2003). Ein gut untersuchter ROCK-Effektor ist MLCP (myosin light chain phosphatase). Sie wird durch ROCK zum Einen auf direktem Wege phosphoryliert, zum Anderen phosphoryliert ROCK die MLC (myosin light chain), die wiederum MLCP phosphoryliert. In beiden Fällen kommt es durch phosphoryliertes MLCP zur erhöhten Kontraktilität und zur Aktin-Kabel-Bildung sowie in der Folge zu

vermehrter Stressfaser-Bildung (Noda et al., 1995, Somlyo & Somlyo, 2000). ROCK phosphoryliert und aktiviert die LIM-domain-containing protein Kinasen 1 und 2 (LIMK1/2) mit der Folge, dass Cofilin von LIMK1/2 phosphoryliert und die F-Aktin-Depolymerisation unterdrückt wird (Maekawa et al., 1999). mDia (mammalian diaphanous) ist ebenfalls ein RhoA-Effektor und bildet nach Aktivierung lange, dünne Aktin-Stressfasern aus vielen dicht gepackten F-Aktin-Bündeln, die das Neuron durchziehen (Alberts et al., 1998). In Neuronen ist das collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) für die Mikrotubuli wichtig, da es Tubulinheterodimere bindet und deren Anlagerung an das plus-Ende der Mikrotubuli fördert. CRPM-2 wird durch ROCK phosphoryliert und inaktiviert. Dabei kommt es zur Degeneration der Wachstumskegel in Neuronen (Fukata et al., 2002). Ein anderer ROCK Effektor sind die Mikrotubulus-assoziierten-Proteine (MAPs) wie Tau oder MAP2, die eine wichtige Rolle bei der Formation im Mikrotubulussystem übernehmen. Werden MAPs oder Tau von ROCK phosphoryliert, sinkt die Polymerisation der Mikrotubuli (Riento & Ridley, 2003).

2.5 Rac1

Rac1 wird ubiquitär exprimiert und geranylgeranyliert. In Neuronen fördert Rac1 das Wachstum von Axonen (Kunda et al., 2001, Chuang et al., 2005, Da Silva et al., 2005). Die Rac-spezifischen GEFs Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) und das Tiam1-verwandte Protein STEF (engl. still life and Tiam1-like exchange factor) sind für die Aktindynamik am wachsenden Axon durch Rac1 Aktivierung verantwortlich (Kunda et al., 2001). Rac1 kontrolliert dabei die Aktinpolymerisation während der Bildung von Lamelliopodien über verschiedene Mechanismen. Lamelliopodien sind lange Zellausstülpungen, die beispielsweise bei der Entstehung eines Wachstumskegels in Neuronen gebildet werden. Sie werden von Aktinnetzen durchzogen, deren Bildung durch Rac1 gesteuert wird. Rac1 aktiviert über die WAVE Proteine (WASP family verprolin homologues proteins, Wiskott Aldrich syndrome proteins) den Actin-related-protein-2/3-Komplex (Arp2/3) und führt so zur Aktinpolymerisation. Dies erfolgt durch Aufhebung der Autoinhibition des Arp2/3-Komplexes mit nachfolgender peripherer Aktinpolymerisation durch Anlagerung an den Seiten und Enden von bestehenden Aktinfilamenten sowie durch den Aufbau von neuen Aktinfilamenten (Eden et al., 2002). Die Aktinpolymerisation wird durch die Formin-Proteine induziert, im Speziellen durch die diaphanous-related proteins (DRF) mDia1

und mDia2. Rac1 hebt auch hier die Autoinhibition der DRF auf und es kommt zur Exposition der FH2-Domäne der DRF, die an das Aktinfilament bindet und Aktin-Monomere daran polymerisiert (Zigmond, 2004). Die Polymerisation kann mehrere Male wiederholt werden. Währenddessen bleibt das DRF dabei permanent gebunden. Auch durch die Hemmung von Cofilin führt Rac1 zur Aktinpolymerisation, indem die Anzahl der Zyklen der Aktinpolymerisation erhöht werden. Darüber hinaus wirkt Rac1 aktivierend auf die Serin/Threonin Kinase PAK (p21-activated kinase). Diese phosphoryliert die LIM-Kinase, die wiederum Cofilin phosphoryliert und inhibiert. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Aktinpolymerisation (Wang et al., 2007). Ein weiterer Effektor von Rac, das IQGAP1 (Rac1 GAP mit IQ-Domäne), bindet direkt an die Aktinfilamente und vernetzt sie (Aspenström, 1999). Durch Rac-spezifische GEF DOCK7 kann Rac1 auch Einfluss auf die Mikrotubuli nehmen. Dabei inhibiert Rac1 das Mikrotubulus-destabilisierende Protein Stathmin/Op18 und es kommt zum Axonwachstum durch Polymerisation der Mikrotubuli (Watabe-Uchida et al., 2006).

2.6 ROCK und Tau

Zwischen ROCK, dem Haupteffektor von RhoA, und Tau bestehen Zusammenhänge in der Signaltransduktion. Ein gemeinsamer Effektor von ROCK und GSK3 β ist CRMP-2. Sowohl ROCK als auch GSK3 β sind an der Phosphorylierung und Inaktivierung von CRMP-2 beteiligt und beeinflussen die neuronale Polarität, indem sie die Polymerisation der Mikrotubuli inhibieren (Yoshimura et al., 2005). In Untersuchungen wurde der Ansatz beschrieben, diesen Signaltransduktionsweg GSK3 β /CRMP-2 als therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Alzheimer zu nutzen (Yoshimura et al., 2006). Weiterhin existieren auch andere Verbindungen zwischen ROCK und Mikrotubuli. In mit nerve-growth factor stimulierten PC12 Zellen konnte gezeigt werden, dass CRMP-2 sowohl von ROCK als auch von CDK5 phosphoryliert und inaktiviert wird. Dadurch wird die Polymerisation der Mikrotubuli behindert (Patrakitkomjorn et al., 2008). CRMP-2 scheint durch seine Verbindungen zu ROCK, GSK3 β und CDK5 ein stark regulierender Faktor für die Phosphorylierung und Destabilisierung der Mikrotubuli zu sein. Des Weiteren wurde in retinalen Ganglionzellen gezeigt, dass CDK5 und ROCK einen wahrscheinlich parallelen oder sogar z. T. gemeinsamen Signaltransduktionsweg haben, der die Organisation des Zytoskeletts im Axon inhibiert (Cheng et

al., 2003). Eine Inhibition von ROCK würde demzufolge einen positiven Effekt auf die Mikrotubuli haben.

2.7 Rac1 und Tau

Neben ROCK hat auch Rac1 einige Verbindungen zu Tau. So ist CDK5 ein Effektor von Rac1 und wird von ihm genutzt, um WAVE zu phosphorylieren und damit die Aktinpolymerisation zu fördern (Sanchez et al., 2009). Auch der Komplex aus CDK5/p35 ist ein Rac1-Effektor, der die PAK-Aktivität inhibiert und somit Einfluss auf die Regulation des Zytoskeletumbaus während des Neuritenwachstums ausübt (Nikolic et al., 1998).

2.8 Zielsetzung

In einer vorherigen Publikation der Arbeitsgruppe (Meske et al., 2003) an primären Rattenneuronen wurde nach der GGT-Inhibition und entsprechend aller geranylgeranylisierbaren GTPasen ein transientser Anstieg der Phosphorylierung von Tau am Epitop Ser199/202 festgestellt. Amano und Kollegen konnten ebenfalls einen Anstieg der Phosphorylierung einiger Tau-Epitope nach ROCK-Inhibition beobachten. In Folge dessen war die Stabilisierung der Mikrotubuli durch Tau reduziert (Amano et al., 2003). Neben diesen beiden Untersuchungen gab es keine weiteren Arbeiten zum Zusammenhang der Inhibition von GGT, ROCK und Rac1 und einer Hyperphosphorylierung von Tau.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten sollen hinsichtlich der untersuchten Zellart und Tau-Epitope sowie der Untersuchungszeiträume einen neuen Einblick in die Effekte nach spezifischer Hemmung von GGT, ROCK und Rac1 geben und mögliche Zusammenhänge einer Hyperphosphorylierung von Tau untersuchen.

Zunächst sollte das neuronale Überleben unter GGT-, ROCK- und Rac1-Inhibition getestet werden. Durch die GGT-Inhibition sollten die Auswirkungen der Inaktivierung aller geranylgeranylisierbaren GTPasen auf Mikrotubuli und Mikrofilamente untersucht werden. Auf Grundlage der spezifischen Hemmung von ROCK und Rac1 sollten dann die Effekte auf das neuronale Zytoskelett differenziert aufgezeigt werden. Anschließend sollten in immunohistochemischen Färbungen die beiden wichtigsten Komponenten des Zytoskeletts (Mikrotubuli und Mikrofilamente) nach Inkubation mit den unterschiedlichen Inhibitoren dargestellt werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die spezifische Inhibition von GGT, ROCK und Rac1 zu einer Hyperphosphorylierung von Tau führt.

3 Methodik

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	J.T. Baker, Philippsburg, USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dithiotreit (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Sigma, St. Louis, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hepes	Serva, Heidelberg, Deutschland
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Philippsburg, USA
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumfluorid	Sigma, St. Louis, USA
Neurobasal-Medium mit B27 Supplement	Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Okadaic Acid	Sigma, St. Louis, USA
Orthovanadat	Sigma, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS)	Biochrom, Cambridge, UK
Poly-D-Lysin	Sigma, St. Louis, USA
Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinaseinhibitor	Complete, Santa Cruz, USA
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serva Blue	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Temed	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vectashield	Vector, Burlingame, USA

3.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
12E8	Athena Neurosciences, Worcester, USA
488 anti-mouse Alexa Fluor	Molecular Probes, Eugene, USA
Anti- β -Tubulin	Sigma, San Diego, USA
Anti-Aktin-Antikörper	Sigma, San Diego, USA
Anti-Mouse Peroxidase labelled IgG	Vector, Burlingame, USA
Anti-Rabbit Peroxidase labelled IgG	Vector, Burlingame, USA
Anti-Tau-5	Chemicon International, Billirica, USA
AT-8	innogenetics, Gent, Belgien
FITC-Phalloidin	Sigma, San Diego, USA
GGTI286	Calbiochem, San Diego, USA
High-Range Rainbow Molekular Marker	Amersham Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PHF-1	Zur Verfügung gestellt von Peter Davis
Rac1-Inhibitor NSC 23766	Calbiochem, San Diego, USA
Rainbow-Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ROCK-Inhibitor Y-27632	Calbiochem, San Diego, USA

3.1.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Nuaire, Fernwaldt, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Feinwaage Explorer	OHaus, Pine Brooke, USA
Heizblock TCR100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lamin Air HP72	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrozentrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop IX70	Olympus, Tokio, Japan
Mini-Protean I und II für Mini-Gele	Bio-Rad, Hercules, USA
pH-Meter 211	HANNA, Woonsocket, USA
Photometer Universal Microplate Reader	Bio Tek, Winooski (Vermont), USA
Rubber – Policeman	TRP, Hereford, UK
Rührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Rüttler KS15	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Stromversorgungsgerät Power Pac 200, 300	Bio-Rad, Hercules, USA
Trans-Blot-SD, Semi dray transfer cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Ultrasonic Prozessor	Hielscher Ultrasound Technology, Ringwood, USA
Zentrifuge 5804R, Rotor F-45-30-11	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Entwickler X-Omat EXII	Kodak, Rochester, USA
Fixierer RP X-Omat LO A-C	Kodak, Rochester, USA
Chemieluminiszenzsubstrate Western Lightning Plus	Perkin Elmer, Waltham, USA
Albumin Standard Reihe	Pierce, Rockford, USA

3.1.5 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
12-well-Platten	Falcon, Colorado Springs, USA
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Waltham, USA
Microtiterplatte 96-well	Falcon, Colorado Springs, USA
Objektdeckgläschen	Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Deutschland
Overhead Transparencies	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
PVDF-Membran	Corporate Express, Broomfield, USA
Reaktionsgefäße 1,5ml; 0,5ml	Milipore, Billirica, USA
Whattmanpapier	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturflaschen	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 14ml, 50ml	Falcon, Colorado Springs, USA

3.1.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
4xSDS-Sample-Puffer	4ml destilliertes Wasser 1ml 0,5M Tris pH 6,8 0,8ml Glycerin 1,6ml 10% SDS 0,2ml 0,3% Bromphenolblau 0,4ml Mercaptoethanol
Gelpuffer I	45,41g Tris 1g SDS 100ml 1N HCl auf 250ml mit destilliertem Wasser auffüllen pH 8,8
Gelpuffer II	15,14g Tris 1g SDS 50ml 1N HCl auf 250ml mit dd H ₂ O auffüllen pH 6,8
15% Trenngel	dd H ₂ O 4,05ml GP I 2,7ml 40% Acrylamid 4,05ml + 100-200µl 10% APS + 5,4µl Temed
Sammelgel	dd H ₂ O 3,14ml GP II 1,25ml 40% Acrylamid 0,56ml +100µl 10% APS + 5µl Temed

Methodik

10% Trenngel	dd H ₂ O 5,4ml GP I 2,7ml 40% Acrylamid 2,7ml
Elpho Laufpuffer 10x	60,6g Tris 288g Glycin ad 2000ml dd H ₂ O
Elpho Laufpuffer 1x	100ml 10x Elpho Laufpuffer 10ml 10% SDS-Lösung (50g SDS ad 500ml dd H ₂ O) ad 1000ml dd H ₂ O
Blottingpuffer	5,8g Tris 2,9g Glycin 3,7ml aus 10% SDS 200ml MeOH ad 1000ml dd H ₂ O
TBS 10x	49,4g Tris 174g NaCl ad 1000ml dd H ₂ O, pH 7,4
TBST 10x	TBS (1000ml) 1ml Tween, pH 7,4
Serva Blue	4 Tabletten (Brilliant Blue G) 100ml Ethanol 125ml H ₂ O 25ml Eisessig

3.2 Methoden

3.2.1 Neuronale Zellkultur

Den anästhetisierten, trächtigen black-six-Mäusen wurden Mäuseembryonen für die neuronalen Zellkulturen entnommen. Für die Westernblotanalyse wurde 1 Kortex für eine sterile Poly-D-Lysin beschichtete Zellkulturflasche (23cm²) mit einer Aussaatdichte von 10.000 Zellen/cm² verwendet. Für immunohistochemische Untersuchungen wurden die Neuronen auf sterilen, mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern (Durchmesser 2cm) gezüchtet. Die Zellen wuchsen im zellfreien Neurobasal-Medium mit B27 Supplement und 0,5mM Glutamin. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit (5% CO₂) kultiviert.

3.2.2 Inkubation mit den Inhibitoren

Es wurden zunächst Stammlösungen der Inhibitoren GGTI286, Y-27632 und NSC 23766 mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO hergestellt. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte 7 Tage nach Aussaat der Neuronen. Bei der Zugabe der Inhibitoren wurde 0,5ml Medium hinzugefügt. Bei der Berechnung der Inhibitormengen zur Einstellung einer bestimmten Konzentration wurde das entsprechend berücksichtigt. Es wurde darauf geachtet, keimfrei zu arbeiten und die Kulturen bei der Inkubation mit den Inhibitoren so kurz wie möglich außerhalb des Brutschranks zu halten.

3.2.2.1 GGTI286

GGTI286 ist ein selektiver Inhibitor der Geranylgeranyltransferase. Die ausbleibende Isoprenylierung der GTPasen führt dazu, dass die zur Aktivierung benötigte Membranassoziation nicht stattfindet und somit die kleinen GTPasen gehemmt werden.

3.2.2.2 ROCK-Inhibitor Y-27632

ROCK-Inhibitor Y-27632 inhibiert konzentrationsabhängig gleichermaßen die Haupteffektoren von RhoA, ROCK1 und ROCK2.

3.2.2.3 Rac1-Inhibitor NSC 23766

NSC 23766 ist ein Rac1-spezifischer Inhibitor. Alle Rac1-spezifischen GEFs werden von NSC 23766 konzentrationsabhängig kompetitiv gehemmt und die Aktivierung von Rac1 bleibt aus. In vitro wird bei einer Konzentration von 50µM die Aktivierung von Rac1 zu 50% gehemmt. In Fibroblasten führt die Behandlung mit 100µM NSC 23766 zur vollständigen Inaktivierung von Rac1. Dabei ist Rac1 stärker als in unbehandelten Kontrollen an GDP gebunden. Dieser Inhibitor greift nicht in die Reaktionsketten von anderen, kleinen GTPasen wie RhoA oder Cdc42 ein und ist aus diesem Grund für die Untersuchung spezifischer Effekte der Rac1-Inhibition zur Untersuchung des Zytoskeletts gut geeignet (Gao et al., 2004).

3.2.3 MTT-Assay

Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Formazan. Dieses wird aus den Zellen herausgelöst und die Menge photometrisch bestimmt. Dabei korreliert die gemessene Konzentration an Formazan mit der Zellvitalität.

Es wurde eine Stammlösung aus 5mg MTT und 1ml PBS hergestellt, wobei die Endkonzentration bei der Behandlung pro well 25µg/ml war. Die Inkubation erfolgte für 1,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Danach wurden pro well 750µl von einer Lösung (1% HCl 37%ig, 99% Isopropanol) dazugegeben und die wells für 15 Minuten auf den Rüttler gestellt. 180µl wurden von jedem well auf eine 96-well-Platte pipettiert und die Extinktion bei 562/630nm photometrisch bestimmt.

Die Neuronen wurden in 12-well-Platten mit den Inhibitoren RhoA-Kinase-Inhibitor Y-27632 in der Konzentration 1µM, 10µM, 50µM, 100µM; Rac1-Inhibitor NSC 23766 in den Konzentrationen 5µM, 10µM, 25µM, 50µM, 75µM, 100µM und GGTI286 in der Konzentration 10µM zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h) behandelt. Bei der Zugabe der Inhibitoren wurde 0,5ml Medium gewechselt.

3.2.4 Immunofluoreszenz

Die Neuronen wurden auf sterilen, mit Poly-D-Lysin beschichteten runden Glasplättchen (2cm Durchmesser) in 12-well-Platten gezüchtet und mit den Inhibitoren RhoA-Kinase-Inhibitor Y-27632 in der Konzentration 50 μ M, Rac1-Inhibitor NSC 23766 in der Konzentration 50 μ M und GGTI286 in der Konzentration 10 μ M zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h) behandelt. Sie wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Neuronen 3x für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen, um Rückstände des Formaldehyds zu entfernen. Es erfolgte für 10 Minuten die Inkubation mit PBS mit 0,1% TritonX 100 und 1,5% BSA. Die Neuronen wurden anschließend erneut 3x für jeweils 10 Minuten in PBS mit 1,5% BSA gewaschen. Schließlich wurde für 1h mit dem Antikörper Anti- β -Tubulin 1:500 in PBS mit 1,5% BSA und anschließend mit FITC-Phalloidin 1:1000 inkubiert. Die Neuronen wurden dann 3x für jeweils 15 Minuten mit PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte erfolgten unter abgedunkeltem Licht. Die Neuronen wurden mit dem Antikörper 488 anti-mouse Alexa Fluor bei einer Verdünnung von 1:500 in PBS für 1 Stunde inkubiert und danach 3x für jeweils 15 Minuten in PBS gewaschen. Dieser Antikörper ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Die kleinen Glasplättchen mit den Neuronen wurden von den 12-well-Platten auf den mit Vectashield beschichteten Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt.

3.2.5 Kriterien zur morphologischen Auswertung

Zur Dokumentation der morphologischen Veränderungen wurden von jedem Präparat Übersichtsaufnahmen mit 20-facher Vergrößerung und Detailaufnahmen mit 40-facher Vergrößerung gemacht. Die Zellen bei den Detailaufnahmen lagen naturgemäß im Randbereich der Präparate. Es wurden jeweils Aufnahmen der Tubuli mit β -Tubulinfärbung (rot) und Aktinfärbungen mit FITC-gekoppelten Phalloidin (grün) angefertigt. Mit Hilfe des Programms J-Image wurden die Vergrößerungen der Bilder des Aktin und Tubulin übereinander gelagert, um ein besseres Verständnis der Veränderungen des Zytoskeletts zu erhalten.

3.2.6 Zellextrakte für die Analyse der Tau-Phosphorylierung

Zunächst wurden PBS und Extraktionspuffer auf 4°C gekühlt. Die Zellkulturflaschen wurden mit 5ml PBS gespült und die gesamte Flüssigkeit wurde durch Schleudern wieder entfernt. Dann wurden 500µl des Probenpuffers in die Flaschen gegeben und die Zellen mit Rubber-Policeman abgekratzt. Der gesamte Inhalt der Flaschen wurde in vorgekühlte 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und mit zum Aufschluss der Zellen mit 30 Stößen á 0,5 Sekunden bei 100 Watt Leistung mit Ultraschall behandelt. Die erste Zentrifugation zur Entfernung der Zellkerne erfolgte für 3 Minuten bei 4°C und 1000 x g. Der Überstand wurde in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Um Zelltrümmer auszusortieren, wurden die Zellen noch einmal 15 Minuten bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert und der Überstand erneut in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurden 50µl vom Gesamtvolumen für die Proteinbestimmung abgenommen und tiefgefroren. Zur Denaturierung wurden die übrigen 450µl mit 150µl 4xSDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock erwärmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

3.2.7 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Kit nach Herstellerangaben. Dem BCA-Reaktionsprinzip liegt zu Grunde, dass die Peptidbindungen der Proteine im alkalischen Milieu zweiwertige Kupferionen reduzieren. Diese bilden mit Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex mit blauer Farbe, dessen Menge bei einem Absorptionsmaximum von 562nm bestimmt wird.

Jede 10µl Probe wurde mit 30µl destilliertem Wasser verdünnt. 10µl dieser Verdünnung wurden zusammen mit 180µl des BCA-Kits (Verdünnung der beiden Komponenten 1:50) auf eine 96-well-Platte pipettiert. Jede verdünnte Probe wurde jeweils dreifach aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten im Brutschrank. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch bestimmt. Die Eichkurve wurde mit Hilfe einer linearen BSA Verdünnungsreihe erstellt. Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel.

3.2.8 SDS-Page und Immunoblotting

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden Proteine auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe, ihrer Ladung und der Beschaffenheit des Trennmediums gegeneinander aufgetrennt. SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine und sorgt mit dem enthaltenen DTT zur Auflösung von Disulfidbrücken der Proteine. Die Auftrennung erfolgt nur noch anhand ihrer Größe und des Molekulargewichtes. Anschließend können sie angefärbt und im Westernblot dargestellt werden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10% Polyacrylamidgel für alle Tau Proteine. Die mit 4xSDS-Probenpuffer versetzten Proben der Tau Proteine wurden mit 1xSDS-Probenpuffer auf eine Proteinkonzentration von 0,4µg/µl verdünnt. Alle Proben wurden 3 Minuten bei 65°C erhitzt. Die Trenngele wurden mit Sammelgelen überschichtet und mit 15 Auftragstaschen gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde mit Laufpuffer gespült. Pro Tasche wurde 1µg Protein aufgetragen. Eine Tasche wurde mit Rainbow-Molekulargewichtsmarker beladen, die beiden äußeren Taschen blieben frei. Die Gele wurden in eine mit Elpho-Laufpuffer gefüllte Anodenkammer gehängt. Im Sammelgel betrug die Spannung 60V, im Trenngel 120V. Der Transfer der Proteine von den Minigelen auf eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) erfolgte in einer Semi-Dry-Blotkammer für 50 Minuten bei 15V Spannung und bei einer Stromstärke von 200 mA. Die Blockierung unspezifischer Bindungstellen wurde 1 Stunde in 10% Magermilchlösung in TPBS vorgenommen. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper in 3% Milchpulver/TBST in den Verdünnungen Tau-5 1:3000, 12E8 1:1000, AT-8 1:1000 und PHF-1 1:1000 inkubiert. Die Membranen wurden 3x für 10 Minuten in TBST gewaschen, dann 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper 1:4000 Anti-Mouse Peroxidase IgG in TBST inkubiert und wiederum 3x für 10 Minuten in TBST gewaschen. Die Membranen wurden 1 Minute in Enhanced chemiluminescence substrate reagent inkubiert, ein Autoradiographiefilm in einer Dunkelkammer damit für 5 Sekunden belichtet und anschließend entwickelt. Um Beladungsunterschiede in der Proteinmenge zu messen, wurden die Membranen zusätzlich mit einem Anti-Aktin-Antikörper untersucht. Dazu wurden die Membranen nochmals 3x für 10 Minuten in TBST gewaschen und mit dem Anti-Aktin-Antikörper in der Verdünnung 1:500 für 2h bei Raumtemperatur in 3% Milchpulver/TBST inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3x in TBST gewaschen und mit dem 2. Antikörper 1:4000 Anti-Rabbit

Peroxidase IgG inkubiert. Danach wurden die Membranen 3x für 10 Minuten in TBST gewaschen und für 1 Minute in Enhanced chemiluminescence substrate reagent inkubiert, ein Autoradiographiefilm in einer Dunkelkammer damit für 5 Sekunden belichtet und anschließend entwickelt. Zur Kontrolle wurden die Blots mit Serva Blue Färbung gefärbt und zur Quantifizierung des Proteingehalts der Film eingescannt sowie die Banden (Fläche und optische Dichte) mit dem Programm ImageJ (National Health Institute, USA) ausgewertet.

Da die Inkubation mit einigen der Inhibitoren erwartungsgemäß zu massiven Zellschäden führt, war die Qualität der Proteine mit zunehmender Behandlungsdauer reduziert wird. Aus diesem Grund wurden nach Messungen der Proteinnengen die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben angeglichen. Weiterhin wurde zur Analyse der phosphorylierungsabhängigen Epitope zunächst die Taugesamtmenge mittels Tau-5 Antikörper bestimmt. In mehreren Schritten wurde die Taugesamtmenge in allen Proben angeglichen. Um dennoch auftretende Schwankungen der Proteinbeladung zu detektieren, wurde Aktin als „Markerprotein“ in allen Proben analysiert. Traten Schwankungen der untersuchten phosphorylierungsabhängigen Epitope auf, so wurden diese nur dann als signifikant erachtet, wenn keine entsprechenden Schwankungen in der Aktinbeladung in der gleichen Probe auftraten.

3.2.9 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurde mit dem Programm Microsoft Excel gearbeitet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Student T-Tests auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde ein p-Wert $<0,05$ als signifikant gewertet. In den Grafiken wurden die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

4 Ergebnisse

Die Neuronen wurden unter den angegebenen Zellkulturbedingungen mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät und gezüchtet. Die Behandlung erfolgte 7 Tage nach der Aussaat. Die Zellkulturen wurden zu Beginn der Versuche unter dem Mikroskop untersucht, zur Anwendung kamen nur Zellkulturen ohne morphologische Auffälligkeiten.

4.1 Neuronales Überleben

4.1.1 GGTI286

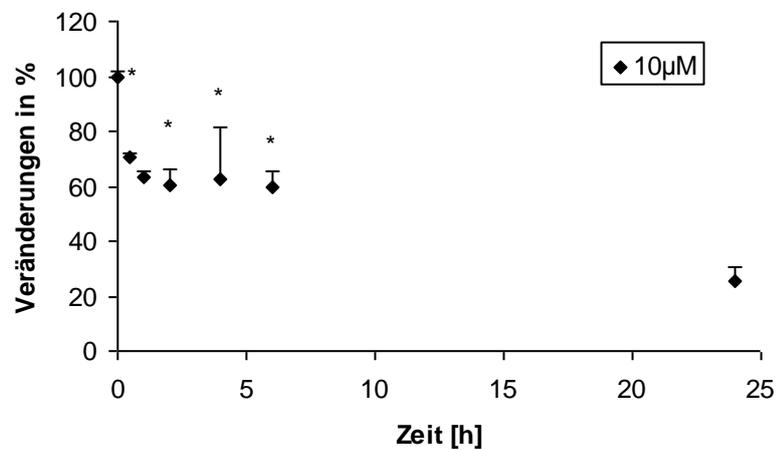


Abbildung 3-6: Abgebildet ist das neuronale Überleben unter Behandlung mit GGTI286 10µM innerhalb von 24h Behandlungsdauer in Bezug auf die Kontrolle (100%) mittels MTT Assay. N = 3, * = p < 0,05.

Die Auswirkungen der Behandlung mit GGTI286 10µM waren bereits nach 30 Minuten mit 30% Zelltod im Vergleich zur Kontrolle messbar. Diese zeitabhängige Entwicklung setzte sich über den gesamten, untersuchten Bereich fort, so dass nach der 24h Behandlung mit GGTI286 nur noch 25% der Zellen überlebt hatten.

4.1.2 ROCK-Inhibition mit Y-27632

Nach der Inhibition der Geranylgeranylierung und aller geranylgeranylabhängigen GTPasen mit GGTI286 sollte die spezifische Hemmung der RhoA-Kinase und deren Auswirkungen auf das Überleben der Neuronen untersucht werden.

Dazu wurden zunächst die verschiedenen Zeitpunkte 0h, 24h, 48h, 72h, 96h und unterschiedlichen Konzentrationen des ROCK-Inhibitors Y-27632 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M untersucht. Die Entwicklung der Neuronen wurde mikroskopisch verfolgt. Wie im Diagramm sichtbar wird, zeigten sich keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Veränderungen. Die Inhibition der RhoA-Kinase hatte keine Auswirkungen auf das Überleben der Neuronen. Mit der mittleren Konzentration von 50 μ M wurden auch die frühen Zeitpunkte (0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h) untersucht. Dabei wurden ebenfalls keine Auswirkungen auf die Neuronen festgestellt.

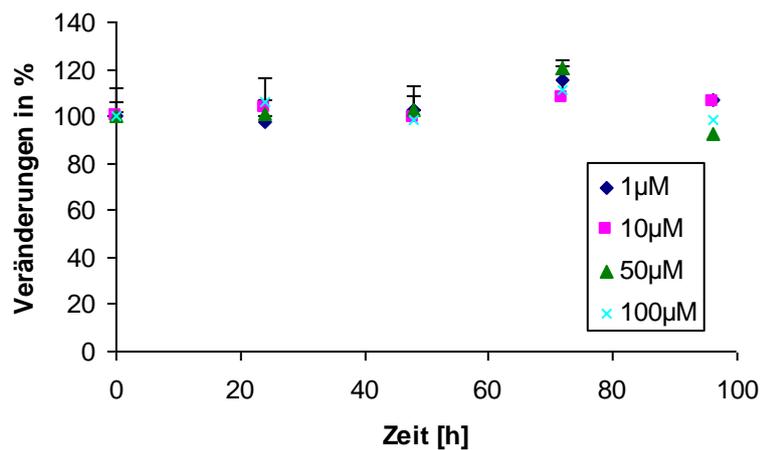


Abbildung 3-7: Dargestellt ist das neuronale Überleben unter Inhibition von ROCK mit Y-27632 bei den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M in Bezug auf die Kontrolle (100%). Die Überlebensraten unter den unterschiedlichen Konzentrationen variieren nicht. Es konnte kein Effekt auf das neuronale Überleben während der Behandlungsdauer mit diesem Inhibitor beobachtet werden. N = 3.

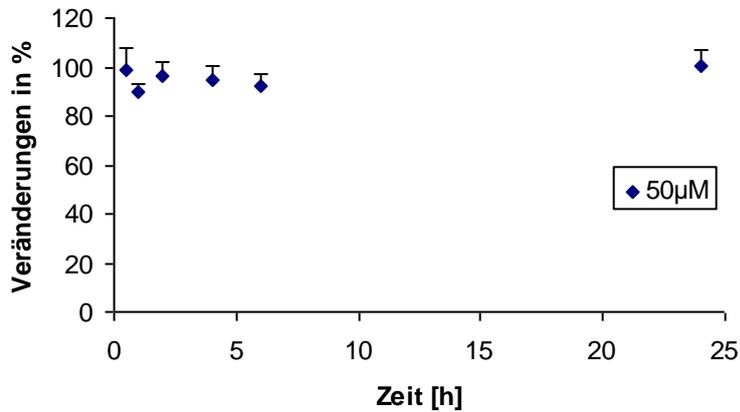


Abbildung 3-8: Die Untersuchung der Zeitpunkte 0 bis 24h unter Inhibition von ROCK mit Y-27632 50µM zeigte in Bezug auf die Kontrolle keine zeitabhängigen Effekte auf das neuronale Überleben. N = 3

4.1.3 Rac1-Inhibition mit NSC 23766

Zur Untersuchung der spezifischen Rac1-Inhibition auf die Neuronen wurden die Zeitpunkte 24h, 48h, 72h, 96h gewählt. Die eingesetzten Konzentrationen waren 5µM, 10µM, 25µM, 50µM, 75µM, 100µM.

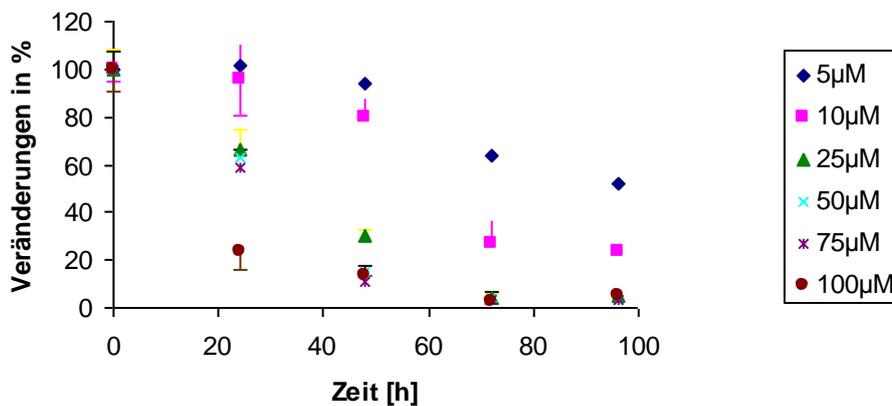


Abbildung 3-9: Dargestellt ist das zeitabhängige neuronale Überleben unter dem Einfluss des Rac1-Inhibitors NSC 23766 in Bezug auf Kontrollen (100%). Es wird deutlich, dass das Überleben der Neuronen stark von der Konzentration dieses Inhibitors und der Behandlungsdauer abhängig ist. N = 3

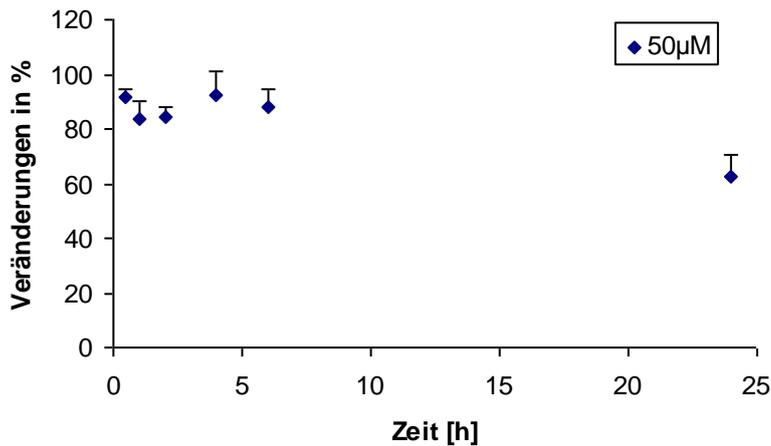


Abbildung 3-10: Untersucht wurde speziell das neuronale Überleben unter Inhibition von Rac1 mit NSC 23766 50µM. Das Überleben der Neuronen ist abhängig von der Behandlungsdauer. N = 3

Es wurde ein deutlicher Unterschied zur Behandlung mit dem RhoA-Kinase-Inhibitor festgestellt. Schon bei der niedrigsten Konzentration von 5µM zeigte sich nach 72h eine signifikante Abnahme der vitalen Zellen. Das Absterben der Neuronen fand zeit- und konzentrationsabhängig statt. Die mittlere Konzentration von 50µM wurde auch an früheren Zeitpunkten (0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h) untersucht. Die Neuronen wiesen hier nach 6h Inhibition deutliche Schäden an ihren Fortsätzen auf. Nach 24h Inhibition hatten nur 40% der Zellen überlebt.

4.2 Immunohistochemie

4.2.1 Veränderungen im Mikrofilament- und Mikrotubulussystem

Im folgenden Schritt wurden die Inhibitoren in den ermittelten Konzentrationen eingesetzt, um Auswirkungen auf die beiden wichtigsten Elemente des Zytoskeletts zu dokumentieren. Die eingesetzten Konzentrationen für die Inhibition waren GGTI286 10µM, ROCK-Inhibitor Y-27632 50µM und Rac1-Inhibitor NSC 23766 50µM. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden Veränderungen im Mikrofilament- und Mikrotubulussystem mit den Inhibitoren und Zeitpunkten der Behandlung untersucht. Die Zellen wurden dafür wie beschrieben auf Glasplättchen gezüchtet und nach 7 Tagen des Wachstums mit den Inhibitoren behandelt, anschließend fixiert und gefärbt.

4.2.1.1 GGTI286

Die Auswirkungen der Inhibition aller GTPasen durch die Geranylgeranyltransferase zeigen deutliche Unterschiede zur spezifischen Inhibition von ROCK und Rac1. Auch zwischen den beiden GTPasen gab es Unterschiede nach der Behandlung.

Die Inhibition mit GGTI286 10 μ M führte nach einer Behandlung von 2h zu keinen Veränderungen am Tubulin, jedoch war die Anfärbbarkeit des F-Aktin reduziert. Nach 4h war die Anzahl der Wachstumskegel im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Die Behandlung für 6h führte zu Schäden am F-Aktin und Tubulin. In der Übersicht und der Vergrößerung waren nur noch wenige gefärbte Strukturen der Mikrofilamente erkennbar. Das Tubulinnetzwerk war dicht, jedoch traten erste Fragmentierungen und Schwellungen der Axone und Dendriten auf. Die Behandlung der Neuronen mit GGTI schädigte die Zellen im Verlauf der 24h Inkubationszeit mit steigender Tendenz. Nach Ablauf der Inkubationszeit waren fast alle Zellfortsätze fragmentiert, die F-Aktinstrukturen kaum mehr anfärbbar und nur noch Reste davon vorhanden.

4.2.1.2 ROCK-Inhibition mit Y-27632

Die Inhibition der RhoA Kinase durch Y-27632 mit einer Konzentration von 50 μ M zeigte im untersuchten Zeitraum bis 24h keine Fragmentierung am Tubulin. Die Phalloidin-markierten F-Aktinstrukturen traten im Verlauf der Inkubation immer stärker in Erscheinung, insbesondere im Bereich der Wachstumskegel. Die Neuronen zeigten in der Übersicht ein dicht organisiertes Netzwerk, die Dendriten und Axone waren in der Vergrößerung identisch mit den Kontrollen.

4.2.1.3 Rac1-Inhibition mit NSC 23766

Die Inhibition von Rac1 mit NSC 23766 50 μ M führte bereits nach 2h zu ersten Schädigungen. Auf den ersten Blick waren die Wachstumskegel kleiner als in den Kontrollen. Die Mikrotubuli zeigten keine Auffälligkeiten, jedoch waren bei genauerer Betrachtung erste Schwellungen der Fortsätze als Anzeichen von Schädigungen zu erkennen. Nach 4h Behandlung war das Netzwerk der Mikrotubuli weniger dicht und die Anzahl der Neuronen reduziert. In der Vergrößerung zeigte sich, dass die F-Aktinstrukturen geschädigt waren und weniger Wachstumskegel existierten. Die Dendriten und Axone zeigten leichte Schwellungen und einige wenige wiesen eine beginnende Fragmentierung auf. Das Mikrofilament- und Mikrotubulussystem der

Neuronen war nach 6h stark geschädigt und die Zelldichte deutlich reduziert. Die Phalloidin-positiven F-Aktinstrukturen waren deutlich geschädigt und die Neurite fragmentiert. Nach 24h Inkubation mit Rac1-Inhibitor war ein Teil der Zellen vollkommen zerstört und die meisten Dendriten und Axone fragmentiert.

Die ROCK-Inhibition hatte einen positiven Effekt auf das Mikrofilamentsystem der Neuronen. Nach der Inkubation der Zellkulturen mit dem GGT und dem Rac1-Inhibitor kam es bei diesen zunächst zu Schäden am Aktin bzw. Mikrofilamentsystem. Zunächst reduzierte sich die Anzahl der Wachstumskegel und im weiteren Verlauf verstärkte sich der Abbau der Mikrofilamente. Anschließend reduzierte sich die Anzahl der Zellen und führte schließlich zur Schwellung, Fragmentierung und Zerstörung der Axone und Dendriten. Diese Effekte traten bei der Inhibition von Rac1 schneller und stärker als bei der Inhibition von GGT auf.

Kontrolle 2h

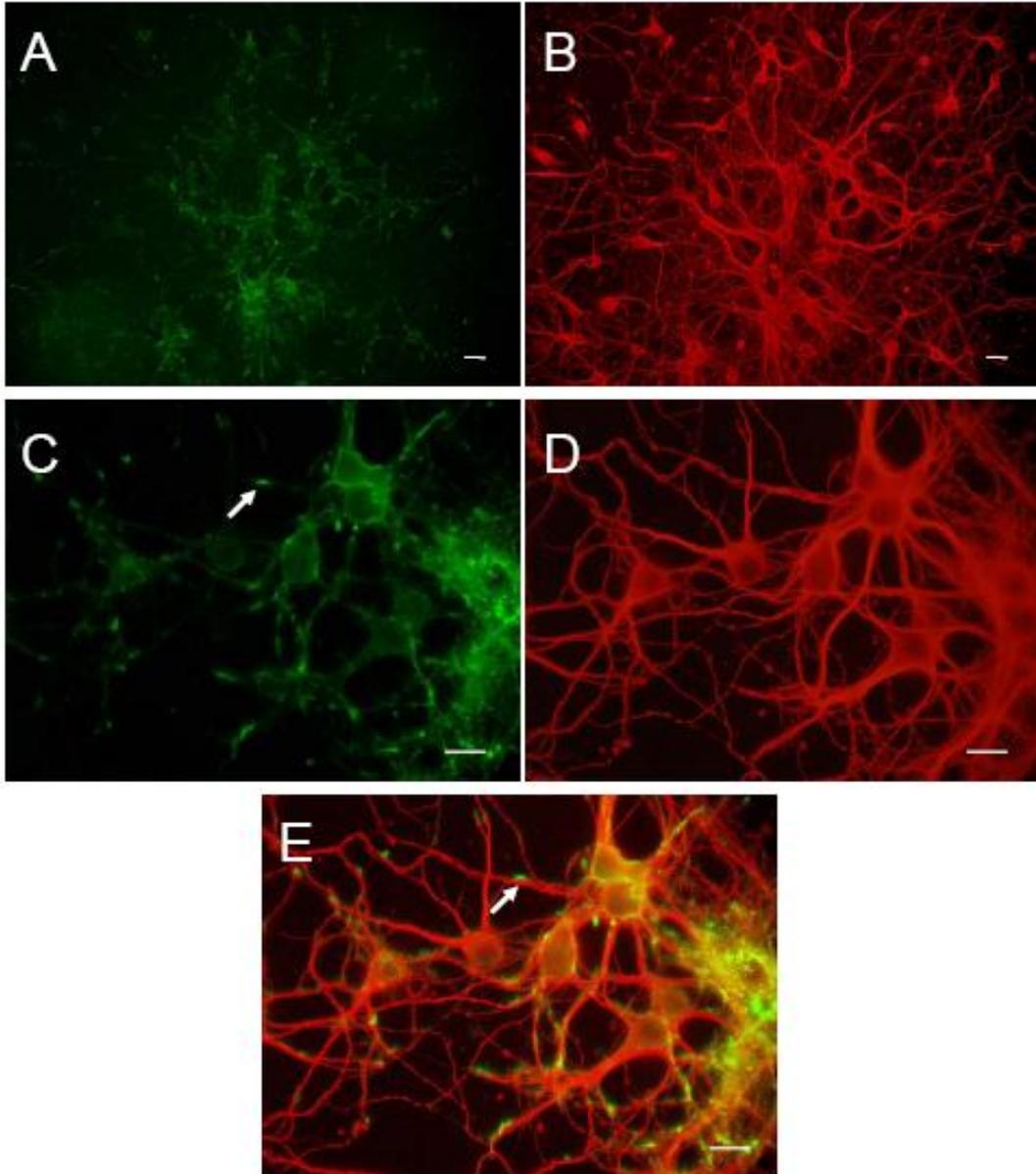


Abbildung 3-11: Abgebildet sind unbehandelte Neuronen. Die Mikrofilamente sind grün und die Mikrotubuli rot dargestellt. Das große Netzwerk von Neuronen in den Aufnahmen A und B sehr gut dargestellt. Deutlich zu erkennen in der Detailaufnahme in C und E sind die Wachstumskegel (Pfeile), in denen ein besonders starker Umbau der Aktinfilamente stattfindet.

Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

GGTI286 10 μ M 2h

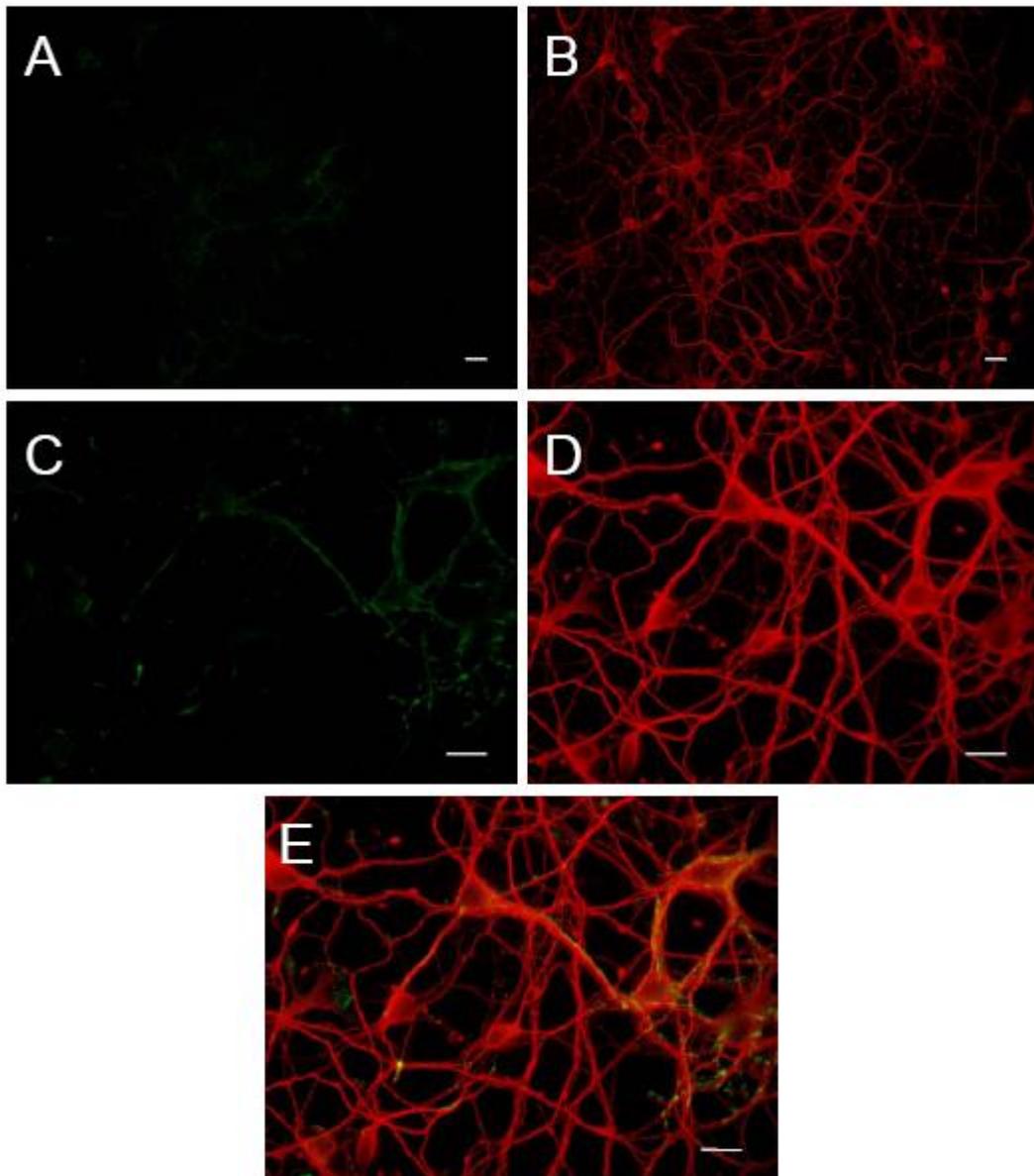


Abbildung 3-12: Die Behandlung mit GGTI286 10 μ M nach 2h zeigt noch keine deutlichen Veränderungen, jedoch gibt es bereits Tendenzen. Die Färbung des F-Aktin (C) ist weniger gut im Vergleich zu den Kontrollen und der Behandlung mit ROCK Y-27632. In der Übersicht ist ein gut ausgebildetes Neuronennetzwerk sichtbar (A und B) und in der Vergrößerung (C und D) zeigen die Zellkörper und Zellfortsätze keine Auffälligkeiten, jedoch ist die Anfärbbarkeit des F-Aktin reduziert (C). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M 2h

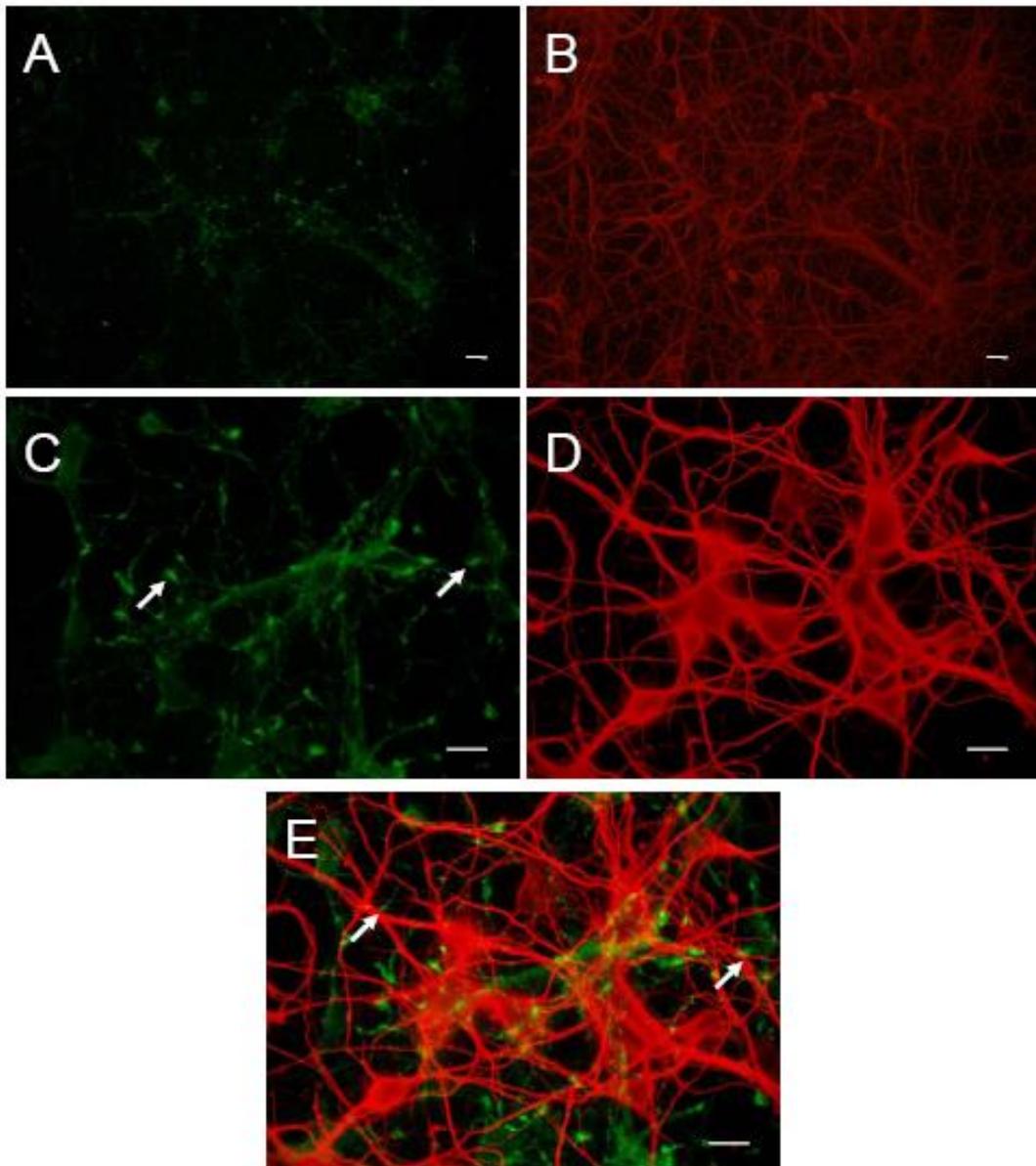


Abbildung 3-13: Abgebildet sind Neuronen nach 2h Behandlung mit ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M. Sowohl die Übersichtsaufnahmen (A und B) als auch die Vergrößerungen (C und D) der behandelten Neuronen zeigen keine Schädigung des Zytoskeletts. Sie ähneln denen der Kontrolle und zeigen eine stärkere Färbung der Aktinstrukturen (C und E) als die Kontrolle, insbesondere im Bereich der Wachstumskegel (Pfeile). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M 2h

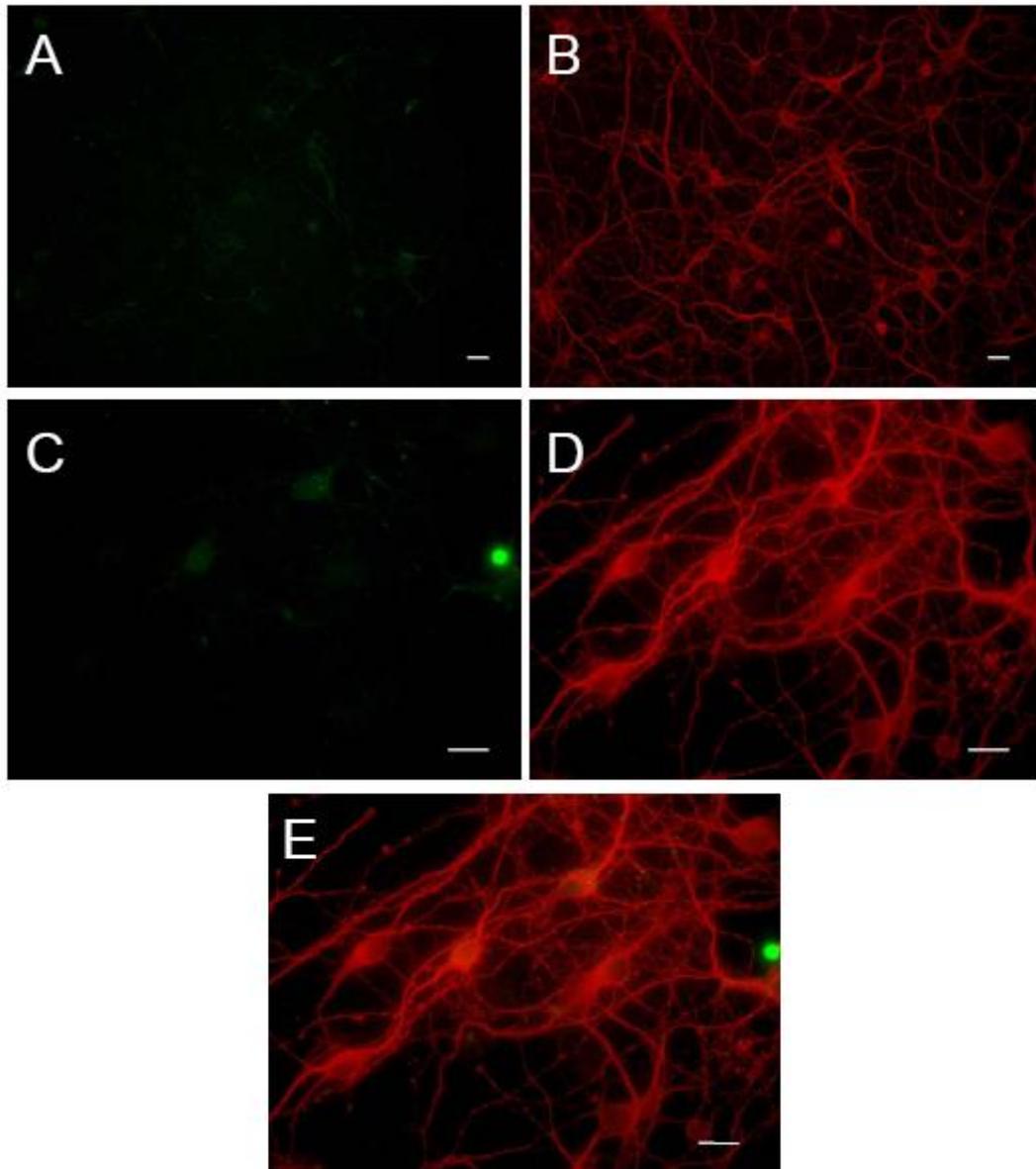


Abbildung 3-14: Die Behandlung mit Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M nach 2h zeigt sowohl in der Übersichtsaufnahme (A) als auch in der Vergrößerung (C) erste Schädigungen der Aktinfilamente. Die Wachstumskegel sind sehr viel kleiner (C) als die der Kontrollen. Die Übersichtsaufnahme der Mikrotubuli (B) enthält keine Auffälligkeiten. In der Vergrößerung (D) sind jedoch erste Schwellungen der Fortsätze als Anzeichen von Schädigungen zu erkennen.

Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Kontrolle 4h

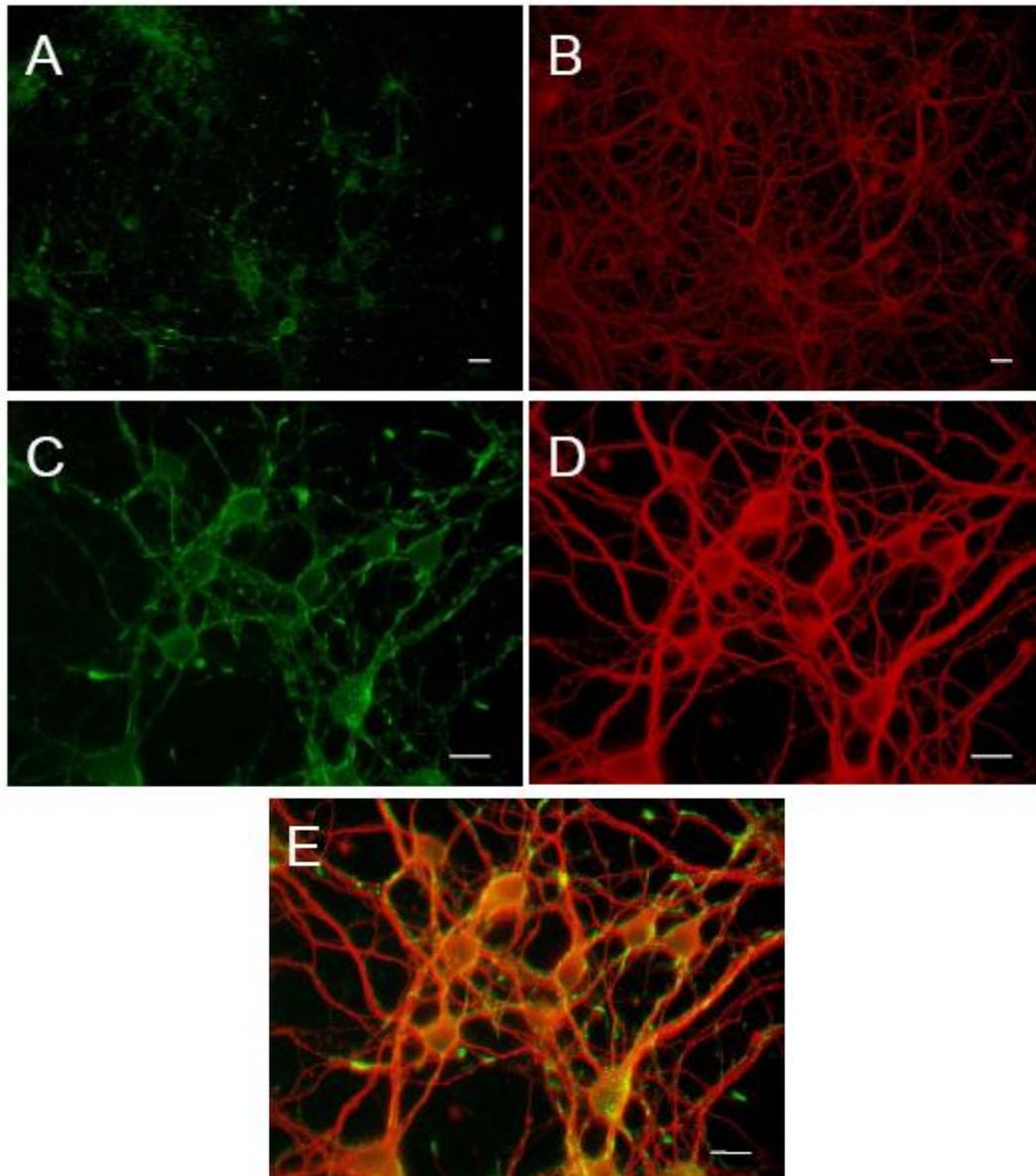


Abbildung 3-15: Die Kontrolle nach 4h zeigt ein dicht organisiertes Neuronennetzwerk in der Übersicht (A und B). In der Vergrößerung (C und D) sind die Somata, Dendriten und Axone regelgerecht. Die Wachstumskegel und Mikrotubuli sind gut ausgebildet. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

GGTI286 10 μ M 4h

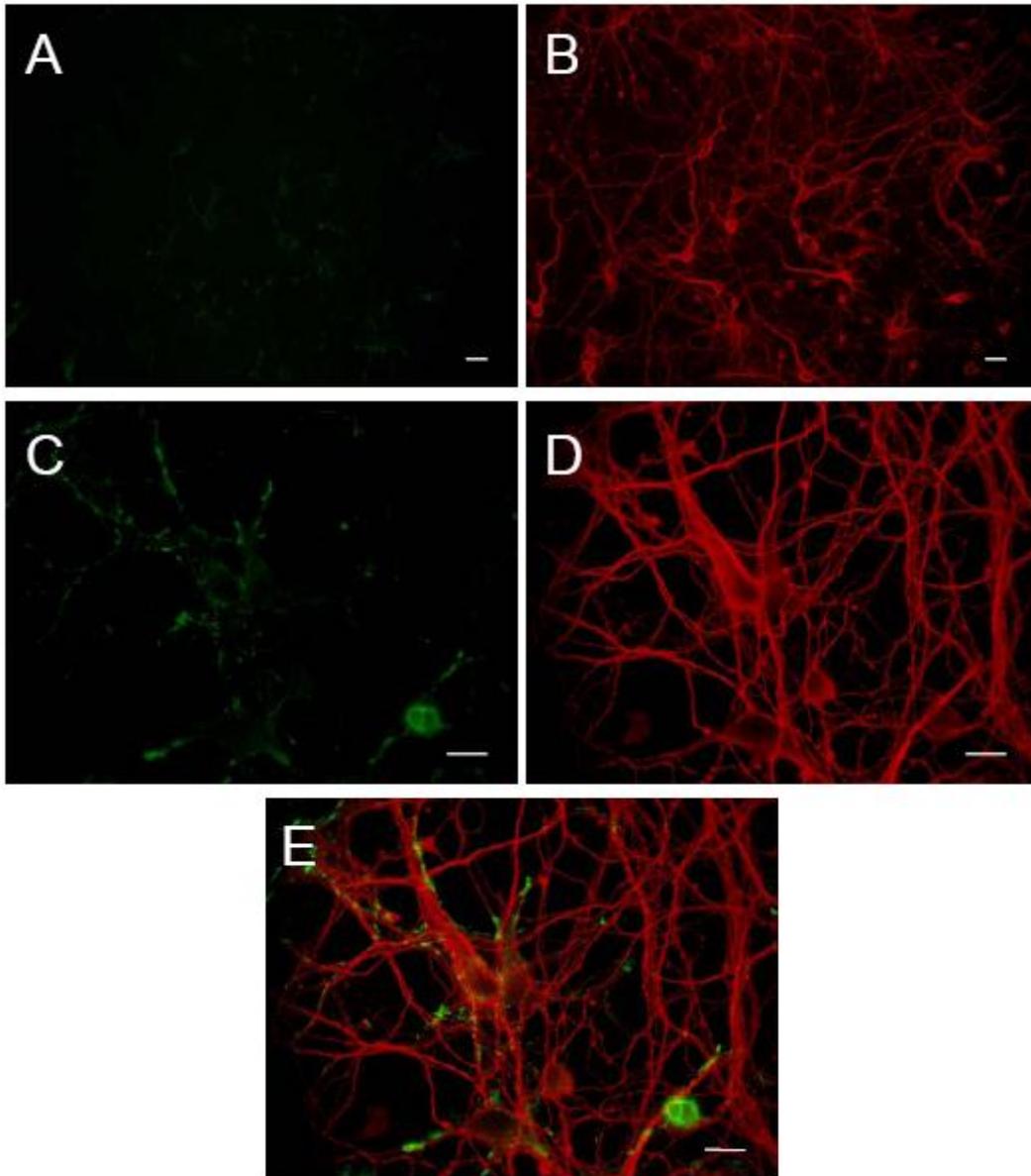


Abbildung 3-16: Nach der Behandlung mit GGTI-286 10 μ M für 4h ist sowohl in der Übersicht (A und B) als auch in der Vergrößerung (C und D) ersichtlich, dass das F-Aktin der Mikrofilamente geschädigt wurde. Es sind fast keine Wachstumskegel mehr sichtbar (C). Das Tubulin ist dagegen intakt (B und D). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M 4h

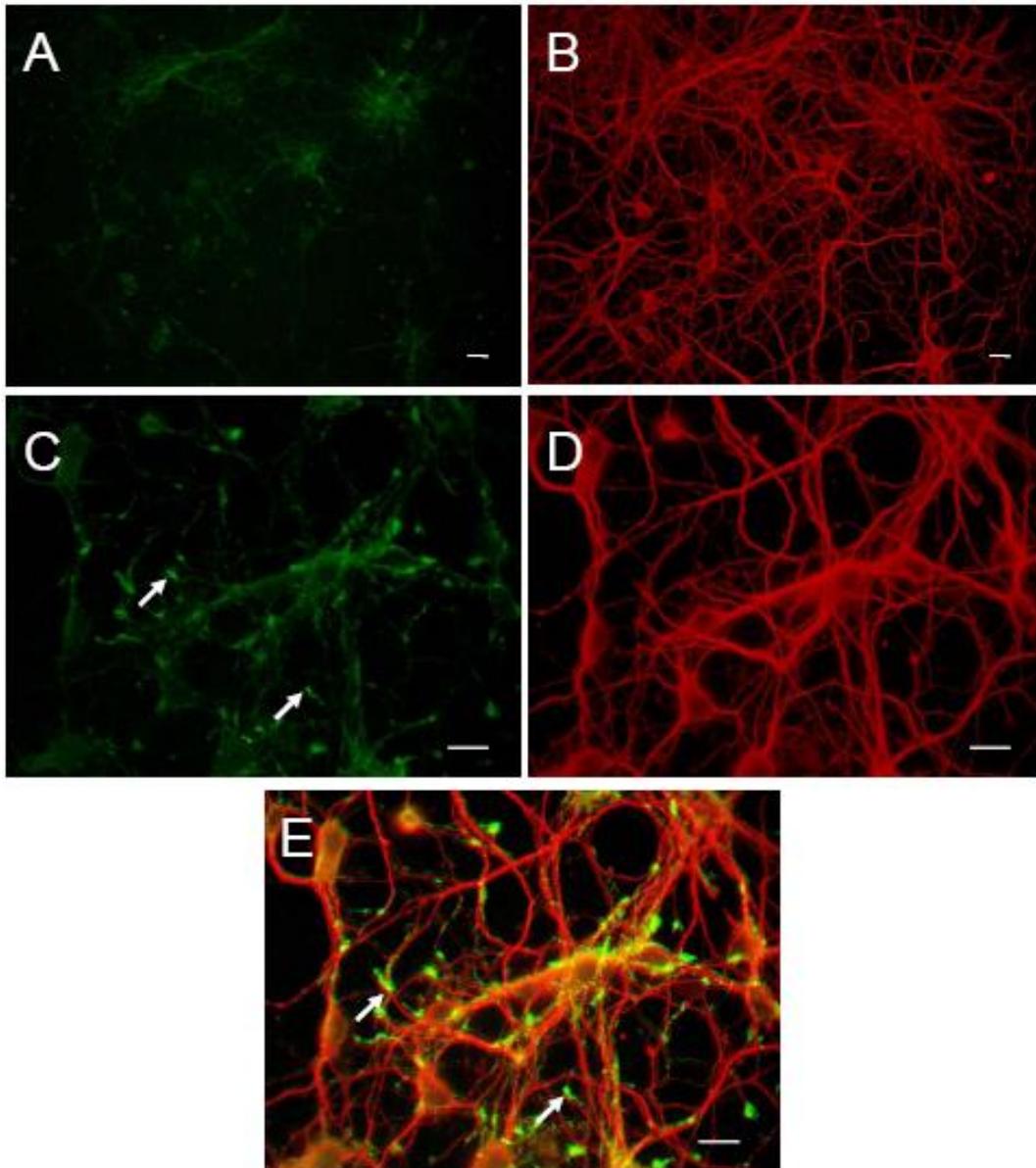


Abbildung 3-17: Die Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M für 4h hat keine negativen Auswirkungen auf das Mikrofilament- und Mikrotubulussystem. Das F-Aktin hat noch eine stärkere Färbung insbesondere im Bereich der Wachstumskegel (Pfeile in C und E) als in der Kontrolle.

Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M 4h

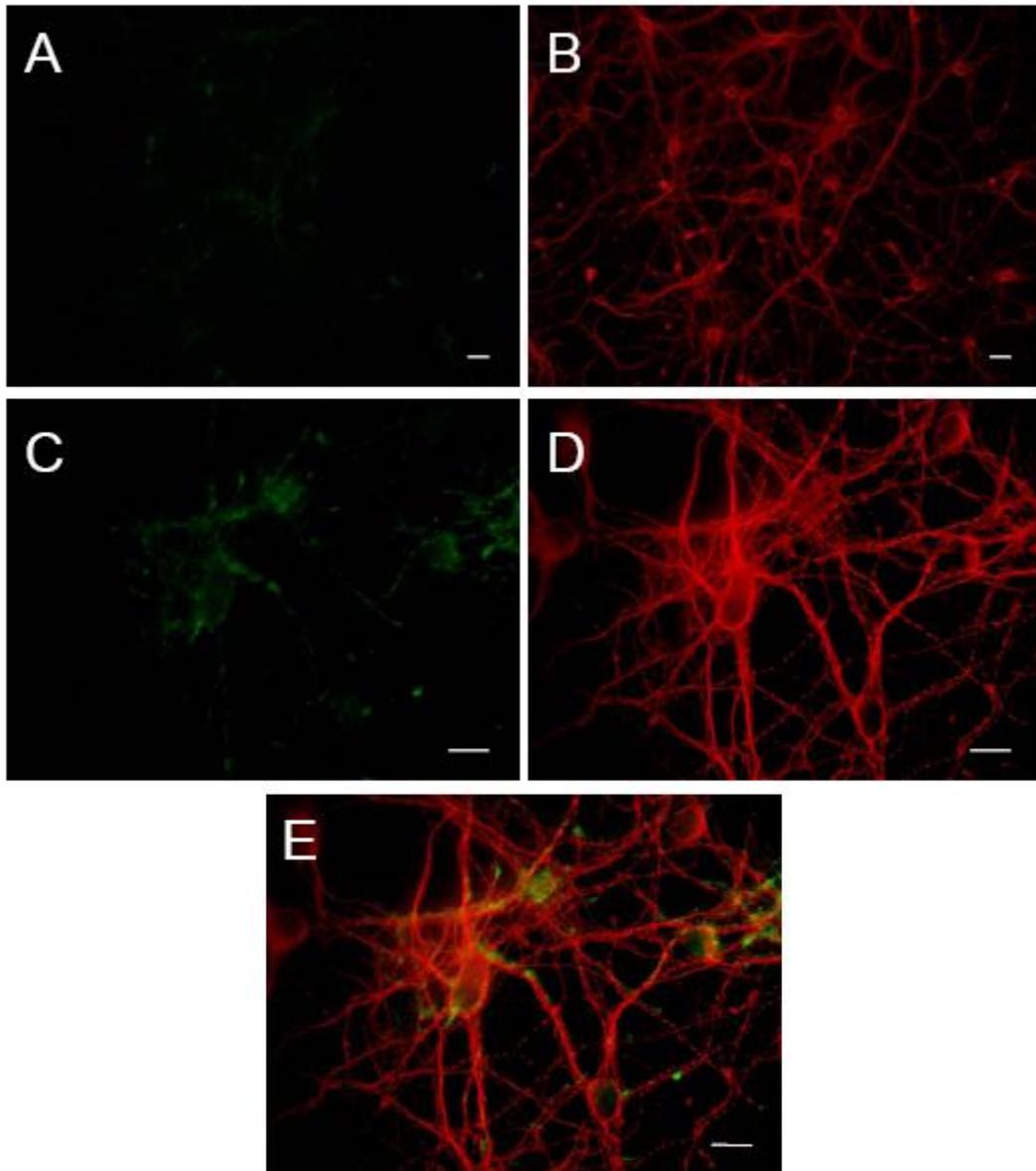


Abbildung 3-18: Die Anzahl der Neuronen ist reduziert (A und B). Das F-Aktin ist geschädigt und es zeigen sich wenige Wachstumskegel in der Detailaufnahme (C). Die Dendriten und Axone haben leichte Schwellungen und einige wenige zeigen eine beginnende Fragmentierung (D). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Kontrolle 6h

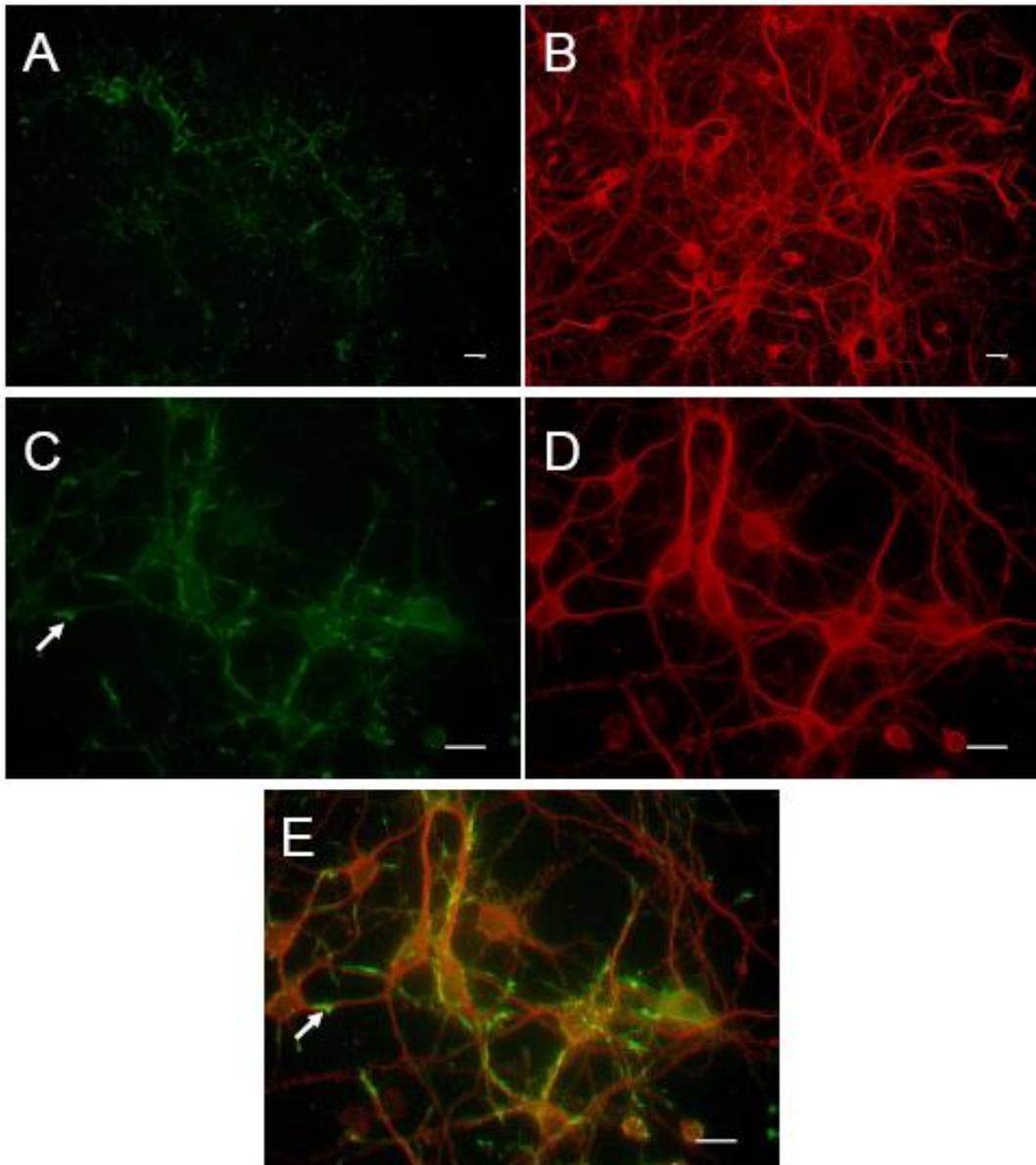


Abbildung 3-19: Die Neuronen sind gut vernetzt und haben zahlreiche, weitverzweigte Fortsätze und Wachstumskegel (Pfeile in C und E). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

GGTI286 10 μ M 6h

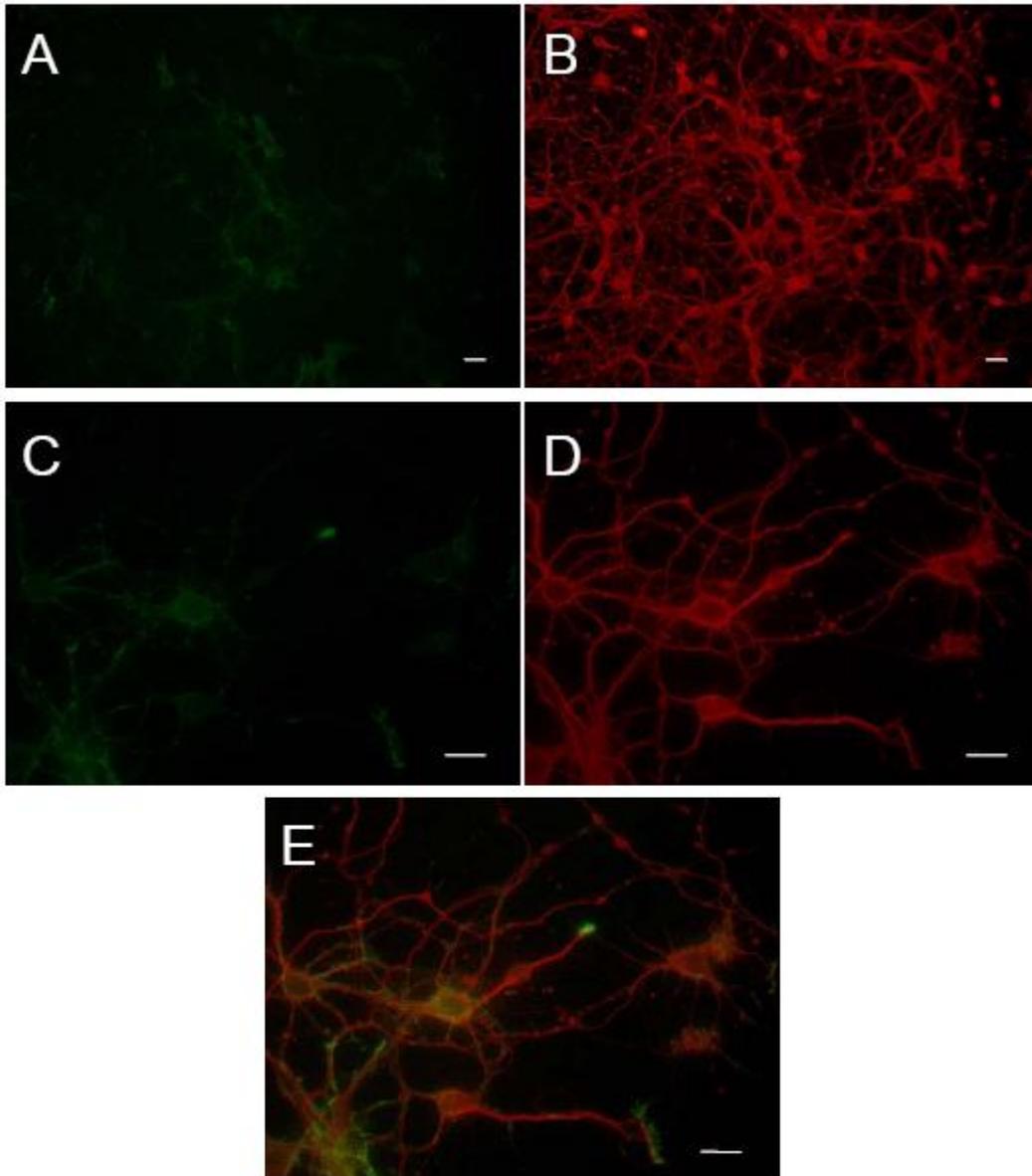


Abbildung 3-20: Die Behandlung mit GGTI286 10 μ M zeigt nach 6h Schäden am F-Aktin und Tubulin. In der Übersicht und der Vergrößerung sind nur noch wenige gefärbte Strukturen der Mikrofilamente erkennbar (A und C). Das Tubulinnetzwerk ist noch dicht (B), jedoch sind die Fragmentierungen und Schwellungen der Axone und Dendriten bereits sichtbar (D).

Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M 6h

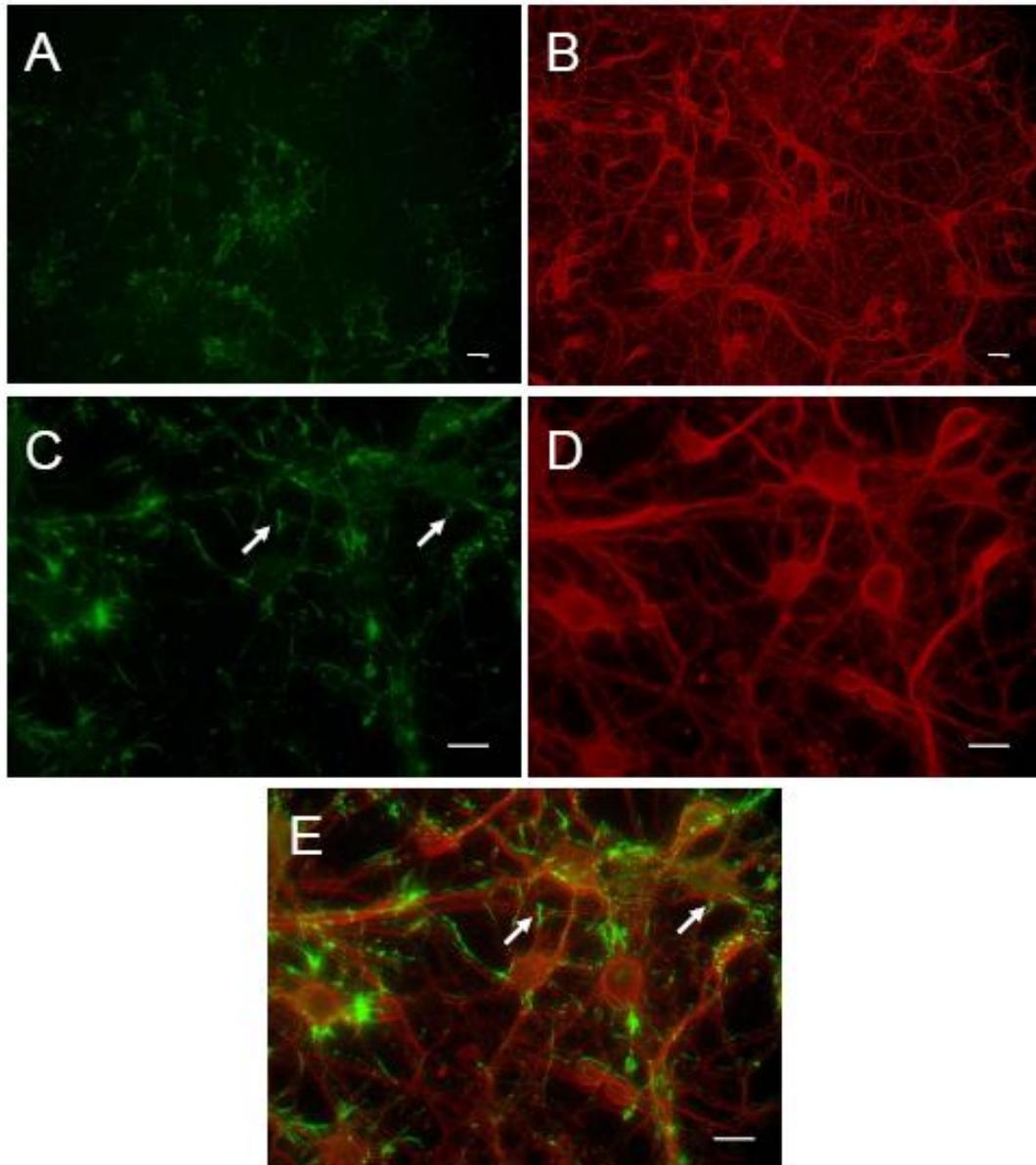


Abbildung 3-21: Die Neuronen sind nach Behandlung mit ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M nach 6h vollkommen intakt und zeigen eine noch stärkere Anfärbung der Aktinstrukturen (Pfeile in C und E) als in der Kontrolle. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M 6h

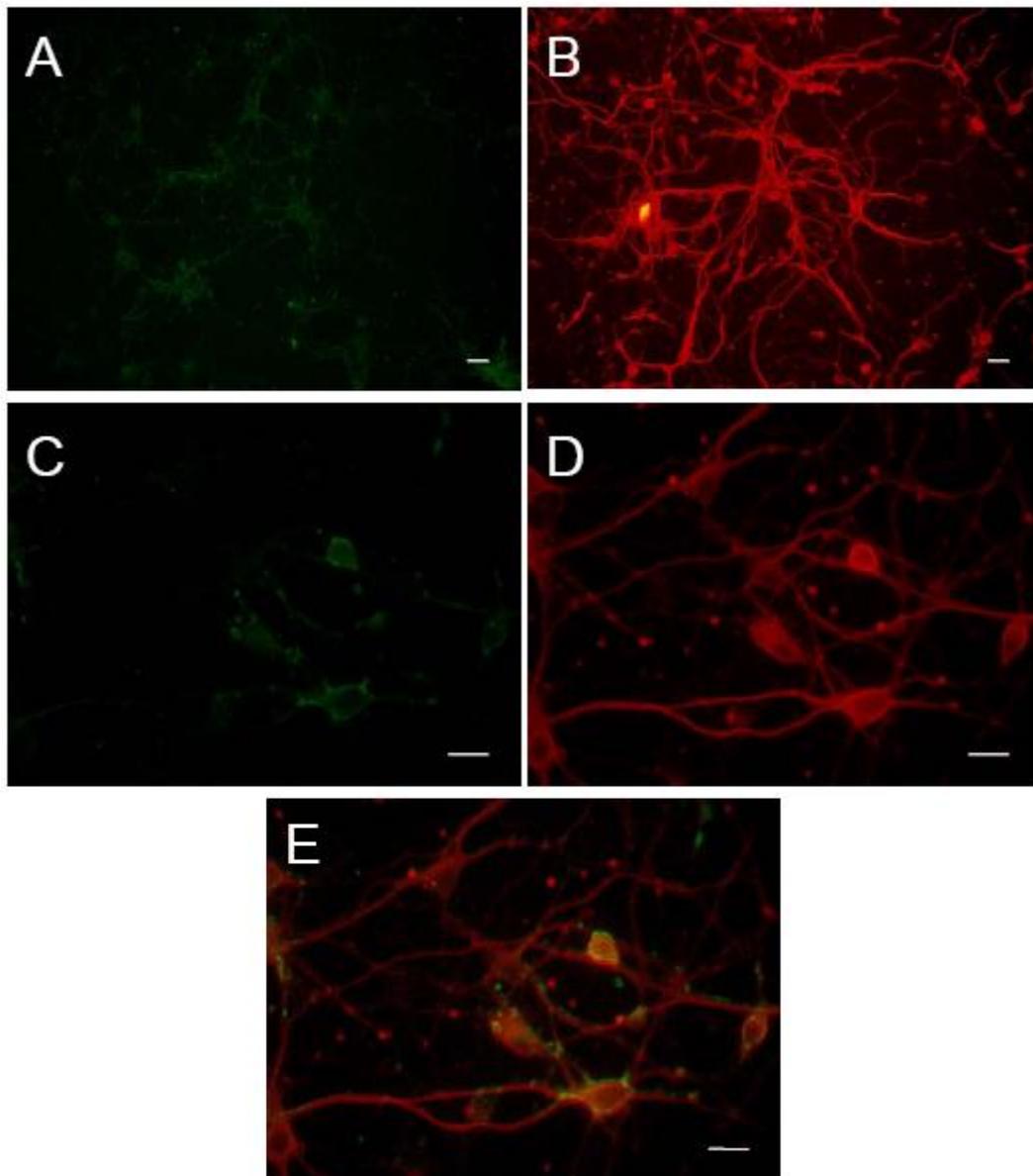


Abbildung 3-22: Die Behandlung mit dem Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M für 6h führt zu einer starken Schädigung des Mikrofilament- und Mikrotubulussystems. Die Zelldichte ist deutlich reduziert (A und B) und das F-Aktin ist stark geschädigt (C). Die Neurite sind fragmentiert und weisen Schwellungen auf (D). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Kontrolle 24h

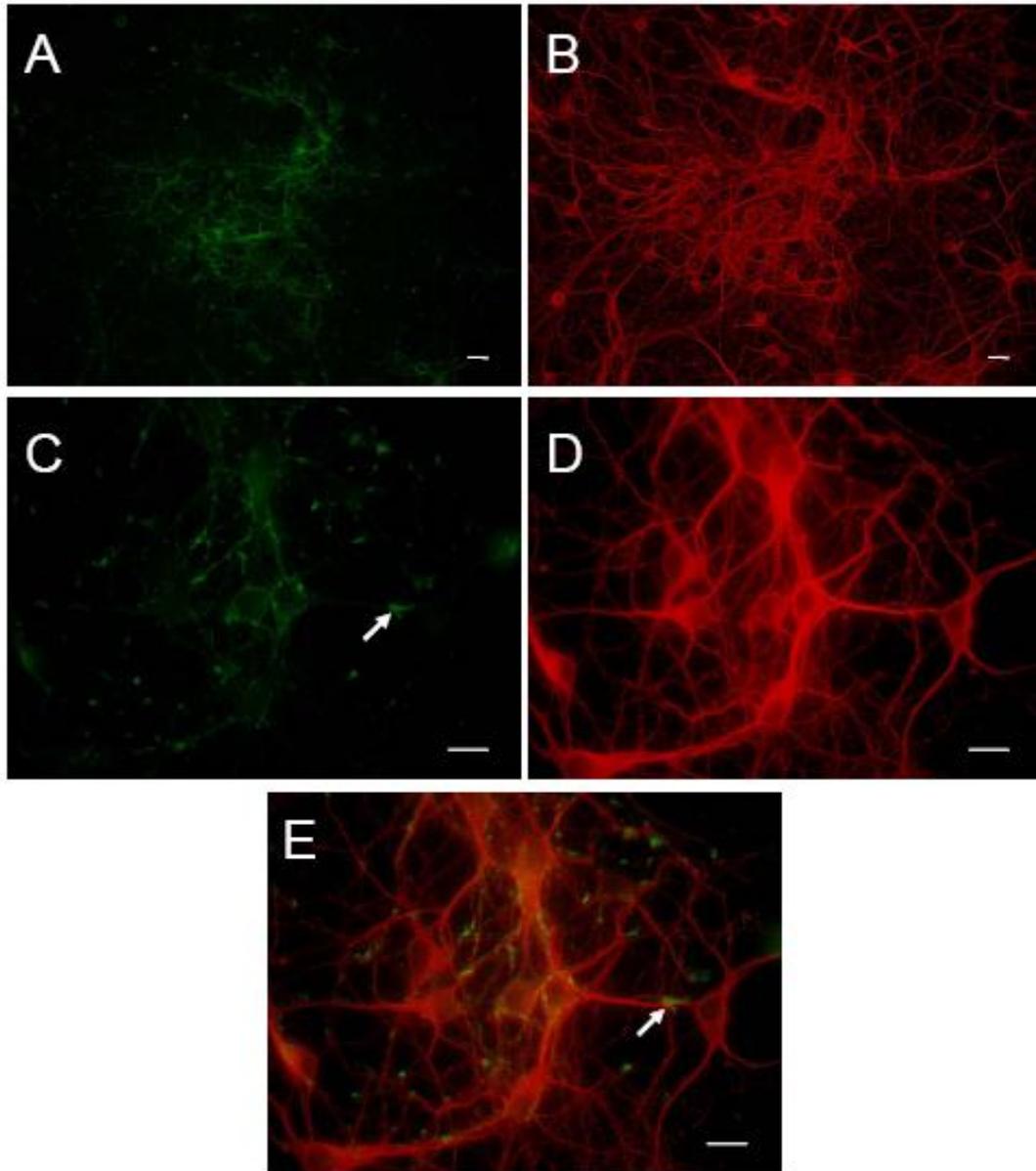


Abbildung 3-23: Die unbehandelten Neuronen haben ein dichtes Netzwerk (A und B). In der Vergrößerung (C und E) sind die Wachstumskegel (Pfeile) sehr gut ausgebildet und ohne Auffälligkeiten am Tubulinsystem (B und D). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

GGTI286 10 μ M 24h

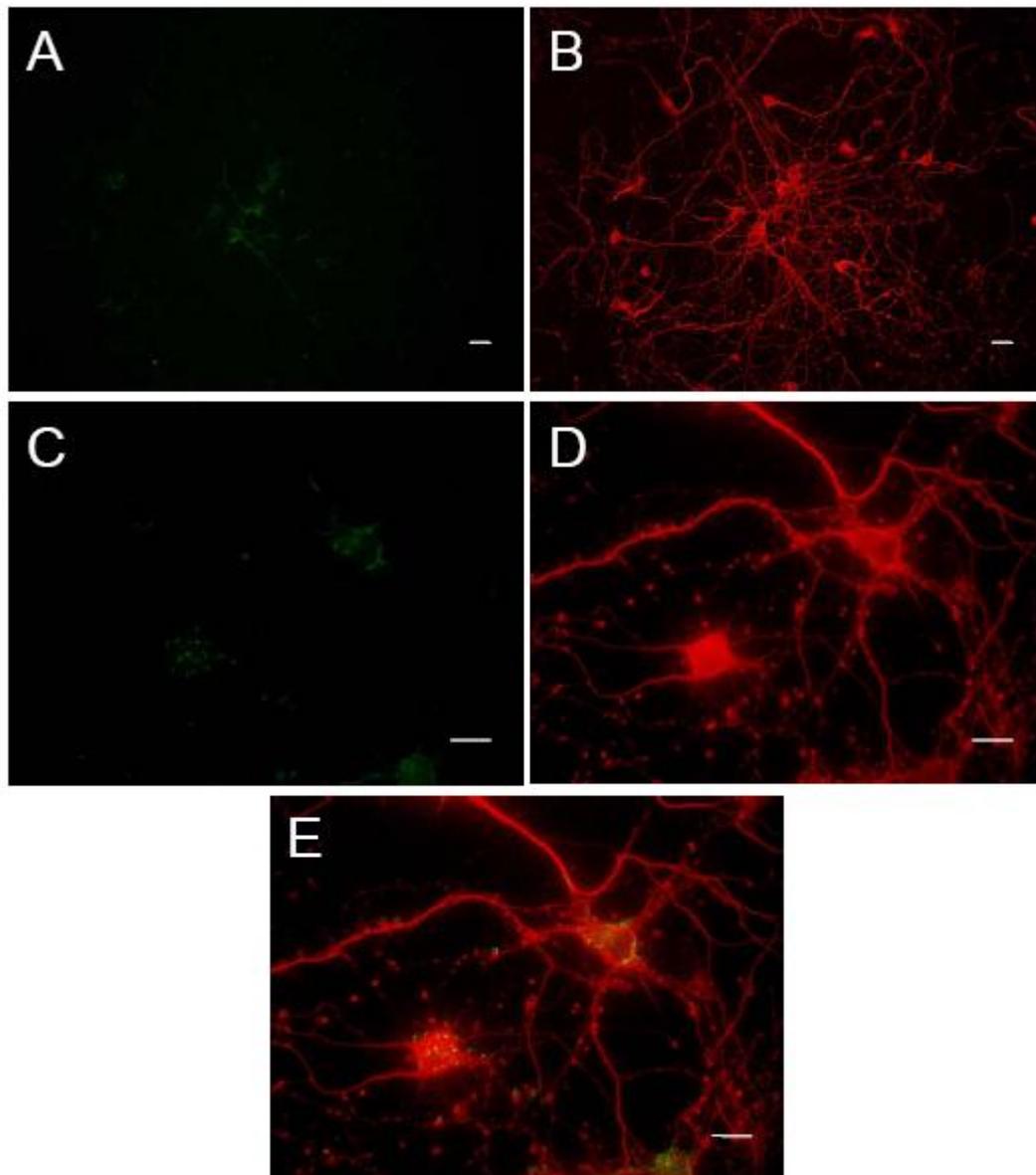


Abbildung 3-24: Die Behandlung mit GGTI286 10 μ M für 24h führt zu einer starken Schädigung der Zellen. Fast alle Zellfortsätze sind fragmentiert (B und D). Das F-Aktin ist kaum mehr anfärbbar (A und C). Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M 24h

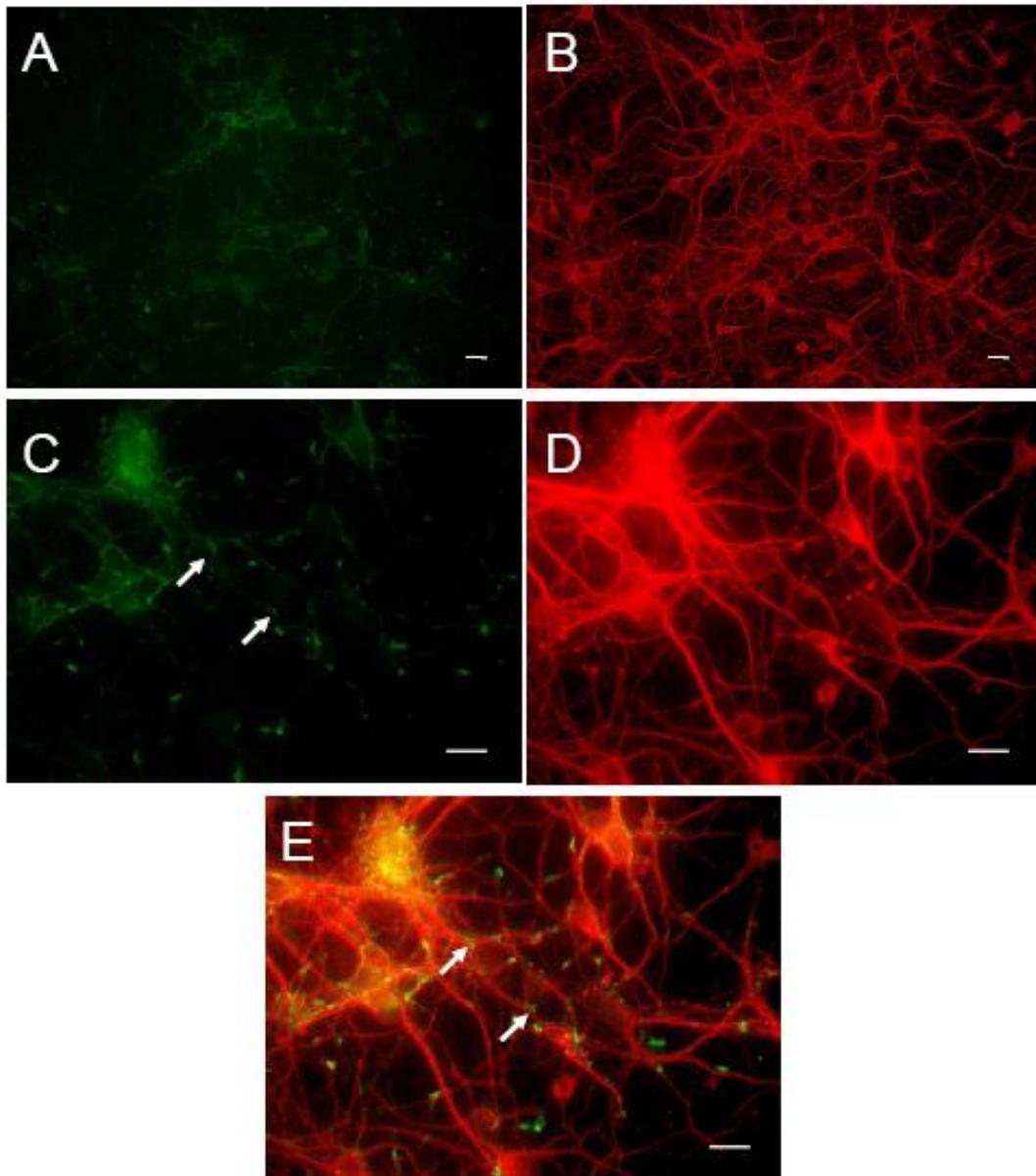


Abbildung 3-25: Nach der Behandlung mit ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M für 24h ist das Neuronennetzwerk dicht und gut ausgebildet. Es sind zahlreiche Wachstumskegel (Pfeile in C und E) und ein gut ausgebildetes Mikrotubulussystem sichtbar. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M 24h

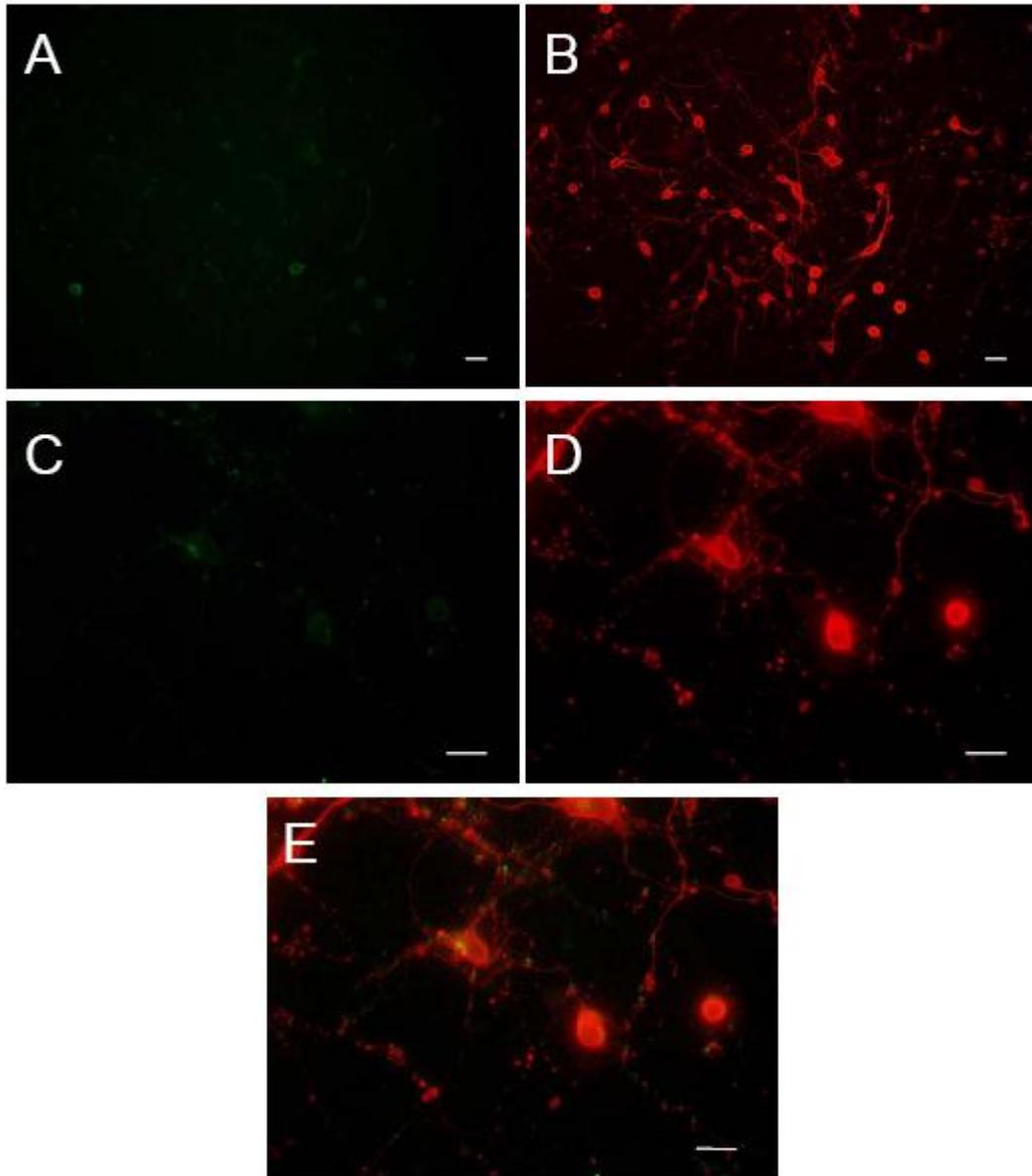


Abbildung 3-26: Die Behandlung mit Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M für 24h führt zur teilweisen Zellzerstörung (A und B). Es sind zahlreiche Zelltrümmer vorhanden (D). Die meisten Zellfortsätze sind fragmentiert. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

4.3 Untersuchung der Tau-Phosphorylierung mit Westernblot

Im Folgenden wurden die Effekte der Inhibition mit GGTI286 10 μ M, ROCK-Inhibitor Y-27632 50 μ M und Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M auf die Phosphorylierung von Tau untersucht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Hemmung der Isoprenylierung von kleinen GTPasen und einer Hyperphosphorylierung von Tau wie bei Tauopathien konnten zuvor in einer Publikation der Arbeitsgruppe mit Rattenneuronen unter Lovastatinbehandlung und Inhibition von GGTI nachgewiesen werden (Meske et al., 2003).

4.3.1 GGTI286

Zunächst wurde die Tau-Gesamtmenge mit dem Antikörper Tau-5 untersucht. Schwankungen in der Proteinbeladung wurden durch die Untersuchung der Aktinbeladung in mehreren Schritten mittels Westernblot untersucht und korrigiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Antikörpers 12E8 die Phosphorylierung des entsprechenden Epitops an Tau untersucht. Die leichten Schwankungen der Menge an 12E8 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter GGTI-Behandlung zu keiner signifikanten Phosphorylierungsänderung an diesem Epitop. Die Untersuchung mit AT-8 diente der Überprüfung der Phosphorylierung des Epitops Ser202 Thr205. Nach 6h Behandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung an diesem Epitop. Mit Hilfe des Antikörpers PHF-1 wurde die Phosphorylierung des Epitops Ser396 Ser404 untersucht. Es kam zu keiner Veränderung der Phosphorylierung dieses Epitops. Die Blots zeigten bei den Proben der 4h, 6h und 24h Behandlungen mehrere kleinere Banden, die durch die Fragmentierung beim Abbau von Tau entstehen (nicht abgebildet).

Die Streuung der Werte zur Untersuchung der Tau-Phosphorylierung ist zum Teil groß und hängt mit Schwankungen der Proteinmenge in den einzelnen untersuchten Proben zusammen. Da die Inhibition von GGT mit massiven Schäden einherging, reduzierte sich die Qualität der Proteine mit steigender Behandlungsdauer. Trotz mehrmaliger, sorgfältiger Angleichung der Proteinkonzentrationen in allen Proben, ist die Analyse von exakt gleichen Mengen Tau in allen Proben nicht vollständig gelungen. Deshalb wurde in jeder Probe neben den phosphorylierungsabhängigen Epitopen auch die Menge an Aktin als „Markerprotein“ untersucht. Traten Schwankungen der untersuchten

phosphorylierungsabhängigen Epitope auf, so wurden nur solche Schwankungen als spezifisch erachtet, wenn keine entsprechenden Schwankungen in der Aktinbeladung in der gleichen Probe festgestellt wurden.

Tau gesamt

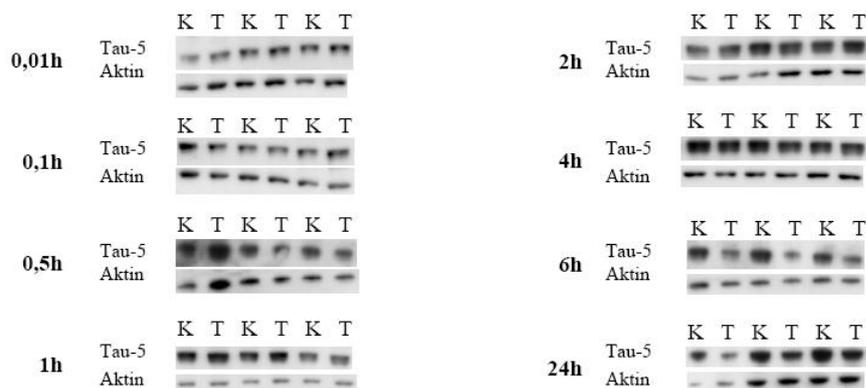
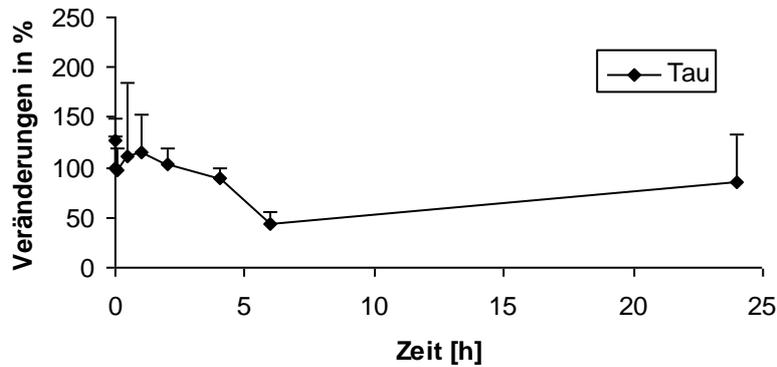


Abbildung 3-27: Tau-5 nach Behandlung mit GGTI286 10 μ M

Dargestellt ist die Tau-Gesamtmenge und die Aktinbeladung unter GGTI-Behandlung 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen der Tau-Gesamtmenge konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Die Tau-Gesamtmenge blieb während des untersuchten Zeitraums konstant. Nach 6h kam es zur Abnahme der Gesamtproteinmenge. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit GGTI286 10 μ M

Tau Phosphorylierung 12E8

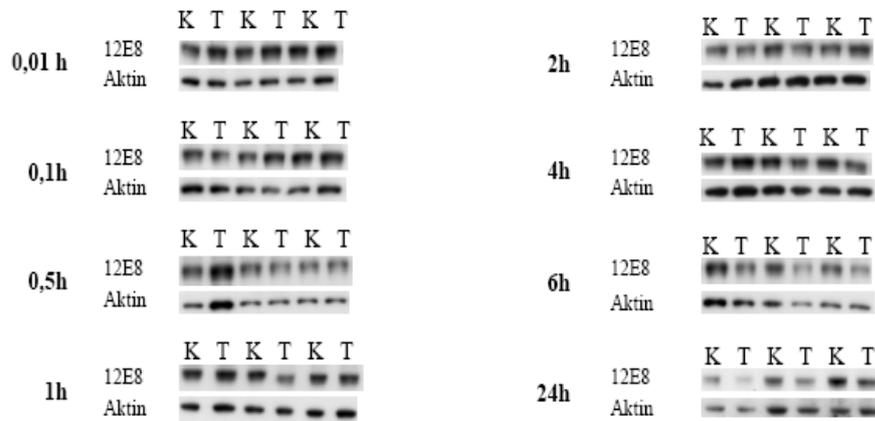
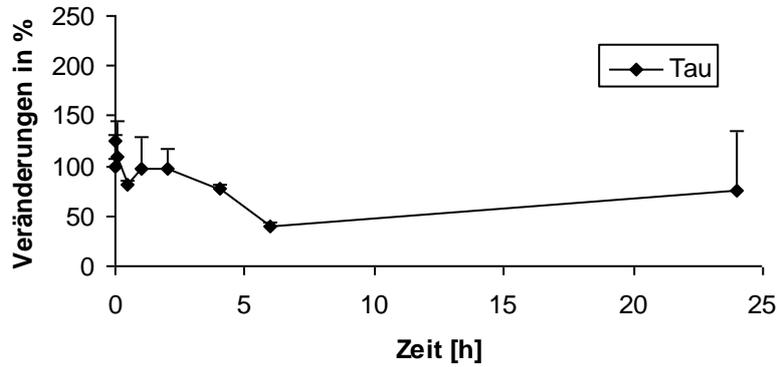


Abbildung 3-28: 12E8 nach Behandlung mit GGTI286 10µM

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser262 unter GGTI-Behandlung 10µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen der Menge an 12E8 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter GGTI-Behandlung zu keiner Phosphorylierung an diesem Epitop. Nach 6h kam es zur Abnahme der Proteinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit GGTI286 10µM

Tau Phosphorylierung AT-8

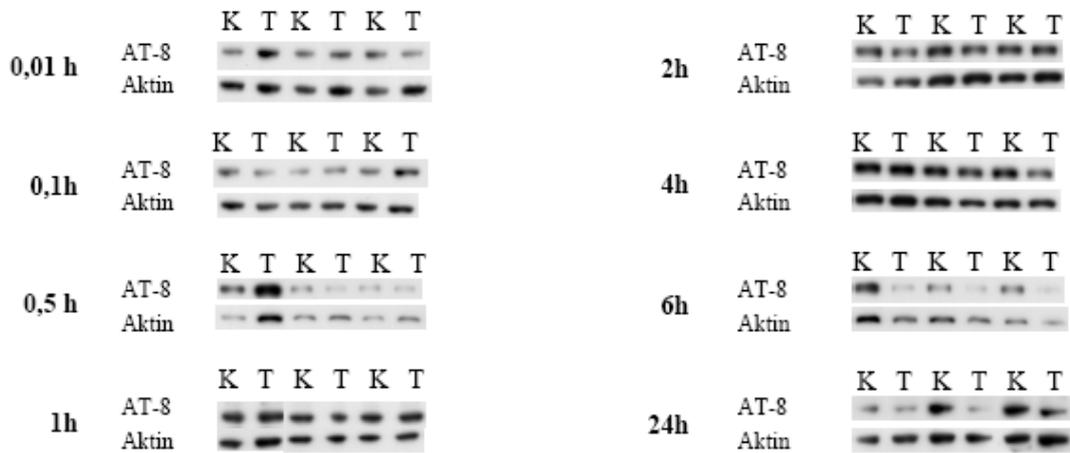
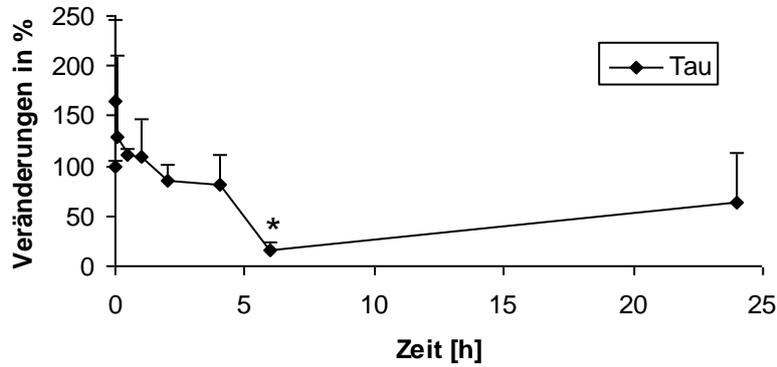


Abbildung 3-29: AT-8 nach Behandlung mit GGTI286 10µM

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser199 Thr202 unter GGTI-Behandlung 10µM im Vergleich zur Kontrolle. Nach 6h Behandlung kam es zur signifikanten Abnahme der Phosphorylierung an diesem Epitop. Die anderen, leichten Schwankungen konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter GGTI-Behandlung zu keiner Phosphorylierungszunahme an diesem Epitop. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit GGTI286 10µM, * = p < 0,05.

Tau Phosphorylierung PHF-1

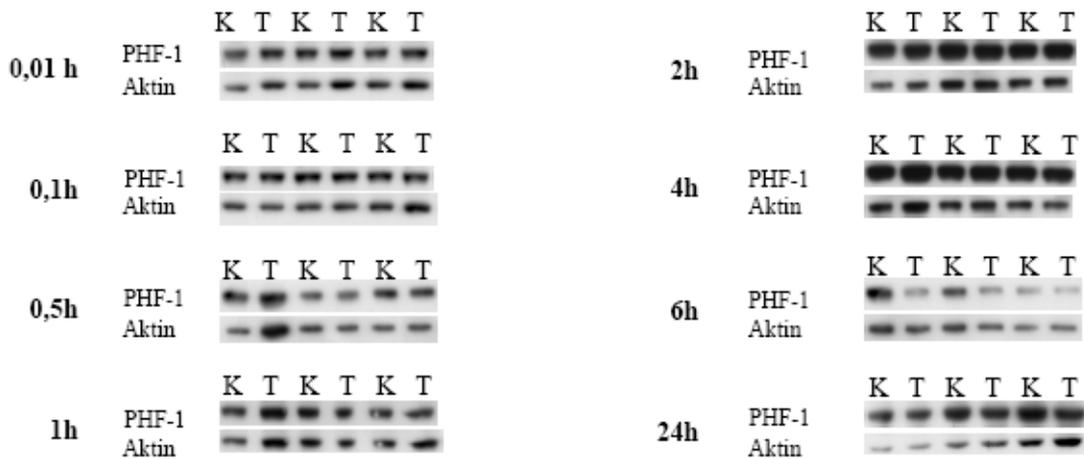
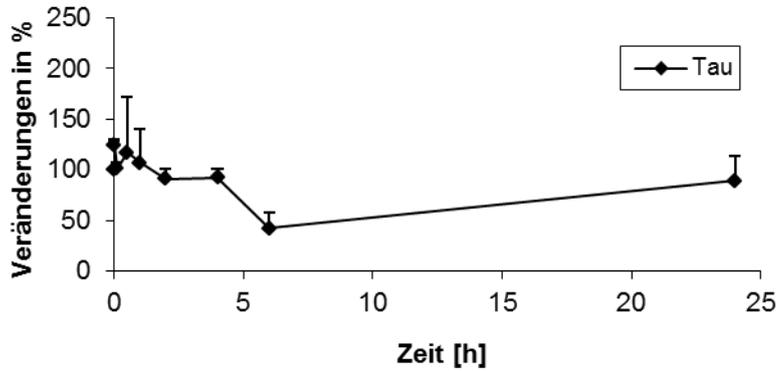


Abbildung 3-30: PHF1 nach Behandlung mit GGTI286 10µM

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser396 Ser404 unter GGTI-Behandlung 10µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen der Menge an PHF-1 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter GGTI-Behandlung zu keiner Phosphorylierung an diesem Epitop. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit GGTI286 10µM

4.3.2 ROCK-Inhibition mit Y-27632

Wie beim Einsatz von GGTI wurde zunächst die Tau-Gesamtmenge mit dem Antikörper Tau-5 bestimmt. Schwankungen in der Proteinbeladung wurden durch die Untersuchung der Aktinbeladung mittels Westernblotanalyse in mehreren Versuchen analysiert und korrigiert. Der Untersuchungszeitraum von 24h zeigte keine Unterschiede in der Gesamtmenge an Tau. Anschließend wurde mittels des Antikörpers 12E8 die Phosphorylierung des entsprechenden Epitops an Tau untersucht. Die leichten Schwankungen des Signals nach der Untersuchung mit 12E8 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter ROCK-Inhibition zu keiner Phosphorylierungsänderung an diesem Epitop. Die Untersuchung mit AT-8 diente der Überprüfung der Phosphorylierung des Epitops Ser202 Thr205. Ebenso wie beim 12E8 kam es zu keiner Zunahme der Phosphorylierung dieses Epitops. Mit Hilfe des Antikörpers PHF-1 wurde die Phosphorylierung des Epitops Ser396 Ser404 untersucht. Die leichten Schwankungen sind auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung in Unterschieden in der Proteinbeladung zu begründen. Es kam zu keiner Zunahme der Phosphorylierung an diesem Epitop.

Die Inhibition von ROCK führte innerhalb des untersuchten Zeitraums zu keiner Phosphorylierungsänderung an den untersuchten Epitopen.

Tau gesamt

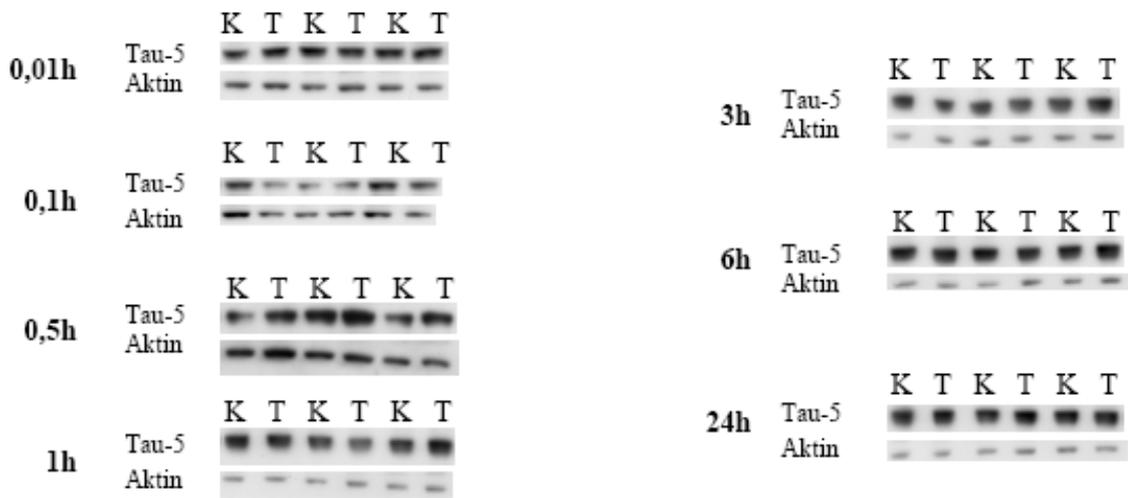
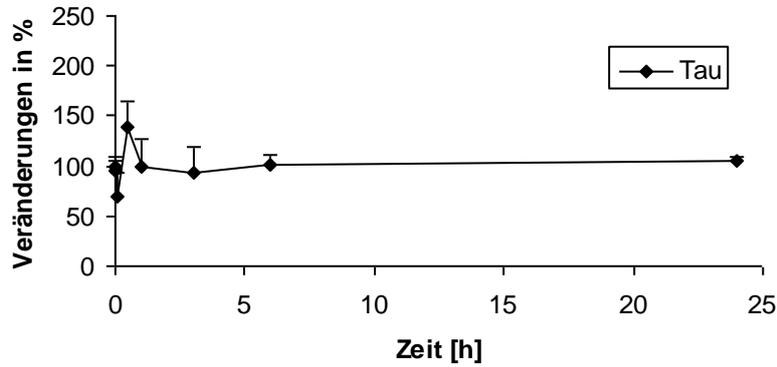


Abbildung 3-31: Tau-5 nach Behandlung mit ROCK-Inhibitor Y-27632 50µM

Dargestellt ist die Tau-Gesamtmenge unter ROCK-Inhibition 50µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen der Tau-Gesamtmenge konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Die Tau-Gesamtmenge blieb während des untersuchten Zeitraums konstant. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) unter Y-27632 50µM

Tau Phosphorylierung 12E8

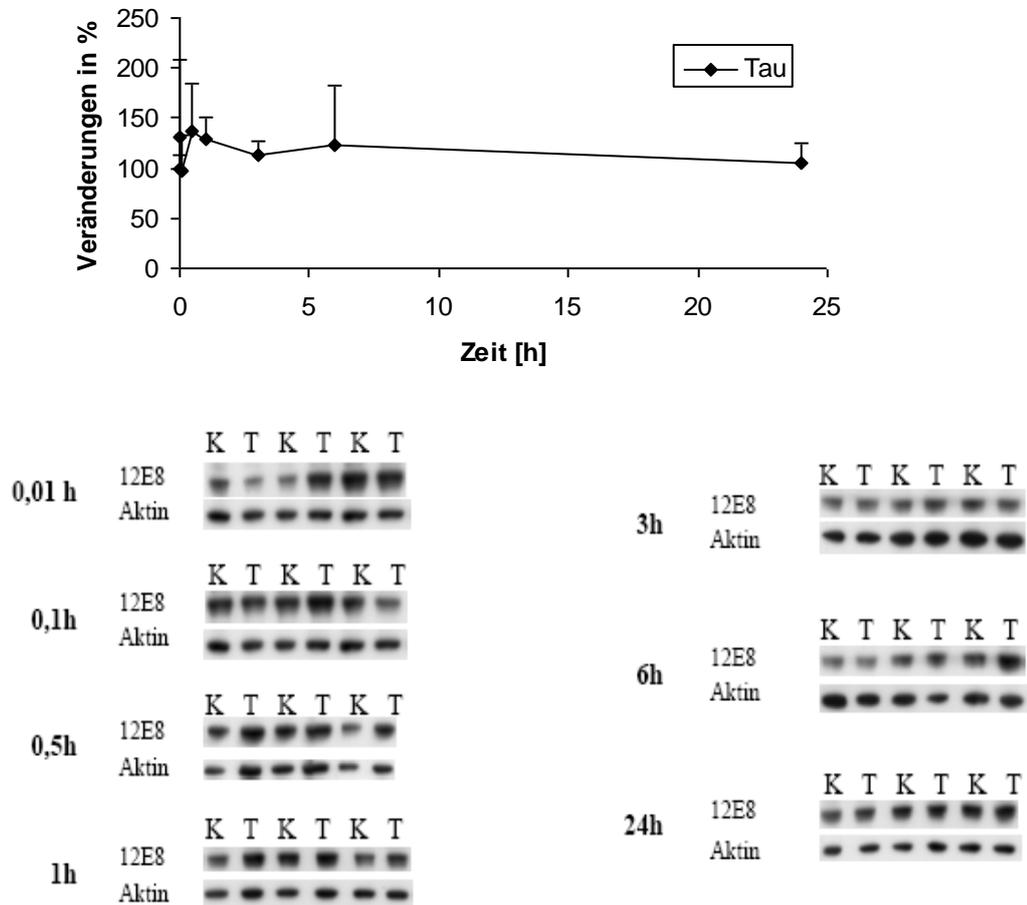


Abbildung 3-32: 12E8 nach Behandlung mit ROCK-Inhibitor Y-27632 50µM

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser262 unter ROCK-Inhibition 50µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam innerhalb des untersuchten Zeitraums zu keiner Phosphorylierungsänderung an diesem Epitop. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit Y-27632 50µM

Tau Phosphorylierung AT-8

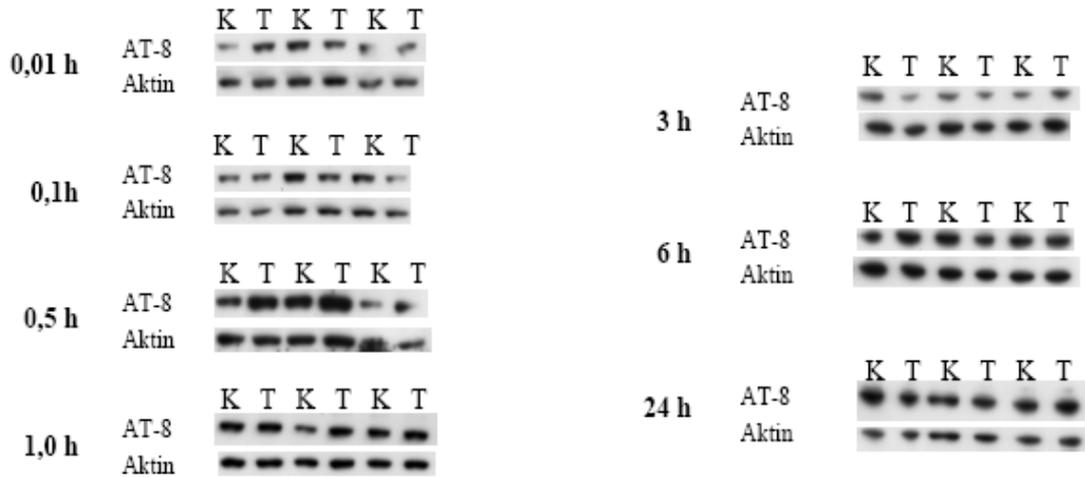
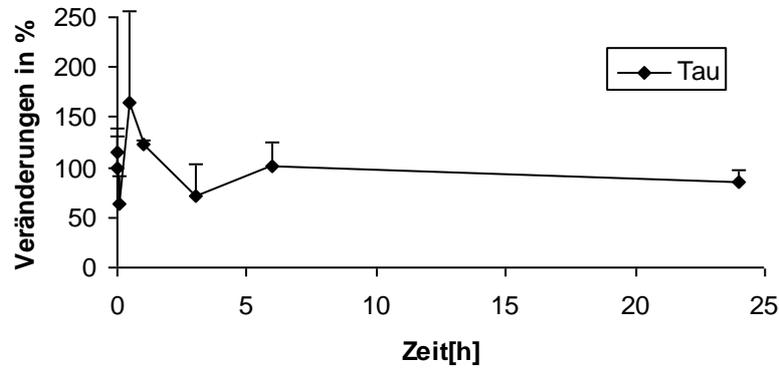


Abbildung 3-33: AT-8 nach Behandlung mit ROCK-Inhibitor Y-27632 50µM

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser202 Thr 205 unter ROCK-Inhibition 50µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen der Menge an AT-8 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter ROCK-Inhibition, wie bei Behandlung mit GGTI zu keiner Phosphorylierungsänderung an diesem Epitop. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit Y-27632 50µM

Tau Phosphorylierung PHF-1

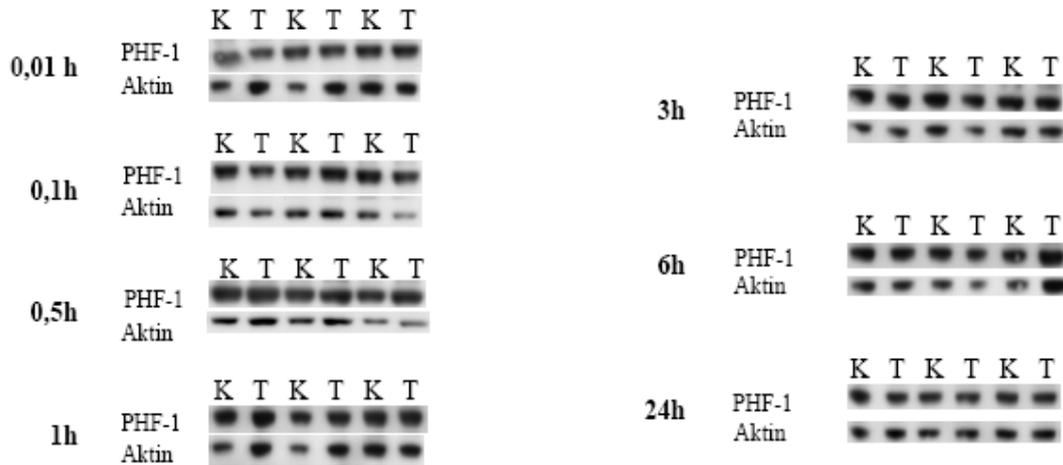
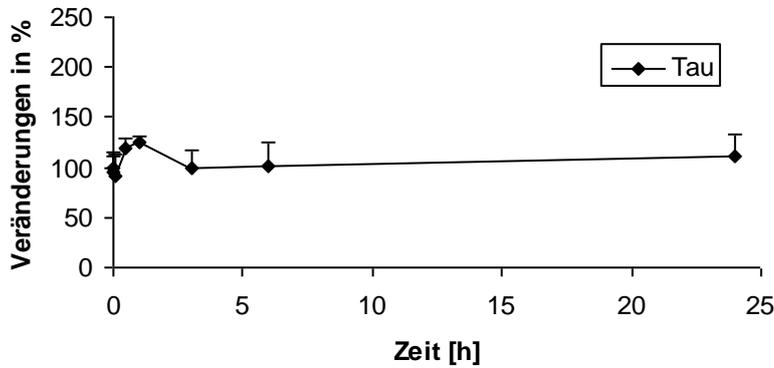


Abbildung 3-34: PHF-1 nach Behandlung mit ROCK-Inhibitor Y-27632 50µM

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser396 Ser404 unter ROCK-Inhibition 50µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen der Menge an PHF-1 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter ROCK-Inhibition wie bei der Behandlung mit GGTI zu keiner Phosphorylierungsänderung an diesem Epitop. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit Y-27632 50µM

4.3.3 Rac1-Inhibition mit NSC 23766

Nach der Inhibition von GGT und ROCK wurden abschließend Phosphorylierungsänderungen von Tau unter Rac1-Inhibition mit einer Konzentration von 50µM untersucht. In den MTT-Assays und den Aufnahmen der Immunohistochemie wurde deutlich, dass die Rac1-Inhibition einen starken Einfluss auf das neuronale Überleben des Mikrotubulus- und des Mikrofilamentsystems hatte. Nun sollte ermittelt werden, ob ein Zusammenhang der Schädigungen auch mit einer erhöhten Phosphorylierung des Taus einhergeht. Die Vorgehensweise entsprach den Versuchen mit GGTI und ROCK-Inhibitor. Getestet wurden wiederum die Antikörper Tau-5, 12E8, AT-8 und PHF-1.

Wie bei der Inhibition von GGT und ROCK wurde zunächst die Tau-Gesamtmenge mit dem Antikörper Tau-5 bestimmt. Schwankungen in der Proteinbeladung wurden erneut durch die Analyse der Aktinbeladung untersucht. Mit dem Antikörper 12E8 wurde die Phosphorylierung des Epitops Ser262 untersucht. Die leichten Schwankungen der Menge an 12E8 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam unter Rac1-Inhibition zu keiner Phosphorylierungsänderung an diesem Epitop. Anschließend erfolgten die Untersuchung mit AT-8 und die Überprüfung der Phosphorylierung des Epitops Ser202 Thr205. Es kam an diesem Epitop zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung nach 24h Behandlung. Mit Hilfe des Antikörpers PHF-1 wurde abschließend die Phosphorylierung des Epitops Ser396 Ser404 untersucht. Dabei wurde eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung nach 6h und 24h Behandlung gemessen. Die anderen, leichten Schwankungen wurden auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als Unterschiede in der Proteinbeladung identifiziert. Die Blots zeigten bei den Proben der 4h, 6h und 24h Behandlungen mehrere kleinere Banden, die durch die Fragmentierung beim Abbau von Tau entstehen (nicht abgebildet).

Die Streuung der Werte zur Untersuchung der Tau-Phosphorylierung ist zum Teil groß und hängt mit Schwankungen der Proteinmenge in den einzelnen untersuchten Proben zusammen. Da die Inhibition von GGT mit massiven Schäden einherging, war die Qualität der Proteine mit steigender Behandlungsdauer reduziert. Trotz mehrmaliger, sorgfältiger Angleichung der Proteinkonzentrationen in allen Proben, ist die Analyse von exakt gleichen Mengen Tau in allen Proben nicht vollständig gelungen. Deshalb wurde

in jeder Probe neben den phosphorylierungsabhängigen Epitopen auch die Menge an Aktin als „Markerprotein“ untersucht. Traten Schwankungen der untersuchten phosphorylierungsabhängigen Epitope auf, so wurden nur solche Schwankungen als spezifisch erachtet, wenn keine entsprechenden Schwankungen in der Aktinbeladung in der gleichen Probe festgestellt wurden.

Tau gesamt

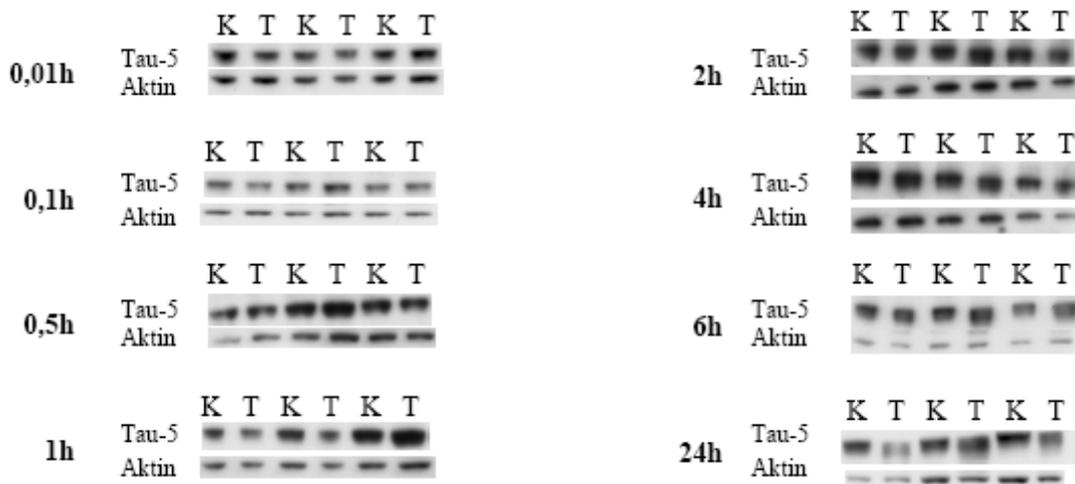
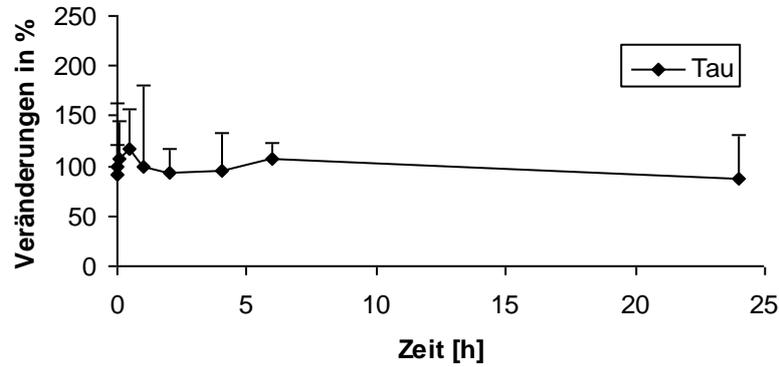


Abbildung 3-35: Tau-5 nach Behandlung mit Rac1-Inhibitor NSC 23766 50µM 24h

Dargestellt ist die Tau-Gesamtmenge unter Rac1-Inhibition 50µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen der Tau-Gesamtmenge konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Die Tau-Gesamtmenge blieb während des untersuchten Zeitraums konstant. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit NSC 23766 50µM

Tau Phosphorylierung 12E8

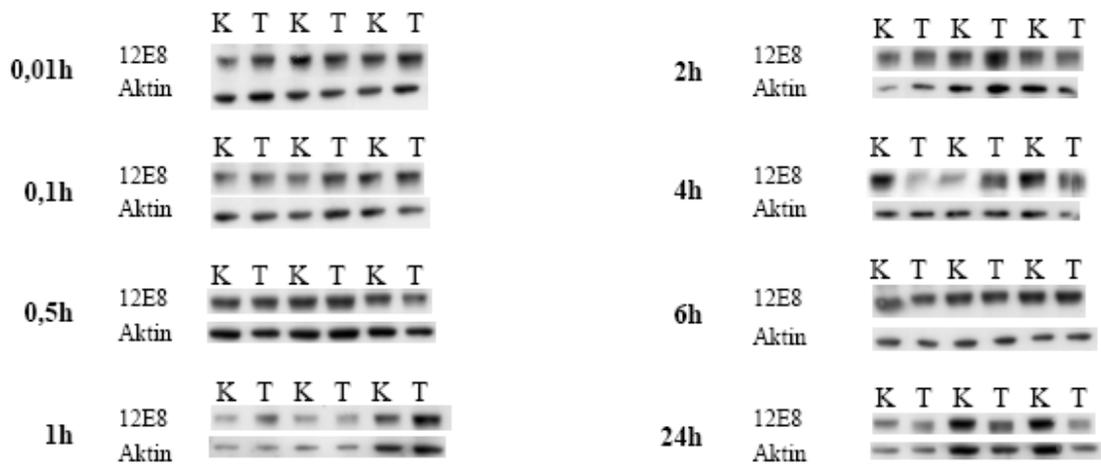
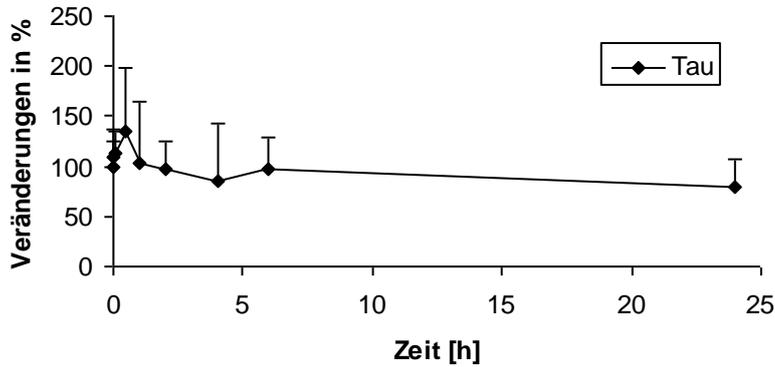


Abbildung 3-36: 12E8 nach Behandlung mit Rac1-Inhibitor NSC 23766 50µM 24h

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung an Epitop Ser262 unter Rac1-Inhibition 50µM im Vergleich zur Kontrolle. Die leichten Schwankungen konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. Es kam innerhalb des untersuchten Zeitraums wie bei der Behandlung mit GGTI und ROCK-Inhibitor unter Rac1-Inhibition zu keiner Phosphorylierungsänderung an diesem Epitop. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit NSC 23766 50µM

Tau Phosphorylierung AT-8

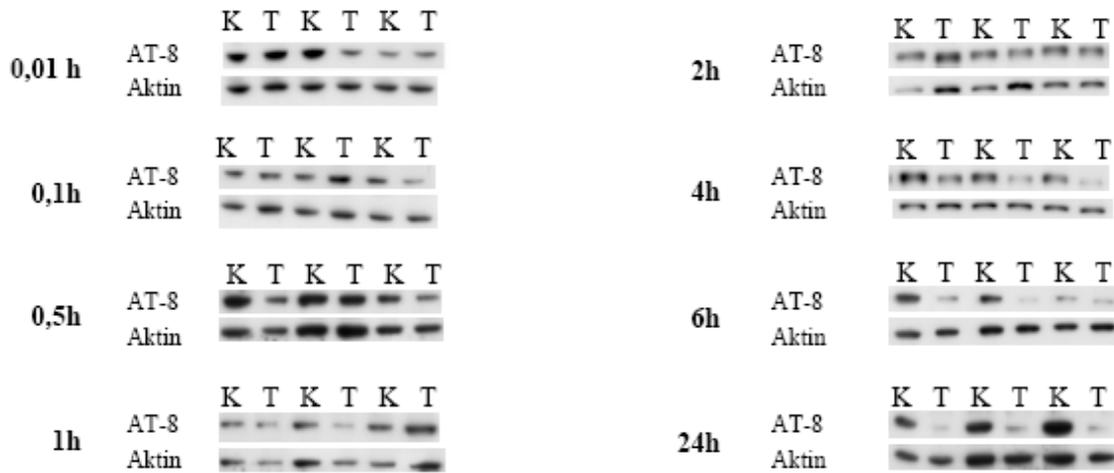
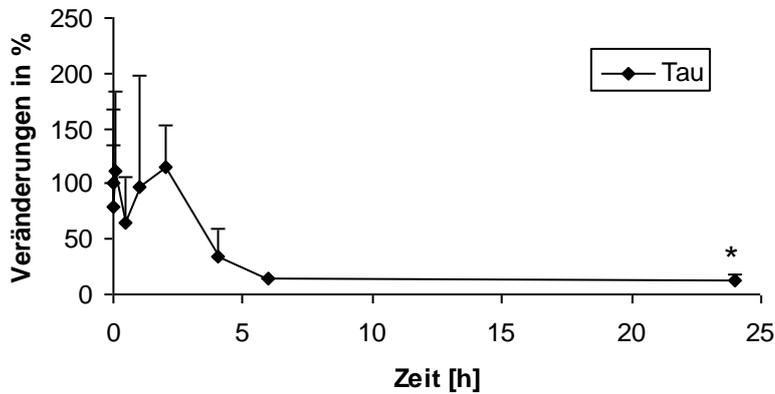


Abbildung 3-37: AT-8 nach Behandlung mit Rac1-Inhibitor NSC 23766 50µM

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser202 Thr205 unter Rac1-Inhibition 50µM im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h kam es zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung an diesem Epitop. Die anderen, leichten Schwankungen der Menge an AT-8 konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit NSC 23766 50µM, * = p < 0,05

Tau Phosphorylierung PHF-1

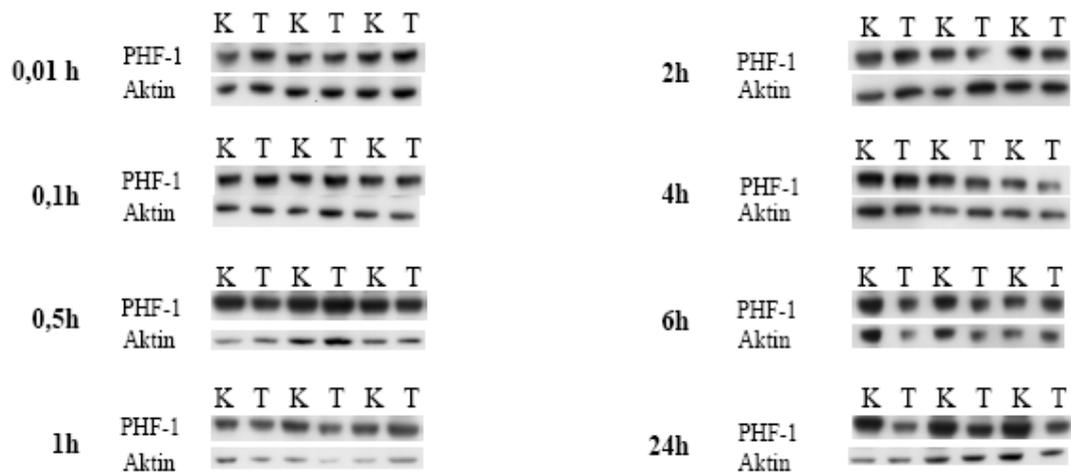
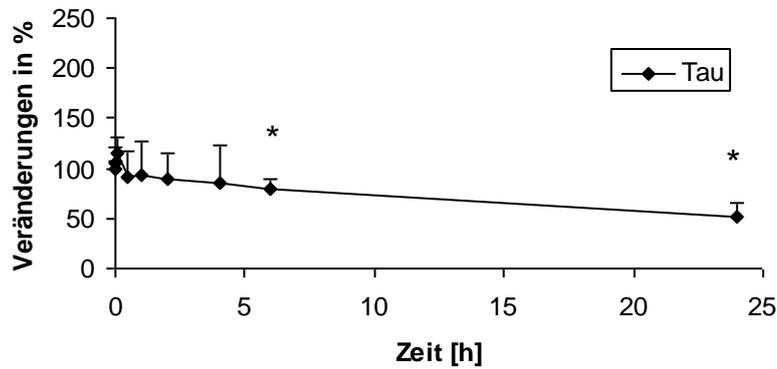


Abbildung 3-38: PHF-1 nach Behandlung mit Rac1-Inhibitor NSC 23766 50 μ M

Dargestellt ist die Tau-Phosphorylierung am Epitop Ser396 Ser404 unter Rac1-Inhibition 50 μ M im Vergleich zur Kontrolle. Nach 6h und 24h Behandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung an diesem Epitop. Die anderen, leichten Schwankungen konnten auf der Grundlage der Analyse der Aktinbeladung als beladungsabhängige Schwankungen identifiziert werden. N = 3, K = Kontrolle, T = treatment (Behandlung) mit NSC 23766 50 μ M, * = p < 0,05

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit zeigen, dass das neuronale Überleben stark von der Inhibition von GGT und Rac1 beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibition von ROCK keinen Effekt. In den immunohistochemischen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass es nach der Inhibition von GGT nach 4h Inkubationszeit zu massiven Schäden an den Mikrotubuli und Mikrofilamenten kam. Ähnliche Effekte setzten nach der Inkubation mit dem Rac1-Inhibitor bereits nach 2h ein. Die ROCK-Inhibition führte hingegen zu stärker ausgeprägten Wachstumskegeln und hatte keinen Effekt auf die Mikrotubuli. Bei den Experimenten zur Tau-Phosphorylierung konnte eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung mit dem Antikörper AT-8 nach 6h Inkubationszeit mit GGT-Inhibitor beobachtet werden. Die Experimente zur Rac1-Inhibition zeigten mit dem Antikörper PHF-1 bei 6h und 24h Behandlungszeit mit dem Antikörper AT-8 nach 24h eine reduzierte Phosphorylierung. Die Inhibition von ROCK zeigte keinen Effekt auf die untersuchten Tau-Epitope.

Inhibitionen Untersuchungen	Inhibition von GGT mit GGTI286 10µM	Inhibition von ROCK mit Y-27632 50µM	Inhibition von Rac1 mit NSC 23766 50µM
Neuronales Überleben	Stark reduziert	Kein Effekt	Stark reduziert
Immunohistochemische Untersuchungen	Massive Schäden an Mikrotubuli und Mikrofilamenten ab 4h Inkubationszeit	Stärker ausgeprägte Wachstumskegel; Kein Effekt auf Mikrotubuli	Massive Schäden an Mikrotubuli und Mikrofilamenten ab 2h Inkubationszeit
Tau-Phosphorylierung	Kein Effekt mit Antikörpern 12E8 und PHF-1; Signifikante Abnahme der Phosphorylierung bei Untersuchung mit Antikörper AT-8 nach 6h Inkubationszeit	Kein Effekt mit Antikörpern 12E8 PHF-1 und AT-8	Kein Effekt mit Antikörper 12E8; Signifikante Abnahme der Phosphorylierung bei Untersuchung mit Antikörper PHF-1 nach 6h und 24h sowie Antikörper AT- 8 nach 24h Inkubationszeit

Abbildung 4-39: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen von primären Mäuseuronen mit der Inhibition von GGT, ROCK und Rac1

5 Diskussion

RhoA und Rac1 gehören zu den kleinen GTPasen und spielen in Neuronen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Mikrofilamente und Mikrotubuli des Zytoskeletts.

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte der spezifischen Hemmung von GGT, ROCK und Rac1 auf das Überleben und das Zytoskelett von primären Mäuseneuronen zu untersuchen.

In einer vorherigen Publikation der Arbeitsgruppe an primären Rattenneuronen wurde nach Inhibition von GGT ein transients Anstieg der Phosphorylierung eines Tau-Epitops festgestellt (Meske et al., 2003). Eine andere Arbeitsgruppe hatte sich spezifisch mit der Inhibition von ROCK befasst. An SF9 Zellen der Mottenovarien wurde ebenfalls ein Anstieg der Phosphorylierung einiger Tau-Epitope nach ROCK-Inhibition beobachtet. In Folge dessen war die Stabilität der Mikrotubuli durch Tau reduziert (Amano et al., 2003). Neben diesen beiden Untersuchungen gibt es keine weiteren Arbeiten zum Zusammenhang der Inhibition von GGT, ROCK und Rac1 und einer Hyperphosphorylierung von Tau in primären Mäuseneuronen.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten geben hinsichtlich der untersuchten Zellart und Tau-Epitope sowie der Untersuchungszeiträume einen neuen Einblick in die Effekte nach spezifischer Hemmung von GGT, ROCK und Rac1 und untersuchen mögliche Zusammenhänge einer Hyperphosphorylierung von Tau.

5.1 GGT, ROCK, Rac1 und das neuronale Überleben

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das neuronale Überleben unter GGT-, ROCK- und Rac1-Inhibition untersucht. Die Mäuseneuronen zeigten keinen Effekt bei ROCK-Inhibition, reagierten jedoch sehr sensibel auf die Inhibition von GGT und Rac1. Bereits nach 6h Behandlungsdauer hatten 40% bzw. 15% der Zellen nicht überlebt. Nach 24h Behandlungsdauer hatten bei GGT-Inhibition 75% und bei Rac1-Inhibition 40% der Zellen nicht überlebt. Diese Ergebnisse korrespondieren im Wesentlichen mit anderen Untersuchungen, z.B. Le et al., 2005, Domoki et al., 2009, Chen et al., 2010, überein.

5.2 Untersuchungen zum Zytoskelett

Die nachfolgend beschriebenen Effekte, wie z.B. die Schädigung der Zellfortsätze bei Rac1-Inhibition, traten innerhalb der ersten 6h nach Beginn der Behandlung der Zellkulturen auf. Dementsprechend waren die frühen Zeitpunkte bis 6h Inkubationszeit von besonderem Interesse für die immunohistochemischen Untersuchungen und die Analyse der Tau-Phosphorylierung. Die Zellkulturen wurden daher während der ersten 6h Behandlung in kurzen Zeitabständen untersucht.

5.2.1 GGT und das Zytoskelett

Die Untersuchungen der neuronalen Zellkulturen nach Hemmung von GGT zeigten, ähnlich wie bei der Rac1-Inhibition, massive Schäden an den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten. Im Unterschied zur Inhibition von Rac1 traten die ersten Effekte der GGT-Inhibition erst nach 4h Behandlungsdauer auf, d.h. also nach einer etwa 2h längeren Inkubationszeit als bei der Rac1-Inhibition. Diese zeitliche Verzögerung könnte damit zusammenhängen, dass bei der Inhibition mit GGTI286 noch geranylgeranyliertes Rac1 vorhanden war und die Schadefekte deshalb etwas verzögert eintraten.

5.2.2 ROCK und das Zytoskelett

Ein ganz anderes Bild zeigte sich bei der Inhibition von ROCK, dem Haupteffektor von RhoA. ROCK kann über seinen Effektor LIMK1/2 die Aktindepolymerisation in Zellen des Neuroblastomtumors steigern (Maekawa et al., 1999) und durch Inhibition von mDia die Protrusion von Membranfortsätzen in primären Rattenneuronen hemmen (Arakawa et al., 2003). Des Weiteren inhibiert ROCK CRMP-2 und führt so zu einer Degeneration der Wachstumskegel in primären Rattenneuronen (Fukata et al., 2002).

Die ROCK-Inhibition der primären Neuronen hatte bei den Untersuchungen zu dieser Arbeit keinen Einfluss auf das neuronale Überleben. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Gruppen an humanen Stammzellen (Li et al., 2009; Li et al., 2008). Die Mikrofilamente der primären Neuronen der Maus waren in den immunohistochemischen Aufnahmen im gesamten Verlauf der 24h Inkubationszeit besser als in den Kontrollen entwickelt, insbesondere im Bereich der Wachstumskegel.

Viele andere Untersuchungen zu aktivem RhoA und ROCK ähneln dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Phänotyp. Die Inhibition von RhoA mit dem C3 Toxin von *Clostridium botulinum* und der Einsatz von dominant negativem RhoA führten zu ähnlich gut organisierten Aktinstrukturen wie in den hier durchgeführten Versuchen zur Inhibition von ROCK (Jalink et al., 1994). Die Wirkung von aktivem RhoA wurde in zahlreichen Experimenten untersucht. Konstitutiv aktives RhoA führte in PC12 und Zellen des Neuroblastoms zu einer Retraktion von Neuriten (Tigyi et al., 1996) sowie zu reduziertem Dendritenwachstum in hippocampalen Pyramidenzellen von Ratten (Nakayama et al., 2000) und in hippocampalen Zellkulturen von Ratten und Mäusen (Ahnert-Hilger et al., 2004). In Neuroblastomzellen konnte bei RhoA/ROCK-Aktivierung die Depolymerisation der Mikrotubuli und Neurofilamente nachgewiesen werden (Amano et al., 1998, Hirose et al., 1998; Katoh et al., 1998). Auch kam es nach Aktivierung von ROCK in Zellen des Neuroblastoms zur Zellrundung und Neuritenretraktion (Hirose et al., 1998). In Versuchen zum Neuritenwachstum konnte ebenso gezeigt werden, dass konstitutiv aktives Rac1 zum Wachstum der neuronalen Fortsätze von hippocampalen Zellkulturen von Ratten führt, wohingegen konstitutiv aktives RhoA genau das Gegenteil bewirkte (Schwamborn & Püschel, 2004). In hippocampalen Neuronen von Mäusen bewirkte die Inhibition von ROCK die Bildung von neuen, langen Spines der Dendriten und erhöhte deren protrusive Motilität (Tashiro & Yuste, 2004).

5.2.3 Rac1 und das Zytoskelett

Rac1 spielt durch seine Effektoren mDia, PAK und WAVE eine wichtige Rolle in der Steigerung der Aktinpolymerisation (Eden et al., 2002, Zigmund, 2004, Wang et al., 2007) und erhöht über seinen Effektor DOCK7 auch die Mikrotubulipolymerisation (Watanabe-Uchida et al., 2006).

Bei den Experimenten zu der vorliegenden Arbeit wurden in den immunohistochemischen Färbungen der neuronalen Zellkulturen nach Rac1-Inhibition zunächst nach 2h Behandlungsdauer kleinere, aktinreiche Wachstumskegel als in den Kontrollen beobachtet. Die Zellkulturen der 6h Behandlung zeigten jedoch massive Schäden am Zytoskelett, z.B. eine Fragmentierung der Neurite. Zudem waren die Phalloidin-positiven F-Aktinstrukturen deutlich geschädigt. In den Proben zur 24h Rac1-

Inhibition war ein Teil der Zellen vollkommen zerstört sowie die Dendriten und Axone überwiegend fragmentiert. Bei den Färbungen mit FITC-Phalloidin zur Untersuchung der Mikrotubuli wurden nach 2h Rac1-Inhibition Schwellungen mit anschließender Fragmentierung im Bereich der Neurite sichtbar und mit steigender Behandlungsdauer ein hinsichtlich der Dichte reduziertes Netzwerk von Mikrotubuli beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung von primären Neuronen dokumentieren sehr genau den zeitlichen Verlauf nach Rac1-Inhibition und decken sich mit Untersuchungen anderer Gruppen an anderen Zelltypen. Die Gruppe von Corbetta et al. konnte bei Rac1 Knockout-Mäusen Verhaltensauffälligkeiten, Epilepsie und vorzeitigen Tod nachweisen (Corbetta et al., 2009). Bei den Untersuchungen von Sarner und Mitarbeitern an Zellen des Neuroblastomtumors wurde festgestellt, dass aktiviertes Rac1 für die Differenzierung von Neuronen benötigt wird und dominant negatives Rac1 das Neuritenwachstum in Zellen des Neuroblastomtumors hemmt (Sarner et al., 2000). Ebenso ist eine erhöhte Rac1-Aktivität in den Wachstumskegeln nerve growth factor stimulierter PC12 Zellen festgestellt worden (Aoki et al., 2004). Dominant negatives Rac1 blockiert das Wachstum, die Morphogenese und die Stabilität der Zellen. (Tashiro & Yuste, 2004). Khodosevich und Monyer konnten zeigen, dass konstitutiv aktives Rac1 zu längeren Neuriten und konstitutiv negatives Rac1 zu kürzeren Neuriten in Neuronen führt (Khodosevich & Monyer, 2010).

Die Ähnlichkeit zwischen den Phänotypen von Rac1- und GGPP-inhibierten Neuronen ist von Interesse, da in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe die Phänotypen der GGPI- und Statinbehandlung ebenfalls gleich waren. Statine sind Medikamente, die den Mevalonatweg hemmen und therapeutisch zur Senkung des Cholesterinblutspiegels genutzt werden. Sie verursachen jedoch dosis- und zeitabhängig Nebenwirkungen an neuronalen Zellkulturen. Es konnte gezeigt werden, dass der GGPP-Mangel diese Schäden bei Statinbehandlung auslöst. Da durch den GGPP-Mangel die Aktivierung von RhoA, ROCK und Rac1 ausbleibt, sollte weiterhin geklärt werden, ob ROCK oder Rac1 einen Anteil an den beobachteten Effekten haben könnte. Entsprechend den hier aufgezeigten Zytoskelettschäden könnte die Inhibition insbesondere von Rac1 Teil der Signalkette sein, die bei der Statin-induzierten Neurotoxizität eine zentrale Rolle spielt. In der Krebsforschung wird die Inhibition von Rac1 als therapeutisches Ziel diskutiert.

Anders als in Neuronen wäre hier eine toxische Wirkung erwünscht. So konnten Akunuru und Kollegen durch Rac1-Inhibition an Stammzellen des pulmonalen Adenokarzinoms die Proliferation und die Metastasierung der Zellen hemmen (Akunuru et al., 2011). An Zellen des Mammakarzinoms führte die Inhibition von Rac1 mit NSC 23766 zur Apoptose (Yoshida et al., 2010).

5.3 GGT, ROCK, Rac1 und Tau

In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe an primären Rattenneuronen des Hippokampus zeigte sich ein transientser Anstieg der Phosphorylierung von Tau am Epitop Ser199/202 nach Lovastatinbehandlung und Inhibition von GGT (Meske et al., 2003).

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Phosphorylierung dieser Epitope von Tau zeigten nach Inhibition von ROCK und der Westernblotanalyse keine Phosphorylierungsänderungen innerhalb des Untersuchungszeitraums von 24h. Die Phosphorylierung von Tau scheint nicht durch eine ROCK-Inhibition in primären Mäuseneuronen an den hier untersuchten Epitopen beeinflusst zu werden. Nach GGT-Inhibition kam es nach 6h Behandlungsdauer zu einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung am Epitop Ser202 Thr205, vermutlich durch Abbauprozesse nach Apoptose. Die gleichen Untersuchungen erfolgten auch mit den Rac1-inhibierten Zellkulturen. Es konnten keine Änderungen der Phosphorylierung mit dem Antikörper 12E8 beobachtet werden. Es kam nach Untersuchung mit dem Antikörper AT-8 am Epitop Ser202 Thr205 zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung nach 24h Behandlung. Mit Hilfe des Antikörpers PHF-1 wurde abschließend die Phosphorylierung des Epitops Ser396 Ser404 untersucht, bei der eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung nach 6h und 24h Behandlung festgestellt wurde. Diese Effekte könnten durch die proteolytische Spaltung des Taus bei Apoptose der Neuronen erklärt werden. In PC12 Zellen und nicht-neuronalen CHO-Zellen die mit Tau transfiziert wurden, sind ähnliche Effekte beobachtet worden. Zu Beginn der Apoptose dieser Zellen wurde Tau am Epitop Ser369 Ser404 durch die PP2A dephosphoryliert (Mills et al., 1998). Diese Ergebnisse stimmen mit den beobachteten Effekten der Rac1-Inhibition nach 6h und 24h Behandlungsdauer überein.

Wie bei der Inhibition von GGT konnte kein direkter Zusammenhang zwischen einer Inhibition von Rac1 und hyperphosphorylierten Epitopen von Tau festgestellt werden.

Eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse zur Phosphorylierung von Tau bei der GGT-Inhibition und der Untersuchung mit AT-8 könnte an Speziesunterschieden liegen. Genetische Unterschiede zwischen Maus, wie in der vorliegenden Arbeit, und Ratte, wie bei den Experimenten von Meske et al., können zu den unterschiedlichen Resultaten geführt haben. Die gleiche Konzentration von 10 μ M GGT-Inhibitor könnte bei Mäusen schon eine toxische Wirkung auslösen. Der transiente Anstieg bei den Untersuchungen von Meske et al. in der Phosphorylierung von Tau nach 12h GGT-Inhibition am Epitop Ser199/202 könnte daher trotz gleich hoher Konzentration des Inhibitors bei den Versuchen zu der vorliegenden Arbeit auf Grund von Speziesunterschieden nicht sichtbar geworden sein.

Auf Grund des schnellen Absterbens der Neuronen nach GGT-Inhibition nach 6h um 40% und nach 24h um 75% und der massiven Zytoskelettschäden nach 6h GGT-Inhibition in den immunohistochemischen Färbungen wurde kein zeitlich übereinstimmender Zwischenwert von 12h Behandlungsdauer wie in der Arbeit von Meske et al. erhoben.

Die Streuung der Werte zur Untersuchung der Tau-Phosphorylierung ist zum Teil groß und hängt mit Schwankungen der Proteinmenge in den einzelnen untersuchten Proben zusammen. Da die Inhibition von Rac1 und GGT mit massiven Schäden einherging, war die Qualität der Proteine mit steigender Behandlungsdauer reduziert. Trotz mehrmaliger, sorgfältiger Angleichung der Proteinkonzentrationen in allen Proben, ist die Analyse von exakt gleichen Mengen Tau in allen Proben nicht vollständig gelungen. Deshalb wurde in jeder Probe neben den phosphorylierungsabhängigen Epitopen auch die Menge an Aktin als „Markerprotein“ untersucht. Traten Schwankungen der untersuchten phosphorylierungsabhängigen Epitope auf, so wurden nur solche Schwankungen als signifikant erachtet, wenn keine entsprechenden Schwankungen in der Aktinbeladung in der gleichen Probe festzustellen waren.

Es existiert bisher nur eine Medline-erfasste Untersuchung zur Inhibition von ROCK und deren Effekte auf die Tau-Phosphorylierung in SF9 Zellen der Mottenovarien (Amano et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe um Amano konnte zeigen, dass Tau in vitro direkt von ROCK an Thr245, Thr377 und Ser409 und auch schwächer am Epitop Ser262 phosphoryliert wird und es dadurch in seiner Funktion der Stabilisation und Organisation der Mikrotubuli inhibiert wird. Die Ursache für das schwache Signal der Phosphorylierung am Epitop Ser262 könnte darin liegen, dass andere Kinasen neben ROCK oder Phosphatasen stärker die Phosphorylierung an diesem Epitop steuern. Hervorzuheben ist, dass Amano und Kollegen zeigen konnten, dass das Epitop Ser262 zwar direkt durch ROCK phosphoryliert werden kann, die Inhibition von ROCK jedoch ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit keinen Effekt auf die Phosphorylierung hatte. Es scheint daher kein zwingender Zusammenhang zwischen ROCK Aktivität und Erhöhung der Phosphorylierung sowie ROCK-Inhibition und verminderter Phosphorylierung am Epitop Ser262 zu bestehen.

Weitergehende Untersuchungen von Amano et al. haben an COS7 Zellen eine erhöhte Phosphorylierung an den Epitopen Thr245 und Ser409, nicht aber am Epitop Thr377 gezeigt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergab die Untersuchung der COS7 Zellen ebenfalls keine erhöhte Phosphorylierung am Epitop Ser262 (Amano et al., 2003).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit an primären Mäuseneuronen konnten die unterschiedlichen Effekte auf das Zytoskelett der ROCK-, Rac1- und GGT-Inhibition innerhalb von 24h Behandlungszeit sehr genau dokumentieren. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zum neuronalen Überleben führte in den immunohistochemischen Experimenten die GGT- und Rac1-Inhibition zu starken Schäden an Mikrotubuli und Aktinfilamenten, sichtbar durch Fragmentierung und Zerstörung von Neuriten bis hin zum Zelltod. Die beobachteten Effekte ähneln denen aus Experimenten an Zellen des Neuroblastomtumors oder PC 12 Zellen unter Rac1-Inhibition (Sarner et al., 2000, Aoki et al., 2004). Die Inhibition von ROCK führte dagegen in den immunohistochemischen Experimenten zu stärker ausgeprägten Wachstumskegeln und hatte keine Auswirkungen auf das neuronale Überleben. Diese

Ergebnisse zur Rac1-, GGT- und ROCK-Inhibition deuten darauf hin, dass durch Statine verursachte Schäden an Neuronenkulturen mit der einhergehenden Rac1-Inhibition eng zusammenhängen können. Ein möglicher Zusammenhang der Inhibition von GGT, ROCK und Rac1 mit einer erhöhten Tau-Phosphorylierung wie bei Tauopathien konnte durch die hier vorliegende Arbeit an den ausgewählten Epitopen nicht festgestellt werden.

6 Literaturverzeichnis

Adamson , P., Marshall, C.J., Hall, A., Tilbrook, P.A. (1992) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20033-20038.

Ahnert-Hilger, G., Höltje, M., Grosse, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F., Just, I. (2004) Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J. Neurochem.*, **90**, 9-18.

Akunuru, S., Palumbo, J., Zhai, Q.J., Zheng, Y. (2011) Rac1 targeting suppresses human non-small cell lung adenocarcinoma cancer stem cell activity. *PLoS One.*; **6**, 16951.

Alberts, A.S., Bouquin N., Johnston L.H., Treisman R. (1998) Analysis of RhoA-binding Proteins Reveals an Interaction Domain Conserved in Heterotrimeric G Protein beta Subunits and the Yeast Response Regulator Protein Skn7. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8616-8622.

Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Fukata, Y., Yano, T., Shibata, M., Ikebe, M., Kaibuchi, K. (1998) Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes to Cells*, **3**, 177-188.

Amano, M., Kaneko, T., Maeda, A., Nakayama, M., Ito, M., Yamauchi, T., Goto, H., Fukata, Y., Oshiro, N., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (2003) Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J. Neurochem.*, **87**, 780-790.

Aoki, K., Nakamura, T., Matsuda M. (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 713-719.

- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., Narumiya, S.** (2003) Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.*, **161**, 381-391.
- Aspenström, P.** (1999) Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 95-102.
- Bernards, A., Settleman, J.** (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.*, **14**, 377-385.
- Bishop, A.L., Hall, A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.*, **348**, 241-255.
- Bonetti, P.O., Lerman, L.O., Napoli, C., Lerman, A.** (2003) Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? *Eur. Heart J.*, **24**, 225-248.
- Brandt, R., Léger, J., Lee, G.** (1995) Interactions of tau with neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell. Biol.* **131** 1327-40.
- Buchsbaum, R.J.** (2007) Rho activation at a glance. *J. Cell. Sci.*, **120**, 1149-1152.
- Buée, L., Bussièrre, Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R.** (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.*, **33**, 95-130.
- Chen, T.J., Hung, H.S., Wang, D.C., Chen, S.S.** (2010) The protective effect of ROCK-Inhibitor on aluminum-induced neurotoxicity in rat cortical neurons. *Toxicol. Sci.*, **116**, 264-72
- Cheng, Q., Sasaki, Y., Shoji, M., Sugiyama, Y., Tanaka, H., Nakayama, T., Mizuku, N., Nakamura, F., Takei, K. Goshima, Y.** (2003) Cdk5/p35 and Rho-kinase mediate ephrin-A5-induced signaling in retinal ganglion cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, **24**, 632-645.

Chuang, J.Z., Yeh, T.Y., Bollati, F., Conde, C., Canavosio, F., Caceres, A., Sung, C.H. (2005) The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Dev. Cell*, **9**, 75-86.

Corbetta, S., Gualdoni, S., Ciceri, G., Monari, M., Zuccaro, E., Tybulewicz, V.L., de Curtis, I. (2009) Essential role of Rac1 and Rac3 GTPases in neuronal development. *FASEB J.*, **23(5)**, 1347-1357.

Da Silva, J.S., Hasegawa, T., Miyagi, T., Dotti, C.G., Abad-Rodriguez, J. (2005) Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat. Neurosci.*, **8**, 606-615.

Davis, P.K., Johnson, G.V. (1999) Energy metabolism and protein phosphorylation during apoptosis: a phosphorylation study of tau and high-molecular-weight tau in differentiated PC12 cells. *Biochem. J.*, **340**, 51-58.

Domoki, F., Kis, B., Gáspár, T., Snipes, J.A., Parks, J.S., Bari, F., Busija, D.W. (2009) Rosuvastatin induces delayed preconditioning against oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, **296**, 97-105.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.*, **8**, 1454-1468.

Dransart, E., Olofsson, B., Cherfils, J. (2005) RhoGDIs Revisited: Novel Roles in Rho Regulation. *Traffic*, **6**, 957-966.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., Kirschner, M.W. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell*, **3**, 1141-1154.

Drubin, D.G., Feinstein, S.C., Shooter, E.M., Kirschner, M.W. (1985) Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J. Cell. Biol.*, **101**, 1799-807

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., Kirschner, M.W. (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, **418**, 790-793.

Esmaeli-Azad, B., McCarty, J.H., Feinstein, S.C. (1994) Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J. Cell. Sci.*, **107**, 869-79

Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., Kaibuchi, K. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 583-591.

Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., Zheng, Y. (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7618-7623.

Garcia-Mata, R., Boulter, E., Burridge, K., (2011) The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **(8)** 493-504

Grant, P., Sharmah, P., Pant, H.C. (2001) Cyclin-dependent protein kinase 5 (Cdk5) and the regulation of neurofilament metabolism, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1534-1546.

Guida, W.C., Hamilton, A.D., Crotty, J.W., Sebt, S.M. (2005) Protein farnesyltransferase: flexible docking studies on inhibitors using computational modeling. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **19**, 871-885.

Hardy, J. (2003) The relationship between amyloid and tau. *J. Mol. Neurosci.*, **20**, 203-206.

Harris C.M, Poulter, C.D. (2000) Recent studies of the mechanism of protein prenylation. *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 137-144.

Hernández, F., Lucas, J.J., Cuadros, R., Avila, J. (2003) GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol. Aging*, **24**, 1087-1094.

Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., Narumiya, S. (1998) Molecular Dissection of the Rho-associated Protein Kinase (p160ROCK)-regulated Neurite Remodeling in Neuroblastoma N1E-115 Cells. *J. Cell Biol.*, **141**, 1625-1636.

Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., Moolenaar, W.H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J. Cell Biol.*, **126**, 801-810.

Katayama, M., Kawata, M., Yoshida, Y., Horiuchi, H., Yamamoto, T., Matsuura, Y., Takai, Y. (1991) The posttranslationally modified C-terminal structure of bovine aortic smooth muscle rhoA p21. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12639-12645.

Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A., Negishi, M. (1998) p160 RhoA-binding Kinase ROKalpha Induces Neurite Retraction. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2489-2492.

Kawata, M., Farnsworth, C.C., Yoshida, Y., Gelb, M.H., Glomset, J.A., Takai, Y. (1990) Posttranslationally processed structure of the human platelet protein smg p21B: evidence for geranylgeranylation and carboxyl methylation of the C-terminal cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 8960-8964.

Khodosevich, K., Monyer, H. (2010) Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons in vitro. *BMC Neurosci.*, **Feb 10**, 11:18.

Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., Neve, R.L. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*, **2**, 1389-1397.

Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., Caceres, A. (2001) Evidence for the Involvement of Tiam1 in Axon Formation. *J. Neurosci.*, **21**, 2361-2372.

Lane, K.T., Beese, L.S. (2006) Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lipid Res.*, **47**, 681-699.

Le, S.S., Loucks, F.A., Udo, H., Richardson-Burns, S., Phelps, R.A., Bouchard, R.J., Barth, H., Aktories, K., Tyler, K.L., Kandel, E.R., Heidenreich, K.A., Linseman, D.A. (2005) Inhibition of Rac GTPase triggers a c-Jun- and Bim-dependent mitochondrial apoptotic cascade in cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.*, **94**, 1025-1039.

Lee, M.S., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., Tsai, L.H. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, **405**, 360-364.

Li X., Meng, G., Krawetz, R., Liu, S., Rancourt, D.E. (2008) The ROCK-Inhibitor Y27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells Dev.*, **17**, 1079-1085.

Li, X., Krawetz, R., Liu, S., Meng, G., Rancourt, D.E. (2009) ROCK-Inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum. Reprod.*, **24**, 580-589.

Madaule, P., Axel, R. (1985) A novel ras-related gene family. *Cell*, **41**, 31-40.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Narumiya, S. (1999) Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, **285**, 895-898.

Magee, T., Marshall, C. (1999) New Insights into the Interaction of Ras with the Plasma Membrane. *Cell*, **98**, 9-12.

Mazanetz, M.P., Fischer, P.M. (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 464-479.

Meske, V., Albert, F., Richter, D., Schwarze, J., Ohm, T.G. (2003) Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 93-102.

Mills, J.C., Lee, V.M.-L., Pittmann, R. N. (1998) Activation of PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis. *J. Cell Sci.*, **111**, 625-636

Muñoz-Montaño, J.R., Moreno, F.J., Avila, J., Diaz-Nido, J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett.*, **411**, 183-188.

Nakayama, A.Y., Harms, M. B., Luo, L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, **20**, 5329-5338.

Neve R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., Donlon, T.A. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res. Rev.*, **387**, 271-280.

Nikolic, M., Chou, M.M., Mayer, B.J., Tsai, L.H. (1998) The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature*, **395**, 194-198.

Noda, M., Yasuda-Fukazawa, C., Moriishi, K., Kato, T., Okuda, T., Kurokawa, K., Takuwa, Y. (1995) Involvement of rho in GTP gamma S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett.*, **367**, 246-50

Panda, D., Goode, B.L., Feinstein, S.C., Wilson, L. (1995) Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry*, **35**, 1141-27

Patrakitkomjorn, S., Kobayashi, D., Morikawa, T., Wilson, M.M., Tsubota, N., Irie, A., Ozawa, T., Aoki, M., Arimura, N., Kaibuchi, K., Saya, H., Araki, N. (2008) Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. *J. Biol. Chem.*, **283**, 9399-9413.

Patzke, H., Tsai, L.H. (2002) Calpain-mediated Cleavage of the Cyclin-dependent Kinase-5 Activator p39 to p29. *J. Biol. Chem.*, **277**, 8054-8060.

Ridley, A. J. (2000) Rho. In GTPases p 89-p136, *Oxford University Press, Oxford*

Riento, K., Ridley, A.J. (2003) ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 446-456.

Rossmann, K.L., Der, C.J., Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 167-180.

Sanchez, A.M., Flamini, M.I., Fu, X.D., Mannella, P., Giretti, M.S., Goglia, L., Genazzani, A.R., Simoncini, T. (2009) Rapid signaling of estrogen to WAVE1 and moesin controls neuronal spine formation via the actin cytoskeleton. *Mol. Endocrinol.*, **23**, 1193-1202.

Sarner, S., Kozma, R., Ahmed, S., Lim, L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 158-172.

Schwamborn, J.C., Püschel, A. (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.*, **7**, 923-929.

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.*, **522**, 177-85.

Stephenson, R., Clarke, S. (1990) Identification of a C-terminal protein carboxyl methyltransferase in rat liver membranes utilizing a synthetic farnesyl cysteine-containing peptide substrate. *J. Biol. Chem.*, **265**, 16248-16254.

Tashiro, A., Yuste, R. (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol. Cell. Neurosci.*, **26**, 429-440.

Tigyi, G., Fischer, D.J., Sebök, A., Marshall, F., Dyer, D.L., Miledi, R. (1996) Lysophosphatidic Acid-Induced Neurite Retraction in PC12 Cells: Neurite-Protective Effects of Cyclic AMP Signaling. *J. Neurochem.*, **66**, 549-558.

Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (1995) Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 1887-902

Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S. Jr., Chae, T., Harlow, E. (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*, **371**, 419-423.

Tseng, H.C., Zhou, Y., Shen, Y., Tsai, L.H. (2002). A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett.*, **523**, 58-62.

Voronkov, M., Braithwaite, S. P., Stock, J.B. (2011). Phosphoprotein phosphatase 2A: a novel druggable target for Alzheimer's disease. *F. Med. Chem.*, **3(7)**:821-33.

Wang, W., Eddy, R., Condeelis, J. (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 429-440.

Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E., Van Aelst, L. (2006) The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron*, **51**, 727-739.

Watanabe, A., Hasegawa, M., Suzuki, M., Takio, K., Morishima-Kawashima, M., Titani, K., Arai, T., Kosik, K.S., Ihara, Y. (1993) In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25712-25717.

Wennerberg, K., Der, C.J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell. Sci.*, **117**, 1301-1312.

Yoshida, H., Ihara, Y. (1993) Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. *J. Neurochem.*, **61**, 1183-1186.

Yoshida, T., Zhang, Y., Rivera Rosado, L.A., Chen, J., Khan, T., Moon, S.Y., Zhang, B. (2010) Blockade of Rac1 activity induces G1 cell cycle arrest or apoptosis in breast cancer cells through downregulation of cyclin D1, survivin, and X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 1657-68.

Yoshimura, T., Arimura, N., Kaibuchi, K. (2006) Molecular mechanisms of axon specification and neuronal disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1086**, 116-125.

Yoshimura, T., Arimura, N., Kaibuchi, K. (2006) Signaling networks in neuronal polarization. *J. Neurosci.*, **26**, 10626-10630.

Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., Kaibuchi, K. (2005) GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, **120**, 137-149.

Zigmond, S.H. (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 99-105.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kosarev, Svetla, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Effekte der Inhibition von ROCK und Rac1 auf Neuronen selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. med. Thomas G. Ohm für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, die fachliche Unterstützung sowie die kontinuierliche und konstruktive Durchsicht des Manuskriptes. Mein besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Volker Meske für die Heranführung an die Thematik, die engagierte Betreuung, die Unterstützung und die Motivation bei der Durchführung des Projektes.

Herzlich danke ich auch Dr. Knut Kallwellis und Frank Albert für die sachkundige Einarbeitung in die Laborarbeit, die stets offenen Ohren für Fragen und die gute Arbeitsatmosphäre.

Ohne die Unterstützung meiner Familie und Freunde hätte ich diese Arbeit nicht durchführen können. Daher gilt Ihnen mein größter Dank. Besonders danke ich dabei meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht und zu jeder Zeit liebevoll unterstützten und meinem Partner Martin Alpermann für seine Geduld, den unermüdlichen Beistand und die unzähligen aufbauenden Worte.