

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

DISSERTATION

**Der Einfluss von *Clostridium botulinum* C3 Proteinen auf
die neuronale Glutamat-Aufnahme**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Piepgras
aus Homburg

Datum der Promotion: 13.12.2019

VORWORT

Ich freue mich, Ihnen hiermit meine Monographie mit dem Titel „Der Einfluss von *Clostridium botulinum* C3 Proteinen auf die neuronale Glutamat-Aufnahme“ zur Erlangung des „Doctor medicinae“ vorlegen zu dürfen. Diese Arbeit beruht auf Teilen meiner experimentellen Arbeit am Institut für Integrative Neuroanatomie der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter Herrn PD Dr. Markus Höltje. Im Rahmen der experimentellen Arbeit zur Erforschung von *Clostridium botulinum* C3 Proteinen habe ich auch Versuche gemacht, die nicht ihren Weg in die Monographie gefunden haben, dafür aber einen Beitrag zur Publikation meiner Arbeitskollegen leisten konnten.

Loske P., Boato F., Hendrix S., **Piepgas J.**, Just I., Ahnert-Hilger G. and Höltje M. *et al.* (2012) ‘Minimal essential length of *Clostridium botulinum* C3 peptides to enhance neuronal regenerative growth and connectivity in a non-enzymatic mode.’, *Journal of Neurochemistry*, 120(6), pp. 1084–96. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07657.x.

Aus meinen Versuchsreihen stammt die Bestätigung des Ergebnisses, dass synaptische Verbindungen nach Behandlung hippocampaler Dissoziationskulturen mit C3bot 26mer zunehmen. Die Western Blot Analysen in Abbildung 2 d mit Nachweis von gesteigerten Signalintensitäten von Synaptophysin und MAP2 unter C3bot 26mer im Vergleich zu unbehandelten Zellen stammen von mir.

Im Rahmen meines Praktischen Jahres in der Neurologie lernte ich einen Patienten kennen, der wegen plötzlich einsetzender Wesensänderung und Demenz-ähnlichen Erscheinungen stationär aufgenommen wurde. Wir konnten feststellen, dass er an einer bis dahin kaum bekannten Form von Autoimmun-Enzephalitis erkrankt war und ihn deshalb erfolgreich behandeln. Aus meinem Interesse an seiner Erkrankung und einer Kooperation zwischen PD Dr. Klemens Ruprecht aus der Neurologie und der AG Höltje (dafür Danke) hat sich mir ein weiteres Forschungsfeld erschlossen, an dem ich parallel arbeiten durfte. Hieraus stammen die meisten meiner Publikationen, die, da für diese Monographie nicht relevant, nur in der Publikationsliste zu finden sind.

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT.....	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6
ZUSAMMENFASSUNG.....	7
ABSTRACT.....	9
EINLEITUNG.....	10
Bakterielle C3 Exoenzyme dienen der Erforschung RhoA-vermittelter Signalwege. .	10
C3 Exoenzyme fördern das neuronale Fortsatzwachstum: Eine besondere Rolle für Clostridium botulinum C3 Exoenzym.....	11
Exzitatorische Transmittertransporter im ZNS und ihre Bedeutung im Kontext von zentralnervösen Krankheitsprozessen.....	12
Regulation der Aktivität von Glutamat-Transportern der Plasmamembran.....	15
ZIELE DIESER ARBEIT.....	18
MATERIAL UND METHODEN.....	19
Antikörper, Lösungen/Puffer und Geräte.....	19
Methoden.....	22
ERGEBNISSE.....	31
Charakterisierung der HT22 Zelllinie.....	32
RhoA-Inaktivierung durch C3bot und C3bot 26mer: Auswirkung auf neuronale Zellen.....	39
Der Einfluss von C3bot und C3bot 26mer auf die neuronale Glutamat-Aufnahme....	41
Der Einfluss von C3 Proteinen auf die Aktivität von EAAT3.....	46
DISKUSSION.....	56
C3 Proteine verändern die Glutamat-Aufnahmekapazität und den Phosphorylierungsstatus von EAAT3.....	56
Der Effekt von C3 Proteinen auf die EAAT3-vermittelte Glutamat-Aufnahme ist abhängig vom Zelltyp.....	61
C3 Proteine reduzieren die Menge an EAAT3-mRNA in HT22 Zellen.....	62
Der Einfluss von C3bot und C3bot 26mer auf Morphologie und Aktivitätsstatus von RhoA in HT22 Zellen und Hippocampusneuronen.....	63
FAZIT.....	65

LITERATURVERZEICHNIS.....	66
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	72
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	75
ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN.....	76
CURRICULUM VITAE.....	77
PUBLIKATIONSLISTE.....	78
DANKSAGUNG.....	79

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Expression von EAAT3 im Maushirn.....	31
Abbildung 2: Kultivierte HT22 Zellen.....	32
Abbildung 3: Expression von EAAT3 in der HT22 Zelllinie.....	34
Abbildung 4: Expression von EAAT1 (GLAST) und EAAT2 (GLT-1) in der HT22 Zelllinie	35
Abbildung 5: Expression von EAAT3 in der Hippocampus-Kultur.....	36
Abbildung 6: Glutamat-Aufnahme von HT22 Zellen und Hippocampus-Kultur.....	38
Abbildung 7: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die Morphologie von HT22 Zellen und primären hippocampalen Neuronen.....	40
Abbildung 8: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf RhoA in HT22 Zellen und Hippocampus-Kultur.....	42
Abbildung 9: Effekte von C3bot, C3bot 26mer und PKC α -Aktivierung auf die Glutamat- Aufnahme in HT22 Zellen.....	44
Abbildung 10: Effekte von C3bot, C3bot 26mer und PKC α -Aktivierung auf die Glutamat- Aufnahme in der Hippocampus-Kultur.....	47
Abbildung 11: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die Expression von EAAT3.....	49
Abbildung 12: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die Oberflächenexpression von EAAT3 in der Hippocampus-Kultur.....	51
Abbildung 13: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die mRNA von EAAT3.....	52
Abbildung 14: Effekte von C3bot auf den Phosphorylierungsstatus von EAAT3.....	54
Abbildung 15: Hypothetischer Wirkmechanismus von C3 Proteinen auf die Aktivität von EAAT3 in Neuronen der hippocampalen Dissoziationskultur und in HT22 Zellen.....	60

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung:

Nach Rückenmarkstraumata kann die neuronale Regeneration durch *Clostridium botulinum* C3 Exoenzym (C3bot) und C3bot 26mer (ein von C3bot abgeleitetes Peptid) gefördert werden. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei C3bot 26mer, da es auch ohne enzymatische Aktivität weiterhin neuroregenerativ wirkt. In dieser Arbeit wurden die Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die neuronale EAAT3-vermittelte Glutamat-Aufnahme in der hippocampalen Zelllinie HT22 und in primären Hippocampus-Kulturen der Maus untersucht.

Methodik:

HT22 Zellen und primäre hippocampale Neurone wurden drei Tage mit C3bot bzw. C3bot 26mer behandelt, bevor die [³H]-Glutamat-Aufnahme-Kapazität als Maß der Glutamat-Aufnahme aus dem Extrazellulärraum analysiert wurde. Immunfluoreszenz-, Western Blot und PCR- Analysen, sowie Biotinylierungs- und Immunpräzipitations-Studien dienten der Frage nach Ursachen veränderter Glutamat-Aufnahme-Kapazitäten unter C3 Proteinen.

Ergebnisse:

C3bot 26mer führt zu einer verstärkten EAAT3-vermittelten Glutamat-Aufnahme in Hippocampusneuronen. Dieser Effekt beruht auf einer gesteigerten Phosphorylierung des Plasmamembran-ständigen Glutamattransporters EAAT3. Umgekehrt konnte bei der HT22 Zelllinie beobachtet werden: Eine reduzierte EAAT3-vermittelte Glutamat-Aufnahme ging mit einer reduzierten Phosphorylierung des Transporters und einem reduzierten Gehalt an EAAT3-mRNA einher. Des weiteren ließ sich feststellen, dass die beiden Zellkultursysteme Unterschiede in der Sensibilität gegenüber enzymkompetentem C3bot und enzymdefizientem C3bot 26mer zeigten: Während C3bot 26mer die Glutamat-Aufnahme-Kapazität in beiden Zelltypen beeinflusste, hatte es keine Wirkung auf Zellmorphologie und RhoA-Aktivität der HT22 Zelllinie.

Schlussfolgerung:

Clostridium botulinum C3 Proteine könnten neben ihrem positiven Effekt auf das axonale Fortsatzwachstum auch durch Verstärkung der neuronalen Glutamat-Aufnahme-Kapazität die neuronale Regenerationsfähigkeit positiv beeinflussen. Beide Eigenschaften machen C3 Proteine zu vielversprechenden Werkzeugen in der Behandlung zentralnervöser Traumata.

ABSTRACT

Introduction:

Clostridium botulinum C3 exoenzyme (C3bot) and C3bot 26mer (a C3bot-derived peptide) promote neuronal regeneration after spinal cord injury. Particular attention is paid to C3bot 26mer which, although lacking enzymatic activity, still promotes neuroregeneration. The present study investigates the effects of C3bot and C3bot 26mer on neuronal EAAT3-mediated glutamate uptake in the hippocampal cell line HT22 and in mouse primary hippocampal cultures.

Methods:

HT22 cells and primary hippocampal neurons were treated with C3bot and C3bot 26mer for three days prior to analysis of [³H] -glutamate uptake capacity. Immunofluorescence, Western Blot, and PCR analyzes as well as biotinylation and immunoprecipitation studies were used to investigate the causes of altered glutamate uptake capacities after treatment with C3 proteins.

Results:

This study shows that C3bot and C3bot 26mer increase phosphorylation of the glutamate transporter EAAT3 located in the plasmamembrane which mediates an increased EAAT3-mediated glutamate uptake in hippocampal neurons. Vice-versa we could observe a reduced EAAT3-mediated glutamate uptake accompanied by reduced transporter phosphorylation and reduced levels of EAAT3 mRNA in the HT22 cell line. Furthermore, the two cell culture systems showed differences in sensitivity to enzyme-competent C3bot and enzyme-deficient C3bot 26mer: while C3bot 26mer affected glutamate uptake capacity in both cell types, this peptide had no effect on cell morphology and activity of RhoA in the HT22 cell line.

Conclusion:

Next to the known promoting of axonal outgrowth, *Clostridium botulinum* C3 proteins also could facilitate neuronal regeneration by enhancing glutamate uptake capacity of primary neurons. These properties make C3 Proteins promising tools for the treatment of lesions of the central nervous system.

EINLEITUNG

Clostridium botulinum C3 Exoenzym (C3bot) und C3bot 26mer (ein aus C3bot abgeleitetes und enzymatisch-inaktives Peptid) fördern die neuronale Regeneration. In dieser Arbeit wurde der Einfluss beider Proteine (im folgenden C3 Proteine genannt) auf die Aktivität des neuronalen Glutamat-Transporters EAAT3 in der murinen hippocampalen Zelllinie HT22 sowie in neuronalen Primärkulturen aus dem Hippocampus der Maus untersucht. Dabei wurde der Fokus auf den Expressionsstatus, die subzelluläre Lokalisation und die posttranslationale Modifikationen von EAAT3 gelegt.

Bakterielle C3 Exoenzyme dienen der Erforschung RhoA-vermittelter Signalwege

C3 Exoenzyme werden von *Clostridium botulinum* (C3bot), *Clostridium limosum* (C3lim), *Staphylococcus aureus* (C3stau) und *Bacillus cereus* produziert. Sie haben die Funktion einer ADP-Ribosyltransferase und führen zu einer spezifischen Inaktivierung von Rho, einem Guaninnucleotid-bindenden Protein (auch kleine G-Proteine oder GTPasen genannt). Der Wirkmechanismus beruht in einer ADP-Ribosylierung des aktiven Zentrums von Rho [1]. Die erste Isoform dieser Enzyme wurde 1987 von Aktories et al. im Überstand kultivierter Clostridien (*Clostridium botulinum* Typ C) entdeckt und Botulinumtoxin C3 genannt [2,3]. „C“ bezieht sich dabei auf den Stamm dieser Bakterienart, nämlich *Clostridium botulinum* Typ C, und „3“ auf die Anzahl der von diesem Stamm gebildeten Toxine.

Rho kommt bei Säugetieren u.a. in den drei Isoformen RhoA, B und C vor, die die am besten untersuchten Vertreter dieser Proteinfamilie sind. Die Rho-Familie besteht aus 17 weiteren Mitgliedern (beispielsweise Rac und Cdc42) und ist vor allem für ihre Rolle bei der Organisation des Cytoskeletts bekannt. Monomere G-Proteine funktionieren als molekularer Schalter und wechseln zwischen einem aktiven (GTP-gebundenen) und inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand. Diese beiden Zustände werden durch Regulatorproteine induziert: Guaninnucleotid Exchanging Factors (GEFs) aktivieren G-Proteine durch Insertion von GTP und GTPase Activating Proteins (GAPs) inaktivieren G-Proteine durch Hydrolyse von GTP. Einmal aktiviert binden monomere GTPasen an ihre Ziele, sogenannte Effektorproteine. Etwa 60 GEFs, 70 GAPs und nochmal 60

weitere Effektorproteine verschaffen Rho-GTPasen eine Vielzahl an Möglichkeiten mit anderen zellulären Signalwegen zu interagieren [4].

C3 Exoenzyme fördern das neuronale Fortsatzwachstum: Eine besondere Rolle für *Clostridium botulinum* C3 Exoenzym

RhoA ist an der Regulation des Fortsatzwachstums von Nervenzellen beteiligt. Ahnert-Hilger et al. konnten 2004 an murinen embryonalen Hippocampus-Kulturen zeigen, dass die C3 Protein-vermittelte Inaktivierung von RhoA zu einer Förderung des Dendritenwachstums führt. Dies konnte unter allen C3 Proteinen - nämlich C3bot, C3lim und C3stau – beobachtet werden. Interessanterweise stach C3bot im Zuge dieser Studien hervor, da es als einziges der eingesetzten C3 Proteine zusätzlich das Wachstum von Axonen förderte. Erstaunlicherweise geschah dies unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität, denn in embryonalen Hippocampus-Kulturen führte die Inkubation mit enzymatisch inaktiven Mutanten von C3bot (C3botE174A und Q) weiterhin zur Elongation neuronaler Fortsätze [5].

Folgestudien dienten der Identifizierung der Aminosäuresequenz, welche diesen enzymatisch-unabhängigen Effekt von C3bot erklären könnte. Hierzu wurden überlappende Peptidfragmente aus der Sequenz von C3bot generiert und deren Wirkung auf neuronale Zellen studiert. So konnte initial ein 29 Aminosäuren langes, enzymatisch inaktives Peptidfragment von C3bot (C3bot 29mer) identifiziert werden, welches weiterhin in der Lage ist, das Auswachsen von kultivierten Nervenzellen zu fördern.

Das neuroregenerative Potenzial von C3bot 29mer wurde daraufhin anhand eines Modells untersucht, bei dem die Reinnervation des Hippocampus durch den *Tractus perforans* des Entorhinalen Cortex nach Schnittläsion *in vitro* verfolgt werden kann. Dabei haben beide Substanzen, C3bot und C3bot 29mer, zum gesteigerten Auswachsen entorhinaler Neurone in den Hippocampus geführt.

In derselben Arbeit konnte außerdem beobachtet werden, dass die Menge der vesikulären Transmittertransporter (unter anderem vGLUT1 und vGLUT2) nach Inkubation mit C3bot 29mer zunahm, was als Resultat einer Zunahme synaptischer Verbindungen interpretiert wurde [6].

Auch der Nachweis einer *in vivo* Wirksamkeit von enzymatisch inaktiven C3 Proteinen und Peptiden konnte erbracht werden: Nach experimenteller Rückenmarksläsion zeigten Mäuse, die mit C3bot 29mer behandelt wurden, eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verbesserte motorische Regeneration. Die histologische Aufarbeitung des Rückenmarks zeigte eine in ihrer Größe reduzierte, für Traumata des Zentralen Nervensystems (ZNS) typische Glianarbe in den behandelten Tieren, sowie eine gesteigerte Anzahl von absteigenden glutamatergen (*Tractus corticospinalis*) und serotonergen (*Tractus raphespinalis*) Fasern [7].

Loske et al. untersuchten wie weit man mit der Kürzung von C3bot gehen kann: Ein 26 Aminosäuren langes, enzymatisch inaktives Peptidfragment (C3bot 26mer) zeigte in allen durchgeführten Studien ein mit dem Gesamtprotein identisches regenerationsförderndes Potenzial. Auch die gesteigerte Zahl vesikulärer Transmittertransporter konnte weiterhin beobachtet werden. Eine weitere Verkürzung führte zum teilweisen oder kompletten Verlust der biologischen Aktivität von C3bot [8].

Auch andere Arbeitsgruppen konnten einen positiven Effekt von C3bot auf das Wachstum von Nervenzellen nachweisen. So konnte am *Nervus opticus* Läsionsmodell in der Ratte gezeigt werden, dass eine mehrmalige intraoculäre Injektion von C3bot die Zahl überlebender retinaler Ganglionzellen nach Läsion erhöht [9,10].

Eine in diesem Zusammenhang noch nicht ausreichend geklärte Frage ist, ob die beobachteten enzymatisch-unabhängigen Effekte ebenfalls auf einer Inaktivierung von RhoA beruhen oder auf einer Interaktion mit RhoA-unabhängigen Signalwegen. Vor kurzem konnte durch Rohrbeck et al. und Adolph et al. gezeigt werden, dass das Intermediärfilamentprotein Vimentin die Aufnahme von C3bot in das Cytosol der Zielzelle vermittelt [11–13].

Exzitatorische Transmittertransporter im ZNS und ihre Bedeutung im Kontext von zentralnervösen Krankheitsprozessen

Neurone kommunizieren durch Neurotransmitter miteinander. Man unterscheidet exzitatorische und inhibitorische Neurone, die ihre Transmittermoleküle (bspw. Glutamat oder γ -Aminobuttersäure bzw. GABA) in präsynaptischen Vesikeln speichern und auf elektrische Reize hin ausschütten. Im synaptischen Spalt binden die Transmitter an prä-, peri- und/oder postsynaptische Rezeptoren, die entweder direkt als Kanäle

fungieren (ionotrop) oder indirekt (metabotrop) G-Protein-vermittelte Signalkaskaden aktivieren. In Abhängigkeit von den resultierenden Ionenströmen wird so ein de- oder hyperpolarisierendes postsynaptisches Potenzial erzeugt. Die synaptische Transmission wird entweder durch Abbau des Transmitters im synaptischen Spalt oder durch Endocytose des Transmitters aus dem synaptischen Spalt unterbrochen.

Glutamat ist ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter im ZNS, der sowohl an ionotrope als auch an metabotrope Rezeptoren bindet und dessen Transmission nur durch Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt unterbrochen werden kann. Diese „Clearance“ wird durch hoch-affine Glutamat-Transporter der Plasmamembran, den Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs), gewährleistet, die den elektrochemischen Natrium (Na^+)- / Kalium (K^+)-Gradienten nutzen um Glutamat entgegen seinem Konzentrationsgefälle in das Innere der Zelle zu transportieren [14]. Bis dato sind fünf Subtypen der EAAT bekannt, die alle vom sogenannten Solute Carrier Family 1- (SLC1-) Gen kodiert werden: GLAST/EAAT1, GLT-1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 und EAAT5 [15–20]. Dabei werden EAAT1 und -2 von Astrozyten und EAAT3 - 5 von Nervenzellen exprimiert. Neben ihrer Rolle in der Modulation der synaptischen Transmission dient die EAAT-vermittelte Glutamat Clearance auch der Prävention einer Glutamat-induzierten Übererregung (Excitotoxizität) wie sie beispielsweise bei energetischer Unterversorgung mit Zusammenbruch der Na^+/K^+ ATPase im Rahmen einer zerebralen Ischämie vorkommen kann.

GLT-1 kommt durchweg im ZNS vor und macht mengenmäßig den größten Anteil der Glutamat-Transporter aus. Die Expression dieses Proteins nimmt mit der Reifung des Gehirns und der damit verbundenen Zunahme synaptischer Kontakte drastisch zu und macht im adulten Rattengehirn etwa 1% des gesamten Proteingewichtes aus [21,22]. Subzellulär betrachtet, befindet sich dieser Transporter an astrozytären Fortsätzen in unmittelbarer Nähe zu synaptischen Kontakten. Tanaka et al. studierten 1997 den Phänotyp von GLT-1 Knockout-Mäusen und haben die bedeutsame Rolle dieses astroglialen Transporters aufgezeigt: Homozygote Tiere entwickelten spontane, in der Regel letale epileptische Anfälle und ein im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen größeres Kälte-induziertes Hirnödem. Daneben offenbarte die histologische Begutachtung der Hippocampus-Region eine beschleunigte neuronale Degeneration bei Abwesenheit von GLT-1. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die exzitatorischen

postsynaptischen Potenziale (EPSPs) in Knockout-Tieren weniger stark durch NMDA-Rezeptor Antagonisten geblockt wurden als in Wildtyp-Tieren. Zusammengefasst sprechen diese Beobachtungen für eine reduzierte Glutamat-Clearance aus dem synaptischen Spalt mit verheerenden pathophysiologischen Auswirkungen [23].

GLAST wird hauptsächlich von den Bergmann Zellen des Cerebellums exprimiert und findet sich an den Fortsätzen dieser Gliazellen [21]. Diese umhüllen die synaptischen Kontakte zwischen Purkinje Zellen und Parallelfasern bzw. Kletterfasern. GLAST Knockout-Mäuse zeigen im Vergleich zu GLT-1 Knockout-Mäusen weniger stark ausgeprägte Phänotypen. Eingeschränkte motorische Fähigkeiten wurden von Watase et al. ebenso wie ein im Vergleich zu Kontrolltieren größeres Kälte-induziertes Hirnödem beobachtet [24].

EAAC1 wird im und außerhalb des ZNS exprimiert. Im ZNS ist er, wie GLT-1, ubiquitär, am stärksten jedoch im Hippocampus, exprimiert. Extrazerebral ist er in der Niere und dem Dünndarm, hier vor allem im Ileum, lokalisiert [21,25]. Im ZNS wird EAAC1 ausschließlich von Nervenzellen exprimiert und ist somatodendritisch lokalisiert [25].

Die Rolle dieses Transporters im ZNS ist nur ungenügend verstanden. Einige Autoren bringen eine EAAC1-Dysfunktion in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen und einer gesteigerten Anfallsbereitschaft durch erhöhte extrazelluläre Glutamat-Spiegel. Dafür sprechen Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass es nach Kindling-Experimenten (eine experimentelle Methode zur Induktion epileptischer Anfälle in Nagern) zu einer Zunahme der EAAC1 Proteinmenge im Rattenhirn kam [26,27] und *post mortem* Studien an humanen Gehirnen mit Temporallappen Epilepsie/Hippocampus Sklerose, wo eine erhöhte Expression von EAAT3 in den verbliebenen hippocampalen Pyramidenzellen der CA2 Region und in Körnerzellen nachgewiesen werden konnte [28].

Außerdem konnten Rothstein et al. nach intraventrikulärer Applikation von EAAC1 Antisense-Oligonucleotiden (mit Reduktion der EAAC1 mRNA Translation) motorische Defizite, wie verlangsamte Bewegungen bis hin zu Paresen der hinteren Extremitäten sowie Gangunsicherheiten in Ratten beobachten [29].

In einer ersten EAAC1 Knockout Studie von 1997 konnten diese Hypothesen nicht bestätigt werden. Hier zeigten homozygote Mäuse eine Aminoazidurie und

eingeschränkte Spontanaktivität. Es konnten weder spontane epileptische Anfälle noch eine erhöhte Anfallsbereitschaft beobachtet werden [30].

Andere Autoren sehen in EAAT3 eine Möglichkeit für das Neuron mit pathophysiologisch erhöhten extrazellulären Glutamatspiegeln umzugehen. In der Studie von Li et al. bildeten EAAT3 Knockout-Mäuse in einem Schlaganfallmodell größere Infarktareale aus und zeigten damit einhergehend schwerere neurologische Defizite als die dazugehörigen Kontrolltiere [31].

Scimemi et al. sehen in EAAC1 ein Mittel der Feinmodulierung der synaptischen Transmission: Die Autoren konnten durch den Einsatz von EAAC1 Knockout-Tieren eine Reduktion aktivierter perisynaptischer NMDA-Rezeptoren beobachten. Zusammengefasst stellten sie die Hypothese, dass EAAC1 eine unspezifische Aktivierung benachbarter Synapsen durch Diffusion von Glutamatmolekülen verhindert [32].

EAAT4 ist ebenfalls ein neuronaler Glutamat Transporter. Er wird, anders als EAAC1, hauptsächlich im Cerebellum von den Purkinjezellen exprimiert [21]. In Experimenten mit Knockout-Mäusen konnte eine ähnliche Funktion dieses Transporters wie EAAC1 herausgearbeitet werden: Bei unveränderten postsynaptischen Potenzialen konnten die Autoren eine erhöhte Anzahl aktivierter benachbarter Synapsen beobachten [33].

Regulation der Aktivität von Glutamat-Transportern der Plasmamembran

Prinzipiell stehen der Zelle verschiedenen Möglichkeiten zur Regulation der Transporteraktivität zur Verfügung: Eine Steigerung der Expression des Proteins mit Erhöhung der gesamten zellulären Proteinmenge, eine Verlagerung von Transporterproteinen (beispielsweise aus einem endosomalen Reservoir an die Plasmamembran) ohne Änderung der gesamten zellulären Proteinmenge und die posttranslationale Modifikation mit Steigerung der Affinität von Transporter zu seinem Substrat.

Ein gut charakterisierter zellulärer Regulationsmechanismus von EAAC1 ist die Proteinkinase C α - (PKC α -)vermittelte subzelluläre Translokation des Transporters. Dies konnte in einer neuronalen Zelllinie und neuronalen Mischkulturen durch Inkubation mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), einem Phorbolster welcher die Wirkung des

endogenen PKC α -Aktivators Diacylglycerin (DAG) nachahmt, gezeigt werden. In Übereinstimmung mit kinetischen Analysen, die eine gesteigerte Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) von radioaktiv markiertem Glutamat nach Inkubation mit PMA ergaben, zeigten sich in morphologischen Studien eine erhöhte Transporterdichte in der Plasmamembran und in Biotinylierungsstudien (Biotin bindet an Proteine und kann die Plasmamembran nicht passieren) eine stärkere Markierung von Transportermolekülen. Zusammengefasst sprechen die gewonnenen Beobachtungen für eine gesteigerte Translokation von EAAT3 aus subzellulären Kompartimenten an die Plasmamembran mit konsekutiver Steigerung der zellulären glutamatergen Transportaktivität [34,35].

In Folgearbeiten konnten González et al. außerdem eine gesteigerte Affinität (K_M) von EAAT3 zu Glutamat nach PKC-Aktivierung beobachten und durch PKC-Subtypstudien zeigen, dass PKC ϵ hierfür verantwortlich ist [36].

Während einer zerebralen Ischämie führt die zelluläre Sauerstoffunterversorgung zu einem Zusammenbruch der ATP-Synthese. Eine der Folgen ist die Drosselung der glutamatergen Transportaktivität von Astrozyten und Neuronen mit dem Resultat einer Glutamat-induzierten Excitotoxizität. Dies wiederum hat einen Untergang von Glia- und Nervenzellen zur Folge und stellt einen wesentlichen Faktor im Zustandekommen des Hirnödems nach Schlaganfall dar. Beim sogenannten „Ischemic Preconditioning“, einem Modell in der Schlaganfallforschung, werden mehrmals unvollständige Okklusionen in zerebralen Blutgefäßen von Mäusen gesetzt bevor ein vollständiger Verschluss des Blutgefäßes herbeigeführt wird. Tiere die dieser Prozedur unterzogen wurden zeigen eine bessere Toleranz gegenüber zerebralen Ischämien als die dazugehörige Kontrollgruppe. Der Grund hierfür ist eine TNF α -vermittelte Steigerung der Expression von EAAT3 mit Erhöhung der neuronalen Transportkapazität für Glutamat und Verringerung der Excitotoxizität bzw. des daraus resultierenden Zellunterganges. Dieser Mechanismus stellt ein gutes Beispiel für eine Modulierung der Glutamat-Aufnahme durch eine Steigerung der Expression von EAAT3 dar [37,38].

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits die Wirkung von C3 Proteinen auf die Aktivität der glialen Glutamat-Transporter untersucht. Höltje et al. haben 2008 die Wirkung von C3bot auf die Glutamat-Aufnahme und -Freisetzung in murinen Astrozytenkulturen studiert. Die Transfektion mit dominant-negativem RhoA und

Inkubation von Astrozyten mit dem enzymatisch-aktiven C3bot steigerte die Glutamat-Aufnahme in Astrozyten durch eine NFκB-vermittelte Expression von GLT-1, erhöhte die Calcium-vermittelte Exocytose von Glutamat und induzierte in Astrozyten eine stellare Form [39].

Es konnten auch erste Hinweise auf eine Wirkung von C3 Proteinen auf die neuronale Glutamat-Aufnahme beobachtet werden: Die Inkubation von Hippocampus-Kulturen, die allerdings immer auch einen Anteil an Astrozyten aufweisen und somit eine Mischkultur darstellen, mit C3bot 29mer führte in diesem Modellsystem ebenfalls zu einer Steigerung der Glutamat-Aufnahme [6].

ZIELE DIESER ARBEIT

Diese Arbeit dient der weiteren Charakterisierung von C3bot und dem hieraus generierten Peptidfragment C3bot 26mer. Die hier durchgeführten Experimente sollen die Frage klären, wie C3bot und C3bot 26mer den neuronalen Glutamat-Stoffwechsel beeinflussen. Diese Frage ist aufgrund folgender Punkte interessant:

- 1) C3 Proteine sind vielversprechende Werkzeuge, die zum weiteren Verständnis der zentralnervösen Regenerationsfähigkeit beitragen.
- 2) Vorarbeiten haben gezeigt, dass C3 Proteine die neuronale Glutamat-Aufnahme verstärken. Auf welche Weise ist noch unbekannt.
- 3) C3bot erhöht die astrozytäre Glutamat-Aufnahme durch eine NFκB-vermittelte Expressionssteigerung von GLT-1.
- 4) Die Optimierung des neuronalen Glutamat-Stoffwechsel könnte das neuroregenerative Profil von C3 Proteinen begünstigen (Vorbeugung der Glutamat-induzierten Excitotoxizität).

Im Rahmen dieser Fragestellung wurde der Fokus auf den neuronalen Glutamat-Transporter der Plasmamembran EAAT3 gelegt.

Die Arbeit ist folgendermaßen gegliedert:

- 1) Prüfen, ob sich die hippocampale Zelllinie HT22 und primäre hippocampale Dissoziationskulturen als Modellsysteme zum Studium der Aktivität von EAAT3 eignen.
- 2) Untersuchen des Einflusses von C3 Proteinen auf den Expressionsstatus, die subzelluläre Lokalisation und die posttranslationale Modifikationen von EAAT3 in HT22 Zellen und primären hippocampalen Dissoziationskulturen.

MATERIAL UND METHODEN

Antikörper, Lösungen/Puffer und Geräte

Primärantikörper

Zielprotein	Wirt	Quelle	Verdünnung
Actin	Kaninchen, polyclonal	Sigma, A5060	1:2000 (WB)
β -Actin	Maus, monoclonal	Sigma, A3853	1:1000 (WB)
α -Tubulin	Maus, monoclonal	Sigma, T5168	1:2000 (IF)
EAAT3	Kaninchen, polyclonal	Santa Cruz, sc-25658	1:1000 (WB) 1:500 (IF)
GLAST	Meerschweinchen, polyclonal	Chemicon, AB 1782	1:2000 (IF) 1:3000 (WB)
GLT-1	Meerschweinchen, polyclonal	Chemicon, AB 1783	1:2000 (IF) 1:3000 (WB)
MAP 2	Kaninchen, polyclonal	Chemicon, AB5622	1:1000 (IF)
MAP 2	Maus, monoclonal	Chemicon, MAB 3418	1:1000 (IF)
NFP 200	Maus, monoclonal	Chemicon, MAB5256	1:400 (IF)
PKC α	Maus, monoclonal	BD Bioscience, 610107	1:1000 (WB) 1:500 (IF)
Phosphoserin	Kaninchen, polyclonal	Abcam, ab9332	1:500 (WB)
Phosphotyrosin	Kaninchen, polyclonal	Abcam, ab17302	1:500 (WB)
RhoA	Maus, monoclonal	Cytoskeleton, ARH03	1:500 (WB)
RhoA	Maus, monoclonal	Santa Cruz, 26C4	1:500 (WB)

Sekundärantikörper

Name	Quelle	Verdünnung
Alexa Fluor 594 anti-Mouse	Life Technologies, A-11032	1:300 (IF)
Oregon Green 488 anti-Rabbit	Life Technologies, O-11038	1:300 (IF)
Alexa Fluor 488 anti-Guinea Pig	Life Technologies, A-11073	1:300 (IF)
Cy3 anti-Rabbit	Dianova, 111-165-003	1:300 (IF)
Oregon Green 488 anti-Mouse	Life Technologies, O-6380	1:500 (IF)
Peroxidase anti-Mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, PI-2000	1:2000 (WB)
Peroxidase anti-Rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, PI-1000	1:2000 (WB)
Peroxidase anti-Guinea Pig (H+L)	Dianova, 106-035-003	1:2000 (WB)
Peroxidase anti-Rabbit (L)	Dianova, 211-032-171	1:2000 (WB)
Peroxidase anti-Mouse (L)	Dianova, 115-035-174	1:2000 (WB)

Lösungen/Puffer

Name	Zusammensetzung
Antikörperlösung	1,5 % (w/v) Bovines Serumalbumin in 1x TBS
Biotinlösung	1 mg/ml Biotin in PBS
Blocklösung Immunfluoreszenz	5 % (w/v) Bovines Serumalbumin 2 % (v/v) Fetales Kälberserum 0,1 % (v/v) Triton-X-100 in 1x TBS
Blocklösung Western Blot	5 % (w/v) Magermilchpulver 0,1 % (v/v) Tween-20 in 1x TBS
Extraktionspuffer	140 mM KCl 2 mM EDTA 20 mM Hepes in Aqua dest., pH 7,4
KREBS-Hepes-Puffer 1x	140 mM NaCl 15 mM Hepes 4,7 mM KCl 2,5 mM CaCl ₂ 1,2 mM MgSO ₄ in Aqua dest., pH 7,4
Laemmli-Puffer 4x	200 mM Tris 400 mM DTT 8 % (w/v) SDS 0,4 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glyzerol 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol in Aqua dest.
Laufpuffer für SDS-PAGE 10x	250 mM Tris 2 M Glycin 35 mM SDS in Aqua dest., pH 8,3
Lysepuffer	1 % Triton-X-100 1 mM PMSF PI 1:1000 in PBS
Lysepuffer für Rho-GTPase Pulldown-Assay	20 mM Tris 10 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM DTT 1 mM PMSF 1 % Triton in Aqua dest., pH 7,4
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88 6 g Glycerol 12 ml 0,2 M Tris (ad pH 8,5) 6 ml Aqua bidest. 2,5 % DABCO

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung 10x (PBS)	140 mM NaCl 10 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua dest., pH 7,4
Ponceau S Färbelösung	0,3 % (w/v) Ponceau S 3 % (w/v) Trichloressigsäure 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure in Aqua dest.
Quenchpuffer	100 mM Glycin in PBS
Semi-Dry Blottingpuffer	386 mM Glycin 47,8 mM Tris 1,31 mM SDS 20 % (v/v) Methanol in Aqua dest.
Tris I Puffer 4x	500 mM Tris 0,4 % (w/v) SDS in Aqua dest., pH 6,8
Tris II Puffer 4x	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS in Aqua dest., pH 8,8
Tris-gepufferte Kochsalzlösung 10x (TBS)	200 mM Tris 1,5 mM NaCl pH 7,5

Geräte

Gerät	Hersteller
Zellkulturzentrifuge	Heraeus Labofuge 400
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417C
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter Optima MAX-XP Ultracentrifuge
Scintillation System	Beckman Coulter LS 6500
Bio Rad Mini Protean System	Biorad Inc.
Kryotom Frigocut 2800N	Reichert Jung
Fluoreszenz Mikroskop DMLB <i>mit folgenden Objektiven:</i> <ul style="list-style-type: none"> • PL FLUOTAR 40x / 0.70 PH 2 • PL FLUOTAR 20x / 0.50 PH 2 • Leica 506507 10x PH 	Leica
Konfokalmikroskop TCS SL <i>mit folgendem Objektiv:</i> <ul style="list-style-type: none"> • HCX PI APO 40x / 0.17 / E 	Leica

Methoden

Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden bei der Durchführung der Versuche und ihrer Auswertung eingehalten. Im Labor von Herrn PD Dr. Markus Höltje lagen Tötungsanzeigen für die verwendeten Mäuse vor. Die Versuche wurden in Laboren der Stufe S1 unter Einhaltung der Sicherheitsbestimmungen durchgeführt.

Zellkultur

HT22 Zellen (erhalten vom Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover) wurden aufgetaut und in 6- oder 24-Loch Zellkulturplatten (für Immunofluoreszenzuntersuchungen in 24-Loch Platten auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom) bestehend aus 3,7 g/l NaHCO₃ und 4,5 g/l D-Glucose zusammen mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zur Durchführung der Experimente wurden Zellzahlen von 1,2 x 10⁶ bzw. 0,2 x 10⁶ Zellen in den 6- bzw. 24-Loch Zellkulturplatten verwendet. Ein Teil der Zellen wurde unter Serum-freien Bedingungen drei Tage mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer inkubiert.

Für die primären hippocampalen Dissoziationskulturen wurden NMRI-Mausembryonen (Charles River) im Embryonalstadium von Tag 16 und 17 (E16 bzw. E17) verwendet. Trächtige Mäuse wurden durch zervikale Überstreckung getötet. Nach Desinfektion der Bauchdecke wurde das Abdomen eröffnet, die Embryonen isoliert und in Glucosehaltiger Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (1x PBS + 6 g/l Glucose) gesammelt. Nach Dekapitation erfolgte die Präparierung der Hippocampi in einer separaten Kulturschale mit 1x PBS + 6 g/l Glucose. Die isolierten Hippocampi wurden in Neurobasalmedium (NB-Medium, Gibco) bestehend aus 2 % B27, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,25 % L-Glutamin aufgenommen. Danach wurden die Hippocampi in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt und mit 5 ml DMEM, versetzt mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 1 % HEPES, 0,25 % Insulin und 8 g/l Glucose (N-Medium) gewaschen und bei 193 RCF drei Minuten in der Zellkulturzentrifuge zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Hippocampi in 5 ml N-Medium mit einer sterilen Glaspipette mehrmals resuspendiert und anschließend bei 193 RCF weitere drei Minuten

zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde in Abhängigkeit von der Pelletgröße 200 µl bis 1 ml NB-Medium zugegeben, resuspendiert und dann das sogenannte Startermedium bestehend aus NB-Medium mit 100 mM Natriumglutamat zugegeben. Die Zellen wurden dann in mit Poly-L-Lysin beschichteten 6- oder 24-Loch Platten mit bzw. ohne Glasplättchen in NB-Medium kultiviert. Zur Durchführung der Experimente wurden Zellzahlen von 6×10^5 bzw. 8×10^4 Zellen in den 6- bzw. 24-Loch Zellkulturplatten verwendet. Ein Teil der Zellen wurde drei Wochen nach Präparation unter Serum-freien Bedingungen drei Tage mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer inkubiert.

Aufreinigung von Zellmembranen

Alle Arbeitsschritte bis auf die Zentrifugation in der Zellkulturzentrifuge erfolgten in der Kälte bei 4 °C bzw. auf Eis.

In 6-Loch Platten kultivierte Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann unter Zugabe von 1x PBS mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgenommen. Die Suspension wurde zunächst in der Zellkulturzentrifuge bei 2716 RCF 4 Minuten zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in 500 µl 1x PBS resuspendiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 20817 RCF wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 200 µl 1x PBS resuspendiert und mit 1800 µl ddH₂O unter Zusatz eines Proteaseinhibitor-Cocktails (Roche, 1:1000), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, finale Konzentration 1 mM) und Natriumhydroxid (NaOH ad pH 7,4, finale Konzentration 10 mM) versehen. Dies wurde in ein Glashomogenisatorröhrchen gegeben, mit Hilfe eines Teflonstabes homogenisiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Proben wurden initial in der Ultrazentrifuge bei 1043 RCF 10 Minuten (Rotor TLA-110 von Beckman Coulter) zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgte eine weitere dreißigminütige Zentrifugation bei 267008 RCF im selben Rotor. Die so gewonnene zelluläre Membranfraktion wurde in Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C unter Agitation fünf Minuten im Thermomixer gekocht.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

In 6-Loch Platten kultivierte Zellen wurden unter Zugabe von 1x PBS mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgenommen und bei 2716 RCF 4 Minuten in der Zellkulturzentrifuge zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl 1x PBS resuspendiert und erneut in der Tischzentrifuge bei 20817 RCF 3 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets mit Laemmli-Puffer resuspendiert. 8 %, 10 %, 12 % bzw. 15 % Trenngele und 4 % Sammelgele wurden zur Proteinauftrennung verwendet. Nach Beladung der Geltaschen mit 5 µl Markerprotein und 12 bis 15 µl der Probenlösung (Zielproteingehalt pro Tasche 10 µg) wurde die Elektrophorese bei konstanten 0,04 Ampère durchgeführt. Nach vollständiger Auftrennung wurden Gele von den Glasplatten gelöst und ein „Semidry Blot“ bei konstanten 0,5 Ampère durchgeführt. Auf Nitrocellulosemembran geblottete Proteine wurden mit Ponceau S sichtbar gemacht und mit destilliertem Wasser gespült. Nitrocellulosemembranstreifen wurden 1 Stunde in Blocklösung gewaschen bevor sie mit Antikörper inkubiert wurden.

Die Inkubationskammern wurden dazu mit 3 ml Antikörperlösung gefüllt und der Antikörper dazugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte nach erneutem Waschen in der Blocklösung die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach Waschen im TBS-Puffer wurden Membranstreifen auf einer Chemilumineszenzkassette (Amersham Biosciences) angeordnet und in der Dunkelkammer mit ECL-Lösung (Amersham Biosciences) benetzt, um Proteinbanden auf einem Fotofilm sichtbar zu machen. Die Quantifizierung der Western Blot Protein Banden erfolgte mittels LabImage 1D Software (Kapelan Bio-Imaging, www.kapelanbio.de).

Zusammensetzung der Gele:

Gel	Zusammensetzung
8 % Trenngel (x2)	2,5 ml Tris II Puffer 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid 5,5 ml Aqua dest. 150 µl 10 % APS 16 µl TEMED
10 % Trenngel (x2)	2,5 ml Tris II Puffer 2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 5 ml Aqua dest.

	150 µl 10 % APS 16 µl TEMED
12 % Trenngel (x2)	2,5 ml Tris II Puffer 3 ml Acrylamid/Bisacrylamid 4,5 ml Aqua dest. 150 µl 10 % APS 16 µl TEMED
15 % Trenngel (x2)	2,5 ml Tris II Puffer 3,75 ml Acrylamid/Bisacrylamid 3,75 ml Aqua dest. 150 µl 10 % APS 16 µl TEMED
4 % Sammelgel (x2)	1,25 ml Tris I Puffer 0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 3,25 ml Aqua dest. 42 µl 10 % APS 5,2 µl TEMED

Immuncytochemie

In 24-Loch Platten auf Glasplättchen kultivierte Zellen mit und ohne C3bot- bzw. C3bot 26mer - Behandlung wurden zweimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und dann 20 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen und die Glasplättchen für 40 Minuten mit Block-Lösung versehen. Danach wurden sie in einer feuchtgehaltenen Kammer ausgelegt und mit 50 µl Primärantikörperlösung über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen und mit Sekundärantikörper 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen ein letztes Mal zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Unter Zugabe von 10 µl Mowiol wurden Glasplättchen auf Objektträger gebettet und im Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMLB) betrachtet.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde mit PFA-fixierten Gehirnkryoschnitten von intrakardial Formaldehyd-perfundierten Mäusen durchgeführt. Kryoschnitte (20 µm Dicke) wurden in 4 % Formaldehyd fixiert, mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte, nachdem die Schnitte mit PBS gewaschen wurden, die zweistündige Inkubation mit Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und auf Objektträger gebettet. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) wurde zur Visualisierung der Zellkerne

verwendet. Analysiert wurden die Schnitte durch das Leica TCS SL Konfokalmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Glutamat-Aufnahme

Die Bestimmung der aufgenommenen Mengen an Glutamat wurde mittels Flüssigszintillationsmessung von Tritium-markiertem Glutamat (L-Glutamic acid [3,4-³H] 1 mCi/ml, 20 Ci/mmol, Hartmann Analytic MT 855) durchgeführt. Dabei wird die Ionisierungsenergie des schwachen beta-Strahlers Tritium zur Anregung der Moleküle der Szintillationsflüssigkeit verwendet, die sie in Form von Lichtquanten wieder abgeben. Die Anzahl der detektierten Lichtquanten ist dabei proportional zu den radioaktiven Zerfallsvorgängen der Tritium-markierten Substanz.

Für den Glutamat-Aufnahme-Assay wurden Zellen in 24-Loch Platten ohne Glasplättchen verwendet. Das Kulturmedium wurde mit 5 µM [³H]-Glutamat und 45 µM K⁺-Glutamat versehen. Zur Bestimmung des spezifischen Transports wurden L-trans-Pyrrolidin-2,4-dicarboxylsäure (PDC, finale Konzentration 1 mM) oder Dihydrokainat (DHK, finale Konzentration 1 mM) als Hemmstoffe der Glutamat-Transporter der Plasmamembran eingesetzt. Das Kulturmedium wurde abgenommen, gegen 400 µl des oben genannten Aufnahme-mediums ausgetauscht und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Bei den HT22 Zellen wurden pro Bedingung vier Löcher einer 24-Loch Platte benutzt, wobei drei Löcher [³H]-Glutamat-Medium ohne PDC erhielten und ein Loch [³H]-Glutamat-Medium mit PDC erhielt. Der PDC-Wert wurde vom Mittelwert der Zellen die kein PDC erhielten subtrahiert. Die Versuchsreihe, in welcher HT22 Zellen mit PMA inkubiert wurden, erhielt weder PDC noch DHK. Bei der Hippocampus-Kultur wurden pro Bedingung ebenfalls vier Löcher einer 24-Loch Platte benutzt: Drei Löcher erhielten [³H]-Glutamat-Medium mit DHK und ein Loch [³H]-Glutamat-Medium mit PDC. Danach wurde der PDC-Wert vom Mittelwert der Zellen die DHK erhielten subtrahiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit kaltem KREBS-Hepes-Puffer gewaschen und mit 150 µl Triton X-100 10 Minuten bei 40 °C lysiert. 100 µl wurden zur Auswertung in den Szintillator gegeben, um die aufgenommene Glutamatmenge zu bestimmen. Die restlichen 50 µl wurden zur Proteinbestimmung mit dem Bicichinonsäure (BCA) Test (Thermo Scientific) photometrisch quantifiziert. BCA-Lösung und 4% CuSO₄ wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Davon wurde jeweils 200 µl zu 20 µl Probe gegeben. Zur

Ermittlung einer Eichkurve wurden BSA-Lösungen mit 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml und 400 µg/ml Proteinkonzentrationen mit BCA/Cu-Lösung versehen. Die Leerwerte wurden mit Triton X-100 zusammen mit BCA/Cu-Lösung bestimmt. Eine 96-Loch-Platte wurde mit den Lösungen beladen und eine halbe Stunde bei 60 °C inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 550 nm (Absorptionsmaximum von BCA) wurden photometrisch die Absorptionswerte bestimmt und mittels der Eichkurve die Proteinkonzentrationen ermittelt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit den Zerfallswerten aus dem Szintillator in Beziehung gesetzt und so die aufgenommene Menge an Glutamat in pmol bzw. nmol / mg Protein aus der spezifischen Aktivität berechnet.

Rho-GTPase Pulldown-Assay

Um den Spiegel an aktivem, GTP-gebundenem RhoA nach Behandlung mit C3bot, C3botE174Q und C3bot26mer zu ermitteln, wurde ein Pulldown-Assay mit einem Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und der Rho-Bindedomäne (GST-RBD) durchgeführt. Alle Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in Lysepuffer lysiert und fünf Minuten bei 13000 RCF zentrifugiert. Der Überstand wurde eine Stunde mit den GST-RBD-Beads inkubiert (20-30 µg/Probe), anschließend gewaschen und dann in Laemmli-Puffer unter Agitation bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden zusammen mit kompletten Zelllysaten und GTPγS (einem nicht hydrolysierbarem Analogon von GTP, finale Konzentration 100 µM) als Positivkontrolle einer proteinbiochemischen Analyse zugeführt.

Biotinylierungsassay

Alle Arbeitsschritte bis auf die Zentrifugation in der Zellkulturzentrifuge erfolgten in der Kälte bei 4 °C bzw. auf Eis. Die Biotinlösung, der Quench- und Lysepuffer wurden vor jedem Experiment frisch angesetzt.

In 6-Loch Platten kultivierte Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und dann mit Biotin-Lösung unter Agitation 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit dem Quenchpuffer gewaschen und dann unter Agitation 30 Minuten mit Quenchpuffer inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann unter Zugabe von PBS mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgenommen.

Die Suspension wurde zunächst in der Zellkulturzentrifuge bei 2716 RCF 4 Minuten zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in 500 µl 1x PBS resuspendiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 20817 RCF wurde der Überstand abgenommen. Die so gewonnenen Zellpellets wurden in Lysepuffer unter Agitation eine Stunde lysiert und dann fünf Minuten bei 2655 RCF zentrifugiert. Während der Zellyse wurden die Avidin-Beads in 50 µl Portionen abgenommen und in Lysepuffer aufgenommen. Nach der Zentrifugation wurde ein Teil des Lysats zu den Avidin-Beads gegeben und über Nacht unter Agitation inkubiert. Der andere Teil wurde in Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C unter Agitation fünf Minuten im Thermomixer gekocht. Am nächsten Tag wurde ein Teil des Überstandes aufgehoben und die Avidin-Beads dreimal mit PBS gewaschen. Überstand und Avidin-Beads wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C unter Agitation fünf Minuten im Thermomixer gekocht.

Immunpräzipitation

Alle Arbeitsschritte bis auf die Zentrifugation in der Zellkulturzentrifuge erfolgten in der Kälte bei 4 °C bzw. auf Eis.

In 6-Loch Platten kultivierte Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann unter Zugabe von 1x PBS mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgenommen. Die Suspension wurde zunächst in der Zellkulturzentrifuge bei 2716 RCF 4 Minuten zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in 500 µl 1x PBS resuspendiert. Ein Teil dieser Suspension wurde zur Proteinbestimmung mittels BCA-Test aufgehoben, der Rest drei Minuten in der Tischzentrifuge bei 20817 RCF zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Für den BCA-Test wurden die Proben 1:5 und 1:10 verdünnt. BCA-Lösung und 4 % CuSO₄ wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Davon wurde jeweils 200 µl zu 20 µl Probe gegeben. Zur Ermittlung einer Eichkurve wurden BSA-Lösungen mit 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml und 400 µg/ml Proteinkonzentrationen mit BCA/Cu-Lösung versehen. Die Leerwerte wurden mit Triton X-100 zusammen mit BCA/Cu-Lösung bestimmt. Eine 96-Loch-Platte wurde mit den Lösungen beladen und eine halbe Stunde bei 60 °C inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 550 nm (Absorptionsmaximum von BCA) wurden photometrisch die Absorptionswerte bestimmt und mittels der Eichkurve die Proteinkonzentrationen ermittelt. Nach Ermittlung der

Proteinkonzentrationen wurden die Proben durch den Zusatz von Extraktionspuffer (versetzt mit Phosphataseinhibitor-Cocktail 1:1000, Roche), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, finale Konzentration 1 mM) und 1 % Triton-X-100) auf 1 mg/ml eingestellt, eine Stunde unter Agitation lysiert und dann fünf Minuten bei 2655 RCF zentrifugiert. Während der Zellyse erfolgte die Antikörper-Bead Kopplung. Hierzu wurden Dynabeads in 50 µl Portionen abgenommen, in PBS mit 0,02% Tween-20 aufgenommen, 5 µg des jeweiligen Antikörpers dazugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Agitation inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde ein Teil des Lysates zu den Dynabeads gegeben und über Nacht unter Agitation inkubiert. Der andere Teil wurde in Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C unter Agitation fünf Minuten im Thermomixer gekocht. Am nächsten Tag wurde ein Teil des Überstandes aufgehoben und die Dynabeads dreimal mit PBS gewaschen. Überstand und Dynabeads wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C unter Agitation fünf Minuten im Thermomixer gekocht.

RNA Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (RNeasy MidiKit Qiagen, Hilden, Germany). Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit dem NanoDrop ND-1000 (PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) ermittelt.

Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der RNA Expression in HT22 Zellen und primären hippocampalen Dissoziationskulturen wurden Real-Time PCR-Analysen mit dem ABI PRISM StepOnePlus Real-Time PCR System Instrument (Applied Biosystems, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde zunächst einer reversen Transkription unterzogen. Hierzu wurde das Omniscript RT Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) verwendet. Anschließend folgte die PCR der gewonnenen cDNA mit dem Kapa SYBR FAST qPCR Master Mix (PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany). Die Expression des Zielgens EAAT3 wurde gegen das Kontrollgen beta-2 Mikroglobulin normalisiert und die Spezifität der verwendeten Primer durch eine Agarose-Gelelektrophorese der durch die PCR amplifizierten DNA verifiziert. Mittlere CT-Werte wurden mit der ABI PRISM Software

berechnet und die Expressionsspiegel des Zielgens wurden durch die Differenz der CT-Werte von EAAT3 und beta-2 Mikroglobulin bestimmt. Jedes Experiment wurde in Duplikaten (mit biologischen Triplets) zusammen mit einer Negativkontrolle durchgeführt.

Die Synthese der Primer (B2M (NM_009735.3): F, ATTCACCCCCACTGAGACTG; R, GCTATTTCTTTCTGCGTGAT und EAAC1 (NM_009199): F, TGCTGAAGCTGGTCATTTG; R, CTGAGTGACACCAGGCTTGA) erfolgte durch Eurofins (Ebersberg, Germany). Die mRNA-Sequenzen von Ziel- und Kontrollgen wurden der Datenbank von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> entnommen. Die cDNA-Sequenzen wurden mit der Datenbank von <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> verglichen. Zum Entwurf der Primer wurde das Web-Tool Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) verwendet.

Statistische Analyse

Die statische Analyse des Glutamat-Aufnahme-Assays wurde mit der Software GraphPad Prism 5 Version 5.0 durchgeführt. Zur statistischen Analyse der quantitativen Real-Time Polymerase Kettenreaktion wurde die Software Excel 2003 Version 11.0 herangezogen. Für den Glutamat-Aufnahme-Assay und die quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion wurde ein gepaarter zweiseitiger Student's t-Test eingesetzt. P-Werte < 0.05 wurden mit * und p-Werte < 0.001 mit *** markiert.

ERGEBNISSE

Zunächst wurde eine immunhistochemische Anfärbung des neuronalen Glutamat-Transporters EAAT3 im Maushirn durchgeführt, um die *in vivo* Verteilung des Transporters zu dokumentieren. In der Übersicht (Abbildung 1 A) wird eine ubiquitäre Verteilung im Gehirn deutlich. Besonders im Cortex, den Basalganglien und im Bereich der Hippocampusformation konnte eine sehr starke Expression für EAAT3 nachgewiesen werden (Abbildung 1 A). Auf zellulärer Ebene zeigte sich in der cortikalen und hippocampalen Pyramidenzellschicht eine hohe EAAT3-Signalintensität, die im Bereich der Perikaryen sehr prominent erschien (Abbildung 1 B und C).

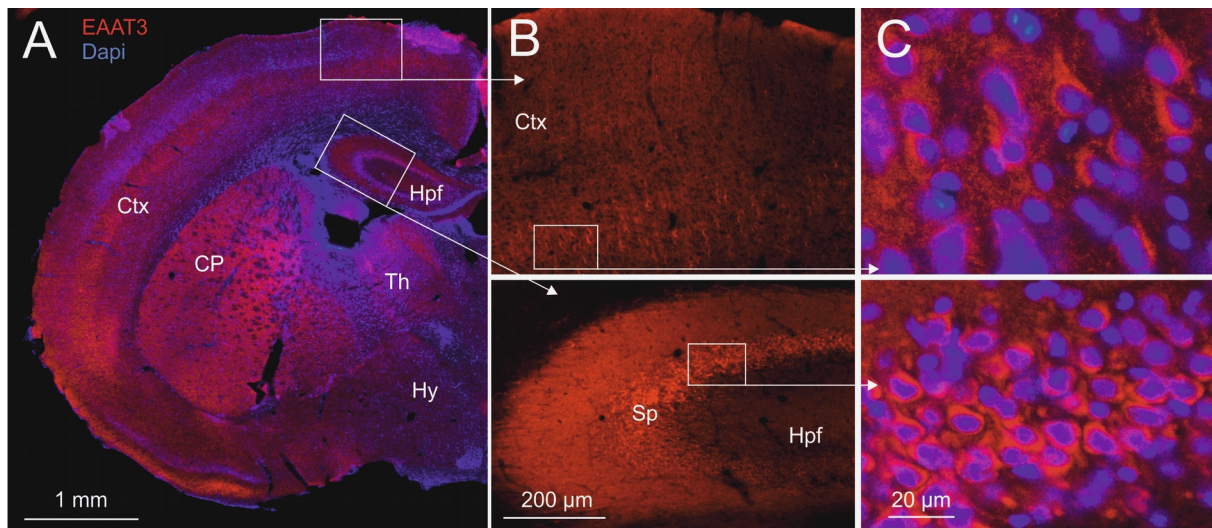


Abbildung 1: Expression von EAAT3 im Maushirn

A) Überblick eines koronaren Schnittes auf Höhe der Hippocampusformation. Nach Applikation eines gegen EAAT3 gerichteten Primärantikörpers und Inkubation mit einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper konnte die Expression des Transporters sichtbar gemacht werden. Zellkerne erscheinen durch Inkubation mit DAPI blau. EAAT3 wird ubiquitär im Gehirn exprimiert. Eine besonders hohe Signalintensität findet sich im Cortex, den angeschnittenen Basalganglien sowie der Hippocampusformation. **B)** Vergrößerung aus dem Bereich des Neocortex und der Hippocampusformation mit angefärbten Pyramidenzellen. **C)** Die EAAT3 Immunfluoreszenz zeigt auf zellulärer Ebene eine starke somatische Lokalisation. CTX, Cortex; CP, Caudatputamen; Hpf, Hippocampusformation; Th, Thalamus; Hy, Hypothalamus; Sp, Stratum pyramidale (n = 1).

Charakterisierung der HT22 Zelllinie

Im Folgenden wurden neuronale Kultursysteme auf ihre Eignung zur Untersuchung des neuronalen Glutamat-Transports hin untersucht. Die HT22 Zelllinie ist hippocampalen Ursprungs und wurde erstmals 1994 beschrieben [40]. Der Vorteil einer Zelllinie besteht darin, dass man relativ leicht große Mengen an Zellen generieren und so proteinbiochemische Fragestellungen angehen kann. Als Nachteil ist zu nennen, dass sich die Proteinausstattung der Zelllinie im Laufe der Kultivierung verändern kann. So muss in regelmäßigen Abständen sichergestellt werden, dass die Proteine, die von Interesse sind, weiterhin exprimiert werden. Wenn die Proteine nicht mehr zufriedenstellend exprimiert werden, muss eine klonale Selektion erfolgen, was einen sehr aufwendigen Prozess darstellt.

Kultivierte HT22 Zellen (Abbildung 2) präsentieren sich in Abhängigkeit von der Zelldichte als rundliche bis polygonale Zellen, deren Tendenz zur Fortsatzbildung bei geringerer Zelldichte (Abbildung 2 A) ausgeprägter als bei konfluenten Kulturen (Abbildung 2 B) erscheint.

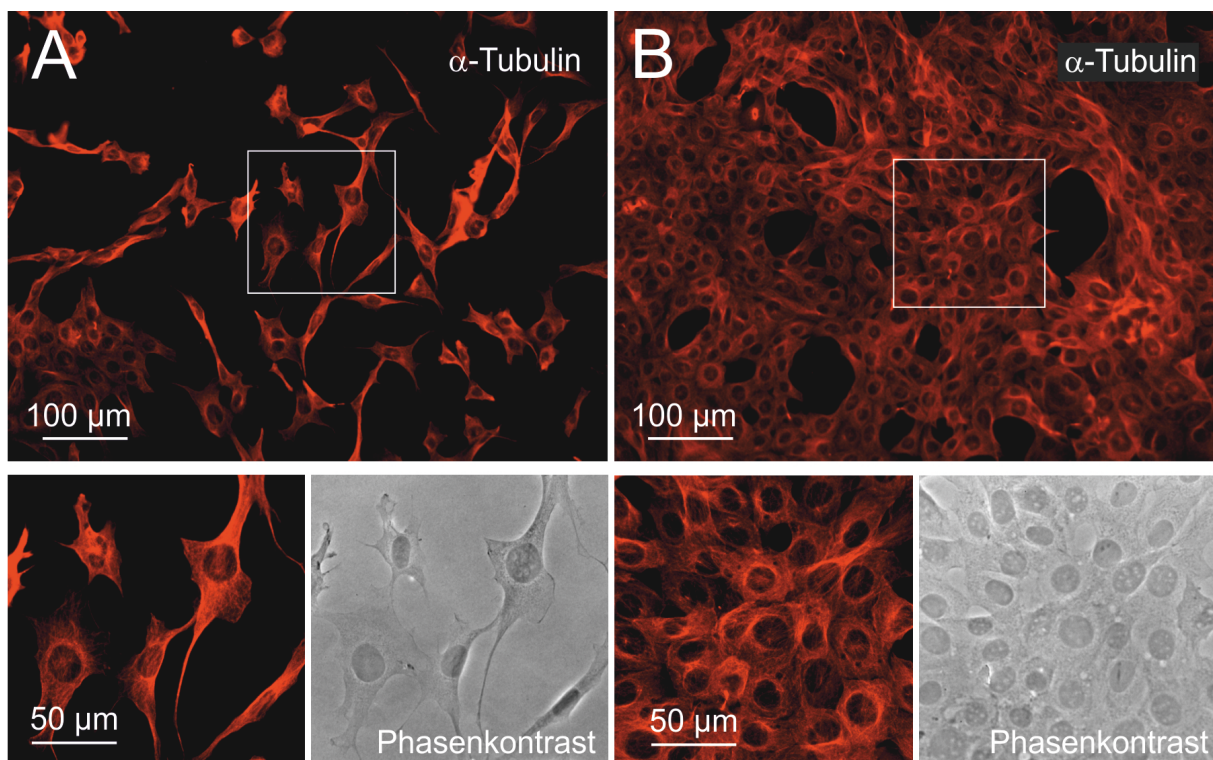


Abbildung 2: Kultivierte HT22 Zellen

HT22 Zellen wurden kultiviert, fixiert und mit einem gegen α -Tubulin gerichteten Primärantikörper inkubiert. Durch einen rot fluoreszierenden Sekundärantikörper wurde das Cytoskelett sichtbar gemacht. Daneben sind die Zellen im Phasenkontrast dargestellt. **A)** und **B)** zeigen HT22 Zellen weniger dicht (entsprechend einer Zellzahl von etwa $0,4 \times 10^5$ Zellen) bzw. konfluent (entsprechend einer Zellzahl von etwa $0,2 \times 10^6$ Zellen) kultiviert. Es handelt sich um rundliche bis polygonale Zellen die eine Tendenz zur Fortsatzausbildung haben ($n = 2$).

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob EAAT3 in HT22 Zellen exprimiert wird (Abbildung 3), was durch Immunfluoreszenz-Analysen bestätigt werden konnte. Die Inkubation mit einem monoklonalen EAAT3 Antikörper resultierte in einem gepunkteten Signal in den HT22 Zellen im Bereich von Cytosol bzw. in der Nähe der Plasmamembran (Abbildung 3 A). Die parallel durchgeführte proteinbiochemische Aufarbeitung von HT22 Zellkulturen bestätigte die Expression von EAAT3. Als Positivkontrollen für die proteinbiochemischen Analysen dienten eine primäre hippocampale Dissoziationskultur der Maus sowie ein Rattenhirnhomogenat (Abbildung 3 B). Im Vergleich zur Hippocampus-Kultur sowie dem Rattenhirnhomogenat erschien die Signalintensität reduziert, jedoch deutlich sichtbar.

Für eine detailliertere Charakterisierung der Glutamat-Transportersubtypen in kultivierten HT22 Zellen wurden zum Vergleich Immunfluoreszenz-Analysen und proteinbiochemische Analysen der im ZNS exprimierten vorwiegend glialen Transporter GLAST (EAAT1) und GLT-1 (EAAT2) durchgeführt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der extrazellulären Glutamat-Clearance und versorgen Nervenzellen mit Glutamin, indem sie das aufgenommene Glutamat mittels Glutamin-Synthetase in Glutamin umwandeln. Das von den Nervenzellen aufgenommene Glutamin wird durch eine neuronale Glutaminase dann wieder in Glutamat umgewandelt und steht so erneut als Neurotransmitter zur Verfügung. Weder immunocytochemisch noch proteinbiochemisch konnte jedoch die Expression dieser Transporter in HT22 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4).

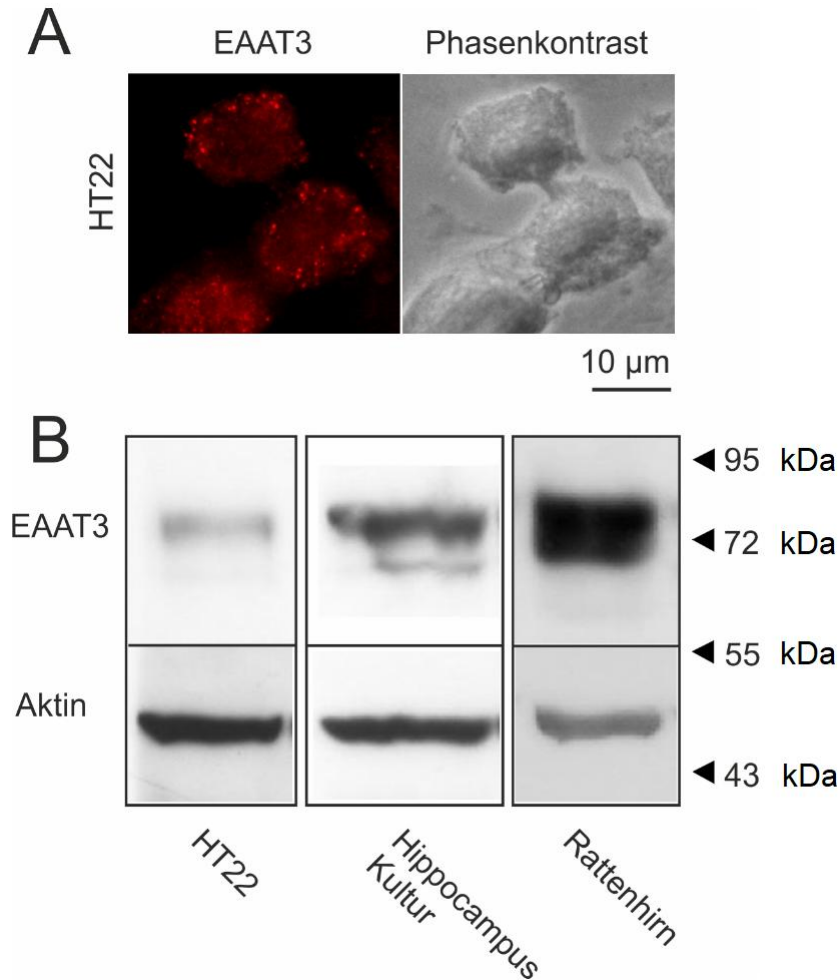


Abbildung 3: Expression von EAAT3 in der HT22 Zelllinie

A) Zellen wurden kultiviert, fixiert und dann mit einem gegen EAAT3 gerichteten Primärantikörper inkubiert. Durch einen rot fluoreszierenden Sekundärantikörper wurde der Transporter visualisiert. Es zeigt sich ein cytosolisches und Plasmamembran-nahes Verteilungsmuster. Daneben sind die Zellen im Phasenkontrast dargestellt (Exemplarisch ist ein repräsentatives Experiment von $n = 8$ dargestellt). **B)** HT22 Zellen und hippocampale Dissoziationskulturen sowie Rattenhirnhomogenat wurden in der Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Inkubation mit einem gegen EAAT3 gerichteten Primärantikörper und Visualisierung durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper zeigen die Expression von EAAT3 in den aufgeführten neuronalen Zellen bzw. im Rattenhirnhomogenat. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet (Exemplarisch ist ein repräsentatives Experiment von $n = 14$ dargestellt).

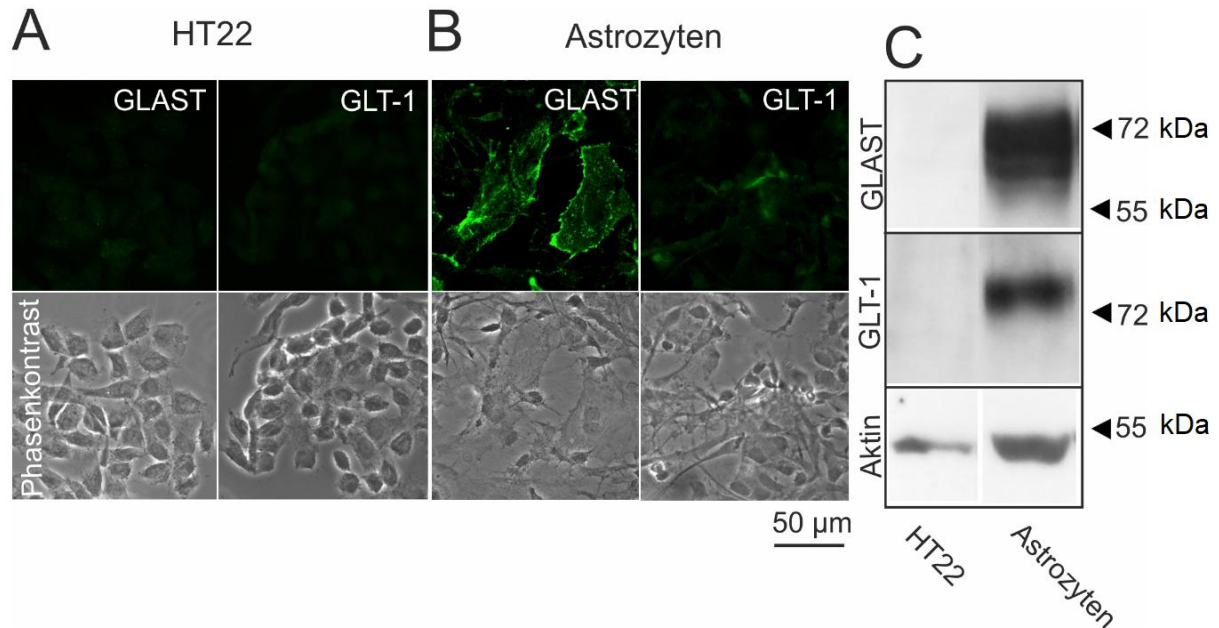


Abbildung 4: Expression von EAAT1 (GLAST) und EAAT2 (GLT-1) in der HT22 Zelllinie

(A, B) HT22 Zellen bzw. Astrozyten wurden kultiviert, fixiert und mit einem gegen GLAST bzw. GLT-1 gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch einen grün fluoreszierenden Sekundärantikörper. Dabei zeigte sich keine Immunreaktion bei HT22 Zellen und eine positive bei Astrozyten (n = 2). (C) Die proteinbiochemische Aufarbeitung von HT22 und astrozytären Zellkulturen bestätigt, dass HT22 Zellen weder GLAST noch GLT-1 exprimieren. Als Ladungskontrolle diente Aktin (Exemplarisch ist ein repräsentatives Experiment von n = 4 dargestellt).

Als zusätzliches, hinsichtlich neuronaler Eigenschaften weiter differenziertes Modell wurden primäre embryonale Dissoziationskulturen aus dem Hippocampus von Mäusen untersucht. Durch eine Doppelfärbung gegen das axonale Markerprotein Neurofilamentprotein (NFP) und das dendritische Markerprotein Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) konnte eine Aussage hinsichtlich einer neuronalen und kompartmentspezifischen Lokalisation von EAAT3 getroffen werden: Ersichtlich wurde eine starke Expression des Transporterproteins sowohl im Soma der Zellen als auch im Bereich beider Fortsatztypen. Diese Bilder bestätigen die zuvor erhobenen proteinbiochemischen Ergebnisse und ergänzen die oben gezeigte Immunhistochemie (Abbildung 5).

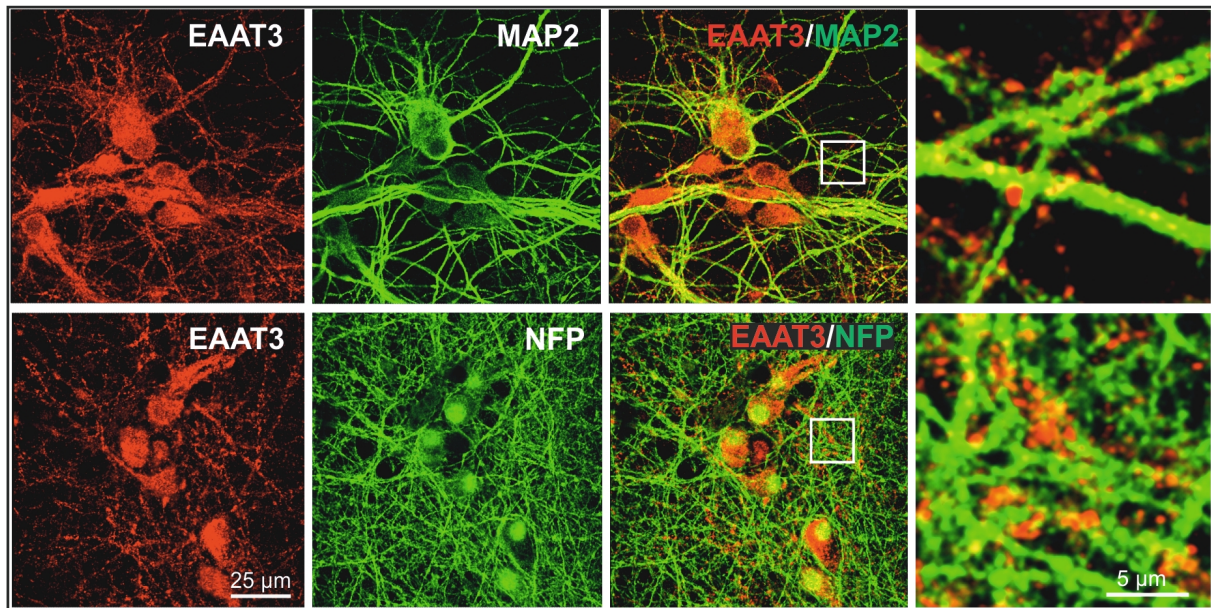


Abbildung 5: Expression von EAAT3 in der Hippocampus-Kultur

Eine drei Wochen kultivierte hippocampale Dissoziationskultur, gewonnen aus Mausembryonen des Embryonaltages E17, wurde fixiert und mit einem gegen EAAT3 und MAP2 bzw. NFP gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch rot und grün fluoreszierende Sekundärantikörper. **Obere Reihe:** EAAT3 (rot) zeigt die stärkste Expression im Soma. Es findet sich ein geclustertes Signal in den neuronalen Fortsätzen. Die Ko-Färbung mit MAP2 (grün), einem dendritischen Marker, zeigt eine Lokalisation in Dendriten. **Untere Reihe:** Ko-Färbung gegen das axonale Markerprotein NFP (grün) zeigt zusätzlich eine Ko-Lokalisation mit EAAT3 (rot) (n = 1).

Wie im vorangehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, besitzen HT22 Zellen prinzipiell die zur Glutamat-Aufnahme nötige Transporterausstattung. In funktionellen Versuchen wurde radioaktiv markiertes Glutamat ($[^3\text{H}]$ -Glutamat) eingesetzt, um die Fähigkeit der Zellen zur aktiven Glutamat-Aufnahme zu analysieren. Dabei wurden Zellen eine Stunde mit $50 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ -Glutamat-haltigem Zellkulturmedium inkubiert und dann lysiert. Anschließend folgte eine Quantifizierung der aufgenommenen Radioaktivität (die Menge an aufgenommenem Glutamat errechnete sich aus der spezifischen Aktivität des markierten Glutamats) im Szintillationszähler. Wie sich zeigte, nehmen HT22 Zellen Glutamat aus dem Extrazellulärraum auf. Durch die Applikation

von PDC oder TBOA, beides Blocker der Plasmamembran-ständigen Glutamat-Transporter, in einer finalen Konzentration von 1 mM während des Aufnahme-Assays, konnte die Spezifität validiert werden (beide Inhibitoren zeigten keine Unterschiede in ihrer Wirksamkeit). Durch Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glutamat und konstant gehaltener Inkubationszeit wurde eine kinetische Analyse der Glutamat-Aufnahme erstellt (Abbildung 6 A). Die Glutamat-Aufnahme-Assays wurden parallel am zweiten zu untersuchenden Modell, den primären hippocampalen Neuronen, durchgeführt. Bei Betrachtung der Absolutwerte fällt auf, dass die primäre Neuronenkultur etwa 50fach mehr Glutamat aus dem Extrazellulärraum aufnimmt. Auch hier wurde die Spezifität durch die Anwendung von PDC validiert (Abbildung 6 B).

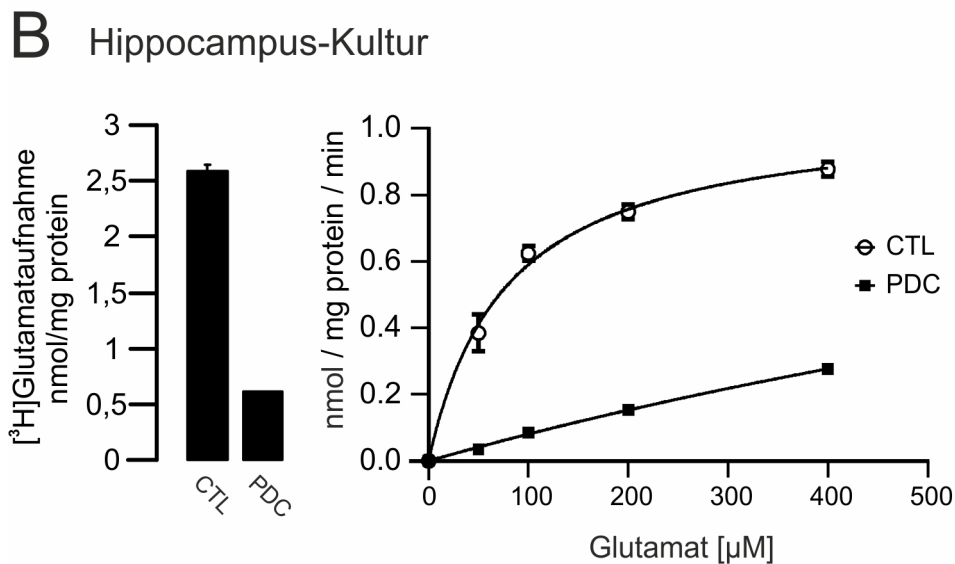
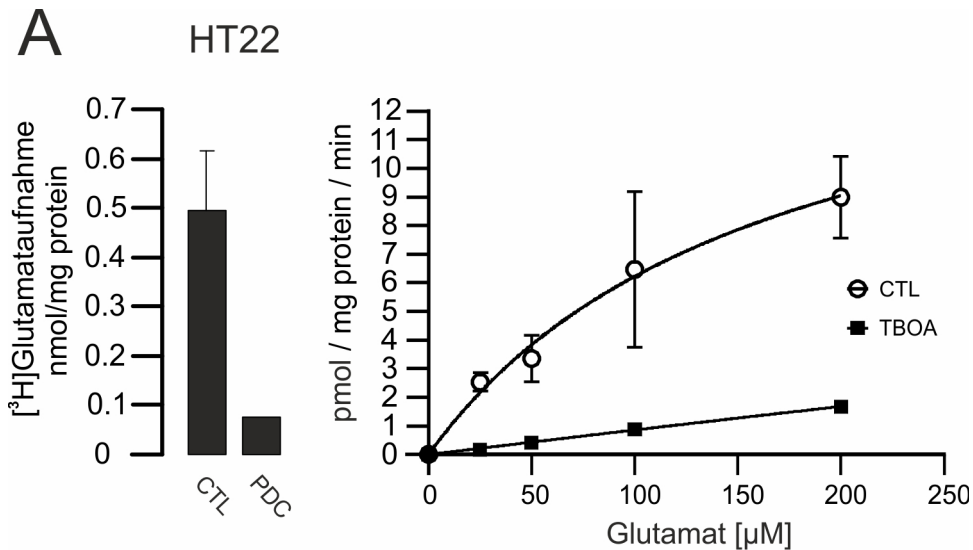


Abbildung 6: Glutamat-Aufnahme von HT22 Zellen und Hippocampus-Kultur

A) Linkes Diagramm: HT22 Zellen wurden eine Stunde in 50 μ M [³H]-Glutamat-haltigem Medium inkubiert und dann lysiert. Aus dem gewonnenen Lysat wurde die aufgenommene Glutamatmenge im Szintillationszähler quantifiziert. PDC, ein Blocker der Plasmamembranständigen Glutamat-Transporter, wurde zur Validierung des spezifischen Transports eingesetzt (n = 22, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment). Rechtes Diagramm: Durch Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an [³H]-Glutamat und konstant gehaltener Inkubationszeit wurde die Aufnahmekinetik analysiert. Hier wurde TBOA als spezifischer Inhibitor der Glutamat-Aufnahme verwendet. Die Kurve zeigt eine Sättigungskinetik (n = 3, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment).

B) Linkes Diagramm: Kultivierte Hippocampusneurone wurden wie in A) beschrieben inkubiert und dann lysiert. Die Validierung mittels PDC sowie die Quantifizierung der aufgenommenen Glutamatmenge erfolgte ebenfalls auf identische Weise (n = 13, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment). Rechtes Diagramm: Durch Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an [³H]-Glutamat und konstant gehaltener Inkubationszeit wurde die Aufnahmekinetik analysiert. Hier wurde PDC als spezifischer Inhibitor der Glutamat-Aufnahme verwendet. Die Kurve zeigt eine Sättigungskinetik (n = 2, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment).

RhoA-Inaktivierung durch C3bot und C3bot 26mer:

Auswirkung auf neuronale Zellen

Um zunächst eine generelle Sensitivität der HT22 Zellen sowie der verwendeten Hippocampusneurone gegenüber C3bot und C3bot26mer zu belegen, wurde die morphologische Reaktion auf die Inkubation mit beiden Substanzen als gut etabliertes Read-Out System benutzt. Dafür wurden HT22 Zellkulturen und primäre hippocampale Dissoziationskulturen unter Serum-freien Bedingungen drei Tage mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer inkubiert. Die untersuchten HT22 Zellen reagierten auf Behandlung mit C3bot mit einem deutlich verstärkten Fortsatzwachstum. Die Inkubation mit C3bot 26mer führte jedoch nicht zu sichtbaren Effekten (Abbildung 7 A). Wie erwartet und bereits publiziert [8] kommt es hingegen in kultivierten Hippocampusneuronen durch C3bot und C3bot 26mer zu einer Zunahme an morphologischer Komplexität mit Zunahme an Dendritenlänge und -verzweigung. In Abbildung 7 B ist dies noch einmal qualitativ dargestellt.

Im Weiteren wurde untersucht, ob es in den verwendeten Modellsystemen nach Inkubation mit C3bot bzw. C3bot 26mer zu einer messbaren Veränderung in der Aktivität von RhoA als Effektorprotein kommt. Der enzymatische Wirkmechanismus von C3bot besteht in einer ADP-Ribosylierung von RhoA, was in dessen Inaktivierung und nachfolgendem proteasomalen Abbau resultiert. Die ADP-Ribosylierung führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes von RhoA und lässt sich proteinbiochemisch im Western Blot als RhoA-Shift nachweisen. Die erhöhte Bande im Western Blot stellt somit komplett inaktiviertes RhoA dar. Sowohl in HT22 Zellen als auch primären Neuronen konnte nach dreitägiger Behandlung mit C3bot ein Shift im Molekulargewicht

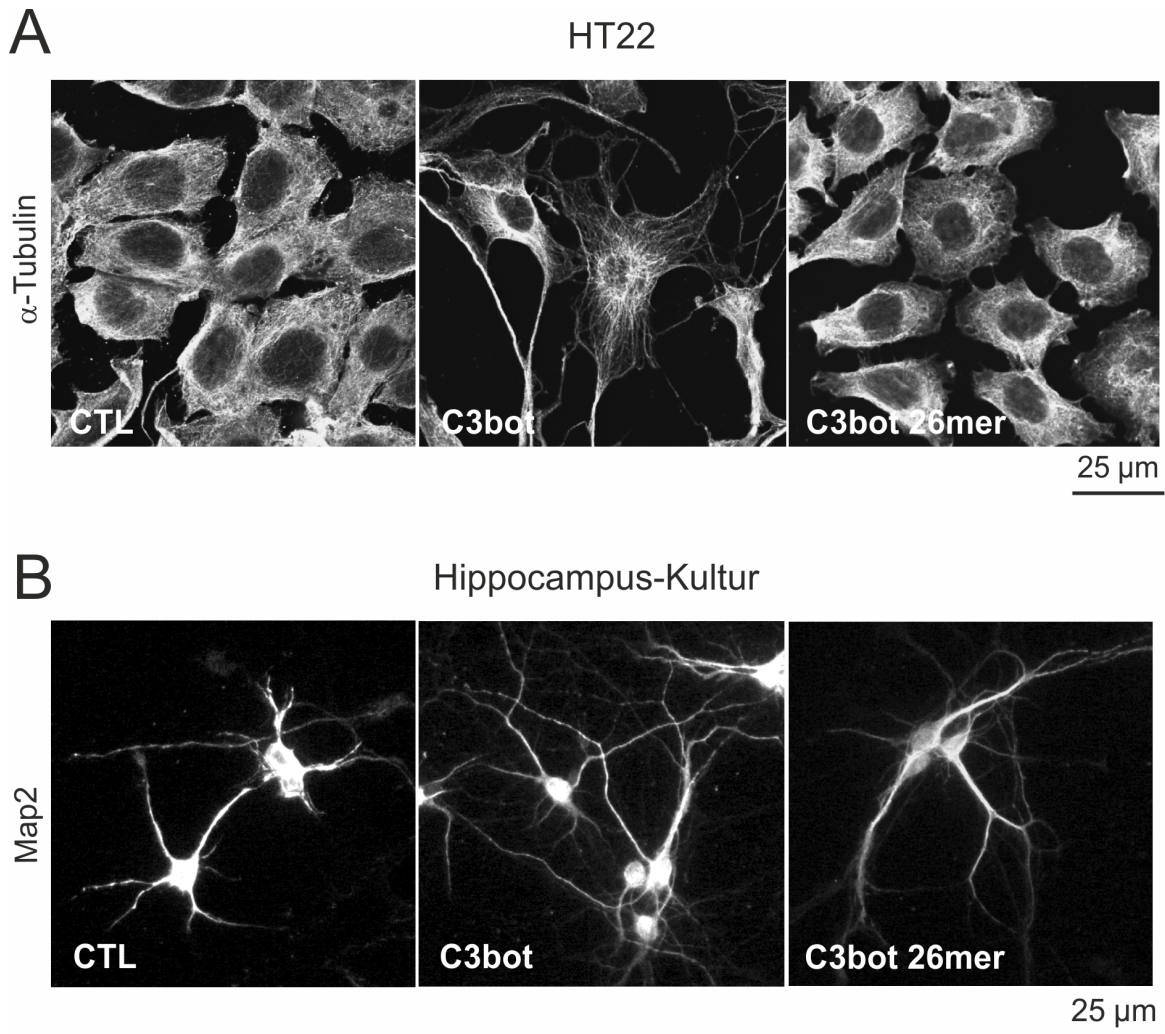


Abbildung 7: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die Morphologie von HT22 Zellen und primären hippocampalen Neuronen

HT22 Zellen und Hippocampusneurone wurden drei Tage unter Serum-freien Bedingungen mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer inkubiert. **A)** HT22 Zellen wurden fixiert und mit einem gegen α -Tubulin gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Visualisierung des Cytoskeletts erfolgte durch Inkubation mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper. Die Behandlung mit C3bot führt zu ausgeprägten morphologischen Veränderungen in HT22 Zellen mit Betonung in der Fortsatzformation. C3bot 26mer führt zu keinen morphologischen Veränderungen (Exemplarisch ist ein Experiment dargestellt bei $n = 5$). **B)** Nervenzellen wurden fixiert und mit einem gegen Map2 gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Visualisierung der Dendriten erfolgte durch Inkubation mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper. Beide, C3bot und C3bot 26mer führen zu einer deutlichen Zunahme in Länge und Verzweigung dendritischer Fortsätze (Exemplarisch ist ein Experiment dargestellt bei $n = 3$).

festgestellt werden (Abbildung 8 A, B). Weiterhin ließ sich ein reduziertes RhoA-Signal nachweisen, was mit einem proteasomalen Abbau nach ADP-Ribosylierung vereinbar ist. Im Gegensatz dazu konnte nach Inkubation mit C3bot 26mer in beiden Zelltypen kein Shift im Molekulargewicht nachgewiesen werden. In HT22 Zellen zeigte sich allerdings eine gegenüber der Kontrolle verstärkte Expression von RhoA. Der Wirkmechanismus von C3bot 26mer ist bis dato noch ungeklärt. Da diesem Peptid die enzymatische Aktivität fehlt, wurde ein anderer experimenteller Ansatz gewählt, um eine mögliche RhoA-Modifizierung zu erfassen. Mit Hilfe des Rho Pulldown-Assays kann aktives (GTP-gebundenes) Rho von inaktivem (GDP-Rho) getrennt und selektiv untersucht werden. In HT22 Zellen kam es nach Inkubation mit C3bot (hier als Positivkontrolle verwendet) zu der erwarteten Abnahme von aktivem RhoA. Die beiden enzymatisch inaktiven Substanzen C3bot 26mer und C3botE174Q hatten keinen Effekt (Abbildung 8 A). Im Gegensatz dazu kommt es in primären Hippocampusneuronen nach Behandlung mit C3bot 26mer (verwendet in steigenden Konzentrationen) zu einer deutlichen Reduktion von aktivem RhoA (Abbildung 8 B; Abbildung wurde von PD Dr. Astrid Rohrbeck, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt).

Die verwendeten Zellkulturen eignen sich als Modellsysteme, da sie die Fähigkeit zur Glutamat-Aufnahme besitzen und sensitiv gegenüber C3 Proteinen sind.

Der Einfluss von C3bot und C3bot 26mer auf die neuronale Glutamat-Aufnahme

Im Folgenden wurde nun der Einfluss einer Inkubation von HT22 Zellen und Hippocampusneuronen mit C3bot bzw. C3bot 26mer auf die Glutamat-Aufnahme untersucht.

Eine dreitägige Behandlung von HT22 Zellen mit C3bot bzw. C3bot 26mer führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Glutamat-Aufnahme. C3bot reduzierte die Abnahme um 20 % und C3bot 26mer um 24 %. Die Spezifität der Aufnahme wurde auch hier durch den Einsatz von PDC validiert (Abbildung 9 A).

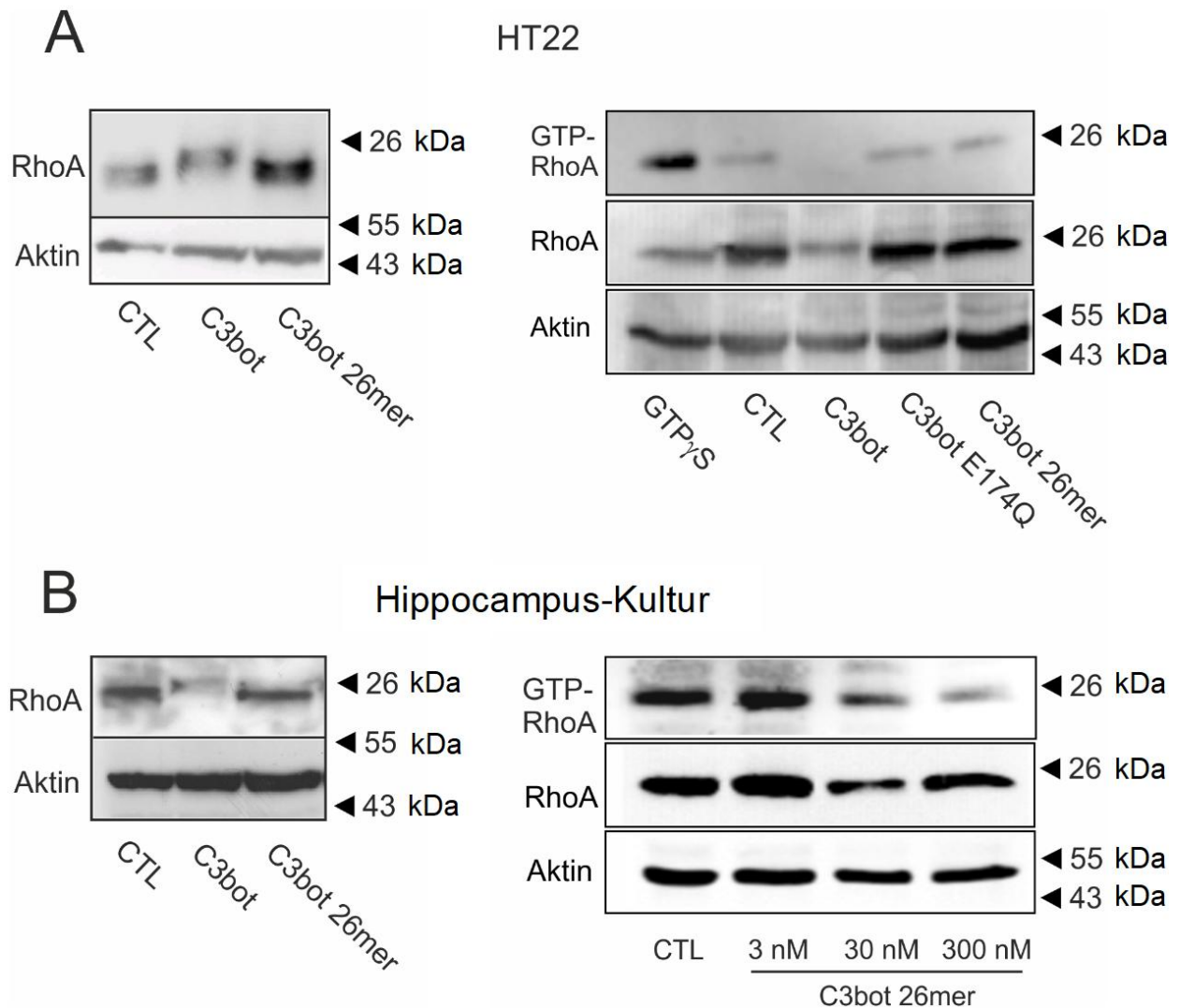


Abbildung 8: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf RhoA in HT22 Zellen und Hippocampus-Kultur

A, B) HT22 Zellen und Hippocampusneurone wurden drei Tage unter Serum-freien Bedingungen mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer inkubiert und anschließend proteinbiochemisch untersucht. Die **linken Abbildungen** zeigen die Inkubation mit RhoA Antikörper zur Detektion von RhoA Gesamtprotein. Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet. In beiden Zellsystemen wird eine Veränderung des Molekulargewichtes von RhoA durch C3bot-vermittelte ADP-Ribosylierung deutlich. Ein proteasomaler Abbau von inaktiviertem RhoA führt zusätzlich zu einem schwächeren RhoA-Signal nach Behandlung mit C3bot (HT22 Zellen: n = 2, reproduziert nach [11,12]. Hippocampus-Kultur: n = 1, reproduziert nach [6].

Die **rechten Abbildungen** zeigen die Ergebnisse der RhoA Pulldown-Assays. Zusätzlich zu RhoA Gesamtprotein ist hier aktives (GTP-gebundenes) RhoA dargestellt. In Hippocampusneuronen, nicht jedoch in HT22 Zellen, kommt es zu einer Abnahme von aktivem RhoA nach Inkubation mit C3bot 26mer. C3botE174Q ist eine enzymatisch-inaktive Mutante von C3bot und wurde in der Analyse der HT22 Zellen verwendet (HT22 Zellen: n = 2. Hippocampus-Kultur: Abbildung wurde zur Verfügung gestellt von PD Dr. Astrid Rohrbeck, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover).

Um Hinweise auf mögliche beteiligte Signaltransduktionsmechanismen zu erhalten, wurde die PKC α -vermittelte Translokation von EAAT3 aus dem endosomalen Reservoir an die Plasmamembran, welche einen gut untersuchten Regulationsmechanismus der neuronalen Glutamat-Aufnahme darstellt, zum Vergleich analysiert. Die experimentelle Aktivierung der PKC α erfolgt durch die Applikation von Phorbolestern wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Vor diesem Hintergrund wurden HT22 Zellen 20 Minuten vor dem Glutamat-Aufnahme-Assay mit 200 nM PMA behandelt. Dabei kam es zu einer signifikanten Reduktion der Glutamat-Aufnahme um 24 % (Abbildung 9 B).

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass nach Aktivierung durch PMA die PKC α aus dem Cytosol an die Plasmamembran transloziert wird [41]. Abbildung 9 C zeigt eine immunocytochemische Aufarbeitung von HT22 Zellen, die vor der Fixierung entweder drei Tage mit C3bot bzw. C3bot 26mer oder 20 Minuten mit PMA behandelt wurden. EAAT3 zeigt auch nach Behandlung mit C3bot bzw. C3bot 26mer oder PMA weiterhin ein cytosolisches und Plasmamembran-nahes Verteilungsmuster. Unter PMA kommt es dagegen zu einer deutlichen Verlagerung von PKC α aus dem Cytosol an die Plasmamembran. Trotz ähnlicher Effekte auf die Glutamat-Aufnahme scheint somit in HT22 Zellen die Inkubation mit C3bot bzw. C3bot 26mer nicht zu einer Aktivierung von PKC α zu führen.

Primäre hippocampale Dissoziationskulturen wurden identisch zu den Untersuchungen an HT22 Zellen behandelt. Hier zeigte sich jedoch eine Steigerung der Glutamat-Aufnahme. C3bot führte zu einer Steigerung um 27 % und C3bot 26mer zu einer signifikanten Steigerung um 19 % (Abbildung 10 A).

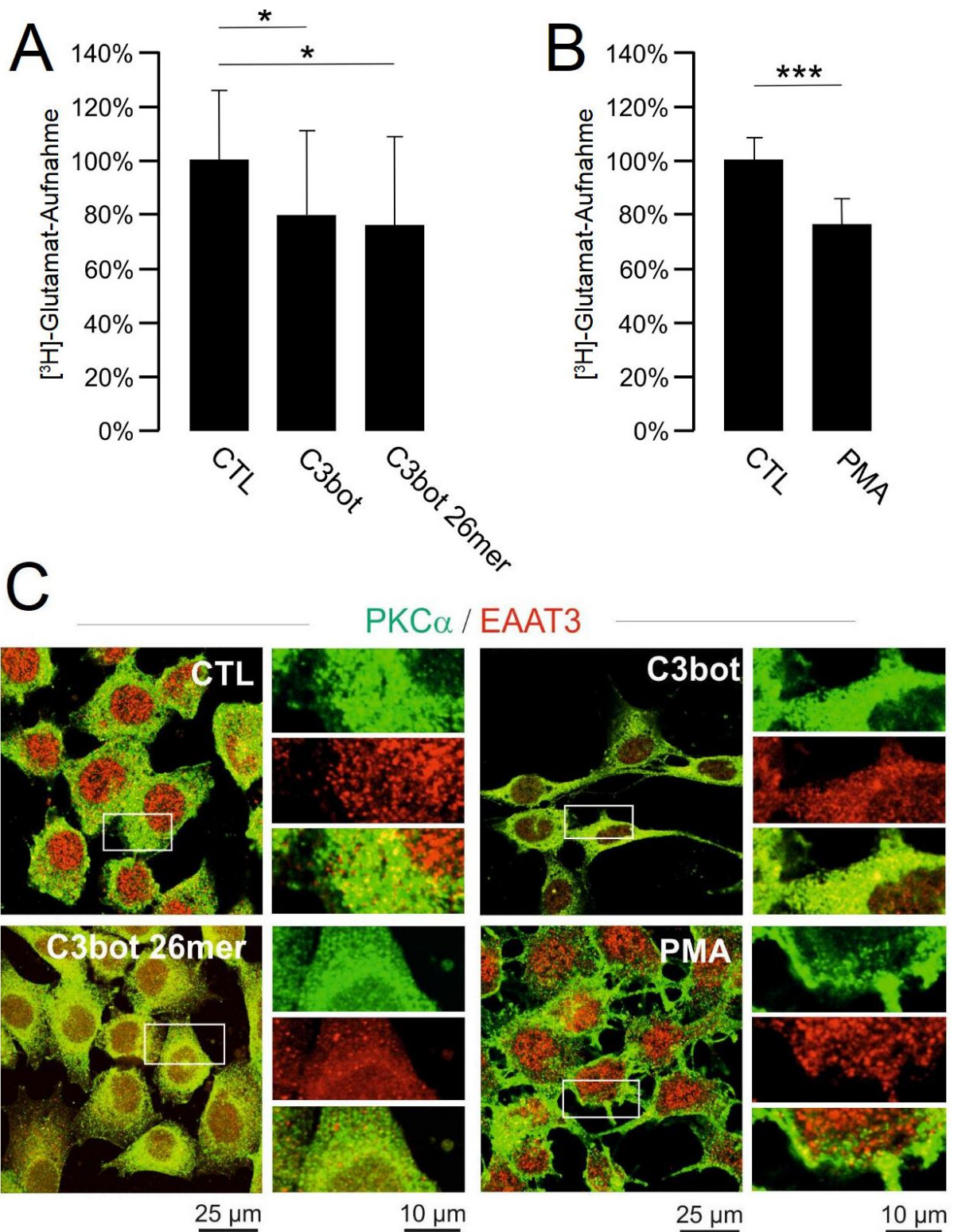


Abbildung 9: Effekte von C3bot, C3bot 26mer und PKC α -Aktivierung auf die Glutamat-Aufnahme in HT22 Zellen

A) HT22 Zellen wurden drei Tage lang vor dem Glutamat-Aufnahme-Assay mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer unter Serum-freien Bedingungen inkubiert. Aus dem gewonnenen Lysat wurde die aufgenommene Glutamatmenge quantifiziert. PDC, ein Blocker der Plasmamembranständigen Glutamat-Transporter, wurde zur Validierung des spezifischen Transports eingesetzt. C3bot und C3bot 26mer führen zu einer signifikanten Reduktion der Glutamat-Aufnahme um 20 % bzw. 24 % verglichen zu unbehandelten Zellen (C3bot und C3bot 26mer jeweils *P < 0.05 bei n = 8). **B)** Eine zwanzigminütige Inkubation mit PMA vor dem Aufnahme-Assay führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Glutamat-Aufnahme um 24 % verglichen zu unbehandelten Zellen (**P < 0.01, n = 8). **C)** HT22 Zellen wurden kultiviert und vor der Fixierung drei Tage mit 300 nM C3bot und C3bot 26mer bzw. 20 Minuten mit 200 nM PMA inkubiert. Danach wurden Zellen mit einem gegen EAAT3 und PKC α gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch einen rot (EAAT3) und grün (PKC α) fluoreszierenden Sekundärantikörper. EAAT3 zeigt sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Zellen ein cytosolisches Verteilungsmuster. Die morphologischen Veränderungen nach C3bot lassen sich parallel beobachten. PKC α zeigt inaktiv ein cytosolisches Verteilungsmuster. Inkubation mit PMA führt zur Translokation der PKC α aus dem Cytosol an die Plasmamembran (n = 4). Die Inkubation mit C3 Proteinen führt zu keiner PKC α -Aktivierung (n = 3).

In diesen Experimenten wurde Dihydrokainat (DHK, ein spezifischer GLT-1 Inhibitor) in einer finalen Konzentration von 1 mM dem [3 H]-Glutamat-Medium zugesetzt. Grund hierfür ist das Ergebnis der Studie von Höltje et al. 2008, in welcher gezeigt werden konnte, dass C3 Proteine zu einer verstärkten astrozytären Glutamat-Aufnahme durch eine NF κ B-vermittelte Expressionssteigerung von GLT-1 führen [39]. Trotz der Zugabe des Mitose-Hemmers B27 während der Kultivierung von primären neuronalen Dissoziationskulturen befindet sich immer ein Restanteil an Astrozyten in der Kultur. Durch den Einsatz von DHK ist die gemessene verstärkte Glutamat-Aufnahme auf die Neurone zurückzuführen.

Auch Aktivierung von PKC α durch PMA führte zu einer Steigerung der Glutamat-Aufnahme. Diese betrug 13 % (Abbildung 10 B). Analog zu den HT22 Zellen erfolgte eine immunocytochemische Färbung gegen PKC α und EAAT3: Wie bereits in HT22 Zellen beobachtet, führte die Behandlung mit C3bot bzw. C3bot 26mer jedoch nicht zu einer sichtbaren Umverteilung von EAAT3. Auch zeigte sich keine PKC α Aktivierung nach Inkubation mit C3 Proteinen. Die Inkubation mit PMA führte auch in diesem Modell zu einer Aktivierung der PKC α . Auch in diesem Modell kann man aus den

durchgeführten Experimenten ableiten, dass es sich bei den C3 Protein- bzw. PKC α -vermittelten Effekten um unterschiedliche Zellsignalwege handeln muss (Abbildung 10 C).

Der Einfluss von C3 Proteinen auf die Aktivität von EAAT3

HT22 und primäre Hippocampusneurone reagieren hinsichtlich der Glutamat-Aufnahme unterschiedlich auf C3 Proteine und Aktivierung der PKC α . Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit möglichen zellbiologischen Mechanismen zur Erklärung der oben vorgestellten Beobachtungen.

Unterschiedliche Mechanismen zur Regulation der zellulären Transporter-Aktivität sind denkbar: Eine Steigerung der Expression des Proteins mit Erhöhung der gesamten zellulären Proteinmenge, die Verlagerung von Transportermolekülen (beispielsweise aus einem ruhendem endosomalen Reservoir) an die Plasmamembran ohne Änderung der gesamten zellulären Proteinmenge, sowie die posttranslationale Modifikation mit Steigerung der Affinität von Transporter zu seinem Substrat.

Um eine Änderung im Expressionslevel von EAAT3 zu erfassen, wurden HT22 Zellen und primäre hippocampale Neurone drei Tage mit C3bot bzw. C3bot 26mer behandelt. Bei den HT22 Zellen wurde eine Membranfraktionierung durchgeführt, was die Aufkonzentrierung zellulärer Membranen ermöglicht. Nach Aufschluss der Zellen durch Zugabe von destilliertem Wasser erfolgt eine niedertourige Zentrifugation um Zellkerne und –organellen zu entfernen. Danach wird durch eine hochoctourige Zentrifugation das Cytosol von Plasmamembranen und Endosomen getrennt. Die so gewonnenen Membranfraktionen wurden proteinbiochemisch aufgearbeitet. Wegen der hohen Expression von EAAT3 war diese Methode bei den Hippocampus-Kulturen nicht notwendig. Die Abbildungen 11 A und B zeigen, dass sich die Proteinexpressionslevel von EAAT3 nach Behandlung mit C3bot bzw. C3bot 26mer in HT22 und Neuronen nicht wesentlich verändern. Die parallel dazu durchgeführten immunocytochemischen Analysen ergab qualitativ betrachtet ebenfalls keine klaren Veränderungen in der Signalintensität. (Abbildung 11 C).

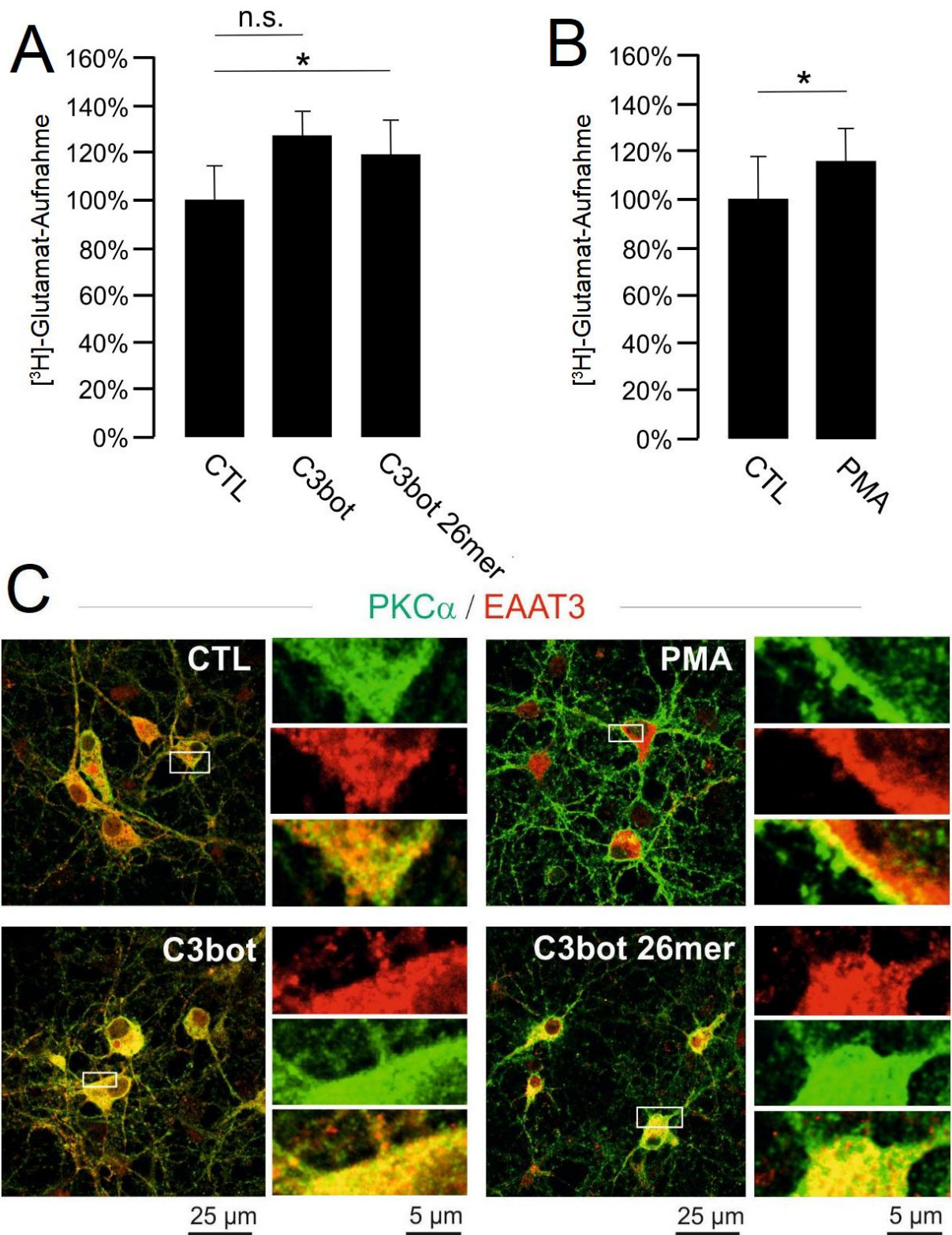


Abbildung 10: Effekte von C3bot, C3bot 26mer und PKC α -Aktivierung auf die Glutamat-Aufnahme in der Hippocampus-Kultur

A) Hippocampusneurone wurden drei Tage lang vor dem Glutamat-Aufnahme-Assay mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer unter Serum-freien Bedingungen inkubiert. Aus dem gewonnenen Lysat wurde die aufgenommene Glutamat-Menge quantifiziert. PDC, ein Blocker der Plasmamembran-ständigen Glutamat-Transporter, wurde zur Validierung des spezifischen Transports eingesetzt. Die Aktivität astrozytärer Glutamat-Transporter wurde zusätzlich durch 1 mM Dihydrokainat blockiert. C3bot führte zu einer Zunahme von der Glutamat-Aufnahme um 27 % und C3bot 26mer signifikant zu einer Zunahme der Glutamat-Aufnahme um 19 % verglichen zu unbehandelten Zellen (C3bot 26mer: *P < 0.05 bei n = 3 (drei Kulturen aus drei verschiedenen Mäusen)). **B)** Eine zwanzigminütige Inkubation mit PMA vor dem Aufnahme-Assay führte zu einer signifikanten Zunahme der Glutamat-Aufnahme um 16 % verglichen zu unbehandelten Zellen. Auch hier wurde eine unspezifische Glutamat-Aufnahme durch den Einsatz von PDC berücksichtigt (*P < 0.05 bei n = 4 (vier Kulturen aus drei verschiedenen Mäusen)). **C)** Primäre hippocampale Neuronenkulturen wurden kultiviert und vor der Fixierung drei Tage mit 300 nM C3bot und C3bot 26mer bzw. 20 Minuten mit 200 nM PMA inkubiert. Danach wurden Zellen mit einem gegen EAAT3 und PKC α gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch einen rot (EAAT3) und grün (PKC α) fluoreszierenden Sekundärantikörper. EAAT3 zeigt sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Zellen ein cytosolisch und Plasmamembran-nahes Verteilungsmuster. PKC α zeigt inaktiv ein cytosolisches Verteilungsmuster. Inkubation mit PMA führt zur Translokation der PKC α an die Plasmamembran (Exemplarisch ist ein Experiment dargestellt bei n = 3). Auch hier führt die Inkubation mit C3 Proteinen zu keiner PKC α -Aktivierung (Exemplarisch ist ein Experiment dargestellt bei n = 3). n.s., nicht signifikant.

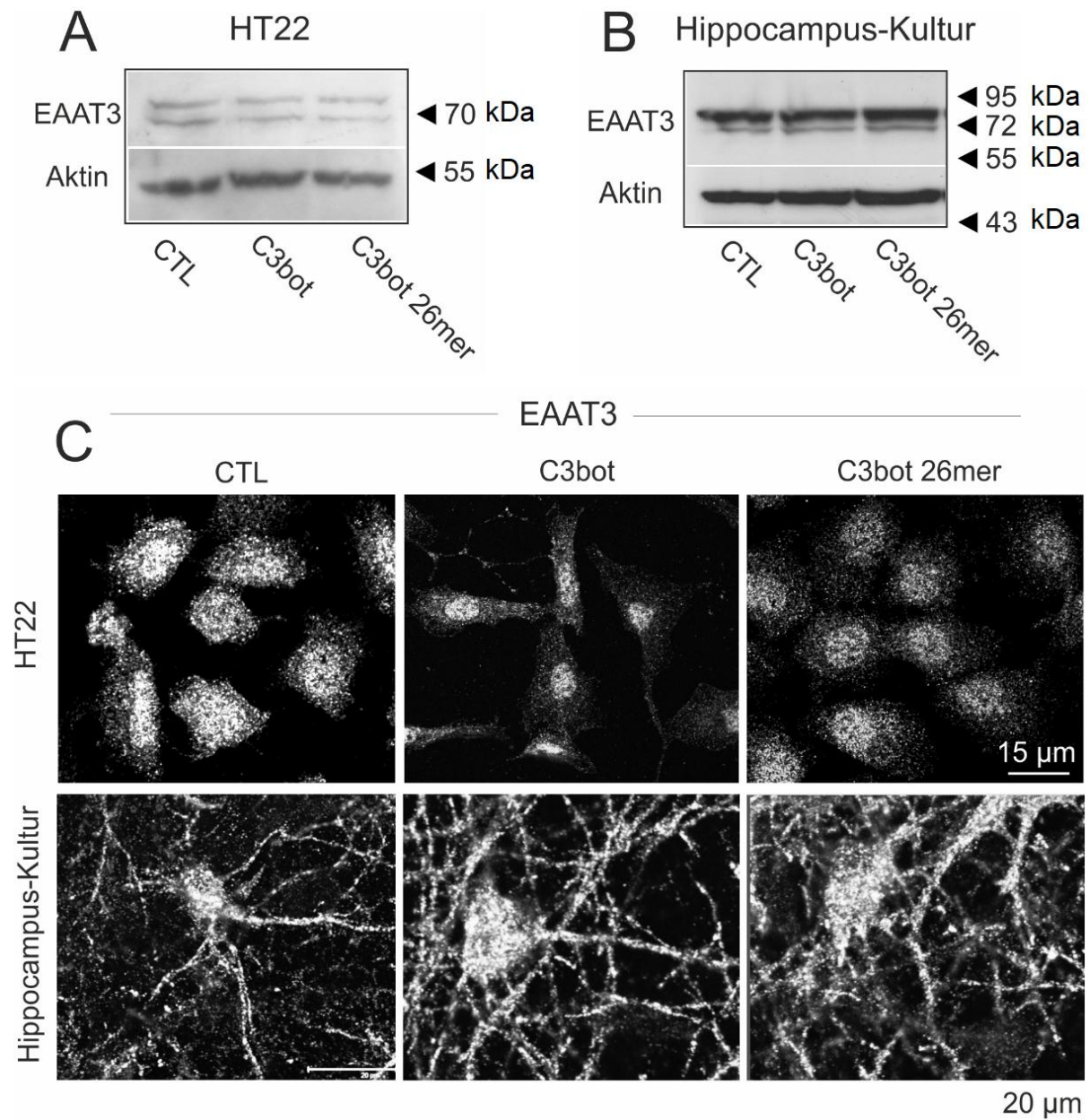


Abbildung 11: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die Expression von EAAT3

A) und B) HT22 Zellen sowie Hippocampusneurone wurden kultiviert und drei Tage mit 300 nM C3bot oder C3bot 26mer unter Serum-freien Bedingungen inkubiert. Im Folgenden wurde für die HT22 Zellen eine Membranfraktionierung aus Zellhomogenaten zur Western Blot Analyse hergestellt. Die Hippocampus-Kulturen wurden einfachen Western Blot Analysen ohne Membranfraktionierung zugeführt. Es wurde ein gegen EAAT3 gerichteter Primärantikörper und zur Visualisierung ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Es zeigten sich

keine offensichtlichen Veränderungen in der Gesamtproteinmenge von EAAT3 nach Inkubation mit C3bot oder C3bot 26mer (Exemplarisch ist jeweils ein Experiment dargestellt bei HT22 Zellen $n = 12$ und bei Hippocampus-Kultur $n = 3$). **C)** HT22 Zellen und Hippocampusneurone wurden nach dreitägiger Behandlung fixiert und mit einem gegen EAAT3 gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch einen fluoreszierenden Sekundärantikörper. Auch in der Immunocytochemie fanden sich keine einheitlichen Veränderungen hinsichtlich der Expression von EAAT3 (Exemplarisch ist jeweils ein Experiment dargestellt bei HT22 Zellen $n = 4$ und bei Hippocampus-Kultur $n = 3$).

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem C3 Protein-vermittelten Effekten um eine Änderung im Trafficking von EAAT3 und damit in der Anzahl aktiver Transporter an der Plasmamembran handelt, wurde mit Hilfe des Biotin-Assays untersucht. Hierbei werden lebende Zellen mit Biotin inkubiert und dann lysiert. Biotin bindet an alle in den Extrazellulärraum ragende Proteine. Durch Zugabe von Avidin, einem spezifischen Bindungspartner von Biotin, ist eine Isolierung der Biotin-Protein-Komplexe aus dem Zelllysat möglich. Da Biotin nicht Plasmamembran-gängig ist, kann so die Trennung von extrazellulären und intrazellulären Proteinen erfolgen. Auch hier wurden HT22 Zellen und primäre Neurone drei Tage mit C3bot bzw. C3bot 26mer behandelt, biotinyliert und dann proteinbiochemisch analysiert. Die ohnehin niedrige EAAT3 Expression in HT22 Zellen machte eine Analyse durch diese Methodik unmöglich. In Neuronen wurden zufriedenstellende Proteinsignale im Western Blot erhalten, Quantifizierung dieser zeigte jedoch keinen einheitlichen Effekt. Es ließen sich also keine einheitlichen Veränderung in der Membranexpression von EAAT3 nach Behandlung mit C3bot bzw. C3bot 26mer erkennen. Exemplarisch wird der Western Blot eines Experimentes in primären Neuronen gezeigt (Abbildung 12). In Analogie hierzu haben kinetische Analysen mit Hippocampus-Kulturen nach Behandlung mit C3bot und C3bot 26mer keine signifikanten Veränderungen ergeben ($n = 5$, Daten dieser Analysen wegen fehlender Signifikanz nicht dargestellt). Auch haben identische Analysen mit HT22 Zellen keine signifikanten Veränderungen ergeben ($n = 3$, Daten dieser Analysen wegen fehlender Signifikanz nicht dargestellt).

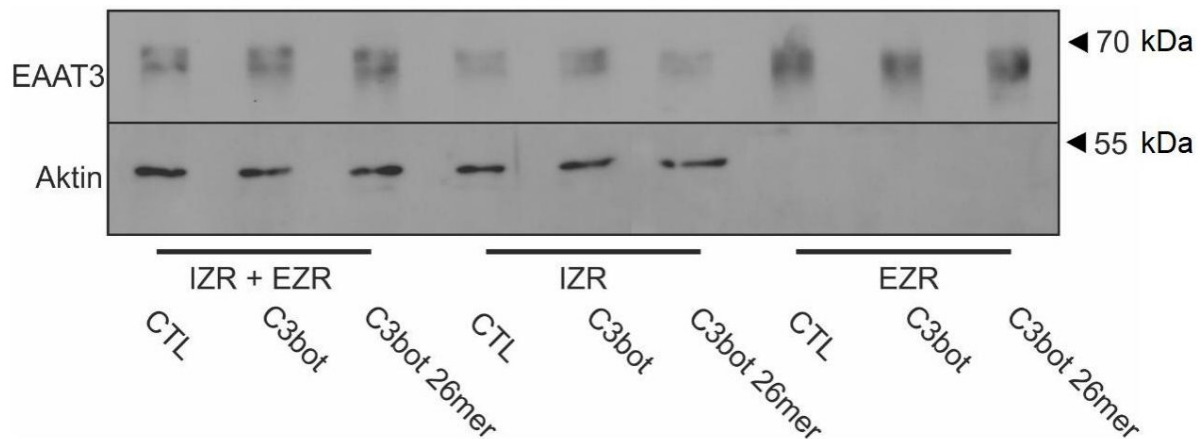


Abbildung 12: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die Oberflächenexpression von EAAT3 in der Hippocampus-Kultur

Hippocampale Neurone wurden drei Tage mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer unter Serumfreien Bedingungen inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit Biotin mit anschließender Lyse nach mehrmaligem Waschen. Durch Inkubation der Lysate mit Avidin-Beads konnten die biotinylierten Oberflächenproteine von den unbiotinylierten Intrazellulärproteinen getrennt werden. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Western Blot Analyse eines repräsentativen Biotinylierungsexperimentes. Quantifizierungen von jeweils drei Experimenten zeigten keine Veränderung in der Oberflächenexpression von EAAT3 in primären Hippocampusneuronen. Aufgrund der niedrigen EAAT3 Expression in HT22 Zellen konnte dieses Zellmodell mit dieser Methodik nicht analysiert werden. Als Ladungskontrolle diente Aktin. IZR, Intrazellulärraum; EZR, Extrazellulärraum (Exemplarisch ist für die Hippocampus-Kultur ein Experiment dargestellt bei n = 6).

Eine weitere Methode wurde zur Untersuchung möglicher C3 Protein-bedingter Regulationsmechanismen von EAAT3 verwendet. Die quantitative Reverse Transkriptase Polymerasen-Kettenreaktion (qRT-PCR) stellt eine sehr sensitive Methode zur Analyse des vorhandenen mRNA Gehalts in biologischen Proben dar. Im Rahmen einer Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover wurde der mRNA Gehalt für EAAT3 in HT22 Zellen und Hippocampusneuronen quantifiziert. Eine dreitägige Behandlung mit 300 nM C3bot bzw. C3bot 26mer führte zu einer signifikanten Abnahme an EAAT3 mRNA in HT22 Zellen (Abbildung 13 A). In Hippocampusneuronen ließen sich keine einheitlichen Effekte darstellen, nach

Inkubation mit C3bot kam es zu einer geringfügigen signifikanten Abnahme der mRNA für EAAT3, für C3bot C3bot 26mer konnte kein signifikanter Effekt dargestellt werden (Abbildung 13 B).

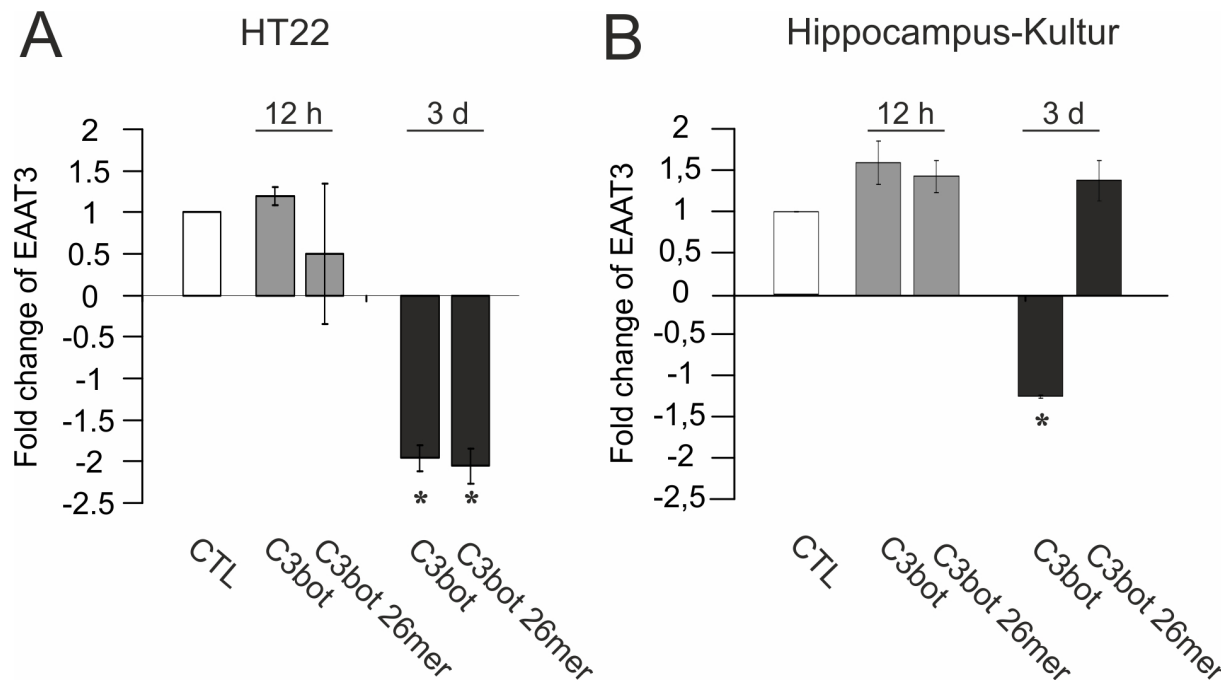


Abbildung 13: Effekte von C3bot und C3bot 26mer auf die mRNA von EAAT3

(A) HT22 Zellen wurden 12 Stunden bzw. drei Tage unter Serum-freien Bedingungen mit C3bot bzw. C3bot 26mer inkubiert. Nach Lyse mit anschließender RNA-Extraktion wurde eine PCR zur Quantifizierung der EAAT3-mRNA durchgeführt. In HT22 Zellen kam es unter beiden C3 Proteinen nach dreitägiger Inkubation zu einer deutlichen Reduktion an EAAT3 mRNA (Drei Tage C3bot und C3bot 26mer: jeweils $*P < 0.05$ bei $n = 3$). Die 12-stündige Inkubation hatte keinen Einfluss auf die EAAT3 mRNA-Expression in HT22 Zellen (jeweils $n = 3$). **(B)** In primären Hippocampusneuronen hatte die 12-stündige Inkubation mit C3 Proteinen keinen Einfluss auf die Menge an EAAT3-mRNA (jeweils $n = 3$ (3 Kulturen aus einem Tier)). Nach dreitägiger Inkubation durch C3bot kam es zu einer geringen Abnahme an EAAT3-mRNA. Drei Tage C3bot 26mer hatten keinen Einfluss auf die EAAT3-mRNA Expression (Drei Tage C3bot: $*P < 0.05$, $n = 3$ (3 Kulturen aus einem Tier)). Die Normalisierung erfolgte durch den Vergleich mit beta-2 Mikroglobulin.

Um die Frage einer möglichen posttranslationalen Modifizierung als Regulierungsmechanismus zu adressieren, wurde zunächst eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Hierzu wurden magnetische Beads, an die Protein G gekoppelt ist, mit einem polyclonalem EAAT3 Antikörper inkubiert. Protein G bindet mit hoher Affinität an die Fc-Region von Immunglobulinen des Types G. Diese Magnetbead-Antikörper-Komplexe wurden dann in ein Zelllysate gegeben und mit Hilfe eines Magneten Antikörper-gebundenes EAAT3 von den restlichen Proteinen getrennt. Abbildung 14 zeigt die erfolgreiche IP in primärer Neuronenkultur. Nun wurden die Zellen mit C3 Proteinen behandelt, lysiert und einer IP gegen EAAT3 unterzogen. Die auf diese Weise isolierten EAAT3-Transporter wurden daraufhin mit spezifischen Phosphotyrosin bzw. -serin Antikörpern inkubiert um Änderungen im Phosphorylierungsstatus dieser Aminosäurereste zu erfassen. Dieser experimentelle Ansatz zeigte eine Verminderung phosphorylierter Serin- und Tyrosinreste in HT22 Zellen (n = 3, Abbildung 14 B). In primären Neuronen ließ sich eine Zunahme phosphorylierter Tyrosinreste beobachten (n = 5, Abbildung 14 C). Weder bei den HT22 Zellen noch bei den Hippocampus-Kulturen war der Unterschied in Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant.

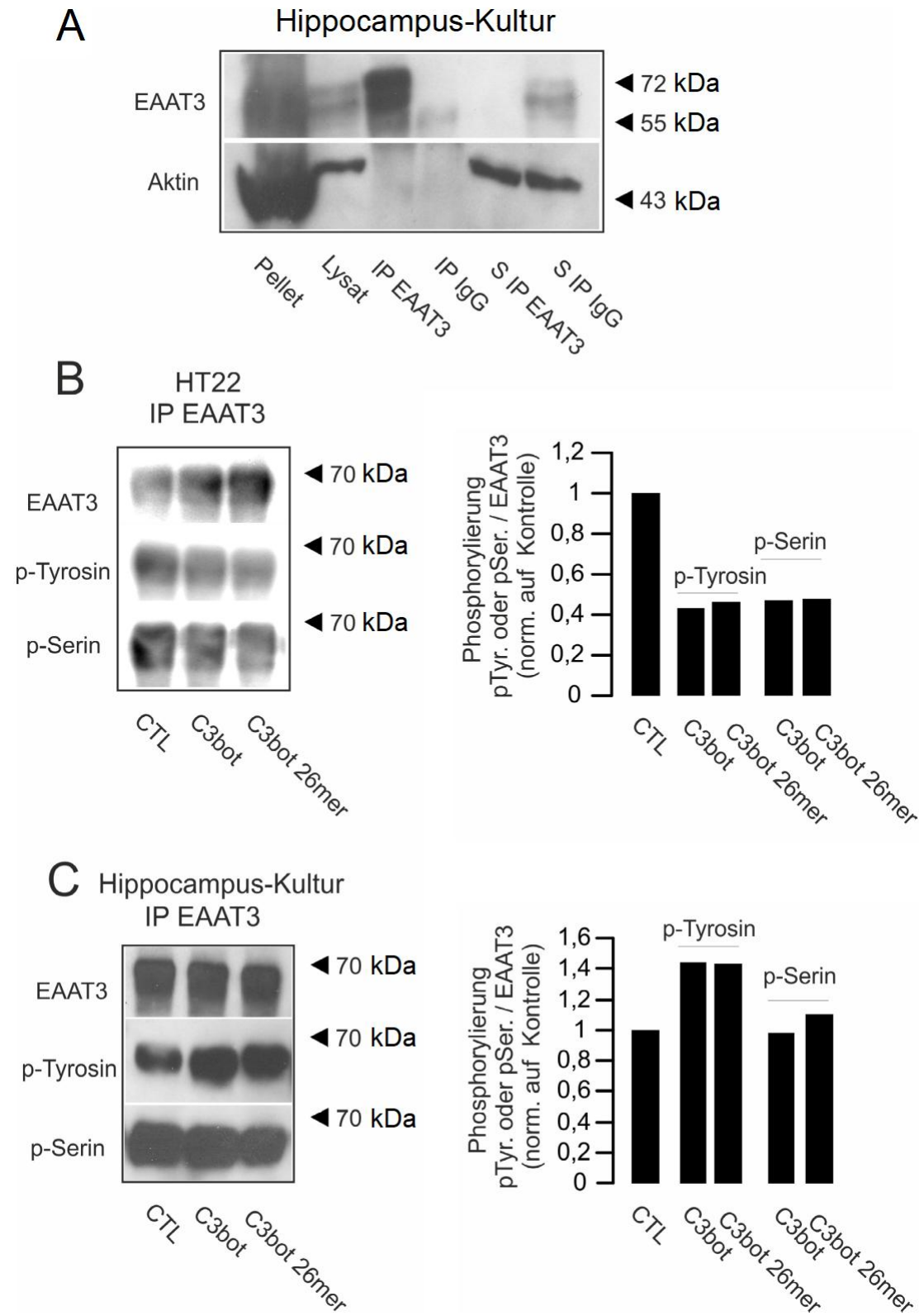


Abbildung 14: Effekte von C3bot auf den Phosphorylierungsstatus von EAAT3

(A) Dargestellt ist der Western Blot einer Immunpräzipitation gegen EAAT3 im Modell der primären Hippocampus-Kultur. Ein polyclonaler EAAT3 Antikörper vom Typ IgG aus dem Kaninchen sowie unspezifische polyclonale Kaninchen IgG Antikörper wurden an magnetische Dynabeads gekoppelt. Zellen wurden nach Kultivation lysiert und anschließend mit EAAT3-Dynabead-Komplexen bzw. unspezifischen IgG-Dynabead-Komplexen inkubiert. Durch den Einsatz eines Magneten können Dynabead-Antikörper-Protein Komplexe aus dem Zelllysate isoliert werden. In der Fraktion "IP EAAT3", nicht jedoch in der Fraktion "IP IgG", ist ein sehr deutliches EAAT3 Signal zu erkennen. Im Einklang hierzu bleibt das EAAT3 Signal im Überstand der "IP IgG" erhalten, wohingegen es im Überstand der "IP EAAT3" komplett verschwunden ist. IP, Immunpräzipitation; S, Supernatant. **(B)** HT22 Zellen wurden kultiviert und drei Tage mit 300 nM C3bot oder C3bot 26mer unter Serum-freien Bedingungen inkubiert. Den Lysaten wurde ein Phosphatase-Inhibitor zugegeben, bevor die IP gegen EAAT3 durchgeführt wurde. Die geblotteten "IP EAAT3" – Fraktionen wurden mit einem gegen EAAT3, phosphoryliertem Serin bzw. phosphoryliertem Tyrosin gerichteten Primärantikörper inkubiert und mithilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper entwickelt. In HT22 Zellen zeigt sich ein reduziertes Signal für phosphoryliertes Serin und phosphoryliertes Tyrosin unter beiden C3 Proteinen (Exemplarisch ist ein Western Blot samt Quantifizierung mittels LabImage 1D Software dargestellt bei n = 3). **(C)** Primäre Hippocampusneurone wurden drei Wochen kultiviert und dann drei Tage mit 300 nM C3bot oder C3bot 26mer unter Serum-freien Bedingungen inkubiert bevor sie der gleichen Prozedur wie die HT22 Zellen unterzogen wurden. In diesem Modellsystem zeigte sich eine Zunahme des Signales für phosphoryliertes Tyrosin unter beiden C3 Proteinen. Es konnten keine Veränderungen im Signal für phosphoryliertes Serin beobachtet werden. (Exemplarisch ist ein Western Blot samt Quantifizierung mittels LabImage 1D Software dargestellt bei n = 5).

DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *Clostridium botulinum* Exoenzym und einem daraus abgeleiteten Peptid auf die neuronale Glutamat-Aufnahme in der neuronalen Zelllinie HT22 und in murinen Hippocampusneuronen untersucht. Beide C3 Proteine führten in primären Neuronen zu einer Steigerung und in der HT22 Zelllinie zu einer Abnahme der Glutamat-Aufnahme.

C3 Proteine verändern die Glutamat-Aufnahmekapazität und den Phosphorylierungsstatus von EAAT3

C3bot und C3bot 26mer führten in primären hippocampalen Neuronen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von EAAT3 an der Aminosäure Tyrosin. Parallel hierzu zeigte sich in funktionellen Analysen eine gesteigerte Glutamat-Aufnahme unter beiden C3 Proteinen. Bei der Zelllinie verhielt es sich gegensätzlich zu den Neuronen: Eine verminderte Glutamat-Aufnahme ging mit einer reduzierten Phosphorylierung von EAAT3 an Tyrosin sowie Serin einher.

Die Phosphorylierung von Tyrosin und Serin sind gut erforschte zellbiologische Prozesse [42,43]. Die Phosphorylierung von Plasmamembrantransportern (auch außerhalb des ZNS) führt zu einer Veränderung ihrer kinetischen Eigenschaften. Dabei wird zwischen einem indirekten Weg (die Phosphorylierung findet an einem mit dem Transporter assoziierten Protein statt) und direktem Weg (die Phosphorylierung findet direkt am Transporter statt) unterschieden. Dabei kann sich diese posttranslationale Modifizierung entweder auf die subzelluläre Lokalisation des Transporters oder die Affinität des Transporters zu seinem Substrat auswirken [44]. Die Phosphorylierung von Proteinen findet hauptsächlich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin statt und ist biochemisch durch den Transfer einer Phosphatgruppe an eine Hydroxylgruppe charakterisiert, wobei ATP in der Regel als Phosphatdonor dient. Kinasen sind enzymatische Katalysatoren dieser Reaktion.

Es konnte eine Sequenz von drei Aminosäuren in EAAT3 identifiziert werden, welche Tyrosin enthält und für die PMA- bzw. PKC α -vermittelte Translokation des Transporters an die Plasmamembran erforderlich zu sein scheint [45]. Außerdem konnte durch Do et al. gezeigt werden, dass das volatile Anästhetikum Isofluran zu einer PKC α -vermittelten

Erhöhung der Membranexpression von EAAT3 führt [46] und in einer Folgearbeit konnten durch gentechnische Studien belegt werden, dass eine Mutation von Serin an Position 465 diesen Effekt aufhebt [47]. Beide Beobachtungen sprechen für eine direkte Phosphorylierung des Transporters, welche die Translokation an die Plasmamembran zu vermitteln scheint.

Die in dieser Arbeit beobachtete Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von EAAT3 in HT22 Zellen und Hippocampusneuronen ist eine für C3 Proteine neue Erkenntnis. Da diese Beobachtung bis jetzt lediglich auf einem Antikörpernachweis beruht, sind gentechnische Experimente zur weiteren Erhärtung dieser Beobachtung erforderlich. So würde die Generierung von Punktmutationen phosphorylierbarer Aminosäuren zeigen, ob EAAT3 direkt oder ob ein anderes, mit dem Transporter assoziiertes Protein phosphoryliert wird. Es ist nicht völlig auszuschließen, dass die positive Antikörperreaktion in der hier durchgeführten IP nicht auf EAAT3 direkt, sondern auf einem mit EAAT3 ko-präzipitierten Protein, beruht. Allerdings müsste das Molekulargewicht des putativen ko-präzipitierten Proteins dann in etwa dem von EAAT3 entsprechen.

Gut erforscht ist die PKC α -vermittelte Translokation von EAAT3 an die Plasmamembran und es gibt Hinweise auf eine Interaktion zwischen RhoA und PKC α . In der Arbeit von Schmalzing et al. konnte gezeigt werden, dass aktives RhoA in Oozyten die konstitutive Endocytose der Na⁺/K⁺ -ATPase fördert, inaktives RhoA diese aber hemmt. Dabei konnte Fluoreszenz-mikroskopisch gezeigt werden, dass dieser RhoA-vermittelte Effekt nicht der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts zuzuschreiben war. Genau wie aktives RhoA, hat durch Phorbolster aktivierte PKC α die Endocytose gefördert. Da dieser PKC α -vermittelte Effekt durch gleichzeitige Injektion von C3bot unterdrückt werden konnte, kann auf eine Interaktion zwischen RhoA und PKC α bei der Regulation des zellulären Proteintransportes geschlossen werden [48].

Nonaka et al. identifizierten 1995 die PKC α als Zielprotein von RhoA. RhoA-Aktivierung durch GTP resultierte hier in einer PKC α -vermittelten Aktivierung einer MAP-Kinase [49]. RhoA reguliert auch die Synthese von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) [50]. PIP₂ wird durch die Phospholipase C in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) umgewandelt. DAG wiederum ist ein endogener Aktivator der PKC α .

Eine Aktivierung von PKC α durch C3 Proteine konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. In immunocytochemischen Experimenten zeigte sich keine Umverteilung der PKC α vom Cytosol an die Plasmamembran nachdem die Zellen mit C3 Proteinen inkubiert wurden. Im inaktiven Zustand zeigt die PKC α eine cytosolische Verteilung und die Aktivierung (bspw. durch Phorbol ester) resultiert in einer Translokation an die Plasmamembran [41].

Neben PKC α gibt es weitere Kinasen, die mit RhoA interagieren: Die Rho-assoziierte Kinase (ROCK) ist ein Effektorprotein von RhoA. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle unter anderem in der Muskelphysiologie. Aktiviertes RhoA-GTP reguliert über ROCK und Myosin Phosphatase den Grad der Phosphorylierung von Myosin, indem ROCK die Phosphatase hemmt [51]. Ein weiteres Beispiel für die Interaktion zwischen RhoA und ROCK findet sich in der Arbeit von Schulz et al. In einer umfangreichen Studie über die molekularen Grundlagen der Neurofibromatose 2 zeigen die Autoren, dass das von dem NF2 Gen kodierte Protein Merlin RhoA aktiviert. Dies führt zu einer ROCK-vermittelten Phosphorylierung von Neurofilamenten und fördert damit das Wachstum von Axonen [52].

Die oben zitierten Arbeiten (aktives RhoA aktiviert eine Kinase) könnten einen Erklärungsansatz für die Beobachtungen in HT22 Zellen liefern: Da C3 Proteine die Aktivität von RhoA hemmen, müsste die Inkubation mit C3 Proteinen zu einer verminderten Aktivität von Kinasen führen. Hieraus resultiert dann die verminderte Phosphorylierung von EAAT3, wie in HT22 Zellen beobachtet. Die Durchführung eines Glutamat-Aufnahme-Assays bei Zellen, die mit Y-26732 (einem spezifischen Inhibitor der ROCK, [53]) inkubiert wurden, könnte wichtige Erkenntnisse liefern: Käme es hierbei zu einer Reduktion der Glutamat-Aufnahme, würde dies für die ROCK als Mediator der Phosphorylierung von EAAT3 sprechen und die Hypothese stützen, dass nach C3 Protein-induzierter Konformationsänderung, RhoA nicht mehr die ROCK aktivieren und diese wiederum nicht EAAT3 phosphorylieren kann (Abbildung 15).

In Nervenzellen muss man von einer anderen Signalkette ausgehen. Hier scheint RhoA die Dephosphorylierung von EAAT3 zu vermitteln, da eine Hemmung der RhoA-Aktivität zu einer gesteigerten Phosphorylierung führt. So lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Das Effektorprotein von RhoA ist eine Phosphatase und Hemmung der Interaktionsfähigkeit zwischen RhoA und der Phosphatase durch C3 Proteine führt zu

einem Wegfall der Phosphatase-Aktivität. Die Phosphorylierungsstelle ist nun für eine Kinase freigegeben (Abbildung 15).

Aus Pull-Down Experimenten, durch die aktives RhoA (RhoA-GTP) von inaktivem RhoA (RhoA-GDP) getrennt werden kann, geht hervor, dass C3bot 26mer keine RhoA-Inaktivierung in HT22 Zellen zur Folge hat. In diesen Experimenten sieht man, dass die RhoA-GTP Spiegel nach Inkubation mit C3bot 26mer unverändert bleiben. Wie lässt es sich nun erklären, dass C3bot und C3bot 26mer die Glutamat-Aufnahme in HT22 Zellen reduzieren? Folgende Möglichkeit ist denkbar: C3bot 26mer bindet an RhoA und führt zu einer Konformationsänderung, die in ihrem Ausmaß jedoch geringer als die C3bot-vermittelte ist. Die Kinase verliert so nicht ihre Aktivität, kann jedoch nicht mehr EAAT3 binden (Abbildung 15).

In primären Neuronen wurden nach Inkubation der Zellen mit dem enzymatisch-inaktiven C3bot 26mer reduzierte Spiegel an aktivem RhoA (RhoA-GTP) gefunden. Bestätigt findet sich dies in der Arbeit von Loske et al.: Im Vergleich zu unbehandelten Tieren ließen sich in Rückenmarkspräparaten von Mäusen nach experimenteller Rückenmarksläsion unter C3bot 26mer reduzierte RhoA-GTP Mengen nachweisen [8]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass in Neuronen das Ausmaß der Konformationsänderung von RhoA für beide C3 Proteine identisch ist. Nach Inkubation mit beiden Proteinen kann keine GTP-Anlagerung an RhoA erfolgen (Abbildung 15).

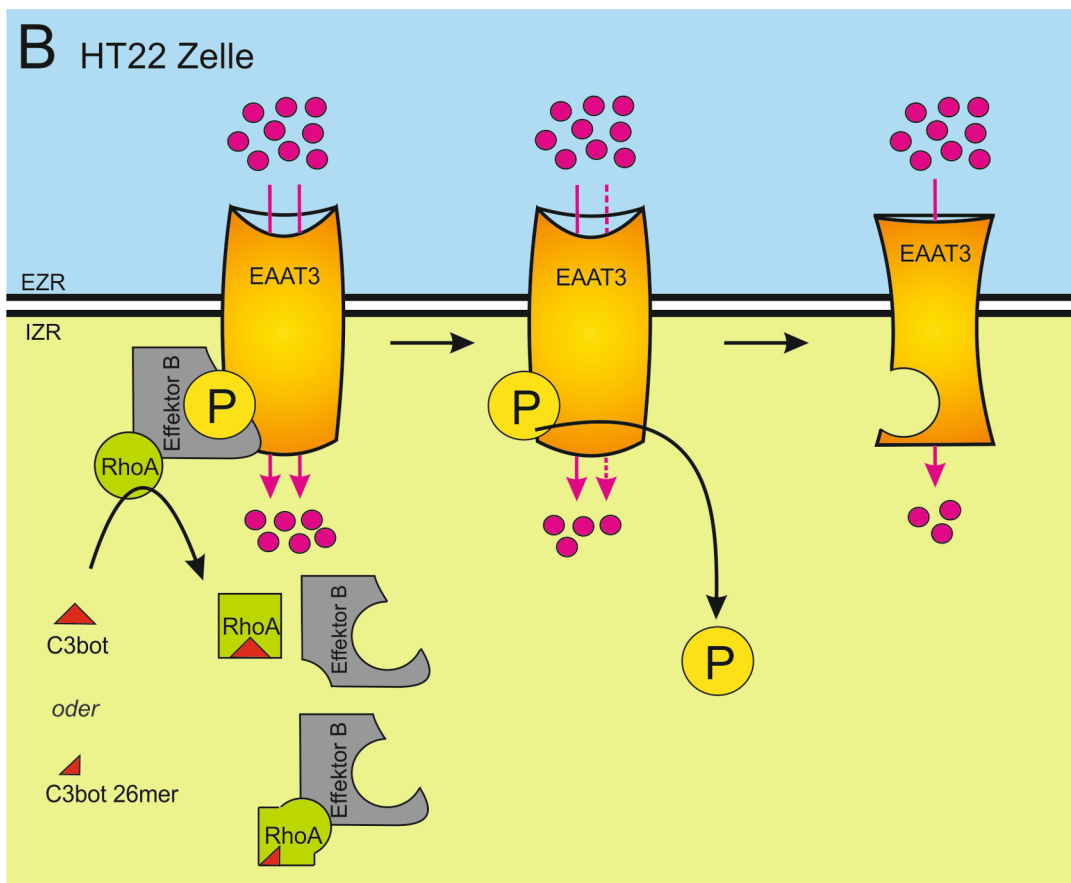
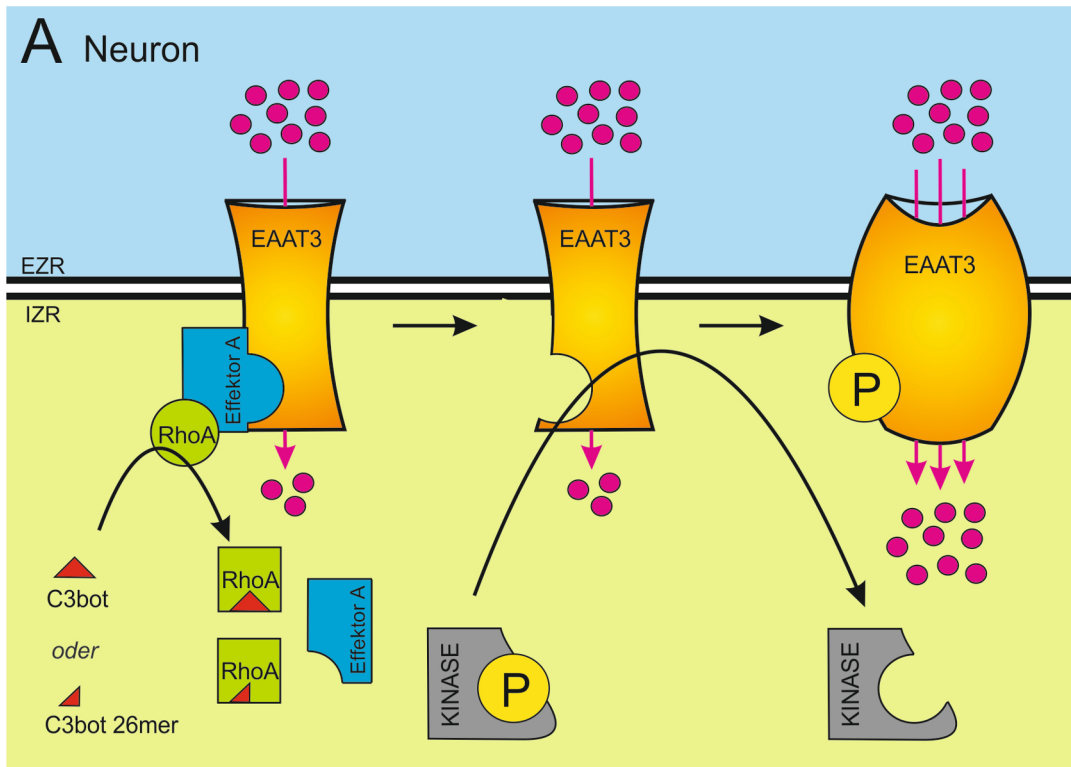


Abbildung 15: Hypothetischer Wirkmechanismus von C3 Proteinen auf die Aktivität von EAAT3 in Neuronen der hippocampalen Dissoziationskultur und in HT22 Zellen

(A) Im Neuron binden C3bot und C3bot 26mer nach Eintritt in die Zelle an das aktive Zentrum von RhoA mit daraus resultierender Konformationsänderung von RhoA. Eine von RhoA aktivierte Phosphatase (Effektor A) dissoziiert von EAAT3 und gibt die Bindungsstelle für eine Kinase frei, die nun die Phosphorylierung von EAAT3 katalysiert. Daraus resultiert eine Konformationsänderung von EAAT3 mit Erhöhung der Glutamat-Aufnahme aus dem Extrazellulärraum aufgrund einer gesteigerten Affinität von EAAT3 zu Glutamat. **(B)** In der HT22 Zelle binden C3bot und C3bot 26mer nach Eintritt in die Zelle an das aktive Zentrum von RhoA mit daraus resultierender Konformationsänderung von RhoA. Eine von RhoA aktivierte Kinase (Effektor B) kann nun EAAT3 nicht mehr phosphorylieren. C3bot 26mer führt nach Bindung ebenfalls zu einer Konformationsänderung von RhoA, dies aber in geringerem Ausmaß als C3bot. Die Kinase (Effektor B) verliert nicht ihre Aktivität, kann so aber nicht mehr an EAAT3 binden. Der Wegfall der Phosphorylierung von EAAT3 resultiert in einer Konformationsänderung von EAAT3 mit Reduktion der Glutamat-Aufnahme aus dem Extrazellulärraum aufgrund einer verminderten Affinität von EAAT3 zu Glutamat. Kirschröte Punkte stellen Glutamat-Moleküle dar. EZR, Extrazellulärraum; IZR, Intrazellulärraum; P, Phosphat.

Der Effekt von C3 Proteinen auf die EAAT3-vermittelte Glutamat-Aufnahme ist abhängig vom Zelltyp

In der bereits erwähnten Arbeit von Schmalzing et al. zur Untersuchung einer möglichen RhoA-PKC α Interaktion wurden auch die HT22 Zelllinie sowie primäre hippocampale Nervenzellen aus der Maus verwendet. Genau wie in der vorliegenden Arbeit für C3 Proteine beobachtet, verhielten sich HT22 Zellen und primäre Nervenzellen gegensätzlich gegenüber einer Aktivierung der PKC α durch Phorbol ester: HT22 Zellen reagierten mit einer Abnahme, primäre Nervenzellen dagegen mit einer Zunahme der Glutamat-Aufnahme [48]. In mit EAAT3 cDNA injizierten *Xenopus* Oozyten und in Madin-Darby canine kidney cells, die stabil mit EAAT3 transfiziert wurden, kam es zu einer Abnahme der Glutamat-Aufnahme nach PKC α Aktivierung. In der C6 Glioma Zelllinie, die endogen EAAT3 exprimiert, zu einer Zunahme [54].

Entscheidend scheint also zu sein, von welcher Zelle EAAT3 exprimiert wird und welche Signalwege aktiviert werden. Diese Beobachtung ist wichtig, denn die in dieser Arbeit verwendeten hippocampalen Dissoziationskulturen sind Mischkulturen, die sich aus glutamatergen und GABAergen Neuronen zusammensetzen. Da EAAT3 von beiden Neuronentypen exprimiert wird, muss die in diesem Modell gemessene Glutamat-

Aufnahme als Produkt verschiedener Zelltypen angesehen werden. So lassen sich mögliche Differenzen zwischen glutamatergen und GABAergen Neuronen nach Inkubation mit C3 Proteinen (oder Phorbol ester) in diesem Modell schwer erfassen. Um das Problem der zellulären Heterogenität in der Dissoziationskultur zu umgehen muss in zukünftigen Studien ein Weg gefunden werden, dieses primäre Nervenzellmodell spezifischer einzusetzen. Hierbei wäre der Einsatz pharmakologischer Kanalblocker oder die Herstellung reiner glutamaterger oder GABAerger Neuronenkulturen (bspw. durch die Methodik der Durchflusszytometrie) denkbar. Unumgänglich wird dabei der Einsatz elektrophysiologischer Analysen sein.

C3 Proteine reduzieren die Menge an EAAT3-mRNA in HT22 Zellen

Der Zelle stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die Aktivität eines Transporters der Plasmamembran zu regulieren. Eine dieser Möglichkeiten ist die Steigerung oder Reduktion der Proteinsynthese auf Ebene der Transkription oder Translation. Für Astrozyten konnte bereits eine gesteigerte Aufnahmekapazität für Glutamat unter dem enzymatisch-aktiven C3bot gezeigt werden. Hier führte C3bot zu einer NF κ B-vermittelten Expressionssteigerung von GLT-1/EAAT2, was durch die gentechnische Inaktivierung von RhoA betätigt werden konnte [39].

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Western Blot und immunocytochemischen Analysen die Menge an EAAT3 in HT22 Zellen und primären Neuronen nach Behandlung mit C3 Proteinen untersucht. In den primären Neuronen gab es keinen Hinweis auf eine Änderung im Expressionsstatus des Transporters. Die HT22 Zelllinie erwies sich in diesem Punkt als schwierig zu untersuchen, da die ohnehin niedrige Expression von EAAT3 während der Passagierung Schwankungen unterlag. Aus diesem Grund wurde sich der Methodik der quantitativen PCR bedient, wobei eine signifikant reduzierte Menge an EAAT3 mRNA in HT22 Zellen nach Inkubation mit C3 Proteinen nachgewiesen werden konnte. In Hippocampusneuronen waren die Effekte insgesamt geringer und nicht einheitlich ausgeprägt.

Von Elsner et al. zeigen in ihrer Arbeit, dass RhoA an der Regulation wichtiger Transkriptionsfaktoren beteiligt ist [55]. Zusammen mit der Studie von Höltje et al., in welcher eine NF κ B-vermittelte Expressionssteigerung von GLT-1 in Astrozyten unter C3bot nachgewiesen werden konnte [39], erscheinen zukünftige Studien, in welchen

der Einfluss von RhoA auf EAAT3 regulierende Transkriptionsfaktoren untersucht wird, zum weiteren Verständnis einer möglichen Interaktion zwischen RhoA und EAAT3 wichtig.

Der Einfluss von C3bot und C3bot 26mer auf Morphologie und Aktivitätsstatus von RhoA in HT22 Zellen und Hippocampusneuronen

In HT22 Zellen führte lediglich enzymkompetentes C3bot zu einem verstärkten Fortsatzwachstum. In primären Neuronen erhöhte sich sowohl unter C3bot als auch unter enzymatisch-inaktiven C3bot 26mer die Zahl axonaler und dendritischer Fortsätze. Diese morphologischen Effekte korrelieren mit den Ergebnissen aus bereits weiter oben beschriebenen Pull-Down Analysen in welchen C3bot in beiden Kultursystemen, C3bot 26mer hingegen nur in Neuronen zu einer Hemmung der Aktivität von RhoA führte. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Beobachtungen von Höltje et al.: Wie in HT22 Zellen induzierte C3bot, aber nicht das enzymatisch-inaktive C3bot 26mer, eine morphologische Veränderung in Astrozyten [39]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Aktivitätszustand von RhoA für den C3 Protein-vermittelten Effekt auf das Cytoskelett entscheidend ist. Nur wenn die Aktivität von RhoA reduziert ist (in HT22 Zellen führt C3bot 26mer lediglich zu einer Konformationsänderung und die Aktivität von RhoA bleibt unbeeinflusst), können die Zellen Fortsätze auswachsen lassen. RhoA vermittelt über Aktivierung der ROCK die Aktivierung der LIM-Kinase. Die LIM-Kinase wiederum inaktiviert durch Phosphorylierung Cofilin. Im aktiven Zustand führt Cofilin zu einer Depolymerisation von Aktin-Filamenten. Fehlt der Einfluss von Cofilin kann der Wachstumskegel sprießender Axonfortsätze nicht aufrecht erhalten werden und fällt zusammen. Das Axon wächst nicht weiter [56].

Die komplexe Morphologie von Nervenzellen beruht nicht allein auf dem Aktin-Cytoskelett. Neuronen-spezifische Intermediärfilamente werden in drei Untereinheiten exprimiert, die sich als Heteropolymere zusammenlagern. Sie sind essentiell für das axonale Wachstum im ZNS und PNS. Die Regulation erfolgt über Steigerung oder Reduktion der Transkription sowie den Grad der Phosphorylierung einzelner Untereinheiten. Die Phosphorylierung korreliert dabei mit der axonalen Stabilität und Plastizität [57].

In Zusammenschau der Ergebnisse wäre es interessant, die morphologischen Analysen mit Fokus auf mögliche (De-) Phosphorylierungsprozesse zu wiederholen. Wie oben diskutiert, erscheint eine Interaktion zwischen C3 Proteinen und Kinasen bzw. Phosphatasen sehr wahrscheinlich.

FAZIT

In dieser Arbeit fand sich ein veränderter Phosphorylierungsstatus von EAAT3 unter C3 Proteinen, was in primären Neuronenkulturen mit einer gesteigerten Glutamat-Aufnahme einherging. Diese für C3 Proteine neue Beobachtung muss in Folgearbeiten detaillierter untersucht werden. Zum einen sollte verstanden werden, welche Proteine neben RhoA an dieser posttranslationalen Modifizierung von EAAT3 beteiligt sind. Der Nachweis einer Beteiligung von RhoA an der Phosphorylierung von EAAT3 wäre die erste Beschreibung einer derartigen Interaktion. Zum anderen muss die Steigerung der neuronalen Glutamat-Aufnahme in den Kontext zur neuroregenerativen Eigenschaft von C3 Proteinen gesetzt werden, da die glutamaterge Excitotoxizität wesentlich zum Neuronenverlust in zentralnervösen Läsionsarealen beiträgt. Folgestudien zur Klärung der Frage, ob durch die Anwendung von C3 Proteinen ein Neuronenverlust durch Übererregung umgangen werden kann, sind also unbedingt notwendig.

Hinweise die dafür sprechen finden sich bspw. in den Arbeiten von Boato et al. und Li et al.: Boato et al. beobachteten, dass Mäuse, die nach experimenteller Rückenmarksläsion C3 Proteine erhielten, besser ihre motorischen Fähigkeiten wiedererlangten als die dazugehörigen Kontrollgruppen. Dieser eindruckliche Effekt ging mit einer Reduktion des Läsionsareals im Rückenmark einher [7]. Eine Optimierung des neuronalen und astrozytären Glutamat-Stoffwechsels unter C3 Proteinen könnte hierzu beigetragen haben. Li et al. beobachteten nach experimenteller Schlaganfallinduktion in Mäusen ein größeres Läsionsareal in EAAT3 Knock-Out Tieren. D.h., dass durch die Steigerung der Aktivität von EAAT3 zentralnervöse Läsionszonen ebenfalls positiv beeinflusst werden könnten [31].

Die hier vorgelegte Arbeit liefert einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Wirkungsweise von C3 Proteinen und zeigt einmal mehr, dass man C3 Proteine als potenziellen pharmakologischen Behandlungsansatz zentralnervöser Krankheitsprozesse ansehen und dahingehend weiter studieren muss.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Wilde C, Aktories K. The Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum* and related C3-like transferases. *Toxicon*. 2001 Nov;39(11):1647–60.
2. Aktories K, Weller U, Chhatwal GS. *Clostridium botulinum* type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Lett*. 1987;212(1):109–13.
3. Aktories K, Hall A. Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: a new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins. *Trends Pharmacol Sci*. 1989 Oct;10(10):415–8.
4. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002 Dec 12;420(6916):629–35.
5. Ahnert-Hilger G, Höltje M, Grosse G, Pickert G, Mucke C, Nixdorf-Bergweiler B, Boquet P, Hofmann F, Just I. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem*. 2004 Jul;90(1):9–18.
6. Höltje M, Djalali S, Hofmann F, Münster-Wandowski A, Hendrix S, Boato F, Dreger SC, Grosse G, Henneberger C, Grantyn R, Just I, Ahnert-Hilger G. A 29-amino acid fragment of *Clostridium botulinum* C3 protein enhances neuronal outgrowth, connectivity, and reinnervation. *FASEB J*. 2009 Apr 1;23(4):1115–26.
7. Boato F, Hendrix S, Huelsenbeck SC, Hofmann F, Grosse G, Djalali S, Klimaschewski L, Auer M, Just I, Ahnert-Hilger G, Höltje M. C3 peptide enhances recovery from spinal cord injury by improved regenerative growth of descending fiber tracts. *J Cell Sci*. 2010 May 15;123(Pt 10):1652–62.
8. Loske P, Boato F, Hendrix S, Piepgras J, Just I, Ahnert-Hilger G, Höltje M. Minimal essential length of *Clostridium botulinum* C3 peptides to enhance neuronal regenerative growth and connectivity in a non-enzymatic mode. *J Neurochem*. 2012 Mar;120(6):1084–96.
9. Bertrand J, Winton MJ, Rodriguez-Hernandez N, Campenot RB, Mckerracher L. Application of Rho Antagonist to Neuronal Cell Bodies Promotes Neurite Growth in Compartmented Cultures and Regeneration of Retinal Ganglion Cell Axons in the Optic Nerve of Adult Rats. *J Neurosci*. 2005;25(5):1113–21.
10. Bertrand J, Di Polo A, Mckerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol Dis*. 2007;25(1):65–72.

11. Rohrbeck A, Schröder A, Hagemann S, Pich A, Höltje M, Ahnert-Hilger G, Just I. Vimentin mediates uptake of C3 exoenzyme. *PLoS One*. 2014;9(6):1–17.
12. Rohrbeck A, Von Elsner L, Hagemann S, Just I. Uptake of *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme into intact HT22 and J774A.1 cells. *Toxins (Basel)*. 2015;7(2):380–95.
13. Adolf A, Leondaritis G, Rohrbeck A, Eickholt BJ, Just I, Ahnert-Hilger G, Höltje M. The intermediate filament protein vimentin is essential for axonotrophic effects of *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J Neurochem*. 2016 Oct;139(2):234–44.
14. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci*. 1990;11(11):462–8.
15. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure , expression , and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate / aspartate transporter from rat brain. 1992;89(22):10955–9.
16. Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 1992 Dec 3;360(6403):464–7.
17. Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 1992;360(6403):467–71.
18. Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*. 1995 Jun 15;375(6532):599–603.
19. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):4155–60.
20. Kanai Y, Hediger M a. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):469–79.
21. Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci*. 1997;17(21):8363–75.
22. Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci*. 1998;18(21):8751–7.
23. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto

- M, Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 1997;276(5319):1699–702.
24. Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci*. 1998 Mar;10(3):976–88.
 25. Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet V V, Grutle NJ, Mylonakou MN, Plachez C, Zhou Y, Furness DN, Bergles DE, Lehre KP, Danbolt NC. The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. 2012;32(17):6000–13.
 26. Ghijsen WE, da Silva Aresta Belo AI, Zuiderwijk M, Lopez da Silva FH. Compensatory change in EAAC1 glutamate transporter in rat hippocampus CA1 region during kindling epileptogenesis. *Neurosci Lett*. 1999 Dec 10;276(3):157–60.
 27. Miller HP, Levey a I, Rothstein JD, Tzingounis a V, Conn PJ. Alterations in glutamate transporter protein levels in kindling-induced epilepsy. *J Neurochem*. 1997 Apr;68(4):1564–70.
 28. Mathern GW, Mendoza D, Lozada A, Pretorius JK, Dehnes Y, Danbolt NC, Nelson N, Leite JP, Chimelli L, Born DE, Sakamoto a C, Assirati J a, Fried I, Peacock WJ, Ojemann G a, Adelson PD. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 1999 Feb;52(3):453–72.
 29. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo C a., Bristol L a., Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger M a., Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 1996 Mar;16(3):675–86.
 30. Peghini P, Janzen J, Stoffel W. Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J*. 1997;16(13):3822–32.
 31. Li L, Zuo Z. Glutamate transporter type 3 knockout reduces brain tolerance to focal brain ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(5):1283–92.
 32. Scimemi A, Tian H, Diamond JS. Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA receptor activation, and synaptic plasticity in the hippocampus. *J Neurosci*. 2009 Nov 18;29(46):14581–95.

33. Tsai M-C, Tanaka K, Overstreet-Wadiche L, Wadiche JI. Neuronal Glutamate Transporters Regulate Glial Excitatory Transmission. *J Neurosci.* 2012;32(5):1528–35.
34. Dowd L a, Robinson MB. Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na⁺-dependent L-glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *J Neurochem.* 1996;67(2):508–16.
35. Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci.* 1998 Apr 1;18(7):2475–85.
36. González MI, Kazanietz MG, Robinson MB. Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Mol Pharmacol.* 2002 Oct;62(4):901–10.
37. Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cárdenas A, Fernández-Tomé P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor- α pathway. *J Neurosci.* 2004 Feb 11;24(6):1350–7.
38. Pradillo JM, Hurtado O, Romera C, Cárdenas A, Fernández-Tomé P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro M a., Lizasoain I. TNFR1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience.* 2006;138(4):1171–8.
39. Höltje M, Hofmann F, Lux R, Veh RW, Just I, Ahnert-Hilger G. Glutamate uptake and release by astrocytes are enhanced by Clostridium botulinum C3 protein. *J Biol Chem.* 2008 Apr 4;283(14):9289–99.
40. Davis JB, Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 1994;652(1):169–73.
41. Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, Mushinski JF. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem.* 1995 Apr 28;270(17):9991–10001.
42. Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):140–6.
43. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):225–36.
44. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001;65(1):1–105.

45. Sheldon AL, González MI, Robinson MB. A carboxyl-terminal determinant of the neuronal glutamate transporter, EAAC1, is required for platelet-derived growth factor-dependent trafficking. *J Biol Chem*. 2006 Feb 24;281(8):4876–86.
46. Do S-H, Kamatchi GL, Washington JM, Zuo Z. Effects of volatile anesthetics on glutamate transporter, excitatory amino acid transporter type 3: the role of protein kinase C. *Anesthesiology*. 2002 Jun;96(6):1492–7.
47. Huang Y, Feng X, Sando JJ, Zuo Z. Critical role of serine 465 in isoflurane-induced increase of cell-surface redistribution and activity of glutamate transporter type 3. *J Biol Chem*. 2006 Dec 15;281(50):38133–8.
48. Schmalzing G, Richter HP, Hansen A, Schwarz W, Just I, Aktories K. Involvement of the GTP binding protein Rho in constitutive endocytosis in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol*. 1995 Sep;130(6):1319–32.
49. Nonaka H, Tanaka K, Hirano H, Fujiwara T, Kohno H, Umikawa M, Mino A, Takai Y. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1995 Dec 1;14(23):5931–8.
50. Chong LD, Traynor-Kaplan a, Bokoch GM, Schwartz M a. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell*. 1994;79(3):507–13.
51. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):245–8.
52. Schulz A, Baader SL, Niwa-Kawakita M, Jung MJ, Bauer R, Garcia C, Zoch A, Schacke S, Hagel C, Mautner V, Hanemann CO, Dun X, Parkinson DB, Weis J, Schröder JM, Gutmann DH, Giovannini M, Morrison H. Merlin isoform 2 in neurofibromatosis type 2-associated polyneuropathy. *Nat Neurosci*. 2013 Apr;16(4):426–33.
53. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*. 2000 May;57(5):976–83.
54. Trotti D, Peng JB, Dunlop J, Hediger M a. Inhibition of the glutamate transporter EAAC1 expressed in *Xenopus* oocytes by phorbol esters. *Brain Res*. 2001 Sep 28;914(1–2):196–203.

55. von Elsner L, Hagemann S, Just I, Rohrbeck A. C3 exoenzyme impairs cell proliferation and apoptosis by altering the activity of transcription factors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016 Sep;389(9):1021–31.
56. Fujita Y, Yamashita T. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Front Neurosci.* 2014;8(October):338.
57. Pant HC, Veeranna. Neurofilament phosphorylation. *Biochem Cell Biol.* 1995;73(9–10):575–92.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicichinonsäure
C3bot	C3 Toxin von Clostridium botulinum
C3bot 26mer	Enzymatisch inaktives Peptidfragment von C3bot bestehend aus 26 Aminosäuren
C3botE174A/Q	Punktmutiertes C3bot
C3lim	C3 Toxin von Clostridium limosum
C3stau	C3 Toxin von Staphylococcus aureus
CA 1-3	Cornu ammonis 1-3
CaCl ₂	Caliumchlorid
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
CP	Nucleus Caudatus und Putamen
CT	cycle treshold
CTX	Cortex
CuSO ₄	Kupfersulfat
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DHK	Dihydrokainat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EAAT 1-5	excitatory amino acid transporter 1-5
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potenziale
Fc-Region	fragment crystallizable region
FCS	fetales Kälberserum
GABA	α-Aminobuttersäure
GAP	GTPase activating protein

Abkürzung	Bedeutung
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guaninnucleotid exchanging factor
GLAST	glutamate aspartate transporter
GLT-1	glutamate transporter 1
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H/L	heavy / light chain
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hpf	Hippocampusformation
Hy	Hypothalamus
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogencarbonat
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP-Kinase	Mitochondrien-aktivierte Protein-Kinase
MgSO ₄	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Natriumhydrogencarbonat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NB-Medium	Neurobasalmedium
NF2 Gen	Neurofibromatose 2 Gen
NFP	Neurofilamentprotein
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p-Serin	phosphoryliertes Serin
p-Tyrosin	phosphoryliertes Tyrosin
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese

Abkürzung	Bedeutung
PBS	Phosphate buffered saline
PDC	L-trans-Pyrrolidin-2,4-dicarboxylsäure
PFA	Paraformaldehyd
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC α	Proteinkinase C α
PKC ϵ	Proteinkinase C ϵ
PM	Plasmamembran
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
q(RT)-PCR	quantitative (real-time) Polymerasekettenreaktion
RBD	Rho-Bindedomäne
RCF	relative centrifugal force
Rho A	Ras homologue A
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC1	Solute carrier family 1
Sp	Stratum pyramidale
TBOA	threo-beta-Benzylxyaspartat
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th	Thalamus
TNF	Tumornekrosefaktor
vGLUT1/2	vesikulärer Glutamat-Transporter 1/2
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Johannes Piepgras, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von *Clostridium botulinum* C3 Proteinen auf die neuronale Glutamat-Aufnahme“ 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

ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Ich, Johannes Piepgras, hatte folgenden Anteil an folgender Publikation:

Publikation:

Loske P., Boato F., Hendrix S., **Piepgras J.**, Just I., Ahnert-Hilger G. and Höltje M. *et al.* (2012) 'Minimal essential length of Clostridium botulinum C3 peptides to enhance neuronal regenerative growth and connectivity in a non-enzymatic mode.', *Journal of Neurochemistry*, 120(6), pp. 1084–96. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07657.x.

Beitrag im Einzelnen:

Aus meinen Versuchsreihen stammt die Bestätigung des Ergebnisses, dass synaptische Verbindungen nach Behandlung hippocampaler Dissoziationskulturen mit C3bot 26mer zunehmen. Die Western Blot Analysen in Abbildung 2 d mit Nachweis von gesteigerten Signalintensitäten von Synaptophysin und MAP2 unter C3bot 26mer im Vergleich zu unbehandelten Zellen stammt von mir.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

CURRICULUM VITAE

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

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen als Erst- bzw. Letztautor

Piepgras J.*, Höltje M.*, Michel K., Li Q., Otto C., Drenckhahn C., Probst C., Schemann M., Jarius S., Stöcker W., Balint B., Meinck H.-M., Buchert R., Dalmau J., Ahnert-Hilger G. and Ruprecht K. (2014) 'Anti-DPPX encephalitis : pathogenic effects of antibodies on gut and brain neurons', *Neurology* 2015 Sep 8;85(10):890-7 doi: 10.1212/WNL.0000000000001907 (*equal contribution).

Piepgras J.*, Höltje M.*, Otto C., Harms H., Satapathy A., Cesca F., Benfenati F., Gitler D., Pich A., Zander J.-F., Ahnert-Hilger G.° and Ruprecht K.° (2015) 'Intrathecal immunoglobulin A and G antibodies to synapsin in a patient with limbic encephalitis.', *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 2(6), p. e169. doi: 10.1212/NXI.0000000000000169 (*°equal contribution).

Höltje M.*, Mertens R.*, Schou M. B., Saether S. G., Kochova E., Jarius S., Prüss H., Komorowski L., Probst C., Paul F., Bellmann-Strobl J., Gitler D., Benfenati F., **Piepgras J.°**, Ahnert-Hilger G.° and Ruprecht K.° (2017) 'Synapsin-antibodies in psychiatric and neurological disorders : Prevalence and clinical findings', *Brain, Behavior, and Immunity*. doi: 10.1016/j.bbi.2017.07.011 (*°equal contribution).

Publikation als Koautor

Mertens R., Melchert S., Gitler D., Schou M.B., Saether S.G., Vaaler A., **Piepgras J.**, Kochova E., Benfenati F., Ahnert-Hilger G., Ruprecht K., Höltje M. (2018) 'Epitope specificity of anti-synapsin autoantibodies: Differential targeting of synapsin I domains' *PLoS One* [Internet]. 2018;13(12):e0208636. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30543686>

Loske P., Boato F., Hendrix S., **Piepgras J.**, Just I., Ahnert-Hilger G. and Höltje M. (2012) 'Minimal essential length of Clostridium botulinum C3 peptides to enhance neuronal regenerative growth and connectivity in a non-enzymatic mode.', *Journal of Neurochemistry*, 120(6), pp. 1084–96. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07657.x.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn PD Dr. Markus Höltje für die exzellente Betreuung dieser wissenschaftlichen Arbeit und die vielen heiteren gemeinsamen Stunden an der Laborbank, am Mikroskop und am Computer zur Auswertung. Ich bedanke mich sehr für die Laborkenntnisse, die ich mir durch unsere Zusammenarbeit aneignen konnte.

Frau Prof. Dr. Ahnert-Hilger danke ich dafür, dass Sie immer ein offenes Ohr bei Fragen zu experimentellen Ansätzen hatte und dabei ihren breiten Erfahrungsschatz mit mir geteilt hat. Herrn Prof. Dr. Imre Vida danke ich für sein Interesse und konstruktives Feedback an meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Meinen Arbeitskollegen danke ich für die Unterstützung durch Rat und Tat. Besonderen Dank gilt hierbei Herrn Dr. Jens Baron, der mir als Neuling im Labor mit viel Geduld die ersten Schritte im Laboralltag gezeigt hat und Herrn Sascha Seibert, der mir durch fruchtbare Diskussionen zur Seite stand. Frau Dr. Agnieszka Münster-Wandowski danke ich für den Intensivkurs am Elektronenmikroskop und Herrn Dr. Paul Turko für die wertvollen Tipps bei der Zellkultur. Antje Dräger, Birgit Metze, Marion Möbes und Suzan Öztürk danke ich für die technische Assistenz. Sie haben mir das Fortführen meiner Experimente nach dem Freisemester sehr erleichtert.

Meinen Eltern Cynthia und Uwe Piepgras danke ich von ganzem Herzen. Durch ihre bedingungslose Unterstützung konnte ich mich während des Medizinstudiums voll und ganz auf meine Arbeit im Labor konzentrieren. Aus ihrem Stolz auf meine wissenschaftliche Arbeit konnte ich die nötige Ausdauer in holprigen Phasen des Experimentierens ziehen. Es erfüllt mich mit großer Trauer, dass mein Vater die Fertigstellung meiner Promotion nicht mehr miterleben kann.

Meiner Frau Marlene Piepgras danke ich mit Leib und Seele. Ich danke ihr für die Unterstützung in schwierigen Phasen sowie für das Zelebrieren von guten Momenten in meiner wissenschaftlichen und ärztlichen Tätigkeit. Zusätzlich darf ich von ihr als Naturwissenschaftlerin lernen. Mein aktueller wissenschaftlicher Werdegang wäre ohne sie undenkbar.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Tochter Henrietta Lou Piepgras dafür, dass sie meine Monographie nur in den Papierkorb bewegt und nicht vollständig von meinem Computer gelöscht hat.