

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

DISSERTATION

Glutamat-Aufnahme und -Freisetzung durch Astrozyten nach *Clostridium*  
*botulinum* C3-Protein-Behandlung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Romy R. Lux

aus Dresden

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. G. Ahnert-Hilger  
2. Prof. Dr. med. H. Bigalke  
3. Prof. Dr. hum. biol. C. Beyer

Datum der Promotion: 29.01.2010

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Einführung in die Thematik	1
1.2	Astrozyten: Betrachtungen zur funktionellen Bedeutung im ZNS	1
1.2.1	Glutamat-Homöostase	3
1.2.2	Glutamat-Exzitotoxizität	5
1.2.3	Glutamattransporter der Plasmamembran	6
1.2.4	Vesikuläre Glutamattransporter	7
1.2.5	Mechanismen der Glutamat-Freisetzung	8
1.3	Die Familie der Rho-GTPasen	9
1.4	C3 ADP-Ribosyltransferasen	11
1.5	Wirkung von C3 Transferasen auf Astrozyten	13
1.6	Fragestellungen	14
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Chemikalien	15
2.2	Puffer und Lösungen	17
2.2.1	Medien für die Zellkultur	17
2.2.2	Protein-Gelelektrophorese und Western Blotting	17
2.2.3	Lösungen für die Immunzytochemie	19
2.2.4	Lösungen für die Glutamat-Aufnahme und -Freisetzung	19
2.2.5	Fixierlösung	20
2.3	Antikörper	20
2.4	Geräte und Material	22
2.5	Methoden	23
2.5.1	Zellkultur	23
2.5.2	Protein-Gelelektrophorese und Western Blotting	23
2.5.3	Immunzytochemie	25
2.5.4	Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	26
2.5.5	Versuche zur Glutamat-Aufnahme und –Freisetzung	26

---

2.5.6	Proteinquantifizierung / BCA-Test	27
2.5.7	Vesikelfärbung	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Effekte von <i>Clostridium botulinum</i> C3 Protein auf die Morphologie kultivierter Maus-Astrozyten	30
3.2	C3bot-Effekte auf das Expressionsmuster kleiner GTPasen der Rho-Familie	32
3.3	Effekte von C3bot auf die [ <sup>3</sup> H] Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten	34
3.4	Effekte von C3bot auf die vesikuläre [ <sup>3</sup> H] Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten	41
3.5	Glutamat/Glutamin-Sekretion unter Einfluss von C3bot	44
3.6	Einfluss der Behandlung mit C3bot auf die Anzahl von Exo-Endozytose-Ereignissen in Astrozyten	45
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	C3bot induziert eine stellare Morphologie in kultivierten Astrozyten	51
4.2	Die Glutamat-Aufnahme wird durch C3bot GLT-1 abhängig erhöht	51
4.3	Die vesikuläre Glutamat-Aufnahme wird durch C3bot erhöht	54
4.4	C3bot induziert eine vermehrte exozytotische Freisetzung von Glutamat	55
4.5	Mögliche Beeinflussung der Glutamat-Homöostase durch C3bot im klinischen Kontext	58
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Publikation</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>84</b>
<b>11.</b>	<b>Erklärung an Eides statt</b>	<b>85</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufnahme, Speicherung und Freisetzung von Glutamat durch Astrozyten im Zentralnervensystem (ZNS). Störungen der Glutamat-Homöostase sind klinisch hochrelevant und werden für eine Reihe schwerwiegender pathologischer Zustände verantwortlich gemacht. Im Detail untersucht wurde der regulatorische Einfluss von Rho-Proteinen auf die Mechanismen des Glutamat-Kreislaufs in Astrozyten. Als biochemisches Werkzeug diente dabei vor allem *Clostridium botulinum* C3 ADP-Ribosyltransferase. C3 Transferasen inhibieren spezifisch die Aktivität von Rho-Proteinen und eignen sich daher sehr gut zum Studium Rho-abhängiger Prozesse. Ein zweiter Aspekt des Einsatzes von clostridialen Proteinen der C3 Familie in dieser Arbeit liegt in ihrer Verwendung als regenerationsfördernde Substanzen in neuronalen Läsionsmodellen. Damit verbunden ist jedoch eine bislang unzureichende Charakterisierung möglicher Effekte etwa auf gliale Zellen, die eine erfolgreiche Regeneration entscheidend beeinflussen können.

## 1.2 Astrozyten: Betrachtungen zur funktionellen Bedeutung im ZNS

Die glialen Zelltypen des ZNS umfassen Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Sie stellen über 50% des Gesamtgehirnvolumens dar und sind auch nach der Pränatalperiode teilungsfähig. Die am häufigsten vertretenen Zellen sind dabei Astrozyten. Zu ihren Aufgaben gehören neben der Ausbildung von Hüll- und Stützgeweben die Aufnahme von Neurotransmittern und Ionen, insbesondere Kalium, die Speicherung und Abgabe von Nährstoffen, die Bildung einer Grenzschicht zu nicht-neuronalem Gewebe, sowie die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke. Weiterhin beeinflussen Astrozyten den neuronalen Stoffwechsel und sogar die synaptische Transmission (Peters et al., 1991; Barres und Barde, 2000; Mi et al., 2001).

Neuronen übertragen Signale vorwiegend über chemische Botenstoffe. An präsynaptischen Enden werden Neurotransmitter wie Glutamat in synaptischen

Vesikeln gespeichert, welche nach Eintreffen von Aktionspotentialen mit der Plasmamembran fusionieren und ihren Inhalt freisetzen. Durch die enge räumliche Beziehung von Astrozytenfortsätzen zu Synapsen kann der so freigesetzte Transmitter sowohl ionotrope als auch metabotrope Rezeptoren auf Astrozyten aktivieren, wobei es nachfolgend zu einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg kommt, der sich als oszillierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle auch auf benachbarte Astrozyten und über deren Endfüße bis auf die Endothelzellen von zerebralen Arteriolen ausbreiten kann (Dani et al., 1992; Porter und McCarthy, 1996; Pasti et al., 2001; Bezzi et al., 2004). Die Höhe des Anstiegs der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Frequenz der Oszillationen sind abhängig von der neuronalen Aktivität (Pasti et al., 1997; Parri und Crunelli, 2003). Durch diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen adäquat stimuliert, setzen Astrozyten, quantitativ an die neuronale Aktivität angepasst, Arachidonsäure aus dem Plasmamembran-Phospholipid-Pool im Austausch gegen Glutamat frei. Diese wird mittels P-450 2C11-Epoxygenase zu Epoxyeikosatriensäure (EET) metabolisiert (Alkayed et al., 1996; Roman, 2002; Lovick et al., 2005). EETs hyperpolarisieren die Plasmamembran von Endothelzellen, indem sie die Leitfähigkeit für  $\text{K}^+$  erhöhen (Gbremedhin et al., 1992; Harder et al., 1998, 2002). Das führt zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und induziert so die Freisetzung vasoaktiver Metaboliten wie zum Beispiel Stickstoffoxid (NO) (Graier et al., 1995; Li et al., 2003), aber auch Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ). Daraus resultiert eine Dilatation der zerebralen Arteriolen, verbunden mit einer funktionellen Hyperämie des betroffenen Gebietes (Gbremedhin et al., 1992, Zonta et al., 2003).

Seit Längerem ist belegt, dass sich synaptisch freigesetztes Glutamat auch zu benachbarten Synapsen ausbreiten kann (Harris, 1995). In Zellkulturmodellen konnte beobachtet werden, dass astrozytäre Fortsätze in Richtung einer Synapse wachsen, sobald die extrazelluläre Glutamatkonzentration einmal hoch genug war, um einen solchen „Überlauf“ hervorzurufen. Neu ausgebildete Fortsätze von Astrozyten können überschüssiges Glutamat aufnehmen und damit die Spezifität der neuen funktionellen Synapsen verbessern (Ventura und Harris, 1999). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Astrozyten auch an der synaptischen Feinabstimmung bei Abläufen der kognitiven Entwicklung und der Kontrolle der Erregbarkeit des limbischen Systems teilnehmen. Sie kontrollieren die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung an der Synapse und die Stabilität der synaptischen Verbindung mittels Stimulationsverstärkung (Jourdain et al., 2007).

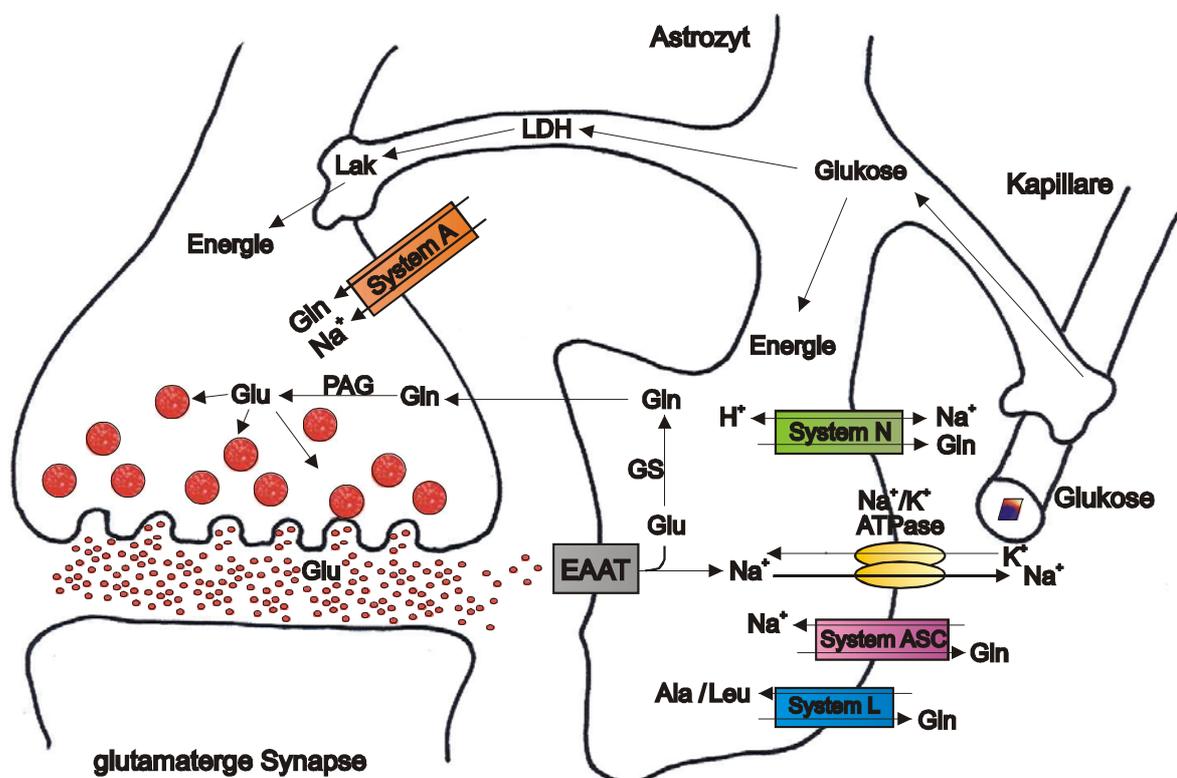
Der Energiebedarf des Gehirns ist im Vergleich zu seiner relativen Masse extrem hoch. Obwohl das Gehirn nur etwa 2% der Körpermasse des Menschen ausmacht, beansprucht es ca. 20% der Sauerstoff- und Glukoseversorgung des Organismus für sich (Magistretti et al., 1999). Zur Aufrechterhaltung der metabolischen Versorgung des Gehirns spielen die Astrozyten eine zentrale Rolle. Initiiert durch die Aktivität von astrozytenspezifischen Glutamatttransportern, sowie der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und einer damit verbundenen Aktivierung der Glykolyse, werden über eine Monocarboxylat-Transporter-vermittelte Sekretion von Laktat Metaboliten für Neuronen bereitgestellt. Es kommt somit zu einer Verknüpfung von synaptischer Aktivität und der benötigten Bereitstellung von Glukose und Sauerstoff (Fox et al., 1988; Magistretti und Pellerin, 1999; Magistretti et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass über 80% der Glukose-Verwertung linear mit der Glutamat-abhängigen Neurotransmission korreliert (Sibson et al., 1998; Hyder et al., 2002). Etabliert hat sich das Modell eines Monocarboxylat-Transporters als „Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle“, der die adäquate Energiebereitstellung durch Astrozyten in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität sichert (Bittar et al., 1996; Loaiza et al., 2003; Serres et al., 2004).

Grundsätzlich ist die Versorgung des neuronalen Gewebes mit Sauerstoff und Glukose von einem dem Verbrauch angepassten zerebralen Blutfluss abhängig. Astrozyten fungieren hier als intermediärer Zelltyp, der als Sensor für die metabolische Aktivität funktioniert und die Durchblutung den Gegebenheiten anpasst (Pellerin und Magistretti, 1994).

### 1.2.1 Glutamat-Homöostase

Die Aminosäure Glutamat fungiert im erwachsenen Säugetiergehirn als exzitatorischer Neurotransmitter, als direkte Vorstufe des inhibitorischen Neurotransmitters und essentieller Komponente des Intermediärstoffwechsels  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), als Baueinheit von Proteinen und als Energiesubstrat. Jedoch auch als potentiell Neurotoxin. Nicht zuletzt als Konsequenz des Fehlens einer Pyruvat-Carboxylase in Neuronen, die eine *de novo*-Synthese von Glutamat aus Glukose unmöglich macht, ergibt sich ein komplexer Homöostase-Kreislauf, in den unterschiedliche Membrantransporter und Enzyme, sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten, involviert sind (Abbildung 1; Patel, 1974; Shank et al., 1985; Hertz et al., 1999). Die herausragende

Bedeutung des Glutamatstoffwechsels für das ZNS zeigt sich in der Tatsache, dass über 90% der Synapsen im Säugetiergehirn Glutamat als Neurotransmitter nutzen (Braitenberg und Schuz, 1998). Durch die synapsennahe Lokalisation von Astrozytenfortsätzen kann freigesetztes Glutamat von den umgebenden Astrozyten direkt aufgenommen werden. In der Zelle wird Glutamat mittels astrozytenspezifischer Glutamin-Synthetase zu Glutamin umgewandelt (Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979) und an den Extrazellulärraum abgegeben. Von dort kann Glutamin wieder in Neuronen aufgenommen und mithilfe der Phosphat-aktivierten Glutaminase zu Glutamat umgebaut werden (Kvamme et al., 2001).



**Abb.1**

*Glutamat-Homöostase*

Bei adäquater Stimulation wird an der glutamatergen Synapse der Neurotransmitter Glutamat freigesetzt. Freies Glutamat diffundiert zu Astrozyten, wird über die EAATs aufgenommen, durch GS zu Glutamin amidiert und wieder freigesetzt. Neuronen nehmen das freigesetzte Glutamin auf, resynthetisieren mittels der PAG Glutamat und speichern es in sekretorischen Vesikeln. An der neuronalen Plasmamembran wird Glutamin über das System A zusammen mit  $\text{Na}^+$  aufgenommen. Auf der astrozytären Seite wird das aufgenommene Glutamin über das System L im Austausch gegen neutrale Aminosäuren, über das System ASC gegen  $\text{Na}^+$  und über das System N zusammen mit  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{H}^+$  freigesetzt. Um die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration aufrechtzuerhalten, wird es durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wieder aus der Zelle geschleust. Die notwendige Energie für diese Mechanismen bezieht der Astrozyt über Glukose

aus zerebralen Kapillaren und stellt sie dem Neuron über das aus Glukose mittels der LDH gebildeten Laktat zur Verfügung. Abkürzungen: Ala, Alanin; ATP, Adenosin-trisphosphat; EAAT, exzitatorischer Aminosäure Transporter; Gln, Glutamin; Glu, Glutamat; GS, Glutamin-Synthetase; Lak, Laktat; LDH, Laktatdehydrogenase; Leu, Leucin; PAG, Phosphat-aktivierte Glutaminase. Nach Bak et al., 2006

Für jedes Molekül Glutamat wird ein Molekül Ammonium in den Neuronen produziert und in den Astrozyten verbraucht. Da eine Erhöhung der Ammonium-Konzentration einen schädlichen Effekt auf viele essentielle zelluläre Funktionen hätte (Felipo und Butterworth, 2002), muss es über sogenannte Aminosäureshuttle zwischen dem neuronalen und dem astrozytären Kompartiment transportiert werden. Bisher konnten zwei solcher Shuttle identifiziert werden, die Ammonium in eine nicht-neuroaktive Aminosäure einbauen und transportieren; zum Einen basierend auf Leucin (Yudkoff et al., 1996; Lieth et al., 2001) und zum Anderen auf Alanin (Waagepetersen et al., 2000; Zwingmann et al., 2000). Weitere essentielle Bestandteile des Aminosäurekreislaufs stellen verschiedene Transportersysteme dar. Zu diesen gehört auf astrozytärer Seite das „System L“ (Kanai et al., 1998; Deitmer et al., 2003), das Glutamin gegen neutrale Aminosäuren austauscht, außerdem das „System N“ (Chaudhry et al., 1999; Bröer et al., 2002), ein Glutamin /  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Antiporter und das „System ASC“, welches  $\text{Na}^+$  gegen Glutamin austauscht. Auf der neuronalen Seite befindet sich das „System A“ (Yao et al., 2000; Mackenzie et al., 2003), ein  $\text{Na}^+$  / Glutamin-Symporter. Der Glutamin-Transport kann auch durch die Erhöhung der Glutamat-Konzentration hochreguliert werden (Bröer et al., 2004). Ein ähnlicher Kreislauf wird auch für GABA angenommen (Peng et al., 1993; Patel et al., 2001).

### 1.2.2 Glutamat-Exzitotoxizität

Eine wichtige Funktion der Astrozyten im Rahmen der Aufrechterhaltung der Homöostase liegt in der Aufnahme und Beseitigung von potentiell toxischem, bei der Signalübertragung freigesetzten  $\text{K}^+$  und Neurotransmittern wie Glutamat oder GABA (Orkand et al., 1966; Kettenman et al., 1984). Initiiert durch hohe extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen, etwa infolge ischämischer Zustände, erfolgt eine übermäßige Aktivierung von N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren, verknüpft mit einem gesteigerten  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Die erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentration ändert das

Membranpotential des Neurons, sorgt damit für einen osmotisch bedingten Einstrom von Wasser und mit dem anschließenden Anschwellen der Zelle für deren Tod (Choi, 1992). Dieses Phänomen wird als Exzitotoxizität bezeichnet und beginnt bei einer extrazellulären Konzentration von  $>30 \mu\text{M}$  Glutamat, wobei die physiologische Konzentration bei ca.  $2\text{-}5 \mu\text{M}$  liegt (Erencinska und Silver, 1990).

### 1.2.3 Glutamattransporter der Plasmamembran

Für Glutamat konnten bislang fünf hochaffine Plasmamembrantransporter identifiziert werden, die den einzigen bekannten Mechanismus zur Entfernung von exzitatorischen Aminosäuren aus der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns darstellen (Danbolt et al., 1998): Kloniert sind die exzitatorischen Aminosäure-Transporter EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT-1, EAAT3/EAAC1, EAAT4 sowie EAAT5. Die verschiedenen Transportersubtypen sind strukturell sehr ähnlich, unterscheiden sich aber vor allem in ihrer Lokalisation. EAAT1 und 2 sind primär astrogliale Subtypen, EAAT3 stellt die neuronale Transporterform dar. EAAT4 und 5 werden weniger stark und vor allem in Purkinjezellen und retinalen Müllerzellen exprimiert (Danbolt, 2001). Die bei der Glutamat-Aufnahme dominierenden Transporter sind - mit regionalen und entwicklungsabhängigen Unterschieden - EAAT1 und 2, im weiteren als GLAST und GLT-1 bezeichnet (Danbolt, 2001; Schousboe et al., 2004). Astrozyten exprimieren die Glutamattransporter GLAST und GLT-1 sowohl am Zellkörper als auch an den Fortsätzen. Sie finden sich an der Plasmamembran der Zelle lokalisiert, wobei die Konzentration an Stellen, an denen die Astrozytenmembran auf andere Astrozyten, Dendriten, Pia mater oder vaskuläres Epithel stößt, geringer ist als an den Stellen im Neuropil, die eine enge räumliche Beziehung zu Synapsen aufweisen (Chaudhry et al., 1995). Der Anteil an der Gesamtaufnahme von Glutamat durch EAAT3/EAAC1 ist offensichtlich von untergeordneter Bedeutung, da EAAT3/EAAC1-defiziente Mäuse weder erhöhte extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen aufweisen, noch eine Neurodegeneration erleiden (Tanaka et al., 1997). Der Einwärtstransport von einem Molekül Glutamat ist immer an den Kotransport von drei  $\text{Na}^+$ -Ionen und einem Proton im Austausch gegen ein  $\text{K}^+$ -Ion gekoppelt (Zerangue und Kavanaugh, 1996; Levy et al., 1998). Dieser Ionenaustausch unterstützt die Glutamat-Aufnahme mit einer Antriebskraft, die imstande ist, einen Konzentrationsgradienten zwischen Intrazellulär-

und Extrazellulärraum von  $10^6$  aufrechtzuerhalten (Bröer et al., 2005). Die Glutamattransporter sind in der Lage, in beide Richtungen zu arbeiten, abhängig von den intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen. Bei pathologischen Prozessen, etwa während eines ischämischen Insults, aber auch infolge einer unphysiologisch gesteigerten repetitiven neuronalen Transmission, depolarisieren die Zellmembranen durch die hohe  $K^+$ -Konzentration im synaptischen Spalt und verringern den Gradienten, was zu einer Umkehr des Glutamattransports in den Extrazellulärraum führt (Zerangue und Kavanaugh, 1996; Rossi et al., 2000).

#### 1.2.4 Vesikuläre Glutamattransporter

In den letzten Jahren konnten drei homologe vesikuläre Glutamattransporter (VGLUTs) identifiziert werden. Sie sind Glutamat-spezifisch und weisen, verglichen mit den Transportern der Plasmamembran, eine relativ geringe Substrataffinität im niedrigen millimolaren Bereich auf. VGLUT1 befindet sich hauptsächlich in Neuronen und Astrozyten im Kortex, Hippokampus und Zerebellum (Bellocchio et al., 2000; Fremeau et al., 2001; Kaneko und Fujiyama, 2002), VGLUT2 wird vor allem in thalamischen und hypothalamischen Regionen (Bai et al., 2001; Takamori et al., 2001), dort auch in Astrozyten, exprimiert (Montana et al., 2004). VGLUT3 wurde als Kotransporter sowohl in serotonergen, cholinergen und GABAergen Neuronen (Schäfer et al., 2002), als auch in Astrozyten (Fremeau et al., 2002) nachgewiesen.

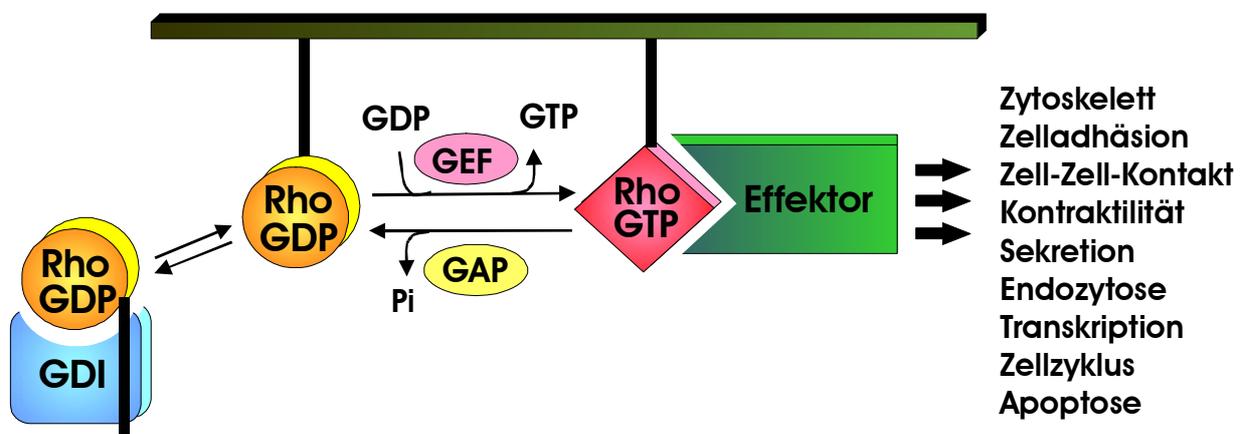
Die Glutamat-Aufnahme hängt von einem elektrochemischen Gradienten ab, der von der vakuolären  $H^+$ -ATPase (v-ATPase) aufrechterhalten wird (Hell et al., 1990; Takamori et al., 2001, 2002). Die vesikuläre  $H^+$ -ATPase sorgt für eine Ansäuerung der synaptischen Vesikel und benötigt einen parallelen Chloridaustausch über Chloridkanäle für eine effiziente Aufnahme. Der resultierende Gradient bildet den Antrieb für die Neurotransmitter-Aufnahme, wobei Glutamat von einem gleichzeitigen Protoneneinstrom begleitet wird. Bei niedrigen Chloridkonzentrationen von ca. 4-6 mM, kommt es zu einem erhöhten Protoneneinstrom, bei hohen Chloridkonzentrationen ist die Glutamat-Aufnahme direkt proportional an den Protonenaustausch gekoppelt (Maycox et al., 1988; Hell et al., 1990). Reguliert wird die Aktivität der vesikulären Transporter zum Beispiel über vesikelständige, heterotrimäre G-Proteine (Winter et al., 2005).

### 1.2.5 Mechanismen der Glutamat-Freisetzung

Bei adäquater Stimulation kommt es in Astrozyten zu einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg, der als Konsequenz zu einer Freisetzung von Glutamat führt. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass die Glutamat-Freisetzung über regulierte Exozytose ablaufen kann, da vesikuläre Kompartimente identifiziert wurden, die hierfür kompetent sind (Bezzi et al., 2004; Stigliani et al., 2006). Es konnten die für eine Vesikelfusion essentiellen Kernproteine des SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor)-Komplexes Synaptobrevin, SNAP23 (Synaptosomen-assoziiertes Protein 23) und Syntaxin detektiert werden (Parpura et al., 1995). Wurden diese mithilfe von clostridialen Toxinen gespalten, konnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Glutamat-Freisetzung inhibiert werden (Bezzi et al., 1998; Araque et al., 2000). Astrozyten können Glutamat auch über reversen Transport der Plasmamembrantransporter (Szatkowski et al., 1990) oder schwellungsinduzierte Mechanismen freisetzen (Kimelberg et al., 1990). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Freisetzung läuft jedoch unabhängig vom reversen Transport (Araque et al., 2000). Auch Substanzen wie Bradykinin (Parpura et al., 1994), Adenosin (Porter and McCarthy, 1996), Prostaglandin (Bezzi et al., 1998), GABA (Kang et al., 1998), Norepinephrin (Kulik et al., 1999), Histamin (Shelton and McCarthy, 2000), Chemokine (Bezzi et al., 2001), Acetylcholin (Araque et al., 2002), 5-Hydroxytryptamine (Meller et al., 2002) und ATP (Zhang et al., 2004b) sind in der Lage, die Glutamat-Freisetzung über die gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freigabe aus intrazellulären Speichern zu triggern. Glutamat selbst kann ebenso seine Freisetzung über metabotrope Glutamatrezeptoren positiv beeinflussen (Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998, 2004). Das während synaptischer Aktivität freigesetzte ATP (Coco et al., 2003) induziert eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung durch G-Protein-gekoppelte purinerge Rezeptoren vom P2Y1-Typ, deren Signalgebung in den Astrozyten an die Exozytose gekoppelt ist (Bowser und Khakh, 2004; Damerq et al., 2006). Glutamat und andere Aminosäuren können außerdem *in situ* über spannungsabhängige Anionen-Kanäle freigesetzt werden (Nedergaard et al., 2002), aber auch Connexin-Hemikanäle oder P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren sind neben den besprochenen Transportern in der Lage, Glutamat freizusetzen (Duan et al., 2003; Ye et al., 2003).

### 1.3 Die Familie der Rho-GTPasen

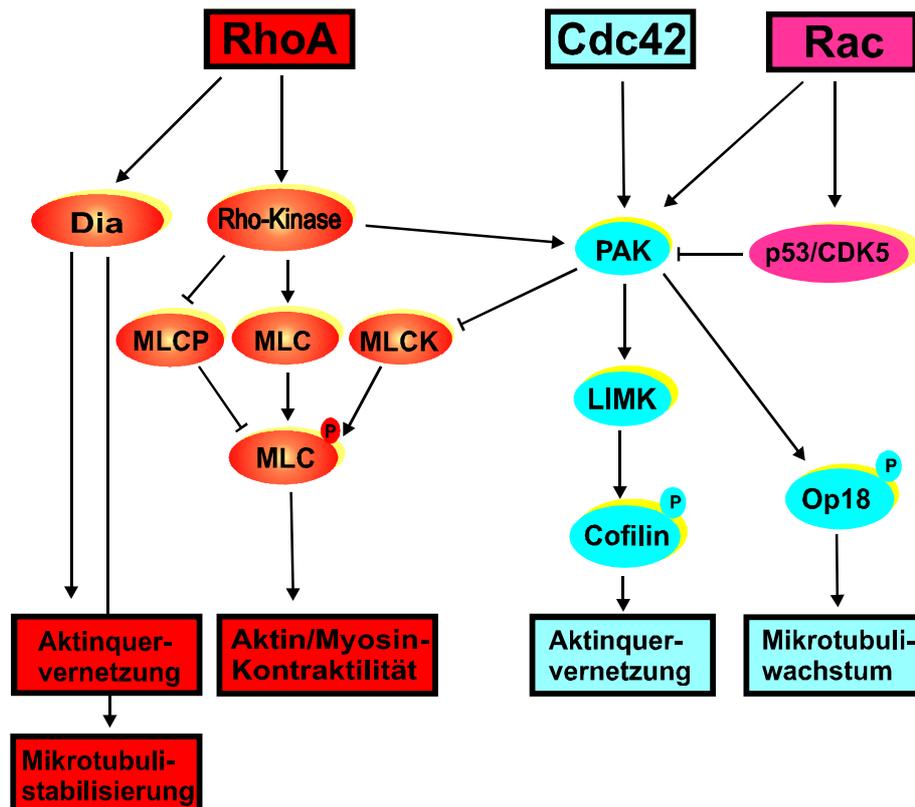
Die Ras-homologe (Rho)-GTPase-Familie besteht aus Rho (A,B,C,D,G,T), Rac (1,2,3), Cdc42, Rnd (1,2,3 / RhoE), TC10, TCL, Wrch1+2, RhoBTB- sowie der Miro-Subfamilie (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Rivero et al., 2001; Fransson et al., 2003; Burrige und Wennerberg, 2004). Heute sind 22 Gene des menschlichen Genoms bekannt, die für Rho-Proteine kodieren. Rho-Proteine stellen molekulare Schalter dar, die extrazelluläre Signale mit intrazellulären Signalkaskaden verbinden. Reguliert wird dabei vor allem die Dynamik des Aktin-Myosin-Zytoskeletts, (Nobes und Hall, 1995; Hall, 1998). Bisher am besten untersucht sind RhoA, Rac1 und Cdc42. Ähnlich anderen regulatorischen GTPasen liegen sie GDP-gebunden inaktiv und GTP-gebunden aktiv vor (Abb.2). Die Kontrolle der Konversionen zwischen aktiver und inaktiver Form unterliegt zum Einen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs; Rossman et al., 2005), die die Austauschraten von GDP gegen GTP erhöhen und zum Anderen Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs; DerMardirossian und Bokoch, 2005), die die Rho/GDP- Verbindung durch Komplexbildung im Zytosol stabilisieren.



**Abb.2**  
*Rho-GTPase-Zyklus*

Die Rho-GTPasen liegen GDP-gebunden inaktiv und GTP-gebunden aktiv vor. Die aktivierten Rho-GTPasen sind in der Lage, eine Vielzahl an Effektoren zu beeinflussen, die wiederum Einfluss auf diverse Zellfunktionen besitzen. Der Nukleotid-Austausch von GDP gegen GTP unterliegt der Kontrolle der GEFs. Um die Aktivierung zu beenden, wird GTP von GAPs hydrolysiert und der Rho-GDP-Komplex an GDIs gebunden und im Zytosol bis zur nächsten adäquaten Stimulation stabilisiert. Abkürzungen: GAP, GTPase-aktivierende Proteine; GDI, Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor; GDP, Guanindiphosphat; GEF, Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor; GTP, Guanintrisphosphat. Nach Vogelsang et al., 2007

Die Signaltransduktion wird durch intrinsische Hydrolyse von Rho-GTP via GTPase-aktivierende Proteine (GAPs; Zalzman et al., 1999; Moon und Zheng, 2003) beendet. Rho-Proteine sind die Schlüssel-Regulatoren des Zytoskeletts in vielen Zellen (Hall, 1998; Burridge und Wennerberg, 2004). Sie sind neben der Feinregulation des mikrofilamentären Zytoskeletts in so vielfältige Zellfunktionen wie in die Kontrolle der Stress-Fasern, Vesikeltransport, Enzymaktivierung, Polarität, Zellwachstum, Zytokinese, Zellbewegung, Adhäsionskontakte, Zellzyklus, Gentranskription und Zell-Zellmigration aber auch in inflammatorische und apoptotische Prozesse involviert (Abo et al., 1991; Bishop und Hall, 2000; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Wennerberg und Der, 2004; Etienne-Manneville, 2004; Jaffé und Hall, 2005). Die beteiligten Signaltransduktionswege unterliegen einem komplexen Netzwerk verschiedenster zellulärer Proteine (Abb.3). Ein weitgehend bekannter Effektor, der von Rac1 und auch von Cdc42 aktiviert werden kann, ist die p21-aktivierte Kinase (PAK). PAK phosphoryliert und aktiviert die nachgeschaltete Lin-11, Isl-1, Mec3 (LIM)-Kinase (Yang et al., 1998), welche wiederum Cofilin phosphoryliert, inaktiviert und so die Aktin-Filamente stabilisiert und die Quervernetzung fördert (Bamburg, 1999). Die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) und deren Regulator p53 können, ausgehend von Rac1, die PAK negativ regulatorisch beeinflussen (Nikolic et al., 1998). PAK ist außerdem in der Lage das Mikrotubuli-destabilisierende OP18 zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren (Daub et al., 2001), die Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLCK) zu inhibieren und so indirekt mit dem Myosin-Leicht-Ketten (MLC)-Aufbau zu interferieren (Bokoch et al., 2003). Der RhoA-Signalweg führt zum Einen über die Rho-Kinase, die die MLC über Phosphorylierung direkt aktiviert oder indirekt über die Inaktivierung der inhibitorischen Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP) für deren Aktivierung sorgt (Amano et al., 1996). Außerdem führt er über ein Protein aus der Familie der Diaphanous-verwandten Formine (Dia), welches via IRSp53 die Aktinquervernetzung oder direkt die Mikrotubulistabilisierung fördert (Fujiwara et al., 2000). Eine Vielzahl von Arbeiten belegt die Existenz auch von gemeinsamen Signalwegen der drei GTPasen untereinander (Yamaguchi et al., 2001; Yuan et al., 2003).

**Abb. 3**

*Signaltransduktionswege der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42*

Für genaue Erläuterung siehe Text. Abkürzungen: Cdk5, cyclin-dependent kinase 5; Dia, Diaphanous-related formins; LIMK, Lin-11, Isl-1 and Mec-3 kinase; MLC, myosin light chain; MLCK, myosin light chain kinase; MLCP, myosin light chain phosphatase; PAK, p21-activated kinases. Nach Govek et al., 2005

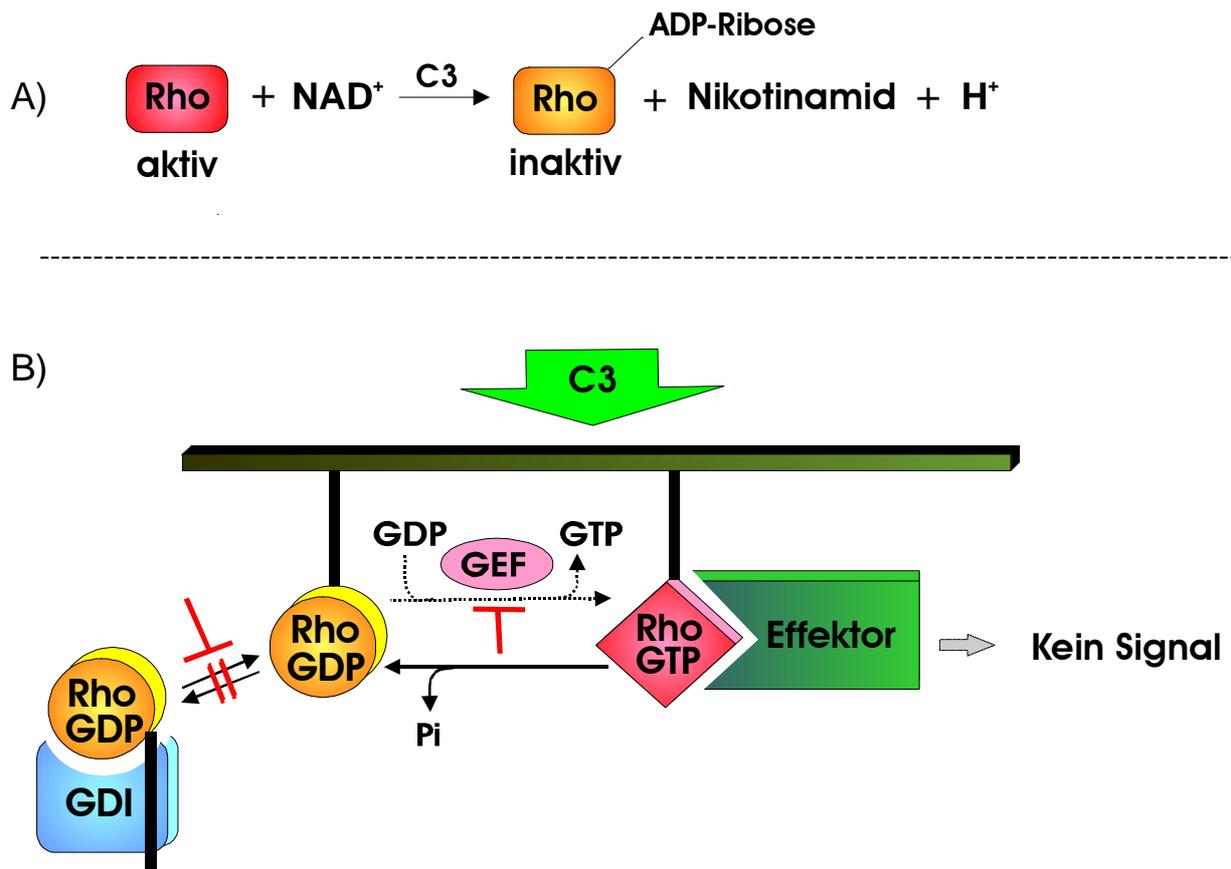
Aufgrund dieser Vielfalt an Effektoren und Funktionen, insbesondere im Bezug auf das Zytoskelett, sind Rho-GTPasen das Ziel verschiedenster pharmakologischer Ansätze zur inaktivierenden Modifikation, in erster Linie der ADP-Ribosylierung, Glukosylierung, Deamidierung und Transglutaminierung (Aktories et al., 1987; Schmidt et al., 1997; Masuda et al., 2000; Just und Gerhard, 2004), aber auch aktivierender Substanzen wie Lysophosphatidsäure (Ramakers und Moolenaar, 1998).

#### 1.4 C3 ADP-Ribosyltransferasen

Die Familie der C3- Exoenzyme umfasst sieben bakterielle ADP-Ribosyltransferasen aus verschiedenen Bakterienstämmen. Sie ADP-ribosylieren selektiv die GTP-

bindenden Proteine RhoA, B, C und inhibieren deren nachgeschaltete Signalwege, weshalb sie als pharmakologische Werkzeuge zur Erforschung von zellulären Rho-Funktionen eingesetzt werden (Aktories, 2000). C3-Transferasen katalysieren den Transfer des ADP-Ribose-Komplexes ihres Ko-Substrats Nikotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) auf RhoA, B oder C (Abb. 4 A; Sekine et al., 1989). Dabei läuft die Inaktivierung über zwei Schritte ab (Abb. 4 B): Zum Einen wird der GEF-vermittelte Nukleotid-Austausch inhibiert (Sehr et al., 1998). Zusätzlich wird der inaktive ADP-ribosylierte RhoA / GDI-Komplex im Zytosol stabilisiert (Fujihara et al., 1997). Ist kein Substrat vorhanden, wird  $\text{NAD}^+$  zu ADP-Ribose und Nikotinamid hydrolysiert (Wilde et al., 2002b). Andere Proteine der Rho-Familie, wie z.B. Rac1 oder Cdc42 sind schlechte Substrate für die C3-Proteine (Wilde et al., 2003). Der Prototyp der C3-Exoenzyme, *Clostridium botulinum* C3-Transferase (C3bot) wurde bereits vor über 20 Jahren beschrieben (Aktories et al., 1987). C3-Proteine werden seit vielen Jahren zur Untersuchung von neuronalen Regenerationsprozessen eingesetzt. Unter anderem wird die funktionelle Wiederherstellung nach Rückenmarksverletzungen durch die Rho-GTPasen blockiert, da diese, insbesondere RhoA-vermittelt, neues Axonwachstum und deren Verzweigung inhibieren (Yuan et al., 2003). Die Applikation von C3bot im Experiment konnte eine konstante Verbesserung des Ergebnisses des Heilungsprozesses bewirken (Dergham et al., 2002). Diese Auswirkungen auf Neuronen lassen C3bot zu einem pharmakologischen Werkzeug in der Therapie von akuten Verletzungen neuronaler Strukturen werden (Lehmann et al., 1999; Bertrand et al., 2005, 2007).

Zusätzlich sind C3 Proteine in der Lage, in Neuronen nicht-enzymatisch mit Ral, einer GTPase der Ras-Familie, zu interagieren (Wilde et al., 2002a). Ral ist unter anderem in die Transkription und Zelltransformation involviert (Feig et al., 1996; Hernandez-Munoz et al., 2000). Bisher konnte für die C3-Toxine kein spezifischer Transportweg für die Internalisierung identifiziert werden. Im Gegensatz zu den anderen C3-Proteinen z.B. aus *Clostridium limosum* (C3lim) oder *Staphylokokkus aureus* (C3stau) weist C3bot, unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität, einen fördernden Einfluss auf das Axonwachstum hippokampaler Neuronen auf (Ahnert-Hilger et al., 2004).

**Abb.4****Wirkmechanismus der C3 Transferasen**

A: Die C3-Transferasen translozieren die ADP-Ribose ihres Co-Substrates  $\text{NAD}^+$  auf das aktive Rho-Protein und inaktivieren es auf diese Weise. Dabei entstehen Nikotinamid und Protonen.

B: Unter dem Einfluss von C3 werden zum Einen die GEFs und damit der Nukleotid-Austausch von GDP zu GTP inhibiert und zum Anderen der Rho/GDP/GDI-Komplex im Zytosol fixiert, so dass kein Rho-GTP entstehen kann und damit Signalweiterleitung an die Effektoren blockiert wird. Abkürzungen: GAP, GTPase-aktivierende Proteine; GDI, Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor; GDP, Guanindiphosphat; GEF, Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren; GTP, Guanintrisphosphat. Nach Vogelsgesang et al., 2007

**1.5 Wirkung von C3 Transferasen auf Astrozyten**

In den bislang durchgeführten Studien zur Wirkung von C3 Proteinen auf Astrozyten lag der Schwerpunkt überwiegend auf der Charakterisierung der morphologischen Effekte. So führt die Inaktivierung von RhoA durch C3bot *in vitro* in Astrozyten zeit- und konzentrationsabhängig zu irreversiblen Änderungen der Zellmorphologie von flachen polygonalen Zellen hin zu einer stellaren (sternförmigen) Form, die dem *in vivo* Erscheinungsbild ähnelt (Ramakers und Moolenaar, 1998; Höltje et al., 2005). Daten zu möglichen begleitenden Effekten im Hinblick auf die physiologischen Kapazitäten

fehlten bislang weitestgehend. Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass eine Vielzahl chronisch-neurodegenerativer Erkrankungen im Zusammenhang mit der astrozytären Regulation der Glutamat-Homöostase steht, wurden die folgenden Untersuchungen als Gegenstand der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Im Zentrum des Interesses standen dabei die nachfolgend aufgeführten Fragestellungen.

## **1.6 Fragestellungen**

1. Welchen Effekt hat die Hemmung Rho-abhängiger Signalwege durch C3bot auf die Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten?
2. Beeinflusst die Inkubation mit C3bot das Expressionsmuster und die Aktivität der glialen Plasmamembrantransporter GLAST und GLT-1?
3. Werden die vesikulären Glutamattransporter VGLUT1-3 in kultivierten Astrozyten exprimiert und in ihrer Expression und Aktivität durch C3bot beeinflusst?
4. Wird die Sekretion von Glutamat (vesikulär und nicht-vesikulär) aus Astrozyten durch C3bot-vermittelte Rho-Hemmung beeinflusst?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
AM1-43	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, St.Louis, USA
Bafilomycin A1	Sigma, St.Louis, USA
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma, St.Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma, St.Louis, USA
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Botulinum Neurotoxin D (BoNt/D)	Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, Prof. H. Bigalke
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, St.Louis, USA
<i>Clostridium botulinum</i> C3 Protein	Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, Prof. I. Just
Coomassie-Brilliant-Blau	Merck, Darmstadt
Diamidino-2-phenylindol – Dihydrochlorid (DAPI)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dihydrokainat (DHK)	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, St.Louis, USA
ECL <sup>TM</sup> Enhanced Chemiluminescence	Amersham Life Science, Buckinghamshire, England
Feinchemikalien (z.B. NaCl, KCl)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	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, St.Louis, USA
Ionomycin	Sigma, St.Louis, USA
Kaliumglutamat	Sigma, St.Louis, USA
LWM (Low Molecular Weight Marker)	BioRad, Hercules, USA
Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt/Main
Methanol	Merck, Darmstadt
Moviol	Hoechst, Frankfurt/Main
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer, Darmstadt
Optiphase Hisafe 3	PerkinElmer, Boston, USA
Paraformaldehyd	Sigma, St.Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma, St.Louis, USA
Ponceau S	Sigma, St.Louis, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe
4-Sulfonato Calix(8)Arene, Natrium Salz (SCAS) -Quencher	Biotium Inc., Hayward, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, St.Louis, USA
<u>Tritium-markierte Transmitter</u>	
[3,4- <sup>3</sup> H] L-Glutamat	
40 Ci/mmol spezifische Aktivität	Moravek-Biochemicals, Brea, USA

## 2.2 Puffer und Lösungen

### 2.2.1 Medien für die Zellkultur

Hank's Buffered Salt Solution (HBSS+)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Poly-L-Lysin

10% fötales Kälberserum (FKS)

*PBS-Puffer*

*(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>

### 2.2.2 Protein-Gelelektrophorese und Western Blotting

*Laufpuffer*

25 mM	TRIS
200 mM	Glycin
3,5 mM	SDS

*Blot-Transferpuffer „Semi-dry“*

48 mM	TRIS
386 mM	Glycin
3,7 g/l	SDS
20% (v/v)	Methanol
ad 800ml 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*

0,75 g BSA  
ad 50 ml TS

*Westernblot-Blocklösung*

5 % TS  
0,1% Magermilchpulver  
Tween 20

*Coomassie brilliant blue R-250*

1 g Coomassie brilliant blue R-250  
500 ml Methanol  
500 ml Essigsäure  
filtrern und mit Aqua dest auf 1 l aufgefüllt

*Sammelgel 3,75%*

1 ml TRIS I  
500 µl Acrylamid  
200 µl Bisacrylamid  
2,3 ml H<sub>2</sub>O  
5,4 µl Temed  
40 µl 10% APS  
10 µl Bromphenolblau

## Zusammensetzung der Trenngele (Mengen für ein Gel)

<b>Trenngel</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
TRIS II	1,5 ml	1,5 ml	2 ml	1,5 ml
Acrylamid	1,5 ml	2 ml	3,2 ml	3 ml
BISacrylamid	0,6 ml	0,8 ml	1,28 ml	1,3 ml
H <sub>2</sub> O	2,4 ml	1,7 ml	1,52 ml	200 µl
Temed	8 µl	8 µl	16 µl	8 µl
10%APS	75 µl	75 µl	150 µl	75 µl

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

**2.2.3 Lösungen für die Immunzytochemie***Block- & Primärantikörperlösung*

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

*Zweitantikörperlösung*

2 %	PBS
	BSA

**2.2.4 Lösungen für die Glutamat-Aufnahme und -Freisetzung***Krebs-Hepes-Puffer*

140 mM	NaCl
4,7 mM	KCl
2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 mM	Hepes
1,2 mM	MgSO <sub>4</sub>
6,5 mM	Glukose
mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt	

*Medium für die Aufnahme-Versuche von Tritium-markiertem Glutamat*

0,05 $\mu$ M	Medium serumfrei
50 $\mu$ M	[ <sup>3</sup> H] L-Glutamat
	Kalium-Glutamat

*Lösung zur Stimulierung der Sekretion*

1,3 $\mu$ M	KR-Hepes
	Ionomycin

*BCA-Reagenz*

Im Verhältnis 50:1	Reagenz A
	Kupfersulfat 4%

**2.2.5 Fixierlösung**

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

**2.3 Antikörper**

**Primärantikörper:** WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz

$\alpha$ -Tubulin	monoklonales Maus-IgG, Sigma, St.Louis, USA (WB 1:1000)
C3	polyklonales Maus-IgG, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, Prof. I. Just (WB 1:5000)
Cdc42	monoklonales Maus-IgG, BD Transduction Laboratories, Pharmingen, Heidelberg (WB 1:2000)
GFAP	monoklonales Maus-IgG, Sigma, St.Louis, USA (IF 1:400)
GLAST	polyklonales Meerschweinchen-IgG, Chemicon, Temecula, USA (WB 1:5000, IF 1:2500)
GLT-1	polyklonales Meerschweinchen-IgG, Chemicon, Temecula, USA (WB 1:5000, IF 1:2500)
I $\kappa$ B	monoklonales Maus IgG, abcam, Cambridge, England (WB 1:4000)

NF $\kappa$ B (p65)	monoklonales Maus-IgG, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA (IF 1:200)
Rac1	monoklonales Maus-IgG, BD Transduction Laboratories, Pharmingen, Heidelberg (WB 1:2500)
RhoA	polyklonales Kaninchen-IgG, Santa Cruz Technologies, USA (WB 1:2000)
Synaptobrevin 106.5	polyklonales Kaninchen-IgG, Reinhard Jahn, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen (WB 1:2000)
Synaptotagmin	monoklonal Maus Aszites, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:4000)
SNAP 23	polyklonales Kaninchen-IgG, Bioteccon, Potsdam (WB 1:5000)
Syntaxin	monoklonal Maus Aszites, Sigma, St.Louis, USA (WB 1:5000)
VGLUT1	monoklonales Maus-IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:5000, IF 1:2500)
VGLUT2	polyklonales Kaninchen-IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:5000, IF 1:2500)
VGLUT3	polyklonales Kaninchen-IgG, SynapticSystems, Göttingen (WB 1:5000, IF 1:2500)

### **Sekundärantikörper:**

Peroxidase gebundenes Pferd-anti-Maus IgG	Vector Laboratories, Burlingame, England (WB 1:2000)
Peroxidase gebundenes Anti-Kaninchen IgG	Vector Laboratories, Burlingame, England (WB 1:2000)
Peroxidase gebundenes Anti-Meerschweinchen IgG	Jackson Immunoresearch Laboratories, Suffolk, England (WB 1:2000)

Alexa green Fluor 488 Ziege-anti-Meerschweinchen / Ziege-anti-Kaninchen	Molecular Probes,Eugene, USA (IF 1:5000)
Alexa red Fluor 594 Ziege-anti-Maus / Ziege-anti-Kaninchen	Molecular Probes,Eugene, USA (IF 1:5000)

## 2.4 Geräte und Material

BioRad Mini Protean II Elektrophoresekammer, BioRad, Hercules, USA

BioRad Power Pac 200, BioRad, Hercules, USA

BioRad Transblot SD Semi-dry Transfer cell, BioRad, Hercules, USA

Cawomat 2000 IR, Cawo Photochemische Fabrik GmbH, Schrobenhausen

ELISA Reader MR 5000, Dynatech, Bülach, CH

Eppendorf-Pipetten, Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Thermo-Mixer comfort, Eppendorf, Hamburg

Hybond-C, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England

Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England

Labofuge 400, Hereaus, Kendro, Osterode

Leica DMLB Epifluoreszenz-Mikroskop, Leica Microsysteme GmbH, Wetzlar

LS6500 Multipurpose Scintillation Counter, Beckman Coulter, USA

Millipore Reinst-Wasser, Chemicon, USA

MS1/2 Minishaker, Roth, Karlsruhe

Tischzentrifuge Qualitron, Roth, Karlsruhe

## 2.5 Methoden

### 2.5.1 Zellkultur

Astrozyten-Primärkulturen wurden aus Gesamtmäusegehirnen vom 2. bis 3. Tag postnatal (P2/3) präpariert, nachdem die Tiere durch Dekapitierung getötet wurden. Anschließend wurde der Kopf mit Nadeln fixiert, die Schädeldecke eröffnet, das Gehirn herauspräpariert und in eine mit eiskaltem Hank's Buffered Salt Solution (HBSS+) gefüllte Petrischale gegeben. Sobald allen Tieren das Hirn entnommen war, wurden die Meningen mit einer Pinzette gründlich entfernt und die Gehirne in mit HBSS+ gefüllten 15 ml Falcon-Tubes gegeben. Die Gehirne wurden dreimal in HBSS+ gewaschen und dieses zuletzt abgesaugt. Danach wurden die Gehirne mit einer über einer Flamme rundgeschmolzenen Pasteurpipette vorsichtig homogenisiert, indem sie mehrmals durch die verkleinerte Öffnung gezogen und mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) aufgefüllt wurden. Das Homogenat wurde für 10 Minuten bei 800 Umdrehungen pro Minute (U/Minute) und 4°C zentrifugiert, der entstehende Überstand abgesaugt und anschließend mit einer Pasteurpipette mit einer kleineren Öffnung erneut homogenisiert. Nun wurde das Homogenat mit DMEM aufgefüllt und ein weiteres Mal bei 4°C und 800 U/Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurden mit Poly-L-Lysin (100 µg/ml in PBS für 2 Stunden) beschichtete 6-well-Platten zweimal mit PBS gewaschen und mit etwas warmem DMEM, ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) befüllt. Die Zellen wurden nun auf Kulturplatten (1,5 Gehirne/well) vereinzelt und in den Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> zur Kultivierung verbracht. Die Zellen wurden während des Kultivierens alle 2-3 Tage gewaschen und mit frischem Medium versehen, wobei die ebenfalls in Kultur vorhandene Mikroglia abgeklopft oder abgeschüttelt wurde. Subkonfluente Kulturen wurden für morphologische Untersuchungen sowie Aufnahme- und Freisetzungsversuche mit Glutamat zusätzlich sowohl mit als auch ohne Glasplättchen in 24-well Platten rekultiviert.

### 2.5.2 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 wurde 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 Gel-Resten 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 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 SD Semi-dry Transfer Kammer zwischen Filterpapieren auf Nitrozellulose-Membranen verbracht. Bei 0,55 Ampère für 2 Gele wurden die Proteine typischerweise in 20-25 Minuten übertragen. Anschließend wurden die Membranen für 3 Minuten mit Ponceau-Rot gefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet, beschriftet und zur nachfolgenden Verarbeitung und Dokumentation eingescannt. Zur weiteren Antikörperbehandlung wurden Streifen im Bereich der zu untersuchenden Banden aus der Nitrozellulose-Membran geschnitten und für 1 Stunde zum Blocken der unspezifischen Bindungen und zum Entfärben in Blocklösung gelegt. Danach wurde der Primärantikörper in Antikörperlösung gelöst, zusammen mit der Nitrozellulose-Membran eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Blotstreifen nochmals in Blocklösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur mehrfach gewaschen und der Sekundärantikörper dazugegeben. Dieser inkubierte für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde der Streifen in TS-Puffer von überschüssigem

Antikörper gereinigt und die Proteinbanden durch den Enzym-gekoppelten Antikörper nach Zugabe von Chemilumineszenz-Reagenz auf ECL Hyperfilm sichtbar gemacht. Um die Vergleichbarkeit der Gesamtproteinmengen zu kontrollieren, wurden Färbungen von Referenzgelen mit Coomassie-Brilliant-Blau durchgeführt. Dazu wurde das komplette Gel nach der Elektrophorese in Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Lösung gegeben, 3 Minuten in der Mikrowelle erhitzt, mit destilliertem Wasser gewaschen und für weitere 6 Minuten in der Mikrowelle erwärmt, bis die gewünschte Farbtintensität eintrat. In Glycerol eingelegte Einweckfolien dienten als Hülle und wurden mit dem Gel in der Mitte in einen Rahmen eingespannt, in dem die Folie zum Trocknen für 24 Stunden bei Raumtemperatur aufgestellt wurde.

### **2.5.3 Immunzytochemie**

Als Immunzytochemie wird eine weitere 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 Astrozyten verwendet. Diese wurden zweimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und für 15-20 Minuten in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, für 1 Stunde in Blocklösung belassen und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in Blocklösung gelösten Primärantikörper inkubiert. Die Zellen wurden zwei weitere Male für 10 Minuten in PBS gewaschen und 1,5 Stunden mit fluoreszenzmarkiertem Sekundär-Antikörper bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS (2 x 10 Minuten) wurden die Glasplättchen mit 10 µl des Polyvinylalkohols Moviol als Eindeckmittel pro Glasplättchen auf Objektträger aufgebracht und eingebettet. Die angefärbten Zellen wurden nun entweder mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop oder mittels der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie analysiert und dokumentiert.

#### **2.5.4 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie**

Zum Erstellen von konfokalen Bildern wurde das konfokale Leica TCS SL Laser Scan Mikroskop mit 40fachem Öl-Immersionsobjektiv benutzt. Roter Fluoreszenz-Farbstoff wurde bei 543 nm und grüner Fluoreszenz-Farbstoff bei 488 nm Wellenlänge angeregt. Die Fluoreszenz aus den roten und grünen Kanälen wurde getrennt mit Filtern zwischen 498-535 nm und 587-666 nm detektiert. Die Bilder wurden erstellt mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel. Die konfokalen Aufnahmen wurden von Dr. Markus Höltje durchgeführt.

#### **2.5.5 Versuche zur Glutamat-Aufnahme und -Freisetzung**

Zur Untersuchung der Glutamat-Aufnahme und -Freisetzung wurden kultivierte Astrozyten zu definierten Zeiten entweder unter Kontrollbedingungen belassen oder mit 80 nM C3bot vergiftet. Zu Beginn wurden diese mit serumfreiem Medium, dem 50 µM Kalium-Glutamat und 0,05 µM tritiummarkiertes Glutamat zugesetzt wurden, für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Die Zellen wurden nun dreimal gewaschen. Für Glutamat-Aufnahme-Versuche erfolgte hier bereits die Lyse der Zellen und die Flüssigszintillationsmessung der aufgenommenen Radioaktivität. Astrozyten für die Sekretions-Versuche wurden zusätzlich entweder nur mit KR-Hepes/Glukose inkubiert oder mit 1,3 µM Ionomycin für 10 Minuten bei 37°C zur Sekretion stimuliert. Ionomycin ist eine pH-abhängige Calcium-Ionophore, die Calcium im Komplex bindet und durch biologische Membranen transportiert. Der Überstand inklusive der sezernierten Menge an Glutamat/Glutamin wurde in Szintillationsröhrchen (Poly-Q vials) zur Messung überführt. Zur Bestimmung der in den Zellen verbliebenen Menge an Radioaktivität wurden die Astrozyten mit 0,4% Triton X-100 lysiert. Das Lysat wurde ebenfalls in Röhrchen überführt, denen der Flüssigszintillator hinzugefügt wurde. Die Röhrchen wurden nun zur Messung in den Szintillationszähler eingesetzt.

Das physikalische Prinzip der Szintillation wird in weiten Bereichen der Grundlagenforschung und Nuklearmedizin ausgenutzt. Ein Szintillationszähler oder Liquid Szintillation Counter (LCS) zählt die Anzahl von entstehenden Lichtblitzen, die äquivalent zur Zahl der radioaktiven Zerfälle ist, da beim Auftreffen radioaktiver Strahlung aus fluoreszierenden Materialien Photonen ausgelöst werden. Dies kommt

durch die Anhebung eines Elektrons auf ein höheres Energieniveau durch die Strahlung, dessen Rückkehr in den Ursprungszustand und der gleichzeitigen Emission eines Photons zustande. Dieser Effekt kann sowohl zur Bestimmung der Strahlungsintensität von  $\gamma$ -Strahlung, als auch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Strahlung genutzt werden. Flüssigkeitsszintillatoren arbeiten mit einer aus mehreren Szintillatoren bestehenden organischen Lösung, wobei der Primärszintillator die absorbierte Energie in Licht umwandelt, welches sich meist im UV-Bereich befindet, und der Sekundärszintillator das im UV-Bereich liegende Licht absorbiert und im sichtbaren Bereich remittiert.

Mithilfe der Messergebnisse konnten quantitative Aussagen über die Aufnahme oder Freisetzung von Glutamat durch Astrozyten gemacht werden. Eine zurückgehaltene Menge des Zelllysats wurde für eine Proteinmengenbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)- Reagenz verwendet.

Die so erhaltenen Zerfälle pro Minute (DPM)-Werte wurden in Zerfälle pro Sekunde umgerechnet. Dieser Wert entspricht der Einheit Bequerel ( $\text{Zerfälle pro Minute} / 60 \text{ [s]} = 1 \text{ Bq}$ ). Mittels der spezifischen Aktivität des eingesetzten Glutamats (40 Ci/mmol) und dem Umrechnungsfaktor von Ci in Bq (1 Ci= 37 GBq), konnte die aufgenommene oder freigesetzte Menge an Glutamat (in nmol) berechnet werden, die typischerweise in nmol / g Protein angegeben wurde.

### **2.5.6 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 durchgeführt um einen Bezug herzustellen zwischen der aufgenommenen bzw. abgegebenen Radioaktivität und der vorhandenen Proteinmenge. Außerdem zur Berechnung der Proteinmengen vor dem Auftragen auf die Proteingele.

Von dem bei der Szintillationsmessung zurückbehaltenen Zelllysat wurden 25  $\mu\text{l}$  in ein Eppendorfreaktionsgefäß gefüllt und 25  $\mu\text{l}$  0,4% Triton X-100 zugefügt. Für die durchzuführende Doppelbestimmung wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  aus jedem Röhrchen in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  des BCA-

Reagenzes hinzupipettiert. Es wurden zwei Vertiefungen nur mit Triton X-100 und BCA-Reagenz gefüllt, um den Leerwert zu ermitteln. 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.

### **2.5.7 Vesikelfärbung**

Der Farbstoff AM1-43 ist ein aktivitätsabhängiger kationischer Styryl-Farbstoff, der ein lipophiles Ende aus zwei Kohlenstoffketten und eine hochhydrophile, kationische Kopfgruppe besitzt. In der Zellpräparation verteilt er sich zwischen der wässrigen Phase, in der er nicht fluoreszieren kann, und der Oberfläche der äußeren Zellmembran, wo das lipophile Ende in die Membran eindringen und intensiv fluoreszieren kann. Während der Endozytose wird der Farbstoff aufgenommen und eingeschlossen. Durch Waschschriffe wird der an der Zelloberfläche befindliche Farbstoff abgewaschen, wodurch die Fluoreszenzsignale proportional zu den neugeformten Vesikeln sind. Im Verlauf der stimulierten Exozytose wird AM1-43 zusammen mit den Neurotransmittern freigesetzt. Um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren, kann 4-Sulfonato Calix(8)Arene-Natrium Salz (SCAS)-Quencher-Lösung genutzt werden. Quencher können Anregungsenergie von Nachbarmolekülen übernehmen, während das gequenchte Molekül in den Grundzustand wechselt und so an einer Fluoreszenz gehindert wird.

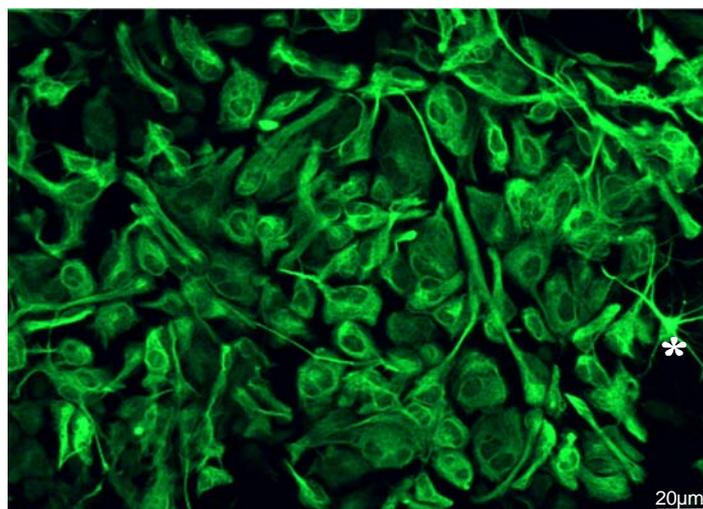
Für die Vesikelfärbung wurden auf Glasplättchen gewachsene Zellen unter Kontrollbedingungen oder mit C3bot behandelt, benutzt. Astrozyten wurden zuerst für 1 Minute mit in KR-HEPES gelöstem AM1-43 (4 µM) mit oder ohne Zusatz von 1,3 µM Ionomycin zur Stimulation der Sekretion inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Astrozyten für 4 Minuten mit SCAS-Quencher-Lösung (500 µM) behandelt. Im Anschluss daran wurden die gefärbten Zellen erneut gewaschen und für 20 Minuten in Fixierlösung fixiert. Die fixierten Zellen wurden für 5 Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, 1 µg/ml) zur Kern-Markierung gegengefärbt und im Anschluss daran dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach einem letzten Waschschriff wurden die gefärbten Zellen eingebettet, fotografiert und dunkel aufbewahrt.

Für den quantitativen Vergleich der Anzahl AM1-43 gefärbter Vesikel pro Astrozytenzelle, unter den jeweiligen Versuchsbedingungen, wurden die Zellen nach der Vesikelfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Für jede Bedingung wurden von jeweils zehn Bildern in Feldern von je  $136 \times 108 \mu\text{m}$  Punkte in der Größenordnung zwischen 50 und 250 Pixel mittels Scion Image Software ausgezählt. Zu jeder AM1-43-Vesikelfärbung wurde eine Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI durchgeführt, ebenfalls fotografiert, ausgezählt und die Zellzahl zur Fluoreszenzpunktzahl ins Verhältnis gesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Effekte von *Clostridium botulinum* C3 Protein auf die Morphologie kultivierter Maus-Astrozyten

Als Modellsystem zur Untersuchung von Rho-abhängigen Effekten in Astrozyten wurden Primärkulturen verwendet. Mit diesem etablierten System konnten ausreichende Mengen an Astrozyten auch für biochemische Zwecke zur Verfügung gestellt werden. Die im Ausgangsmaterial noch vorhandenen Neuronen wurden durch Scherkräfte während des Homogenisierungsprozesses zerstört. Nach Abschütteln der zunächst noch im Kultursystem vorhandenen Mikroglia waren die Kulturen zu 98% rein. Zunächst erfolgte eine Betrachtung der untersuchten Zellen hinsichtlich der Morphologie, wofür diese typischerweise für 10-14 Tage kultiviert und anschließend fixiert wurden. Um die Morphologie unter Kontrollbedingungen beurteilen zu können, wurden die subkonfluenten, auf Glasplättchen gewachsenen Zellen gegen das für Astrozyten spezifische saure Gliafaserprotein (GFAP) gefärbt (Abb. 5).

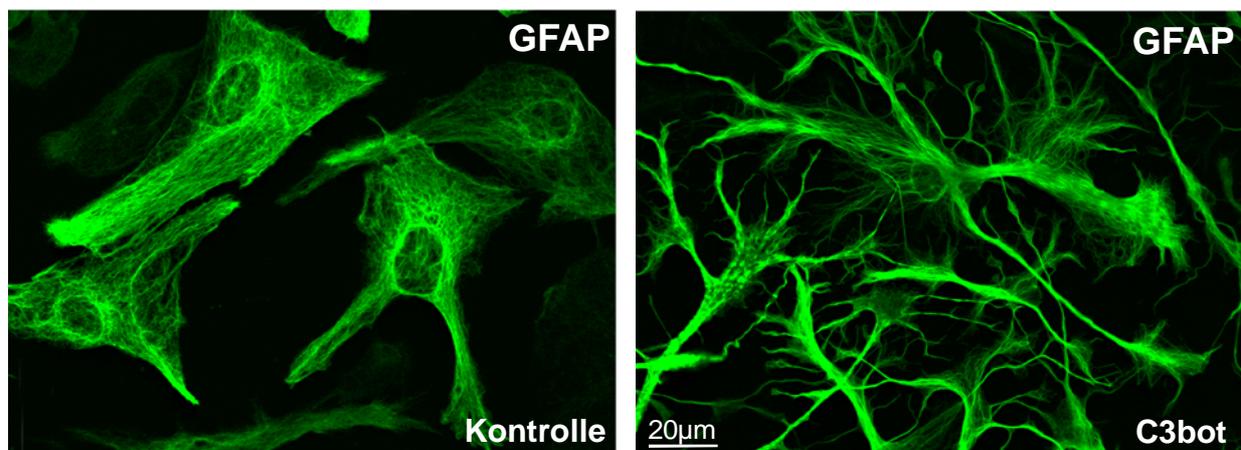


**Abb.5:**

*Astrozytenkultur der Maus*

Astrozyten aus dem Gesamthirn der Maus wurden postnatal am Tag 3 (P3) präpariert, kultiviert und nach mehrmaligem Mediumwechsel und Abschütteln von Mikroglia auf Glasplättchen weiterkultiviert. Nach 10 Tagen in Kultur wurden die subkonfluenten Zellen fixiert und mit Hilfe eines Antiserums gegen saures Gliafaserprotein (GFAP, glial fibrillary acidic protein), als Markerprotein für Astrozyten, gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie. In Kultur erscheinen die Astrozyten als flache, häufig fibroblastenartige Zellen. Ein geringer Prozentsatz der Zellen (siehe \*) weist ausgeprägte Fortsätze auf.

GFAP bildet den Grundbaustein der astrozytären Intermediärfilamente und ist, neben Vimentin und S-100 $\beta$ , das am häufigsten verwendete Markerprotein für Astrozyten im ZNS, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Bignami und Dahl, 1976; Boyes et al., 1986). Unter Kontrollbedingungen wiesen die Zellen eine polygonale, flache, fibroblasten-ähnliche Morphologie auf. Ein geringer Prozentsatz wies ausgeprägte, dünne Fortsätze auf. Für eine morphologische Beurteilung der Effekte von *Clostridium botulinum* C3 Protein (C3bot) auf Astrozyten wurden diese, wie in den meisten nachfolgend beschriebenen Versuchen, für 72 Stunden unter serumfreien Bedingungen mit 80 nM C3bot inkubiert (Abb. 6). Die so behandelten Zellen wiesen eine stark ausgeprägte Veränderung ihrer Morphologie auf. Zu beobachten war ein deutlich verstärktes Fortsatzwachstum mit vermehrter Verzweigung und ein Rückzug des Zytoplasmas um die Kernregion der Astrozyten. Dieses Phänomen, auch als „Stellation“ bezeichnet, konnte schon in früheren Arbeiten an Astrozytenprimärkulturen beschrieben werden (Höltje et al., 2005).



#### Abb.6

##### *Morphologische Veränderungen kultivierter Astrozyten nach Inkubation mit C3bot*

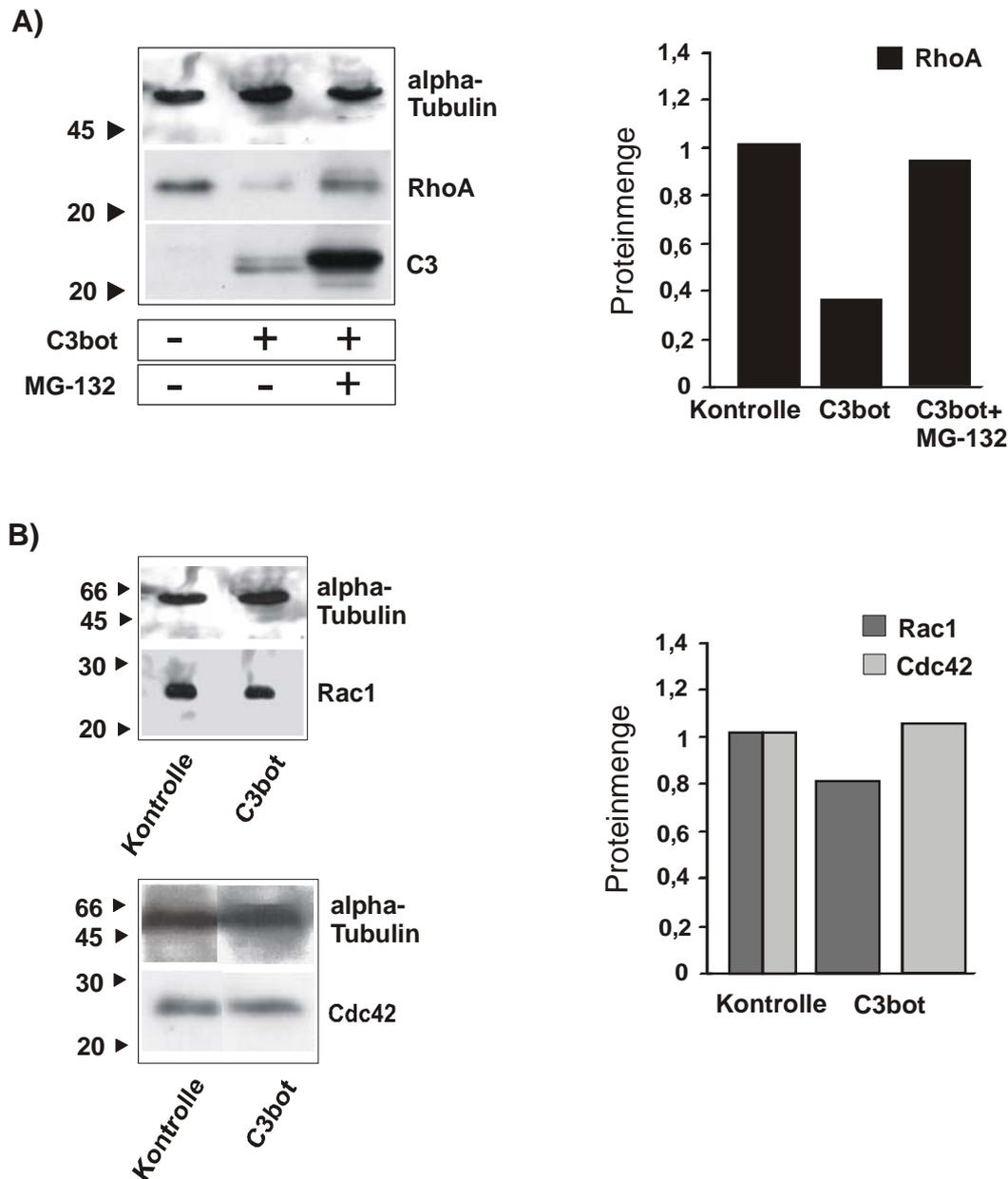
Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit 80 nM *Clostridium botulinum* C3 Protein (C3bot) serumfrei inkubiert. Unbehandelte Kulturen dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gegen GFAP gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie. Die unter Kontrollbedingungen fibroblastenartigen Astrozyten weisen nach Inkubation mit C3bot ein deutlich verstärktes Fortsatzwachstum hin zu einem ramifizierten Erscheinungsbild auf.

### 3.2 C3bot-Effekte auf das Expressionsmuster kleiner GTPasen der Rho-Familie

Aktinquervernetzung, -kontraktilität, Mikrotubuliwachstum und -stabilisierung bestimmen im Wesentlichen die Zellmorphologie. Kleine GTPasen der Rho-Familie, hauptsächlich RhoA, Rac1 und Cdc42, fungieren dabei als Regulatoren des Zytoskeletts. Zur Untersuchung möglicher Effekte der Inkubation mit C3bot auf das Expressionsmuster der Rho-Proteine wurden Astrozyten mit C3bot inkubiert. Mittels Proteingelelektrophorese, Westernblot und Chemilumineszenz (ECL)-Detektion wurde das Proteinniveau der kleinen Rho-Proteine semi-quantitativ analysiert (Abb. 7). Als Referenzbande zur Auswertung der Veränderungen der Proteinmenge wurde alpha-Tubulin verwendet.

Die Analyse ergab einen deutlichen Rückgang des Proteinniveaus von RhoA (62%) nach C3bot-Inkubation im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Abb. 7 A). Verschiedene zelluläre Mechanismen sind als Ursache für den Rückgang in der Proteinmenge denkbar: Die Proteine könnten zum Einen polyubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut worden sein. Aber auch Regulationsmechanismen auf Transkriptions- und Translationslitionsebene der untersuchten Proteine könnten verantwortlich sein für die Verminderung des Proteinniveaus. Mittels des pharmakologischen Proteasomen-Inhibitors MG-132 wurde zunächst eine geförderte proteasomale Degradierung untersucht. MG-132 stabilisiert den inhibitorischen Faktor I $\kappa$ B, einen Inhibitor des Transkriptionsfaktors  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), wodurch die Expression des Proteasoms blockiert wird. Dies verhindert den Abbau der Proteine durch das 26S-Proteasom nach Anbindung von Ubiquitin (Rock et al., 1994).

Nach Zugabe von MG-132 (50  $\mu$ M) für 48 Stunden wurde der Rückgang der Proteinmenge von RhoA nach C3bot-Inkubation deutlich vermindert. Ebenso konnte für C3bot eine stärkere Bandenintensität nach Inkubation mit MG-132 beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass sowohl RhoA, als auch internalisiertes C3bot dem proteasomalen Abbau unterliegen (Abb. 7 A). Anschließend wurde der Einfluss von C3bot auf die Proteine Rac1 und Cdc42 untersucht. Für Rac1 konnte nur ein geringer Rückgang (21%) in der Proteinmenge nach C3bot-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nachgewiesen werden (Abb. 7 B). Auf die Expression von Cdc42 hatte C3bot keinen Effekt.

**Abb.7****Expressionsmuster von RhoA, Rac1 und Cdc42 in Astrozyten nach Inkubation mit C3bot**

Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Kulturen dienen als Kontrolle. Die Zellen wurden homogenisiert und mittels Proteingelelektrophorese und Western-Blot auf die Expression kleiner GTPasen der Rho-Familie hin untersucht. Eingesetzt wurden Primärantikörper gegen RhoA, Rac1, Cdc42, C3bot sowie alpha-Tubulin als internem Standard. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Reagenz, die Banden wurden über Lab-Image-Software semi-quantitativ ausgewertet.

A: Besonders deutlich ist der Effekt von C3bot auf RhoA, das einen deutlichen Rückgang des Proteinniveaus im Vergleich zur Kontrolle aufweist. Die Applikation des Proteasomen-Inhibitors MG-132 (50  $\mu$ M) für 48 Stunden vermindert den Abbau von RhoA und C3bot.

B: Für Rac1 kann ebenfalls ein geringer Effekt nachgewiesen werden. Auf die Expression von Cdc42 hat C3bot keinen Einfluss.

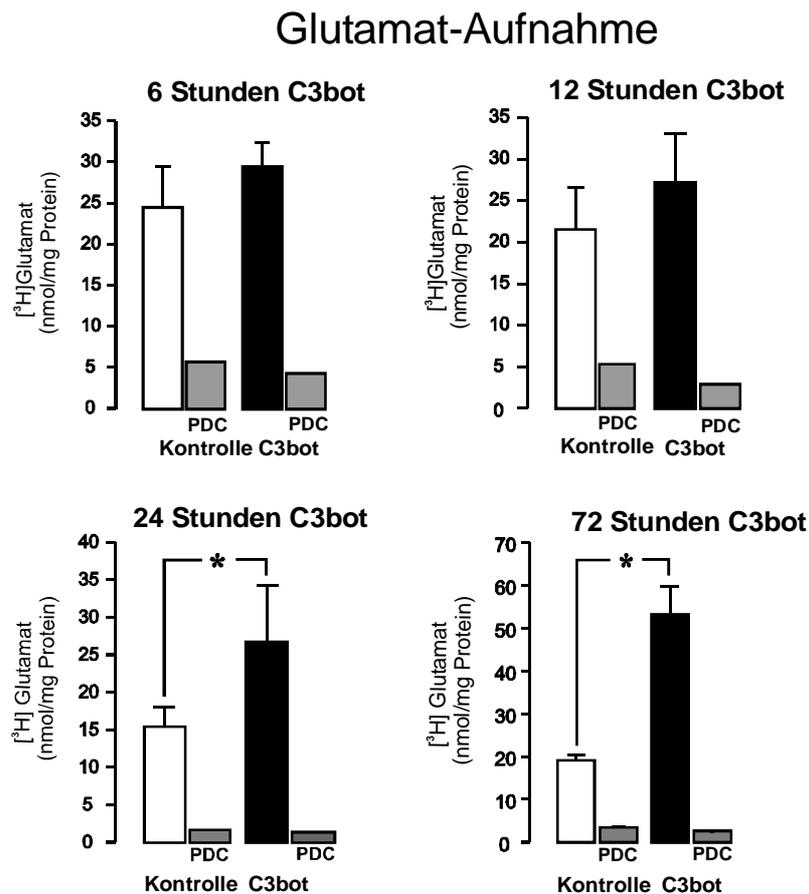
### 3.3 Effekte von C3bot auf die [<sup>3</sup>H] Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten

Im Anschluss an die Untersuchungen zur Morphologie, sowie die proteinbiochemischen Experimente, die im Wesentlichen einer Überprüfung der Wirksamkeit von C3bot auf die Kulturen galten, sollten nun mögliche damit einhergehende funktionelle Konsequenzen der C3bot-Inkubation untersucht werden. Eine der Hauptaufgaben der Astrozyten besteht darin, freigesetztes, auf postsynaptische Neurone exzitatorisch wirkendes Glutamat wieder aufzunehmen und zu verstoffwechseln, da frei im Extrazellulärraum befindliches Glutamat in höheren Konzentrationen exzitotoxisch wirkt (Erencinska und Silver, 1990). Glutamat kann in Astrozyten sowohl gespeichert als auch freigesetzt und Neuronen wieder zur Verfügung gestellt werden.

Kultivierte Astrozyten wurden zunächst für 6, 12, 24 oder 72 Stunden mit C3bot inkubiert und anschließend für 1 Stunde mit 50  $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H] Glutamat beladen. An den anschließend lysierten Zellen wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung die aufgenommene Menge an Glutamat gemessen und auf die vorhandene Proteinmenge bezogen (Abb. 8). Um die in diesem Assay gemessene Menge an unspezifisch gebundenem Glutamat zu dokumentieren, wurden die glialen Plasmamembrantransporter Glutamat/Aspartat-Transporter (GLAST) und Glutamattransporter-1 (GLT-1) mit L-trans-2,4-pyrrolidin-dicarboxylat (PDC), einem kompetitiv hemmenden Neurotransmitter-Analogon, spezifisch inhibiert (Bridges et al., 1991).

Nach 24 Stunden C3bot-Inkubation ergab sich eine signifikante Steigerung der Glutamat-Aufnahme auf 27 nmol/mg Protein im Vergleich zu 15,1 nmol/mg Protein unter Kontrollbedingungen. Nach 72 Stunden war dieser Anstieg mit einer Steigerung von 19 nmol/mg Protein auf 53 nmol/mg Protein noch deutlicher ausgeprägt. Die unspezifische Aufnahme lag nach 72 Stunden zwischen 3 und 5 % der Gesamtaufnahme. Auf eine Untersuchung der Effekte noch ausgedehnterer Inkubationszeiten wurde auch vor dem Hintergrund einer möglichen Zunahme unspezifischer Effekte durch die morphologischen Veränderungen verzichtet. Für die kinetische Analyse der Glutamat-Aufnahme wurden sowohl Kontrollzellen als auch mit C3bot behandelte Zellen für einen auf 10 Minuten verkürzten Zeitraum mit 50  $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H] Glutamat inkubiert, um mögliche Sättigungsphänomene der Transportersysteme zu minimieren (Abb. 9). Die nichtlineare kinetische Auswertung nach Michaelis-Menten wurde zur doppelt reziproken Lineweaver-Burke-Darstellung transformiert. Hier wurde deutlich, dass die gesteigerte Glutamat-Aufnahme der Zellen nach C3bot-Inkubation

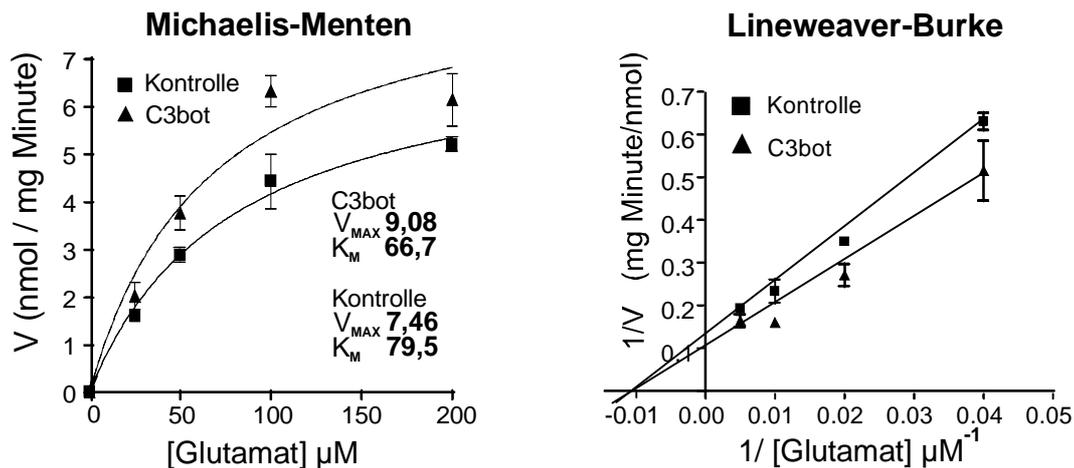
zum Einen auf der erhöhten maximalen Transportgeschwindigkeit  $V_{\max}$  von 7,46 nmol/mg/ Minute unter Kontrollbedingungen auf 9,08 nmol/mg/Minute nach C3bot-Inkubation und zum Anderen auf der gesteigerten Substrataffinität für Glutamat basiert, was der geringere  $K_m$ -Wert von 66,7  $\mu\text{M}$  im Vergleich zum Kontrollwert von 79,5  $\mu\text{M}$  belegt.



#### Abb.8

##### *C3bot erhöht die Aufnahme von [<sup>3</sup>H] Glutamat zeitabhängig*

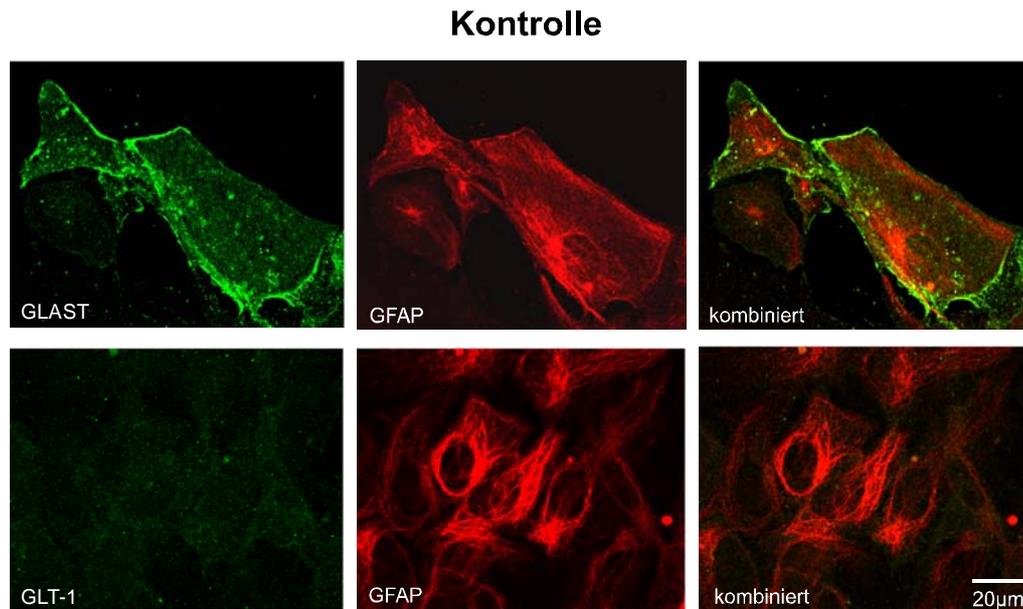
Kultivierte Astrozyten wurden für 6, 12, 24 oder 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Kulturen dienten als Kontrolle. Für die Aufnahme-Experimente wurden die Astrozyten für 1 Stunde mit 50  $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H] Glutamat inkubiert. Die aufgenommene Menge an Glutamat wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessung an den lysierten Zellen bestimmt und auf die jeweils vorhandene Proteinmenge bezogen. 1 mM PDC (Pyrrolidindicarboxylat) wurde als spezifischer Inhibitor der Plasmamembrantransporter GLAST (Glutamat/Aspartat-Transporter) und GLT-1 (Glutamattransporter 1) eingesetzt, um den Anteil unspezifisch gebundenen [<sup>3</sup>H] Glutamats zu dokumentieren. Nach 24 Stunden C3bot-Inkubation zeigt sich eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Aufnahme in den mit C3bot behandelten Zellen. Nach 72 Stunden zeigt sich dieser Effekt noch deutlicher ausgeprägt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Bestimmungen in Triplikaten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ; \*) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

**Abb.9**

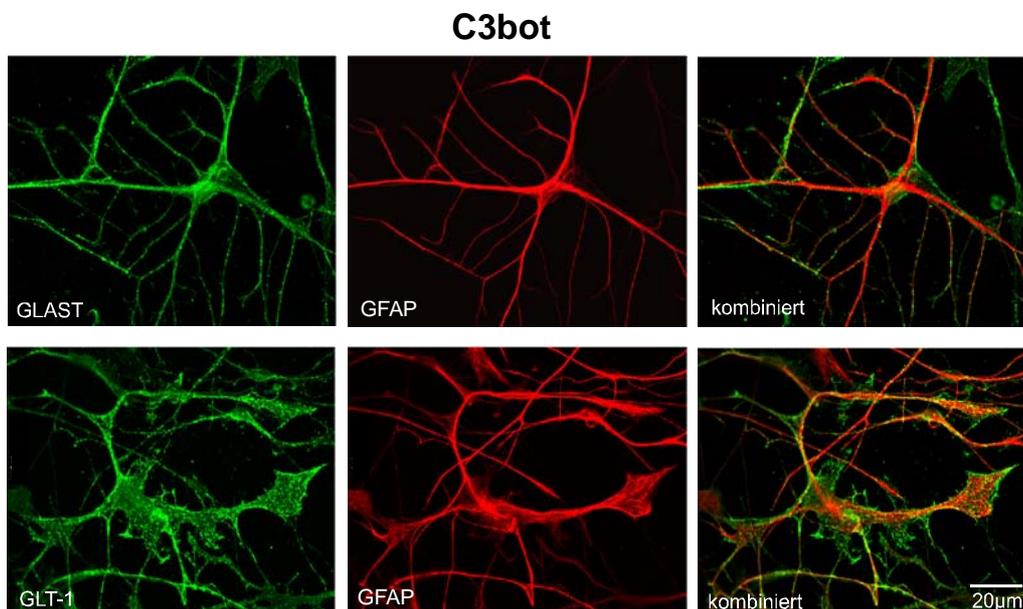
*Steigerung der Transportgeschwindigkeit und Substrataffinität für Glutamat in Astrozyten nach C3bot-Inkubation*

Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot behandelt. Unbehandelte Kulturen dienen der Kontrolle. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit 50  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ] Glutamat inkubiert. Danach wurde die [ $^3\text{H}$ ] Glutamat-Aufnahme mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung ermittelt und auf die jeweilige Proteinmenge bezogen. Die nichtlineare kinetische Analyse nach Michaelis-Menten und deren Transformation zur doppelt-reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burke zeigen, dass die gesteigerte [ $^3\text{H}$ ] Glutamat-Aufnahme der C3bot-behandelten Astrozyten sowohl auf einer erhöhten Transportgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ), als auch auf einer gesteigerten Substrataffinität ( $K_m$ ) basiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Bestimmungen in Triplikaten eines repräsentativen Experiments.

Um mögliche Effekte von C3bot auf das Transportsystem der Plasmamembran zu untersuchen, wurde im Folgenden die Expression der dort lokalisierten Glutamattransporter untersucht. Hierfür wurden kultivierte Astrozyten auf das Astrozyten-Markerprotein GFAP und die beiden hochaffinen Transportsubtypen der Plasmamembran, GLAST und GLT-1, immunzytochemisch untersucht (Abb. 10). Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von Proteinen wurde erneut die konfokale Laser-Scan Mikroskopie genutzt, da bei diesem Verfahren optische Schnitte durch die Zelle erfolgen, die eine für diese Zwecke genügend genaue Lokalisation der untersuchten Antigene in der Zelle erlauben. Unter Kontrollbedingungen ließ sich GLAST erwartungsgemäß bevorzugt an der Plasmamembran der Astrozyten darstellen. Im Gegensatz dazu ließ sich GLT-1 praktisch nicht nachweisen. Kultivierte Astrozyten wurden parallel dazu mit C3bot inkubiert und ebenso gegen GFAP, GLAST oder GLT-1 jeweils doppelgefärbt (Abb. 11). Nach C3bot-Behandlung ließen sich im Gegensatz zu den Kontrollbedingungen beide Glutamattransportersubtypen in der großen Mehrzahl (90%) der GFAP-positiven und stark verzweigten Zellen sowohl im Bereich der Somata, als auch in den Fortsätzen lokalisieren.

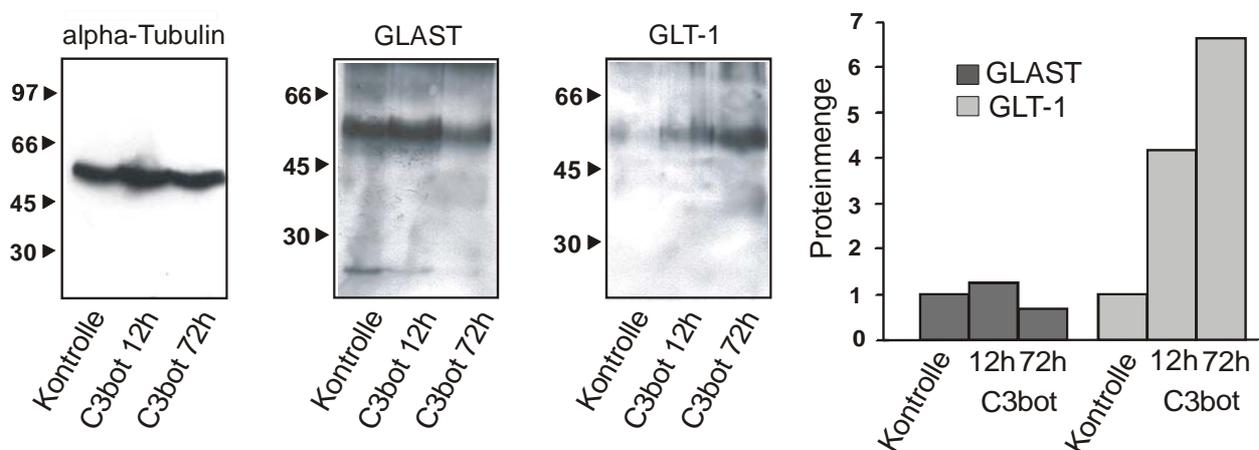
**Abb.10***Expression von GLAST in Astrozyten unter Kontrollbedingungen*

Astrozyten wurden unter Kontrollbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und gegen GFAP und die Plasmamembran-Glutamattransporter GLAST und GLT-1 doppelgefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie. Der Glutamattransporter GLAST weist unter diesen Bedingungen eine bevorzugte Lokalisation an der Plasmamembran der Zellen auf, wohingegen GLT-1 unter Kontrollbedingungen praktisch nicht nachweisbar ist.

**Abb.11***C3bot induziert die Expression von GLT-1 in kultivierten Astrozyten*

Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und gegen GFAP und die Glutamattransporter GLAST und GLT-1 jeweils doppelgefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie. Sowohl GLAST auch als GLT-1 lassen sich in der großen Mehrzahl der GFAP-positiven, stark verzweigten Zellen bevorzugt an der Plasmamembran im Bereich des Somas, aber auch in den Fortsätzen nachweisen.

Um diese Beobachtung auch proteinbiochemisch zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden Astrozyten für 12 oder 72 Stunden mit C3bot inkubiert und mittels Westernblot-Verfahren auf die Expression von GLAST und GLT-1 hin analysiert (Abb. 12). Bezogen auf alpha-Tubulin als internem Standard konnte ein zeitabhängiger Anstieg um das 4,2 (12h) bzw. 6,5fache (72h) im Proteinniveau des unter Kontrollbedingungen kaum nachweisbaren GLT-1 dokumentiert werden. Das GLAST-Proteinniveau hingegen war nach 12 Stunden nahezu äquivalent zur Kontrolle und nach 72 Stunden um ca. 30% erniedrigt.



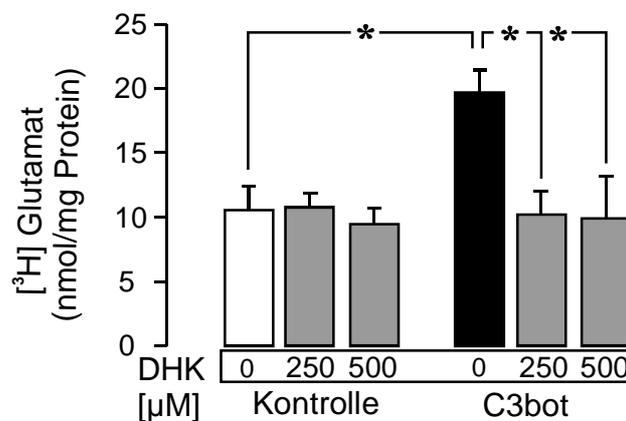
### Abb.12

#### *Expressionsmuster der Glutamattransporter GLAST und GLT-1 in Astrozyten.*

Kultivierte Astrozyten wurden für 12 oder 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Kulturen dienten als Kontrolle. Mittels Proteingelelektrophorese und anschließendem Westernblot-Verfahren erfolgte der Proteinnachweis mit Antikörpern gegen alpha-Tubulin als internem Standard, sowie gegen die Glutamattransporter GLAST und GLT-1. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Reagenz. Unter diesen Bedingungen kann nach 72 Stunden ein deutlicher Anstieg des Proteinlevels von GLT-1 beobachtet werden. Das Proteinniveau von GLAST hingegen ist nach 72 Stunden Inkubation erniedrigt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment.

Um den funktionellen Nachweis zu führen, dass die C3bot-abhängig gesteigerte Glutamat-Aufnahme der Astrozyten auf einer gesteigerten Transportaktivität von GLT-1 beruht, wurde ein pharmakologischer Ansatz verwendet. Hierfür wurde Dihydrokainat (DHK) als spezifischer, nicht-kompetitiver Inhibitor des Glutamattransporters GLT-1 eingesetzt (Munoz et al., 1987; Levy et al., 1998).

Kultivierte Astrozyten wurden unter den bekannten Bedingungen mit C3bot inkubiert. Die Zellen wurden mit 250 oder 500  $\mu\text{M}$  Dihydrokainat (DHK) für 30 Minuten präinkubiert und darauf für 1 Stunde mit 50  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ] Glutamat beladen. Auf die Glutamat-Aufnahme der Kontrollzellen hatte DHK bei beiden Konzentrationen keinen Einfluss (Abb. 13). Die gesteigerte Glutamat-Aufnahme nach C3bot-Behandlung wurde im Gegensatz dazu nahezu exakt auf das Kontrollniveau reduziert. Diese Ergebnisse belegen, dass die Mehraufnahme an [ $^3\text{H}$ ] Glutamat nach Inkubation mit C3bot tatsächlich auf einer gesteigerten Expression und Transportaktivität von GLT-1 beruht.



### Abb.13

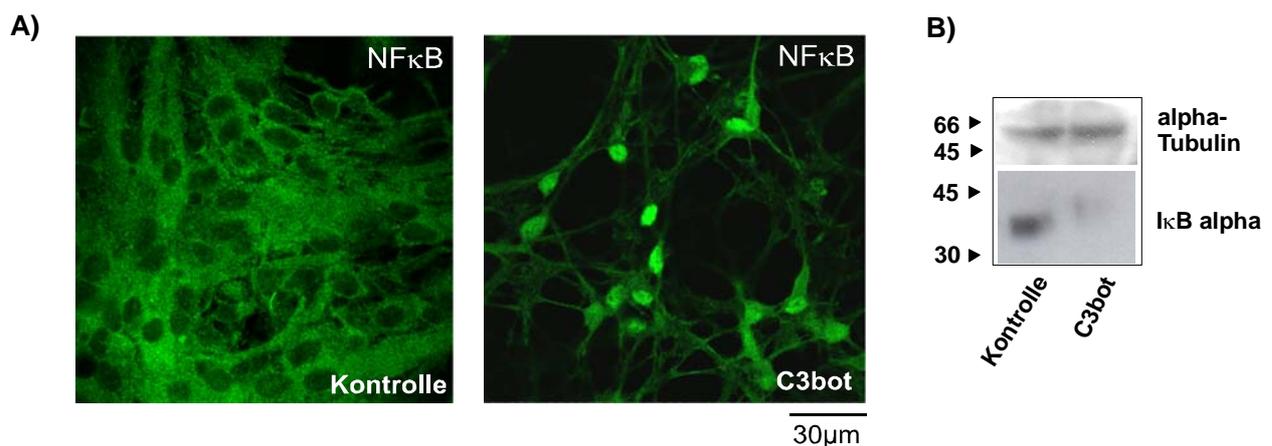
*Die gesteigerte [ $^3\text{H}$ ] Glutamat-Aufnahme nach Inkubation mit C3bot beruht auf der Aktivität von GLT-1*

Astrozytenkulturen wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Astrozyten dienten als Kontrolle. Vor den Aufnahme-Experimenten wurden die Astrozyten für 30 Minuten mit Dihydrokainat (DHK), einem spezifischen Inhibitor des Glutamattransporters GLT-1, in zwei Konzentrationen präinkubiert und danach für 1 Stunde mit 50  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ] Glutamat beladen. Die aufgenommene Menge an Glutamat wurde durch Flüssigszintillationsmessung an den lysierten Zellen bestimmt und auf die jeweils vorhandene Proteinmenge bezogen. Unter Kontrollbedingungen hat die Präinkubation mit DHK keinen Effekt auf die [ $^3\text{H}$ ] Glutamat-Aufnahme. Im Gegensatz dazu wird die gesteigerte [ $^3\text{H}$ ] Glutamat-Aufnahme in C3bot-behandelten Astrozyten unter DHK wieder auf das Kontrollniveau reduziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Bestimmungen in Triplikaten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ; \*) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

Aus den Ergebnissen der bislang beschriebenen Experimente ergab sich die Frage nach den beteiligten Signaltransduktionsmechanismen, über die die GLT-1-Expression nach C3bot-Inkubation hochreguliert wurde. Die Transkription des Gens für GLT-1 unterliegt der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Nuklear-Faktor  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) (Rodriguez-Kern et al., 2003). Für die Proteinexpression von GLT-1 muss ein proteasomaler Abbau

des inhibitorischen Faktors  $\kappa\text{B}$  ( $\text{I}\kappa\text{B}$ ) und die anschließende Translokation des Heterodimers  $\text{NF}\kappa\text{B}$  ( $\text{p}50/\text{p}65$ ) in die Kernregion der Zelle erfolgen. Dort bindet  $\text{NF}\kappa\text{B}$  an die Zell-DNA und aktiviert die Transkription des Gens für  $\text{GLT-1}$ .

Um die zelluläre Lokalisation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  zu dokumentieren, wurden kultivierte Astrozyten zunächst mit C3bot inkubiert und gegen die  $\text{p}65$ -Untereinheit von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  gefärbt (Abb. 14 A).



**Abb.14**

***C3bot induziert die Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in die Kernregion via Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}$***

Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Die Zellen wurden fixiert und gegen die  $\text{p}65$ -Untereinheit des Transkriptions-Faktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie.

A: Unter Kontrollbedingungen kann  $\text{NF}\kappa\text{B}$  hauptsächlich im Zytoplasma der Astrozyten nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit C3bot zeigt sich eine deutliche Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in die Zellkernregion.

B: Mittels Proteingelelektrophorese und anschließendem Westernblot-Verfahren erfolgte der Proteinnachweis mit Antikörpern gegen  $\text{I}\kappa\text{B}$  alpha. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Reagenz. Nach der Inkubation mit C3bot zeigt sich ein deutlich vermindertes Proteinniveau von  $\text{I}\kappa\text{B}$  alpha.

Mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie konnte die Untereinheit unter Kontrollbedingungen hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit C3bot war eine Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  aus dem Zytoplasma der Zelle in die Kernregion nachweisbar. Für einen proteinbiochemischen Nachweis dieses C3bot-Effektes wurde der inhibitorische Faktor  $\text{I}\kappa\text{B}$  in kultivierten und mit C3bot inkubierten Zellen mittels Westernblot-Technik analysiert (Abb. 14 B). Es zeigte sich eine Verschiebung von der dephosphorylierten (36kDa) zur phosphorylierten (40kDa)

Form von I $\kappa$ B. Außerdem konnte ein deutlicher Rückgang im Gesamtproteinniveau von I $\kappa$ B nach C3bot-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollbedingungen beobachtet werden.

### 3.4 Effekte von C3bot auf die vesikuläre [ $^3$ H] Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten

Neben den hochaffinen Plasmamembrantransportern GLAST und GLT-1 wurde in Astrozyten die vesikuläre Speicherung von Glutamat über vesikelständige Glutamattransporter (VGLUT1-3) nachgewiesen (Belocchio et al., 2000; Bai et al., 2001; Fremeau et al., 2002; Montana et al., 2004; Bezzi et al., 2004). Durch die Speicherung in sekretorischen Vesikeln könnte über die Veränderung der zytoplasmatischen Glutamat-Konzentration auch der Transport über die Plasmamembran beeinflusst werden.

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts von C3bot auf die Proteinexpression vesikulärer Glutamattransporter wurden kultivierte Zellen mit C3bot inkubiert und gegen VGLUT 1-3 und GFAP doppel-gefärbt (Abb. 15).

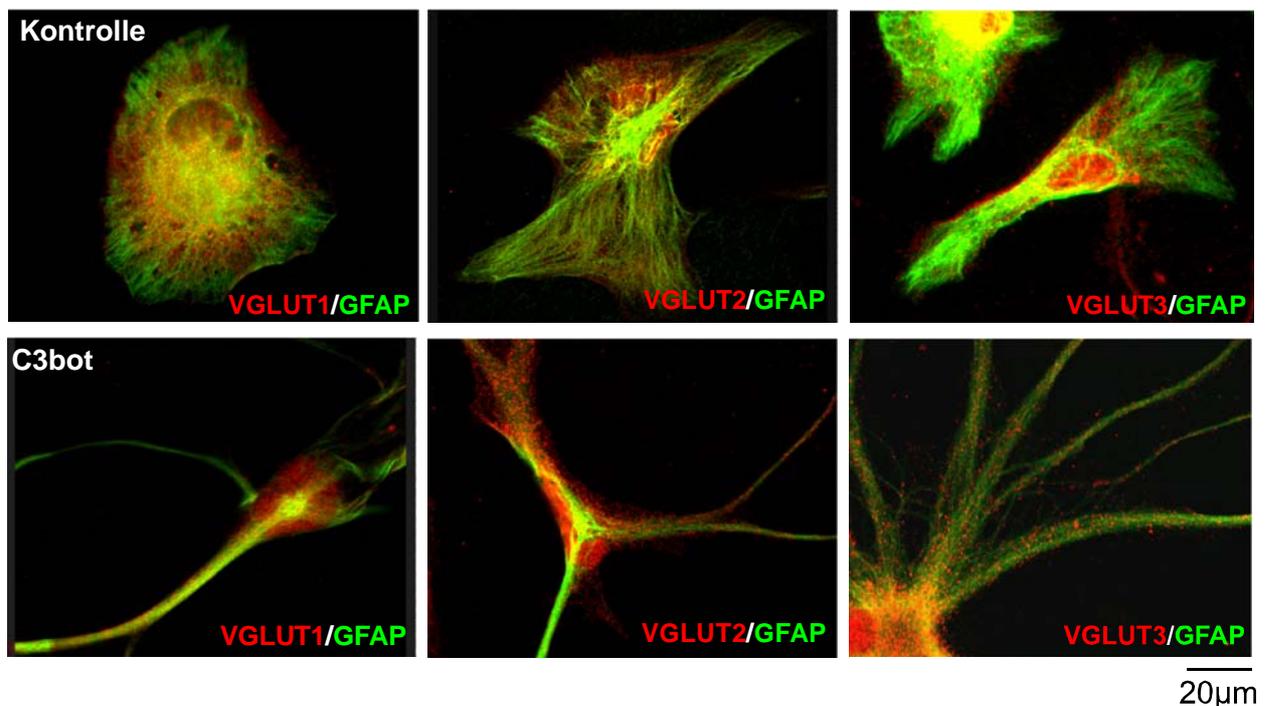
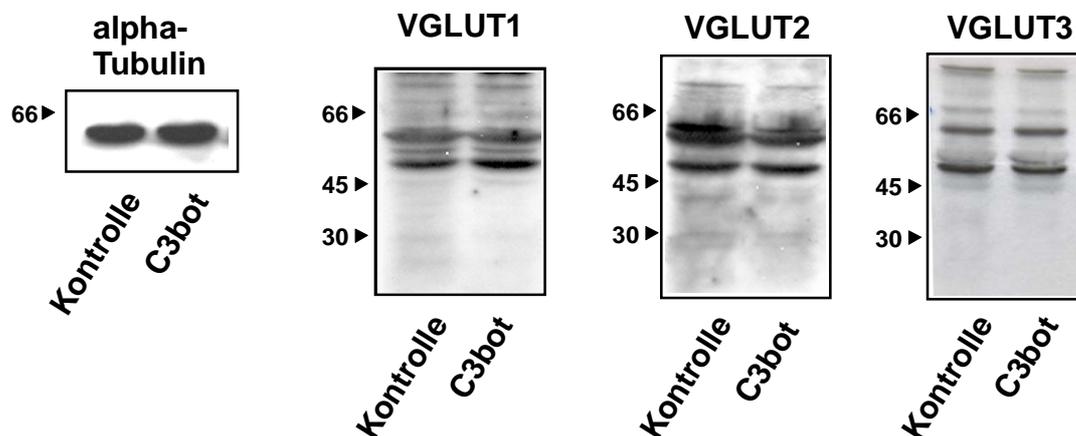


Abb.15

### *Kultivierte Astrozyten exprimieren die vesikulären Glutamattransporter VGLUT1-3*

Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden fixiert und gegen GFAP und die vesikulären Glutamattransporter VGLUT1-3 doppelgefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie. Unter beiden Bedingungen können alle drei Transporter sowohl im Bereich des Somas, als auch in den Fortsätzen nachgewiesen werden.

Unter Kontrollbedingungen waren alle drei Transportersubtypen in punktförmiger Verteilung in den Astrozyten nachweisbar. Nach Inkubation mit C3bot waren ebenfalls alle drei vesikulären Glutamattransporter sowohl im Bereich des Somas, als auch in den verzweigten Zellfortsätzen deutlich zu erkennen. Um eine quantitative Aussage über das Proteinniveau treffen zu können, wurde das Expressionsmuster aller drei Transportersubtypen mittels Western-Blot-Verfahren nach C3bot-Inkubation untersucht (Abb. 16). Die Visualisierung der Proteinbanden zeigte keinerlei signifikante Veränderungen im Proteinniveau der vesikulären Transporter gegenüber der Kontrolle. Dieses Ergebnis schließt eine Beteiligung der vesikulären Glutamattransporter am Gesamtanstieg der astrozytären Glutamat-Aufnahme nicht aus, da ihre Aktivität neben der Proteinsynthese auch anderen Regulationsmechanismen unterliegt (Winter et al., 2005), welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.



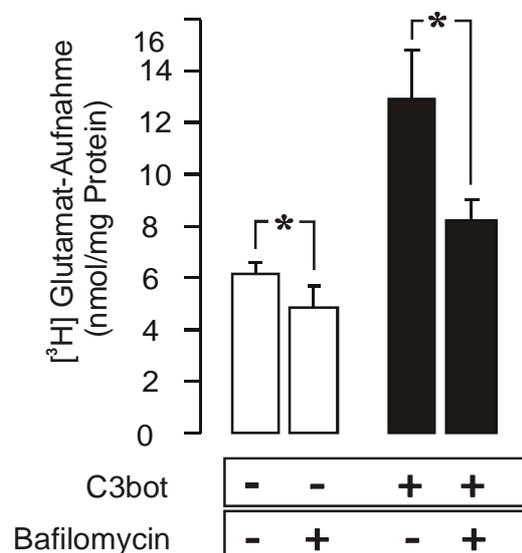
**Abb.16**

### *Expressionsmuster der vesikulären Glutamattransporter VGLUT1-3 in Astrozyten*

Astrozytenkulturen wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Mittels Proteingelelektrophorese und anschließendem Westernblot-Verfahren erfolgte der Proteinnachweis mit Antikörpern gegen die vesikulären Glutamattransporter VGLUT1-3. Als interner Standard wurde alpha-Tubulin eingesetzt. Unter diesen

Bedingungen können keine signifikanten Veränderungen im Proteinniveau aller drei Transportersubtypen nach Behandlung mit C3bot nachgewiesen werden.

Zum Nachweis des Anteils von vesikulären Transportprozessen an der gesteigerten Glutamat-Aufnahme wurde die vesikuläre Speicherung pharmakologisch mit Bafilomycin A1, einem Makrolidantibiotikum aus *Streptomyces griseus*, unterbrochen (Abb. 17). Bafilomycin A1 ist ein spezifischer Inhibitor der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (v-ATPase) (Bowman et al., 1988). Die v-ATPase ist, anders als die Plasmamembran-ATPase, Na<sup>+</sup>-unabhängig und pumpt unter Hydrolyse von ATP H<sup>+</sup>-Ionen in die Vesikel (Kanner and Schuldiner, 1987). Durch die Aktivität der v-ATPase wird ein elektrochemischer Gradient generiert, durch den die Speichervesikel angesäuert werden und



**Abb.17**

***Bafilomycin A1 reduziert die Glutamat-Aufnahme in Astrozyten***

Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit C3bot 80 nM inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Vor den [<sup>3</sup>H] Glutamat-Aufnahme-Experimenten wurden die Zellen für 1 Stunde mit 1 μM Bafilomycin A1 präinkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 50 μM [<sup>3</sup>H] Glutamat beladen. Die aufgenommene Menge an Glutamat wurde durch Flüssigszintillationsmessung an den lysierten Zellen bestimmt und auf die jeweils vorhandene Proteinmenge bezogen. Durch die Präinkubation mit Bafilomycin A1 wird unter beiden Bedingungen die [<sup>3</sup>H] Glutamat-Aufnahme reduziert, wobei die Abnahme der [<sup>3</sup>H] Glutamat-Aufnahme nach Inkubation mit C3bot sowohl relativ als auch absolut deutlich stärker ausgeprägt ist. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus Bestimmungen in Triplikaten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Signifikanz (p<0,05; \*) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

so die notwendige Energie für die Glutamat-Aufnahme aufgebracht werden kann (Maycox et al., 1988). Durch die Blockierung der v-ATPase durch Bafilomycin A1 kann der für die Aufnahme gebrauchte Protonengradient nicht bereitgestellt und die vesikuläre Glutamat-Aufnahme gehemmt werden (Araque et al., 2000).

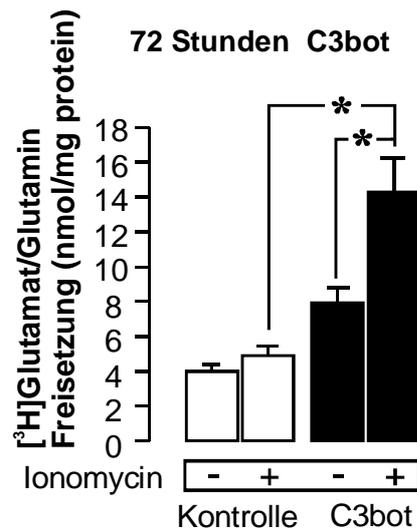
Kultivierte Astrozyten wurden vor den [<sup>3</sup>H] Glutamat-Aufnahme-Experimenten für 1 Stunde mit 1 µM Bafilomycin A1 präinkubiert. Unter Kontrollbedingungen wurde die [<sup>3</sup>H] Glutamat-Aufnahme durch die Präinkubation um 1,3 nmol/mg (25%) reduziert. Im Vergleich dazu wurde die gesteigerte [<sup>3</sup>H] Glutamat-Aufnahme nach C3bot-Inkubation sowohl absolut (4,7 nmol/mg) als auch relativ (38%) deutlich stärker inhibiert. Diese Ergebnisse deuten trotz des unveränderten Proteinniveaus der vesikulären Glutamattransporter darauf hin, dass die Hemmung Rho-abhängiger Signalwege zu einer Förderung vesikulärer Transportprozesse für Glutamat in Astrozyten führt.

### 3.5 Glutamat/Glutamin-Sekretion unter Einfluss von C3bot

Wie einführend erwähnt, kann Glutamat nach der Aufnahme aus dem Extrazellulärraum vorübergehend gespeichert, zu Glutamin umgewandelt oder unmittelbar wieder freigesetzt werden. Da ein Teil des aufgenommenen Glutamats von der astrozytären Glutamin-Synthetase zu Glutamin umgewandelt wird, beinhaltet die Glutamat-Freisetzung in den Sekretions-Versuchen auch immer gleichzeitig einen Anteil an Glutamin (Höltje et al., 2008). Zur Untersuchung des C3bot-Effekts auf die Glutamat/Glutamin-Sekretion, unabhängig vom Aminosäuretyp, wurde die Calcium-Ionophore Ionomycin genutzt. Ionomycin ist ein für bivalente Ionen hochspezifisches Polyetherantibiotikum aus *Streptomyces conglobatus*, welches  $\text{Ca}^{2+}$  im Komplex 1:1 bindet, durch biologische Membranen transportiert und somit die intrazelluläre Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht, was zur Stimulation von Freisetzungsmechanismen in der Zelle führt (Kauffmann et al., 1980).

Für diese Untersuchung wurden kultivierte Astrozyten mit C3bot inkubiert und für 1 Stunde mit 50 µM [<sup>3</sup>H] Glutamat beladen. Die Zellen wurden im Anschluss daran für 10 Minuten mit Ionomycin (1,3 µM) zur Sekretion stimuliert (Abb. 18). Nach 72 Stunden unter serumfreien Bedingungen kam es in den Kontrollkulturen zu einer Steigerung der Glutamat/ Glutamin-Sekretion auf 4,9 nmol/mg Protein gegenüber 3,4 nmol/mg Protein

(43 %) der basalen Freisetzung (Pufferinkubation). An den mit C3bot inkubierten Zellen konnte ein signifikanter Anstieg der freigesetzten Aminosäuren von 7,9 nmol/mg Protein auf 14,3 nmol/mg Protein (81 %) beobachtet werden. Damit ergab sich eine fast dreifache hochsignifikante Erhöhung der Freisetzung von stimulierten C3bot-behandelten Zellen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen.



**Abb.18**

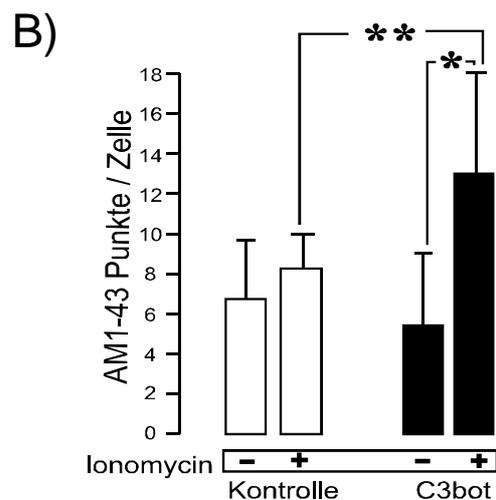
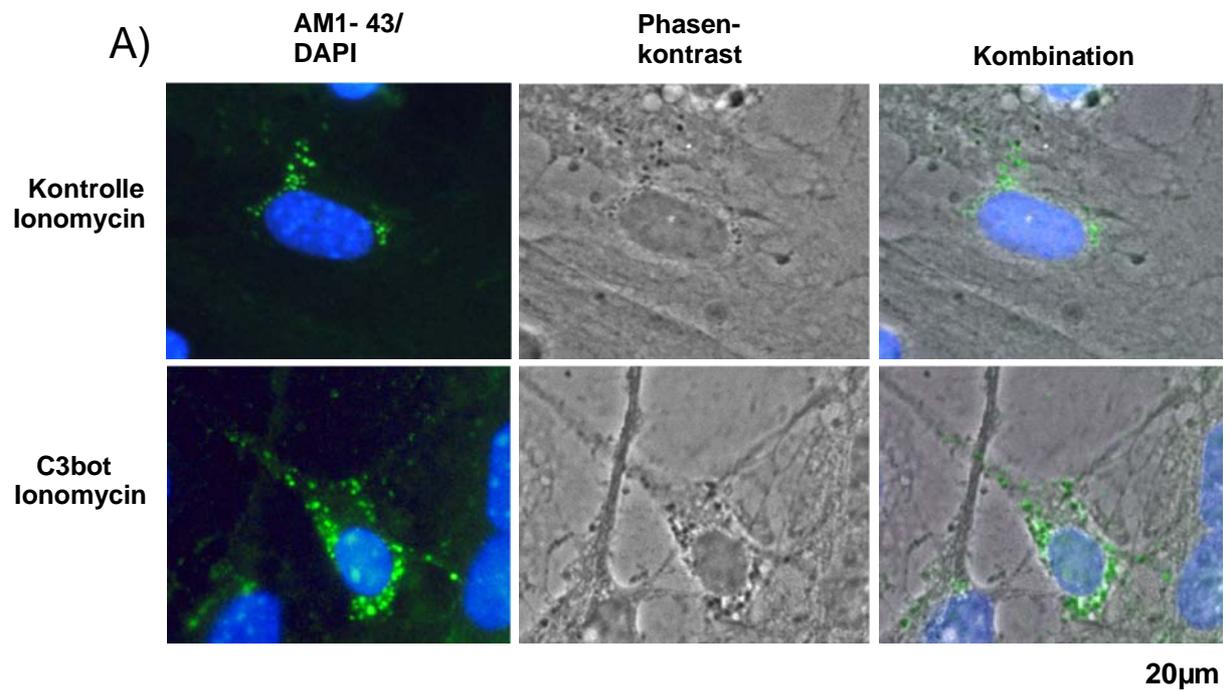
*C3bot stimuliert die calciumabhängige [<sup>3</sup>H] Glutamat/Glutamin-Freisetzung aus Astrozyten*

Kultivierte Astrozyten wurden mit 80 nM C3bot für 72 Stunden inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Für diese Freisetzungsexperimente wurden die Astrozyten für 1 Stunde mit 50  $\mu$ M [<sup>3</sup>H] Glutamat inkubiert. Die Zellen wurden mit Puffer inkubiert oder mit der Calcium-Ionophore Ionomycin (1,3  $\mu$ M) für 10 Minuten zur Sekretion stimuliert. Die freigesetzte Menge an Glutamat/Glutamin wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessung aus dem gewonnenen Überstand bestimmt und auf die jeweils vorhandene Proteinmenge bezogen. Unter Kontrollbedingungen steigert die Stimulation mit Ionomycin die [<sup>3</sup>H] Glutamat/Glutamin-Freisetzung nur gering. Nach Inkubation mit C3bot lässt sich eine signifikante Steigerung der Freisetzung dokumentieren. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Bestimmungen in Triplikaten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ; \*) wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

### 3.6 Einfluss der Behandlung mit C3bot auf die Anzahl von Exo-Endozytose-Ereignissen in Astrozyten

In einem weiteren experimentellen Ansatz zur Untersuchung der Sekretionssteigerung wurde das Auftreten von vesikulären Exo-Endozytose-Prozessen mit Hilfe des fixierbaren Fluoreszenzfarbstoffes AM1-43 untersucht (Abb.19). Der Styryl-Farbstoff

AM1-43 wird aktivitätsabhängig in Vesikelmembranen transportiert und festgehalten und eignet sich daher gut für die Visualisierung der Vesikelfusionen.



### Abb.19

#### *C3bot erhöht die Zahl der vesikulären Membranfusionen*

Kultivierte Zellen wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden für 1 Minute mit dem Farbstoff AM1-43 (4µM) mit oder ohne gleichzeitigen Zusatz von 1,3 µM Ionomycin inkubiert. Nach der Fixation wurden die Zellen mit dem DNA-Marker DAPI gegengefärbt, um die Zellzahl zu bestimmen.

A: Phasenkontrastbilder zeigen die typische Zellmorphologie unter Kontrollbedingungen bzw. nach C3bot-Behandlung.

B: Die unstimulierten Zellen weisen eine zwischen Kontroll- und C3bot-behandelten Zellen vergleichbare Zahl an Fluoreszenzpunkten auf. Unter Einfluss der Ionomycin-Stimulation steigt die Zahl der gefärbten Vesikel nach Inkubation mit C3bot im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen signifikant an. Auch der Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen nach C3bot-Inkubation ist signifikant.

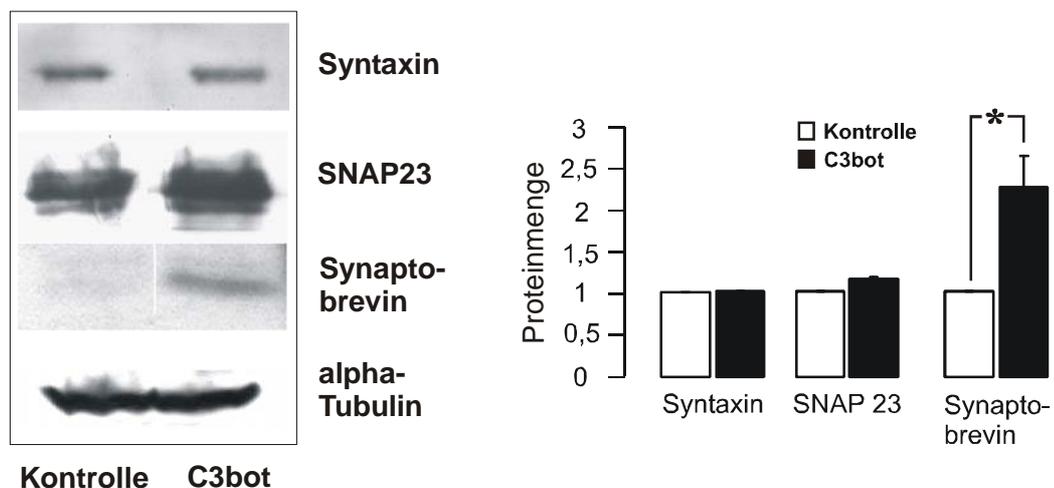
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Bestimmungen in Triplikaten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ; \*) wurde mittels Student's t-Test berechnet.

Kultivierte Astrozyten wurden mit C3bot behandelt und für 1 Minute mit  $4 \mu\text{M}$  AM1-43 entweder mit Puffer allein oder bei gleichzeitiger Applikation von Ionomycin inkubiert (Abb. 19). Anschließend wurde eine Kernfärbung durchgeführt. Zur Darstellung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) genutzt, welcher sich spezifisch an die Adenin-Thymin-reichen Regionen der DNA anlagert und sich deshalb zur Zellkernmarkierung eignet (Abb.19 A; Otto, 1990). Die Phasenkontrastbilder zeigten die typische Morphologieveränderung der Astrozyten nach der Behandlung mit C3bot. Für die quantitative Analyse wurden die Fluoreszenzpunkte mithilfe der Scion-Image Software ausgezählt und zur Zellkernzahl ins Verhältnis gesetzt (Abb. 19 B). Unter Puffer-Inkubationsbedingungen zeigte sich in den Kontroll- und C3bot-behandelten Zellen eine vergleichbare Anzahl von Fluoreszenzpunkten. Im Gegensatz dazu konnte nach Ionomycin-Stimulation ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzpunktzahl in den C3bot-behandelten Astrozyten nachgewiesen werden, sowohl im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen, als auch im Vergleich zu den unstimulierten C3bot-behandelten Zellen. Die anhand der AM1-43 Färbungen erhobenen Daten belegen somit eine gesteigerte Anzahl der Exo- und Endozytose-Aktivität in C3bot-behandelten Zellen.

Da bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass Glutamat durch Exozytose aus Astrozyten freigesetzt werden kann (Araque et al., 1998; Bezzi et al, 2004) und für den Prozess der exozytotischen Freisetzung das Vorhandensein des löslichen N-ethylmaleimid-sensibler Faktor (NSF)-Bindungs-Protein Rezeptor (SNARE)-Komplexes von entscheidender Bedeutung ist (Jahn und Südhof, 1999), sollte im Anschluss der Einfluss von C3bot auf die zu diesem Komplex gehörenden Bestandteile untersucht werden.

Um Substanzen aus Speichervesikeln exozytotisch freisetzen zu können, muss zumindest ein Teil der Vesikelmembran mit der Zellmembran verschmelzen. Dafür bilden die SNARE-Proteine einen sehr stabilen Komplex, der die Membranen aneinander heftet und öffnet. Zu diesem Komplex gehören die beiden an der Zellmembran lokalisierten Proteine Syntaxin und Synaptosomen-assoziiertes Protein 25 (SNAP25), sowie das in der Vesikelmembran verankerte Synaptobrevin.

Um den Einfluss von C3bot auf das Expressionsmuster dieser drei Proteine zu untersuchen, wurden kultivierte Astrozyten mit C3bot inkubiert und auf die Expression von Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP23, einer homologen Isoform von SNAP25 in nicht-neuronalen Zellen, mittels Western-Blot-Verfahren untersucht (Abb. 20). Es zeigte sich, dass C3bot keine Wirkung auf das Proteinniveau von Syntaxin ausübte. Im Gegensatz dazu konnte ein leichter Anstieg im Proteinniveau von SNAP23 und eine stark gesteigerte Expression von Synaptobrevin dokumentiert werden.



### Abb.20

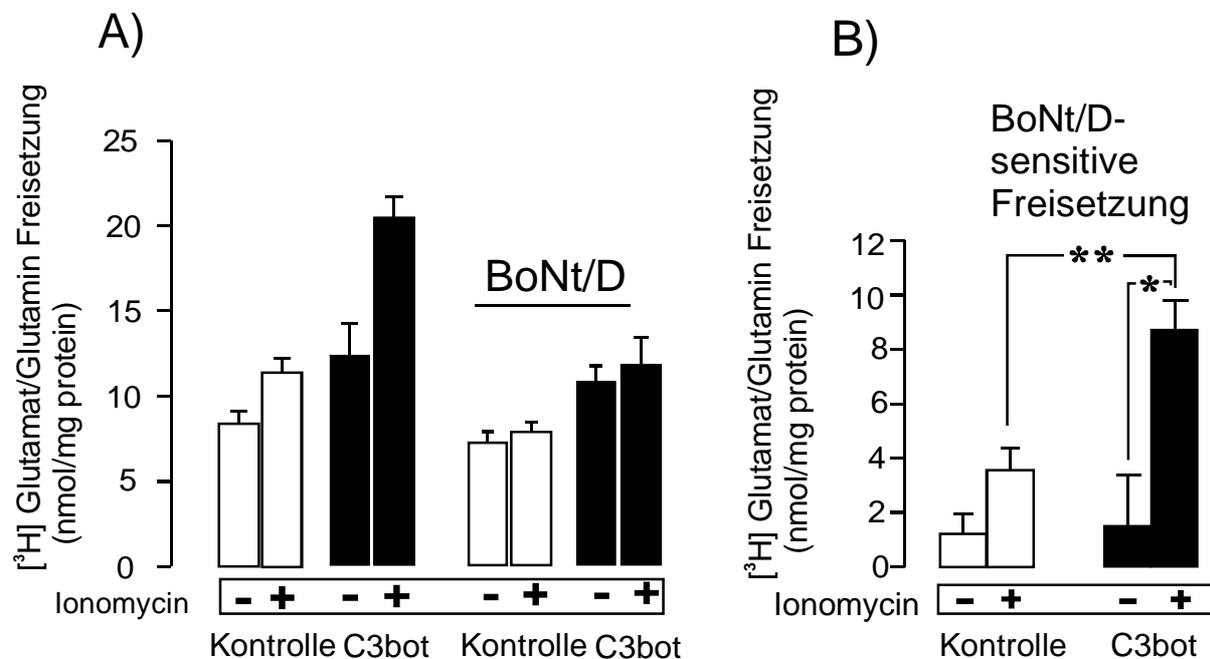
#### *C3bot steigert die Expression von SNAP23 und Synaptobrevin*

Kultivierte Astrozyten wurden für 72 Stunden mit 80 nM C3bot inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Mittels Proteingelelektrophorese und anschließendem Westernblot-Verfahren erfolgte der Proteinnachweis mit Antikörpern gegen die SNARE- Proteine Syntaxin, SNAP23 und Synaptobrevin. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Reagenz. Als interner Standard wurde alpha-Tubulin eingesetzt. Syntaxin zeigt nach der Inkubation mit C3bot keine Veränderung im Expressionsmuster. SNAP23 und insbesondere Synaptobrevin weisen einen Anstieg in ihrem Proteinniveau nach C3bot-Inkubation auf.

Vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse sollte weiter auf die Differenzierung zwischen vesikulärer und nicht-vesikulärer Glutamat/Glutamin-Freisetzung eingegangen werden. Zu diesem Zweck wurde Botulinum Neurotoxin D (BoNt/D) eingesetzt. Bei Botulinum Neurotoxinen handelt es sich um eine Gruppe von Zink-Metalloproteasen, die neuronale Proteine hochspezifisch spalten und inaktivieren. Bisherige Ergebnisse konnten belegen, dass sowohl Tetanus-Toxine (Bezzi et al., 1998), als auch Botulinum

Neurotoxine (Verderio et al., 1999) genutzt werden können, um exozytische Vesikelmembranfusionen auch in glialen Zellen zu blockieren.

Es wurden unbehandelte sowie C3bot-behandelte Astrozyten für 24 Stunden vor den Sekretionsversuchen mit oder ohne 1 nM BoNt/D inkubiert und danach für 1 Stunde mit 50  $\mu$ M [ $^3$ H] Glutamat beladen (Abb. 21).



**Abb. 21**

*C3bot erhöht die exozytische [ $^3$ H] Glutamat/Glutamin-Freisetzung*

Kultivierte Astrozyten wurden mit 80 nM C3bot für 72 Stunden, sowie für 24 Stunden zusätzlich mit 1 nM Botulinum Neurotoxin D (BoNt/D), einem spezifischen Inhibitor der exozytischen Vesikelmembranfusion, inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Für diese Freisetzungsexperimente wurden Astrozyten für 1 Stunde mit 50  $\mu$ M [ $^3$ H] Glutamat beladen. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen entweder mit Puffer inkubiert oder mit Ionomycin (1,3  $\mu$ M) für 10 Minuten zur Sekretion stimuliert. Die freigesetzte Menge an Radioaktivität wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessung aus dem gewonnenen Überstand bestimmt und auf die jeweils vorhandene Proteinmenge bezogen.

A: BoNt/D reduziert die Freisetzung von Glutamat besonders aus Ionomycin-stimulierten Zellen nach C3bot-Behandlung.

B: Aus der Differenz zwischen der [ $^3$ H] Glutamat/Glutamin-Freisetzung mit und der Freisetzung ohne Präinkubation mit BoNt/D resultiert die BoNt/D-sensitive exozytische [ $^3$ H] Glutamat/Glutamin-Freisetzung, die nach C3bot-Behandlung deutlich stärker ausgeprägt ist, was auf eine vesikuläre Komponente hindeutet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Bestimmungen in Triplikaten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ; \*) wurde mittels Student's t-Test berechnet.

Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Puffer inkubiert oder mit 1,3  $\mu$ M Ionomycin für 10 Minuten zur Sekretion stimuliert. Es zeigte sich, wie bereits vorher dokumentiert,

dass Ionomycin nach Behandlung mit C3bot einen stark stimulierenden Effekt auf die Freisetzung hatte (Abb. 21 A). Nach Botulinum Neurotoxin D-Inkubation zeigte sich unter Kontrollbedingungen ein Rückgang der unstimulierten Freisetzung um 20%, sowie eine Reduktion in der Ionomycin-stimulierten Freisetzung um 34%. An C3bot-inkubierten Astrozyten ließ sich ebenfalls eine Hemmung der unstimulierten Sekretion um 14% beobachten. Eine besonders stark ausgeprägte Reduktion wurde für die Ionomycin-stimulierte Glutamat/Glutamin-Sekretion beobachtet (44%). Um den Anteil der Botulinum Neurotoxin D-sensitiven und damit exozytotischen Freisetzung an der Gesamtfreisetzung zu berechnen, wurde die Differenz zwischen der Glutamat/Glutamin-Freisetzung ohne sowie mit BoNt/D-Präinkubation betrachtet (Abb. 20 B). Unter Kontrollbedingungen war die Ionomycin-stimulierte BoNt/D-sensitive Glutamat/Glutamin-Freisetzung nur gering um 2,2 nmol/mg Protein erhöht. Im Gegensatz dazu war diese nach C3bot-Inkubation deutlich signifikant um 7,6 nmol/mg Protein erhöht. Zusammenfassend weist dieses Ergebnis im Kontext mit den Bafilomycin A1-, AM1-43-Versuchen und Untersuchungen der SNARE-Protein-Expression auf eine verstärkte Beteiligung vesikulärer Speicherungs- und Freisetzungsprozesse für Glutamat in Astrozyten nach Hemmung von Rho abhängigen Signalwegen hin. Daraus kann gefolgert werden, dass der Hauptteil der C3bot-induzierten gesteigerten Freisetzung aus Glutamat besteht, da für Glutamin bislang keine vesikuläre Speicherung in Astrozyten bekannt ist.

## 4. Diskussion

### 4.1 C3bot induziert eine stellare Morphologie in kultivierten Astrozyten

Die initial durchgeführten Experimente dienten der Kontrolle der Aktivität des verwendeten C3 Proteins, da die verschiedenen Chargen biologischen Schwankungen unterliegen, die die Aussagekraft der sich anschließenden Versuche beeinflussen könnten. Es zeigte sich eine ausgeprägte Stellation der kultivierten Astrozyten nach Behandlung mit C3bot, die betreffend der Konzentration und Inkubationszeit vergleichbar mit den zuvor gemachten Beobachtungen war (Höltje et al., 2005).

Eine proteinbiochemische Bestätigung der Wirksamkeit von C3bot erfolgte weiterhin über die Kontrolle des Proteinniveaus von RhoA, das, wie bereits gezeigt, durch C3bot signifikant gesenkt wurde (Höltje et al., 2005). Mittels des pharmakologischen Proteasomen-Inhibitors MG-132 konnte zusätzlich bewiesen werden, dass RhoA nach der Inkubation mit C3bot einem verstärkten proteasomalen Abbau unterliegt. Die Zugabe von MG-132 blockierte den Abbau von RhoA fast vollständig.

Die Familie der Rho-GTPasen im engeren Sinne besteht neben RhoA auch aus RhoB und RhoC und weiteren wenig untersuchten Subtypen. Diese besitzen zwar eine zu 85% identische Amino-Säure-Sequenz, unterscheiden sich aber in dem Teil der Sequenz, der über deren zelluläre Lokalisation entscheidet. So sind RhoA und C im Zytosol und in der Plasmamembran vorhanden, RhoB jedoch vorwiegend in Endo- und Lysosomen, was unterschiedliche Funktionen impliziert (Adamson et al., 1992; Wang et al., 2003). In den proteinbiochemischen Untersuchungen wurden vornehmlich die C3bot-Effekte auf RhoA untersucht, da RhoA die für zytoskelettale Effekte entscheidende Isoform darstellt (Ramakers und Moolenaar, 1998). Zudem stehen gegen diese Isoform verlässlichere Antikörper zur Verfügung.

### 4.2 Die Glutamat-Aufnahme wird durch C3bot GLT-1 abhängig erhöht

Nach erfolgreichem Nachweis einer generellen Wirksamkeit von C3bot wurde der Effekt auf die Glutamat-Aufnahme untersucht. Es zeigte sich eine signifikante

Steigerung der Aufnahme von Glutamat nach Inkubation mit C3bot. Immunzytochemische, proteinbiochemische und pharmakologische Untersuchungen konnten nachweisen, dass dabei die Expression des Plasmamembrantransportersubtyps GLT-1 signifikant hochreguliert, GLAST jedoch kaum beeinflusst wird. Die erhobenen Daten deuten außerdem darauf hin, dass die Steigerung der Expression von GLT-1 über einen C3bot-induzierten Abbau von I $\kappa$ B getriggert ist. Infolge dessen kommt es zu einer Translokation von NF $\kappa$ B in die Kernregion der Astrozyten, die eine verstärkte Expression von GLT-1 bedingt.

Die Regulation der Expression und Aktivität der Plasmamembrantransporter für Glutamat unterliegt generell einer hohen Variabilität. Für GLT-1 konnte bereits eine NF $\kappa$ B-abhängige Wirkung durch den Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) nachgewiesen werden, wobei TNF $\alpha$  trotz der Aktivierung von NF $\kappa$ B eine Hemmung der Expression von GLT-1 zur Folge hat. Dieser klassische NF $\kappa$ B –Signalweg beinhaltet die signalinduzierte Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Degradierung von I $\kappa$ B mit Hilfe der I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$ , woraufhin es zur Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern, dessen Bindung an die DNA und Expressionsregulation der entsprechenden Gene kommt (Israel, 2000; Yamamoto und Gaynor, 2004). Im Gegensatz zu TNF $\alpha$  kann der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) die Expression von GLT-1 und somit die Glutamat-Aufnahme via NF $\kappa$ B unabhängig von I $\kappa$ B steigern (Zelenaia et al., 2000). Es wird vermutet, dass EGF bereits existierende nukleäre NF $\kappa$ B-Komplexe induziert (Sitcheran et al., 2005). Ebenfalls NF $\kappa$ B-abhängig wird die GLT-1-Expression durch Proteinkinase B (Akt) gefördert. Akt aktiviert IKK $\alpha$  und fördert die I $\kappa$ B-Degradation. Das Expressionsmuster von GLAST bleibt dabei, ähnlich zur Wirkung von C3bot, unverändert (Li et al., 2006).

Eine im Vergleich zu GLAST generell erhöhte Empfindlichkeit von GLT-1 gegenüber regulatorischen Einflüssen zeigen auch Versuche mit Glukokortikoiden wie Dexamethason, welches die GLT-1-Expression zeit-, dosis- aber auch lokalisationsabhängig stark steigern kann, das GLAST-Niveau jedoch nicht beeinträchtigt (Zschocke et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GLT-1 primär differenzierungs-assoziiert hochreguliert wird. So zeigte eine Studie, dass eine Behandlung mit zellpermeablem Dibutyryl-cAMP nicht nur zu einer stellaren Differenzierung der Zelle, sondern auch zu einer gleichzeitigen Steigerung der GLT-1-Expression führte (Swanson et al., 1997).

Nachgewiesen werden konnte der regulatorische Einfluss von RhoA bereits auf verschiedene NF $\kappa$ B-abhängige Prozesse, etwa die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Eine Hemmung von RhoA führt zur Aktivierung von IKK $\alpha$ , was wiederum die Phosphorylierung von I $\kappa$ B zur Folge hat. Die sich anschließende Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern bewirkt eine Expressionsteigerung von NO und iNOS (Rattan et al., 2003). Für RhoB ist belegt, sowohl die basale als auch die auf genotoxischem Stress basierende stimulierte NF $\kappa$ B-Aktivität zu inhibieren. RhoB inhibiert IKK-unabhängig den Abbau von I $\kappa$ B unter anderem auch nach TNF $\alpha$ -Einwirkung. Es wird vermutet, dass RhoB auf diesem Wege der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase unter zellschädigenden Einflüssen dient, da es die durch äußere Stimulanzien hochregulierte Gen-Expression verschiedenster Mediatoren wieder auf ein basales Niveau erniedrigt (Fritz und Kaina, 2000).

In der Literatur finden sich Belege für viele weitere Substanzen, die mit den Mechanismen der Glutamat-Aufnahme durch astrogliale Transportsysteme der Plasmamembran interagieren. So fördert Glutamat selbst die GLT-1-Transportaktivität (Swanson et al., 1997), ebenso wie Endothelin B und neurotrophe Faktoren (Torres et al., 2003; Escartin et al., 2006). Aktuell wird diskutiert, ob die Transportaktivität des Transporters durch seinen strukturellen Aufbau modifiziert werden könnte. GLT-1 besteht vermutlich aus drei identischen Untereinheiten, die unabhängig voneinander agieren können (Yernool et al., 2004; Grewer et al., 2005). Welche exakten Funktionen die einzelnen Bestandteile zum Transportprozess beitragen und möglicherweise differenziert durch C3bot beeinflusst werden können, bleibt zu untersuchen. Einen weiteren wichtigen Faktor im Rahmen der Regulation der Glutamat-Aufnahme via GLT-1 stellt dessen Komplexbildung zu sogenannten „Clustern“ dar, die *in vivo* exklusiv in den astrozytären Fortsätzen zu finden sind (Minelli et al., 2001). Es wird vermutet, dass die Lokalisation von GLT-1 in den der Synapse zugewandten Fortsätzen der Zelle die Messung der extrazellulären Glutamat-Konzentration ermöglicht und dabei Mechanismen unterstützt, die für die Akkumulation der Transporter an Stellen der Membran sorgt, an denen Glutamat vermehrt beseitigt werden muss. Die Cluster dienen hier als Transporter-„Reserve-Pool“ (Chaudhry et al., 1995; Minelli et al., 2001). Die Ergebnisse einer früheren Studie weisen darauf hin, dass die Clusterbildung nicht nur Einfluss auf die Transporter-Aktivität an sich hat, sondern auch einen alternativen Weg der Glutamat-Aufnahme darstellen könnte. Sowohl die Morphogenese, als auch

das Generieren neuer Cluster erfolgt über Rho-abhängige Signalwege (Zhou und Sutherland, 2004). Weiterhin konnte z.B. für EAAC1 bereits gezeigt werden, dass verschiedene Phosphatasen und Kinasen im Zusammenspiel mit Aktinzytoskelett-assoziierten, Rho-regulierten Gerüstproteinen eine Rolle bei der Bewegung von und zur Plasmamembran spielen (Lin et al., 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen stark darauf hin, dass die Beeinflussung der Glutamat-Aufnahme durch C3bot-Inkubation über den klassischen NF $\kappa$ B-Signalweg erfolgt. Rho-GTPasen sind zum großen Teil auch für die Morphologie der Astrozyten verantwortlich, sodass auch die Möglichkeit bestand, dass allein die morphologischen Effekte von C3bot eine Umverteilung von Transportproteinen bewirken und damit die Transportaktivität sekundär durch Membranrestrukturierung beeinflussen. Dieser Fragestellung wurde anschließend an die Experimente der vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe weiter nachgegangen. Die Astrozyten wurden mit C3bot und Pyrrolidinthiocarbamat (PDTTC) behandelt, einem NF $\kappa$ B-Inhibitor, der das morphologische Phänomen der Stellation nicht verhindert, jedoch NF $\kappa$ B-abhängige Prozesse ausschließt. Die Ergebnisse belegen lediglich einen geringen NF $\kappa$ B-unabhängigen positiven Effekt der morphologischen Veränderungen auf die Glutamat-Aufnahme, der keinesfalls das Niveau einer Behandlung ausschließlich mit C3bot erreicht. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für Experimente mit Latrunculin B nachgewiesen werden, einem Toxin, welches zu primär Rho-unabhängigen, stellaren Veränderungen in Astrozyten führte, jedoch nicht zu einer signifikanten Steigerung der Aufnahme von Glutamat (Höltje et al., 2008).

### **4.3 Die vesikuläre Glutamat-Aufnahme wird durch C3bot erhöht**

Im Anschluss an die Untersuchungen der Effekte von C3bot auf die Plasmamembran-transporter sollte der Einfluss von C3bot auf die in der Kultur nachgewiesenen vesikulären Glutamattransporter 1-3 (VGLUT1-3) untersucht werden. Hierbei konnte sowohl fluoreszenz-mikroskopisch als auch proteinbiochemisch kein Effekt auf das Expressionsniveau nachgewiesen werden. Versuche mit Bafilomycin A1 konnten jedoch zeigen, dass vesikuläre Transportprozesse verstärkt an der vermehrten Glutamat-Aufnahme nach C3bot-Inkubation beteiligt sind.

In vorangegangenen Arbeiten konnte generell die Expression aller drei Transportersubtypen in Astrozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Bellocchio et al., 2000; Fremeau et al., 2002; Montana et al., 2004). Eine Ursache der nachgewiesenen Aktivitätssteigerung der vesikulären Glutamattransporter nach Behandlung mit C3bot könnte im vermehrten zytoplasmatischen Angebot von Glutamat liegen, was den Konzentrationsgradienten gegenüber dem Vesikellumen und damit die Transportrate günstig beeinflussen dürfte. Die Transportkapazität der VGLUTs ist aber sowohl von einem elektrischen als auch einem pH-Gradienten abhängig. Die Steilheit der Gradienten ist von der intrazellulären Chloridkonzentration abhängig. Bei niedrigen Chloridkonzentrationen wird als treibende Kraft der Protoneneinstrom in die Vesikel, im Kotransport mit Glutamat, benötigt. Ist die Chloridkonzentration dagegen hoch, reicht die pH-Differenz zwischen dem Zytosol und den Vesikeln der Astrozyten aus, um den Glutamattransport anzutreiben (Hell et al., 1990; Maycox et al., 1988; Winter et al., 2005). Ein hypothetischer Wirkort von Rho Proteinen (und damit C3bot) in diesem Zusammenhang wären die Chloridkanäle CIC3 und CIC7. CIC3 konnte in Endosomen und synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden, wo er einen Einfluss auf die Glutamat-Aufnahme zeigte (Stobrawa et al., 2001). CIC7 ist ein ubiquitär exprimierter Chloridkanal, der in der Nähe von v-ATPasen beinhaltenden Endosomen und Vesikeln nachgewiesen werden konnte (Kornak et al., 2001). Eine genauere Untersuchung dieser Fragestellungen wurde unter anderem durch die Tatsache verhindert, dass es nicht gelang, Astrozyten zu permeabilisieren und in Analogie etwa zu neuronalen Systemen (Höltje et al., 2000) vesikuläre Transportprozesse direkt zu messen.

#### **4.4 C3bot induziert eine vermehrte exozytotische Freisetzung von Glutamat**

Die Behandlung von Astrozyten mit C3bot resultierte in einer signifikanten Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Glutamat/Glutamin-Sekretionskompetenz. Die Ergebnisse der anschließenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass die erhöhte Sekretion auf einer vermehrten exozytotischen Freisetzung basiert, da sich die gesteigerte Freisetzung nach C3bot-Inkubation weitestgehend als BoNt/D-sensitiv erwies. Weiterhin konnte die Expression der SNARE-Proteine Synaptobrevin und SNAP23 durch C3bot gesteigert werden. Diese Beobachtungen gingen einher mit einer generell erhöhten Anzahl von Endo-Exozytose-Ereignissen nach C3bot-Behandlung.

Aus den Ergebnissen der Sekretionsversuche konnte primär nicht zwischen Effekten auf die Freisetzung von Glutamat und Glutamin unterschieden werden. Wie einleitend erwähnt, werden beide Substanzen durch Astrozyten freigesetzt. Da für das Umbauprodukt Glutamin jedoch keine vesikuläre Speicherung (respektive Transporter) bekannt ist, ließen die BoNt/D-Versuche zunächst darauf schließen, dass die vermehrte Freisetzung nach Behandlung mit C3bot im wesentlichen aus Glutamat bestand. In weiterführenden Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte dies durch Trennung der beiden Substanzen mittels Ionenaustausch-Chromatografie von Kulturüberständen bestätigt werden (Höltje et al., 2008). Im Weiteren wird daher die Freisetzung nur für Glutamat diskutiert.

Generell kann die gesteigerte Glutamat-Aufnahme als Voraussetzung für eine vermehrte Freisetzung angesehen werden. Die mittels AM1-43-Färbungen beobachtete Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Vesikel-Membran-Fusionen in C3bot-behandelten Zellen richtete auch im Zusammenhang mit den Befunden bezüglich der Effekte durch Bafilomycin A1 die Aufmerksamkeit auf eine verstärkte Beteiligung vesikulärer Sekretionsmechanismen.

In den letzten Jahren hat sich eine Vielzahl von Arbeitsgruppen mit dem (erfolgreichen) Nachweis Exozytose-kompetenter Kompartimente in Astrozyten beschäftigt (siehe Übersichtsarbeit Montana et al., 2004, 2006; Crippa et al., 2006; Stigliani et al., 2006). Die hierfür wichtigsten molekularen Bestandteile sind die bereits besprochenen VGLUTs, die SNARE-Proteine Synaptobrevin, SNAP23 und Syntaxin, sowie die vesikuläre  $\text{H}^+$ -ATPase (v-ATPase), die den Protonengradienten für den vesikulären Glutamattransport liefert (Araque et al., 2000).

Hinweise auf eine Beteiligung von Rho Proteinen an Exozytoseprozessen existieren in verschiedenen Zellsystemen. So konnte nachgewiesen werden, dass der zytoskelettale Umbau, insbesondere des Aktin-Zytoskeletts eine essentielle Rolle bei der Exozytose spielt. So ist beispielsweise sowohl die Anzahl der sekretionsbereiten Vesikel als auch die Exozytose-Ereignis-Rate in chromaffinen Zellen direkt von der Aktin-Dynamik abhängig (Vitale et al., 1995). Für PC12-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung des Zytoskeletts die Menge an vesikulär freigesetztem Neurotransmitter reduziert (Bernstein et al., 1998). Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von Rho Proteinen an der Exozytose hin. Noch deutlicher konnte dieser Zusammenhang in einer weiteren Studie gezeigt werden, in der nachgewiesen wurde, dass Nadrin, ein Neuronen-spezifisches GTPase-aktivierendes Protein (GAP), über die Inaktivierung von

RhoA die Exozytose positiv beeinflussen konnte, und die Inhibition von Nadrin die Exozytose-Aktivität stark reduziert (Harada et al., 2000).

Am wahrscheinlichsten ergibt sich somit eine Interpretation der beobachteten Effekte auf die Glutamat-Freisetzung als das Resultat zum Einen des vermehrten zytoplasmatischen Angebots, welches wiederum eine gesteigerte vesikuläre Speicherung bedingt. Zum Anderen dürften zytoskelettale Effekte, die exozytotische Fusionsprozesse fördern, beteiligt sein. Ungeklärt bleibt zunächst, auf welchem Weg die Expression von SNARE-Proteinen durch Rho-abhängige Mechanismen reguliert wird, da die gesteigerte Expression nach Behandlung mit C3bot ebenfalls eine Grundlage für vermehrte exozytotische Ereignisse darstellen dürfte.

Es existieren weitere potentielle Wege der nicht-vesikulären Glutamat-Freisetzung aus Astrozyten. Ein reverser Transport über GLT-1 und GLAST (Szatkowski et al., 1990) konnte dabei ausgeschlossen werden (Höltje et al., 2008). Aktuell wird die Rolle des G-Protein-gekoppelten purinergen Rezeptors P2Y1 auf die Glutamat-Freisetzung diskutiert (Takano et al., 2005; Domercq et al., 2006; Jourdain et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Duan konnte 2003 erstmals die Freisetzung von Glutamat über purinerge Ionenkanäle durch Aktivierung von P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren nachweisen (Duan et al., 2003). Ein weiterer untersuchter Sekretionsweg sind die Volumen-abhängigen Anionenkanäle, die unter hypoosmotischen Bedingungen, wie beispielsweise dem ischämischen Infarkt, durch die schwellungsbedingte Volumenzunahme geöffnet werden und auch Glutamat freisetzen können (Mongin und Orlov, 2001). Im Fokus einer Vielzahl von Arbeiten stehen die Connexone und Pannexine. Es bestehen Hinweise darauf, dass einzelne Connexone als funktionelle Hemikanäle bei geringen extrazellulären Konzentrationen zweiwertiger Kationen unter anderem für Glutamat den Weg aus der Zelle ermöglichen können (Ye et al., 2003). Eine Studie konnte auch *in vivo* nachweisen, dass über diese Hemikanäle Glutamat freigesetzt werden kann (Spray et al., 2006). Auch Pannexine können Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Kanäle, ähnlich den Connexonen bilden und konnten in Astrozyten nachgewiesen werden (Bruzzone et al., 2003).

Inwieweit diese angeführten Sekretionsmechanismen für den geringfügig ebenfalls durch C3bot gesteigerten nicht-vesikulär freigesetzten Anteil verantwortlich gemacht werden können, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

#### 4.5 Mögliche Beeinflussung der Glutamat-Homöostase durch C3bot im klinischen Kontext

C3bot wurde in den bisherigen Untersuchungen an Neuronen als Wachstums- und Regenerationsförderndes Agens eingesetzt (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Ahnert-Hilger et al., 2004; Bertrand et al., 2005, 2007). Das Auswachsen, die Ausbildung von Verzweigungen der Axone und das Überleben des gesamten Neurons nach Läsionen ist aber nicht zuletzt auch von dem die Neuronen umgebenden glialen Milieu abhängig. Ein offensichtlich wesentlicher Faktor dabei besteht in der Kontrolle der extrazellulären Glutamat-Konzentration durch gliale Transporter. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Einfluss von C3bot auf die Expression und Aktivität der einzelnen Transportertypen gezeigt werden. In diesem Kontext sollten die bislang beobachteten neuronalen Effekte beurteilt werden.

Untersuchungen zeigen, dass Störungen der Glutamat-Homöostase an einer Vielzahl akuter oder chronisch neurodegenerativer Prozesse beteiligt sind (siehe Übersichtsarbeit Cruz and Cerdan, 1999; Danbolt, 2001). Das vermutete Grundprinzip dieser Störungen besteht darin, dass mikrogliale Zellen auf metabolisch, oxidativ oder traumatisch bedingte Umgebungsveränderungen mit Aktivierung und Ausschüttung löslicher Faktoren wie Zytokinen und Chemokinen reagieren. Diese inflammatorische Reaktion steht höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der Modulation sowohl der Expression als auch der Aktivität der Glutamattransporter, allen voran GLT-1 (siehe Übersichtsarbeit Tillieux und Hermans, 2007). Dies hat eine starke Zunahme der extrazellulären Glutamat-Konzentration zur Folge, was über unterschiedliche NMDA-Rezeptor-vermittelte Mechanismen zum Tod von Nervenzellen führt. Hierbei spielt, wie bereits angeführt,  $\text{TNF}\alpha$  als wichtiger GLT-1-Regulator eine wichtige Rolle, da es als proinflammatorisches Zytokin dann vermehrt ausgeschüttet wird, die Glutamat-Aufnahme unterdrückt und ebenso zu neuronalem Zelltod führen kann (Su et al., 2003; Sitcheran et al., 2005).

Kürzlich publiziert werden konnte die Beobachtung, dass schon nanomolare Konzentrationen von C3bot zu einer Aktivierung der Mikroglia-Zellen und damit einhergehend zu einer Freisetzung sowohl von NO, als auch von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  führen. Auch dieser Mechanismus unterliegt der Kontrolle von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Hoffmann et al., 2008).

Ein Rückgang der Glutamat/Glutamin-Zirkulation konnte in Biopsien von Epilepsie-Patienten nachgewiesen werden (Petroff et al., 2002). Ein weiterer klinisch relevanter pathologischer Zustand, an dem der Glutamat-Kreislauf beteiligt zu sein scheint, ist der Morbus Alzheimer, bei dem eine anormale Expression der Glutamat-Synthetase und gleichzeitig ein Rückgang der GLT-1-Aktivität gezeigt werden konnte (Robinson, 2001; Dabir et al., 2006). Veränderungen im Glutamat-Transport-System wurden auch in Patienten mit sporadischer oder familiärer Amyotropher Lateralsklerose (ALS) beobachtet. ALS ist eine im Erwachsenenalter einsetzende, chronisch progressive, neuromuskuläre Erkrankung, die durch die selektive Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons charakterisiert ist. Obwohl der primäre pathogenetische Auslöser noch nicht endgültig gesichert ist, kann nach einer Reihe von klinischen Untersuchungen von einer zentralen Rolle der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität ausgegangen werden. In Präparationen des motorischen Kortex von ALS-Patienten konnte ein Rückgang der Glutamat-Transporter-Kapazität, insbesondere von GLT-1, beobachtet werden (Rothstein et al., 1995; Howland et al., 2002). Dies hat eine erhöhte Vulnerabilität vor allem der Motoneurone für exzitatorische Insulte zur Folge (Tanaka et al., 1997). Die Reduktion der Glutamat-Aufnahme durch eine erniedrigte GLT-1-Expression und -Aktivität steht auch bei der neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington und bei der progressiven Form des ischämischen Insults im Mittelpunkt der Forschung (Mallolas et al., 2006; Hassel et al., 2008). Das extrazelluläre Glutamat-Niveau und das damit korrelierende Ausmaß der neurologischen Schäden nach einem ischämischen Insult sind allerdings sehr individuell und unabhängig vom Infarkt volumen, was letztlich auf unterschiedliche Vulnerabilität der einzelnen Patienten auf Infarktsituationen schließen lässt. Eine Studie konnte dafür auch ein genetisches Korrelat liefern. Ein Polymorphismus im GLT-1-Promotor ist assoziiert mit der höheren Glutamat-Konzentrationen und schlechteren klinischen Therapieergebnissen (Mallolas et al., 2006). Dies zeigt eine große Schwierigkeit bei Therapieansätzen im Sinne einer GLT-1-Modulation. Neben den bisher genannten Erkrankungen stehen auch Multiple Sklerose, Schizophrenie, chronische Schmerzen und Parkinson im Zusammenhang mit Veränderungen der Aktivität und exprimierten Menge des Glutamatttransporters GLT-1 und der daraus entstehenden Exzitotoxizität des überschüssigen Glutamats (siehe Übersichtsarbeit Tillieux und Hermans, 2007).

Eine weitere Schlüsselrolle der Astrozyten ist der Erhalt der Integrität des neuronalen Gewebes nach einer traumatischen Verletzung, was sich als reaktive Gliose darstellt.

Diese ist charakterisiert durch Hypertrophie, Proliferation und vermehrte Expression von saurem Gliafaserprotein (GFAP). Die wundnahen Astrozyten umgeben das lädierte Areal, bilden eine permanente Narbe und stellen somit das wahrscheinlich größte Hindernis für die neuronale Regeneration dar (Ridet et al., 1997; Stichel und Müller, 1998; David und Lacroix, 2003). Ergebnisse aus *in vitro*-Versuchen zeigten, dass die Inkubation mit C3bot zu einem noch schnelleren Wundverschluss nach Läsionen führt (Höltje et al., 2005). Im Gegensatz dazu zeigten erste *in vivo*-Versuche, dass die zeitnahe Verabreichung von Ribosyltransferasen der C3-Familie nach Hirnläsionen die Überlebenswahrscheinlichkeit der neuronalen Zellen um das 1,5fache steigern kann (Bertrand et al., 2007). Insofern bleibt in diesem Zusammenhang zu klären, inwieweit der Regenerationsprozess durch C3bot *in vivo* wirklich beeinflusst wird.

Die geschilderten Krankheitsbilder verdeutlichen zum Einen die Bedeutung der exakten Regulation der Glutamatkonzentration durch die Vielzahl verschiedener Transporter, die Konsequenzen aus deren Fehlregulation, aber auch die zukünftigen Möglichkeiten der Beeinflussung dieser Dysfunktionen durch Forschung an C3 Transferasen. Hierbei steht insbesondere GLT-1 durch seine Schlüsselrolle in einer Vielzahl von pathologischen Zuständen im Mittelpunkt. Zum Anderen macht Ihr Reichtum an trophischen Signalen für die Nervenzellen, ihre vielfältigen Funktionen im Astrozyten-Neuronen (-Blutgefäß) - Netzwerk und zerebralen Stoffwechsel die Astrozyten zu einem potentiellen therapeutischen Ziel auch bei akuten Verletzungsbildern (Ranaivo et al., 2006).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, im Kontext mit vorangegangenen Arbeiten, weisen darauf hin, dass die bisher gezeigten Wirkungen von C3bot auf Neuronen wahrscheinlich nicht nur direkt vermittelt sind, sondern zusätzlich auch über einen Sekundäreffekt durch die funktionelle Beeinflussung der umgebenden Glia-Zellen unterstützt gesehen werden müssen.

Dies unterstreicht die Möglichkeit der Verwendung von C3bot als pharmakologisches Werkzeug im Zusammenhang mit akuten Verletzungen und chronischen Erkrankungen des ZNS. Allerdings ist eine abschließende Bewertung der Einsetzbarkeit praktisch noch nicht möglich, da einem vermutlich neuroprotektiven Effekt der gesteigerten Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten nach der Behandlung mit C3bot potentiell eine vermehrte Freisetzung durch adäquate Stimuli gegenüber steht. Diese Fragestellung wird insbesondere in *in vivo*-Untersuchungen zu klären sein.

In Zukunft wird im Hinblick auf die pharmakologische Verwendung zu untersuchen sein, welche Effekte C3bot auf andere Zellarten und Strukturen im ZNS, wie z.B.

Oligendrozyten und auch auf unterschiedliche Regionen hat. Ebenso entscheidend werden hier funktionelle Untersuchungen *in vivo* sein, mit Rücksicht auf Unterschiede in Funktion und Verteilung der einzelnen Kompartimente unter physiologischen und pathologischen Konditionen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *Clostridium botulinum* C3-Protein auf die Glutamat-Aufnahme und -Freisetzung kultivierter Maus-Astrozyten untersucht. Zunächst konnten Ergebnisse vorangegangener Arbeiten zum Einfluss von C3bot auf die Astrozytenmorphologie sowie die damit einhergehende Verminderung des Proteinniveaus von RhoA bestätigt werden. In C3bot-behandelten Kulturen konnte eine gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigerte Aufnahme von Tritium-markiertem Glutamat gemessen werden. Die anschließenden immunzytochemischen sowie proteinbiochemischen Untersuchungen der Glutamattransporter belegen, dass die Expression des Plasmamembrantransporters GLT-1 signifikant gesteigert, die Expression von GLAST jedoch nicht wesentlich beeinflusst wurde. Pharmakologische Versuche zur selektiven Hemmung der Transportaktivität von GLT-1 konnten bestätigen, dass die beobachtete vermehrte Glutamat-Aufnahme nach Inkubation mit C3bot auf der Aktivität dieses Transportersubtyps beruht. Weiterhin zeigte sich, dass auch die vesikulären Glutamattransporter VGLUT1, 2 und 3 in den untersuchten Kulturen exprimiert wurden, sie in ihrem Proteinniveau jedoch nicht durch C3bot beeinflusst werden konnten. Die verstärkte Hemmung der Glutamat-Aufnahme durch BafilomycinA1 nach Behandlung mit C3bot legt aber eine vermehrte Beteiligung vesikulärer Speicherprozesse nahe. Die Behandlung mit C3bot führte weiterhin zu einer gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Sekretion von Glutamat, wie die Stimulation mittels der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore Ionomycin zeigte. In proteinbiochemischen Versuchen konnte dabei eine deutlich gesteigerte Expression des SNARE-Proteins Synaptobrevin nachgewiesen werden. Die Visualisierung und Quantifizierung von vesikulären Fusionsereignissen mit der Plasmamembran über den dabei aufgenommenen Farbstoff AM1-43 lieferte starke Hinweise auf vermehrte Exo-Endozytose-Ereignisse nach Behandlung mit C3bot. Letztendlich bestätigt wurden diese Hinweise auf eine gesteigerte exozytotische Freisetzung von Glutamat durch den Einsatz von *Clostridium botulinum* Neurotoxin D, welches die C3bot-vermittelte vermehrte Freisetzung von Glutamat zum größten Teil blockierte.

Die durchgeführten Arbeiten belegen für Rho-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Aufnahme und Freisetzung des wichtigsten exzitatorischen Transmitters

durch Astrozyten und somit vermutlich auch für die Glutamat-Homöostase im ZNS. Sie legen weiterhin nahe, dass die bislang beobachteten Effekte von C3 Proteinen auf neuronales Wachstum möglicherweise auch auf indirekt vermittelten, glialen Effekten beruhen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG and Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 1991; **353**: 668-670.
- Adamson P, Paterson HF and Hall A. Intracellular localization of the p21rho proteins. *J. Cell Biol.* 1992; **119**: 617-627.
- Ahnert-Hilger G, Höltje M, Grosse G et al. Differential effects of RhoGTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 2004; **90**: 9-18.
- Aktorics K, Weller U and Chhatwal GS. Clostridium botulinum type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Lett.* 1987; **212**: 109-113.
- Aktorics K. Bacterial protein toxins as tools in cell biology and pharmacology. In: Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R (eds). *Cellular microbiology* 2000. ASM Press, Washington: 221-237.
- Alkayed NJ, Birks EK, Hudetz AG, Roman RJ, Henderson L and Harder D. Inhibition of brain P-450 arachidonic acid epoxygenase decreases baseline cerebral blood flow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1996; **271**: 1541-1546.
- Amano M, Ito M, Kimura K et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-Kinase). *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 20246-20249.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP and Haydon PG. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 1998; **10**: 2129-2142.
- Araque A, Li N, Doyle RT and Haydon PG. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* 2000; **20**: 666-673.
- Araque A, Martín ED, Perea G, Arellano JI and Buno W. Synaptically released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci* 2002; **22**: 2443-2450.
- Bai L, Xu H, Collins JF and Ghishan FK. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 36764-36769.
- Bak LK, Schousboe A and Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle:

- aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 2006; **98**: 641-653.
- Bamburg JR. Proteins of the ADF/cofilin family: Essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999; **15**: 185-230.
- Barres BA and Barde Y. Neuronal and glial cell biology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; **10**: 642-648
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT and Edwards RH. Uptake of glutamate into synaptic vesicle by an anorganic phosphate transporter. *Science* 2000; **289**: 957-960.
- Bernstein BW, DeWit M and Bamburg JR. Actin disassembles reversibly during electrically induced recycling of synaptic vesicles in cultured neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998 ; **53** : 236-251.
- Bertrand J, Winton MJ, Rodriguez-Hernandez N, Campenot RB and McKerracher L. Application of rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats. *J. Neurosci.* 2005; **25**: 1113-1121.
- Bertrand J, Di Polo A and McKerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol. of Dis.* 2007; **25**: 65-72.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998; **391**: 281-285.
- Bezzi P, Domerq M, Brambilla L et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 2001; **4**: 702-710.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E and Volterra A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 2004; **7**: 613-620.
- Bignami A and Dahl D. Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *J. Histochem.* 1976; **25**: 466-469.
- Bishop AL and Hall A. RhoGTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 2000; **348**: 241-255.
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C and Magistretti PJ. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J. Cereb. Blood flow Metab.* 1996; **16**: 1079-1089.

- Bokoch GM. Biology of p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 2003; **72**: 743-781.
- Bowman EJ, Siebers A and Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; **85**: 7972-7976.
- Bowser DN and Khakh BS. ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J. Neurosci.* 2004; **24**: 8606-8620.
- Boyes BE, Kim SU, Lee V, Sung SC. Immunohistochemical co-localization of S-100b and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Neurosci.* 1986; **17**: 857-865.
- Braitenberg V and Schuz A. *Cortex: Statistics and Geometry of neuronal Connectivity.* New York: Springer 1998;
- Bridges RJ, Stanley MS, Anderson MW, Cotman CW and Chamberlin AM. Conformationally defined neurotransmitter analogues: selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J. Med. Chem.* 1991; **34**: 717-725.
- Bröer A, Albers A, Setiawan I. Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J. Physiol.* 2002; **539**: 3-14.
- Bröer A, Deitmer JW and Bröer S. Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *GLIA* 2004; **48**: 298-310.
- Bröer S. Molecular mechanisms of glutamate and glutamine transport in astrocytes. In: *The role of glia in neurotoxicity.* Aschner M and Costa LG (eds), CRC Press, Boca Raton 2005: 93-109.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A and Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100**: 13644-13649.
- BurrIDGE K and Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; **116**: 167-179.
- Chaudhry FA, Lehre KP, Champagne MV, Ottersen OP, Danbolt NC and Storm-Mathisen J. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 1995; **15**: 711-720.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D et al. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 1999; **99**: 769-780.
- Choi DW. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 1992; **23**: 1261-1276.

- Coco S, Calegari F, Pravettoni E et al. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 1354-1362.
- Crippa D, Schenk U, Francolini M et al. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J. Physiol.* 2006; **570**: 567-582.
- Cruz F and Cerdan S. Quantitative <sup>13</sup>C NMR studies of metabolic compartmentation in the adult mammalian brain. *NMR Bio-med.* 1999; **12**: 451-462.
- Dabir DV, Robinson MB, Swanson E et al. Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J. Neurosci.* 2006; **26**: 644-654.
- Danbolt NC, Chaudhry FA, Dehnes Y. Properties and localization of glutamate transporters. *Prog. Brain Res.* 1998; **116**: 21-41.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 2001; **65**: 1-105.
- Dani JW, Chernjavsky A and Smith SJ. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 1992; **8**: 429-440.
- Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A and Hall A. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 1677-1680.
- David S and Lacroix S. Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 2003; **26**: 411-440
- Deitmer JW, Bröer A and Bröer S. Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J. Neurochem.* 2003; **87**: 127-135.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD and McKerracher L. Rho signalling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J. Neurosci.* 2002; **22**: 6570-6577.
- DerMardirossian C and Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 2005; **15**: 356-363.
- Domercq M, Brambilla L, Pilati E, Marchaland J, Volterra A and Bezzi P. P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by TNF alpha and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 30684-30696.
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y and Swanson RA. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 2003; **23**: 1320-1328.
- Erencinska M and Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 1990; **35**: 245-296.

- Escartin C, Brouillet E, Gubellini P et al. Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLT-1 and GLAST to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *J. Neurosci.* 2006; **26**: 5978-5989.
- Etienne-Manneville S and Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; **420**: 629-635
- Etienne-Manneville S. Cdc42--the centre of polarity. *J. Cell Sci.* 2004; **117**: 1291-1300.
- Feig LA, Urano T and Cantor S. Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci.* 1996; **21**: 438-441.
- Felipo V and Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* 2002; **67**: 259-279.
- Fox PT, Raichle ME, Mintun MA and Dence C. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 1988; **241**: 462-464.
- Fransson A, Ruusala A and Aspenstrom P. Atypical Rho Gtpases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol. Chem.* 2003; **278**: 6495- 6502.
- Fremeau RT, Matthew DT, Pahner I et al. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapses. *Neuron* 2001; **31**: 247-260.
- Fremeau RT, Burman J, Qureshi T et al. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signalling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; **99**: 14488-14493.
- Fritz G and Kaina B. Ras-related GTPase RhoB represses NF- $\kappa$ B signaling. *J. Biol. Chem.* 2000; **276**: 3115-3122.
- Fujihara H, Walker LA, Gong MC et al. Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol. Biol. Cell* 1997; **8**: 2437-2447.
- Fujiwara T, Mammoto A, Kim Y and Takai Y. Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; **271**: 626-629.
- Gbremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, VanRollins M and Harder DR. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1992; **263**: 519-525.
- Govek EE, Newey SE and Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 2005; **19**: 1-49.
- Graier F, Simecek S and Sturek M. Cytochrome mono-oxygenase-regulated signalling

- of Ca<sup>2+</sup> entry in human and bovine endothelial cells. *J. Physiol. (Lond)* 1995; **482**: 259-274.
- Grewer C, Balani P, Weidenfeller C, Bartusel T, Tao Z and Rauen T. Individual subunits of the glutamate transporter EAAC1 homotrimer function independently of each other. *Biochem.* 2005; 44: 11913-11923.
- Harada A, Furuta B, Takeuchi K, Itakura M, Takahashi M and Umeda M. Nadrin, a novel neuron-specific GTPase-activating protein involved in regulated exocytosis. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 36885-36891.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509-514.
- Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 1998; **29** : 229-34.
- Harder DR, Zhang C and Gebrmedhin D. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol. Sci.* 2002; **17**: 27-31.
- Harris KM. How multiple-synapse boutons could preserve input specificity during an inter-neuronal spread of LTP. *Trends Neurosci.* 1995; **18**: 365-369.
- Hassel B, Tessler S, Faull RLM and Emson PC. Glutamate uptake is reduced in pre-frontal cortex in Huntington's disease. *Neurochem. Res.* 2008; **33**: 232-237.
- Hell JW, Maycox PR and Jahn R. Energy dependance and functional constitution of the  $\gamma$ -aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 2111-2117.
- Hernandez-Munoz I, Malumbres M, Leonardi P and Pellicer A. The Rgr oncogene (homologous to RalGDS) induces transformation and gene expression by activating Ras, Ral and Rho mediated pathways. *Oncogene* 2000; 19: 2745-2757.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A and Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 1999; **57**: 417-428.
- Höltje M, von Jagow B, Pahner I et al. The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *J Neurosci.* 2000; **20**: 2131-2141.
- Höltje M, Hoffmann A, Hofmann F et al. Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing. *J. Neurochem.* 2005; **10**: 1-11.
- Höltje M, Hofmann F, Lux R, Veh RW, Just I and Ahnert-Hilger G. Glutamate uptake and release by astrocytes is enhanced by *Clostridium botulinum* C3 protein. *J.*

- Biol. Chem.* 2008; **283**: 9289-9299.
- Hoffmann A, Hofmann F, Just I et al. Inhibition of rho-dependent pathways by Clostridium botulinum C3 protein induces a proinflammatory profile in microglia. *GLIA* 2008;
- Howland DS, Liu J, She Y et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; **99**: 1604-1609.
- Hyder F, Rothman DL and Shulman RG. Total neuroenergetics support localized brain activity: implications for the interpretation of fMRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; **99**: 10771-10776.
- Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB ? *Trends Cell Biol.* 2000; **10**: 129-133.
- Jaffé AB and Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; **21**: 247-269.
- Jahn R and Südhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; **68**: 863-911.
- Jourdain, P., Bergersen LH, Bhaukaurally K et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 2007; **10**: 331-339.
- Just I and Gerhard R. Large clostridial cytotoxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2004; **152**: 23-47.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E and Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 23629-23632.
- Kaneko T and Fujiyama F. Complementary distribution of vesicular glutamate transporter in the central nervous system. *Neurosci. Res.* 2002; **42**: 243-250.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA and Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1998; **1**: 683-692.
- Kanner BI and Schuldiner S. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1987; **22**: 1-38.
- Kauffmann RF, Taylor RW and Pfeiffer DR. Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**: 2735-2739.
- Kettenmann H, Backus KH and Schachner M. Aspartate, glutamate and gamma-amino-

- butyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.* 1984; **52**: 25-29.
- Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S and Waniewski RA. Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 1990; **10**: 1583-1591.
- Kornak U, Kasper D, Bösl MR et al. Loss of the CIC7 chloride channel leads to osteoporosis in mice and man. *Cell* 2001; **104**: 205-215.
- Kulik A, Haentzsch A, Luckermann M, Reichelt W and Ballanyi K. Neuron-glia signalling via  $\alpha_1$  adrenoreceptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release in Bergmann glial cells in situ. *J. Neurosci.* 1999; **19**: 8401-8408.
- Kvamme E, Torgner IA and Roberg B. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J. Neurosci. Res.* 2001; **66**: 951-958.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I et al. Inactivation of Rho signalling pathways promotes CNS axon regeneration. *J. Neurosci.* 1999; **19**: 7537-7547.
- Levy LM, Warr O and Attwell D. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous  $\text{Na}^+$ -dependent glutamate uptake. *J. Neurosci.* 1998; **18** : 9620-9628.
- Li L-B, Toan SV, Zeleniaia O et al. Regulation of astrocytic glutamate transporter expression by Akt: evidence for a selective transcriptional effect on the GLT-1/EAAT2 subtype. *J. Neurochem.* 2006; **97**: 759-771
- Li N, Sul JY and Haydon PG. A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J. Neurosci.* 2003; **23**: 10302-10310.
- Lieth M, LaNoue KF, Berkich DA. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. *J. Neurochem.* 2001; **76**: 1712-1723.
- Lin CL, Orlov I, Ruggiero AM et al. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 2001; **410**: 84-88.
- Loaiza A, Porras OH and Barros LF. Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J. Neurosci.* 2003; **23**: 7337-7342.
- Lovick TA, Brown LA and Key BJ. Neuronal activity-related coupling in cortical arteriols: involvement of astrocyte-derived factors. *Exp. Physiol.* 2005; **90**: 131-140.
- Mackenzie B, Schafer MK, Erickson JD, Hediger MA, Weihe E and Varoqui H. Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine trans-

- porter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 23720-23730.
- Magistretti PJ and Pellerin L. Cellular mechanism of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos. Trans. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1999; **354**: 1155-1163.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL and Shulman RG. Energy on demand. *Science* 1999; **283**: 496-497.
- Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M et al. A polymorphism in the EAAT2 promotor is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J. Exp. Med.* 2006; **203**: 711-717.
- Masuda M, Betancourt L, Matsuzawa T et al. Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin. *EMBO J.* 2000; **19**: 521-530.
- Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW and Jahn R. Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 15423-15428.
- Meller R, Harrison PJ and Elliott JM. In vitro evidence that 5-hydroxytryptamine increases efflux of glutamate via 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation. *J. Neurosci. Res.* 2002; **67**: 399-405.
- Mi H, Haeberle H and Barres BA. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J. Neurosci.* 2001 ; **21**: 1538-1547
- Minelli A, Barbaresi P, Reimer RJ, Edwards RH and Conti F. The glial glutamate transporter GLT-1 is localised both in the vicinity of and at distance from axon terminals in the rat cerebral cortex. *Neurosci.* 2001; **108**: 51-59.
- Mongin AA and Orlov SN. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. *Pathophysiol.* 2001; **8**: 77-88.
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X and Parpura V. (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* 2004; **24**: 2642-2633.
- Montana V, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M and Parpura V. Vesicular transmitter release from astrocytes. *GLIA* 2006; **54**: 700-715.
- Moon SY and Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 2003 Jan; **13**: 13-22.
- Munoz MD, Herreras O, Herranz AS, Solis JM, Martin del Rio R and Lerma J. Effects of dihydrokainic acid on extracellular amino acids and neuronal excitability in the

- in vivo rat hippocampus. *Neuropharm.* 1987; **26**: 1-8.
- Nedergaard M, Takano T and Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; **3**: 748-755.
- Nikolic M, Chou MM, Lu W, MayerBJ and Tsai LH. The p35/Cdk5 kinase is a neuron specific Rac effector that inhibits PAK1 activity. *Nature* 1998; **395**: 194-198.
- Nobes CD and Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multi-molecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell* 1995; **81**: 53-62.
- Norenberg MD and Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 1979; **161**: 303-310.
- Orkand RK, Nicholls JG and Kuffler SW. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* 1966; **29**: 788-806.
- Otto F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods Cell Biol.* 1990; **33**: 105-110.
- Parpura V, Basarasky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S and Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 1994; **369**: 744-747.
- Parpura V, Fang Y, Basarsky TA, Jahn R and Haydon PG. Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* 1995; **377**: 489-492.
- Parri HR and Crunelli V. The role of  $Ca^{2+}$  in the generation of spontaneous astrocytic  $Ca^{2+}$  oscillations. *Neurosci.* 2003; **120**: 979-992.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T and Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 1997; **17**: 7817-7830.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S and Carmignoto G. Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J. Neurosci.* 2001; **21**: 477-484.
- Patel MS. The effect of ketone bodies on pyruvate carboxylation by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 1974; **23**: 865-867.
- Patel AB, Rothman DL, Cline GW and Behar KL. Glutamine is the major precursor for GABA synthesis in rat neocortex in vivo following acute GABA-transaminase inhibition. *Brain Res.* 2001; **919**: 207-220.
- Pellerin L and Magistretti PJ. Glutamate uptake in astrocytes stimulates aerobic

- glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; **91**: 10625-10629.
- Peng L, Hertz L, Huang R. Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Dev. Neurosci.* 1993; **15**: 367-377.
- Peters A, Palay SL and Webster H. The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. *Philadelphia: W.B. Saunders*; 1991.
- Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, Kim JH and Spencer DD. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia* 2002; **43**: 703-710.
- Porter JT and McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 1996; **16**: 5073-5081.
- Ramakers GJ and Moolenaar WH. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp. Cell Res.* 1998; **245**: 252-262.
- Ranaivo HR, Craft JM, Hu W et al. Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid- $\beta$ -induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J. Neurosci.* 2006; **26**: 662-670.
- Rattan R, Giri S, Singh AK and Singh I. RhoA negatively regulates cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase expression in brain-derived transformde cell lines: negative regulation of IKK $\alpha$ . *Free Rad. Biol. & Med.* 2003; **35**: 1037-1050.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A and Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997; **20**: 570-577.
- Rivero F, Dislich H, Glockner G and Noegel AA. The Dictyostelium discoideum family of rho-related proteins. *Nucleic Acids Res.* 2001; **29**: 1068-1079.
- Robinson SR. Changes in cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 2001; **66**: 972-980.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L et al. Inhibitors of the proteasome block the degeneration of most cell proteins and the generation peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; **78**: 761-771.
- Rodriguez-Kern A, Gegelashvili M, Schousboe A, Zhang J, Sung L and Gegelashvili G. Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-kappaB. *Neurochem.Int.* 2003; **43**: 363-370.
- Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.* 2002; **82**: 131-185.
- Rossi DJ, Oshima T and Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is

- mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; **403**: 316-21.
- Rossman KI, Der CJ and Sondek J. GEF means go: turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; **6**: 167-180.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ and Kunel RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1995; **38**: 73-84.
- Schäfer MKH, Varoqui H, Defamie N, Weihe E and Erickson JD. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 50734-50748.
- Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M and Aktories K. Gln63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1. *Nature* 1997; **387**: 725-729.
- Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS and Larsson OM. Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Int.* 2004; **45**: 521-527.
- Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E and Aktories K. Glucosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins-effects on nucleotide binding, GTPase activity and effector-coupling. *Biochem.* 1998; **37**: 5296-5304.
- Sekine A, Fujiwara M and Narumiya S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 8602-8605.
- Serres S, Bezancon E, Franconi JM and Merle M. Ex vivo analysis of lactate and glucose metabolism in the rat brain under different states of depressed activity. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 47881-47889.
- Shank RP, Bennett GS, Freytag SO and Campbell GL. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res.* 1985; **329**: 364-367.
- Shelton MK and McCarthy KD. Hippocampal astrocytes exhibit Ca<sup>2+</sup>-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J. Neurochem.* 2000; **74**: 555-563.
- Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL and Shulman RG. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; **95**: 316-321.

- Sitcheran R, Gupta P, Fisher PB and Baldwin AS. Positive and negative regulation of EAAT2 by NF- $\kappa$ B: a role for N-myc in TNF $\alpha$ -controlled repression. *EMBO* 2005; **24**: 510-520.
- Spray DC, Ye ZC and Ransom BR. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 2006; **54**: 758-773.
- Stichel CC and Müller HW. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* 1998; **294**: 1-9
- Stigliani S, Zappettini S, Raiteri I. Glia re-sealed particles freshly prepared from adult rat brain are competent for exocytotic release of glutamate. *J. Neurochem.* 2006; **96**: 656-668.
- Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S. Disruption of CIC3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 2001; **29**: 185-196.
- Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Chao W, Volsky DJ and Fisher PB. Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100**: 1955-1960.
- Swanson RA, Liu J, Miller JW et al. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J. Neurosci.* 1997; **3**: 932-940.
- Szatkowski M, Barbour B and Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 1990; **348**: 443-447.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C and Jahn R. Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J. Neurosci.* 2001; **21**: 1-6.
- Takamori S, Malherbe P, Broger C and Jahn R. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep.* 2002; **3**: 798-803.
- Takano T, Kang J, Jaiswal JK et al. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; **102**: 16466-16471.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 1997; **276**: 1699-1702.
- Tillieux S and Hermans E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J. Neurosci. Res.* 2007; **85**: 2059-2070.

- Torres GE, Gainetdinov RR and Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; **4**: 13-25.
- Van Aelst L and D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signalling networks. *Genes Dev.* 1997; **11**: 2295-2322.
- Ventura R and Harris KM. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 1999; **19**: 6897-6906.
- Verderio C, Coco S, Rossetto O, Montecucco C and Matteoli M. Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. *J. Neurochem.* 1999; **73**: 372-379.
- Vitale ML, Seward EP and Trifaró JM. Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 1995; **14**: 353-363.
- Vogelsgesang M, Pautsch A and Aktories K. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2007; **374**: 347-360.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Larsson OM and Schousboe A. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J. Neurochem.* 2000; **75**: 471-479.
- Wang L, Yang L, Luo Y and Zheng Y. A novel strategy for specifically downregulating individual rho GTPase activity in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 44617-44625.
- Wennerberg K and Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* 2004; **117**: 1301-1312.
- Wilde C, Barth H, Sehr P et al. Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA. *J. Biol. Chem.* 2002a; **277**: 14771-14776.
- Wilde C, Just I and Aktories K. Structure-function analysis of the Rho-ADP-ribosylating exoenzyme C3stau2 from *Staphylococcus aureus*. *Biochem.* 2002b; **41**: 1539-1544.
- Wilde C, Vogelsgesang M and Aktories K. Rho-specific *Bacillus cereus* ADP-ribosyltransferase C3cer cloning and characterization. *Biochem.* 2003; **42**: 9694-9702.
- Winter S, Brunk I, Höltje M et al.  $G\alpha_{02}$  regulates vesicular glutamate transporter activity by changing its chloride dependence. *J. Neurosci.* 2005; **25**: 4672-4680.
- Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K and Negishi M. RhoA inhibits the nerve growth

- factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 18977-18983.
- Yamamoto Y and Gaynor RB. I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends Biochem. Sci.* 2004; **29**: 72-79.
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K et al. Cofilin phosphorylation by LIM-Kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 1998; **393**: 809-812.
- Yao D, Mackenzie B, Ming H, Zhu H, Hediger MA and Erickson JD. A novel system A isoform mediating Na<sup>+</sup>/neutral amino acid cotransport. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 22790-22797.
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S and Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci.* 2003; **23**: 3588-3596.
- Yernool D, Boudker O, Jin Y and Gouaux E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 2004; **431**: 811-818.
- Yuan XB, Jin M, Xu X et al. Signalling and crosstalk of RhoGTPases in mediating axon guidance. *Nat. Cell Biol.* 2003; **5**: 38-45.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Grunstein L et al. Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino-acid transamination. *J. Neurochem.* 1996; **66**: 378-385.
- Zalcman G, Dorseuil O, Garcia-Ranea JA, Gacon G and Camonis J. RhoGAPs and RhoGDIs, (His)stories of two families. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1999; **22**: 85-113.
- Zelenaia O, Schlag BD, Gochenauer GE et al. Epidermal growth factor receptor antagonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF- $\kappa$ B. *Mol. Pharmacol.* 2000; **57**: 667-678.
- Zerangue N and Kavanaugh MP. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 1996; **383**: 634-637.
- Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M et al. Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J. Biol. Chem.* 2004b; **279**: 12724-12733.
- Zhou J and Sutherland ML. Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J. Neurosci.* 2004; **24**: 6301-6306.
- Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T and Carmignoto G. Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J. Physiol.* 2003; **553**: 407-414.

Zschocke J, Bayatti N, Clement AM et al. Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions. *J. Biol. Chem.* 2005; **280**: 34924-34932.

Zwingmann C, Richter-Landsberg C, Brand A and Leibfritz D. NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3-<sup>13</sup>C]alanine in astrocytes, neurons and cocultures: implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia* 2000; **32**: 286-303.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BoNt/D	Botulinum Neurotoxin D
BSA	Bovines Serumalbumin
C3bot	Clostridium botulinum C3-Protein
C3lim	Clostridium limosum C3-Protein
C3stau	Staphylococcus aureus C3-Protein
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CdK5	Cyklin-abhängige Kinase
CIC3/7	Chlorid-Kanal 3/7
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenyl-indol
DHK	Dihydrokainat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPM	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EAAC	Exzitatorischer Aminosäure Carrier
EAAT 1-5	Exzitatorische Aminosäure Transporter 1-5
ECL	Enhanced chemiluminescence
EET	Epoxyeikosatriensäure
FGF-2	fiboblast growth factor 2
FKS	Fötale Kälberserum
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDNF	glial derived neurotrophic factor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamat/Aspartat-Transporter
GLT-1	Glutamatttransporter 1
GTP	Guanosintriphosphat
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
<sup>3</sup> H	Tritium
HBSS+	Hanks Buffered Salt Solution
HEPES-KOH	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
(20)-HETE	(20)-Hydroxyeikosatetrise Säure
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B	Inhibitorischer Faktor $\kappa$ B
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LCS	Liquid Scintillation Counter
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec3-Kinase
LWM	Low Molecular Weight Marker

---

MLC	Myosin-Leichtkette
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
Na <sup>+</sup>	Natrium
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NF $\kappa$ B	Nuklearfaktor $\kappa$ B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSF	N-ethylmaleimid-sensibler Faktor
P	Postnatal-Tag
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphate-buffered Saline Solution
PDC	Pyridiniumdichromat
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
Rho	Ras-homolog
SDS	Natriumduodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLO	Streptolysin O
SNAP23/25	Synaptosomen-assoziiertes Protein von 23/25 kD
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor
Temed	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TS	Tris-Saline
V <sub>max</sub>	Maximale Transportgeschwindigkeit
v-ATPase	Vesikuläre ATPase
VGLUT	Vesikulärer Glutamattransporter
ZNS	Zentralnervensystem

## 8. Publikation

M. Höltje, F. Hofmann, R. Lux, R. W. Veh, I. Just, and G. Ahnert-Hilger. Glutamate uptake and release by astrocytes is enhanced by *Clostridium botulinum* C3 protein. *J. Biol. Chem.* 2008; **283**: 9289-9299.

## **9. Lebenslauf**

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

**Berlin, den**

**Romy Lux**

## 10. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger für die Überlassung des sehr interessanten Promotionsthemas und die engagierte Betreuung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Markus Höltje für die tolle, ausführliche und ausdauernde Hilfe sowohl bei theoretischen als auch bei praktischen Fragestellungen und das stete, fördernde Interesse an meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Susan Öztürk, Ursel Tofoté, Birgit Metze und den anderen Mitarbeiterinnen des Labors für ihre praktische Hilfe und das nette Arbeitsklima bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern Boris und Marion für den regen Gedanken- und Ideen-Austausch, die ständige Hilfe bei der Fertigstellung und die moralische Unterstützung.

Meinen Freunden möchte ich für die Geduld und den Beistand in stressigen Zeiten danken.

## 11. Erklärung an Eides statt

Ich, Romy Lux, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Glutamat-Aufnahme und –Freisetzung durch Astrozyten nach *Clostridium botulinum* C3-Protein-Behandlung“ 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