

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

DISSERTATION

Effekte von C3bot und C3bot-Peptiden auf synaptische  
Konnektivität und neuronale Regeneration

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Loske

Geboren in Neuruppin

Gutachter/in:     1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Markus Höltje  
                          2. Prof. Dr. med. Hans Bigalke  
                          3. Prof. Dr. med. Lars Klimaschewski

Datum der Promotion: 07. September 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Funktion und Entwicklung von Neuronen .....	1
1.2 Die Familie der Rho-GTPasen .....	2
1.3 Neuronale Entwicklung und RhoGTPasen .....	4
1.4 Die C3-ADP-Ribosyltransferasen .....	6
1.5 C3-Ribosyltransferasen als Werkzeuge zur Förderung neuronalen Wachstums .....	7
1.6 Entwicklung neurotropher Peptidabschnitte von C3bot .....	10
1.7 Fragestellung .....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Hippocampusdissoziationskulturen .....	13
2.2 Gelektrophorese der Dissoziationskulturen .....	16
2.3 Präparation des entorhinalen Kortex .....	18
2.4 Pulldown von aktivem RhoA an Rückenmarksfragmenten der Maus .....	20
2.5 Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge) .....	22
2.6 Puffer und Lösungen .....	24
2.7 Antikörper .....	29
2.8 Geräte und Material .....	30
2.9 Versuchstiere .....	31
2.10 Richtlinien .....	31
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
3.1 Synaptische Konnektivität hippocampaler Neurone .....	32
3.2 Proteinbiochemische Analyse des Expressionsniveaus synaptischer Proteine hippocampaler Neurone der Maus .....	48
3.3 Axonales Wachstum an organotypischen Hirnschnittkulturen .....	51
3.4 Wirkung von C3-Peptiden auf die RhoA-Aktivität nach Rückenmarksläsion.....	56
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>62</b>
4.1 Förderung der synaptischen Konnektivität durch C3bot und C3bot Peptide .....	62
4.1.1 Mögliche Rezeptorbindung und intrazellulärer Wirkmechanismus .....	62
4.1.2 Hemmung von RhoA trotz fehlender enzymatischer Aktivität .....	64
4.1.3 Erhöhte synaptische Konnektivität: ein sekundärer Effekt? .....	66
4.2 Axonotrophe Effekte von C3bot <sup>156-181</sup> in der organotypischen Hirnschnittkultur .....	69

4.2.1	Verwendung von organotypischen Kultursystemen zur Untersuchung neuronaler Regeneration .....	69
4.2.2	C3bot <sup>156-181</sup> als axonotropher Faktor .....	70
4.3	Effekte von C3bot Peptiden nach Rückenmarksschädigung .....	71
4.3.1	Verbessertes Regenerationsvermögen nach Rückenmarksschädigung	71
4.3.2	Perspektiven für den Einsatz von C3bot-Peptiden als regenerationsfördernde Substanzen im ZNS .....	73
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>Publikation.....</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>90</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>91</b>
<b>11.</b>	<b>Erklärung an Eides statt .....</b>	<b>92</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Funktion und Entwicklung von Neuronen

In dieser Arbeit werden funktionelle Parameter von Neuronen betrachtet, daher sollen zunächst ihre Eigenschaften und ihre Entwicklung kurz dargestellt werden.

Neurone stellen hochspezialisierte, stark polarisierte Zellen dar, die für die Weiterleitung und in höheren zentralnervösen Kern- und Rindengebieten für die Integration und Verarbeitung von elektrischen Erregungen zuständig sind.

Undifferenzierte Neurone besitzen einen abgerundeten Zelleib ohne Fortsätze. Sie entwickeln sich – wie später noch ausgeführt wird – in wenigen Tagen zu Zellen mit komplexen Verzweigungen weiter. Die Ausbildung der neuronalen Verschaltung geschieht zum einen durch die Wanderung des Neurons zur vorbestimmten Lokalisation. Zum anderen durch die genau regulierte Wegfindung des Axons. Das Axon bildet den Kontakt zu anderen Neuronen über chemische Synapsen aus, an denen Neurotransmitter ausgeschüttet werden. Es gibt verschiedene Formen von Synapsen. An ihnen treffen die prä- und postsynaptischen Membranen aufeinander. Erstere gehört zumeist zum Axon, letztere in der Regel zum Dendriten des empfangenden Neurons. Beide Membranen sind durch den 20-30 nm breiten Spalt getrennt, indem sich extrazelluläre Matrix befindet, die auch für das Haften und Verbleiben der Verbindung an dieser Lokalisation sorgt. Auf beiden Seiten befinden sich in der Plasmamembran spezifische Ionenkanäle und Rezeptoren. Die präsynaptischen Terminalien enthalten Transmitter-gefüllte Vesikel. Die Beladung der Vesikel mit den verschiedenen Neurotransmittern erfolgt durch spezifische Transportproteine unter Nutzung eines  $H^+$ -Ionen-Gradienten. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem die vesikulären Glutamat- und GABA-Transporter – VGLUTs und VGAT, auf die später noch einmal eingegangen wird.

Die Neurone sind in eine Umgebung aus glialem Gewebe eingebettet, das von Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia gebildet wird. Diese beteiligen sich an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke, der Versorgung der Neurone mit Nährstoffen und der Homöostase von Neurotransmittern. Des Weiteren sorgen sie für die Entfernung toxischer Substanzen und Abwehr von Krankheitserregern sowie die Bildung von Markscheiden zum Zweck der beschleunigten Fortleitung. Ihr Vorkommen ist ebenfalls Voraussetzung für eine regelrechte Funktionsweise des Nervensystems.

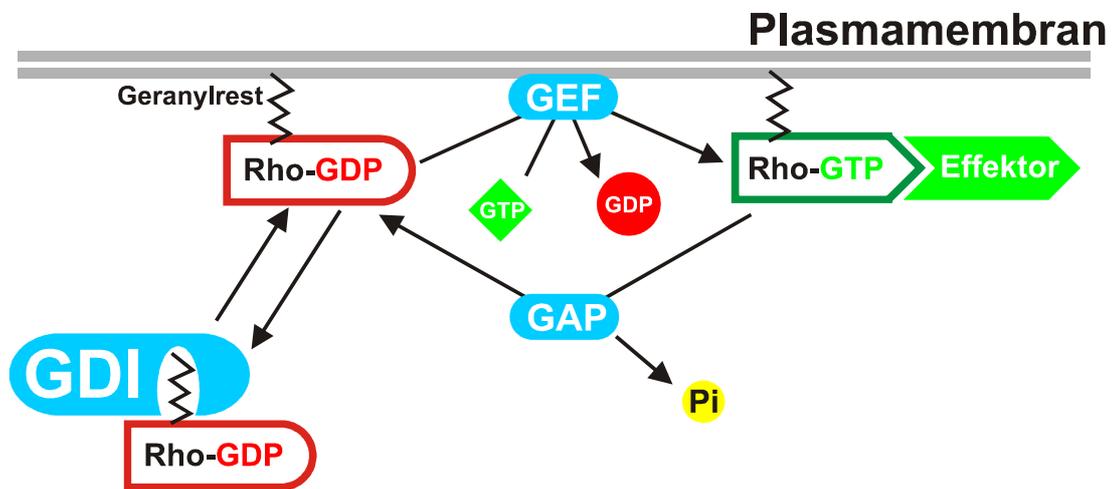
Grundlegend für die Beschreibung von Effekten an neuronalen Strukturen ist der Zusammenhang von Morphologie und Funktion, daher wurden morphologische Parameter in dieser Arbeit als Marker für Funktionalität verwendet. Das zum Teil über große Distanzen auswachsende Axon und die sich dabei bildenden Synapsen sind die strukturelle Basis für die neuronale Interaktion. Über ihre Quantifizierung können Aussagen über die Wirksamkeit möglicher neurotroph wirksamer Substanzen gemacht werden.

## 1.2 Die Familie der Rho-GTPasen

Als wichtige Schaltstellen in der Differenzierung unter anderem von Nervenzellen gelten RhoGTPasen (rho – ras homolog). Sie sind Mitglieder der Ras-Superfamilie 20-30 kDa schwerer GTP-bindender Proteine. Die bisher bekannten Vertreter sind die RhoA-verwandte Subfamilie (RhoA, RhoB und RhoC); die Rac1-verwandte Subfamilie (Rac1a und seine Spleißvariante Rac1b, Rac2, Rac3 und RhoG); die Cdc42-verwandte Subfamilie (Cdc42 und seine Gehirn-spezifische C-terminale Spleißvariante G25K, TC10, TCL, Chp/Wrch-2 und Wrch-1); die Rnd Subfamilie (Rnd1, Rnd2, und RhoE/Rnd3); die RhoBTB Subfamilie und die Miro Subfamilie (Wennerberg et al., 2004).

Sie dienen der Verarbeitung und Weiterleitung extrazellulärer, Rezeptor-vermittelter Signale zu intrazellulären Signalwegen. Durch posttranslationale Prenylierung mit einem Geranylrest am Carboxyterminus haben sie die Fähigkeit, mit Membranen zu interagieren (Ridley, 2001). Aktivierung der Rho-GTPasen wird über die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP), ihre Inaktivierung über den Austausch von GTP gegen Guanosindiphosphat (GDP) erreicht (Wennerberg et al., 2004). Der aktive und inaktive Zustand wird im Wesentlichen durch drei Proteingruppen reguliert: 1. Guanosin-Austauschfaktoren (GEFs), welche den Austausch von GDP gegen GTP bewirken, und so die Interaktion von aktivem Rho mit weiteren zellulären Effektoren fördern, 2. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), welche die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren und somit zu Inaktivität führen, und 3. Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs), welche mit einer hydrophoben Tasche in einer Domäne den vorgenannten Geranylrest isolieren und einen löslichen Komplex mit inaktivem Rho im Zytosol bilden. Hierdurch wird der Austausch von GDP gegen GTP

erschwert. Die intrinsische GTPase-Aktivität erlaubt eine zeitlich und räumlich genaue Regulation der Aktivität (Bishop et al., 2000, Nikolic, 2002) (Abb. 1).



### Abbildung 1

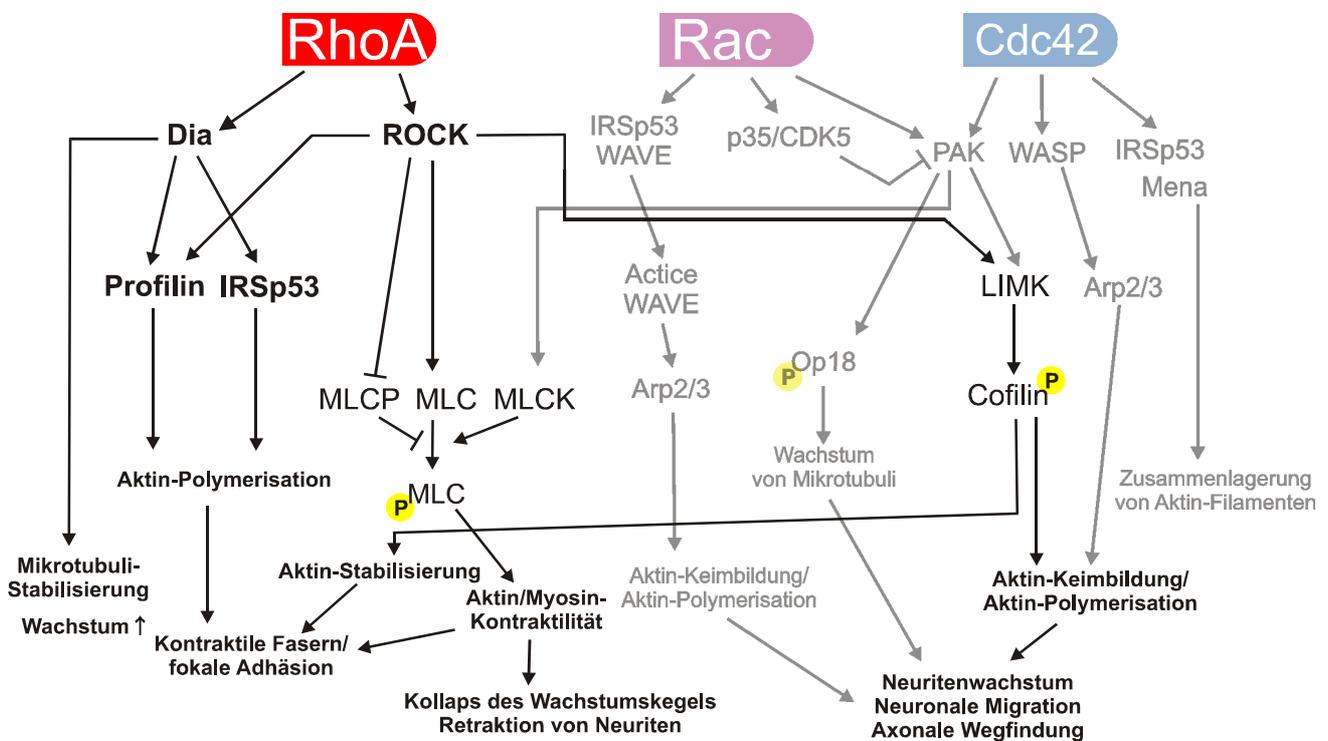
#### Regulierung der Aktivität von Rho-Proteinen

Die Aktivität der RhoGTPasen wird durch den Austausch von GDP gegen GTP hergestellt. Dieser Austausch wird von vielen Vertretern von GEFs, GAPs und GDIs reguliert bzw. verhindert. Details siehe Text. (nach Etienne-Manneville und Hall, 2002)

Die Aktivität von Rho-Proteinen hat starken Einfluss auf die zelluläre Morphologie in vielen Geweben – von der relativ einfachen Polarität epithelialer Zellen zu den komplexen Verzweigungen von Neuronen. Diesen Einfluss üben sie aus durch ihre Wirkung auf Zell-Zell-Kontaktbildung und ihre dadurch in Epithelien bewirkte Aufteilung der Membran in apikal und basolateral, was auch die Verteilung der Lipide und Proteine auf diese Bereiche einschließt. Unter der Kontrolle der Rho-Proteine stehen die Migration von Abwehrzellen aus den Blutgefäßen sowie die Kontraktion von Gefäßen durch Regulation des kontraktiven Aktin-Myosin-Systems. Weiterhin wird das Aktin-Zytoskelett für Morphologie und interne Struktur von Zellen und ihre Fortbewegung durch Filo- und Lamellipodienausbildung und Anheftung an extrazelluläre Matrix sowie Ausstülpungen der Plasmamembran bei der Phagozytose reguliert. Auch die Ausbildung von Mikrotubuli für die Polarität von Zellen, die Regulation des Zellzyklus und die Steuerung des kontraktiven Rings bei der Zellteilung werden durch sie gesteuert (Narumiya und Yasuda, 2006).

### 1.3 Neuronale Entwicklung und RhoGTPasen

RhoGTPasen sind wichtige Effektoren bei der Entstehung neuronaler Netzwerke. Rac1, Cdc42 und RhoA sind entscheidend in diese Prozesse involviert. Knock-out-Experimente zeigen, dass allein die Abwesenheit einer dieser drei GTPasen zum Tod von Mäusembryonen führt (Heasman und Ridley, 2008). In Abbildung 2 werden die Signalwege der Rho-GTPasen mit besonderem Fokus auf RhoA dargestellt.



**Abbildung 2**

*Effekte von RhoGTPasen in Neuronen*

RhoA sowie Rac und Cdc42 sind über viele Effektoren an der neuronalen Entwicklung beteiligt. Details siehe Text. (nach Govek et al., 2005, modifiziert nach Nikolic, 2002, Hall und Bishop, 2000 und Burridge und Wennerberg, 2004)

Die Induktion der Zellfortsätze der Neurone geschieht über die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Stabilisierung erster Fortsatzknospen durch die Mikrotubuli. Dies wird im Wesentlichen positiv reguliert durch Rac und Cdc42, wohingegen RhoA negativ auf das Wachstum wirkt. Die Regulation der Aktivität der genannten

GTPasen erfolgt beispielsweise über externe Reize wie Wachstumsfaktoren und die Stimulation des Austauschs von GDP gegen GTP über GEFs.

Von den bestehenden unreifen Neuriten entwickelt sich innerhalb einiger Tage ein einzelner zum Axon, die anderen wachsen weniger stark und werden zu Dendriten. An den Dendriten werden Dornfortsätze (spines) gebildet, die u. a. morphologische Grundlage für Synapsen und die elektrische Aktivität der Neurone sind.

Die Polarisierung des neuronalen Zellkörpers wird über zeitlich und räumlich genaue Steuerung der Aktivierung von RhoGTPasen durch die GEFs und GAPs ermöglicht. Dabei ist eine lokale Destabilisierung des Aktin-Skeletts bzw. dessen Instabilität und das Einwachsen von Mikrotubuli am stärksten nachweisbar in dem das Axon bildenden Neuriten (Watabe-Uchida et al., 2006). Ein schneller Wechsel des Aktivitätszustandes der GTPasen scheint dabei die Wirkung zu erzielen. Sie sind in Axonen und Dendriten unterschiedlich lokalisiert bzw. exprimiert und regulieren die Bewegung des Wachstumskegels durch Wirkung auf die Ausbildung und Stabilität von Filo- und Lamellipodien, die die Grundlage für Axonverzweigung- und längenwachstum sind.

Ein Signalweg von RhoA führt über die Inaktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) zum Ausbleiben der Aktivierung der leichten Kette (MLC), was die Kontraktilität des Aktin/Myosin-Skeletts einschränkt. Über die Rho-Kinase (ROCK) wird die MLC phosphoryliert und die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), die diesen Effekt antagonisiert, inaktiviert, was schließlich zu stärkerer Kontraktilität führt und die Retraktion von neuronalen Fortsätzen bewirkt. Hemmung von ROCK-Signalwegen durch den ROCK-Inhibitor Y27632 oder genetischen knock-out von ROCK verbessert die neuronale Regeneration nach Schädigung (Dergham et al., 2002, Duffy et al., 2009).

Über LIMK (Lin-11, Isl-1 und Mec-3 Domäne enthaltenden Kinase) und Cofilin kann ROCK die Polymerisation von Aktin-Monomeren fördern (Nikolic, 2002). ROCK interagiert außerdem mit den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli, was die bestehende Morphologie des Neurons unterstützt bzw. irreguläres Fortsatzwachstum verhindert, und damit die bis zu diesem Zeitpunkt erreichte Polarität erhält.

RhoA interagiert weiterhin mit Dia (Diaphanous-verwandte Formine) unter anderem über IRSp53 (Insulin-Rezeptor-Substrat von 53 kDa), das bei der Organisation des Aktin-Skeletts mitwirkt (Govek et al., 2005). Nachgeschaltet wirkt außerdem Profilin, welches an der gerichteten Polymerisation von Aktin-Monomeren beteiligt ist

(Birbach, 2008). Es wird auch durch ROCK reguliert, wodurch die Bildung zusätzlicher Wachstumsknospen behindert und die Stabilisierung bisheriger Neuriten unterstützt wird (Da Silva et al., 2003).

Die drei genannten RhoGTPasen sind außerdem entscheidend bei der axonalen Wegfindung, da z. B. überschießendes Wachstum verhindert werden muss. Rac und Cdc42 sind wichtige Regulatoren für die Anhaftung am umgebenden Gewebe und die räumliche Orientierung des Axons. Auch im Fall der Dendriten ist gegenseitige Regulation der GTPasen die Grundlage für das Auswachsmuster und die Bildung von Dornfortsätzen. Die Effekte der Aktivität von Rho-Proteinen sind während der neuronalen Entwicklung unterschiedlich bezüglich Axon- und Dendritenwachstum.

Die Aktivität der GTPasen ist aber nicht nur bei den physiologischen Prozessen wie Entwicklung und Plastizität des Nervensystems wichtig. Kommt es zur Schädigung des Nervensystems, regulieren sie ebenfalls die Mechanismen für den Schutz und die Regeneration des ZNS. Dabei unterliegen sie den Einflüssen verschiedener bei Verletzungen oder Infektionen freigesetzter oder –gelegter Mediatoren.

## 1.4 Die C3-ADP-Ribosyltransferasen

Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass Überstände bestimmter Stämme von *Clostridium botulinum* ADP-ribosylierende Aktivität besitzen. Diese Aktivität war auf ein anderes Substrat gerichtet als für das bisher bekannte C2-Protein aus *C. botulinum*, welches Aktin ADP-ribosyliert (Aktories, 1987). Das neu identifizierte Exoenzym mit einem Molekulargewicht von 24 kDa erhielt zur Unterscheidung den Namen C3 (auch C3bot). Es besteht aus 211 Aminosäuren (Popoff et al., 1991). C1 bezeichnet ein Neurotoxin, welches Syntaxin und SNAP 25 schneidet (Williamson et al., 1996). C3 wies die stärkste Aktivität in der ADP-Ribosylierung membrangebundener Proteine auf, welche zum damaligen Zeitpunkt noch unspezifisch als 21-24 kDa-Proteine bezeichnet wurden. Ihnen wurde eine Bindung von GTP zugeschrieben. Außerdem zeigten sie eine verminderte Ribosylierung durch C3 in Anwesenheit höherer Konzentrationen von GTP (Aktories und Frevert, 1987).

In den folgenden Jahren konnten die molekularen Ziele von C3 als Teile der Familie kleiner G-Proteine identifiziert und die genauen Mechanismen der Inaktivierung der

Rho-Proteine durch die C3-ADP-Ribosylierung aufgeklärt werden (Aktories et al., 1992).

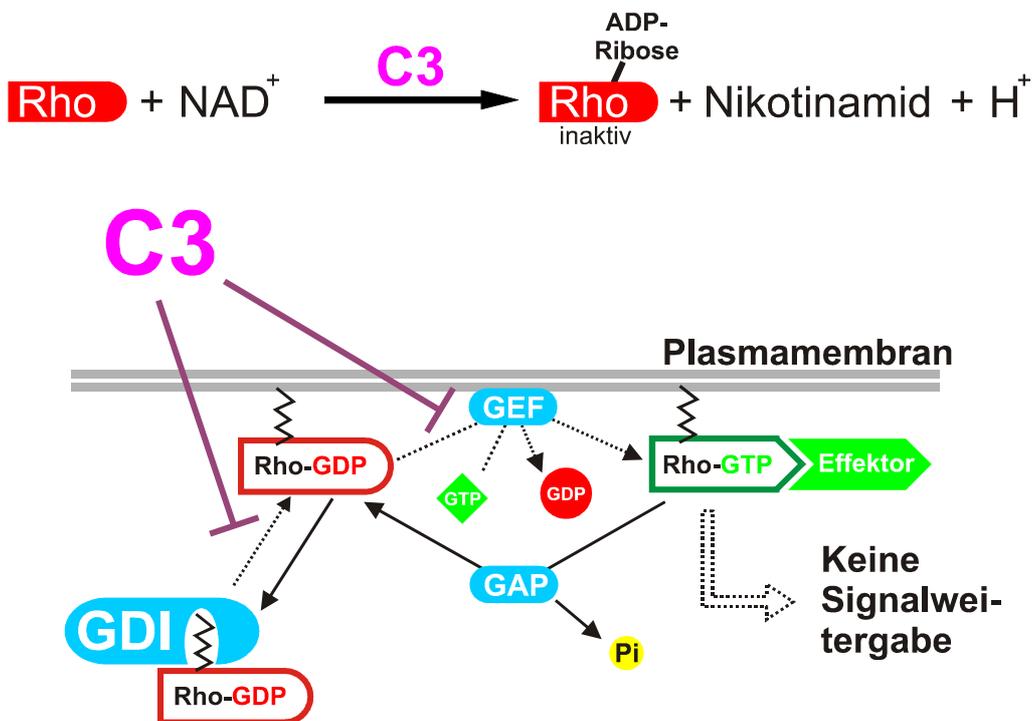
Der Nutzen der Produktion von Toxinen und Exoenzymen für die Bakterien liegt vorrangig in der Überwindung von Barrieren und Abwehrmechanismen des Organismus, in den die Invasion erfolgt ist. Für C3 sind die pathogenetischen Mechanismen in weiten Teilen noch unklar. Sein Einfluss auf Rho-Proteine scheint dabei eine Rolle zu spielen (siehe unten), was beispielsweise die leichtere Durchwanderung schützender Epithelien oder die Verhinderung der Migration von Abwehrzellen bewirken könnte. Hierbei gibt es Hinweise bezüglich einer Wirkung auf die tight-junctions der Zellen. In Kombination mit dem Neurotoxin C1 würde die Erleichterung der lokalen Invasion in das Darmepithel durch C3 den Zugang von C1 an die Nervenendigungen erleichtern und den Wirt durch die schlaffe Lähmung schneller töten. Dies wiederum schafft dem Bakterium eine anaerobe Umgebung, welche für das Überleben und die Vermehrung der *Clostridien* obligat ist.

Bis heute sind sieben C3-ähnliche ADP-Ribosyltransferasen entdeckt worden, deren Substrate RhoA, B und C sind. Ihr Vorkommen konnte unter anderem auch für *Staphylococcus aureus*, *Clostridium limosum* und *Bacillus cereus* beschrieben werden (Wilde und Aktories, 2001).

## **1.5 C3-Ribosyltransferasen als Werkzeuge zur Förderung neuronalen Wachstums**

Erste Hinweise auf die Wirksamkeit von C3bot an Neuronen ergaben Versuche mit einer Neuroblastom-Zell-Linie, bei der das C3-Exoenzym den negativen Einfluss von Lysophosphatidsäure auf Wachstumskegel und Neuritenwachstum verhindern konnte. C3bot förderte auch die Ausbildung von Neuriten (Jalink et al., 1994, Kozma et al., 1997). Neuronale Primärkulturen aus Hühnerembryonen zeigen ebenfalls ein besseres Auswachsen nach Behandlung mit C3bot (Jin und Strittmatter, 1997). Das Wiederauswachsen von Axonen retinaler Ganglionzellen nach Quetschung des Nervus opticus von Ratten wird durch C3bot begünstigt (Lehmann et al., 1999). Ebenso die Regeneration und das Überleben dieser Zellen nach Axotomie (Bertrand et al., 2007).

Eine weitere wichtige Methode der Analyse von C3bot-Effekten auf zentralnervöse Neurone ist das Rückenmarksläsionsmodell von Mäusen und Ratten. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von RhoA eine große Rolle für die negativen Folgen der Schädigung spielt (Lord-Fontaine et al., 2008, Dubreuil et al., 2003, Conrad et al., 2005). Als Grundlage der Wirkung der C3-Proteine konnte die Beeinflussung des Aktivitätsgrades von RhoGTPasen identifiziert werden. RhoA, B und C werden am Asparaginrest an Position 41 von C3bot unter Verwendung des Kofaktors  $\text{NAD}^+$  kovalent ADP-ribosyliert. Ihre funktionelle Inaktivität wird dabei durch zwei Schritte hergestellt: 1. Verhinderung des GEF-vermittelten Austauschs von Nukleotiden und 2. Stabilisierung des ADP-RhoA im Komplex mit den GDIs im Zytosol. Weitere RhoGTPasen wie Cdc42 oder Rac sind sehr schlechte Substrate für die ADP-Ribosylierung (Vogelsgesang et al., 2007, Abb. 3).



**Abbildung 3**

*ADP-Ribosylierung von Rho-Proteinen durch C3bot*

Die ADP-Ribosylierung von Rho-Proteinen verhindert die Bindung von GTP an Rho und die Lösung des inaktiven Rho aus dem Komplex mit GDI. Details siehe Text. (nach Etienne-Manneville und Hall, 2002)

In primären hippocampalen Neuronen von Mäuseembryonen wurden konstitutiv-aktive und dominant-negative RhoA-Varianten exprimiert sowie verschiedene C3-Proteine angewendet (Ahnert-Hilger et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass die aktive

Form von RhoA zu längeren und stärker verzweigten axonalen Fortsätzen führt und einen negativen Effekt auf die gleichen bei Dendriten erfassten Parameter hat, wobei diese Ergebnisse mit Blick auf die intrinsische neuronale RhoA-Aktivität anhand des Embryonaltages differenziert zu betrachten sind. Die dominant-negative Form zeigte eine gegenteilige Wirkweise. Dies lässt erkennen, dass in unterschiedlichen Stadien der neuronalen Entwicklung der Aktivitätszustand von RhoA ganz verschiedene morphologische Effekte an Neuronen hervorruft und nicht zwingend nur für die Retraktion von Neuriten verantwortlich ist.

Bei intrazellulärer Expression von C3bot war der Effekt auf die Axone infolge RhoA-Inaktivierung ähnlich. Bei extrazellulärer Applikation in nanomolarer Konzentration aber wurde das Wachstum der Axone deutlich gefördert, obwohl nachgewiesen werden konnte, dass auch bei dieser Anwendung der Großteil von RhoA ADP-ribosyliert wurde. Hier kann ergänzt werden, dass C3bot die Menge phosphorylierter MLC senkt (Govek et al., 2005). C3-Transferasen aus *S. aureus* oder *C. limosum* zeigten hierbei keine Wirkung auf Axone.

Bei der Analyse der axonalen Verzweigung von Neuronen konnte außerdem beobachtet werden, dass extrazellulär appliziertes C3bot eine zur intrazellulären Expression gegenteilige Wirkung zeigt, die den durch die ADP-Ribosylierung hervorgerufenen Effekt deutlich übersteigt. Der oben beschriebene axonotrophe Effekt wurde durch enzymatisch inaktive Varianten von C3bot in der gleichen geringen Konzentration erreicht. Bei diesen wurde die katalytische Aminosäure Glutamat an Position 174 ausgetauscht (C3botE174Q, C3botE174A). Der Ersatz von Glutamat durch andere Aminosäuren reduziert die Enzymaktivität erheblich (Aktories et al., 1995; Böhmer et al., 1996). Das Wachstum von Dendriten wurde nur durch enzymatisch aktives C3bot deutlich gefördert.

Betrachtet man die Art der Anwendung und die differenzierten Effekte von C3bot und Varianten davon, zeigt sich, dass es einen weiteren von der enzymatischen Aktivität unabhängigen Weg der Wirkung geben muss.

## 1.6 Entwicklung neurotropher Peptidabschnitte von C3bot

Die Vermutung, dass C3bot eine zusätzliche, Enzym-unabhängige Wirkweise besitzt, konnte durch Hinweise in Experimenten mit Ra1A, einem Mitglied der Ras-Superfamilie, gestützt werden. C3bot bildet dabei einen hochaffinen Komplex mit der GTPase, ohne ADP zu übertragen. Dies führt zu starker Beeinflussung der Wirkmechanismen der beiden Partner. Die ADP-Ribosylierung von C3bot an RhoA wird durch Ra1A-Bindung vermindert und Ra1A wiederum in seiner Aktivierung von Phospholipase D eingeschränkt (Wilde et al., 2002, Pautsch et al., 2005).

Da C3bot nur aus einer einzelnen Peptidkette besteht, in der bisher keine spezifischen Translokationsregionen oder Bindungsstellen ausgemacht werden konnten, die verantwortlich für den enzymatisch unabhängigen, neurotrophen Effekt sein könnten, wurde die Transferase zur Eingrenzung des wirksamen Bereichs in drei sich überlappende Peptide unterteilt. Diese wurden rekombinant mittels E. coli-Expressionssystemen hergestellt. Dabei wurden ein N-terminaler (Aminosäuren 1-98), ein Mittel- (Aminosäuren 62-124) und ein C-terminaler Teil (Aminosäuren 97-211) produziert, die auf ihre Wirkweise hinsichtlich axonalen Wachstums untersucht wurden. Nur der die enzymatische Aminosäure an Position 174 (Aktories et al., 1995) enthaltende Abschnitt (AS 97-211) zeigte dabei axonotrophe Effekte und wurde in der Folge weiter auf die Aminosäuren 154-211 und schließlich bis zu einer Länge von 29 Aminosäuren reduziert (C3bot<sup>154-182</sup>, Abb. 4).



### Abbildung 4

#### Peptidabschnitte aus C3bot

Die Abbildung zeigt die aus dem Gesamtprotein C3bot mit 211 Aminosäuren generierten Peptide, die in dieser Arbeit betrachtet werden. Alle drei Peptide enthalten die für die ADP-Ribosylierung von Rho-Proteinen notwendige katalytische Aminosäure, sind aber enzymatisch inaktiv.

Dieses Peptid zeigte deutlich positive Effekte auf axonale Verzweigung und Länge, synaptische Konnektivität und Regeneration von Fasertrakten nach Rückenmarksschädigungen. Eine verminderte Aktivität von RhoA, die nicht enzymatisch bedingt ist, konnte nachgewiesen werden (Boato et al., 2010).

Ein Fokus der vorliegenden Untersuchung ist die mögliche Verwendung von C3bot-Peptiden bei geschädigtem neuronalem Gewebe. Eine Verkürzung bzw. Eingrenzung der Aminosäuresequenz von C3bot auf das bisher genannte Peptid und darüber hinaus ist dabei von großem Interesse.

Die Applikation von Therapeutika mit hohem Molekulargewicht und vielen Epitopen hat die Aktivierung der adaptiven Abwehr mit der Bildung von Antikörpern zur Folge. Neurotoxine aus *C. botulinum* – vor allem A und B – werden seit vielen Jahren in der Therapie von Muskelspasmen, Hyperhidrosis oder auch Blasenfunktionsstörungen verwendet. Dabei gibt es immer wieder Fälle, in denen nach mehrfacher Anwendung der Toxine neutralisierende Antikörper auftreten, die zum Therapieversagen führen (Dressler und Bigalke, 2005, Schulte-Baukloh et al., 2008). Kurze Peptide von C3bot wären weniger immunogen und würden dieses Problem deutlich minimieren.

Des Weiteren ist die technische Herstellung wesentlich einfacher und kostengünstiger. Auch im Sinne der Erleichterung der klinischen Anwendung wären wirkungsvolle, kurze Peptide sinnvoll.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurden weiter verkürzte Varianten von C3bot mit 26 (C3bot<sup>156-181</sup>) und 15 Aminosäuren (C3bot<sup>163-177</sup>) erstellt, um die minimal wirksame Länge zu ermitteln sowie den wirksamen Abschnitt der Peptidkette einzugrenzen. Die katalytische Aminosäure Glutamat ist in diesen Peptiden weiterhin enthalten, sie sind aber enzymatisch inaktiv. Sie wurden in dieser Arbeit auf ihre Wirkung an verschiedenen Zell- und Gewebemodellen untersucht.

## 1.7 Fragestellung

Es konnte bisher gezeigt werden, dass die Aktivierung von RhoA starke Auswirkungen auf die Morphologie und das Wachstumsverhalten von Neuronen hat. Seine Inhibition durch ADP-Ribosylierung, aber auch die Beeinflussung über Enzym-unabhängige Signalwege durch C3bot können sich stark auf die Ausprägung von

Fortsätzen der Neurone auswirken. Beide genannten Mechanismen wurden in dieser Arbeit auf ihre Wirkung hinsichtlich funktioneller Aspekte von Neuronen untersucht, wobei die nicht enzymatisch vermittelte, neurotrophe Wirkung im Mittelpunkt des Interesses stand. Des Weiteren wurde die RhoA-Aktivität nach Rückenmarksschädigung der Maus und nach Behandlung mit C3bot-Peptiden untersucht. Für C3bot und die beschriebenen Peptide ergaben sich folgende Fragen:

1. Beeinflussen C3bot und die C3bot-Peptide C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>163-177</sup> die Anzahl synaptischer Kontakte an neuronalen Primärkulturen?
2. Kann zwischen Effekten auf exzitatorische und inhibitorische Synapsen unterschieden werden?
3. Wird die Anzahl synaptischer Kontakte durch die Hemmung bzw. Aktivierung von RhoA verändert?
4. Fördern C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>163-177</sup> das Wiederauswachsen von Axonen in organotypischer Hirnschnittkultur?
5. Fördern diese C3bot-Peptide die funktionelle Regeneration nach Rückenmarksschädigung und beeinflussen sie dabei die Aktivität von RhoA?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Hippocampusdissoziationskulturen

#### 2.1.1 Präparation der Hippocampusneurone und Zellkultur

Für die Präparation primärer Hippocampusneurone der Maus wurden Mausembryonen des 16. oder 17. Embryonalaltages (siehe Versuchstiere) verwendet. Die Präparation erfolgte unter der sterilen Werkbank mit autoklavierten Instrumenten und auf Eis.

Nach Eröffnung des Abdomens der Mutter wurden die Embryonen einzeln mittels Pinzette und Schere herausgetrennt und in einer Kulturschale in N-Medium aufgenommen, in der sie von der Eihaut befreit und dekapitiert wurden. Die Köpfchen wurden in eine weitere Kulturschale mit N-Medium überführt. Nach Entnahme des Gehirns wurde der Hippocampus präpariert.

Die Präparation beinhaltete die Abtrennung des Kleinhirns, die Trennung der Hemisphären und schließlich das Heraustrennen des Hippocampus aus der Hirnhemisphäre. Die Hippocampi wurden in NB-Medium gesammelt, dann in sterile 15ml-Röhrchen verbracht und nach Zugabe von 5 ml N-Medium für 3 Minuten bei 800 U/Min. zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde nach Absaugen des N-Mediums noch ein- bis zweimal wiederholt. Dann wurde das Medium mittels steriler Glaspipette abgesaugt und die Hippocampi in 3 ml ebenfalls durch eine Glaspipette dissoziiert. Wiederum kamen 2 ml N-Medium hinzu und anschließend erfolgte die Zentrifugation nach den gleichen Parametern. Nach Absaugen des Überstands wurden je nach Pelletgröße 200 µl bis 1 ml zugegeben und erneut resuspendiert. Hinzugefügt wurden ca. 5 ml Startermedium.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauer Zählkammer und entsprechend die Verdünnung der Zellsuspension auf die gewünschte Konzentration von  $8 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$ /ml (entspricht etwa 75.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) mit dem Startermedium. Die verdünnte Zellsuspension wurde in einem Volumen von 500 µl/well pipettiert.

Die 24er-well-Platten wurden am Vortag mit Glasdeckplättchen und 0,5 ml/well einer Poly-L-Lysin – Lösung versehen. Die 6er-well-Platten mit 1,5 ml/well beschichtet. Am Tag der Präparation wurde die Lösung abgesaugt und die Platten einmal mit PBS gewaschen sowie anschließend mit wiederum 0,5 ml oder 1,5 ml N-Medium plus

Kollagen beschichtet und für mindestens zwei Stunden im Brutschrank (10% CO<sub>2</sub>, 37°C) inkubiert. Kurz vor der Pipettierung der Zell suspension wurde N-Medium mit dem Kollagen von den Platten abgesaugt.

Die Platten wurden dann unter den genannten Bedingungen inkubiert.

Für Versuche mit auf inhibitorischem Substrat gewachsenen Neuronen wurden die Kulturschalen einige Stunden zuvor mit 10 µg/ml (3 µg/well) Chondroitinsulfat-Proteoglykan (CSPG) versehen und inkubiert.

Die Zellen der 24er-well-Platten erhielten am nächsten Tag eine Behandlung mit dem C3-Protein (Wildtyp) oder den Peptiden (C3bot<sup>156-181 myc</sup>, C3bot<sup>163-177 myc</sup>, C3bot<sup>154-182 myc</sup>), welche in PBS gelöst in gewünschter Konzentration dem Nährmedium in der Platte hinzugefügt wurden. Diese Behandlung wurde bis zum fünften Tag nach der Präparation durchgeführt. Dann erfolgte die Transfektion der Neurone.

Die 6er-well-Platten erhielten ihre Behandlung in gleicher Form am fünften Tag nach der Präparation und wurden dann für weitere 48 Stunden inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden diese sofort verwendet oder bei -20°C eingefroren. Die Weiterverarbeitung wird unter „Gelelektrophorese der Dissoziationskulturen“ beschrieben.

### 2.1.2 Transfektion der Hippocampusneurone

Die kultivierten Neurone wurden zum einen mit einem Vektor für eGFP zur Sichtbarmachung der Neurone und ihrer Fortsätze zum anderen mit einer siRNA gegen die mRNA von RhoA zur Beendigung der Translation von RhoA in der Zelle transfiziert.

Dafür wurde das Effectene-Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierfür wurden in der entsprechend der Anzahl der Vertiefungen benötigten Menge im Mastermix pro well 25 µl Puffer, 0,5 µl DNA (0,2 µg) (Vektor C1eGFP und für einige Präparationen 0,5 µl RhoA G 28 [siRNA]) und 1,5 µl Enhancer gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Effectene-Reagenz mit 5 µl/well hinzugegeben und etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu kamen noch einmal 150 µl NB-Medium pro well.

Das alte Medium wurde aus den wells abgesaugt und verworfen. 400 µl NB-Medium wurden auf die Plättchen gegeben. Vom fertiggestellten Mastermix wurden nun noch 180 µl pro well hinzugefügt.

Die Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> erfolgte für weitere 24 Stunden (eGFP-Vektor) und 48 Stunden (siRNA).

### **2.1.3 Immunzytochemie**

Als Immunzytochemie wird eine Methode bezeichnet, mit der Proteine unter Zuhilfenahme von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Verwendet werden kann diese beispielsweise zum Nachweis eines Proteins in Geweben oder Dissoziationskulturen, bis hin zur Lokalisation des Proteins in einem Zellkompartiment. Das Prinzip des Nachweises beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion durch die Affinität eines Antikörpers zu einem spezifischen Epitop, wobei der Sekundärantikörper in diesem Fall an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist.

Für den Proteinnachweis mittels Immunzytochemie wurden auf Glasplättchen kultivierte primäre Hippocampusneurone der Maus verwendet. Diese wurden zweimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen und für 20 Minuten in 4%igem Paraformaldehyd (in PBS gelöst) fixiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen, für eine Stunde in Blocklösung zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen belassen und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in Blocklösung gelösten Primärantikörper inkubiert. Die Zellen wurden zwei weitere Male für zehn Minuten in PBS gewaschen, um dann für eineinhalb Stunden mit fluoreszenzmarkiertem Sekundär-Antikörper bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert zu werden. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS (2 x 10 Minuten) und Eintauchen in H<sub>2</sub>O wurden die Glasplättchen mit 10 µl des Polyvinylalkohols Mowiol als Eindeckmittel pro Glasplättchen auf Objektträger aufgebracht und eingebettet.

## **2.1.4 Epifluoreszenzmikroskopie und Auswertung**

Die angefärbten Zellen wurden mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop bei 63x Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv betrachtet und dokumentiert. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte für Grün (Oregon green, CY3) mit 488 nm Wellenlänge und einer Filterung des ausgesendeten Lichts mit einem Filter zwischen 498-535 und für Rot (Alexa red) mit 543 nm und einem Filter zwischen 587-666 nm. Bei doppelgefärbten Synapsen wurde ein zweiter roter Farbstoff (CY5) mit 649 nm angeregt bei einer Emission zwischen 650-670 nm.

Einige Aufnahmen zur Veranschaulichung wurden von PD Dr. Markus Höltje mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop erstellt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der speziell dafür entwickelten Software NeMo (Henneberger et al., 2005).

## **2.2 Gelelektrophorese der Dissoziationskulturen**

### **2.2.1 Aufarbeitung der Proben**

Die Kulturen in 6er-well-Platten wurden mit 1 ml PBS je well versehen. Die Zellen wurden vom Boden des wells abgeschabt. Die Zellsuspensionen wurden in 10 ml-Röhrchen pipettiert und bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4000 rpm zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet wiederum mit 1 ml PBS versehen und resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 20 µl für den BCA-Test zur Bestimmung der Proteinmenge abgenommen. Die Suspension wurde dann wiederum zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit der nach Auswertung des BCA-Tests errechneten Menge 1x Laemmli-Probenpuffer versehen.

### 2.2.2 Proteinquantifizierung / BCA-Test

Der BCA-Test zur Proteinquantifizierung beruht auf der Reaktion zweiwertiger Kupferionen mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Zusammen mit Bicinchoninsäure kommt es zu einem Umschlag des Farbstoffs von grün zu violett. Zur quantitativen Proteinbestimmung wird die Absorption des violetten Farbstoffs photometrisch bei 550 nm gemessen. Die Proteinbestimmungen werden zur Berechnung der Proteinmengen vor dem Auftragen auf die Elektrophoresegele durchgeführt.

Für die durchzuführende Doppelbestimmung wurden jeweils 20 µl der aufbereiteten Proben aus jedem Röhrchen in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 200 µl des BCA-Reagenzes hinzupipettiert. Als Leerwert wurde der jeweilige Probenpuffer verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 30 Minuten bei 60°C erhitzt. Danach wurde die Extinktion mit einem ELISA-Reader photometrisch bei 550 nm bestimmt. Eine Eichkurve mit 50, 100, 200 und 400 µg/ml BSA als Standardwerte wurde zur Berechnung der Proteinmengen erstellt.

### 2.2.3 Protein-Gelelektrophorese und Western Blotting

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine geeignete Methode zur Quantifizierung, Bestimmung, und zum Vergleich von Proteinmengen unter verschiedenen Bedingungen. Dabei basiert die Trennung der Proteine primär auf ihrem Molekulargewicht. Die so innerhalb der Gelmatrix aufgetrennten Proteine können auf Nitrozellulose-Membranen übertragen, gefärbt und weiter analysiert oder zum Proteinmengenvergleich der einzelnen Banden für den internen Standard mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt werden.

Für diese Versuche wurde das BioRad Protean-System verwendet. Nach dem Säubern zweier 10 x 7 cm großer Glasplatten wurden diese in die BioRad Mini Protean Blot-Kammer gespannt, das Trenngel eingefüllt und mit Isopropanol zur Abschirmung gegen Sauerstoff aufgefüllt. Nach der Polymerisation des Trenngels und der Entfernung des Alkohols wurden das Sammelgel eingefüllt und die Platzhalter für die Taschenbildung hinzugefügt. Sobald auch das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Platzhalter entfernt. Die Taschen wurden vor dem Start

mit dem Laufpuffer von eventuellen Gelresten befreit. Nun wurden die Taschen mit den Proben und dem entsprechenden Marker befüllt. Danach wurde die Kammer mit dem Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese bei 0,02 Ampère pro Gel durchgeführt. Sobald die Bromphenol-Blau-gefärbte Bandenfront den unteren Rand der Glasplatten in der Blotkammer erreicht hatte bzw. die Banden des Markerproteingemischs im gewünschten Bereich genügend aufgetrennt waren, wurde die Elektrophorese gestoppt. Die Platten wurden mit einem Spatel vorsichtig voneinander getrennt und das Gel entfernt.

Zur Durchführung weiterer Analysen wurden die Proteingele, angefeuchtet mit Semidry-Puffer, in der BioRad Transblot Semi-dry Transfer Kammer zwischen Filterpapieren auf Nitrozellulose-Membranen verbracht. Bei 0,56 Ampère für zwei Gele wurden die Proteine typischerweise in 20-25 Minuten übertragen. Anschließend wurden die Membranen für ein bis zwei Minuten mit Ponceau-Rot gefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen und, zwischen Folien gelegt, zur Dokumentation kopiert. Zur weiteren Antikörperbehandlung wurden Streifen im Bereich der zu untersuchenden Banden aus der Nitrozellulose-Membran geschnitten und für eine Stunde zum Blocken der unspezifischen Bindungen und zum Entfärben in Blocklösung gelegt. Danach wurde der Primärantikörper in Antikörperlösung gelöst und die Nitrozellulose-Membran darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Blotstreifen nochmals in Blocklösung für eine Stunde gelegt. Die Blocklösung wurde dabei alle 15 Minuten insgesamt dreimal erneuert. Die Streifen wurden dann für eine Stunde in Antikörperlösung versehen mit Sekundärantikörper auf einem Schwenker inkubiert. Danach wurde der Streifen in TS-Puffer von überschüssigem Antikörper gereinigt und die Proteinbanden durch den Enzymgekoppelten Antikörper nach Zugabe von Chemilumineszenz-Reagenz auf ECL Hyperfilm sichtbar gemacht.

## **2.3 Präparation des entorhinalen Kortex**

### **2.3.1 Präparationsprotokoll**

Schnitte des entorhinalen Kortex (EC) von Mäusen stellen ein gutes Modell zur Analyse der Wirkung neurotropher Substanzen auf axonales Wachstum (Länge und

Anzahl) dar. Dabei wurde in dieser Arbeit der Tractus perforans als Efferenz des enthorinalen Kortex zum Hippocampus betrachtet (Frotscher und Heimrich, 1993).

Mäuse des zweiten postnatalen Tages (siehe Versuchstiere) wurden dekapitiert, Kopfhaut und Schädeldecke entfernt sowie die beiden Gehirnhälften in Präparationsmedium gelegt. In der sterilen Werkbank wurden unter dem Stereoskop in dem gekühlten Medium Stammhirn und Kleinhirn, Bulbus olfactorius, Marklageranteile und die Hirnhaut entfernt. Dadurch lässt sich der Hippocampus darstellen, der als längliche gebogene Struktur im gewölbten (enthorhinalen) Kortex liegend verbleibt.

Dieses Gewebstück wurde anschließend orthogonal zur Längs- und Querachse des Hippocampus – dieser dient als Orientierungsmarke für den Zuschnitt des EC – auf einem Gewebeschneider in 350 µm breite Schnitte getrennt. Die Schnitte wurden in das Präparationsmedium zurückgelegt und mittels Skalpell Hippocampus und restlicher Kortex vom nun sichtbaren EC entfernt. Der EC wurde dann in eine 4er-well-Kulturschale in 30 µl Kollagenlösung verbracht, für 15 Minuten inkubiert (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) und schließlich mit 500 µl Inkubationsmedium versehen, welches mit der gewünschten Konzentration von C3bot oder den Peptiden versehen wurde.

Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C.

### **2.3.2 Fotografische Dokumentation und Auswertung der Bilder**

Die Schnitte wurden dann mit dem Mikroskop IX 70 (Olympus) bei 10facher Vergrößerung aufgenommen und mit der MagnaFire Software (Optronics, Goleta, USA) digital dokumentiert.

Die Bilder wurden in der ImageJ-Software (Version 1.43u, National Institute of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Zur Längenmessung wurden bei gleicher Vergrößerung und Auflösung im Vorfeld Aufnahmen mit einem Objektmikrometer erstellt, um die Bilder der Schnitte skalieren zu können.

Es wurden zwei Parameter in Betracht gezogen: Anzahl der aus der Schnittkante auswachsenden Axone und die Länge aller Axone, die eine Mindestlänge von 400 µm ab Schnittkante erreichen.

Die Anzahl der Axone wurde bestimmt, indem parallel zur Schnittkante eine Linie mit einer Länge von 950 µm in 100 µm Abstand von der Kante gezogen wurde. Hierfür

waren die Bilder vorher skaliert worden. Entlang dieser Linie wurden nun alle Axone gezählt, die diese Linie kreuzten.

Für die Längenmessung wurde die gleiche Linie wie oben erwähnt aber in 400 µm Abstand gezogen. Entlang dieser wurden alle sie kreuzenden Axone einzeln von ihrem Ende bis zum Schrittrand vermessen (Abb. 20).

## **2.4 Pulldown von aktivem RhoA an Rückenmarksfragmenten der Maus**

Der verwendete Pulldown-Assay (Cytoskeleton, Denver, USA) beruht auf dem Prinzip eines mit Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelten Proteins, welches an das gesuchte Protein hochspezifisch bindet. Die an die GST gebundenen Sepharose-Beads erlauben eine Zentrifugation des untersuchten Zelllysats, bei der sich ein Pellet bestehend aus den Beads absetzt, welches das gesuchte Protein enthält.

Zur Untersuchung des Bestandes von aktivem RhoA in hemisezierten Rückenmarksabschnitten der Maus wurde ein Assay verwendet, bei dem das Rho-Effektor-Protein Rhotekin verwendet wird. Rhotekin bindet mit seiner Rho-Binde-Domäne (Rho-Bindedomäne) spezifisch an aktives (GTP-gebundenes) RhoA. Die Rhotekin-RBD in dem verwendeten Kit enthält die Aminosäuren 7-89 der RBD. Damit konnte aktives RhoA aus erzeugten Zelllysaten präzipitiert werden.

### **2.4.1 Operation der Mäuse**

Für diesen Versuch wurden Balb/C-Mäuse verwendet. Nach Fixierung und Narkotisierung der Maus wurde die Rückenhaut paramedian eröffnet, der darunter liegende Fettkörper abgehoben und auf Höhe des thorakalen Segments 8 die paravertebralen Muskelzüge nach lateral verschoben, um die Laminektomie mit Eröffnung des Canalis spinalis durchzuführen. Dabei wurde die Dura mater geschont. Nun wurde mittels Skalpell eine dorsale Hemisektion unter Durchtrennung des linken und rechten dorsalen Funiculus und der beiden Hinterhörner sowie des ventralen Funiculus des Rückenmarks auf Höhe Th 8 durchgeführt. Auf die Läsionsstelle

wurde anschließend ein Schwämmchen getränkt mit 5 µl PBS oder in PBS gelösten Peptiden von C3bot gelegt. Dann wurden die autochthonen Muskelzüge wieder vernäht und die Haut mit dem Klammernahtgerät und gegebenenfalls etwas Histoacryl wieder verschlossen. Für scheinoperierte Tiere wurden die Hemisektion und die Applikation von Wirkstoffen weggelassen. Die Tiere wurden nach 24 Stunden oder sieben Tagen narkotisiert und mit PBS perfundiert, das Rückenmark wurde entfernt, in ein jeweils 1 cm langes zervikales, thorakales (Ort der Läsion) und lumbales Stück zerlegt und mit N<sub>2</sub> schockgefroren.

Die vorgenannte Präparation wurde in einer kooperierenden Arbeitsgruppe (AG Hendrix, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin) von Francesco Boato durchgeführt.

#### **2.4.2 Pulldown-Assay der Rückenmarksfragmente**

Die Weiterverarbeitung der Rückenmarksfragmente erfolgte in der AG Ahnert-Hilger. Die Durchführung erfolgte im Kühlraum bei 4 °C und auf Eis. Die Fragmente wurden in 500 µl Lysepuffer in einem 2 ml-Glas-Homogenisatorröhrchen bei 91/2 rps mit einem Teflon-beschichteten Douncer zehnmal homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde dann überführt in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß, fünfmal durch eine 27G-Kanüle gezogen und schließlich zehnmal am Ultraschall-Homogenisator sonifiziert. Vorexperimente zeigten, dass eine komplette Homogenisierung nötig ist, um möglichst viel Ausgangsmaterial zu erhalten.

Die Homogenate verblieben zur Lyse 15 Minuten auf dem Schüttler und wurden anschließend bei 10.000 U/Min. zwei Minuten zentrifugiert. Das entstandene Lysat wurde in ein weiteres 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und das Pellet verworfen. Von den Lysaten wurden jeweils 20 µl für den BCA-Test und 40 µl für eine Quantifizierung des RhoA-Gesamtbestandes abgenommen. Die Gesamtproteinmenge im Lysepuffer betrug in der Regel 3-5 mg/ml. Nach Herstellerangaben sollte eine Abweichung von mehr als 10% der Proteinmenge der einzelnen Proben voneinander angeglichen werden, was nach Bestimmung im BCA-Test wenn nötig durch hinzufügen der entsprechenden Menge Lysepuffer erreicht wurde.

Der Rest des Lysats wurde mit 15 µl (50 µg) der Rhotekin-RBD-GST-Sepharose-Beads versehen und eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 4000 g wurde der Überstand verworfen und das Bead-Pellet mit 500 µl Waschpuffer resuspendiert und noch einmal zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Bead-Pellets wurden mit 20 µl 2x Laemmli-Probenpuffer versehen und zwei Minuten bei 95 °C gekocht (Hersteller-Angaben). Den 40 µl des abgenommenen Lysats wurden 13,3 µl 4x Laemmli-Puffer hinzugefügt. Diese wurden für fünf Minuten bei 95 °C gekocht.

Die in Laemmli gelösten Bead-Fractionen (Volumen von etwa 25 µl) wurden komplett in die Sammeltaschen der Acrylamidgele pipettiert. Die mit Laemmli versehenen Lysate wurden sowohl in entsprechend dem Ergebnis des BCA-Tests adjustierter Menge (30 µg Protein pro Bahn) als auch nicht adjustiert (15 µl Probe pro Bahn) aufgetragen. Das weitere Vorgehen wird unter Gelelektrophorese beschrieben.

## 2.5 Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge)

Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch (Rotiphorese 40)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Chondroitinsulfatproteoglykane (Mischung verschiedener Proteoglykane des embryonalen Huhngehirns)	Millipore, Billerica, MA, USA
<i>Clostridium botulinum</i> C3 Protein (Expression in <i>E. coli</i> , aufgereinigt aus Überstand)	Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, Prof. I. Just
Peptide von C3bot (C3bot <sup>154-182 myc</sup> , C3bot <sup>156-181 myc</sup> , C3bot <sup>163-177 myc</sup> )	synthetisiert von Pharis Biotec, Hannover
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom, Berlin

Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dimethylsulfoxid	Cytoskeleton, Denver, USA
ECL™ Enhanced Chemiluminescence	Amersham Life Science, Buckinghamshire, England
Effectene-Transfektionsreagenz	Quiagen, Hilden
Feinchemikalien (z.B. NaCl, KCl)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin
Glycin	Merck, Darmstadt
Hanks Buffered Salt Solution (HBSS+)	Biochrom, Berlin
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfon- säure (HEPES-KOH)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
NGS (normal goat serum, Ziegenserum)	Pan Biotech, Aidenbach
Kollagen Typ 1 (vom Rattenschwanz)	Fluka Analytical, St. Gallen, Schweiz
Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt/Main
MEM (Minimal Essential Medium)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	Fermentas, St. Leon-Rot
Mowiol (Polyvinylalkohol)	Hoechst, Frankfurt/Main
Natriumdodecylsulfat	Boehringer, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
RhoA G28 (siRNA)	Beate Brand-Saberi, Freiburg
Saccharose	Roth, Karlsruhe

Tetramethylethyldiamin (Temed)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, St.Louis, USA

## 2.6 Puffer und Lösungen

### 2.6.1 Medien für die Zellkultur

#### *Inkubationsmedium für Hippocampuskulturen*

##### *N-Medium*

50	ml	Fötales Kälberserum
5	ml	Penicillin/Streptomycin
5	ml	L-Glutamin
5	ml	Hepes
1,25	ml	Insulin
4	g	Glucose (in 5 ml DMEM Sterilfiltration)
430	ml	DMEM
1	ml	Kollagen (pro 100 ml N-Medium)

##### *NB-Medium*

10	ml	B27 Supplement
5	ml	Penicillin/Streptomycin
1,25	ml	L-Glutamin
485	ml	NB-Medium

#### *Präparationsmedium für Hippocampuskulturen*

0,6	g	Glucose
auf 100	ml	PBS

##### *Startermedium*

25	µl	NaGlutamat (100 mM)
pro 100	ml	NB-Medium

#### *PBS (Phosphat buffered saline solution)*

140	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
10	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

**2.6.2 Lösungen für Pulldown von aktivem RhoA (alle in H<sub>2</sub>O gelöst)***Lysepuffer*

50	mM	Tris pH 7,5
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5	M	NaCl
2	%	Igepal(tert-Octylphenoxy-poly(oxyethylene)ethanol)
1x		Proteaseinhibitoren

*Protease-Inhibitor-Lösung 100x*

62	µg/ml	Leupeptin
62	µg/ml	Pepstatin A
14	mg/ml	Benzamidin
12	mg/ml	Tosyl Arginin Methylester (in 1 ml DMSO)

*Waschpuffer*

25	mM	Tris pH 7,5
30	mM	MgCl <sub>2</sub>
40	mM	NaCl

*Ladepuffer*

150	mM	EDTA
-----	----	------

*Stopppuffer*

600	mM	MgCl <sub>2</sub>
-----	----	-------------------

*Beads*

3,3	mg/ml	Rhotekin-RBD gebunden an gefärbte Sepharose Beads
-----	-------	--

*GTPγS*

20	mM	
----	----	--

*GDP*

100	mM	
-----	----	--

**2.6.3 Medien und Lösungen für die Präparation des entorhinalen Kortex***Kollagen-Stock*

25	mg	Kollagen Typ 1
12,5	ml	0,1 M Essigsäure

Sterilfiltration

*Kollagenlösung (pH 7,4)*

1	ml	Kollagenlösung
50	µl	DMEM
100	µl	Rekonstituierungspuffer
(0,8	M	NaOH,
2,2	%	NaHCO <sub>3</sub>
		in H <sub>2</sub> O)
		Sterilfiltration

*Präparationsmedium*

16	g/L	MEM
2	mM	L-Glutamin
0,8	mM	Tris
		in H <sub>2</sub> O
		Sterilfiltration

*Inkubationsmedium*

25	%	HBSS
8	g/L	MEM
4	mM	L-Glutamin
1,2	%	Glucose
1	%	Penicillin/Streptomycin
0,5	%	Bicarbonat (43,5 mg/ml)
5	mM	Trisbase
1	mg/L	Insulin
0,8	mg/L	Vitamin C
		Sterilfiltration
25	%	Pferdeserum

**2.6.4 Protein-Gelelektrophorese und Western Blotting**

*Laufpuffer (10x)*

30	g	Tris
144	g	Glycin
10	g	SDS
auf 1	L	H <sub>2</sub> O

*Blot-Transferpuffer „Semi-dry“*

48	mM	Tris
386	mM	Glycin
3,7	g/l	SDS
20	% (v/v)	Methanol
	ad 800 ml	H <sub>2</sub> O

*Ponceau-S-Färbelösung*

0,3 % Ponceau S  
 3 % Trichloressigsäure  
 3 % Sulfosalicylsäure

*Laemmli-Probenpuffer 3x*

4,5 g SDS  
 12,48 ml Tris  
 1,5 g EDTA 0,1 M  
 15 g Saccharose  
 ad 45 ml H<sub>2</sub>O

*TS-Puffer*

20 mM Tris  
 150 mM NaCl  
 mit HCL auf pH 7,5 eingestellt

*TRIS I-Puffer*

500 mM Tris  
 mit HCl auf pH 6,8 eingestellt

*TRIS II-Puffer*

1,5 mM Tris  
 mit HCl auf pH 8,8 eingestellt

*Antikörperlösung*

2,0 g BSA  
 ad 40 ml TS (1x)

*Westernblot-Blocklösung*

5 % Magermilchpulver  
 0,1 % Tween 20  
 TS (1x)

**2.6.5 Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels**

(Mengen für zwei Gele)

<b>Trenngel</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>Sammelgel 4%</b>
Tris II	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	Tris I 1,25 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid	2,5 ml	3 ml	3,75 ml	0,5 ml

H <sub>2</sub> O	5,0 ml	4,5 ml	3,75 ml	3,25 ml
Temed	16 µl	16 µl	16 µl	5,2 µl
10% APS	150 µl	150 µl	150 µl	42 µl

<b>Gele für die zu untersuchende Proteingrößenordnung</b>	
7,5%	29 -150 kDa
10%	14 - 66 kDa
12%	< 36 kDa
15%	< 20 kDa

### 2.6.6 Lösungen für die Immunzytochemie

#### *Block- & Primärantikörperlösung*

			PBS
0,1	%		Triton
5	%		NGS
2	%		BSA

#### *Zweitantikörperlösung*

			PBS
2	%		BSA

### 2.6.7 Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proben

#### *BCA-Reagenz*

Im Verhältnis 50:1	Reagenz A
	Kupfersulfat 4%

#### *Fixierlösung*

4	%	Formaldehyd in PBS
---	---	--------------------

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primärantikörper: WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz

Antigen	Typ, Quelle
Actin	polyklonales Kaninchen-IgG, Sigma, Saint Louis, USA (WB 1:2000)
GFP	polyklonales Kaninchen-IgG, Abcam Inc., Cambridge, USA (IF 1:2000)
Homer 1 b/c	polyklonales Kaninchen-IgG, Santa Cruz Technologies, USA (WB 1:500)
NMDA-Rezeptor	monoklonales Maus-IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:4000)
Rab 3a	monoklonales Maus-IgG, Monoklonales Maus-IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:2000)
RhoA	monoklonales Maus-IgG, Cytoskeleton, Denver, USA (WB 1:500)
SNAP 25	monoklonales Maus-IgG, Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, USA (WB 1:3000)
Synapsin	polyklonales Kaninchen-IgG, SynapticSystems, Göttingen (1:4000)
Synaptobrevin 69.1	monoklonales Maus IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:2000, IF 1:500)
Synaptophysin 7.2	monoklonales Maus IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:2000, IF 1:500)
VGAT	polyklonales Kaninchen IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:2000), polyklonales Meerschweinchen IgG, Calbiochem, USA (IF 1:800)

VGLUT1	polyklonales Meerschweinchen-IgG (IF 1:2000), polyklonales Kaninchen-IgG (WB 1:10.000), SynapticSystems, Göttingen
VGLUT2	polyklonales Meerschweinchen-IgG, (IF 1:300), polyklonales Kaninchen-IgG (WB 1:5000), SynapticSystems, Göttingen

### 2.7.2 Sekundärantikörper:

Peroxidase gebundenes Pferd-anti-Maus IgG	Vector Laboratories, Burlingame, Großbritannien (WB 1:2000)
Peroxidase gebundenes Anti-Kaninchen IgG	Vector Laboratories, Burlingame, Großbritannien (WB 1:2000)
Oregon green 488 Ziege-anti-Kaninchen	Molecular Biotechnology, Göttingen (IF 1:300)
Alexa red Fluor 594 Ziege-anti-Maus IgG	Molecular Biotechnology, Göttingen (IF 1:300)
CY3 Ziege-anti-Kaninchen IgG	Jackson, ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA (IF 1:300)
CY5 Esel-anti-Meerschweinchen IgG	Jackson, ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA (IF 1:500)

## 2.8 Geräte und Material

<i>Elektrophoresekammer</i>	BioRad Mini Protean II, BioRad, Hercules, USA
<i>Netzteil</i>	BioRad Power Pac 200, BioRad, Hercules, USA
<i>Protein-Transferzelle</i>	BioRad Transblot SD Semi-dry, BioRad, Hercules, USA
<i>Entwicklermaschine</i>	Cawomat 2000 IR, Cawo Photochemische Fabrik GmbH, Schrobenhausen
<i>ELISA Reader</i>	MR 5000, Dynatech, Bülach, Schweiz
<i>Pipetten</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Thermo-Mixer</i>	Thermo-Mixer comfort, Eppendorf, Hamburg

<i>Nitrocellulose-Membran und Entwicklerfilm</i>	Hybond-C, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien
<i>Zentrifuge</i>	Labofuge 400, Hereaus, Kendro, Osterode
<i>Epifluoreszenz-Mikroskop</i>	Leica DMLB, Leica Microsysteme GmbH, Wetzlar
<i>Ultraschall-Homogenisator</i>	Sonopuls GM 70, Bandelin electronic, Berlin
<i>Reinst-Wasser-Filter</i>	Millipore und MilliQ academic, Billerica, USA
<i>Rüttler</i>	MS1/2 Minishaker, Roth, Karlsruhe
<i>Inverses Mikroskop</i>	Olympus IX 70, Olympus, USA
<i>Tischzentrifuge Qualitron</i>	Roth, Karlsruhe
<i>Zentrifuge</i>	5417C, Eppendorf, Hamburg
<i>Gewebeschneider</i>	Mcllwain Tissue Chopper, The Mickle Laboratory Engineering Co. LTD., England
<i>Stereomikroskop</i>	Stemi SV 11, Carl Zeiss, Jena
<i>Kaltlichtlampe</i>	KL 1500, Schott, Mainz
<i>Laborrührer</i>	RZR 2021, Heidolph, Schwabach
<i>Potter-Elvehjem-Gewebehomogenisator und Teflon-Stempel mit Edelstahlstab</i>	Wheaton, USA

## 2.9 Versuchstiere

NMRI-Mäuse: Embryonen des 16. oder 17. Embryonaltages (E 16/17) für Hippocampusdissoziationskulturen und -transfektionen

NMRI-Mäuse und C57/BL6 N: Mäuse des zweiten postnatalen Tages (P2) für EC-Schnitte, pro Präparation nur ein Stamm

Balb/C-Mäuse: Mäuse für Assay von aktivem RhoA an Rückenmarksfragmenten und Bestimmung der Bewegungsfähigkeit.

## 2.10 Richtlinien

Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden bei der Durchführung der Versuche und ihrer Auswertung eingehalten.

Im Labor von Frau Prof. Dr. Ahnert-Hilger lag eine Tötungsanzeige vor. In der kooperierenden Arbeitsgruppe von PD Dr. Sven Hendrix lagen Genehmigungen für Tierversuche vor (Charité Berlin, Landesamt für Gesundheit und Soziales, Nr. G0149-09, Universität Hasselt in Belgien, Nr. 201010 ECD).

Die Versuche wurden in Laboren der Stufe S1 und S2 unter Einhaltung der Sicherheitsbestimmungen durchgeführt.

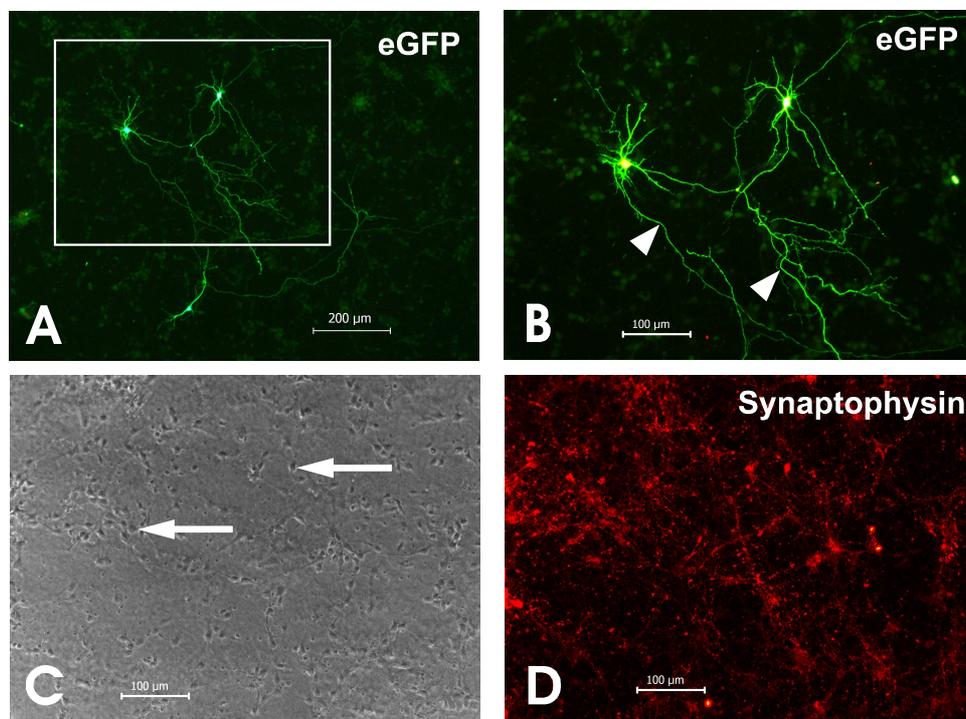
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Synaptische Konnektivität hippocampaler Neurone

##### 3.1.1 Einfluss von C3bot und Peptiden auf die synaptische Konnektivität

Ein Hauptziel der Arbeit war es, den Einfluss von C3bot und den daraus erstellten Peptiden auf funktionelle Eigenschaften von Neuronen zu untersuchen. Zunächst wurden Synapsen untersucht, die die Schaltstellen der neuronalen Kommunikation darstellen. Mit einer für die Quantifizierung von synaptischen Kontakten entwickelten Software konnte die Anzahl der Synapsen an den neuronalen Fortsätzen unter verschiedenen Bedingungen ermittelt werden.

Für die Bestimmung dieses Parameters wurden Primärkulturen von hippocampalen Neuronen der Maus kultiviert, dann fixiert und gefärbt. Die Färbung erfolgte zur Darstellung der Morphologie des Neurons sowie zur Darstellung der an den Fortsätzen lokalisierten Synapsen (Abb. 5 und 6).



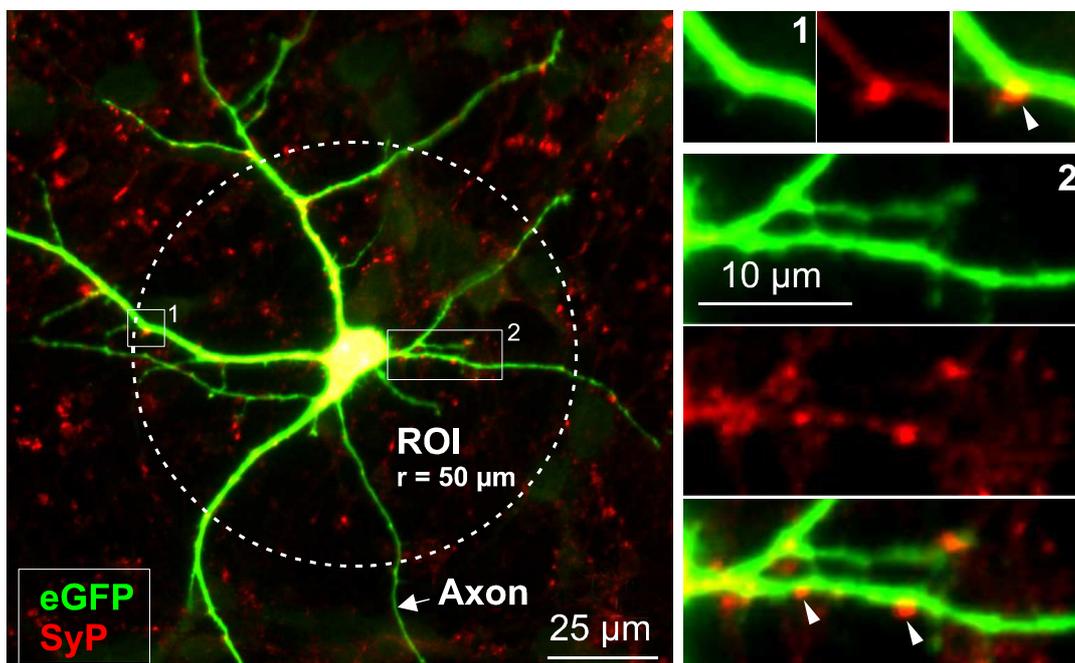
**Abbildung 5:**

*Transfektion von kultivierten Hippocampusneuronen*

Hippocampusneurone wurden am Embryonaltag (E) 16 präpariert und für 6 Tage kultiviert. Die Transfektion erfolgte am 4. Tag in vitro (DIV 4). An DIV 5 wurden die Zellen fixiert und mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert und über fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper visualisiert.

**A:** Hippocampuskultur mit eGFP transfizierten Neuronen bei geringer Vergrößerung (10X) fotografiert. Zur Verstärkung der Eigenfluoreszenz von eGFP wurde mit einem Antikörper gegen GFP und Oregon-green gekoppeltem Sekundärantikörper gefärbt. Sichtbar ist die Morphologie zweier transfizierter Neurone. **B:** Ausschnittsvergrößerung des in **A** begrenzten Bereichs. Die Pfeilspitzen deuten auf die Axone der beiden Neurone. **C:** Phasenkontrast-Darstellung des in **B** gezeigten Bereichs. Die Pfeile deuten auf die Somata der in **A** und **B** sichtbaren Neurone. **D:** Die Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Synaptophysin zeigt die Verteilung synaptischer Kontakte in der Kultur.

Zur Darstellung der Morphologie und insbesondere der proximalen Dendriten der Neurone wurden diese mit einem das enhanced green fluorescence proteine (eGFP) enthaltenden Vektor transfiziert. Erstmals isoliert wurde GFP aus der für Biolumineszenz bekannten Quallenart *Aequorea* als Nebenprodukt bei Betrachtung von Aequorin. Es kann mit Licht bei 488 nm zur Lichtemission bei einer Wellenlänge von 509 nm angeregt werden (Shimomura et al., 1962).



**Abbildung 6**

*Methode zur Quantifizierung der synaptischen Kontakte hippocampaler Neurone*

Hippocampusneurone wurden am Embryonaltag (E) 16 präpariert und für 6 Tage kultiviert. Die Transfektion erfolgte am 4. Tag in vitro (DIV 4). An DIV 5 wurden die Zellen fixiert und mit dem jeweiligen Primärantikörper für eGFP und das gewünschte synaptische Protein (hier

Synaptophysin) inkubiert und über einen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper visualisiert.

Anschließend wurden die Zellen fotografiert, wobei zwei Aufnahmen pro Zelle gemacht wurden. Eine Aufnahme dokumentierte die eGFP-exprimierenden Fortsätze transfizierter Zellen. Die zweite diente der Darstellung von Synaptophysin-positiven Kontakten.

Beide Aufnahmen konnten in der NeMo-Software kombiniert werden, wobei die punktuell gefärbten synaptischen Proteine sich nun als synaptische Kontakte an den Fortsätzen der Neurone darstellten. Diese Kontakte wurden innerhalb einer Region of Interest (ROI) von 50  $\mu\text{m}$  Radius um das Soma an den proximalen Dendriten gezählt. Als Kontakte gewertet wurden jene Punkte, die sich mit dreifacher Intensität vom Hintergrund abhoben und zwischen 0,5 und 2,0  $\mu\text{m}$  Durchmesser lagen (siehe Pfeilspitzen in der Vergrößerung).

Klonierung und Sequenzierung des zu Grunde liegenden Gens von GFP sowie Optimierung durch Mutationen hin zu eGFP ermöglichen es innerhalb eines Tages bei angemessenen Transfektionsraten einzelne Zellkörper und Gewebstrukturen bei verstärkter Lichtemission sichtbar zu machen (Prasher et al., 1992, Zhang et al., 1996). Zur Verstärkung der Visualisierung wurde zusätzlich ein Antikörper gegen eGFP mit Anwendung eines entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpers verwendet. In der Epifluoreszenzmikroskopie waren die erfolgreich transfizierten Neurone mit allen Fortsätzen sichtbar.

Einschlusskriterien für die Aufnahme eines Neurons waren eine vollständige und deutliche Färbung sowie eine gesund erscheinende Morphologie. Unter dieser Bedingung konnten pro Deckgläschen 20 bis 30 Neurone gefunden werden, von denen 15 für die fotografische Dokumentation und Analyse ausgewählt wurden.

Für die Darstellung der Synapsen wurden Antikörper gegen die synaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptobrevin verwendet.

Synaptophysin mit etwa 38 kDa Molekulargewicht und vier Transmembrandomänen ist in der Membran synaptischer Vesikel zu finden (Südhof et al., 1987), wo es als homooligomeres Tetramer vorliegt. Es ist an der für die Exozytose des Neurotransmitters notwendigen Vesikel-Membran-Fusion beteiligt (Trimble und Scheller, 1988, Südhof und Jahn, 1991).

Auch Synaptobrevin, zunächst als VAMP (Vesikal-assoziiertes Membranprotein) bezeichnet (Trimble und Scheller, 1988), trägt als Teil der im SNARE-Komplex befindlichen Proteinmaschinerie zur Vesikel-Membranfusion bei. Es wird von Botulinum-Neurotoxin B und D proteolytisch gespalten (Rothman, 1996).

Durch Verwendung von verschiedenen Filtersystemen im Fluoreszenzmikroskop konnten Doppel- bzw. Dreifachfärbungen zur Darstellung der synaptischen Verbindungen durchgeführt werden.

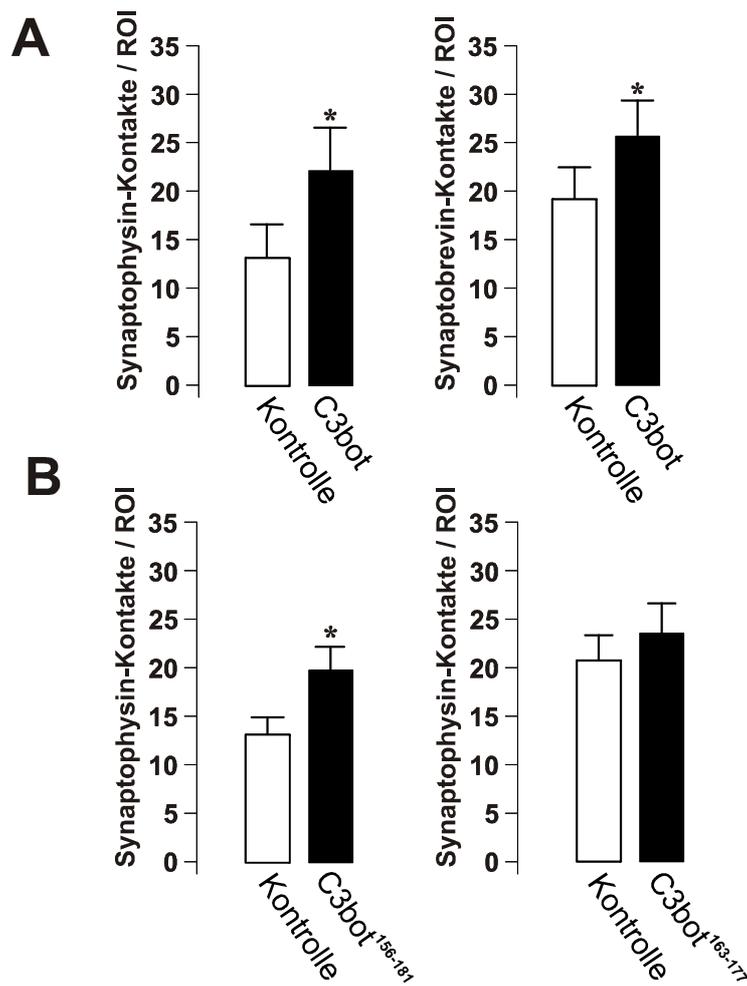
Mit der dargestellten Methode zur Quantifizierung synaptischer Kontaktzahlen wurde untersucht, wie sich diese unter Einfluss von C3bot-Gesamtprotein und C3bot-Peptiden verändern. Folgende drei Peptide wurden verwendet: C3bot<sup>156-181</sup>, C3bot<sup>163-177</sup> und C3bot<sup>154-182</sup>.

Die Peptide wurden in der Regel mit einem zusätzlich N-terminal angehängten myc-Tag verwendet. Diese Sequenz von zehn Aminosäuren (EQKLISEEDL) soll in zukünftigen Untersuchungen verwendet werden, um die Peptide in ihrer zellulären Lokalisation durch Immunfärbung gegen den myc-Tag sichtbar zu machen. Das myc-Tag beeinflusste den neurotrophen Effekt der Peptide nicht, wie vergleichende Vorversuche ergaben.

### **3.1.2 Synaptische Konnektivität unter Wirkung von C3bot, C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>163-177</sup>**

Mit der beschriebenen Methode konnte die Wirkung von C3bot und den beiden Peptiden auf synaptische Kontakte untersucht werden. Dabei wurden als Marker die synaptischen Vesikel-Proteine Synaptophysin und Synaptobrevin verwendet.

C3bot (80 nM) erbrachte dabei bei Markierung von Synaptophysin eine Steigerung der Kontakte pro ROI (Region of interest, siehe Abb. 6) von 13,1 auf 22,2 (+ 69%), C3bot<sup>156-181</sup> von 13,1 auf 19,8 (+ 51%) und C3bot<sup>163-177</sup> von 20,6 auf 23,4 (+ 13,5%). C3bot wurde weiterhin bei Markierung von Synaptobrevin getestet und erhöhte die so gefärbten Kontakte in der Zahl von 19,2 auf 25,6 (+ 33%) (Abb. 7).



### Abbildung 7

*Clostridium botulinum* C3 Protein (C3bot) und C3bot<sup>156-181</sup> erhöhen die Anzahl synaptischer Kontakte in hippocampaler Kultur

**A:** Kultivierte Hippocampusneurone wurden ab DIV 1 für 5 Tage mit C3bot (80 nM), C3bot<sup>156-181</sup> oder C3bot<sup>163-177</sup> (jeweils 50nM) behandelt. Die Transfektion mit eGFP erfolgte an DIV 5. Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen eGFP sowie die synaptischen Markerproteine Synaptophysin oder Synaptobrevin gefärbt. Die Quantifizierung beider Markerproteine ergab eine Steigerung der Anzahl synaptischer Kontakte nach Behandlung mit C3bot. **B:** Die Behandlung mit den C3bot Peptiden zeigte für das 26mer C3bot<sup>156-181</sup> eine erhöhte synaptische Konnektivität hinsichtlich der Synaptophysin Färbung, nicht jedoch das 15mer C3bot<sup>163-177</sup>.

Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments  $\pm$  Standardfehler. Pro Bedingung wurden 30 Neurone ausgewertet. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

### 3.1.3 Wirkung von C3bot, C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>163-177</sup> auf die Anzahl exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen

Die Ausschüttung von Neurotransmittern aus den Vesikeln der Präterminale des Axons in den synaptischen Spalt erfordert deren vorherige Speicherung in den Vesikeln, was durch spezifische Transportproteine erfolgt, die einen durch die vesikuläre H<sup>+</sup>-ATPase erzeugten Protonen- und elektrochemischen Gradienten nutzen. Im Falle von Glutamat und GABA konnten vier solcher Proteine identifiziert werden. Drei wurden in dieser Arbeit als Marker für exzitatorische und inhibitorische Synapsen verwendet – die vesikulären Glutamattransporter VGLUT1 und 2 sowie der vesikuläre GABA-Transporter VGAT.

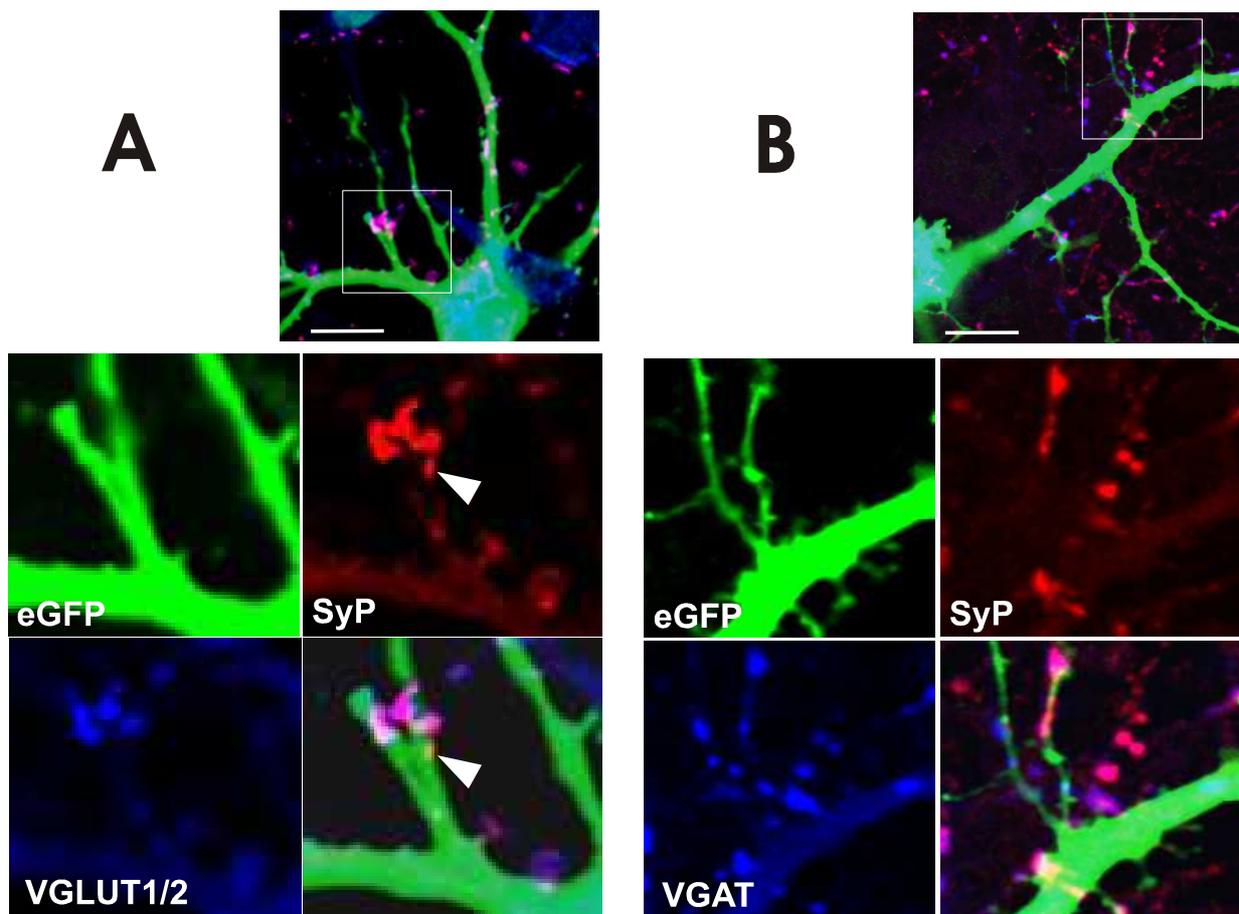
Für den vesikulären Glutamattransporter 1 (VGLUT1, auch BNPI) konnte als erstes der Transport von Glutamat über die Vesikelmembran und seine dortige Lokalisation nachgewiesen werden (Bellocchio et al., 2000, Takamori et al., 2000).

DNPI (Differentiation mediated Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate transporter) zeigt die gleichen Eigenschaften wie VGLUT1 und wurde identifiziert, nachdem loss-of-function-Mutationen von VGLUT1 zu keinem vollständigen Verlust glutamaterger Neurotransmission führten. Dies führte zu seiner Bezeichnung VGLUT2.

Beide Transporter weisen unterschiedliche Verteilungsmuster im murinen ZNS auf, können aber kolokalisiert in synaptischen Vesikeln von Neuronen des murinen Hippocampus gefunden werden. Daher wurden sie in dieser Arbeit zur Markierung glutamaterger Synapsen kombiniert angewendet (Herzog et al., 2001 und 2006, Bai et al., 2001).

Studien an der Lokomotion von Fadenwürmern führten über Mutationsanalysen zur Entdeckung des vesikulären GABA-Transporters (VGAT), welcher auch in glycinergen Synapsen vorkommt und daher auch VIAAT (vesicular inhibitory amino acid transporter) genannt wird. Homologe zu diesem zehn Transmembrandomänen enthaltenden Protein wurden auch in der Maus und in der Ratte gefunden, (Gasnier 2000, McIntire et al., 1997, Dumoulin et al., 1999).

Alle drei Proteine wurden mittels Antikörper an den Hippocampusneuronen gefärbt (Abb. 8).



### Abbildung 8

*Doppelfärbung von Synapsen mittels Markierung von Synaptophysin und Transportern für exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter*

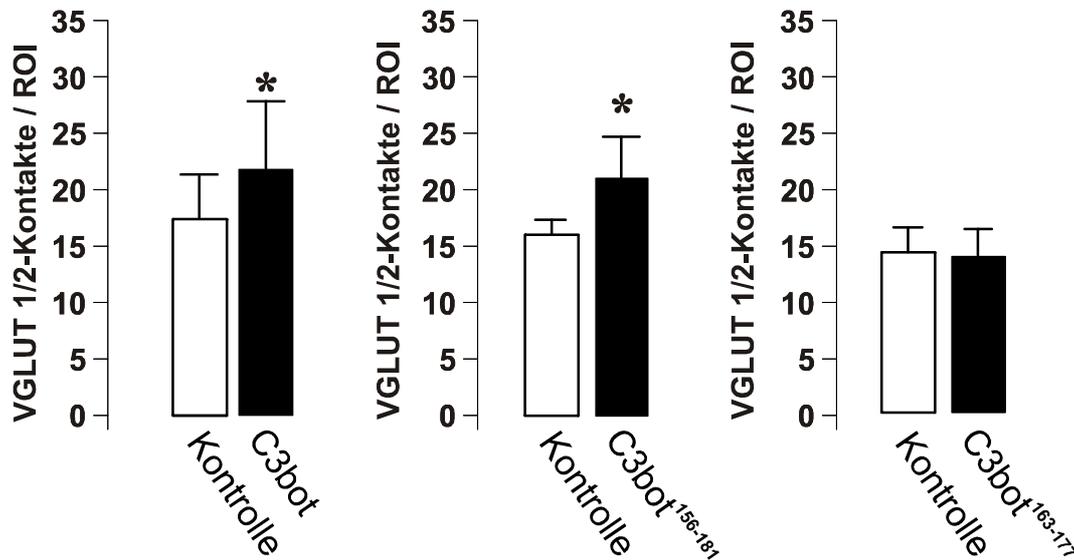
Hippocampusneurone wurden am Embryonaltag (E) 16 präpariert und für 6 Tage kultiviert. Die Transfektion erfolgte am 4. Tag in vitro (DIV 4). An DIV 5 wurden die Zellen fixiert und mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert und über einen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper visualisiert.

Gezeigt wird die Lokalisation von Synaptophysin und den vesikulären Glutamat- und GABA Transportern in synaptischen Boutons an Neuronen aus einer Kontrollkultur.

**A:** Dreifachfärbung eines Neurons. VGLUT1/2 und VGAT wurden mithilfe des Farbstoffes Cy5 sichtbar gemacht und werden hier in Falschfarbe dargestellt. Bei Kolo-kalisation von VGLUT 1/2 und Synaptophysin (SyP) führt die Bildkombination zu violetten Farbflächen. Der Pfeil zeigt auf einen Kontakt ohne das gleichzeitige Vorkommen von VGLUT 1/2.

**B:** Das gleiche Prinzip der Färbung in der Anwendung für SyP und VGAT.

Durch C3bot konnte die Anzahl von VGLUT1/2-positiven Terminalien im Vergleich zur Kontrolle mit 17,4 Kontakten/ROI um 25% gesteigert werden und durch C3bot<sup>156-181</sup> um 30 %. C3bot<sup>163-177</sup> führte zu keinem Effekt (Abb. 9).



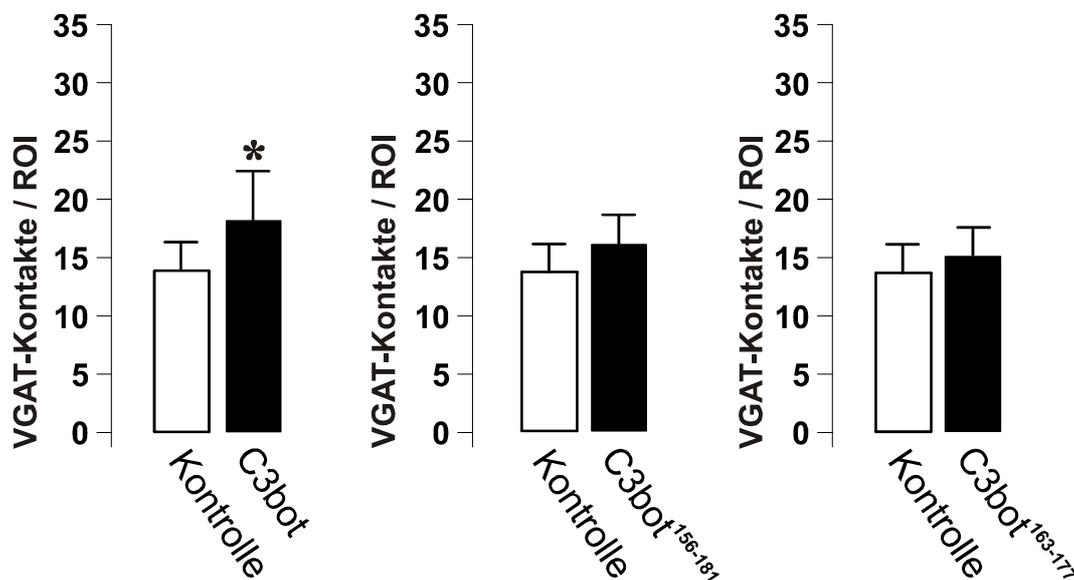
### Abbildung 9

#### *C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> erhöhen die Zahl VGLUT 1/2-positiver synaptischer Kontakte*

Kultivierte Hippocampusneurone wurden ab DIV 1 für 5 Tage mit C3bot (80 nM), C3bot<sup>156-181</sup> oder C3bot<sup>163-177</sup> (jeweils 50nM) behandelt. Die Transfektion mit eGFP erfolgte an DIV 5. Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen eGFP sowie die vesikulären Glutamattransporter VGLUT1/2 markiert. Die Quantifizierung der Markerproteine ergab eine Steigerung der Anzahl synaptischer Kontakte nach Behandlung mit C3bot (80 nM) und C3bot<sup>156-181</sup>. Für C3bot<sup>163-177</sup> konnte kein Effekt nachgewiesen werden.

Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments  $\pm$  Standardfehler. Pro Bedingung wurden 30 Neurone ausgewertet. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

Für die Färbung mit VGAT wurde für die drei Bedingungen eine Steigerung der Kontaktzahlen gemessen. C3bot erhöhte die die synaptischen Kontakte um 31% (von 13,8 Kontakte/ROI auf 18,1). C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>163-177</sup> führten zu keinen signifikanten Effekten (Abb. 10).



**Abbildung 10**

*C3bot erhöht die Zahl VGAT-markierter synaptischer Kontakte*

Kultivierte Hippocampusneurone wurden ab DIV 1 für 5 Tage mit C3bot (80 nM), C3bot<sup>156-181</sup> oder C3bot<sup>163-177</sup> (jeweils 50nM) behandelt. Die Transfektion mit eGFP erfolgte an DIV 5. Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen eGFP sowie den synaptischen GABA-Transporter VGAT gefärbt. Die Quantifizierung ergab eine Steigerung der Anzahl synaptischer Kontakte nach Behandlung mit C3bot (80 nM). Für C3bot<sup>156-181</sup> (50 nM) und C3bot<sup>163-177</sup> (50 nM) war der Effekt nicht signifikant.

Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments  $\pm$  Standardfehler. Pro Bedingung wurden 30 Neurone ausgewertet. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

### 3.1.4 Synaptische Konnektivität unter Wirkung von CSPG

Um eine positive Wirkung von C3bot und seinen Peptiden im Zusammenhang mit der Schädigung neuronalen Gewebes zu untersuchen, wurden Hippocampusneurone auf inhibitorischem Substrat kultiviert und wiederum die Anzahl der synaptischen Kontakte quantifiziert.

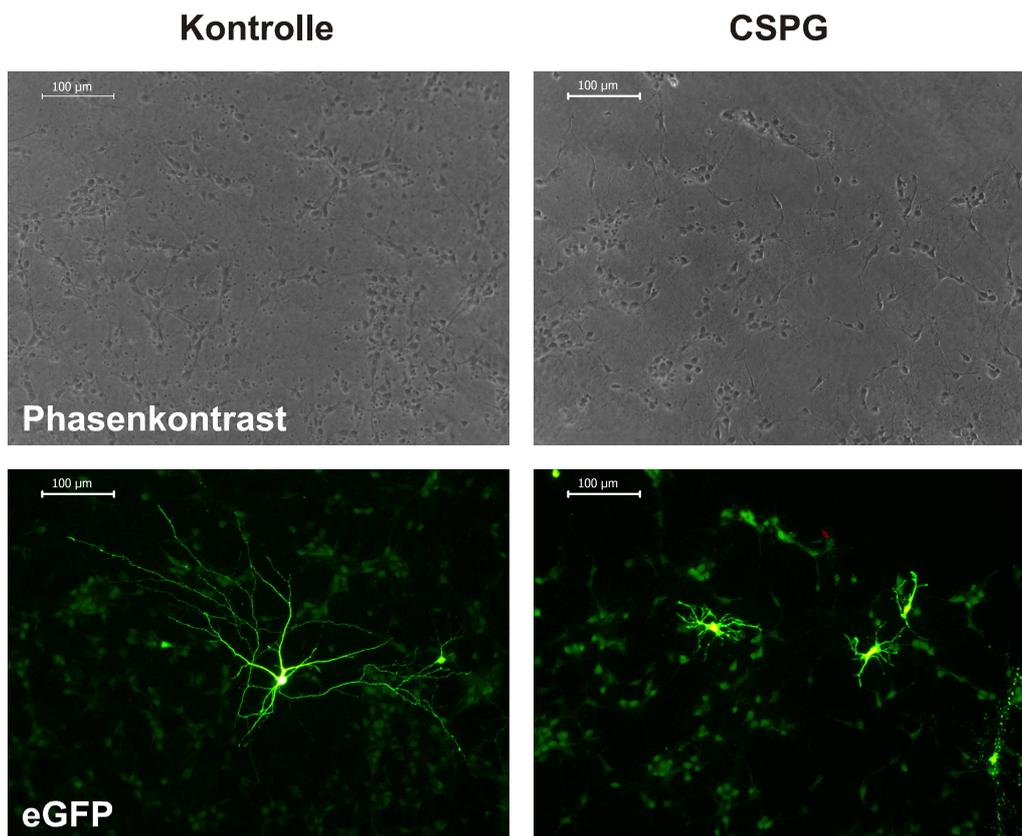
Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG) sind Bestandteile der Extrazellulärmatrix. Sie bestehen aus einem Kernprotein und daran angehängten Zuckerketten unterschiedlicher Länge, in denen die Disaccharide Glukuronsäure und N-Acetyl-Galaktosamin  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidisch verknüpft sind. Dabei tritt meist ein Sulfatrest an unterschiedlichen Positionen eines Disaccharids auf (Sugahara und Mikami, 2007). Das Kernprotein umfasst verschiedene Entitäten mit einem Molekulargewicht

zwischen etwa 100-600 kDa. Dabei kommen GPI-verankerte, Transmembran- und sezernierte Varianten vor, die von allen im ZNS befindlichen Zelltypen mit unterschiedlicher Spezifität produziert werden (Ahono und Oohira, 2006). In dieser Arbeit wurden in einem Gemisch befindlich vor allem Aggrecan, Versican, Neurocan und Phosphacan verwendet, die allesamt in die EZM sezerniert werden.

CSPGs wirken zunächst als inhibitorische Leitstrukturen bei der Entwicklung neuronaler Leitungsbahnen. Wandernde neuronale Vorläuferzellen und sich entwickelnde Axone werden dabei von attraktiven und repulsiven Strukturen an die richtigen Orte zur Verschaltung in funktionellen Kerngebieten geführt. So überschreiten Axone aus der Retina bei der Entwicklung des optischen Systems aufgrund eines Rings aus CSPGs nicht die Retinagrenze und projizieren im Tectum aufgrund einer ähnlichen Barriere auch nicht auf die gegenüberliegende Seite.

Im Rahmen neuronaler Plastizität sind die CSPGs einschränkende Komponenten, die als Bestandteil sogenannter perineuraler Netze die Reiz-abhängige Neu- und Umordnung von Verknüpfungen verhindern (Laabs et al., 2005). Nach einer Verletzung von Nervengewebe sammeln sich rund um den Ort der Schädigung reaktive Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, die zusammen mit neu sezernierter EZM die gliale Narbe bilden. Bestandteil dieses Gewebes ist auch CSPG, welches das Neuauswachsen von Axonen und ihre Überwindung dieses Gebietes verhindern. Dem kann eine Schutzfunktion für die Neurone zugeschrieben werden. Dabei wirkt CSPG vor allem über die Aktivierung des Rho-Rho-Kinase-Signalweges (Busch und Silver, 2007).

Es wurde getestet, wie sich das neuronale Wachstum auf CSPG darstellt. Neurone wurden auf CSPG-beschichteten Platten kultiviert. Nach sechstägiger Inkubation und anschließender Antikörper-Färbung der Neurone und Synapsen wurden diese mit dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 11).



### Abbildung 11

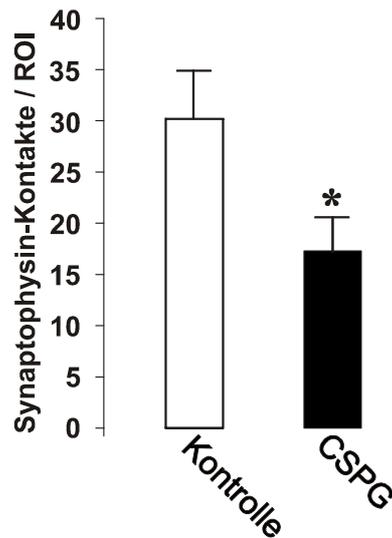
*Darstellung von unbehandelten und auf CSPG gewachsenen Kulturen*

Die linke Seite zeigt einen Ausschnitt aus einer Kultur unbehandelt gewachsener Neurone. Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme zeigen den gleichen Ausschnitt.

Die rechte Seite zeigt einen Ausschnitt aus einer Kultur, die auf CSPG gewachsen ist. Hier sind wesentlich weniger Neurone als in der Kontrolle verblieben, was in der Phasenkontrastaufnahme sichtbar ist. In der eGFP-Aufnahme zeigte sich ein verringertes Fortsatzwachstum.

Auffällig war, dass wesentlich weniger transfizierte Neurone als in der Kontrolle vorlagen. Die Morphologie war im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung in ihrer Komplexität reduziert. Diese Beobachtung wurde in dieser Arbeit nicht quantitativ erfasst, zeigt aber, dass CSPG wie erwartet einen negativen Einfluss auf das Wachstum hat. Die Zählung der synaptischen Kontakte wurde an den gleichen Bildern durchgeführt.

Die Auswertung der Bilder zeigte, dass Neurone, die auf CSPG gewachsen waren, eine starke Verringerung der synaptischen Kontakte um 43% von 30,1 Kontakten/ROI auf 17,3 aufwiesen (Abb. 12).



### Abbildung 12

#### *Neurales Wachstum auf CSPG vermindert die Anzahl synaptischer Kontakte*

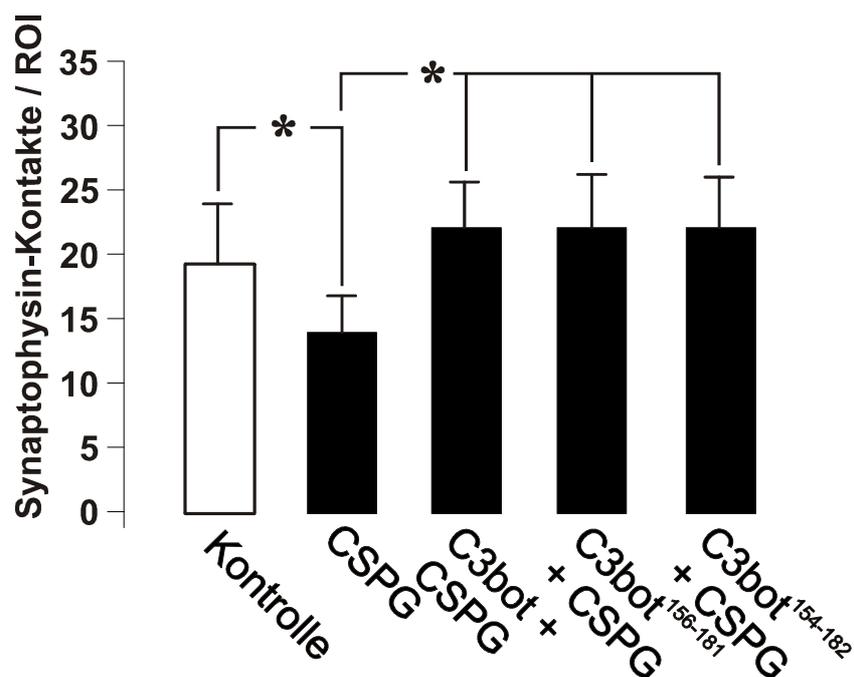
Hippocampusneurone wurden auf CSPG 6 Tage kultiviert. Die Transfektion mit eGFP erfolgte an DIV 5. Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen eGFP sowie das synaptische Markerprotein Synaptophysin gefärbt. Die Quantifizierung des Markerproteins ergab eine Verringerung der Anzahl synaptischer Kontakte bei Wachstum auf CSPG.

Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments  $\pm$  Standardfehler. Pro Bedingung wurden 30 Neurone ausgewertet. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

### 3.1.5 Wirkung von C3bot und C3bot-Peptiden auf synaptische Kontakte bei Wachstum auf CSPG

Nach der erwarteten Beobachtung, dass sich die Anzahl der synaptischen Kontakte an Nervenzellen unter CSPG-Inhibition verringert, wurden sowohl C3bot als auch die beiden Peptide an auf CSPG kultivierten Neuronen angewendet und die Synapsen ausgezählt.

Die Neurone wuchsen 24 Stunden unbehandelt auf CSPG und erhielten dann eine fünftägige Behandlung mit C3bot und den Peptiden C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>154-182</sup>. Für letzteres wurden schon Ergebnisse veröffentlicht (Höltje et al., 2009). Hier wurde es weiter untersucht (Abb. 13).



### Abbildung 13

*C3bot und C3bot-Peptide erhöhen die Zahl synaptischer Kontakte bei Wachstum auf inhibitorischem Substrat*

Kultivierte Hippocampusneurone wuchsen ab DIV 0 auf CSPG und wurden ab DIV 1 für 5 Tage mit C3bot (80 nM), C3bot<sup>156-181</sup> oder C3bot<sup>154-182</sup> (jeweils 50nM) behandelt. Die Transfektion mit eGFP erfolgte an DIV 5. Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen eGFP sowie das synaptische Markerprotein Synaptophysin gefärbt. Die Quantifizierung des Markerproteins ergab eine vermehrte Anzahl synaptischer Kontakte nach Behandlung mit C3bot bei Wachstum auf CSPG im Vergleich zum unbehandelten Wachstum auf CSPG. In gleichem Maße erhöhten C3bot<sup>156-181</sup> (50 nM) und C3bot<sup>154-182</sup> (50 nM) die Zahl synaptischer Kontakte unter dieser Bedingung.

Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments ± Standardfehler. Pro Bedingung wurden 30 Neurone ausgewertet. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

C3bot<sup>163-177</sup> hatte in den vorher gezeigten Versuchen ein unklares Bild gezeigt und wurde in diesem Zusammenhang nicht weiter untersucht.

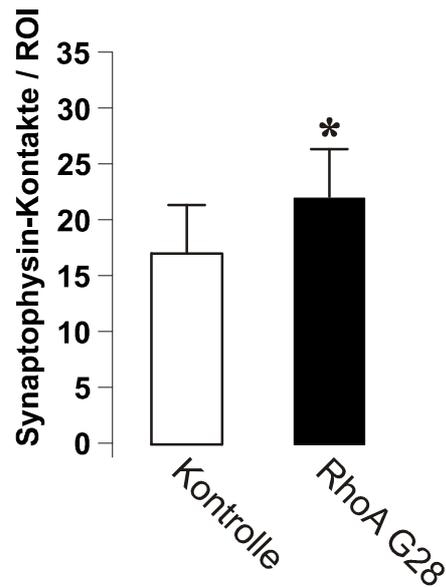
### 3.1.6 Anzahl synaptischer Kontakte bei knock-down von RhoA

Um zu untersuchen, ob die gezeigten Effekte der Peptide trotz fehlender Enzymaktivität auf einer RhoA-abhängigen Wirkungsweise beruhen, wurde das RhoA-Level in den Neuronen mittels einer siRNA (RhoA G28) in knock-down-Ansätzen verringert.

siRNAs zählen zu den kleinen RNAs, einer heterogenen Gruppe von 21-28 Nukleotiden langen doppelsträngigen RNAs, die aus größeren RNA-Strängen durch RNAsen (z.B. Dicer) herausgeschnitten werden. Das entstandene Fragment bildet einen Komplex mit Proteinen (RNA-induced silencing complex), welcher für die komplementäre Anlagerung an die Ziel-mRNA sorgt. Diese wird an der entsprechenden Sequenz entwunden und geschnitten. Dieser mRNA-Abschnitt liegt nun frei im Cytoplasma und wird durch Nukleasen abgebaut. Dieser Mechanismus wird von Zellen unter anderem dazu benutzt, virale RNA abzubauen, um die Produktion viraler Proteine zu verhindern. In der molekularbiologischen Forschung kann durch Einbringung der siRNA ein gewünschtes Protein in der lebenden, kultivierten Zelle ausgeschaltet werden (Tuschl, 2001).

Im experimentellen Ansatz wurden die Zellen zunächst für insgesamt sechs Tage unbehandelt kultiviert. Am fünften Tag jedoch erhielt ein Teil der Zellen einen Vektor, der eGFP und die siRNA RhoA G28 kombiniert enthielt. Die erfolgreiche Transfektion konnte mittels der Expression von eGFP in der Immunfluoreszenz überprüft werden. Ausgehend davon, dass die Degradierung der mRNA für RhoA aufgrund der siRNA-Gabe im Überschuss vollständig ablief und die Translation des Proteins ebenso komplett gestoppt wurde, verblieb nur die bis zu diesem Punkt produzierte Menge der Rho-GTPase. Die Halbwertszeit von RhoA konnte bisher in einer Makrophagen-Zelllinie mit 31 Stunden angegeben werden (Backlund, 1997). Nimmt man dies zur Grundlage, ist anzunehmen, dass die funktionsfähige Menge innerhalb von 24 Stunden auf einen Bestand von 58% absinkt. Da die Transfektionsrate der Neurone mit dem sowohl eGFP als auch die siRNA enthaltenden Vektor gering war, konnte ein proteinbiochemischer Nachweis einer geringeren RhoA-Menge nach knock-down in Hippocampuskulturen nicht erbracht werden, wird aber auch für die Versuche angenommen.

Die mit RhoA G28 für einen Tag transfizierten Neurone zeigten einen signifikanten Anstieg der Zahl der synaptischen Kontakte. Die Verminderung der Menge von RhoA führte zu einer Erhöhung der synaptischen Kontaktzahlen bei der Zählung an Synaptophysin-markierten Terminalien um + 26% bei einer Kontrolle mit 17,5 Kontakten/ROI (Abb. 14).



#### Abbildung 14

##### *Knock-down von RhoA erhöht die Anzahl synaptischer Kontakte*

Kultivierte Hippocampusneurone wurden am DIV5 mit eGFP und der siRNA RhoA G28 in einem Vektor transfiziert. Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen eGFP und das synaptische Markerprotein Synaptophysin gefärbt. Die Quantifizierung der Markerproteine ergab eine Steigerung der Anzahl synaptischer Kontakte nach Behandlung mit der siRNA. Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments  $\pm$  Standardfehler. Pro Bedingung wurden 30 Neurone ausgewertet. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

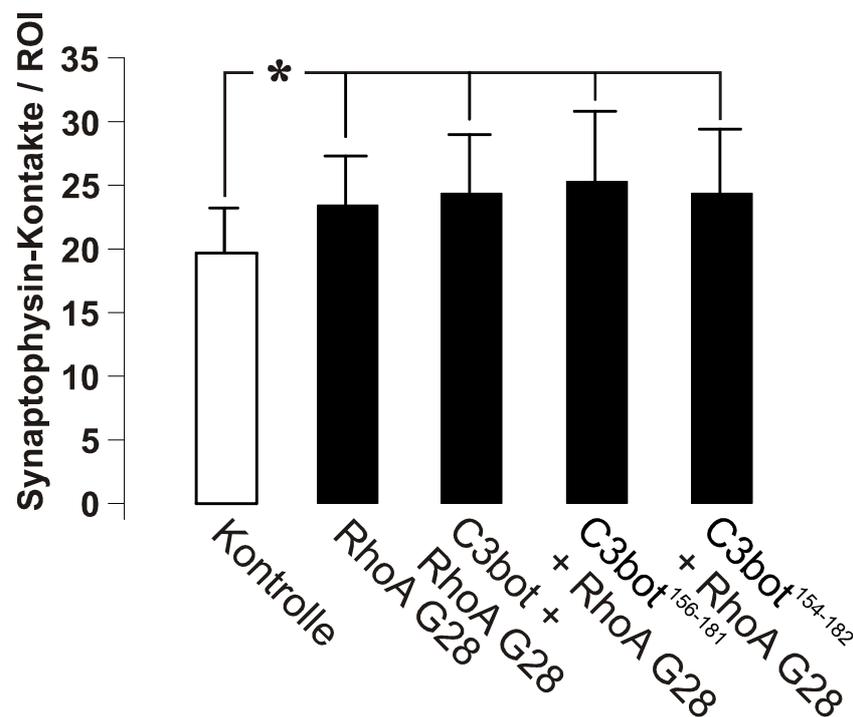
### 3.1.7 Synaptische Konnektivität bei knock-down von RhoA – Untersuchung auf additive Effekte durch C3bot und seine Peptide

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der knock-down von RhoA zu einer Erhöhung der synaptischen Kontaktzahlen führt, sollte ermittelt werden, ob C3bot und C3bot-Peptide unter dieser Bedingung eine zusätzliche Steigerung der Zahlen über das beobachtete Niveau hinaus bewirken.

Die Hippocampusneurone wurden für fünf Tage mit C3bot, C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>154-182</sup> behandelt. Am fünften Tag erfolgte die siRNA-Transfektion und am sechsten Tag die Fixierung der Zellen. Damit konnten die angewendeten Substanzen für vier Tage auch an RhoA als Interaktionspartner agieren. Für weitere 24 Stunden wurde wie oben bereits beschrieben ein knock-down von RhoA durchgeführt.

Die synaptischen Kontakte wurden in diesem Experiment an Synaptophysin-gefärbten Kulturen ermittelt.

Im Vergleich zur Kontrolle (19,6 Kontakte/ROI) erhöhte die siRNA die Anzahl der Kontakte um 20%. In der Kombination der drei Substanzen mit der siRNA-Anwendung führte die zusätzliche Anwendung von C3bot zu einer Steigerung von 24%, von C3bot<sup>156-181</sup> zu 30% und von C3bot<sup>154-182</sup> zu 24%, was gegenüber dem Ergebnis der unbehandelten Neurone signifikant ist, aber im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit der siRNA keine zusätzliche, signifikante Erhöhung darstellt (Abb. 15).



### Abbildung 15

*Anwendung von C3bot und C3bot-Peptiden zeigt keine zusätzlichen Effekte auf die synaptische Konnektivität bei knock-down von RhoA*

Kultivierte Hippocampusneurone wurden ab DIV 1 für 5 Tage mit C3bot (80 nM), C3bot<sup>156-181</sup> oder C3bot<sup>154-182</sup> (jeweils 50nM) behandelt. Die Transfektion mit eGFP und der siRNA RhoA G28 erfolgte an DIV 5. Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen eGFP sowie das synaptische Markerprotein Synaptophysin gefärbt. Die Quantifizierung des Markerproteins ergab eine Steigerung der Anzahl synaptischer Kontakte nach Transfektion mit der siRNA. In Kombination der siRNA und den Substanzen kommt es zu keiner weiteren Steigerung der Werte.

Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments ± Standardfehler. Pro Bedingung wurden 30 Neurone ausgewertet. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

### **3.2 Proteinbiochemische Analyse des Expressionsniveaus synaptischer Proteine hippocampaler Neurone der Maus**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Anzahl synaptischer Kontakte an transfizierten hippocampalen Kulturen nach Behandlung mit C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> steigen und C3bot<sup>163-177</sup> keinen Effekt zeigt, wurde untersucht, ob sich Veränderungen im Expressionsniveau der in den Versuchen angefärbten Proteine auch proteinbiochemisch nachweisen lassen.

Hierfür wurden ebenfalls primäre Hippocampuskulturen der Maus verwendet und für die Gelelektrophorese nach Inkubation mit den Substanzen aufbereitet. Es wurden in Laemmli-Probenpuffer gelöste Gesamtzellsuspensionen auf die Gele aufgetragen. Nach dem Blotten der Proteine aus den Gelen auf Nitrocellulosemembran wurden Antikörper für die spezifische Markierung der Proteine verwendet und die gebundenen Antikörper mittels an entsprechende Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase und dem ECL-Reagenz in der Fotokammer sichtbar gemacht.

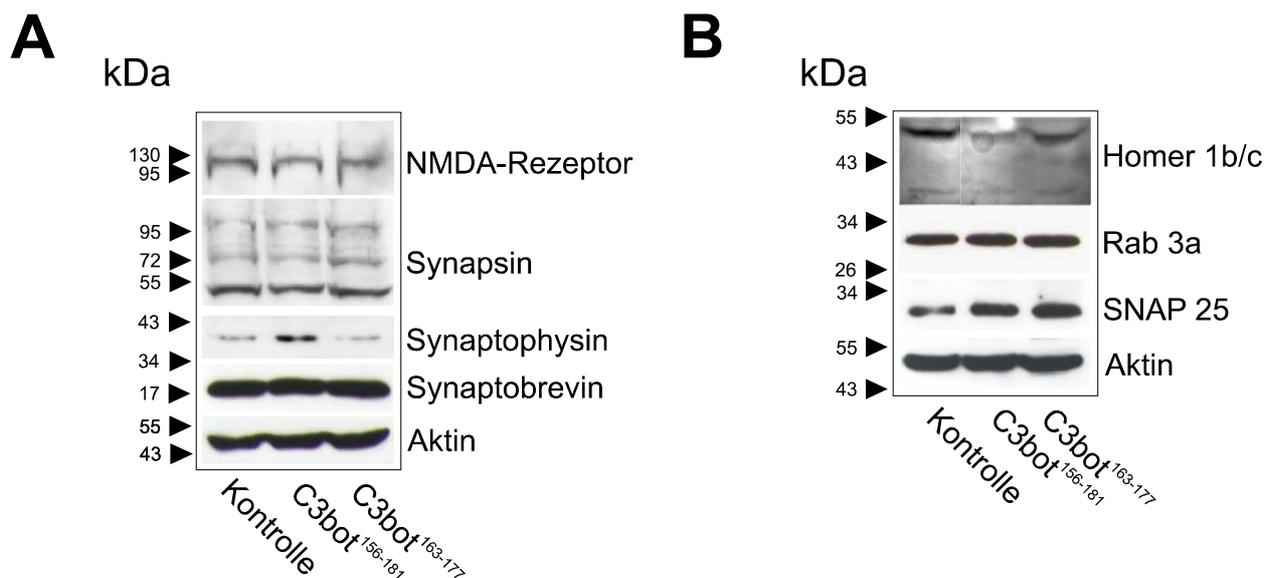
Die zur Darstellung der Synapsen verwendeten Proteine wurden weiter oben schon beschrieben. Außerdem wurden weitere prä- und postsynaptische Marker verwendet, um ein etwas umfassenderes Bild möglicher Veränderungen in der molekularen Struktur der Synapsen zu erfassen (Abb. 16).

Homer 1 b/c, ein Mitglied der Familie der Homer-Proteine, sitzt in der dendritischen Plasmamembran und agiert mit seiner PDZ-ähnlichen Domäne als Regulator metabotroper Glutamatrezeptoren und bildet wahrscheinlich zusammen mit weiteren Proteinen Aggregate der Interaktion bei Signalübertragung (Brakeman et al., 1997). Hierbei spielt es eine erhebliche Rolle in der frühen noch embryonalen Entwicklung des Gehirns. Man findet es vor allem in der CA1 Region des murinen Hippocampus (Shiraishi et al., 2004).

Experimente mit verschiedenen nicht-endogenen Aminosäuren führten zur Klassifikation von zentralnervösen Rezeptoren, zu denen der NMDA-Rezeptor gehört, dem als endogener Agonist Glutamat als exzitatorische Aminosäure zuzuordnen ist. Dieser findet sich auch an Neuronen des Hippocampus in der postsynaptischen Membran und ist beteiligt an der Long-Term-Potentiation (Stone und Burton, 1988).

Rab 3a kommt als Mitglied der Rab/Ypt-Familie kleiner GTPasen am häufigsten vor. Im GTP-gebundenen Zustand bindet es an vesikuläre Membranen der Präsynapse. Über diverse Effektorproteine und Bindung an das Zytoskelett dient es dem Transport von Vesikeln an die Zielmembran. Dabei interagiert es mit verschiedenen Bestandteilen dieser Membran und ist beteiligt an der Aktivierung des SNARE-Komplexes (Gonzalez und Scheller, 1999).

SNAP 25 findet sich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran und der Membran sekretorischer Vesikel. Dort bildet es Komplexe mit weiteren SNARE-Proteinen wie Synaptobrevin und Syntaxin und ist beteiligt an der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Ausschüttung von Neurotransmittern. Es wird von clostridialen Neurotoxinen (A, C1 und E) in der Nähe des Carboxyterminus geschnitten, was zur Verminderung der Exozytose führt (Hodel, 1998).



### Abbildung 16

#### *Expressionsmuster synaptischer Proteine in Hippocampusneuronen*

Kultivierte Hippocampusneurone wurden für fünf Tage mit C3bot<sup>156-181</sup> oder C3bot<sup>163-177</sup> inkubiert. Unbehandelte Kulturen dienten als Kontrolle. Mittels Proteingelelektrophorese und anschließendem Westernblot-Verfahren erfolgte der Proteinnachweis mit Antikörpern gegen prä- und postsynaptische Proteine (siehe Text). Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Reagenz. Aktin wurde als interner Standard zur Ladekontrolle verwendet.

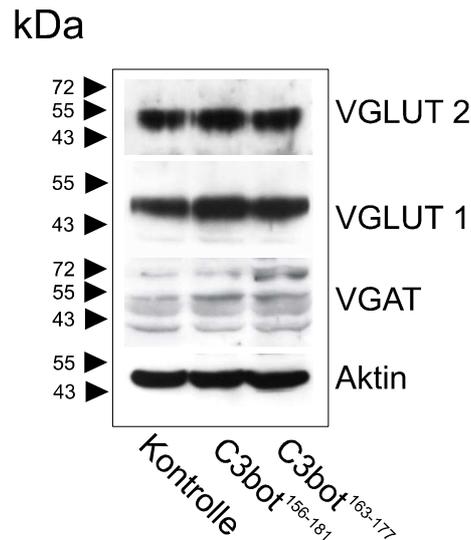
Synapsin kommt in verschiedenen Isoformen unterschiedlicher Molekulargewichte (Ia 80 kDa, Ib 86 kDa, II 55kDa und III 74 kDa) vor. In seiner Bindung an die synaptischen Vesikel ist es unter anderem an der Stabilisierung der Vesikelmembran

beteiligt und bildet Anhäufungen von Vesikeln, die dazu dienen, freie Diffusion im Zytosol und zufällige Vesikel-Membran-Fusionen zu verhindern und einen Reserve-Pool aufrecht zu erhalten. Bevor Vesikel sich im Rahmen der Exozytose in den synaptischen Spalt entleeren, dissoziiert Synapsin von diesen ab (Cesca et al., 2010). Aktin gehört zu den am weitesten verbreiteten Proteinen aller Gewebe des Körpers. Als G-Aktin-Monomer und nach Bindung und Hydrolyse von ATP als F-Aktin-Filament polymerisiert in Doppelhelixform vorliegend (Holmes et al., 1990) ist es Bestandteil des kontraktiven Apparats von Muskelzellen und Strukturprotein im Zytoskelett. Mit einem Anteil von 5% am Gesamtprotein des Gehirns (Bray und Gilbert, 1981) dient es im Western-Blot-Verfahren als Marker für den Vergleich der Proteinmenge der einzelnen Proben.

Die aus den hippocampalen Kulturen gewonnenen Proben wurden anhand der Ergebnisse im BCA-Test bezüglich ihrer Proteinkonzentration einander angeglichen. Anhand der Markierung von Aktin zeigte sich, dass in der Proteinmenge kein Unterschied zwischen den Proben der einzelnen Bedingungen herrschte und verschiedene Expressionslevel der betrachteten Proteine weder darauf zurückzuführen waren noch davon beeinflusst wurden.

Es konnte für Synaptophysin und SNAP 25 gezeigt werden, dass eine Behandlung der Kulturen mit C3bot<sup>156-181</sup> zu einer vermehrten Expression des Proteins führt. Für C3bot<sup>163-177</sup> war das nur für SNAP 25 der Fall. Bei Rab3a, Homer 1b/c, Synapsin und dem NMDA-Rezeptor konnte keine Veränderung gezeigt werden.

Die weiteren zur Markierung von Synapsen und Bestimmung der synaptischen Kontaktzahlen angefärbten Proteine – VGLUT1, VGLUT2, VGAT und Synaptobrevin – zeigten keine Änderung ihres Expressionsniveaus (Abb.17).



### Abbildung 17

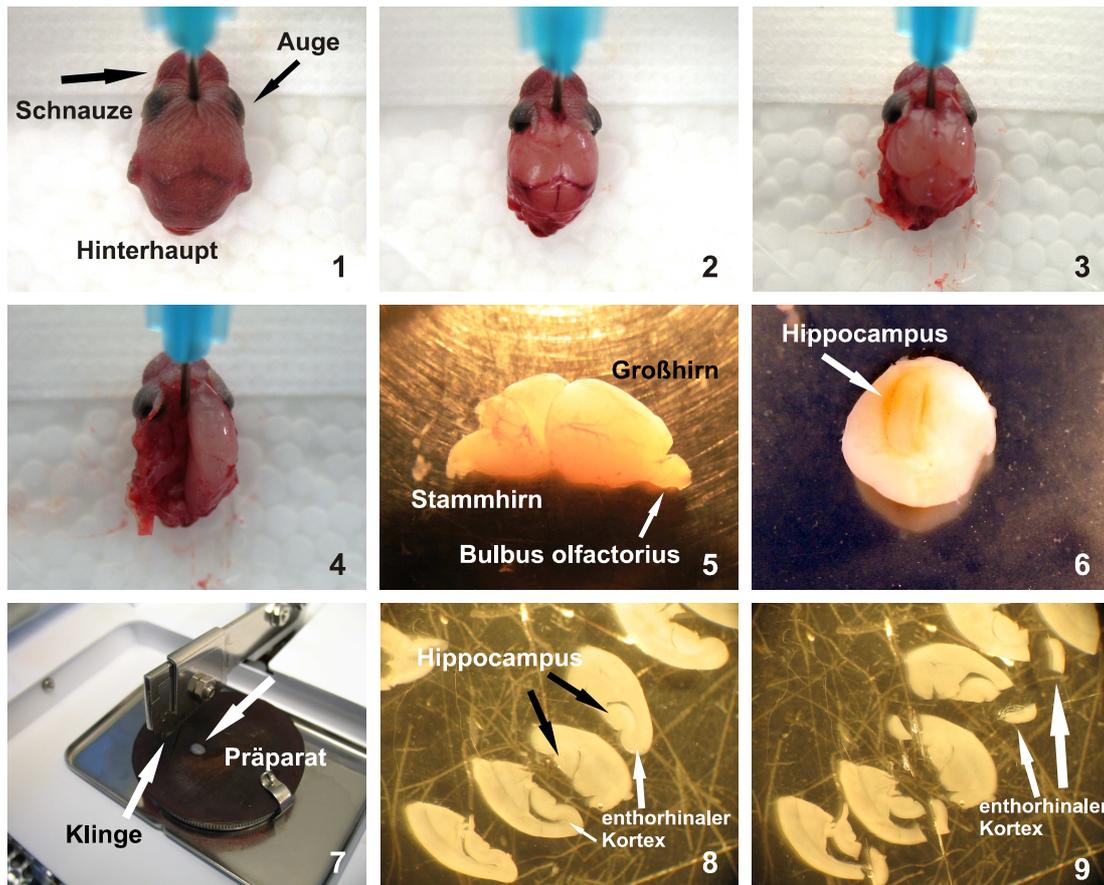
#### *Expressionsmuster vesikulärer Transportproteine in Hippocampusneuronen*

Kultivierte Hippocampusneurone wurden für fünf Tage mit C3bot<sup>156-181</sup> oder C3bot<sup>163-177</sup> inkubiert. Unbehandelte Kulturen dienen als Kontrolle. Mittels Proteingelelektrophorese und anschließendem Westernblot-Verfahren erfolgte der Proteinnachweis mit Antikörpern gegen Aktin als internem Standard, sowie gegen die vesikulären Glutamattransporter 1 und 2 und den vesikulären GABA-Transporter. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Reagenz. Aktin wurde als interner Standard zur Ladekontrolle verwendet.

### 3.3 Axonales Wachstum an organotypischen Hirnschnittkulturen

Nach der Erhebung von Daten zu synaptischen Kontaktzahlen und der Bestimmung des Expressionsniveaus strukturell dafür in Frage kommender Proteine wurde die Auswirkung der Behandlung von Neuronen mit C3bot-Gesamtprotein und C3bot-Peptiden an einem Modell für die Betrachtung des Wiederauswachsens von Axonen betrachtet.

Organotypische Hirnschnittkulturen sind als Anwendung bei neuronalen Geweben gut etablierte Systeme, die in ihrer Komplexität näher an der *in-vivo*-Situation liegen als die Dissoziationskulturen, aber eine genauere Kontrolle der Versuchsbedingungen erlauben als im lebenden Tier. Es ist ein Präparationsprotokoll von Schnitten des enthorhinalen Kortex verwendet worden, welches die Beobachtung des Auswachsens von Axonen aus dem Tractus perforans erlaubt (Abb. 18). An diesem Modell konnten für C3bot und C3bot<sup>154-182</sup> positive Effekte auf das Wachstum gezeigt werden (Höltje et al., 2009).



**Abbildung 18**

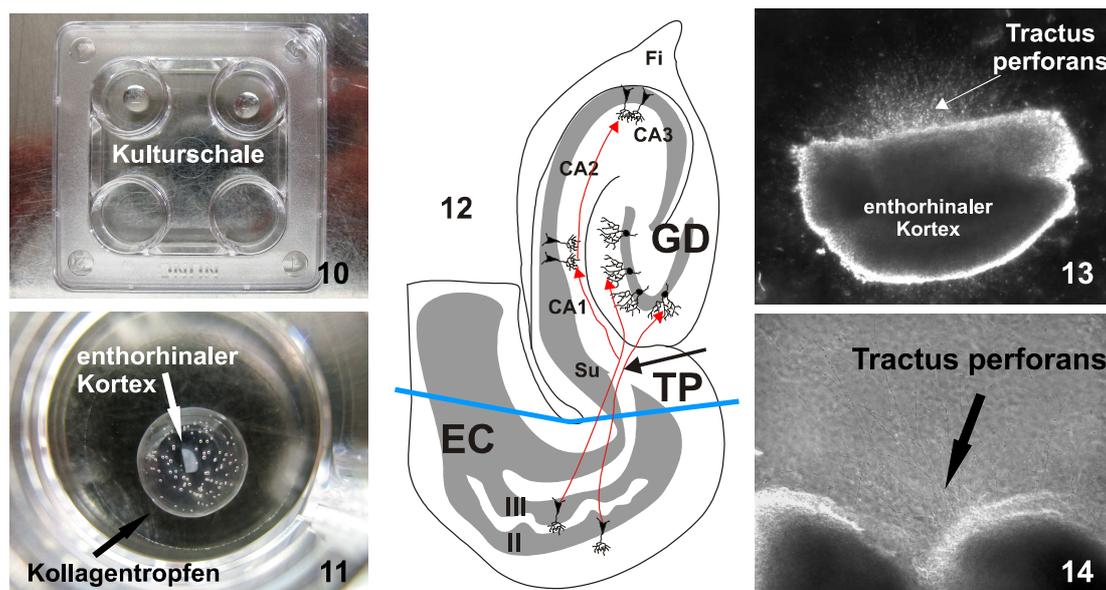
*Darstellung der Präparation des enthorhinalen Kortex der Maus*

In der obersten Bildreihe ist zunächst die Freilegung des Gehirns gezeigt. Nach Dekapitierung und Fixierung des Köpfchens auf Styropor (1) erfolgt die Entfernung der Kopfhaut und der Schädeldecke (2), so dass das Gehirn freilieg (3). Anschließend wurden die getrennten Gehirnhälften per Spatel entnommen (4) und in Präparationsmedium verbracht (5). Darin erfolgte die Entfernung von Stammhirn, Bulbus olfactorius und Marklageranteilen bis der gewünschte Teil des Kortex mit innen anliegendem Hippocampus verblieb (6). Dieses Gewebestück wurde nun auf dem Tisch des Gewebeschniders so positioniert (7), dass orthogonal zur Längsachse des Hippocampus ca. 350 µm breite Transversalschnitte angefertigt werden konnten (8).

Nun wurden Hippocampus und verbliebene, nicht gewünschte Kortexanteile entlang einer Schnittlinie mittels Skalpell abgetrennt (9).

In das Kollagen wieder auswachsende Axone konnten nach 48 h Inkubation mittels Phasenkontrastmikroskop bei 10x Vergrößerung digital fotografiert (Abb. 19) und anschließend wie oben beschrieben und in Abbildung 20 ersichtlich ausgewertet werden.

Bei der Zählung und Längenmessung wurden 15-20 Schnitte pro Bedingung in die Auswertung miteinbezogen.

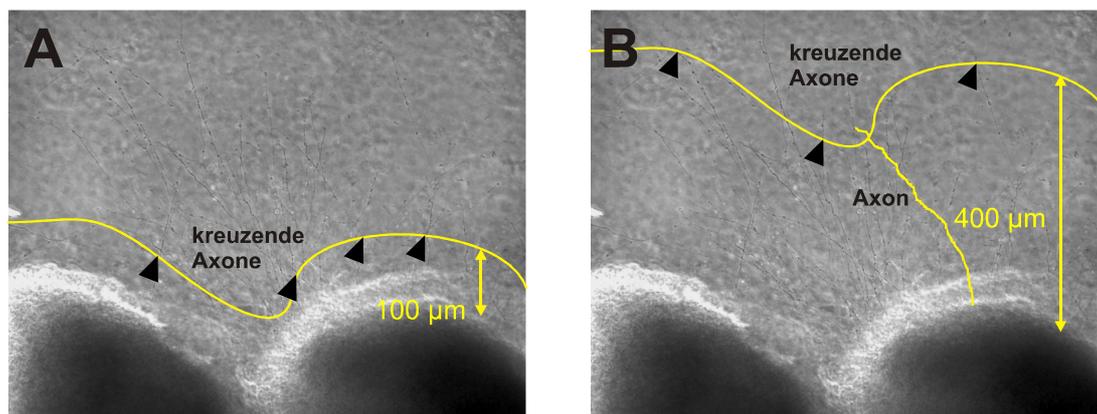


### Abbildung 19

#### Übersicht der organotypischen Hirnschnittkultur des enthorhinalen Kortex

Dargestellt ist der nach Präparation in die Kulturschale (10) verbrachte, etwa 350  $\mu\text{m}$  dicke Schnitt im Kollagentropfen (11). Das Schema (12) zeigt den Ort der Abtrennung des EC (blaue Linie) vom restlichen Kortex und den Fasern des Tractus perforans.

Nach 48 h wuchsen Fortsätze vom Schnitttrand aus in das Kollagen (13). Im Detail (14) sind die Axone deutlich zu erkennen.



### Abbildung 20

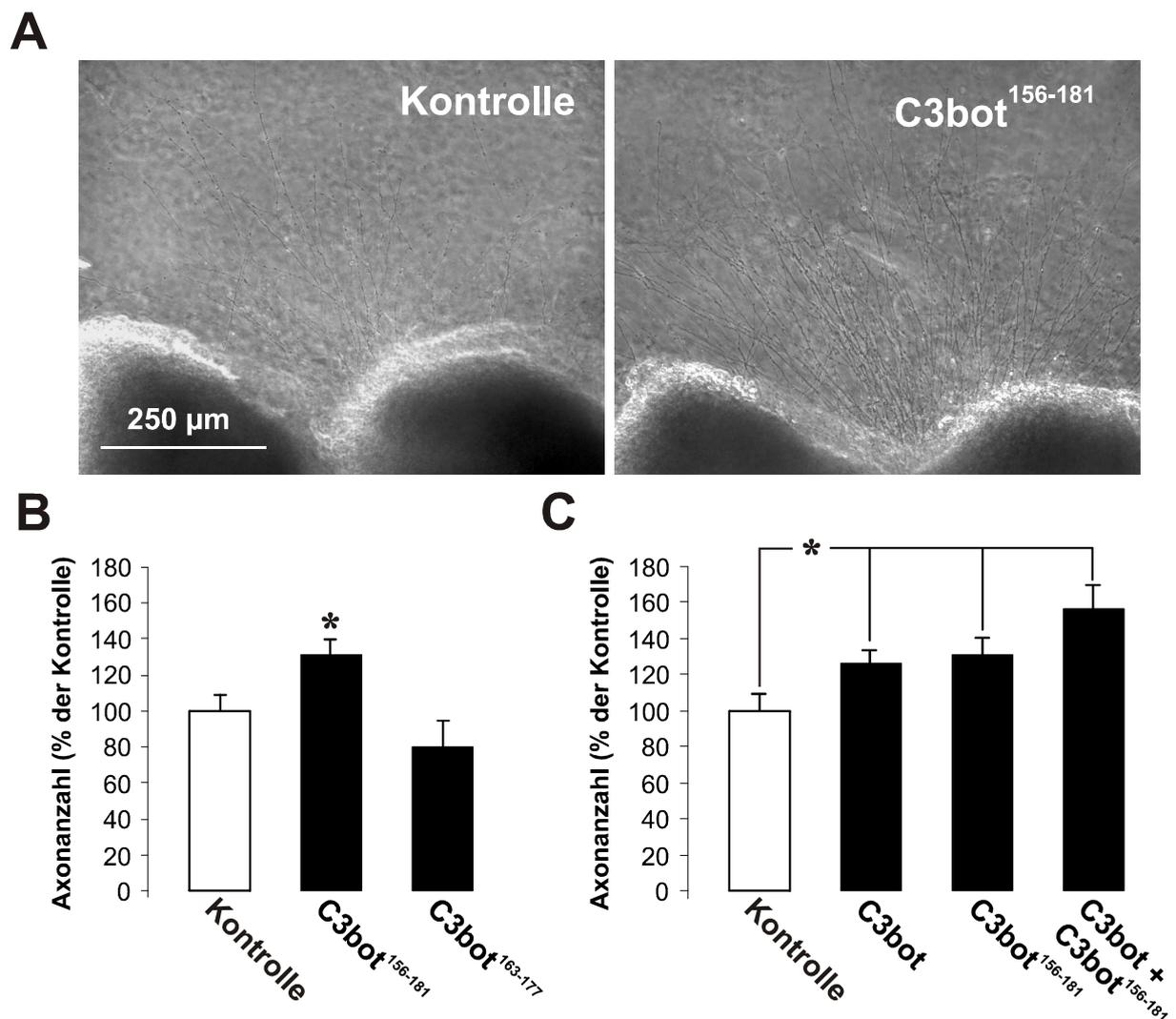
#### Prinzip der Auswertung der Bilder der enthorhinalen Kortex

Bilder mit 10x Vergrößerung aufgenommen in einer Kontrollkultur

A: Zählung der Anzahl auswachsender Axone entlang einer entsprechend dem EC-Rand geformten Linie im Abstand von 100  $\mu\text{m}$  (Pfeile markieren die die Linie kreuzenden Axone)

B: Längenmessung aller Axone, die eine Linie in einer Entfernung von 400  $\mu\text{m}$  vom EC überschreiten

Die genannten Wachstumsparameter wurden unter dem Einfluss von C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>163-177</sup> in einer Konzentration von jeweils 50 nM betrachtet. Zusätzlich wurde das Wachstumsverhalten unter C3bot als Positivkontrolle in der Konzentration von 300 nM durchgeführt, um der durch die Größe des Gesamtproteins bedingten möglicherweise behinderten Diffusion im Kollagen entgegenzuwirken. C3bot wurde des Weiteren in Kombination mit C3bot<sup>156-181</sup> hinzugefügt (Abb. 21 A, B, C und D).



### Abbildung 21

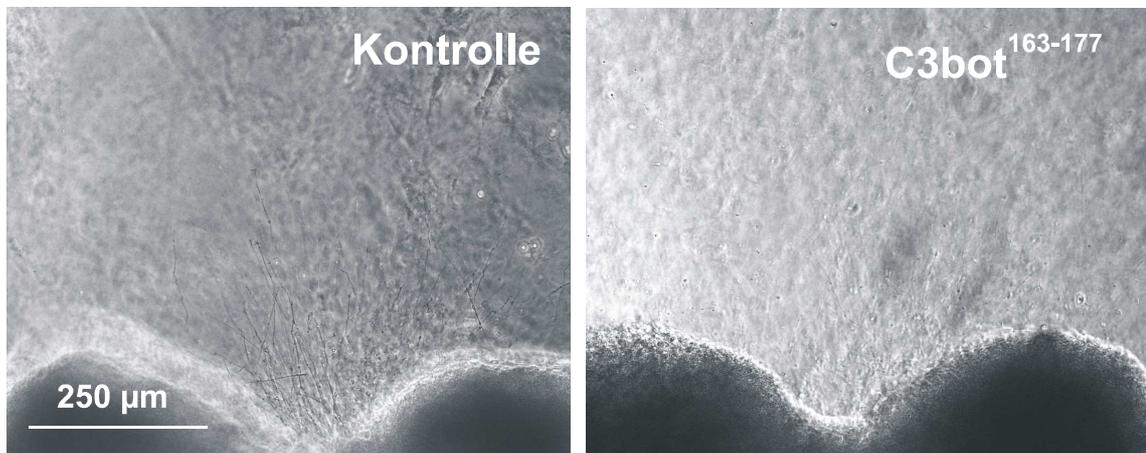
*C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> erhöhen die Zahl der auswachsenden Axone*

**A:** Exemplarische Darstellung von zwei Schnitten des enthorinalen Kortex. Unter Behandlung mit C3bot<sup>156-181</sup> zeigte sich nach 48 h Inkubation ein deutlicheres Auswachsen des Tractus perforans aus der organotypischen Hirnschnittkultur.

**B:** Im Vergleich zur Kontrolle führte die Behandlung mit C3bot<sup>156-181</sup> in einer Konzentration von 50 nM zu einer Erhöhung der Anzahl auswachsender Axone. C3bot<sup>163-177</sup> hingegen wirkte sich in gleicher Dosierung tendenziell, aber nicht signifikant negativ aus.

**C:** C3bot in einer Konzentration von 300 nM führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Axonanzahl. In Kombination mit C3bot<sup>156-181</sup> (50 nM) ergab sich eine weitere, nicht signifikante Erhöhung.

**D**



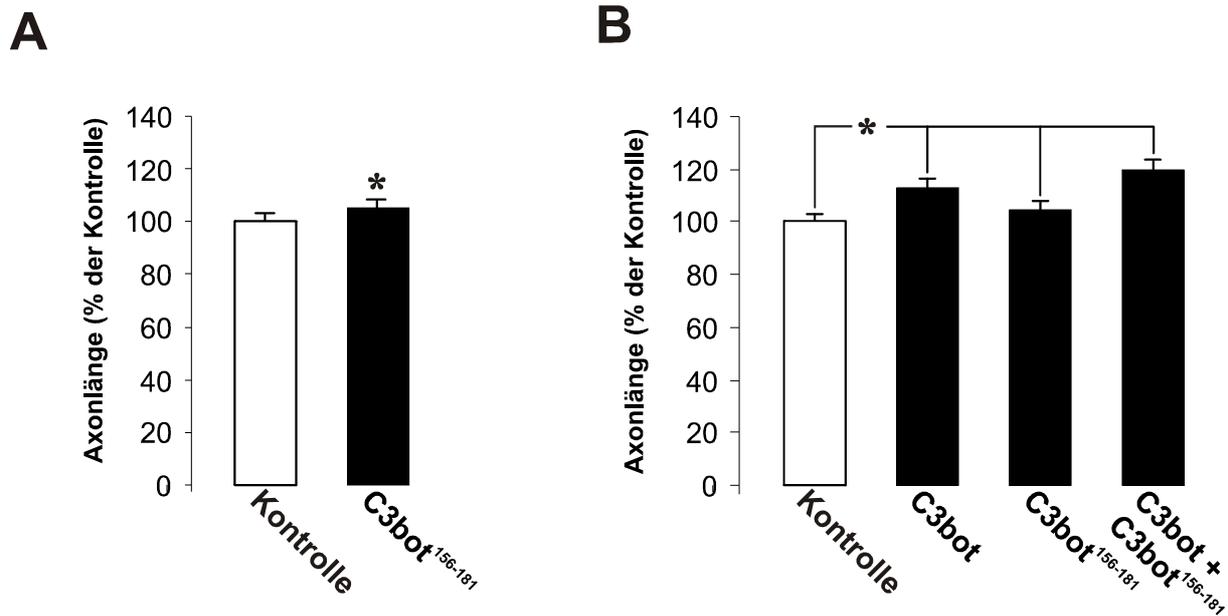
**Abbildung 21**

**D:** Darstellung wie in A, wobei hier die Kontrolle mit C3bot<sup>163-177</sup> verglichen wird. Die Werte der Kontrolle werden als 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ , \*) wurde mittels Student's t-test ermittelt.

Die Anzahl der auswachsenden Axone konnte unter der Behandlung mit C3bot<sup>156-181</sup> um 31% bezogen auf 100% als Kontrollwert erhöht werden. C3bot<sup>163-177</sup> hingegen reduzierte diese Zahl um 20% (80% des Kontrollwertes).

C3bot erhöhte die Anzahl um 32%. Die Kombination von C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> erbrachte eine Steigerung um 34,5%.

In der Längenmessung ergaben sich nur minimale Steigerungen für C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> um 13% bzw. 5% bezogen auf 100% des Kontrollwertes. Die Kombination beider Substanzen führte zu einer Erhöhung der Länge um 20% (Abb. 22). Für C3bot<sup>163-177</sup> wurde die Längenmessung nicht durchgeführt, da nur sehr wenige Axone die Grenze von 400 µm erreichten und so eine Auswertung nicht möglich war.

**Abbildung 22**

*C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> erhöhen die Länge der auswachsenden Axone geringfügig*

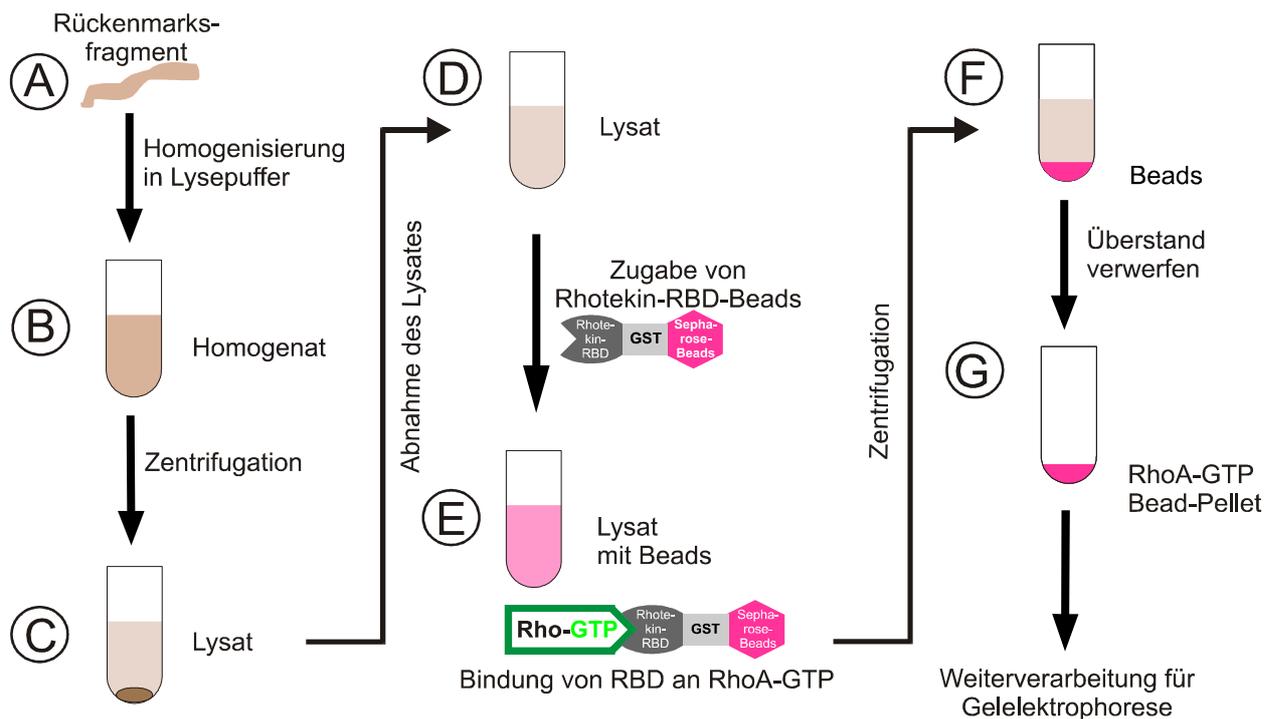
A: Im Vergleich zur Kontrolle führte die Behandlung mit C3bot<sup>156-181</sup> in einer Konzentration von 50 nM zu einer leichten Erhöhung der Länge auswachsender Axone. Diese wurden wie gezeigt ab einer Mindestlänge von 400 µm gezählt.

B: C3bot in einer Konzentration von 300 nM führte zu einem größeren Längenwachstum als C3bot<sup>156-181</sup> mit 50 nM. Die Kombination beider führte noch einmal zu einer leichten Steigerung.

Die Werte der Kontrolle werden als 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ , \*) wurde mittels Student's t-test ermittelt.

### 3.4 Wirkung von C3-Peptiden auf die RhoA-Aktivität nach Rückenmarksläsion

Entscheidend für die Anwendung der Peptide von C3bot als regenerationsfördernde Agenzien ist die Wirksamkeit *in vivo*, welche im Tiermodell zunächst bezüglich der Aktivität von RhoA betrachtet wurde. Dafür wurden Balb/C-Mäuse einer dorsalen Hemisektion des Rückenmarks auf Höhe des Thorakalsegments Th 8 unterzogen und anschließend mit den drei C3bot-Peptiden in einem Schwämmchen (5 µl mit einer Konzentration 40 µM) für 24 Stunden oder sieben Tage direkt auf der Läsionsstelle liegend behandelt. Dann wurde den Tieren das Rückenmark entnommen, in jeweils drei etwa 1 cm lange Abschnitte geteilt und für Pulldown-Analysen verwendet.

**Abbildung 23:***Schema zur Durchführung des RhoA- Pulldowns*

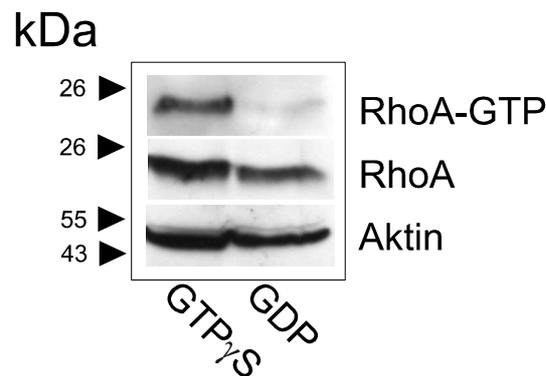
Balb/C-Mäuse wurden einer dorsalen Hemisektion des thorakalen Rückenmarks unterzogen und anschließend für 24 Stunden oder 7 Tage mit Peptiden aus C3bot behandelt. Dann wurde das Rückenmark entnommen, in einen cervikalen, thorakalen und lumbalen Abschnitt geteilt und eingefroren (A).

Die Weiterverarbeitung des thorakalen Abschnitts nach Auftauen erfolgt zügig bei 4°C auf Eis. Nach Homogenisation (B) der Rückenmarksfragmente in Lysepuffer wurde das entstandene Homogenat zentrifugiert (C). Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand war das Lysat (D). Dieses wurde mit den Rhotekin-RBD-Beads versehen (E). Es erfolgte die Bindung dieser an aktives (GTP-gebundenes) RhoA. Zentrifugation pelletierte die Beads (F), die nach Verwerfen des Überstands verblieben (G) und weiterverarbeitet werden konnten. Nach Gelelektrophorese und Western Blot wurde RhoA detektiert, das den vorher präzipitierten Teil des aktiven RhoA am Gesamt-RhoA darstellte.

Das Gewebe des thorakalen Rückenmarks, dem Ort der Läsion, sollte nun auf die Aktivität von RhoA, d.h. die Menge an GTP-gebundenem RhoA hin untersucht werden. Dazu wurde ein Pulldown-Assay durchgeführt, bei dem das aktive RhoA aus einem Lysat des homogenisierten Rückenmarks präzipitiert werden konnte (Abb. 23). Da die Hydrolyse des aktivierten RhoA nach Auftauen des Gewebes schnell fortschreitet, wurden die Gewebestücke möglichst schnell verarbeitet. Nach Homogenisation und Lyse wurden die Lysate in der Gesamtproteinkonzentration nicht aneinander angeglichen, weil die Bestimmung der Konzentration der einzelnen

Proben zu lange gedauert hätte. Die Proben wurden sofort mit den Sepharose-Beads versehen und inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte per BCA-Test im Nachhinein und zeigte, dass die Schwankungen der Proben untereinander im Toleranzbereich lagen und keiner Anpassung untereinander bedurften.

Die Funktionalität des Assays konnte mit  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , welches gebunden an RhoA nicht hydrolysierbar ist, als Positivkontrolle und GDP als Negativkontrolle im Überschuss vorliegend bestätigt werden (Abb. 24).



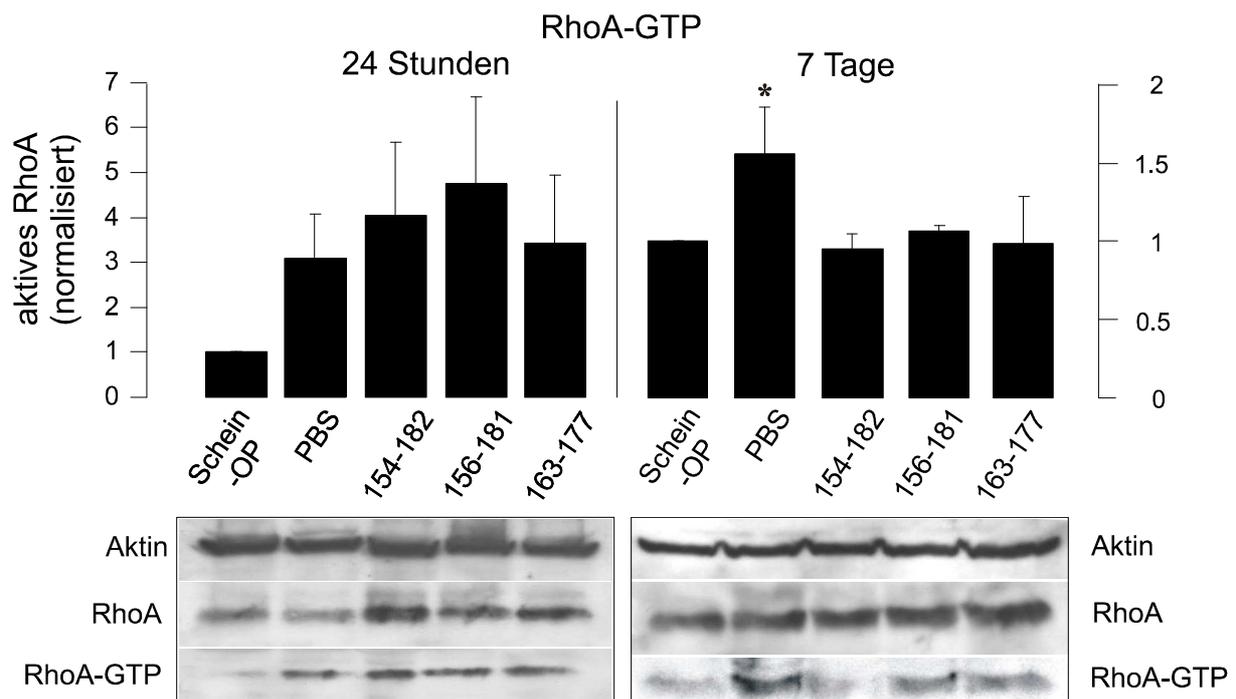
#### Abbildung 24

##### *Positiv- und Negativkontrolle für den RhoA-Pulldown-Assay*

Dafür wurden cervikale Abschnitte von scheinoperierten Tieren verwendet. Bezogen auf das als Ladekontrolle gefärbte Aktin und den Gesamt-RhoA-Gehalt der Probe konnte durch hinzufügen von  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  und GDP gezeigt werden, dass im Pulldown-Assay praktisch nur aktiviertes RhoA ( $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -gebundenes RhoA) detektiert wird.

Die nach Inkubation mit den Sepharose-Beads durch Zentrifugation der Lysate erzeugten Bead-Pellets wurden nach Entfernung des Überstands in Laemmli-Probenpuffer gelöst und komplett auf das Gel aufgetragen, um die gesamte Menge des aktivierten (an die Beads gebunden) RhoA zu erhalten.

Aus den Lysaten der Proben wurden vor Inkubation mit den Sepharose-Beads Aliquots für den BCA-Test und Western Blot abgenommen, um sowohl die Gesamtproteinmenge, als auch die von RhoA (aktiviert und nicht aktiviert) und Aktin als Ladekontrolle in der Probe zu bestimmen. Darauf wurde die Menge von aktiviertem RhoA in der jeweiligen Probe bezogen, um festzustellen, ob es sich um einen tatsächlichen Anstieg der Aktivität handelt oder dieser auf eine höhere Proteinkonzentration in der Probe zurückzuführen ist (Abb. 25).



### Abbildung 25

Einfluss von  $C3bot^{154-182}$ ,  $C3bot^{156-181}$  und  $C3bot^{163-177}$  auf das Aktivitätsniveau von RhoA nach 24 Stunden und 7 Tagen Behandlung

Das aus den Rückenmarksstücken gewonnene Lysat und das über die Rhotekin-Beads präzipitierte aktive RhoA wurden für die Gelelektrophorese mit Laemmli-Probenpuffer versehen. Anschließend wurden die Proteinbanden auf Nitrocellulose-Membran gebロットet, mit Antikörpern gegen Aktin und RhoA inkubiert und schließlich in der ECL-Detektion sichtbar gemacht.

Die Abbildung zeigt die Situation 24 Stunden und 7 Tage nach Rückenmarks-OP.

Das Balkendiagramm stellt das Niveau der RhoA-Aktivität unter Behandlung mit PBS und den drei Peptiden aus C3bot im Vergleich zum unbehandelten, scheinoperierten Tier da, wobei der Wert für letzteres als 1 gesetzt wird. In die Werte für 24 Stunden wurden 4, in die für 7 Tage 4 Pulldown-Versuche einbezogen, deren Rückenmarksabschnitte von Tieren aus drei voneinander unabhängigen Experimenten stammen. Es handelt sich um eine semiquantitative Darstellung nach Auswertung mittels LabImage. Der RhoA-Level wurde bezogen auf Aktin als Ladekontrolle. Die Banden unter dem Balkendiagramm stellen ein repräsentatives Experiment dar. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

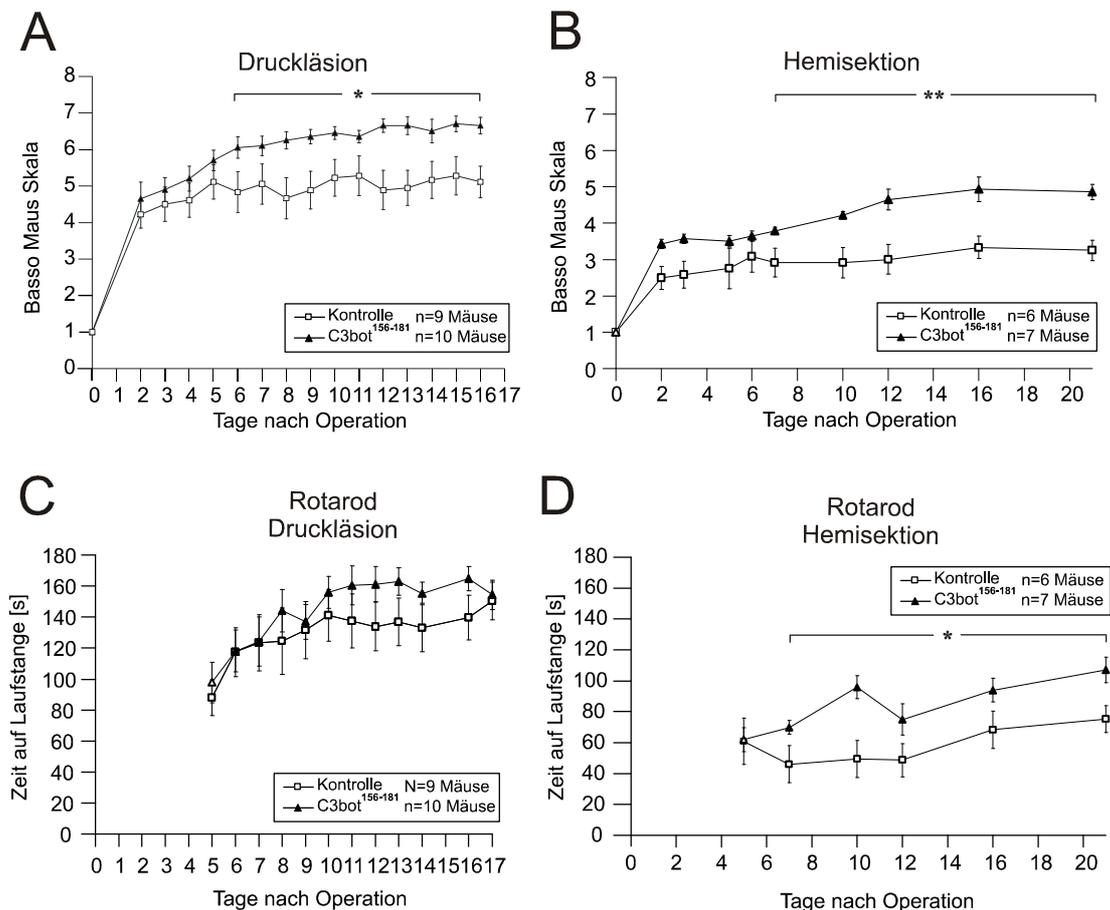
**24 h:** Nach Rückenmarksläsion kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der RhoA-Signale unter allen Bedingungen.

**7 Tage:** Das Niveau des aktivierten RhoA ist unter der Behandlung mit den Peptiden gegenüber unter PBS deutlich verringert und auf das Niveau des nicht-hemisezierten Tieres gesunken.

### 3.5 Einfluss von C3bot<sup>156-181</sup> auf die Bewegungsfähigkeit von Mäusen nach Rückenmarksläsion

Die aus der Aktivitätsbestimmung von RhoA gewonnenen Erkenntnisse sollen nun für C3bot<sup>156-181</sup> noch in den Zusammenhang mit Bewegungsparametern gestellt werden, die an Mäusen nach der oben genannten Hemisektion und einer im Folgenden beschriebenen Druckläsion des Rückenmarks betrachtet wurden.

Die thorakale Druckläsion erfolgte ebenfalls auf Höhe Th 8 und wurde nach partieller Laminektomie mit einer Kraft von 20 cN für eine Sekunde auf das Rückenmark gesetzt. Anschließend wurden die Muskeln wieder vernäht und die Rückenhaut geschlossen.



**Abbildung 26**

*Einfluss von C3bot<sup>156-181</sup> auf die motorische Regeneration von Mäusen nach Rückenmarksläsion*

**A:** Balb/C-Mäuse wurden ab dem ersten Tag nach Druckläsion anhand der Basso Maus Skala bis zum 17. Tag bewertet. Diese Skala erstreckt sich über zehn Stufen der

Bewegungsfähigkeit früher (0 = keine Bewegung) bis später Merkmale (9 = normale Bewegung) der Wiederherstellung nach Verletzung. C3bot<sup>156-181</sup> (40 µM) erhöht die Leistung der Mäuse um mehr als einen Punkt auf der Skala nach Verletzung.

**B:** Die Bewegungsfähigkeit über den gleichen Zeitraum nach Hemisektion ist stärker eingeschränkt, aber auch hier zeigt sich einer Verbesserung für das Peptid um mehr als einen Punktwert.

**C:** Das Peptid erhöht die Latenzzeit bis zum Fallen von der sich drehenden Laufstange um mehr als 20 Sekunden.

**D:** Auf einem geringeren Niveau in Kontrolle und Behandlung als bei der Druckläsion zeigt sich eine Erhöhung der Latenzzeit bis zum Fallen unter Anwendung des Peptids nach Hemisektion.

Diese Daten wurden an Mäusen erhoben, die ebenfalls die beschriebene Hemisektion sowie eine thorakale Druckläsion erlitten aber anschließend länger als sieben Tage beobachtet wurden. Sie wurden von Francesco Boato zur Verfügung gestellt (Boato et al., 2010).

Das Bewegungsvermögen wurde durch zwei Verfahren erfasst. Bei der Basso Maus Skala wird durch ein Auswertungsprotokoll die Bewegung der Mäuse erfasst. Diese werden für einige Minuten auf eine eingegrenzte Ebene gesetzt und bezüglich der Bewegung ihrer Hinterläufe sowie der Rumpfstabilität und dem regelrechten Aufsetzen der Pfoten bewertet (Basso et al., 2006). Beim Rotarod-Test wird die Bewegung der Mäuse erzwungen. Sie werden auf eine sich drehende Laufstange gesetzt. Die Zeit bis zum Herunterfallen wird automatisch durch das Signal einer darunter liegenden, berührungsempfindlichen Platte gestoppt (Sheng et al., 2004). Dabei zeigte sich klar, dass C3bot<sup>156-181</sup> positiven Einfluss auf das Bewegungsvermögen der Mäuse und dieser Einfluss in beiden Bewertungssystemen zur Erfassung der Bewegungsfähigkeit nachweisbar ist (Abb. 26).

In verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte die positive Wirksamkeit von C3bot<sup>156-181</sup> nachgewiesen werden. Demnach ist es als Peptid von C3bot das kürzeste deutlich wirkungsvolle Agens. Das Wirkprofil von C3bot<sup>163-177</sup> konnte nicht klar ermittelt werden. Für C3bot<sup>154-182</sup> konnten über seine bisherigen bekannten Effekte hinaus positive Ergebnisse an Neuronen gezeigt werden. C3bot selbst wies ebenfalls deutliche Wachstumsförderung an den verschiedenen neuronalen Modellen auf.

## 4. Diskussion

### 4.1 Förderung der synaptischen Konnektivität durch C3bot und C3bot Peptide

Ein Schwerpunkt der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen lag in der Untersuchung der Wirkung zweier aus der Sequenz von clostridialer C3-Transferase abgeleiteter Peptide auf die synaptische Konnektivität kultivierter Hippocampusneurone. Ein 26 Aminosäuren langes Peptid, C3bot<sup>156-181</sup>, steigerte die Anzahl synaptischer Kontakte ähnlich dem Gesamtprotein C3bot, für das 15 Aminosäuren lange C3bot<sup>163-177</sup> konnte keine eindeutig positive Wirkung nachgewiesen werden. Knock-down Studien für RhoA sowie der nach Peptid-Behandlung verringerte wachstumshemmende Effekt von RhoA-Aktivatoren (CSPG) machen eine Beteiligung dieser GTPase an den beobachteten Effekten sehr wahrscheinlich.

#### 4.1.1 Mögliche Rezeptorbindung und intrazellulärer Wirkmechanismus

Bezüglich der Wirkmechanismen lässt die bereits bei geringen Konzentrationen vorhandene Effektivität der Substanzen auf eine Funktionsweise ähnlich bekannter neurotropher Faktoren denken, deren Bindung an Membranrezeptoren ihre Wirkung potenziert. Hierbei lassen sich als Beispiel die Neurotrophine anführen, deren bekannteste Vertreter der nerve growth factor (NGF), der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Neurotrophin 4/5 (NT-4/5) sind. Sie binden u. a. an Tyrosinkinaserzeptoren (TrkA, B und C), die ihrerseits den MAP-Kinase-, den IP3-Kinase- oder Phospholipase C-Weg aktivieren. Dabei konnte für BDNF beschrieben werden, dass dies zur Transkription von Genen synaptischer Proteine führt und die Ausbildung von Rezeptorkomplexen in der Postsynapse und Translokation von Proteinen dorthin bewirkt (Bartkowska et al., 2010, Yoshi und Constantine-Paton, 2009). In Transfektionsversuchen mit BDNF konnte eine Erhöhung der synaptischen Konnektivität anhand der Zählung Synaptophysin-positiver Terminalien ermittelt werden (Singh et al., 2006). Der Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75 bindet alle Neurotrophine und interagiert mit RhoA, welches bei Bindung von NGF oder BDNF

inaktiviert wird. NGF führte zu längeren Neuriten von Neuronen des Ganglion ciliare von Hühnern (Huang und Reichardt, 2003, Yamashita et al., 1999). Auch Netrin-1 führt über seinen Rezeptor DCC zum stärkeren Auswachsen von Axonen, was u. a. durch die Inaktivierung von RhoA bewirkt wird (Barallobre et al., 2005). Semaphorine und Ephrine hingegen wirken als repulsive Faktoren über die Aktivierung von RhoA, was durch die Beeinflussung verschiedener GEFs und damit Austausch von GDP gegen GTP an RhoA hervorgerufen wird (Govek et al., 2005).

Dass in der Tat eine bislang nicht charakterisierte Bindungsdomäne für C3 Proteine an neuronalen Zellen zu existieren scheint, zeigen präliminäre Versuche an der hippocampalen Zelllinie HT22, an der in sog. Overlay Versuchen eine Inkubation von bereits auf Membranen immobilisierten Proteinen mit C3bot und anschließender Detektion von C3 mittels Antikörper zu einer einzelnen immunreaktiven Bande führt. Die Identität der zugrunde liegenden Proteinstruktur ist Ziel massenspektroskopischer Analysen, die zurzeit im Labor von Prof. Just durchgeführt werden.

Denkbar ist, dass C3bot-Peptide sowie das C3bot-Gesamtprotein einen oder mehrere der bisher bekannten Rezeptoren für neurotrophe Faktoren nutzen. Dies könnte parallel zu massenspektroskopischen Untersuchungen in weiterführenden Zellkultur-basierten Experimenten durch Hemmung von Rezeptoren wie TrkA, B und C etwa durch den Inhibitor K252a nachgewiesen werden. Um Hinweise auf einen möglichen Proteincharakter von C3-Rezeptorstrukturen zu bekommen, sollen zukünftig Pronase–Abbau Versuche unternommen werden, um dann anschließend das verbleibende Bindungsvermögen der Peptide zu untersuchen. Mittels Behandlung von Neuronen mit Phospholipase C kann eine mögliche GPI-Verankerung des Rezeptors überprüft werden.

Neben einer Bindung an eine Rezeptorstruktur der Plasmamembran als initialen Schritt in der enzymunabhängigen Wirkung von C3 Peptiden ist eine Interaktion mit intrazellulären Bindungspartnern denkbar. Es konnte über die ADP-Ribosylierung funktionell nachgewiesen werden, dass C3bot in Neurone gelangt (Höltje et al., 2009). Möglich ist das auch für C3bot-Peptide, der Weg der Aufnahme ist noch unklar.

Um eine subzelluläre Lokalisation der Peptide bzw. eine Zuordnung zu bestimmten zellulären Kompartimenten nach möglicher Internalisierung zu detektieren, sollen die bereits in dieser Arbeit als myc-Tag markierte Peptide verwendet werden. Mittels

konfokaler Laserscan-Mikroskopie könnten fluoreszenzgekoppelte Antikörper Aufschluss über den Wirkort geben. Für C3bot selbst existiert bereits ein Antikörper. Dabei sind Kolokalisationsstudien mit organellspezifischen Antikörpern möglich. Um eine mögliche Internalisierung nachzuweisen, könnte außerdem der Effekt der Ausschaltung von Schlüsselproteinen der Endozytose wie z.B. Clathrin mittels knock-down durchgeführt werden.

#### 4.1.2 Hemmung von RhoA trotz fehlender enzymatischer Aktivität

Eine Beeinflussung der Regulatoren der Aktivität von RhoA könnte nach erfolgter Internalisierung als möglicher Wirkort in Frage kommen. GEFs, GAPs und GDIs werden über multiple Signalwege angesteuert und steuern ihrerseits den schnellen Übergang von RhoA vom inaktiven in den aktiven Zustand und umgekehrt.

C3bot<sup>154-182</sup> vermindert die Aktivität von RhoA in primären Hippocampuskulturen (Boato et al., 2010). Dieses Peptid enthält das ADP-Ribosylating toxin turn-turn Motiv (ARTT-Loop), welches Teil der katalytischen Domäne von C3bot und somit auch an der Substraterkennung beteiligt ist (Sun et al., 2004). Dennoch ist es enzymatisch inaktiv. Dies ist auch für C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>163-177</sup> der Fall. Ein Hinweis darauf, dass dieser Abschnitt zwar entscheidend für die Wirkung ist, aber nicht die Wildtyp Sequenz benötigt, besteht darin, dass der Austausch von Glutamat gegen Glutamin in einem modifizierten Peptid (C3bot<sup>154-182</sup>E174Q) auch zu einer höheren Anzahl synaptischer Kontakte in neuronalen Kulturen führt (bisher unveröffentlichte Daten).

Starke Hinweise auf eine Beteiligung der kleinen GTPase RhoA an den – vermutlich Rezeptor-vermittelten – intrazellulären Effekten waren bereits vorhanden. In Hippocampuskulturen konnte das 29 Aminosäuren lange C3bot<sup>154-182</sup> eine Verringerung der Aktivität von RhoA bewirken (Boato et al., 2010). Die Beteiligung von RhoA als Effektor wurde weiter untersucht. Zum einen durch Kultur der Neurone auf dem als inhibitorisches Substrat wirkenden CSPG, welches RhoA-Aktivierung bewirkt und als Modell für einen zentralnervösen Schädigungsprozess genutzt wurde. Dies führte zur Verminderung der Zahl synaptischer Kontakte in den so kultivierten Zellen. Die Anwendung der drei Substanzen (C3bot, C3bot<sup>156-181</sup> und C3bot<sup>154-182</sup>) konnte den inhibitorischen Effekt von CSPG praktisch aufheben und die Anzahl Synaptophysin-markierter Synapsen auf das Niveau der Kontrolle erhöhen.

CSPGs sind wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix. Kommt es zu Schäden im ZNS, werden sie beispielsweise von reaktiven Astrozyten produziert und bilden Barrieren in der glialen Narbe (Asher et al., 2001). Aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen ist ihre Beteiligung von Bedeutung. So konnten CSPGs kolokalisiert mit den  $\beta$ -Amyloid-Plaques bei der Alzheimer'schen Krankheit vorgefunden werden, wobei sie hier wahrscheinlich als Schutz gegen die Neurotoxizität des Amyloids fungieren (Miyata et al., 2007), die Inhibition des Auswachsens der Axone also Voraussetzung dieses Schutzes ist. Sie verhindern aber auch die Proteolyse der Amyloid-Plaques (Gupta-Bansal et al., 1995). Des Weiteren konnte die Akkumulation von CSPGs in den Läsionen der Parkinson-Erkrankung nachgewiesen werden (DeWitt et al., 1994). In transgenen Ratten, deren Mutation im Superoxid-Dismutase-Gen zum Bild der amyotrophen Lateralsklerose führt, wurde CSPG als Inhibitor der Neurogeneration identifiziert (Mizuno et al., 2008).

Als Alternative zur etablierten Methode der Hemmung von RhoA durch C3bot bzw. der vermuteten Hemmung durch enzymatisch inaktive C3bot Peptide wurde ein knock-down von RhoA durchgeführt. Dies führte zu einer zu C3bot bzw. C3bot<sup>156-181</sup> vergleichbaren Steigerung der Anzahl synaptischer Kontakte. Dies kann als weiterer Hinweis dafür betrachtet werden, dass eine bislang nicht genau charakterisierte Inaktivierung von RhoA und seiner nachgeschalteten Signalwege durch C3bot und die Peptide verantwortlich für die erhöhte synaptische Konnektivität ist. Die Kombination der Anwendung von C3bot bzw. Peptid und knock-down von RhoA hatte keinen zusätzlichen Effekt und zeigt, dass RhoA-unabhängige Wege für die beobachteten Effekte wohl keine Rolle spielen. Bei enzymatisch-aktivem C3bot dürfte die Inaktivierung der RhoGTPase durch ADP-Ribosylierung in jedem Fall der entscheidende Mechanismus sein.

Der knock-down mittels siRNA als Alternative zur enzymatischen Inaktivierung von RhoA unterscheidet sich insofern von der enzymatischen Inaktivierung durch C3bot, als dass es nach Hemmung von RhoA zu einer vermehrten Expression von RhoB kommt, da der durch RhoA blockierte Promotor rhoB aktiviert wird. Dies zeigte sich bei Behandlung mit C3-ADP-Ribosyltransferase aus *Clostridium limosum* (Hülßenbeck et al., 2007). Nach Hemisektionen des Rückenmarks adulter Ratten und im Hirngewebe von nach Hirninfarkt verstorbenen Menschen konnte neben einer Hochregulierung von RhoA auch eine erhöhte Expression von RhoB gezeigt werden (Conrad et al., 2005, Brabeck et al., 2003). Auch für RhoB werden negative Effekte

auf neuronale Fortsätze über ROCK und die MLC sowie auch proapoptotische Wirkungen über mDia beschrieben (Conway et al., 2004), was auch für den Untergang von Neuronen verantwortlich sein kann. Dass die durch C3bot oder C3bot<sup>156-181</sup> erzielten Effekte auf die Anzahl synaptischer Kontakte jedoch praktisch identisch wie die durch knock-down von RhoA beobachteten waren, spricht für eine RhoA-Spezifität der Effekte und lässt eine zusätzliche Beteiligung von RhoB hierfür unwahrscheinlich erscheinen.

#### **4.1.3 Erhöhte synaptische Konnektivität: ein sekundärer Effekt?**

Denkbar ist, dass die erhöhte Anzahl von Synapsen keine direkte Folge der Wirkung von C3bot oder den Peptiden auf die Expression synaptischer Proteine darstellt. Für C3bot und C3bot<sup>154-182</sup> konnte gezeigt werden, dass beide in nanomolarer Konzentration die Länge und den Grad der Verzweigung von Axonen und Dendriten erhöhen (Ahnert-Hilger et al., 2004, Höltje et al., 2009). Präliminäre Daten zeigen dies auch für C3bot<sup>156-181</sup>. Dies lässt den Schluss zu, dass für die Bildung von Synapsen mehr prä- und postsynaptische Kontaktmöglichkeiten zur Verfügung stehen und die erhöhte synaptische Konnektivität eine indirekte Folge dieser Wirkung ist. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass aktiviertes RhoA die Translation von Cypin reduziert, was zu einer geringeren Verzweigung von Dendriten führt (Chen und Firestein, 2007). Eine Reduzierung der Menge von aktiviertem RhoA durch C3bot und C3bot-Peptide würde diesen Mechanismus hemmen und die dendritische Verzweigung fördern. RhoA wirkt über seinen Effektor ROCK negativ auf die Ausbildung der Dornfortsätze an den Dendriten. Durch Hemmung von RhoA könnte an dieser Stelle die Ausbildung von axodendritische Synapsen gefördert werden bzw. bestehende Verbindungen stabilisiert werden, da abhängig von der Aktivität diese auch wieder gelöst werden können (Nakayama et al., 2000, Tashiro et al., 2000). Bei hoher Aktivität von RhoA überwiegt der Signalweg über ROCK. Über den schon in der Einleitung erwähnten Effektor mDia-vermittelte Mechanismen fördern die dendritische Verzweigung. Wird die Aktivität von RhoA gemindert, tritt mDia als Effektorprotein von RhoA stärker in den Vordergrund, was ebenfalls ein Grund für die bessere synaptische Konnektivität sein könnte (Narumiya et al., 2009).

C3bot und die Peptide könnten auch Einfluss auf die Dynamik der bestehenden Synapsen ausüben bzw. indirekt die Festigung bestehender Kontakte fördern. Durch die erhöhte Anzahl von Synapsen ist ein höheres Potential zur Ausschüttung von Neurotransmittern – vor allem exzitatorische wie Glutamat – gegeben, was für den Mechanismus der Long-Term-Potentiation (LTP) zur Konsolidierung von neuronalen Kontakten notwendig ist. Es kommt dabei aktivitätsabhängig zu stärkerem Calcium-Einstrom, der für die Aktivierung und schließlich Phosphorylierung von Proteinen über Kinasen verantwortlich ist. Dabei wird unter anderem die Empfindlichkeit der postsynaptischen Membran für Transmitter erhöht.

Hier lässt sich die Hemmung von RhoA zur Unterstützung der Bildung und Stabilisierung von Synapsen vermuten. Bei der Inhibition der Geranylierung von RhoA konnte dessen Aktivität verringert werden, was zur Verstärkung der LTP führte. So auch durch die Hemmung von ROCK durch den Inhibitor Y-27632 (O’Kane et al., 2004). Adenosin-bedingte Inaktivierung von RhoA scheint ebenfalls die LTP zu fördern (Rex et al., 2009). Mögliche Effekte von C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> könnten auch elektrophysiologisch untersucht werden.

Im Zusammenhang mit der Zunahme synaptischer Konnektivität wurde auch eine Differenzierung zwischen exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Kontakten unternommen. Dafür wurden zur Färbung der Terminalien Antikörper gegen vesikuläre Neurotransmittertransporter verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl VGLUT1/2-markierter Synapsen weniger stark anstieg als dies zuvor für die Synaptophysin-Kontakte ermittelt wurde. Für VGAT fiel dies noch etwas geringer aus. C3bot<sup>156-181</sup> wirkte sich dabei nicht signifikant aus. C3bot<sup>163-177</sup> erwies sich als wirkungslos.

Die VGLUTs weisen ontogenetisch in den verschiedenen Hirnregionen entwicklungsabhängige Expressionsmuster auf. Bevor aber überhaupt morphologisch als Synapsen zu bezeichnenden Kontakte entstehen, existieren schon Vesikel bzw. Vorformen davon, die sich in oder in der Nähe der Membran des Axonschafts oder des Wachstumskegels befinden und hier stimulusabhängig die Ausschüttung von Glutamat nach vorheriger Beladung des Vesikels erlauben. Dies ist die Voraussetzung für die Bildung exzitatorischer Synapsen, da auf der zukünftigen postsynaptischen Seite NMDA-Rezeptoren nach Aktivierung unter anderem auch Zellmigration und die Ausbildung von Synapsen stimulieren (Boulland et al., 2004). Bevor die Vesikelmembranen mit den Transportern und anderen

Proteinen ausgestattet werden, erfolgt deren Translation im Soma des Neurons und Abschnürung aus dem Trans-Golgi-Netzwerk mit anschließendem Transport entlang des Axons zur Präsynapse. Dort werden die Transporter über mehrere Zyklen von Exo- und Endozytose der Vorvesikel an der Plasmamembran spezifisch in die Membran des Speichervesikels sortiert. Dabei sind Signalmotive in der Peptidsequenz der VGLUTs wichtig für ihre Zuteilung zu den Vesikeln (Santos und Vogelmaier, 2009). Bisher konnte die Beeinflussung von VGLUT- und VGAT-positiven Terminalien durch BDNF beschrieben werden. Dabei zeigte sich, dass BDNF abhängig von seiner Wirkung an TrkB die Menge an exzitatorischen Synapsen erhöht, während die von inhibitorischen Synapsen verringert wird, wobei letzteres auch Folge der Wirkung von vermehrt sezerniertem Glutamat an postsynaptischen metabotropen Glutamatrezeptoren sein kann (Singh et al., 2006). C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> könnten in vergleichbarer Weise als neurotrophe Substanzen wirken, jedoch mit zu BDNF unterschiedlichem Effekt auf inhibitorische Kontakte.

In Mehrfachfärbungen von Synaptophysin und VGLUT1/2 bzw. VGAT überstieg die Summe der absoluten Zahlen für die Transporter-markierten Kontakte die von Synaptophysin. Anzunehmen wäre, dass diese Zahlen ungefähr gleich sind oder zumindest darunter liegen. Dies kann Hinweis auf eine Koexpression von VGLUT1/2 und VGAT in bestimmten Synapsen sein, was für Moosfaserterminalien des Hippocampus von Ratten gezeigt werden konnte und synaptische Übererregbarkeit verhindern könnte (Zander et al., 2010).

Biochemisch konnte für Synaptophysin und SNAP 25 eine verstärkte Expression unter Wirkung von C3bot<sup>156-181</sup> detektiert werden. Bei Anwendung von C3bot<sup>163-177</sup> war ausschließlich für SNAP 25 eine erhöhte Proteinexpression sichtbar.

Für C3bot<sup>154-182</sup> konnte eine Steigerung der Expression von Synaptophysin bereits gezeigt werden, Synaptobrevin zeigte kein verändertes Niveau (Höltje et al., 2009), was sich mit dem hier dargestellten Ergebnis deckt. Das in der genannten Arbeit erhöhte Proteinniveau von Rab3a und Synapsin konnte für die beiden Peptide hier nicht nachgewiesen werden, spricht aber dafür, dass die erhöhte Zahl synaptischer Kontakte zum Teil von der verstärkten Bereitstellung ihrer Bestandteile abhängt.

Unveröffentlichte Daten zur Expression des NMDA<sub>1</sub>-Rezeptors oder der VGLUTs sowie VGAT zeigen aber auch keine erhöhte Expression bei Anwendung von C3bot<sup>154-182</sup>. Im Falle der Transporter könnte dem ein Verteilungsmechanismus zu Grunde liegen, bei dem nicht unbedingt eine größere Menge der Proteine

synthetisiert wird, sondern eine verstärkte Zuordnung in die Synapsen erfolgt. Für den NMDA Rezeptor ist die laterale Diffusion beschrieben worden (Triller und Choquet, 2005). Ähnliche Arten von Umverteilung sind auch für die anderen, in der Funktion unterschiedlichen Proteine denkbar.

Die zum Teil voneinander abweichenden Ergebnisse bezüglich der Proteinexpression würden für ein leicht unterschiedliches Wirkprofil der Peptide sprechen, im Kontext bleiben sie als positive Effektoren für die Expression bestimmter synaptischer Proteine bestehen.

## **4.2 Axonotrophe Effekte von C3bot<sup>156-181</sup> in der organotypischen Hirnschnittkultur**

Das Wiederauswachsen des *Tractus perforans* aus den Schnitten des entorhinalen Kortex – analysiert anhand der Anzahl und der Länge der Axone – konnte durch die Applikation von C3bot<sup>156-181</sup>, nicht jedoch von C3bot<sup>163-177</sup>, gefördert werden. Es war außerdem in der Lage, die positiven Effekte von C3bot durch kombinierte Anwendung noch zu steigern.

### **4.2.1 Verwendung von organotypischen Kultursystemen zur Untersuchung neuronaler Regeneration**

An Schnitten des Hippocampus wurden schon Nachweise für die Wirkung von repulsiven oder attraktiven Rezeptorliganden wie beispielsweise Semaphorine oder Netrine erbracht. Auch konnten externe Einflüsse wie Hypothermie auf auswachsende Axone an entorhinalen Cortex-Explanten (ECs) untersucht werden (Steup et al., 2000, Schmitt et al., 2007). Sie eignen sie sich sehr gut als Modelle zur Untersuchung neuronaler Regeneration. Die Tatsache, dass hier im Vergleich zu den Hippocampuskulturen der Gewebekontext des lebenden Tieres erhalten bleibt und im Ganzen unter Einwirkung der Substanzen steht, lässt organotypische Kultursysteme als Modellsysteme erscheinen, die eher der *in vivo* Situation entsprechen als Einzelzellkulturen.

#### 4.2.2 C3bot<sup>156-181</sup> als axonotropher Faktor

Die Präparation des Gewebes selbst stellt schon eine Läsion dar. Bei Versuchen, in denen neuronale Gewebeschnitte im Ganzen einer Dehnungsverletzung unterzogen wurden, beobachtete man die Myelinbasierte verstärkte Aktivierung von RhoA als Hinweis für eine Beteiligung der GTPase an schädigungsbedingten Prozessen (Di Pietro et al., 2010). C3bot<sup>156-181</sup> ist hier als Effektor bei der Inaktivierung von RhoA denkbar. Seine Funktion als neurotropher Faktor im Inkubationsmedium mit Stimulation der Neurone wie auch der axonalen Wachstumskegel kann ebenfalls angenommen werden. Nicht differenzierbar allerdings ist, ob die höhere Anzahl der Axone unter Wirkung des Peptids und von C3bot durch eine verstärkte Verzweigung auswachsender Axone zustande kommt oder Folge des Wiederauswachsens von Fortsätzen aus einem größeren Anteil der Zellen ist. Das verwendete Modell ließ eine Rückverfolgung der Fasern im Gewebeschnitt nicht zu, allerdings zeigten sich schon am Schnitttrand deutlich mehr Axone, so dass wahrscheinlich mehr Zellen zur Regeneration angeregt wurden.

Versuche mit Kokulturen von Schnitten des ECs und des Hippocampus mit Biocytin-Injektion zur Verfolgung der Axone zeigten, dass wiederauswachsende Fasern des entorhinalen Cortex in Kultur gerichtet in die äußere Körnerzellschicht des Gyrus dentatus projizieren (Frotscher et al., 1997). In Kokulturen von ECs eGFP-exprimierender Mäuse und Wildtyp-Mäusen, in denen die Fasern des ECs infolge der fluoreszierenden Eigenschaften des eGFPs gut erkennbar sind (Hechler et al., 2006), kann dieser Prozess gut verfolgt werden. C3bot und C3bot<sup>154-182</sup> zeigten in diesem Modell ein stärkeres Auswachsen der Axone in die hippocampalen Projektionsgebiete als die Kontrolle (Höltje et al., 2009). Es ist anzunehmen, dass dies für C3bot<sup>156-181</sup> allein und in Kombination mit C3bot auch zutrifft.

## 4.3 Effekte von C3bot Peptiden nach Rückenmarksschädigung

### 4.3.1 Verbessertes Regenerationsvermögen nach Rückenmarksschädigung

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die nach Rückenmarksschädigung zu beobachtende andauernde Aktivierung von RhoA durch den Einsatz nicht-enzymatisch wirksamer Peptide vermindert werden kann. Die Verwendung von C3bot<sup>156-181</sup> als Effektor bei der Inaktivierung von RhoA ist denkbar und führte zudem zu einer verbesserten motorischen Regeneration sowohl nach Kontusionsverletzung des Rückenmarks als auch nach Hemisektion.

Beide Formen der Schädigung wurden in der vorliegenden Arbeit an Mäusen durchgeführt, die im Anschluss an die Operationen bezüglich ihrer Motorik bewertet wurden. Die beiden Schädigungsmodelle unterscheiden sich insofern, als die Druckläsion eher die Folge typischer Unfälle mit Verletzungen menschlichen Rückenmarks darstellt (Sekhon und Fehlings, 2001), die Hemisektion jedoch definierte Fasertrakte durchtrennt, die bei späterer histologischer Untersuchung die eindeutige Identifikation regenerierter Fasern zulässt. Dabei stellt die Hemisektion die schwerere Verletzung dar, was sich im Vergleich zum Kontusionsmodell nach der Operation an der insgesamt schlechteren Bewegungsfähigkeit der Mäuse ablesen lässt.

Dennoch war C3bot<sup>156-181</sup> hier wie auch bei den druckgeschädigten Tieren in der Lage, die Bewegungsfähigkeit gegenüber unbehandelten Tieren zu verbessern. Diese Beobachtung deckt sich mit den schon für C3bot<sup>154-182</sup> gewonnenen Erkenntnissen. Entscheidend für den positiven Effekt dürfte generell die verbesserte Regeneration von absteigenden serotonergen Fasern des raphespinalen Traktes sein, wie Lokomotionsversuche und histologische Untersuchungen an Mäusen mit Transsektion des Rückenmarks ergaben (Boido et al., 2009, Ung et al., 2008). Dies wurde hier zwar nicht explizit untersucht, ist aber auf der Grundlage der Erkenntnisse für C3bot<sup>154-182</sup> auch für C3bot<sup>156-181</sup> anzunehmen. Die Wirkung des Peptids kann dabei ebenso neurotroph auf dem Wiederauswachsen von Axonen der für die Motorik wichtigen Fasertrakte wie auf dem Schutz noch in der Läsionsstelle vorhandener Axone beruhen, wofür auch die früh einsetzende verbesserte Regeneration der Bewegungsfähigkeit der Mäuse nach Applikation von C3bot<sup>156-181</sup> spricht und die Annahme neuroprotektiver Eigenschaften der C3-Substanzen stützt.

Die Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen für C3bot<sup>154-182</sup> (Boato et al., 2010).

Die durch Schädigung im Nervengewebe hervorgerufene Aktivierung von RhoA entspricht offensichtlich einem generellen Mechanismus, der in unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden konnte: so wurde beispielsweise in Spinalganglien von Ratten gezeigt, dass es nach Durchtrennung des *Nervus ischiadicus* der Tiere sowohl in einem Pulldown-Assay für aktiviertes RhoA als auch bei in-situ-RhoGTPase-Aktivitäts-Assays an Ganglien ipsilateral zur Nervenschädigung zum Anstieg von aktiviertem RhoA auf ein erst dann detektierbares Level kommt (Cheng et al., 2008). Auch Kontusion des Rückenmarks von Ratten führt zu einer höheren Menge von membrangebundenem RhoA als Ausdruck einer Aktivierung der GTPase (Sung et al., 2002). In Hemisektionsversuchen an Ratten und Mäusen konnten erhöhte Level von GTP-gebundenem RhoA gezeigt werden (Dubreuil et al., 2003). Die Wachstumsinhibition von neuronalen Fortsätzen über den RhoA-Effektor ROCKII nach Transsektionen oder bei Anwendung des Nogo-Proteins oder CSPG an Neuronenkulturen aus Spinalganglien war weniger stark ausgeprägt in Mäusen mit einem doppelten knock-out von ROCKII (Duffy et al., 2009). Versuche, die die Anwendung von Ibuprofen beinhalteten, brachten eine verbesserte funktionelle Regeneration und das Wiederauswachsen von Axonen mit der Reduzierung des GTP-RhoA-Levels in Einklang (Wang et al., 2009).

Eine RhoA-Inaktivierung erscheint somit im Prinzip als wirksamer Mechanismus, um neuronale Regeneration zu fördern. Hier können Versuche mit C3 an auf Myelin-assoziiertem Glykoprotein kultivierten PC-12 Zellen angeführt werden (Dubreuil et al., 2003). Eine zellpermeable Form von C3bot – BA-210 – hat positiven Einfluss auf die Begrenzung des Gewebedefektes nach Rückenmarksschaden (Lord-Fontaine et al., 2008). Mögliche Mechanismen einer nicht-enzymatisch vermittelten Hemmung von RhoA-Aktivität wurden bereits für die beobachteten *in vitro* Effekte diskutiert und sind offenbar auch für die *in vivo* Situation denkbar.

#### 4.3.2 Perspektiven für den Einsatz von C3bot-Peptiden als regenerationsfördernde Substanzen im ZNS

Die vorliegenden Ergebnisse lassen C3bot Peptide, insbesondere das C3bot<sup>156-181</sup>, als erfolgversprechende Kandidaten für den Einsatz als Therapeutika nach Schädigung im ZNS erscheinen. Neben den schon erwähnten Vorteilen von kurzen, wirkungsvollen Peptiden hinsichtlich Herstellung, Antigenität und Anwendung weisen unveröffentlichte Beobachtungen der hier durchgeführten Versuche mit Rückenmarksschädigung darauf hin, dass Mäuse bei Anwendung von C3bot zu lokalen Blutungen im Bereich der Läsion neigen und häufiger versterben. Unter Peptidwirkung konnte dies nicht beobachtet werden. Das oben erwähnte BA-210 wurde unter dem Namen Cethrin® in einer klinischen Studie (Phase II) von Alseres Pharmaceuticals verwendet. Dabei wurde es in unterschiedlichen Dosierungen im Rahmen von Operationen an Menschen mit akuter Rückenmarksschädigung extradural angewendet. Diese Studie wurde ohne Angabe von Gründen oder Ergebnissen abgebrochen. Möglicherweise hatte C3bot hier unvorhersehbare Nebenwirkungen. Des Weiteren wirkt C3bot bei Anwendung an Astrozyten oder Mikroglia proinflammatorisch und fördert die Entstehung der glialen Narbe, was neuronaler Regeneration im Wege steht. Die enzymdefiziente Variante zeigt diese Wirkung nicht (Höltje et al., 2005, Hoffmann et al., 2008). Dies erlaubt den Schluss, dass auch die Peptide nur auf Neurone wirken, was unveröffentlichte Daten von Peptid-Versuchen mit Astrozyten bestätigen.

Da nach Schädigung eine langfristige, mindestens mehrwöchige Aktivierung von RhoA und RhoB beobachtet wurde (Brabeck et al., 2003), ist für eine mögliche therapeutische Anwendung nicht nur der kurzfristige – unmittelbar nach traumatischen Ereignissen – sondern auch spätere oder über einen längeren Zeitraum durchgeführte Einsatz der Substanzen denkbar und sinnvoll.

C3bot<sup>163-177</sup> mit 15 Aminosäuren Länge hinterlässt ein unklares Bild. Sein Wirkmechanismus ist möglicherweise verschieden von dem der anderen beiden C3-Peptide, obwohl es wie diese auch den ARTT-Loop enthält. Dass es das Niveau von GTP-gebundenem RhoA im geschädigten Rückenmark vermindert, kann die Notwendigkeit der Inaktivierung der GTPase für die positiven Effekte der C3bot-Peptide bestätigen, lässt aber offen, ob dieser Effekt hinreichend ist. Möglicherweise gibt es weitere Signalwege, die C3bot<sup>163-177</sup> nicht anspricht. Pharmakologisch sollte

eine dosisabhängige Bestimmung des Wirkprofils an den schon gezeigten Modellen erfolgen. Vielleicht wird es nach einer Aufnahme ins Zytosol schneller abgebaut und erfordert einen anderen zeitlichen Modus der Applikation. Versuche dazu sind in Vorbereitung.

C3bot<sup>156-181</sup> hat sich in dieser Arbeit im Vergleich mit den Wirkprofilen von C3bot und C3bot<sup>154-182</sup> bewährt. Wie oben angegeben ist geplant, mögliche Signal- und/oder Aufnahmewege bei Neuronen für die Peptide abzufragen und den oder die Mechanismen aufzuklären oder zumindest einzugrenzen. Dies und die hier dargestellten Effekte der Peptide erlauben den hoffnungsvollen Blick auf den zukünftigen therapeutischen Einsatz dieser Substanzen bei diversen Krankheitsprozessen des zentralen Nervensystems unabhängig davon ob sie traumatisch oder entzündlich bedingt sind.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von C3bot und daraus abgeleiteten Peptiden – C3bot<sup>156-181</sup> (26 Aminosäuren) und C3bot<sup>163-177</sup> (15 Aminosäuren) sowie dem schon bekannten C3bot<sup>154-182</sup> (29 Aminosäuren) – in verschiedenen neuronalen Gewebemodellen untersucht.

Anhand der immunfluoreszenzbasierten Auszählung synaptischer Kontakte an den Dendriten primärer Hippocampusneurone von Mäuseembryonen wurde gezeigt, dass C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> in der Lage sind, die Zahl von Synapsen zu erhöhen. Dies konnte auch an VGLUT1/2-markierten und etwas schwächer an VGAT-markierten Kontakten nachgewiesen werden. C3bot<sup>163-177</sup> erwies sich in dieser Anwendung als unwirksam.

Bei Wachstum der Neurone auf Chondroitinsulfatproteoglykan als inhibitorischem Substrat wurde die Kontaktzahl gesenkt. Diese Verminderung konnte durch die Anwendung von C3bot, C3bot<sup>156-181</sup> und dem schon als wirksam veröffentlichten Peptid C3bot<sup>154-182</sup> aufgehoben werden. Die Zahl der Synapsen stieg ebenfalls durch den knock-down von RhoA mittels siRNA RhoA G28. Eine weitere Steigerung der Zahl war bei kombiniertem knock-down mit C3-Substanzen nicht möglich.

In der proteinbiochemischen Analyse der Hippocampuskulturen zeigte sich im Wesentlichen, dass bei Anwendung von C3bot<sup>156-181</sup> eine gesteigerte Expression von Synaptophysin und SNAP 25 erfolgt. Andere prä- und postsynaptische Proteine blieben unbeeinflusst.

Anhand organotypischer Hirnschnittkulturen des enthorhinalen Kortex von Mäusen wurde gezeigt, dass C3bot<sup>156-181</sup> die Zahl und die Länge auswachsender Axone erhöht. C3bot<sup>163-177</sup> hatte dabei keinen Effekt. C3bot und C3bot<sup>156-181</sup> in Kombination bewirken noch eine weitere leichte Steigerung dieser Zahlen.

In einem Pulldown-Assay zur Bestimmung der RhoA-Aktivität im durch Hemisektion geschädigten Rückenmark von Mäusen konnte bestätigt werden, dass die Verletzung zu einem erhöhten Niveau von aktiviertem RhoA führt. C3bot<sup>156-181</sup>, C3bot<sup>154-182</sup> und C3bot<sup>163-177</sup> waren in der Lage, diese Aktivierung nach sieben Tagen zu verringern.

Der Arbeit hinzugefügt wurden Daten zur Bewegungsfähigkeit von Mäusen nach Hemisektion und Druckläsion des thorakalen Rückenmarks. Diese wurden einer

Behandlung mit C3bot<sup>156-181</sup> unterzogen, worauf sich eine verbesserte motorische Regeneration zeigte.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die enzymatisch-inaktiven Peptide ihre Wirkung über die Verringerung der Aktivität von RhoA ausüben. Für die neurotrophen Eigenschaften werden aufgrund der geringen Konzentration bei den Anwendungen ein Rezeptor-abhängiger Mechanismus oder gezielte Internalisierungsprozesse postuliert. Versuche der Aufklärung dessen sind in Vorbereitung.

Aufgrund ihres positiven Effektes auf die Neuroregeneration und ihrer Vorteile gegenüber C3bot selbst sind die C3-Peptide in der therapeutischen Anwendung vorstellbar.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger G, Höltje M, Grosse G, Pickert G, Mucke C, Nixdorf-Bergweiler B, Boquet P, Hofmann F, Just I. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem.* 2004;90(1):9-18.
- Aono S, Oohira A. Chondroitin sulfate proteoglycans in the brain. *Adv Pharmacol.* 2006;53:323-36.
- Aktories K, Jung M, Böhmer J, Fritz G, Vandekerckhove J, Just I. Studies on the active-site structure of C3-like exoenzymes: involvement of glutamic acid in catalysis of ADP-ribosylation. *Biochimie.* 1995;77:326-32.
- Aktories K, Frevert J. ADP-ribosylation of a 21-24 kDa eukaryotic protein(s) by C3, a novel botulinum ADP-ribosyltransferase, is regulated by guanine nucleotide. *Biochem J.* 1987;247:363-8.
- Aktories K, Mohr C, Koch G. Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;175:115-31.
- Aktories K, Weller U, Chhatwal GS. Clostridium botulinum type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Lett.* 1987;212:109-13.
- Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res.* 2001;132:611-9.
- Backlund PS Jr Post-translational processing of RhoA. Carboxyl methylation of the carboxyl-terminal prenylcysteine increases the half-life of RhoA. *J Biol Chem.* 1997;272:33175-80.
- Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem.* 2001;276:36764-9.
- Bajjalieh SM, Scheller RH. The biochemistry of neurotransmitter secretion. *J Biol Chem.* 1995;270:1971-4.
- Barallobre MJ, Pascual M, Del Río JA, Soriano E. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;49:22-47.

- Bartkowska K, Turlejski K, Djavadian RL. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2010;70:454-67.
- Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006;23:635-59.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Synaptic Transmission. Neuroscience 2nd Edition*. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2001:101-102.
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT Jr, Edwards RH. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*. 2000;289:957-60.
- Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol Dis*. 2007;25:65-72.
- Birbach A. Profilin, a multi-modal regulator of neuronal plasticity. *Bioessays*. 2008;30:994-1002.
- Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 2000;348 Pt 2:241-55.
- 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;123:1652-62.
- Böhmer J, Jung M, Sehr P, Fritz G, Popoff M, Just I, Aktories K. Active site mutation of the C3-like ADP-ribosyltransferase from *Clostridium limosum*--analysis of glutamic acid 174. *Biochemistry*. 1996;35:282-9.
- Boido M, Rupa R, Garbossa D, Fontanella M, Ducati A, Vercelli A. Embryonic and adult stem cells promote raphespinal axon outgrowth and improve functional outcome following spinal hemisection in mice. *Eur J Neurosci*. 2009;30:833-46.
- Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Fremeau RT Jr, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the

- widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol.* 2004;480:264-80.
- Brabeck C, Mittelbronn M, Bekure K, Meyermann R, Schluesener HJ, Schwab JM. Effect of focal cerebral infarctions on lesional RhoA and RhoB expression. *Arch Neurol.* 2003;60:1245-9.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature.* 1997 Mar 20;386(6622):284-8.
- Bray D, Gilbert D. Cytoskeletal elements in neurons. *Annu Rev Neurosci.* 1981;4:505-23.
- Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 2004;116:167-79.
- Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17:120-7.
- Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol.* 2010;91:313-48.
- Chen H, Firestein BL. RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *J Neurosci.* 2007;27:8378-86.
- Cheng C, Webber CA, Wang J, Xu Y, Martinez JA, Liu WQ, McDonald D, Guo GF, Nguyen MD, Zochodne DW. Activated RHOA and peripheral axon regeneration. *Exp Neurol.* 2008;212:358-69.
- Conrad S, Schluesener HJ, Trautmann K, Joannin N, Meyermann R, Schwab JM. Prolonged lesional expression of RhoA and RhoB following spinal cord injury. *J Comp Neurol.* 2005;487:166-75.
- Conway AM, James AB, O'Kane EM, Rakhit S, Morris BJ. Regulation of myosin light chain phosphorylation by RhoB in neuronal cells. *Exp Cell Res.* 2004 15;300:35-42.
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability. *J Cell Biol.* 2003;162:1267-79.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci.* 2002;22:6570-7.
- DeWitt DA, Richey PL, Praprotnik D, Silver J, Perry G. Chondroitin sulfate proteoglycans are a common component of neuronal inclusions and

- astrocytic reaction in neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 1994;656:205-9.
- Di Pietro V, Amin D, Pernagallo S, Lazzarino G, Tavazzi B, Vagnozzi R, Pringle A, Belli A. Transcriptomics of traumatic brain injury: gene expression and molecular pathways of different grades of insult in a rat organotypic hippocampal culture model. *J Neurotrauma.* 2010;27:349-59.
- Dressler D, Bigalke H. Botulinum toxin type B de novo therapy of cervical dystonia: frequency of antibody induced therapy failure. *J Neurol.* 2005;252:904-7.
- Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol.* 2003;162:233-43.
- Duffy P, Schmandke A, Schmandke A, Sigworth J, Narumiya S, Cafferty WB, Strittmatter SM. Rho-associated kinase II (ROCKII) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord. *J Neurosci.* 2009;29:15266-76.
- Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci.* 1999;112:811-23.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420:629-35.
- Frotscher M, Heimrich B. Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:10400-3.
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T. Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci.* 1997;20:218-23.
- Gasnier B. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie.* 2000;82:327-37.
- Gonzalez L Jr, Scheller RH. Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell.* 1999;96:755-8.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 2005;19:1-49.
- Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Brunden KR. Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J Biol Chem.* 1995;270:18666-71.
- Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001818.

- Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:690-701.
- Hechler D, Nitsch R, Hendrix S. Green-fluorescent-protein-expressing mice as models for the study of axonal growth and regeneration in vitro. *Brain Res Rev.* 2006;52:160-9.
- Henneberger C, Kirischuk S, Grantyn R. Brain-derived neurotrophic factor modulates GABAergic synaptic transmission by enhancing presynaptic glutamic acid decarboxylase 65 levels, promoting asynchronous release and reducing the number of activated postsynaptic receptors. *Neuroscience.* 2005;135:749-63.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci.* 2001;21:RC181.
- Herzog E, Takamori S, Jahn R, Brose N, Wojcik SM. Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J Neurochem.* 2006;99:1011-8.
- Hodel A. SNAP-25. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30:1069-73.
- Hoffmann A, Hofmann F, Just I, Lehnardt S, Hanisch UK, Brück W, Kettenmann H, Ahnert-Hilger G, Höltje M. Inhibition of Rho-dependent pathways by Clostridium botulinum C3 protein induces a proinflammatory profile in microglia. *Glia.* 2008;56:1162-75.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 1990;347:44-9.
- 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;23:1115-26.
- Höltje M, Hoffmann A, Hofmann F, Mucke C, Grosse G, Van Rooijen N, Kettenmann H, Just I, Ahnert-Hilger G. Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing. *J Neurochem.* 2005;95:1237-48.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.

- Huelsenbeck J, Dreger SC, Gerhard R, Fritz G, Just I, Genth H. Upregulation of the immediate early gene product RhoB by exoenzyme C3 from *Clostridium limosum* and toxin B from *Clostridium difficile*. *Biochemistry*. 2007;46:4923-31.
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol*. 1994;126:801-10.
- Jin Z, Strittmatter SM. Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci*. 1997;17:6256-63.
- Koh CG. Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neurosignals*. 2006-2007;15:228-37.
- Kozma R, Sarnar S, Ahmed S, Lim L. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol*. 1997;17:1201-11.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci*. 1999;19:7537-47.
- Lord-Fontaine S, Yang F, Diep Q, Dergham P, Munzer S, Tremblay P, McKerracher L. Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2008;25:1309-22.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*. 1997;389:870-6.
- Miyata S, Nishimura Y, Nakashima T. Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res*. 2007;1150:200-6.
- Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y. Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats. *J Neurosci Res*. 2008;86:2512-23.

- Nakayama AY, Harms MB, Luo L. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2000;20:5329-38.
- Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:65-76.
- Narumiya S, Yasuda S. Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:199-205.
- Nikolic M. The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:731-45.
- O'Kane EM, Stone TW, Morris BJ. Increased long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus via modulation of GTPase signalling or inhibition of Rho kinase. *Neuropharmacology.* 2004;46:879-87.
- Pautsch A, Vogelsong M, Tränkle J, Herrmann C, Aktories K. Crystal structure of the C3bot-RalA complex reveals a novel type of action of a bacterial exoenzyme. *EMBO J.* 2005;24:3670-80.
- Popoff MR, Hauser D, Boquet P, Eklund MW, Gill DM. Characterization of the C3 gene of *Clostridium botulinum* types C and D and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1991;59:3673-9.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 1992 Feb 15;111(2):229-33.
- Rex CS, Chen LY, Sharma A, Liu J, Babayan AH, Gall CM, Lynch G. Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *J Cell Biol.* 2009;186:85-97.
- Ridley AJ. Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic.* 2001;2:303-10.
- Rothman JE. The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci.* 1996;5:185-94.
- Santos MS, Li H, Voglmaier SM. Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse. *Neuroscience.* 2009;158:189-203.
- Shiraishi Y, Mizutani A, Yuasa S, Mikoshiba K, Furuichi T. Differential expression of Homer family proteins in the developing mouse brain. *J Comp Neurol.* 2004 Jun 7;473(4):582-99.

- Schmitt KR, Kern C, Lange PE, Berger F, Abdul-Khaliq H, Hendrix S. S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. *Neurosci Res.* 2007;59:68-73.
- Schulte-Baukloh H, Bigalke H, Miller K, Heine G, Pape D, Lehmann J, Knispel HH. Botulinum neurotoxin type A in urology: antibodies as a cause of therapy failure. *Int J Urol.* 2008;15:407-15
- Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26:S2-12.
- Sheng H, Wang H, Homi HM, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Pearlstein RD, Warner DS. A no-laminectomy spinal cord compression injury model in mice. *J Neurotrauma.* 2004;21:595-603.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 1962;59:223-39.
- Singh B, Henneberger C, Betances D, Arevalo MA, Rodríguez-Tébar A, Meier JC, Grantyn R. Altered balance of glutamatergic/GABAergic synaptic input and associated changes in dendrite morphology after BDNF expression in BDNF-deficient hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2006;26:7189-200.
- Steup A, Lohrum M, Hamscho N, Savaskan NE, Ninnemann O, Nitsch R, Fujisawa H, Püschel AW, Skutella T. Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol Cell Neurosci.* 2000;15:141-55.
- Stone TW, Burton NR. NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol.* 1988;30:333-68.
- Südhof TC, Jahn R. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron.* 1991;6:665-77.
- Südhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn R. A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science.* 1987;238:1142-4.
- Sugahara K, Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr Opin Struct Biol.* 2007 Oct;17(5):536-45. Epub 2007 Oct 24.
- Sun J, Maresco AW, Kim JJ, Barbieri JT. How bacterial ADP-ribosylating toxins recognize substrates. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:868-76.

- Sung JK, Miao L, Calvert JW, Huang L, Louis Harkey H, Zhang JH. A possible role of RhoA/Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat. *Brain Res.* 2003;959:29-38.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature.* 2000;407:189-94.
- Tashiro A, Minden A, Yuste R. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex.* 2000;10:927-38.
- Triller A, Choquet D. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci.* 2005;28:133-9.
- Trimble WS, Scheller RH. Molecular biology of synaptic vesicle-associated proteins. *Trends Neurosci.* 1988;11:241-2.
- Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem.* 2001;2:239-45.
- Ung RV, Landry ES, Rouleau P, Lapointe NP, Rouillard C, Guertin PA. Role of spinal 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes in quipazine-induced hindlimb movements after a low-thoracic spinal cord transection. *Eur J Neurosci.* 2008;28:2231-42.
- Vogelsgesang M, Pautsch A, Aktories K. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2007;374:347-60.
- Wang X, Budel S, Baughman K, Gould G, Song KH, Strittmatter SM. Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth. *J Neurotrauma.* 2009;26:81-95.
- Watabe-Uchida M, Govek EE, Van Aelst L. Regulators of Rho GTPases in neuronal development. *J Neurosci.* 2006 Oct;26:10633-5.
- Wilde C, Aktories K. The Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum* and related C3-like transferases. *Toxicon.* 2001;39:1647-60.
- Wilde C, Barth H, Sehr P, Han L, Schmidt M, Just I, Aktories K. Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA. *J Biol Chem.* 2002;277:14771-6.
- Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, Brown JE, Neale EA. Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin

- C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem.* 1996;271:7694-9.
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron.* 1999;24:585-93.
- Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010;70:304-22.
- Zander JF, Münster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Gómez-Lira G, Heinemann U, Gutiérrez R, Laube G, Ahnert-Hilger G. Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci.* 2010;30:7634-45.
- Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Oct 23;227(3):707-11.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BNPI	Brain specific Na <sup>+</sup> -dependent inorganic phosphate transporter
BSA	Bovines Serumalbumin
C3bot	Clostridium botulinum C3-Protein
C3bot <sup>156-181</sup>	Peptidabschnitt 156-181 von C3bot
C3bot <sup>163-177</sup>	Peptidabschnitt 163-177 von C3bot
C3bot <sup>154-182</sup>	Peptidabschnitt 154-182 von C3bot
C3lim	Clostridium limosum C3-Protein
C3stau	Staphylokokkus aureus C3-Protein
CA	Cornu ammonis
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cN	Centinewton
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykan
DIV	Day in vitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNPI	Differentiation mediated Na <sup>+</sup> -dependent inorganic phosphate transporter
DTT	Dithiothreitol
E	Embryontag
EC	enthorinaler Kortex
ECL	enhanced chemoluminescence
eGFP	<i>enhanced</i> green fluorescence proteine
EZM	Extrazellulärmatrix
FKS	Fötale Kälberserum
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-exchange-factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS+	Hanks Buffered Salt Solution
HEPES-KOH	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium
MLC(K)(P)	Myosin-leichte-Kette(n-Kinase)( <i>n-Phosphatase</i> )
mRNA	messenger RNA
Myc-Tag	Peptidsequenz von zehn Aminosäuren aus dem c-myc-Gen
Na <sup>+</sup>	Natrium
NAD(PH)	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Postnatal-Tag

PBS	Phosphate-buffered Saline Solution
Rab	<i>ras</i> -like genes expressed in <i>brain</i>
RBD	Rho-Bindedomäne
Rho	Ras-homolog
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
ROCK	Rho-Kinase
SDS	Natriumduodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small inhibitory RNA
SNAP 25	Synaptosomen-assoziiertes Protein von 25 kD
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor
Temed	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Tris-Saline
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
VGLUT	Vesikulärer Glutamat-Transporter
VGAT	Vesikulärer GABA-Transporter
VIAAT	vesicular inhibitory amino acid transporter
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8. Publikation

**Minimal essential length of Clostridium botulinum C3 peptides to enhance neuronal regenerative growth and connectivity in a non-enzymatic mode.**

Peter Loske<sup>#</sup>, Francesco Boato<sup>#</sup>, Sven Hendrix, Johannes Piepgras, Ingo Just, Gudrun Ahnert-Hilger and Markus Höltje

J Neurochem. 2012;120(6):1084-96.

<sup>#</sup> gleichberechtigte Autoren

## **9. Lebenslauf**

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

## 10. Danksagung

Der größte Dank geht an PD Dr. Markus Höltje, der mir durch sein stetes, außerordentliches Engagement sowohl während der Experimentalphase als auch bei der schriftlichen Vollendung der Dissertation ein zuverlässiger Doktorvater war. Die gemeinsame Arbeit war sehr angenehm und lehrreich und wird mir sicher auch in Zukunft von großem Nutzen sein.

Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger möchte ich dafür danken, dass sie mir im C3-Projekt schon anfänglich mit einer Hausarbeit die Möglichkeit gegeben hat, in einer äußerst angenehmen Arbeitsgruppe und außerdem in der traditionsreichen Berliner Anatomie an diesem spannenden Thema zu arbeiten. Ich bin gern dageblieben und sehr froh über ihre ebenfalls engagierte Begleitung.

Ohne die professionelle Unterstützung von Birgit Metze, Suzann Öztürk und Marion Möbes wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen. Ihnen gilt der Dank auch für die geduldige Einführung in die praktische Laborarbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich, weil sie den großen Rahmen schaffen, der mir dies ermöglicht hat und in Gemeinsamkeit hoffentlich noch einiges mehr möglich machen wird.

## 11. Erklärung an Eides statt

Ich, Peter Loske, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Effekte von C3bot und C3bot-Peptiden auf synaptische Konnektivität und neuronale Regeneration“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den