

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

DISSERTATION

**Effekte von Deltamethrin und ADP- ribosylierender
C3- Exoenzyme auf die Entwicklung hippokampaler Neurone in
Kultur**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Geethanjali Pickert geb. Thuraisamy

aus Jaffna (Sri Lanka)

Gutachter: 1.: Prof. Dr. rer. nat. G. Ahnert-Hilger
2.: Prof. Dr. hum. biol. C. Beyer
3.: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K. Scholich

Datum der Promotion: 03.09.2010

Meiner Familie,

meinen vier Kindern

Rebekka, Tabea-Mathura, Hanna-Anjali und Rahel-Beiravi

sowie meinem Ehemann Oliver

in Dankbarkeit und Anerkennung gewidmet.

Publikationen

Neufert C, **Pickert G**, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Nikolaev A, Ouyang W, Neurath MF and Becker C:
Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. **Cell Cycle**. 2010 Feb; 9:4.

Bockhart V, Constantin CE, Häussler A, Wijnvoord N, Kanngiesser M, Myrczek T, **Pickert G**, Popp L, Sobotzik JM, Pasparakis M, Kuner R, Geisslinger G, Schultz C, Kress M, Tegeder I:
Inhibitor kappaB Kinase beta deficiency in primary nociceptive neurons increases TRP channel sensitivity. **J Neurosci**. 2009 Oct 14;29(41):12919-29.

Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, Ouyang W, Neurath MF, Becker C:
STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. **J Exp Med**. 2009 Jul 6;206(7):1465-72. Epub 2009 Jun 29.

Posterbeitrag

Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, Ouyang W, Neurath MF, Becker C:
STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. Digestive Disease Week, May 30 –June 4, 2009; Chicago, Illinois (USA). Poster of Distinction.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

Ahnert-Hilger G, Holtje M, Grosse G, **Pickert G**, Mucke C, Nixdorf-Bergweiler B, Boquet P, Hofmann F, Just I:
Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. **J Neurochem**. 2004 Jul;90 (1):9-18.

Grosse G, Thiele T, Heuckendorf E, Schopp E, Merder S, **Pickert G**, Ahnert-Hilger G:
Deltamethrin differentially affects neuronal subtypes in hippocampal primary culture. **Neuroscience**. 2002;112(1):233-41.

Ahnert-Hilger G, Grosse G, **Pickert G**, Holtje M, Hofmann F, Just I:
Novel neurobiological activity of botulinum C3 exoenzyme and its potential therapeutic use. **N-S ARCH PHARMACOL**. 2002, 365: 2 suppl.

Ahnert-Hilger G, Hofmann F, **Pickert G**, Grosse G, Just I:
Novel neurobiological activity of Clostridium botulinum exoenzyme C3. **N-S ARCH PHARMACOL**. 2002, 365: 185 suppl.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Hippokampuskulturen als Modellsystem für in vitro Untersuchungen	4
1.2	Synaptische Transmission	4
1.3	Spannungsabhängige Kaliumkanäle	5
1.4	Deltamethrin als ausgewählter Vertreter der Pyrethroide	5
1.5	Neuritogenese	7
1.6	Rho-GTPasen	8
1.7	Rho-GTPasen als Substrat bakterieller Toxine	12
1.8	C3 ADP-Ribosyltransferasen	13
2	Fragestellung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Chemikalien und Reagenzien	20
3.2	Puffer und Lösungen	23
3.2.1	Puffer	23
3.2.2	Lösungen zur Immunocytochemie	23
3.2.3	Lösungen für Proteinaufarbeitung, Elektrophorese und Westernblot	24
3.2.4	Lösungen für die elektronenmikroskopischen Untersuchung	26
3.3	Medien für die Zellkultur	26
3.4	Versuchstiere	26
3.5	Verwendete Substanzen, C3 Exoenzyme und DNA-Konstrukte	27
3.6	Verwendete Antikörper	28
3.7	Durchführung der Experimente	30
3.7.1	Anlegen der hippokampalen Primärkulturen	30
3.7.2	Nachweis von Proteinen mittels Westernblot	31
3.7.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentration	31
3.7.2.2	Protein-Gelelektrophorese und Immunoreplika-Analyse	31
3.7.3	Nachweis von Proteinen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene	33

3.7.3.1	Immunzytochemie	33
3.7.3.2	Elektronenmikroskopie	34
3.7.4	Transfektion	35
3.7.5	Morphometrische Messungen	35
3.8	Verwendete Geräte	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Primärkulturen des Hippokampus	37
4.2	Effekte von Deltamethrin auf hippokampale Neuronen	37
4.2.1	Effekte von Deltamethrin auf synaptische Proteine und spannungsabhängigen Kaliumkanälen	39
4.2.2	Effekte von Deltamethrin auf Neuronensubgruppen	43
4.3	Wirkung von C3-Exoenzymen auf neuronales Wachstum	46
4.3.1	Effekte des C3-Exoenzyms aus <i>Clostridium botulinum</i> auf hippokampale Neuronen	47
4.3.2	Wirkung der C3-Isoformen aus <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Clostridium limosum</i> auf hippokampale Neuronen	49
4.3.3	Effekte des C3 ^{bot} auf Dissoziationskulturen der Spinalganglien	52
4.3.4	Die Wirkung des enzymdefizienten C3 ^{bot} auf die hippokampalen Neuronen	54
4.3.5	Die Bedeutung der Rho-Proteine	58
4.3.6	Ultrastrukturelle Analyse der mit rekombinantem C3-Protein behandelten Neuronen	63
4.3.7	Effekte der C3-Exoenzyme auf Astrozyten	66
5	Diskussion	70
5.1	Primärkulturen des Hippokampus stellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung von neurotoxischen Effekten dar	70
5.2	Wirkung von Deltamethrin auf hippokampale Neuronen	70
5.2.1	Effekte von Deltamethrin auf die Überlebensfähigkeit der Neuronen: Die Synthese von synaptischen Proteinen und das Verteilungsmuster von Kaliumkanälen	71
5.2.2	Deltamethrin wirkt unterschiedlich auf Neuronensub populationen	72
5.3	C3 ADP-Ribosyltransferasen	74

5.3.1	Rho-Effekte auf das neuronale Wachstum	74
5.3.2	Effekte der C3-Exoenzyme auf Astrozyten	77
6	Zusammenfassung	81
7	Literaturverzeichnis	83

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Hippokampuskulturen als Modellsystem für in vitro

Untersuchungen

Der Hippokampus ist eines der am besten untersuchten Gehirnareale. Ihm wird eine zentrale Rolle bei Lernvorgängen und der Gedächtnisbildung zugeordnet. Seit den Studien von Ramón Y Cajal (1893) ist die zelluläre Architektur und die Organisation der Neuronen im Hippokampus bekannt. Die Hippokampusformation setzt sich aus dem Gyrus dentatus und dem Ammonshorn (Cornus ammonis) zusammen. Das Ammonshorn teilt sich in drei Bereiche auf: die CA1-, CA2- und CA3- Region (Freund und Buzsaki, 1996). Glutamaterge Neuronen, zu denen Pyramidenzellen und Körnerzellen gehören, repräsentieren 90% der hippokampalen Neuronen, die restlichen 10% bilden GABAerge Interneuronen (Vizi und Kiss, 1998).

Durch die Vereinzelung und Dissoziierung der embryonalen Hippokampusneuronen der Maus in Primärkulturen können Aspekte der neuronalen Entwicklung, etwa das Wachstumsverhalten von Neuriten unter bestimmten definierten Bedingungen, sowie das Auswachsen von Axonen und Dendriten beobachtet und quantifiziert werden. Sie differenzieren sich nach mehrwöchiger Kultivierung zu Neuronen, die typische Eigenschaften entsprechender reifer Neuronen in vivo besitzen, wie etwa das Ausbilden von Synapsen, Moosfaserboutons (Grosse et al, 1998) oder das Neuronentyp-spezifische, subzelluläre Verteilungsmuster spannungsabhängiger Kaliumkanäle.

1.2 Synaptische Transmission

Eine Nervenzelle, die Grundeinheit des Nervensystems, kann einige hundert bis zweihunderttausend synaptische Kontakte ausbilden, an denen die Informationsübertragung über Neurotransmitter stattfindet. Die Transmitterfreisetzung erfolgt über den Mechanismus der Exozytose. Es werden konstitutive und regulierte Exozytose unterschieden. Bei der regulierten Exozytose fusionieren die mit Neurotransmitter gefüllten sekretorischen Vesikel auf einen Stimulus hin mit der Plasmamembran und setzen den Inhalt in den synaptischen Spalt frei. Die Neurotransmitter interagieren dann mit ihren jeweiligen postsynaptischen Membranrezeptoren.

Integrale Membranproteine der Vesikel wie Synaptobrevin, Synaptophysin und Synaptotagmin, sowie die Plasmamembranproteine Syntaxin und SNAP25 sind für die Exozytose von Bedeutung. Synaptobrevin ist für die Interaktion der Vesikel mit der Plasmamembran verantwortlich (Edelmann et al., 1995). Synaptophysin spielt bei der Freigabe sekretorischer Vesikel für die Exozytose eine Rolle (Südhof 1995). Die Calciumregulation der Exozytose wird von Synaptotagmin vermittelt (Chapman et al., 1994).

Die bisher bekannten Neurotransmitter können in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst die einfachen Aminosäuren, die von den meisten Synapsen zu ca. 90% als Transmitter verwendet werden, wie Glutamat, GABA und Glyzin. Die zweite Gruppe setzt sich aus den klassischen Transmittern wie Acetylcholin, die Katecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin sowie Serotonin und Histamin zusammen. Die dritte Gruppe besteht aus einer Vielzahl von Neuropeptiden, wie Cholezystokinin, Substanz P oder Somatostatin.

1.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle der Kv-Familie Kv1.1 bis Kv1.6 sind integrale Membranproteine der Neuronen. Sie werden nach Depolarisation geöffnet, wobei Kaliumionen entlang dem elektrochemischen Gradienten nach außen strömen und so die Repolarisation und die Wiederherstellung des Membranpotenzials einleiten. Bei den spannungsbhängigen Kaliumkanälen kann man schnell inaktivierende (z.B. Kv1.4) und langsam inaktivierende (z.B. Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5 und Kv1.6) Kanäle unterscheiden (Goldstein et al., 1996; Roeper et al., 1997). Die Expression von Kaliumkanälen erfolgt in Neuronen des adulten Hippokampus entwicklungsabhängig (Maletic-Savatic et al., 1995).

1.4 Deltamethrin als ausgewählter Vertreter der Pyrethroide

Insektizide aus der Gruppe der Pyrethroide werden als Schädlingsbekämpfungsmittel in der Landwirtschaft und zur Beseitigung von Ungeziefer in Räumen eingesetzt. Sie wirken auf das Zentralnervensystem von Insekten, beeinflussen aber auch das ZNS von Säugern.

Deltamethrin, das zur Gruppe der Pyrethroide -TypII gehört, besitzt in seiner α -Position eine Zyanogruppe, die bei den Pyrethroiden -TypI wie Tetramethrin fehlt. Beide Typen aktivieren in mikromolaren Konzentrationen spannungsabhängige Natriumkanäle von Vertebratenneuronen. Hierbei werden die Öffnungszeiten der Kanäle verlängert, was zu anhaltender Depolarisation führt (Ogata et al., 1988; Song und Narahashi, 1996; Narahashi, 1996). Es kommt zu einer Erhöhung der freien Kalziumkonzentration, was die Ausschüttung verschiedener Transmitter fördert (Eells et al., 1992) und Kalzium-abhängige Veränderungen des Zytoskeletts bewirkt (Shea et al., 1995). Dabei scheinen Tetrodotoxin (TTX)-resistente Natriumkanäle sensitiver als TTX-sensitive Natriumkanäle zu sein (Tabarean und Narahaschi, 1998).

Als verantwortliche kritische Position für die Deltamethrin-Wirkung wird ein Phenylalanin auf Segment D3-S6 in Na^+ -Kanalprotein der spannungsabhängigen Natriumkanäle angesehen. Die α -Untereinheit des Na^+ -Kanalproteins (*Nav 1,4*) ist aus 4 Domänen (D1-D4), jede mit 6 transmembranären Segmenten (S1-S6) aufgebaut. An dieser Position wird der Deltamethrin-Rezeptor vermutet, da eine Mutation auf diesem Abschnitt eine Resistenz gegenüber Deltamethrin zur Folge hat (Wang et al., 2001).

Deltamethrinbehandlung führt zur vermehrten Ausschüttung von Glutamat, von Katecholaminen aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sowie von Acetylcholin aus hippokampalen Neuronen (Bickmeyer et al., 1994; Hossain et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass Pyrethroide eine Hemmung der Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme wie Calmodulin-aktivierte Ca^{2+} ATPase, Na^+ -, K^+ -ATPase sowie GABA-Transferase in vivo und Tyrosinhydroxylase im Striatum der Ratte bewirken können (Sahib et al., 1987; Husain et al., 1996; Ji et al., 2003; Liu et al., 2004).

Bei den spannungsabhängigen Chloridkanälen verursachen Pyrethroide eine Verminderung der Kanalaktivitäten, in dem sie die Öffnungszeiten der Kanäle verkürzen (Forshaw et al., 1993; Ray et al., 1997; Burr et al., 2004).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen neben der Erfassung von Deltamethrinwirkungen auf die neuronale Entwicklung die Effekte bakterieller Toxine (C3-Exoenzyme) sowie Rho-Proteine auf neuronales Wachstum.

1.5 Neuritogenese

Die Entwicklung der Neuronen in einem Kultursystem wird von Goslin und Banker (1989) folgendermaßen beschrieben: Das abgerundete Neuron setzt sich auf dem Substrat fest (Stadium 1) und es bilden sich in ca. 6 Stunden kleine Fortsätze (Neuriten), an deren Enden sich Wachstumskolben befinden (Stadium 2, nach ca. 12 Stunden). Innerhalb 1 bis 2 Tagen beginnt ein Neurit sehr schnell zu wachsen und entwickelt sich zum Axon (Stadium 3) und alle anderen Fortsätze differenzieren sich zu Dendriten (Stadium 4). Wachstum und Verzweigung schreiten nun immer weiter fort. Ab etwa dem siebten Tag in Kultur treten auch Synapsen in großer Zahl auf. Außerdem treten erstmals spontane, elektrische Aktivitäten auf (Stadium 5).

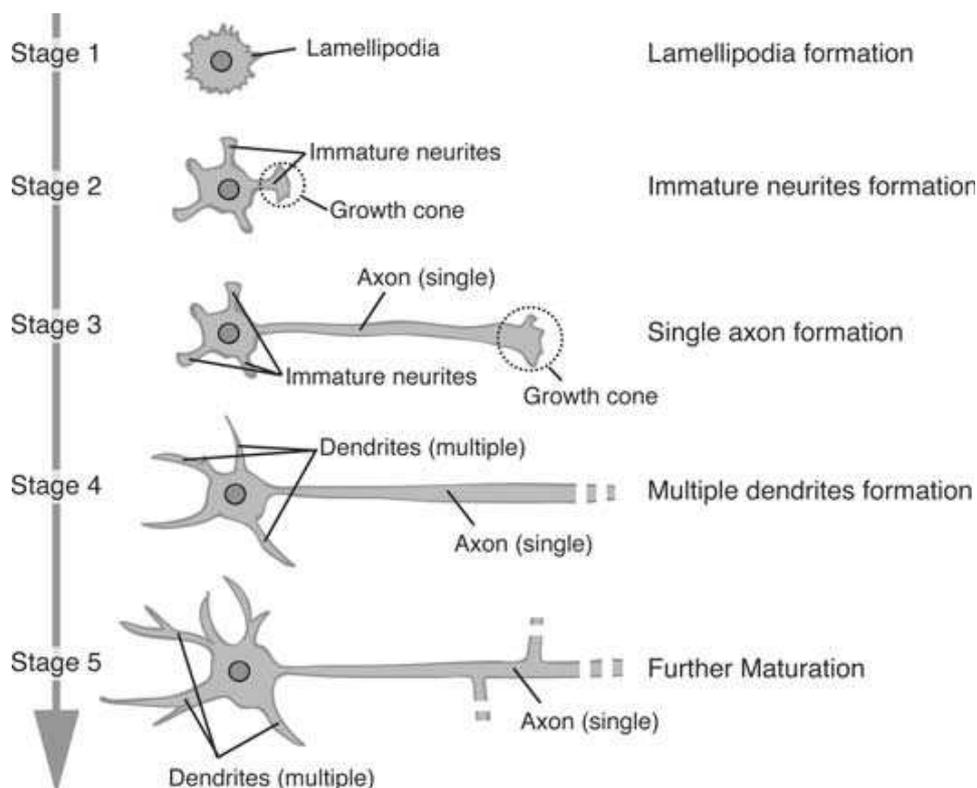


Abbildung 1

Stadien der Entwicklung hippocampaler Neuronen in Kultur

Kultivierte Pyramidennervenzelle des Hippokampus eines kleinen Nagers erwerben ihre charakteristische polarisierte Morphologie in fünf klar definierten Phasen, siehe Text (Yoshimura et al., 2006).

Das Wachstum und die Entwicklung der Neuronen wird durch zytoskelettale Veränderungen vorangetrieben. Hierbei spielen die Rho-Proteine eine wesentliche Rolle. Neben Rho-Proteinen beeinflussen verschiedene andere Moleküle das neuronale Wachstum und die Wachstumsrichtung. Neurotrophe Faktoren wie BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*) und Neurotrophine (NT3, NT4/5) wirken positiv und fördern die neuronale Entwicklung. Sie wirken über zwei Typen von Zelloberflächenmolekülen: Rezeptortyrosinkinasen (trk A, B und C) und der p75-Neurotrophinrezeptor. Die Bindung der Neurotrophine an Rezeptortyrosin-kinasen fördert das Neuritenwachstum (Luo L., 2000).

Neben fördernden Signalen gibt es hemmende Faktoren, die ein weiteres Auswachsen verhindern oder sogar zu einer Rückbildung von Neuronen führen. Hierzu zählen Semaphorine, Ephrine und Slit, die über ihre Membranrezeptoren Plexin, Eph-Rezeptor bzw. Robo wirken (Van Aelst et al., 2004; Govek et al., 2005). Serum enthält Substanzen wie LPA und BDNF, die ebenfalls über die Rho-abhängige Signalkaskaden wirken und das Wachstum von Neuriten/Neuronen beeinflussen. So führt z.B. LPA (*lysophosphatidic acid*) zur Retraktion der Neurite durch G α 12/13-initiierte Aktivierung von Rho über EDG-Rezeptoren (Kranenburg et al., 1999). Bestandteile des Myelins, die nach Neuroläsionen aus den untergehenden Myelinscheiden freigesetzt werden, wirken ebenfalls repulsiv. Hierzu zählen Nogo, MAG (*myelin-associated glycoprotein*) und Ompg (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*). Sie binden an den Nogo-Rezeptor, der mit dem p75^{NTR} und Lingo-1 interagiert und die repulsiven Signale über die Rho-Aktivierung vermittelt (Yamashita et al., 2005).

1.6 Rho-GTPasen

Die Rho-GTPasen gehören zur Familie der Ras-verwandten, kleinen GTP-bindenden Proteinen. Sie werden anhand ihrer strukturellen und funktionellen Homologien in fünf Unterfamilien zusammengefasst. Hierzu gehören die Ras-, Rab-, Arf-, Ran-, und Rho-Proteine. Die Bedeutung der Ras-Unterfamilie für die Zellproliferation und Differenzierung ist durch das Protoonkogen p21^{ras} bekannt. Proteine der Rab- und Arf-Familie übernehmen Aufgaben beim intrazellulären Vesikeltransport (Moss und

Vaughan, 1999; Schimmöller et al., 1998). Ran spielt als Regulatorprotein für den Kerntransport eine wichtige Rolle (Moore, 1998).

Die Rho-GTPasen, deren molekularen Massen 20-30 kDa betragen, werden wie heterotrimere G-Proteine über einen GTPase-Zyklus reguliert.

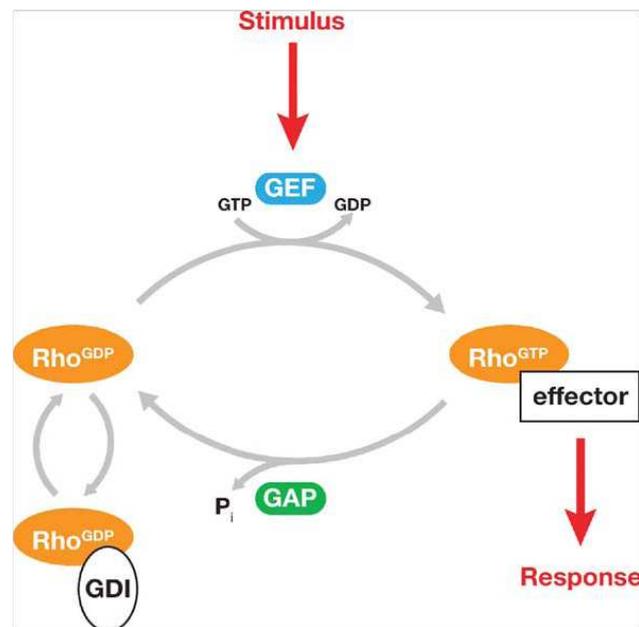


Abbildung 2

Rho-GTPase-Zyklus

Rho-Proteine sind in der GDP-gebundenen Form inaktiv und werden durch einen GDP/GTP-Austausch aktiviert. Der GTPase Zyklus wird durch drei Gruppen von Regulatoren kontrolliert. GEF's fördern die Guaninnukleotid-Freisetzung, GDI's bewirken eine Stabilisierung der GDP-gebundenen Form der Rho-Proteine und GAP's stimulieren die intrinsische Aktivität der Rho-Proteine. In der aktiven Form interagieren sie mit mehreren möglichen Effektoren. Die Hydrolyse des gebundenen GTP durch die intrinsische GTPase Aktivität des Proteins führt die GTPasen wieder in den inaktiven Zustand (Jaffe AB. und Hall A. 2005).

Rho-Proteine

Rho-Proteine werden in 8 Untergruppen geteilt: Rho (RhoA, B und C); Rac (Rac1, 2, 3 und RhoG); Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp und Wrch-1); Rnd (Rnd1, 2 und 3/RhoE); RhoD (RhoD und Rif); RhoH/ TTF; RhoBTB (RhoBTB1 und RhoBTB2) sowie die Miro-Unterfamilie (Miro-1 und Miro-2) (Van Aelst und D'Souza- Schorey, 1997; Fransson et al., 2003; Burrige und Wennerberg, 2004 Sorokina und Chernoff, 2005). Alle Mitglieder haben mindestens 40% Sequenzhomologie. Am besten untersucht

sind bislang die Proteine Rho, Rac und Cdc42 (Machesky et al., 1996; Narumiya et al., 1996; Takai et al., 1995). Die Rho-Proteine werden durch mindestens drei Gruppen interagierender Proteine reguliert (Abbildung 2). Hierzu zählen Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren (GEFs), die den Austausch von GDP gegen GTP fördern. Die Bildung von GTP an Rho-Proteine führt zur Veränderung der Effektorregion, die die Interaktion mit den Effektorproteinen wie Serin- oder Threonin-Kinasen erlaubt. GEF-Proteine für Rho-GTPasen besitzen ein Sequenzmotiv mit Homologie zu dem Dbl Onkogen, dem ersten bekannten Vertreter der Familie der GEF's (Eva und Aaronson, 1985; Hart et al., 1991).

Die zweite Gruppe regulatorischer Proteine sind die GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDI). Sie assoziieren bevorzugt mit der GDP-gebundenen Form der Rho-GTPasen und hemmen dadurch die Dissoziation von gebundenem GDP. Ein bekanntes Mitglied der GDI-Proteine ist Rho-GDI (Fukumoto et al., 1990; Ueda et al., 1990). Rho-GDI scheint eine entscheidende Rolle bei der Translokation der Rho-GTPasen zu spielen. Sie „extrahieren“ Rho-Proteine aus der Zellmembran und stabilisieren die inaktive GDP gebundene Form im Zytosol (Takai et al., 1995).

Die dritte Gruppe sind GTPase aktivierende Proteine (GAPs). Sie stimulieren die intrinsische GTPase Aktivität der Rho-Proteine und beenden den aktiven Zustand der Rho-Proteine. Ein Vertreter dieser Gruppe ist z.B. p50 Rho-GAP (Hall et al., 1990; Lancaster et al., 1994). Die drei oben genannten Regulatorproteine (GEF, GAP und GDI) bestimmen den Zeitpunkt, die Zeitdauer und das subzelluläre Kompartiment der Rho-Funktion. Bisher sind ungefähr 85 GEF's, 80 GAP's und 3 GDI's identifiziert (Aktories et al., 2004).

RhoE/Rnd3 bildet eine Ausnahme, da es weder eine intrinsische GTPase Aktivität besitzt, noch durch Rho spezifische GTPasen stimuliert wird (Foster et al., 1996).

Strukturell sind die Rho-Proteine primär und tertiär ähnlich den anderen Proteinen der Ras-Familie. Zwei Domänen, Switch 1 und 2, unterliegen einer Konformationsänderung, wenn die GTPasen entweder GTP oder GDP gebunden haben (Abbildung 3). Die Switch 1-Region von z.B. RhoA umfasst die Aminosäuren 33-40 und die Switch 2-Region die Aminosäuren 63-78 (Wittinghofer und Nassar, 1996).

Erste Hinweise auf eine Rolle der Rho-Proteine bei der Aktinpolymerisation wurden durch *Clostridium botulinum* C3-Exoenzym, das Rho-Proteine durch ADP-Ribosylierung inaktiviert, erhalten (Chardin et al., 1989). Die funktionelle Bedeutung der Rho-Proteine bei der Zytoskelettregulation wurde durch Mikroinjektionsuntersuchungen mit konstitutiv aktiven Rho Mutanten (Rho^{V14}) beobachtet. Dies führte zu einer massiven Bildung von „stress fibers“ und zur Ausbildung von Adhäsionspunkten (Paterson et al., 1990, Ridley et al., 1992).

Die verwandten GTPasen Rac und Cdc42 wirken ebenfalls auf das Zytoskelett. Rac ist in die Bildung von Lamellipodien und sogenannten „*membrane ruffels*“ eingeschaltet (Ridley et al., 1992b). Cdc42 induziert die Ausbildung von Filopodien und „*mikrospikes*“ (Kozma et al., 1996; Tapon und Hall, 1997).

Cdc42, Rac und Rho sind offenbar sequenziell in die Regulation des Aktinzytoskeletts eingeschaltet, d.h. Cdc42, das z.B. durch Bradykinin aktiviert wird, zur Ausbildung von Filopodien führt und seinerseits Rac aktivieren kann. Rac induziert die Bildung von Lamellipodien und führt wiederum zur Aktivierung von Rho und damit zur Ausbildung von „stress fibers“ und Adhäsionskomplexen.

Zu dem spezifischen Effekt der Regulation des Aktinzytoskeletts (Paterson et al., 1990) sind die Rho-Proteine zusätzlich an einer Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Sie sind z.B. in die Regulation der Phosphatidylinositol-3-Kinase, Phosphatidylinositol-4-Phosphat -5-Kinase, Phospholipase D und Integrin-vermittelte Signalübertragung eingeschaltet (Zheng et al., 1994; Chong et al., 1994; Malcolm et al., 1994; Laudanna et al., 1996).

Rac ist bei der Regulation der NADPH Oxidase in neutrophilen Granulozyten beteiligt (Abo et al., 1991). Zudem führen Rac und Cdc42 über den *JNK*-Signalweg (c-Jun N-Anschlußkinase) zur Aktivierung der Transkription und damit zur Regulation von Zellwachstum und Proliferation (Minden et al., 1995).

Desweiteren sind Rho-Proteine an der Kontrolle der Endozytose, der Zelldifferenzierung, der Zellzyklusregulation, der Apoptose beteiligt (Lamaze et al., 1996, Schmalzing et al., 1995; Fort et al., 1999; Settleman et al., 1999; Olson et al., 1995; Moorman et al., 1996). Bei der Transformation sowie der Invasivität von Tumorzellen ist auch die Beteiligung der Rho-Proteine nachweislich belegt (Khosravi-

Far et al., 1995; Michiels et al., 1995). Entsprechend wurde eine Vielzahl interagierender Proteine identifiziert, bei denen es sich wahrscheinlich um Effektoren der Rho-Proteine handelt.

1.7 Rho-GTPasen als Substrat bakterieller Toxine

Ein häufiger Wirkungsmechanismus bakterieller Toxine ist die Modifizierung eukaryonter GTP-bindender Regulatorproteine, Rho-GTPasen. Diese Toxine lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe gehören die großen clostridialen Zytotoxine, die durch Glucosylierung an Threonin 35 (bzw. Threonin 37) die Rho-GTPasen inaktivieren (Abbildung 3). Hierzu gehören *Clostridium difficile* A und B, *Clostridium sordellii*, hämorrhagisches Toxin (HT) und letales Toxin (LT) sowie *Clostridium novyi* α -Toxin (Aktories et al., 1997; Just et al., 1994, 1995).

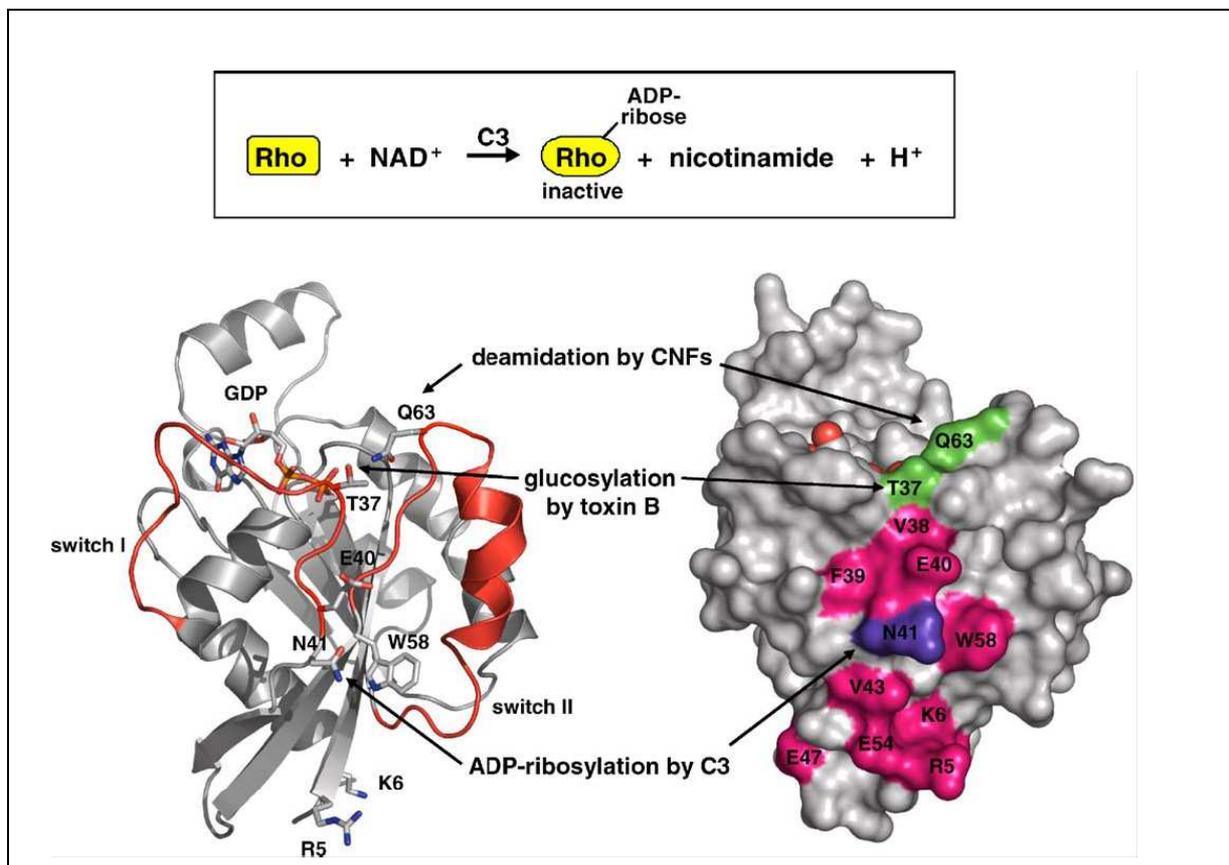


Abbildung 3

Modifizierung von RhoA durch bakterielle Toxine (ADP-ribosylierung der C3-Protein)

C3-Transferasen ADP-ribosylieren RhoA auf RhoAN41 (Schema). RhoA wird als ein Schleifenmodell (links) und als Oberfläche (rechts) dargestellt. Die Akzeptor RhoAN41 (blau) befindet sich neben dem Schalter I-Region in der "Effektor-Loop", eine Region, in der Interaktion mit Effektor-Proteine der RhoA (RhoAR5, K6, E40, E47, E54, W58, und RhoAV38, F39, V4) möglich ist. Die im Untergrund beteiligte Toxin-Interaktion sind in pink dargestellt. Weitere Teile von RhoA, die durch bakterielle Toxine modifiziert werden, sind grün markiert:

RhoAT37, die in der Schalter I-Region befindet, ist mono-glucosyliert von Clostridien-Toxin (z. B., *C. difficile* Toxin A und B). Dies führt zu einer Inaktivierung von Rho GTPasen. Desamidierung von RhoAQ63, die in den Switch-II-Region liegt, vertreten durch *E. coli* zytotoxischen nekrotisierende Faktoren (CNF) führt zu einer konstitutiven Aktivierung von RhoA (Vogelsgesang et al., 2007).

Die zweite Gruppe sind die zytotoxisch nekrotisierenden Faktoren (CNF1 und CNF2) aus *Escherichia coli* und Bordetella dermonekrotisches Toxin (DNT). Sie deamidieren das Glutamin 63 von Rho (Glutamin 61 von Rac und Cdc42). Diese Modifikation blockiert die intrinsische und die GAP- stimulierte (GTPase aktivierendes Protein) GTPase-Aktivität der Rho-Proteine, wodurch diese dauerhaft im aktivierten Zustand verbleiben (Flatau et al., 1997; Schmidt et al., 1997; Horiguchi et al., 1997; Lerm et al., 1999). Die dritte Gruppe sind die C3-Exoenzyme, die Rho-Proteine an Asparagin 41 ADP-ribosylieren. Diese Modifikation blockiert die biologische Aktivität der Rho-GTPasen (Sekine et al., 1989; Aktories et al., 1989).

Außerdem sind eine Reihe von Toxinen, z.B. ExoS von *Pseudomonas aeruginosa*, Yop E von *Yersinia* und SptP von *Salmonella* bekannt, die nicht direkt die Rho-Proteine modifizieren, sondern über deren regulatorische Proteine den GTPase-Zyklus beeinflussen (Goehring et al., 1999; Aktories et al., 2004).

1.8 C3-ADP Ribosyltransferasen

Die Familie der C3-Exoenzyme wird von unterschiedlichen gram-positiven pathogenen Bakterien produziert und stellt bakterielle Toxine dar, die eukaryontische Rho-Proteine modifizieren (Aktories et al., 1992). Bisher sind 7 C3-ähnliche Isoformen beschrieben worden (Aktories et al., 2004). *Clostridium botulinum* produziert zwei Isoformen von C3 ADP-Ribosyltransferasen, die als C3bot1 und C3bot2 bezeichnet werden (Aktories et al., 1987, 1988; Rubin et al., 1988). Die von *Clostridium limosum* produzierte C3-Transferase wird als C3lim, die von *Bacillus cereus* als C3cer bezeichnet (Just et al., 1992; 1995a). Von *Staphylococcus aureus* gebildete ADP-Ribosyltransferasen (3 Isoformen) werden als C3stau1, 2 und 3 bezeichnet (Sugai et al., 1990; Wilde et al., 2002a). C3-Exoenzyme sind stark basische Proteine ($pI \geq 9$) und weisen auf Proteinebene eine Sequenzidentität von 30-70% auf. Sie bestehen aus einer einzelnen Peptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa.

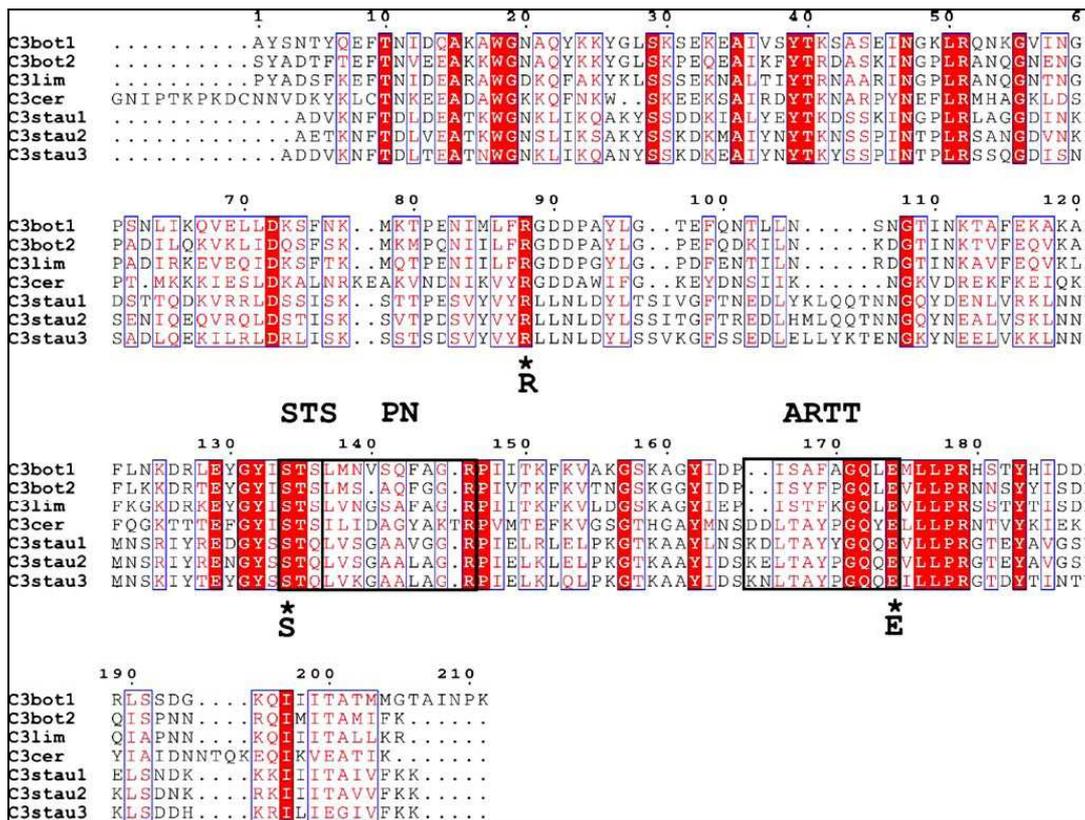


Abbildung 4
Die Sequenzhomologie der C3-Transferasen

Die Sequenzen der sieben C3-ADP-ribosyltransferasen sind zusammengestellt. Clostridium botulinum C3-Transferase Typ I (C3bot1; Acc. Nr. P15879), Clostridium botulinum C3-Transferase Typ II (C3bot2; Acc. Nr. Q00901), Clostridium limosum C3-Transferase (C3lim; Acc. Nr. Q46134), Bacillus cereus C3-Transferase (C3cer; Acc. No AJ429241.1), Staphylococcus aureus C3 Transferase A, B, und C (C3stau1; Acc. Nr. P24121; C3stau2; Acc. No BAC22946, C3stau3; Acc. No.; NP-478345 ; auch als EDIN A, B, und C). Wichtige Motive, die von Bedeutung sind: die ADP-Ribosylierung Toxin-Turn-Turn (ARTT)-Schleife ist in Protein-Substrat Anerkennung beteiligt. Wesentlich für die enzymatische Aktivität (C3botQ172 und C3botE174), die Phosphat-Nicotinamid-Schleife (PN-loop), die in die Bindung von NAD beteiligt ist, die STS-Motiv, das innerhalb der Familie der ADP-ribosyltransferasen erhalten bleibt (Vogelsgesang et al., 2007).

Sämtliche C3-Transferasen spalten das ubiquitäre Co-substrat NAD in ADP-Ribose und Nicotinsäureamid und transferieren die ADP-Ribose auf Asparagin 41 der Rho-Proteine A, B und C, wodurch diese inaktiviert werden (Aktories et al., 1988; Sekine et al., 1989). Diese Inaktivierung führt zur Hemmung seiner biologischen Aktivität bzw. alle Rho-abhängigen Signalwege.

ADP-ribosyliertes Rho kann trotz der Lage von N41 innerhalb der Rho-Effektor-domäne noch mit einigen seiner Effektoren wie z.B. Proteinkinase N, Rhokinase oder Phospholipase D interagieren (Sehr et al., 1998; Genth et al., 2003b). Die GEF-

induzierte Aktivierung der Rho-Proteine wird jedoch nach der ADP-Ribosylierung gehemmt. Dies hat eine verminderte Membrantranslokation zur Folge (Sehr et al., 1998). Zudem verstärkt die ADP-Ribosylierung die Bindung von Rho an GDI (Genth et al., 2003). Also scheint der zelluläre Wirkmechanismus von C3-Exoenzym auf einer Stabilisierung der inaktiven Form von Rho im Zytosol zu beruhen (Abbildung5).

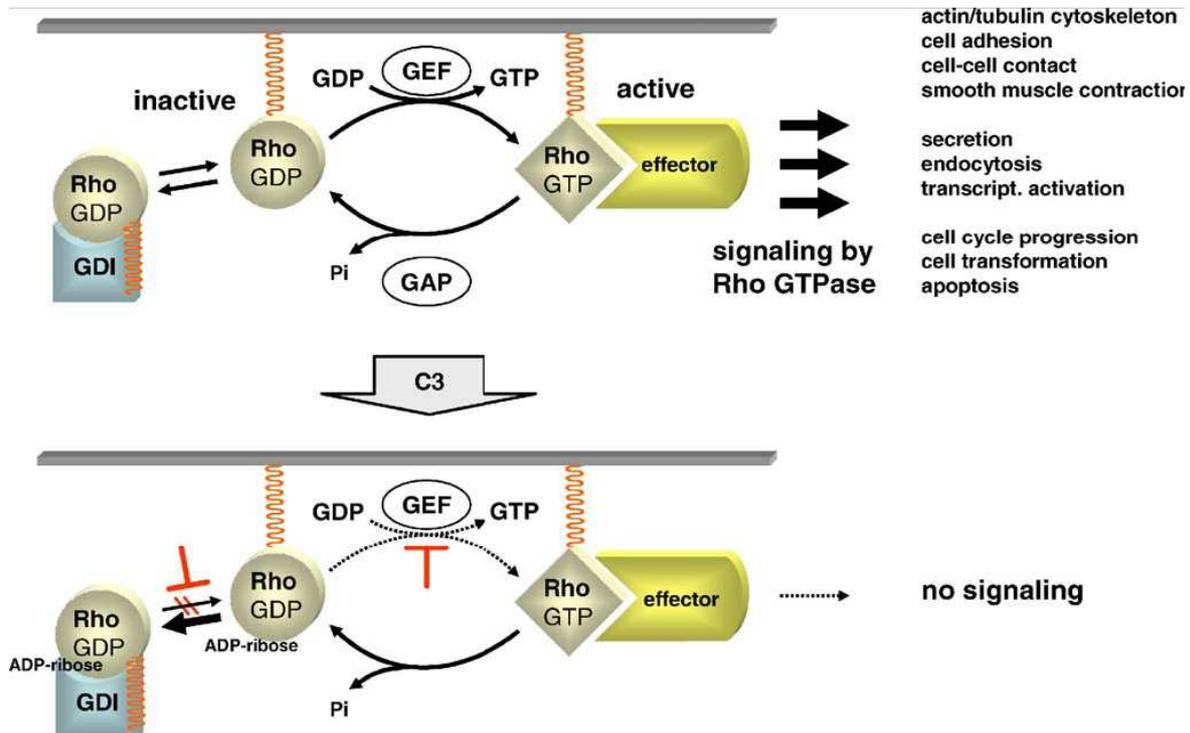


Abbildung 5

Funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von RhoA durch C3^{bot}

C3^{bot} ADP-ribosyliert RhoA als GDI-freie Form. Rho GTPasen sind in der GDP-gebundenen Form inaktiv und aktiviert durch GDP/ GTP Austausch, die durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) erleichtert wird. In der aktiven Form RhoA GTP interagiert mit einer Vielzahl von Effektoren, dies führt zu verschiedenen zellulären Wirkungen. Die aktive Form von RhoA wird durch Hydrolyse von GTP, die durch GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) verstärkt wird, beendet. Die inaktive Form ist von der Membran durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GDI) extrahiert und im Cytosol in einem inaktiven RhoGDI Komplex stabilisiert. RhoA wird in zwei Stufen-Verfahren inaktiviert: 1. ADP-Ribosylierung hemmt die Aktivierung von RhoA durch GEF. 2. Die Bindung von ADP-ribosylierte RhoA zu GDI wird gesteigert, was zu einer Anhäufung von cytosolischen inaktiv Rho-RhoGDI Komplex führt (Vogelsgesang et al., 2007).

Neben der ADP-Ribosylierung von Rho-Proteinen existiert eine weitere intrazelluläre Zielstruktur, die mit den C3-Transferasen interagiert, aber nicht modifiziert wird. RalA bindet mit hoher Affinität an C3-Proteine, jedoch nicht an C3-Protein aus

Staphylococcus aureus. Durch diese Interaktion werden sowohl C3-Proteine als auch RalA in seiner biologische Aktivität gehemmt (Wilde et. Al., 2002b).

Rac wird in Gegenwart niedriger Konzentrationen an Detergentien (z.B. 0,01% SDS) zu maximal 10% modifiziert. Cdc42 ist kein Substrat der C3-Transferasen (Just et al., 1992). RhoE und Rnd3 werden durch C3-Transferase aus *Staphylococcus aureus* modifiziert (Wilde et al., 2001a).

Die C3-Transferasen besitzen nur eine Enzymdomäne und keine spezifische Translokations- und Rezeptordomäne, was ihre Klassifikation als Toxin in Frage stellt. Beschrieben ist, dass sie an keine bekannten Oberflächenrezeptoren binden können und nur bei hohen Konzentrationen im μM -Bereich unspezifisch über Pinozytose in eukaryontische Zellen aufgenommen werden (Boquet et al., 1998). Die schlechte Aufnahme von C3-Exoenzymen in Zellen wird durch experimentelle Manipulationen wie Mikroinjektionen, Elektroporation, Permeabilisierung mit Digitonin oder Streptolysin O ausgeglichen (Nobes und Hall., 1995; Stasia et al., 1991; Mackay et al., 1997; Fensome et al., 1998). Weitere Möglichkeiten bieten intrazelluläre Expression von C3-Proteinen durch transiente Transfektion sowie die Bildung von chimären Konstrukten durch Fusion mit einer Bindungsdomäne einer enzymatisch inaktiven Variante eines Toxins wie C2-Toxin (Fujisawa et al., 1998; Barth et al., 1998).

Wie schon unter Kapitel 1.6 erwähnt, spielen die Rho-Proteine und deren Inaktivierung durch C3-Exoenzyme für verschiedene Signaltransduktionsprozesse eine wesentliche Rolle. Einige Beispiele sind unten aufgeführt. Die durch C3-Exoenzyme hervorgerufene Inaktivierung von Rho führt z.B. zur Depolymerisation des Aktinzytoskeletts sowie zur Verminderung der Zellmotilität, Zellinvasion und Zytokinesis (Chardin et al., 1989; Wiegers et al., 1991; Stasia et al., 1991; Verschueren et al., 1997; Takaishi et al., 1995). Weiterhin wird berichtet, dass C3-Exoenzyme die Phagozytose, Endozytose und Serum-induzierte DNA-Synthese sowie transkriptionale Aktivität blockieren können (Caron und Hall., 1998; Schmalzing et al., 1995; Olsen et al., 1995; Beltman et al., 1999). Jedoch aktiviert C3-Exoenzym den Stress-Signal-Transduktionsweg über den *JNK*-Signalweg (Beltman et al., 1999). In neuronalen Zellen vermindern C3-Transferasen den durch

Thrombin oder Lysophosphatsäure induzierten repulsiven Effekt der Neurite und führen zur Zellabrundung (Jalink et al., 1994; Katoh et al., 1998).

Die Rolle von C3-Transferasen als Pathogenitätsfaktoren ist weitgehend unklar. Erwähnt werden sollten in diesem Zusammenhang die Aktivitäten der C3-Exoenzyme auf das Immunsystem eukaryontischer Organismen. C3-Proteine führen zu einer Verminderung der Funktion von Immunzellen durch Zytotoxizität der Lymphozyten, Adhäsion, Migration und Invasion der Lymphozyten und Leukozyten (Lang et al., 1992; Nemoto et al., 1996; Verschueren et al., 1997; Stam et al., 1998; Laudanna et al., 1996, 1997).

***Clostridium botulinum* C3-Exoenzym (C3^{bot})**

Clostridium botulinum C3-Exoenzym ist der Prototyp der Familie der C3 ADP-Ribosyltransferasen. Es wird von *Clostridium botulinum* Stämmen C1 und D produziert und wurde ursprünglich als Kontamination in C2-Exoenzym produzierenden Bakterienstämmen entdeckt (Aktories et al., 1987; Rubin et al., 1988). Obwohl anfänglich eine neurotoxische Eigenschaft vermutet wurde, besteht strukturell, immunologisch und funktionell keine Ähnlichkeit zu den üblichen clostridialen Neurotoxinen. Das Gen für C3-Transferase ist auf Bakteriophagen neben Neurotoxinen C1 und D lokalisiert (Aktories und Frevert, 1987; Rösener et al., 1987; Adam-Vizi et al., 1988).

C3^{bot} ADP-ribosyliert die Rho-Proteine A, B und C an Asparagin 41, wodurch diese inaktiviert werden. Diese Inaktivierung führt zur Hemmung seiner biologischen Aktivität bzw. aller Rho-abhängigen Signalwege. Da die Rho-Proteine in praktisch allen eukaryontischen Zellen als Hauptregulatoren des Aktin-Zytoskellets fungieren, ergeben sich durch die Hemmung der Rho-Aktivität umfangreiche zelluläre Antworten. Die Kristallstruktur von C3-Protein aus *Clostridium botulinum* ist aufgeklärt und zeigt eine nierenförmige Raumstruktur, die aus einer Mischung aus α -Helices und β -Faltblättern gebildet wird. Der Austausch von Glu-174 führt zu einer Abnahme der Enzymaktivität um den Faktor 10.000 (Wilde et al., 2002b).

Durch den Austausch von der katalytischen Aminosäure Glutamat an Position 174 gegen Alanin bzw. Glutamin (C3bot E174A, Q) wurde zwei komplett enzymatisch inaktive Mutanten von C3bot hergestellt. Mit Hilfe dieser Mutanten wurde Rho-

abhängige/ unabhängige Effekte an den Primärkulturen der Hippokampus sowie Astrozyten untersucht.

2 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen verschiedene Parameter sich entwickelnder Neuronen unter dem Einfluss von Vertretern zweier unterschiedlicher Substanzgruppen, Deltamethrin und C3-Exoenzym aus *Clostridium botulinum* und seinen Isoformen untersucht werden.

Es sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflusst Deltamethrin die Überlebensfähigkeit von Neuronen?

Gibt es hierbei Unterschiede zwischen Neuronensubgruppen?

Welche Effekte hat Deltamethrin auf die Synthese synaptischer Proteine und das Verteilungsmuster von spannungsabhängigen Kaliumkanälen?

2. Welche Effekte haben C3-Exoenzyme aus unterschiedlichen Bakterienstämmen auf die Entwicklung hippocampaler Neuronen?

Sind diese Effekte nur auf hippocampale Neuronen beschränkt?

Welche Rolle spielen Rho-Proteine dabei?

Welche Effekte haben die C3-Exoenzyme auf die gliale Zellen?

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid Stammlösung (30%)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumnickelsulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Apo-Transferrin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Aprotinin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
APS (<i>Ammoniumpersulfat</i>)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Aqua bidest (<i>Tissue culture tested</i>)	Sigma (München, Deutschland)
B27 Supplement	Gibco Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
BCA (<i>Bicinchonic Acid Solution</i>)	Sigma (St. Louis, USA)
Bisacrylamid Stammlösung (30%)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma (München, Deutschland)
BSA (<i>Bovine serum albumine</i>)	Sigma (St. Louis, USA)
DAB (<i>Diaminobenzidin</i>)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
DMEM („ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> “)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
DMEM / HAM's F12	Biochrom (Berlin, Deutschland)
DMSO (<i>Dimethylsulfoxid</i>)	Sigma (München, Deutschland)
EDTA (<i>Ethylendiamintetraacetat</i>)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
EGTA (<i>Ethylenglycoltetraacetat</i>)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Epon 812	Fluka (Buchs, Schweiz)
Epon Accelerator DMP30	Fluka (Buchs, Schweiz)
Epon Hardener DDSA	Fluka (Buchs, Schweiz)
Epon Hardener MNA	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glukose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glukosemonohydrat	Sigma (München, Deutschland)
Glutamin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Glutaraldehyd (70%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

HEPES (<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazine- <i>N</i> -2-ethansulfonic acid)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
HPMA (<i>Hydroxypropylmethacrylate</i>)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Hybond C (<i>Nitrozellulose Membran</i>)	Amersham (Buckinghamshire, England)
Immidazol	Sigma (München, Deutschland)
Immunomount	Shandon (Cheshire, England)
Insulin	Sigma (München, Deutschland)
Kaisers-Glycerin-Gelatine	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kälberserum, fötales	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kalziumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kollagen	Sigma (München, Deutschland)
Lipofectin	Gibco Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
LMW (<i>Low Molecular Weight Marker</i>)	Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Marvel-Milchpulver	Nestlé Deutschland AG (Frankfurt, Deutschland)
Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Methanol	Baker (Deventer, Niederlande)
Mowiol	Hoechst (Frankfurt, Deutschland)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumazid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumborhydrid	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumcacodylat	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Natriumpyruvat	Sigma (München, Deutschland)
Natriumthiosulfat	Sigma (München, Deutschland)
NBM (<i>Neurobasal Medium</i>)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
NGS (<i>Normal-goat-serum</i>)	Vector (Wiesbaden, Deutschland)
NHS (<i>Normal-horse-serum</i>)	Vector (Wiesbaden, Deutschland)
OptiMEM	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Osmiumtetroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicilin / Streptomycin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Phenylhydrazin	Sigma (München, Deutschland)
PIPES (<i>Piperazine-N,N'-[2-ethansulfonic acid]</i>)	Sigma (St.Louis, USA)
PMSF (<i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Poly-L-Lysin	Sigma (München, Deutschland)
Ponceau S	Sigma (St.Louis, USA)
Saccharose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Saponin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
SDS (<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate</i>)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
TEMED	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Thimerosal	Sigma (München, Deutschland)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Hydroxymethylaminomethan	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Triton X-100	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tween-20 (<i>Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate</i>)	Sigma (München, Deutschland)
Uranylacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Sigma (München, Deutschland)

3.2 Puffer und Lösungen

3.2.1 Puffer

PBS (phosphate buffered saline) 10x

115 g	Na ₂ HPO ₄
20 g	KH ₂ PO ₄
20 g	KCl
800 g	NaCl

auf 1 Liter mit dH₂O auffüllen, pH 7,4 einstellen.

Phosphatpuffer 10x

3,8 g	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
12 g	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
87,8 g	NaCl

auf 1 Liter mit dH₂O auffüllen, pH 7,4 einstellen

3.2.2 Lösungen zur Immunocytochemie

Antikörperverdünner (AKV)

0,5% w/v	BSA
0,05% w/v	NaN ₃ in PBS, pH 7,3 einstellen

Vorinkubationslösung

500 µl	Tris (Stocklösung= 1 M) in 9,5 ml dH ₂ O
100 µl	Immidazol (Stocklösung= 1 M)
100 µl	DAB-Lösung (Stocklösung= 50 mg/ml)

Inkubationslösung

500 µl	Ammoniumnickelsulfat (3%) in 5 ml Vorinkubationslösung
250 µl	H ₂ O ₂ (0,3%)

3.2.3 Lösungen für Proteinaufarbeitung, Elektrophorese und Westernblot

Proben-Lade-Puffer (3x)

2,3 g	Tris-HCl
6 g	SDS
30 g	Saccharose
2 mM	EGTA
1 mM	PMSF

auf 100 ml mit dH₂O auffüllen

BCA (Bicinchoninsäure)

50 Teile	Lösung A (Natriumcarbonat, BCA-Nachweisreagenz, Tartrat in 0,1% NaOH)
1 Teile	Lösung B (4% CuSO ₄ *5H ₂ O)

Trenngelpuffer (4x)

181,7 g	Tris
4 g	SDS

auf 1 Liter mit dH₂O auffüllen, pH 8,8 einstellen

Sammelgelpuffer (4x)

60,5 g	Tris
4 g	SDS

auf 1 Liter mit dH₂O auffüllen, pH 6,8 einstellen

Elektrophoresepuffer (10 X)

30 g	TRIS
144 g	Glycin
10 g	SDS

auf 1 Liter mit dH₂O auffüllen, pH 8,3 einstellen

Transferpuffer (Semi Dry)

48 mM	Tris
385 mM	Glycin
3,7 g/ml	SDS 10%
200 ml	Methanol
	auf 1 Liter mit dH ₂ O auffüllen

Ponceau-S Lösung

0,5% w/v	Ponceau-S
3% v/v	Trichloressigsäure

Tris-Puffer (TBS)

6,1 g	Tris
38,9 ml	HCl 1N
8,8 g	NaCl
	auf 1 Liter mit dH ₂ O auffüllen, mit 32% HCl auf pH 7,6 einstellen

Block-Lösung für Immunoreplika-Analyse

2,5 g	Magermilchpulver
50 µl	Tween- 20
100 ml	TBS

Antikörperverdünnungslösung für Immunoreplika-Analyse

1,5% w/v	BSA in TBS Puffer
----------	-------------------

DAB-Lösung

500 µl	Diaminobenzidin (Stock = 2,5mg/ml)
4500 µl	Tris-HCl
4 µl	H ₂ O ₂ 30%

3.2.4 Lösungen für die elektronenmikroskopischen Untersuchung

Cacodylatpuffer (0,2 M)

42,8 g Natriumcacodylat in 1 Liter dH₂O, pH 7,2 einstellen

Eponmischung

10,7 g Epon 812
7,8 g DDSA
6,5 g MNA
0,5 g Eponbeschleuniger

3.3 Medien für die Zellkultur

Kulturmedium für die hippocampale Primärkulturen (NBM-Medium)

500 ml NBM
10 ml B27 Supplement
5 ml Penicillin / Streptomycin (PS)
1,25 ml L-Glutamin (200 mM)

N-Medium

425 ml DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“)
50 ml fötales Kälberserum
5 ml Penicillin / Streptomycin (PS)
5 ml L-Glutamin (200 mM)
1,25 ml Insulin
5 ml HEPES
4 g Glucose

3.4 Versuchstiere

Zum Anlegen hippocampaler Primärkulturen wurde 17 Tage alte Embryonen von NMRI Mäusen verwendet. Am 17. Gestationstag wurde die tragende Maus durch Dekapitation getötet und die Embryonen entnommen. Die Betreuung der Tiere bis zum Versuchstag erfolgte im Tierversuchsstall des Anatomischen Institutes der

Charité. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Genickbruch und unterlag der Aufsicht des Tierschutz-beauftragten der Charité und des Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit.

3.5 Verwendete Substanzen, C3 Exoenzyme und DNA-Konstrukte

Substanzen	Bezugsquelle
Deltamethrin $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	Institut für organische Chemie, Warschau, Polen
C3 Exoenzym aus Clostridium botulinum $C3^{bot}$, gereinigt	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
C3 Exoenzym aus Clostridium botulinum $C3^{bot}$, gereinigt, kommerziell	Calbiochem, La Jolla, CA
C3 Exoenzym aus Clostridium limosum, $rC3^{lim}$	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
C3 Exoenzym aus Staphylococcus aureus (HM16) $rC3^{stau2}$	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
$rC3^{bot}$ Exoenzym aus Clostridium botulinum, rekombinant	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
$rC3^{bot}$ -E174 A Exoenzym aus Clostridium botulinum, rekombinant, enzymatisch inaktiv	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
$rC3^{bot}$ -E174 Q Exoenzym aus Clostridium botulinum, rekombinant, enzymatisch inaktiv	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
Leervektor -Vector pEGFP	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische

	Hochschule, Hannover
Rho A ^{V14} -Vector pEGFP	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
Rho A ^{wt} -Vector pEGFP	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
Rho A ^{N19} -Vector pEGFP	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
C3 ^{bot wt} -Vector pEGFP	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
C3 ^{stau2 wt} -Vector pEGFP	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover
C3 ^{stau2} -E172Q -Vector pEGFP enzymatisch defiziente Mutante	Prof. Dr. Ingo Just, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule, Hannover

3.6 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnug	Bezugsquelle
Calbindin monoklonal, Maus	1:1000	Sigma , St. Louis, USA
Calcineurin B-subunit, polyklonal, Kanninchen	1:1000	Swant, Bellinzona, Schweiz
Calretinin	1:1000	Swant, Bellinzona, Schweiz

Polyklonal, Kanninchen		
GFAP monoklonal, Maus	1:4	Boeringer, Mannheim, Deutschland
Kv 1,1 und Kv 1,2 α -Untereinheiten der Kv 1,1 und Kv 1,2 Kanal, polyklonal, Kanninchen	1:500	Prof. Dr. R. Veh, Institut für Anatomie, Charité, Berlin, Deutschland
MAP 2 Mikrotubule-associated protein 2, monoklonal, Maus	1 :600	Boeringer, Mannheim, Deutschland
NFP 160 Neurofilament protein 160 kDa, monoklonal, Maus	1:4	Chemicon, Temecula, USA
NFP 200 Neurofilament protein 200 kDa, monoklonal, Maus	1:4	Chemicon, Temecula, USA
NPY Neuropeptide Y, polyklonal, Kanninchen	1:100	Amersham, Buckinghamshire, UK
SNAP25 Synaptosomal associated protein 25 kDa monoklonal, Maus	1:1000	Sternberger Monoclonals, Baltimore, USA
Somatostatin polyklonal, Kanninchen	1:2000	Camon, Wiesbaden, Deutschland
Synapsin polyklonal, Kanninchen	1:500	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Synaptobrevin, clone 69.1 monoklonal, Maus	1:2000	Synaptic Systems Göttingen, Deutschland
Synaptophysin, clone G96 polyklonal, Kanninchen	1:1000	Synaptic Systems Göttingen, Deutschland

Sekundäre Antikörper

Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase-gekoppelt	1:500	Vector Laboratories, Wiesbaden, Deutschland
--	-------	--

Pferd anti-Maus IgG CY2-konjugiert	1:500	Vector Laboratories, Wiesbaden, Deutschland
Ziege anti-Kaninchen IgG Texas Red-gekoppelt	1:500	Jackson Laboratories, Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Maus IgG Oregongreen-gekoppelt	1:100	Molekular probes, MoBiTec Eugene, Niederlande
Ziege anti-Kaninchen IgG CY3-konjugiert	1:300	Chemicon, Temecula, USA

3.7 Durchführung der Experimente

3.7.1 Anlegen der hippokampalen Primärkulturen

Sämtliche Arbeitsschritte der Präparation, Kultivierung und Behandlung der Zellen wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Die tragenden Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Embryonen wurden entnommen und unter sterilen Bedingungen dekapitiert. Unter der Stereolupe wurden jeweils die Kopfhaut entfernt, die Kallote eröffnet und das Gehirn entnommen. Die Präparation der Hippocampi erfolgte bei 16 facher Vergrößerung in 0,6%iger Glucose-PBS Lösung auf Eis.

Für die weitere Verarbeitung der Hippocampi wurden der Glucose-PBS Lösung 5%iges fötales Kälberserum zugesetzt. Nach mechanischer Zerkleinerung wurden die Zellen 1-2 min mit 700 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellsediment in NBM-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt, und die Zellsuspension mit NBM-Medium auf eine Endkonzentration von 20.000 bis 150.000 Zellen /200µl und pro well verdünnt.

Die Aussaat erfolgte in Kulturschälchen mit Deckgläschen, deren Oberfläche vorher mit steriler 5% iger Poly-L-Lysin Lösung in PBS für 24h bei RT beschichtet wurde. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und mit 1%iger Kollagen in N-Medium nochmals beschichtet.

Die Zellen wurden bei 37°C und 10% CO₂ in einem Brutschrank bis zu drei Wochen in vitro (DIV 21) kultiviert. Während der Kultivierung erfolgte wöchentlich ein Mediumwechsel, wobei jeweils die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ohne Serumzusatz ersetzt wurde.

3.7.2 Nachweis von Proteinen mittels Westernblot

Für den quantitativen Nachweis der Proteine wurden Homogenate der Zellkulturen verwendet. Mit Probenladepuffer (siehe Seite 17) wurden die Neurone vom Boden des Kulturschälchens gelöst, abgesaugt, mit Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat für 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht, um die Proteasen zu zerstören. Aus dem proteinhaltigen Überstand wurde eine Probe zur Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen.

3.7.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Protein-Konzentration erfolgte mit der Bicinchoninsäure (BCA) Methode nach Smith et al. (1985). Über Verdünnungsreihen wurde eine Standard-Kurve von 50 bis 400 µg / ml BSA hergestellt. BSA wurde in Probenladepuffer angesetzt.

Die Standardwerte sowie die Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen in Duplikaten in die Löcher einer 96-Loch Mikrotiter Platte (20µl / Loch) pipettiert. Dazu wurden pro Loch 200 µl der BCA Reaktionslösung gegeben (eine Mischung aus Lösung A und B im Verhältnis 50:1). Die Mikrotiter Platte wurde dann für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Platte für 10 min zum Abkühlen stehen gelassen, bevor die Absorbtion bei 550 nm in einem Elisa-Reader gemessen wurde. Die Protein-Konzentration der Proben wurde anhand der Standardkurven bestimmt.

3.7.2.2 Protein-Gelelektrophorese und Immunoreplika-Analyse

Die Proteine des Homogenates wurden elektrophoretisch in einem denaturierenden Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel-System (SDA-Page) nach der Methode von

Laemmli(1970) aufgetrennt. Es wurden 12%ige Gel verwendet und pro Geltasche ca. 15µl Protein-Puffer-Gemisch aufgetragen.

Dazu wurde das Homogenat vor dem Aufbringen auf das Gel mit einigen Tropfen Bromphenolblau angefärbt und nach Zugabe von Mercaptoethanol 1:20 (5µl Mercaptoethanol zu 95 µl Protein-Puffer-Gemisch) nochmals 5 min bei 95°C inkubiert. Standard Marker-Proteine, LMW (Low molecular weight marker) von 14,4 bis 94 kDa wurden mit aufgetragen.

Zusammensetzung der Gele:

Trenngel 12%

Trenngel Puffer	1 ml
Acrylamid Stammlösung	1,6 ml
Bisacrylamid Stammlösung	0,64 ml
H ₂ O	0,76 ml
TEMED	2,6 µl
10% Ammoniumpersulfat	40 µl

Sammelgel 3,75%

Sammelgel Puffer	500 µl
Acrylamid Stammlösung	250 µl
Bisacrylamid Stammlösung	100 µl
H ₂ O	1150 µl
TEMED	5 µl
10% Ammoniumpersulfat	40 µl

Die Elektrophorese wurde bei 20 mA / Gel für ca. 90 min in der BIO-RAD-Kammer durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch ca. 20 min bei Stromstärke 300 mA / Gel im „semi-dry“ Verfahren in einer Bio-Rad Trans Blot ® SD Kammer unter Verwendung von „semi-dry“ Puffer vom Gel auf Hybond C Nitrozellulose Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran in Ponceau-S Lösung gebracht, um die Marker-Proteine sowie andere vorhandene

Proteine sichtbar zu machen. Überschüssiges Ponceau-S wurde mit H₂O abgewaschen und die Membran getrocknet.

Die Membran wurde anhand der Marker-Proteine mit dem Skalpell in Streifen geschnitten, mit einem Bleistift markiert und für 1 Stunde bei RT mit Block-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Membranstreifen 3x für 15 min in TBS-Tween gewaschen. Dann folgte die Behandlung mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper bei RT für 2 Stunden. Die Membranstreifen wurden dann 3x für 5 min in TBS-Tween gewaschen, anschließend mit Tris-HCl gespült. Alle Inkubations- und Wasch-Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Durch direkte Zugabe von DAB-Lösung und H₂O₂ wurden die Proteinbanden dargestellt.

3.7.3 Nachweis von Proteinen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene

3.7.3.1 Immunzytochemie

Das den verschiedenen immunzytochemischen Nachweismethoden zugrunde liegende Prinzip basiert auf spezifischer Bindung eines Primärantikörpers an das entsprechende Antigen. Die Darstellung dieses Antigen-Antikörper-Komplexes wird entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper nachgewiesen, oder durch ein an einen Sekundärantikörper gebundenes Avidin, das über Biotin mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, nachgewiesen.

Bei der Fluoreszenzmethode dienen an den Sekundärantikörper gekoppelte fluoreszierende Chromogene zum Nachweis der an das Antigen gebundenen Primärantikörper.

Zunächst wurde mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen 15 min bei RT in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Die fixierten Zellen wurden dann 3x für 5 min mit PBS gewaschen, anschließend mit 0,3% Triton x-100 für 5 min permeabilisiert. Die Zellen wurden wieder 3x für 5 min mit PBS gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen ca. 30 min mit serumhaltiger PBS 2% der Spezies, in der der Sekundärantikörper hergestellt wurde, inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in Antikörperverdünner erfolgte für 24 h bei 4°C in einer feuchten

Kammer. Im Anschluß daran wurden die Zellen 3x für 5 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h bei RT in der abgedunkelten feuchten Kammer. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimalige waschen (5 min) mit PBS entfernt. Durch Aufbringen der Zellkultur-präparate (Deckgläschen) auf Objektträger mit Immunomount (Fa. Shandon) wurden dauerhafte mikroskopische Präparate angefertigt.

Entsprechend der Herkunft der Primärantikörper wurden für polyklonale, aus Kaninchen stammende Primärantikörper (Kv 1,1 und Kv1,2), biotinylierte Sekundärantikörper (anti-rabbit) genutzt, und anschließend mit Texasred-markiertem Avidin dargestellt. Zur Sichtbarmachung von monoklonalen, Primärantikörpern (MAP 2, NFP 200, GFAP usw.) diente ein direkt farbstoffgekoppelter Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus CY-2 gekoppelt, Ziege-anti-Maus Oregon Green gekoppelt). Zudem ermöglichte die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Wellenlängen eine Doppelmarkierung (Texasred Emission bei 615 nm und Absorption bei 595 nm, CY-2 Emission bei 520 nm und maximale Absorption bei 496 nm).

Ausgewertet wurden die Färbungen mit einem Leica DMLB Epifluoreszenz-Mikroskop. Die Bilder wurden mit einer SPOT Kamera der Firma INTAS, Göttingen, digital aufgenommen.

3.7.3.2 Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung der Ultrastrukturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Neurone nach der Behandlung mit C3-Exoenzym für die elektronenmikroskopische Aufnahmen vorbereitet.

Die hippocampale Primärkulturen (mit C3-Exoenzym behandelte und unbehandelte) wurden zuerst mit 1%iges Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für 30 min bei RT fixiert. Mit 1% OsO₄ wurden die Zellen für 25 min kontrastiert, anschließend je 3x in 50% und 70% Alkohol gewaschen. Dann wurden die Proben für 10 min bei 4°C mit 2% Uranylacetat nachkontrastiert und anschließend in 70% Alkohol gewaschen. Die vollständige Schnellentwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95% und 100% Alkohol), die Einbettung in vier Schritten je 15 min mit steigender Epon 812 Konzentration: zunächst in einer Eponmischung aus 2 VT (Volumenteilen) HPMA und 1VT Epon, gefolgt von einer Einbettung in einer Mischung aus je 1 VT

HPMA und Epon, dann in 1VT HPMA und 2 VT Epon und schließlich 5 min in reinem Epon.

Nach Polymerisation bei 60°C wurden die in Epon eingebetteten Kulturen mittels Sekundenkleber auf Eponblöckchen geklebt. An einem Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte angefertigt und diese auf Nickelgrids aufgezogen. Anschließend wurden die hergestellten Präparate nochmals je 3 min mit einer Lösung aus 4%

Uranylacetat und 0,2% Bleicitrat nachkontrastiert. Die Präparate wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 900) der Firma Zeiss untersucht.

3.7.4 Transfektion

Transfektion von hippokampalen Neuronen

Die Zellen wurden mit der DNA des jeweiligen GFP-markierten Konstruktes transient transfiziert. Dazu wurden die Neuronen in 35 mm Kulturschalen auf Glasplättchen bis zu 5 Tagen kultiviert. Es wurde eine DNA-Liposomen (Effektene) Mischung hergestellt. Hierzu wurden zuerst 88µl Puffer (mit Effektene mitgeliefert), 0,8 µg DNA und 4µl Enhancer gemischt, 5 min bei RT inkubiert, dann wurden 10µl Effektene zugesetzt und weitere 10 min bei RT inkubiert. Zur Transfektion wurde 250µl Medium (je well) abgenommen und aufgehoben, 250µl frisches Medium zugegeben. Dazu wurde die DNA/Effektene-/Mischung zugesetzt und 1h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 250µl Medium abgenommen und 250µl frisches Medium zugegeben. 250µl Medium wurde nochmals abgenommen und 250µl aufbewahrtes („konditioniertes“) Medium zugesetzt, und die Kulturen wurden ca. 20h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, in Mowiol auf Objektträgern eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.7.5 Morphometrische Messungen

Zur Ermittlung der Axonlänge, Axonverzweigungen, Zellkörperfläche sowie Länge der Gliafortsätze wurde eine Computer gestützte Analyse der mit Hilfe der Spot Kamera fotografierten Neuronen verwendet. Mittels NeuroLuzida-Software wurden die Neuronen gemessen und über die Neuroexplorer-Software ausgewertet. Die erhaltenen Daten dann in MS-Excel aufbereitet, anschließend statistisch ausgewertet.

Für die Stichprobenvergleiche wurde der t-Test bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ verwendet.

3.8 Verwendete Geräte

Tischzentrifuge MLW T54

Ultraschall-Homogenisator (Bandelin, Berlin)

Dynatech MR 500 Elisa Reader (Dynatech)

Leica DMLB Epifluoreszenz-Mikroskop mit Durchlichteinrichtung

SPOT Kamera (INTAS, Göttingen)

Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Oberkochen)

Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)

Power Pac 200 Netzgerät (Bio-Rad)

Mini-Protean[®] II Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad)

4 Ergebnisse

4.1 Primärkulturen des Hippokampus

Für die morphologisch-quantitativen Untersuchungen wurden primär dissoziierte Zellkulturen aus dem Mäusehippokampus angelegt. Die Vereinzelung der Zellen (Dissoziation des Gewebes) erfolgte mechanisch durch vorsichtiges Pipetieren. Dabei reißen alle Zellfortsätze ab und die Zellen sind bei der Aussaat fortsatzlos und abgerundet. Die intakten Perikarya bilden nach der Aussaat zuerst Lamellipodien (Stadium 1) und später neue Fortsätze (Stadium 2). Im Stadium 3 differenziert einer der Fortsätze zum Axon. Diese wachsen schneller als Dendriten. In späteren Stadien (Stadium 5) bilden die Dendriten und Axone ein weit verzweigtes Fasernetz (Dotti et al., 1988). Die nach der Aussaat vorhandene neuronale Zelldichte in den Kulturen reduziert sich in den ersten Tagen der Entwicklung. Verantwortlich dafür sind zum einen Beschädigungen der Zellen durch die Dissoziation und zum anderen intrinsische Apoptose-Mechanismen.

In hippokampalen Primärkulturen sind neben Gliazellen und Bindegewebszellen hauptsächlich zwei neuronale Zelltypen, pyramidale Neuronen und Körnerzellen zu beobachten. Sie können aufgrund von Größe und Form unterschieden werden. Bereits nach 6 Tagen DIV (*days in vitro*) 6 sind die Neuronenfortsätze gut entwickelt und lassen sich messen.

4.2 Effekte von Deltamethrin auf hippokampale Neuronen

Um die Wirkung des Deltamethrins auf Wachstum und Entwicklung hippokampaler Neuronen zu untersuchen, wurde Deltamethrin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Neuronenkulturen gegeben. So wurden für Langzeiteffekte unterschiedliche Deltamethrinmengen (2nM-2µM Endkonzentration) zweimal pro Woche dem Medium zugesetzt und die Neuronen bis zu DIV17 oder 21 kultiviert. Anschließend wurden die Neuronen fixiert, mit anti-MAP2 markiert und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Abbildung 6 zeigt Kontrollkulturen und mit 200nM Deltamethrin behandelte Kulturen. Die Abnahme der Zellenzahl ist deutlich zu sehen.

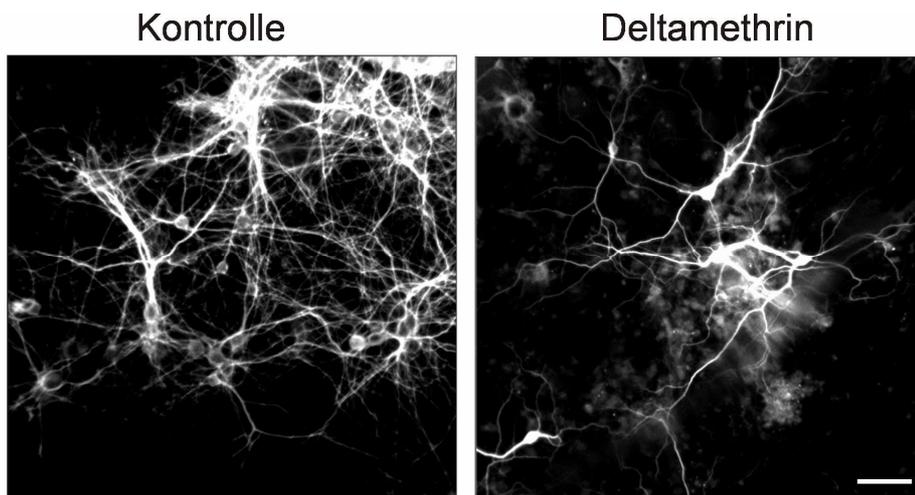


Abbildung 6

Deltamethrin reduziert die Anzahl hippocampaler Neuronen in Kultur

Hippokampale Primärkulturen wurden bis zu DIV18 kultiviert, (ab DIV6 wurden sie zweimal pro Woche mit Deltamethrin (200nM) behandelt) fixiert und mit dem primären Antikörper MAP2 markiert. Die mikroskopischen Aufnahmen der mit Deltamethrin behandelten Neuronen und der unbehandelten Kontrollneuronen sind hier gegenübergestellt. Die Anzahl der Neuronen ist nach der Deltamethrinbehandlung im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Der Maßstab beträgt 60µm.

Bei den morphologischen Untersuchungen wurde eine verminderte Überlebensfähigkeit beobachtet und diese dann anschließend quantifiziert. Hierzu wurden die Neuronen nach der Deltamethrinbehandlung (einmalige und wiederholte Applikationen) gezählt. Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigt die unten angegebene Tabelle (Tabelle 1).

Tabelle 1

Überlebensrate von Neuronen nach der Deltamethrin-Behandlung

Hippokampale Neuronen wurden kultiviert, die einmalige Applikation von Deltamethrin (20nM, 200nM und 2µM) erfolgte nach DIV5, die Neuronen wurden am DIV18 fixiert; bei der mehrmaligen Applikation (20nM, 200nM und 2µM) erfolgte die Deltamethrinbehandlung mit den angegebenen Konzentrationen zweimal wöchentlich. Die Kulturen wurden am DIV18 fixiert und mit dem primären Antikörper gegen MAP2 markiert. Ausgehend von der Mitte des Deckgläschens wurden die MAP2 positiven Neuronen in 7 Arealen (4,75mm²) von mindestens 3 Deckgläsern pro Versuch ausgezählt. Es wurden 3-5 Präparationen ausgezählt und mittels Student's t-Test die Signifikanz ermittelt.

Einmalige Applikation		Mehrmalige Applikation	
Behandlung	Anzahl der Neuronen	Behandlung	Anzahl der Neuronen
Kontrolle	537± 49	Kontrolle	467± 56
20nM DM	477± 48	20nM DM	402± 15; (p<0,03)
200nM DM	408± 54; (p<0,03)	200nM DM	287± 9; (p<0,03)
2µM DM	375± 61; (p<0,03)	2µM DM	314± 8; (p<0,03)

Es konnte eine signifikante Abnahme der Neuronenanzahl von 16% bei 20nM und von 40% bei 2µM Deltamethrin in drei verschiedenen Ansätzen festgestellt werden. Diese Effekte wurden unabhängig von der Häufigkeit der Applikation beobachtet. Eine größere Anzahl von Neuronen reagierte offensichtlich nicht auf die Behandlung mit Deltamethrin. Jedoch scheint es in hippokampalen Kulturen Subpopulationen von Neuronen zu geben, die auch auf niedrige Deltamethrinkonzentrationen empfindlich reagieren. Das Alter der Embryonen (E16, E17 oder E18) scheint keinen Einfluß auf die Effekte von Deltamethrin in hippokampalen Kulturen zu haben.

4.2.1 Effekte von Deltamethrin auf synaptische Proteine und spannungsabhängigen Kaliumkanälen

Um differentielle Effekte von Deltamethrin in neuronalen Kulturen nachzuweisen, wurde die Expression von exozytoserelevanten Proteinen und Kaliumkanälen der Kv1-Familie sowie ihre axonale oder dendritische Verteilung in der Kultur untersucht. Dazu wurden die Untereinheiten der Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv1.2, Synaptophysin, Synapsin, Neurofilamentprotein 200 (NFP200), SNAP25 und Synaptobrevin mit und ohne Deltamethrin-Behandlung verglichen. Sie dienten als Parameter für die Funktionsfähigkeit der Neuronen. Abbildung 7 zeigt die mikroskopische Aufnahme der synaptischen Kontakte der unbehandelten Kontrolle sowie nach der Behandlung mit Deltamethrin, nachgewiesen mit einem Antikörper gegen Synapsin (rot) und NFP 200 (grün).

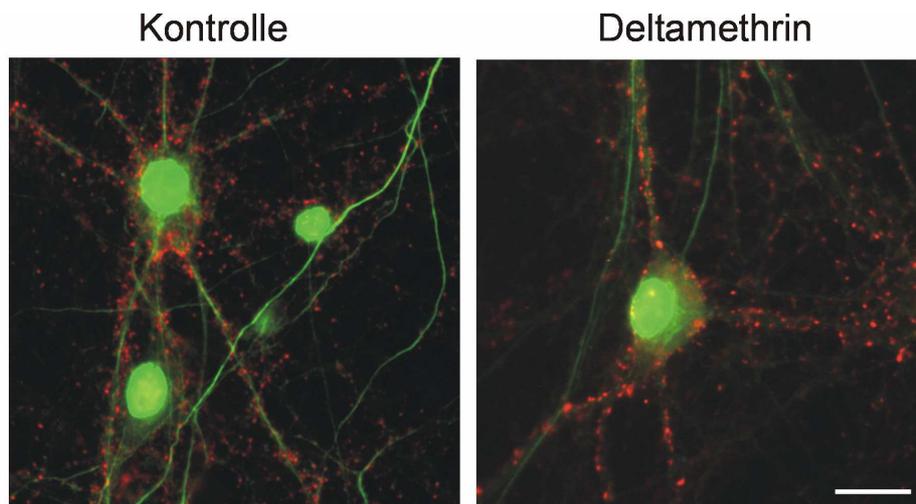


Abbildung 7

Effekte von Deltamethrin auf synaptische Kontakte

Hippokampale Primärkulturen (DIV17) wurden ab DIV6 zweimal pro Woche mit Deltamethrin (200nM) behandelt. Die Neuronen wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper gegen NFP200 (grün) und die synaptischen Kontakte mit dem primären polyklonalen Antikörper gegen Synapsin (rot) markiert und fotografiert. Die mikroskopischen Aufnahmen der mit Deltamethrin behandelten Neuronen und ihrer synaptischen Kontakte sowie die unbehandelten Kontrollneuronen sind hier gegenübergestellt. Die synaptischen Kontakte sind nach der Behandlung mit Deltamethrin noch vorhanden, jedoch reduziert. Der Maßstab beträgt 20µm.

Bei der Analyse der synaptischen Kontakte ergab sich, dass trotz wiederholter Gabe von Deltamethrin (200nM und 2µM, Abbildung 3) immer noch synaptische Kontakte vorhanden waren. Für die Quantifizierung der synaptischen Kontakte wurden Pyramidenzellen mit mindestens fünf Fortsätzen einbezogen und ihre synaptischen Kontakte angefangen vom Perikaryon entlang der Fortsätze über eine Länge von 20 µm gezählt. Die Anzahl der synaptischen Kontakte war nach der Deltamethrin-Behandlung im Gegensatz zur Kontrolle stark reduziert (ca.60%). Der Student's t-Test ergab gegenüber der Kontrolle einen Signifikanzwert von $p < 1,5E-7$.

Als weiteres Schädigungsmerkmal wurden die Verteilungsmuster der alpha-Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle nach Deltamethrinbehandlung betrachtet.

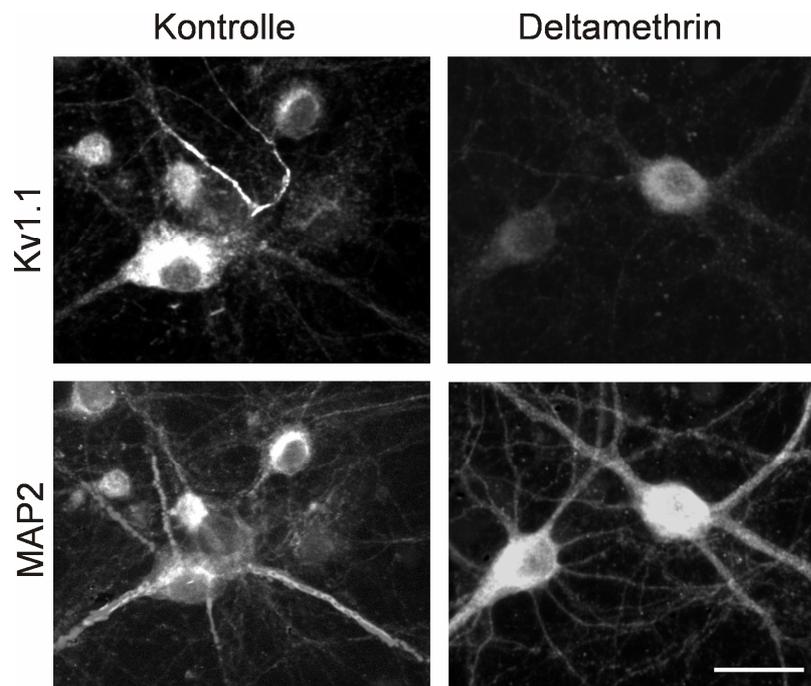


Abbildung 8

Effekte von Deltamethrin auf die Expression der α - Untereinheit des Kv1.1 Kanals

Hippokampale Primärkulturen DIV17 wurden kultiviert und ab DIV6 zweimal pro Woche mit Deltamethrin (200nM) behandelt. Die neuronalen Perikarya und Dendriten wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper gegen MAP2 (grün, unten) und die Kv1.1 Kanal α -Untereinheit mit dem primären polyklonalen Antikörper gegen Kv1.1 (rot, oben) markiert und fotografiert. Die Expression von Kv1.1 Kanal α -Untereinheit ist sowohl in Dendriten als auch in Axonen unter Deltamethrinbehandlung im Gegensatz zur Kontrolle reduziert. Der Maßstab beträgt 20 μ m.

Die Behandlung mit 200nM Deltamethrin reduzierte die Expression der α -Untereinheit des Kv1.1 Kanals in Dendriten (markiert mit anti-MAP2) und in Axonen (Abbildung 8). Die dendritische Morphologie bleibt jedoch erhalten. Es wurden zudem Kaliumkanalproteine und synaptische Proteine (Synaptophysin, Synaptobrevin, Synapsin und SNAP25) mittels Immunoreplika-Analyse nach Gabe unterschiedlicher Deltamethrinkonzentrationen untersucht. Die Immunoreplika-Analyse (Abbildung 9) zeigt die obengenannten Proteine sowie die Kaliumkanalproteine nach Gabe unterschiedlicher Deltamethrinkonzentrationen.

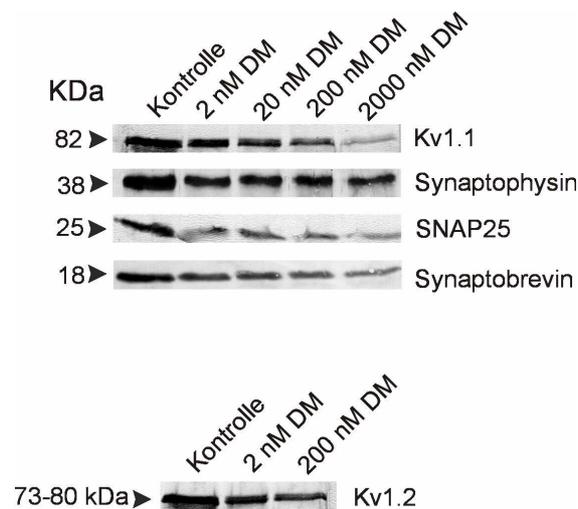


Abbildung 9

Immunoreplika-Analyse der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin, SNAP25 und Synaptobrevin sowie der von α -Untereinheiten der Kv1.1 und Kv1.2 Kanäle

Hippokampale Primärkulturen wurden bis zu DIV17 kultiviert, ab DIV6 wurden sie zweimal pro Woche mit unterschiedlichen Konzentrationen von Deltamethrin behandelt. Dann wurden die Neuronen abgelöst, homogenisiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und mit entsprechenden Antikörpern inkubiert.

Alle untersuchten synaptischen Proteine sind in Deltamethrin behandelten Kulturen reduziert vorhanden (siehe Synapsenzählung). Die beobachtete Reduzierung der synaptischen Proteine sowie der Kaliumkanalproteine in der Immunoblotanalyse wurden densitometrisch vermessen und quantifiziert (Tabelle 2).

Tabelle 2

Densitometrische Analyse der Immunoblots

Die Immunoblots (Abbildung 4) wurden unter Video Imaging aufgenommen und die Proteinbanden unter Verwendung von SCAN PACK 3.0 Programm densitometrisch gemessen. Die Kontrollen wurden als 100% definiert. Die Ergebnisse zeigen die Reduzierung der synaptischen Proteine und der Kaliumkanäle nach Deltamethrinbehandlung.

Deltamethrin	% bezogen auf Kontrolle				
	Synaptophysin	Synaptobrevin	SNAP25	Kv 1,1	Kv 1,2
2nM	76	65	66	75	79
20nM	74	56	47	57	
200nM	75	42	39	36	55
2 μ M	68	30	28	20	

Die Mengen aller untersuchten synaptischen Vesikelproteine sowie die Kv1 Kanal α -Untereinheiten sind in Deltamethrin behandelten Kulturen reduziert vorhanden. Die Gabe von 2nM Deltamethrin bewirkte bei allen untersuchten Proteinen eine Reduzierung von 21% bis 35%. Nach 200nM Deltamethrinbehandlung wurde eine 25%iger Abnahme von Synaptophysin und eine 64%iger Abnahme bei Kv1.1 gemessen. Die wiederholte Gabe von 2 μ M Deltamethrin verursachte eine stärkere Reduzierung synaptischer Vesikelproteine von 32% bis 72% im Vergleich zur Kontrolle.

Zudem wurde eine starke Abnahme der Kv1 Kanal α -Untereinheiten Kv1.1 (25% bis 80%) und Kv1.2 (21% bis 45%) gemessen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Synaptophysin gegenüber einer Deltamethringabe relativ resistent ist und Kv1 Kanal α -Untereinheiten speziell Kv1.1 sehr sensibel reagieren (Abbildung 8, Tabelle 2). Die SNARE-Proteine reagieren empfindlicher als Synaptophysin auf Gabe der Deltamethrinbehandlung (Tabelle 2). Die Reduzierung der synaptischen Proteine korreliert mit der Verringerung der Synapsenzahl.

4.2.2 Effekte von Deltamethrin auf Neuronensubgruppen

In hippocampalen Kulturen werden zwei Hauptneuronentypen, Pyramidenneuronen und Körnerzellen, unterschieden (Große et al., 2000). Außer diesen beiden glutamatergen Neuronentypen, kommen im Hippokampus noch inhibitorische GABAerge Neuronen vor. Ca^{2+} -bindende Proteine Calretinin und Calbindin werden sowohl in Subpopulationen der glutamatergen als auch in GABAergen Neuronen exprimiert. Calbindin kommt sowohl in glutamatergen Körnerzellen als auch in Subpopulation der pyramidalen Neuronen in der CA1 Region und in inhibitorischen Neuronen vor. Peptiderge Transmitter wie Somatostatin und NPY werden in Subpopulationen einiger GABAerger Neuronen exprimiert.

In unseren Versuchen wurden toxischen Einflüsse von Deltamethrin auf neuronales Überleben zwischen Deltamethrinkonzentration von 2nM und 2 μ M beobachtet (siehe oben). Trotz hoher Deltamethrinkonzentration überlebten eine große Anzahl der Neuronen (ca.70%), die typische neuronale Strukturen aufwiesen. Dies deutet auf unterschiedliche Sensitivität von Neuronensubgruppen gegenüber Deltamethrin hin. Um Deltamethrin-sensitive und resistente Neuronen zu differenzieren, wurden neuronale Subpopulationen, die durch die Expression Ca^{2+} -bindender Proteine

(Calretinin, Calcineurin und Calbindin) sowie Somatostatin und NPY charakterisiert sind, untersucht.

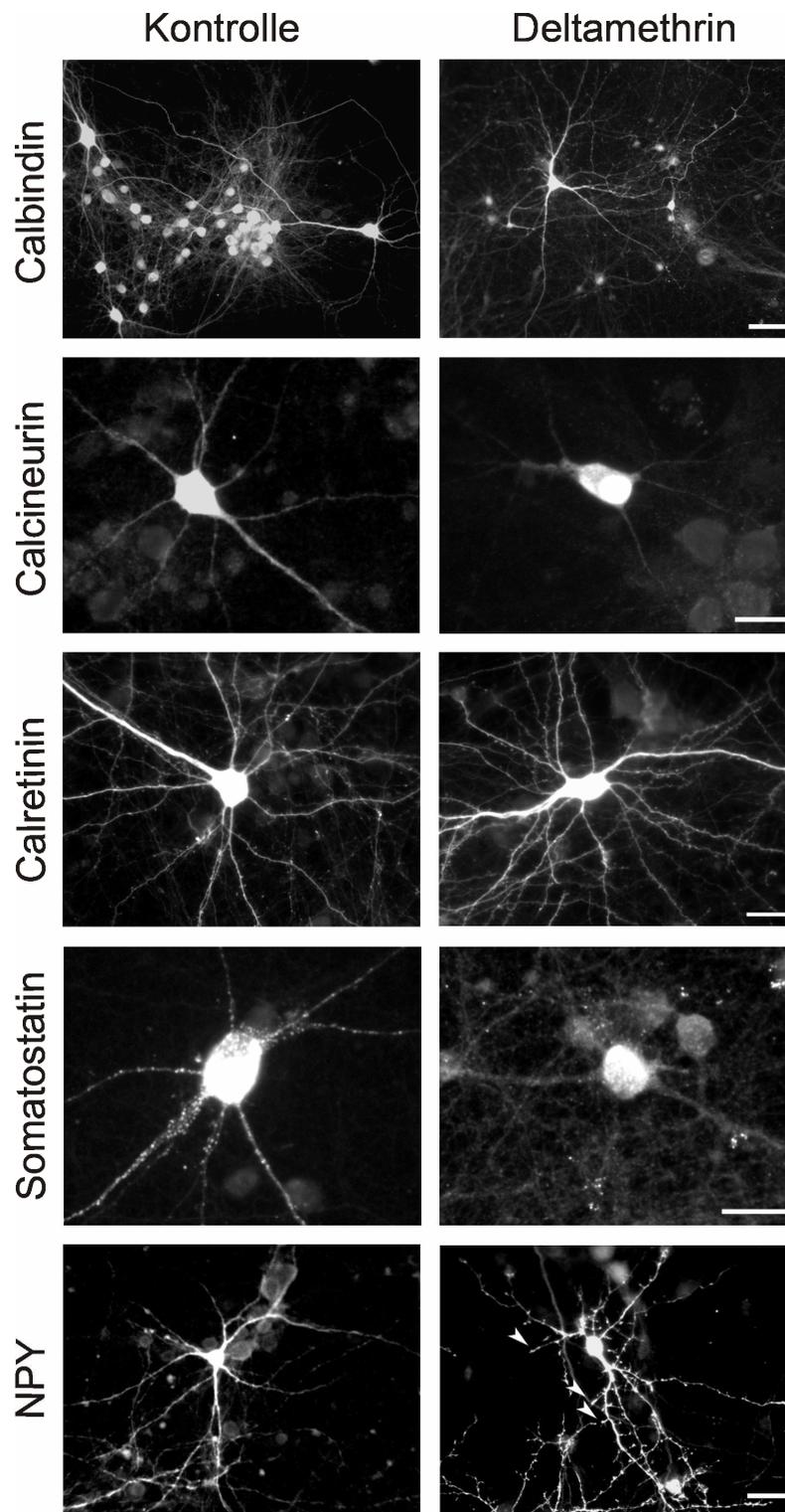


Abbildung 10

Effekte von Deltamethrin auf neuronale Subpopulationen

Hippokampale Primärkulturen wurden bis zu DIV17 kultiviert, ab DIV6 zweimal pro Woche mit Deltamethrin (200nM) behandelt, mit dem entsprechenden primären Antikörpern gegen die Ca^{2+} -bindende Proteine Calbindin, Calcineurin und Calretinin, sowie gegen die peptidergen Neurotransmitter Somatostatin und NPY markiert und fotografiert. Calbindin ist sowohl in Körnerzellen als auch in pyramidalen Neuronen (siehe Kontrollen) exprimiert, wobei nach Deltamethrinbehandlung nur die Körnerzellen reduziert wurden. Nach der Deltamethrinbehandlung waren bei den Calcineurin- und Calretinin-positiven Neuronen keine Effekte zu beobachten, wogegen bei den NPY-positiven Neuronen eine starke Zunahme der Immunreaktivität zu verzeichnen war. Der Maßstab beträgt $40\mu\text{m}$ (Calbindin und NPY) oder $20\mu\text{m}$ (Calcineurin, Calretinin und Somatostatin).

Es wurden durch Deltamethrinbehandlung bei Calretinin-positiven Neuronen kaum oder keine Effekte beobachtet (Abbildung 10). Das morphologische Erscheinungsbild somatostatinhaltiger Neuronen nach Deltamethringabe war verändert. Die NPY-haltige Neuronen zeigte unter der gleichen Behandlung erhöhte Immunreaktivität in filopodialen Fortsätzen (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu reduzierte die Deltamethrinbehandlung (2nM) die Zahl an Calbindin-positiven Neuronen, wobei vornehmlich der Körnerzellen betroffen waren (Abbildung 10).

Die quantitative Analyse der Neuronensubgruppen nach Deltamethrinzugabe durch Auszählung von 3 Versuchen und anschließender statistischer Analyse sind hier gegenübergestellt (Abbildung 11).

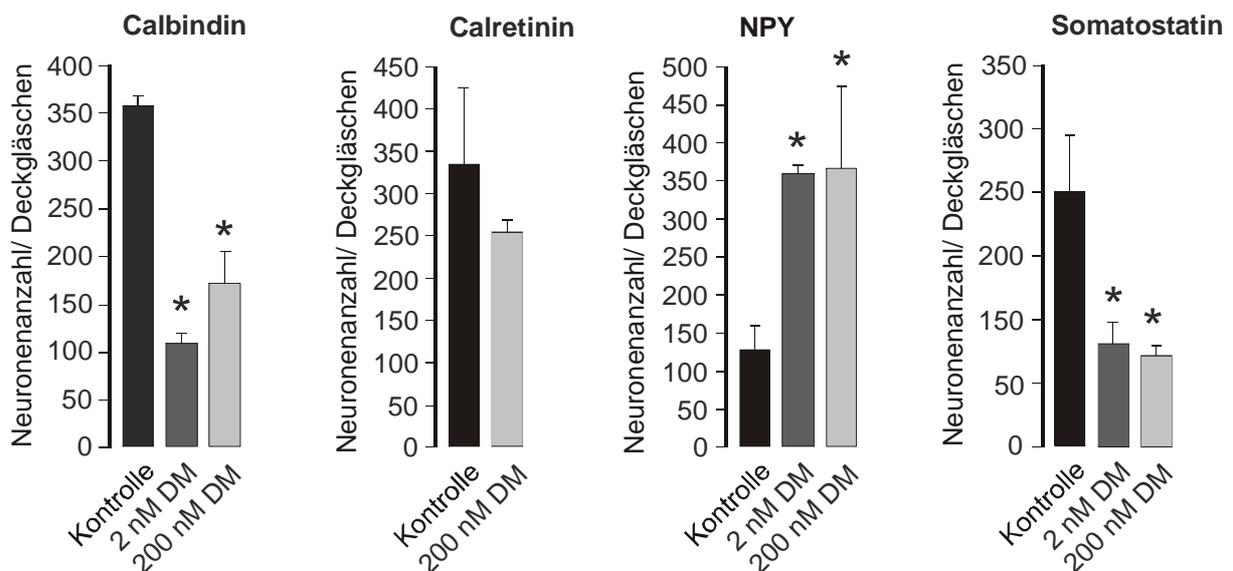


Abbildung 11

Quantitative Analyse der Wirkung von Deltamethrin auf Neuronensubpopulationen

Hippokampale Primärkulturen wurden bis zu DIV17 kultiviert, ab DIV6 zweimal pro Woche mit Deltamethrin (2nM und 200nM) behandelt und mit den entsprechenden primären Antikörpern gegen die Ca^{2+} -bindenden Proteine Calbindin, Calcineurin und Calretinin sowie gegen die peptidergen Neurotransmitter Somatostatin und NPY markiert. Immunpositive Neuronen wurden bei je 3 Deckgläschen in je 3 Versuchen auf einer Fläche von je 113 mm^2 gezählt. Der Student's t-Test ergab gegenüber der Kontrolle bei Calbindin-positiven Neuronen eine signifikante Reduzierung der Anzahl (für 2nM DM, $p < 0,0002$; für 200nM DM, $p < 0,002$) und auch bei Somatostatin-positiven Neuronen eine signifikante Reduzierung der Anzahl (für 2nM DM, $p < 0,002$; für 200nM DM, $p < 0,001$) wogegen bei Calcineurin-positiven Neuronen keine signifikante Veränderung zu erkennen war ($p < 0,2$). NPY-positive Neuronen zeigten gegenüber der Kontrolle eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Neuronen (für 2 nM DM $p < 0,005$; für 200nM DM, $p < 0,02$).

Die Quantifizierung durch Auszählung der Neuronensubgruppen nach Deltamethrinzugabe ergab bei Calbindin-positiven Neuronen 50% und bei Somatostatin-haltigen Neuronen mehr als 60% Reduzierung der Neuronenzahl (Abbildung 11). Eine ca. 300%ige Zunahme der Neuronenanzahl zeigten NPY-haltige Neuronen, wohingegen Calretinin-positive Zellen keine signifikanten Unterschiede erkennen ließen (Abbildung 11). Daraus wird ersichtlich, dass verschiedene Neuronensubgruppen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber einer Deltamethrinbehandlung aufweisen.

4.3 Wirkung von C3-Exoenzymen auf neuronales Wachstum

C3-Exoenzyme sind ADP-Ribosyltransferasen, die spezifisch Proteine der Rho-Familie (A, B und C) an der Stelle Asparagin 41 ADP-ribosylieren (siehe Einleitung). In Voruntersuchungen wurden in Hippokampuskulturen nach Behandlung mit einer Botulinum C1 Neurotoxin-Präparation neurotrophe Effekte beobachtet, die nicht mit der bekannten Syntaxin-spaltenden Wirkung von Botulinum C1 Neurotoxin in Einklang standen (Blasi J et al., 1993). Da *Clostridium botulinum* Stämme C1 und D auch C3 ADP-Ribosyltransferasen produzieren, lag es nahe, die Effekte von C3-Exoenzymen direkt auf neuronalen Kulturen aus dem Mäusehippocampus zu prüfen. Die für diese Untersuchungen verwendeten C3-Proteine wurden entweder rekombinant hergestellt oder aus dem Kulturüberstand clostridialer Kulturen gereinigt.

4.3.1 Effekte des C3-Exoenzyms aus *Clostridium botulinum* auf hippokampale Neuronen

Um die Wirkung des C3-Exoenzyms von *Clostridium botulinum* (C3^{bot}) auf neuronale Primärkulturen des Hippokampus zu untersuchen, wurden Neuronen von Embryonaltag 17 für 6 Tage kultiviert. Sie wurden unter Zugabe von 20nM aus Kulturüberstand gereinigtem C3^{bot} für 5 Tage behandelt. Die Zellkulturen wurden dann fixiert, mit anti-NFP160 markiert, und mit einem Zweitantikörper gegen Maus-IgG, der mit Oregongreen als Fluorophore gekoppelt war, visualisiert. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Neuronen fotografiert (Abbildung 12).

Nach Gabe von C3^{bot} zeigten die Neuronen ein stärkeres Axonwachstum. Um zu verifizieren, ob C3^{bot} das Wachstum speziell von Axonen in der Zellkultur beeinflusst, wurden nach DIV6 morphometrische Messungen durchgeführt.

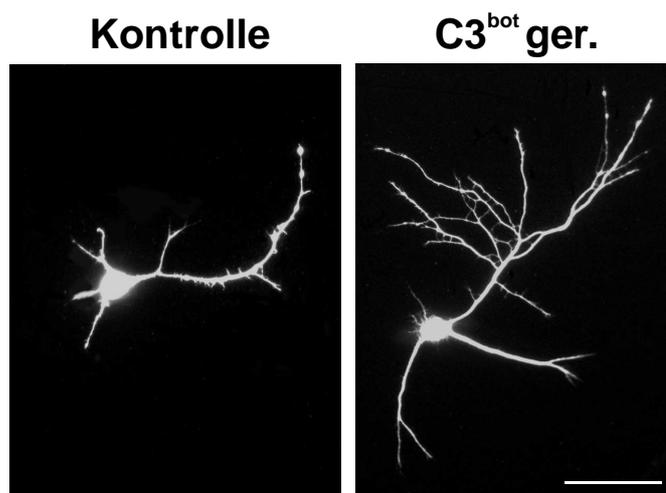


Abbildung 12

Das C3-Exoenzym (20nM) aus *Clostridium botulinum* fördert axonales Wachstum

Hippokampale Primärkulturen (DIV6) wurden für 5 Tage mit 20nM C3^{bot} (aus Kulturüberstand gereinigt) behandelt, fixiert und mit dem primären Antikörper gegen NFP160 markiert. Oregongreen markierter Ziege Anti-Maus IgG diente als sekundärer Antikörper. Die Axone der mit dem C3^{bot} behandelten Neuronen sind länger und stärker verzweigt als die der Kontrollneuronen. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Zur Erfassung der Messdaten für Axonlänge, Axonverzweigungen und Zellkörperfläche wurde ein Computer gestützte Analyse verwendet. Mittels eines speziellen Neuroluzida Computerprogramms wurden die Neuronen gemessen und über die Neuroexplorer-Software ausgewertet. Die morphometrische Messung

startete zuerst am Soma und das Soma wurde umrandet. Dann erfolgte die Messung der Axonlänge ab Abgang des Axons vom Soma. Als Axonlänge wurde die Länge des Axons mit allen seinen Verzweigungen bezeichnet.

Nach den morphometrischen Messungen wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet (Student's t-Test). Die quantitative Analyse ergab eine signifikante Verlängerung der Axone nach C3^{bot} Applikation gegenüber unbehandelten Neuronen (Abbildung 13). Auch die Verzweigungen des Axons sind signifikant unter die Behandlung von C3^{bot} erhöht, wogegen die Zellkörperfläche keinen Unterschied gegenüber Kontrollzellen zeigte.

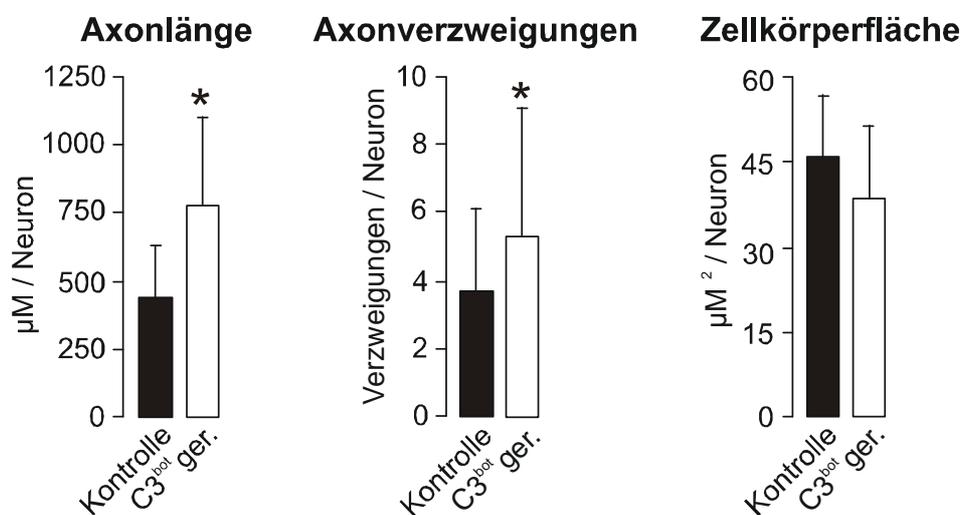


Abbildung 13

Morphometrische Analyse der C3^{bot} Behandlung (20nM) von hippocampalen Neuronen

Für die morphometrischen Analysen wurden 30 Neuronen, die mit dem aus Kulturüberstand gereinigtem (ger.) C3^{bot} behandelt worden waren sowie 30 Kontrollneuronen vermessen. Mittels Student's t-Test wurde die Signifikanz ermittelt. Mit C3^{bot} behandelte Zellen zeigten gegenüber Kontrollzellen eine signifikante Erhöhung der Axonlänge ($p < 0,0001$) und Axonverzweigung ($p < 0,02$) aber keinen signifikanten Unterschied der Zellkörperfläche (Student's t-Test). * $p < 0,05$

Als nächstes wurde geprüft, ob diese neurotrophe Wirkung des C3-Exoenzyms nur mit C3^{bot} beobachtet werden konnte, oder andere C3-Isoformen auch die gleiche Wirkung auf hippocampale Neuronen in Kultur haben. Dazu wurden die C3-Isoformen, die aus den Bakterienstämmen *Staphylococcus aureus* und *Clostridium limosum* produziert werden, auf ihre Wirkung hin überprüft.

4.3.2 Wirkung der C3-Isoformen aus *Staphylococcus aureus* und *Clostridium limosum* auf hippocampale Neuronen

Hippokampale Neuronen wurden am Embryonaltag 17 präpariert und am DIV1 mit 20nM C3^{stau2} aus *Staphylococcus aureus* und 20nM C3^{lim} aus *Clostridium limosum* (beides rekombinante Proteine) inkubiert und für 5 Tage bis DIV6 weiter kultiviert. Anschließend wurden sie fixiert und mit anti-NFP160 markiert. Die Zellen wurden unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Neuronen fotografiert. Die Morphologie der Neuronen sowie die quantitative Analyse durch morphometrischen Messungen sind in Abbildung 14 wiedergegeben.

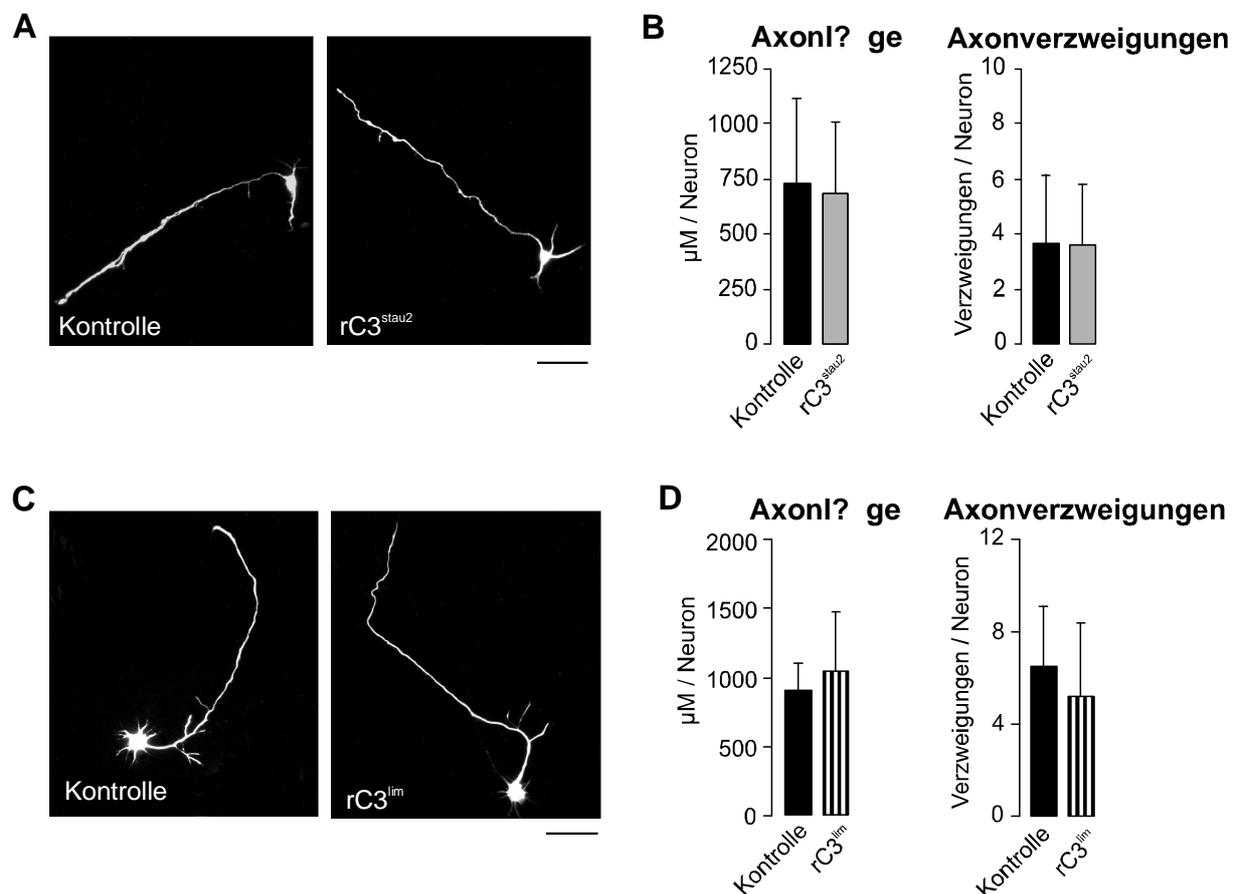


Abbildung 14

Die C3-Isoformen (20nM) aus *Staphylococcus aureus* und *Clostridium limosum* zeigen keine Wirkung auf hippocampale Neuronen

A und C: Morphologie der mit C3^{stau2} und C3^{lim} behandelten Neuronen
 Hippokampale Primärkulturen wurden für 5 Tage mit C3^{stau2} und mit C3^{lim} behandelt, dann mit dem primären Antikörper gegen Neurofilamentprotein 160 inkubiert, Oregongreen markiertes Ziege anti-Maus IgG diente als sekundärer Antikörper. Die Axone der mit dem C3^{stau2} und mit C3^{lim} behandelten Neuronen zeigen keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen. Der Maßstab beträgt 100µm.

B und D: Morphometrische Analyse der mit $C3^{stau2}$ (20nM) und $C3^{lim}$ (20nM) behandelten Neuronen. Für die morphometrischen und statistischen Analysen wurden Neuronen, die mit dem $C3^{stau2}$ (n=25) sowie $C3^{lim}$ (n=15) behandelt worden waren, mit Kontrollneuronen (n=25) verglichen. Mittels Student's t-Test wurde die Signifikanz ermittelt. Die mit $C3^{stau2}$ behandelten Zellen zeigten gegenüber Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied der Axonlänge ($p < 0,71$), Axonverzweigungen ($p = 0,19$) und der Zellkörperfläche ($p < 0,96$). $C3^{lim}$ behandelte Zellen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Axonlänge ($p < 0,199$), Axonverzweigungen ($p < 0,250$) und der Zellkörperfläche ($p < 0,185$) gegenüber der Kontrollzellen.

Morphologisch sind keine Veränderungen der Neuronen im Gegensatz zur Kontrolle zu erkennen. Es wurden morphometrische Messungen durchgeführt, um zu verifizieren, ob $C3^{stau2}$ und $C3^{lim}$ Einflüsse auf das Wachstum von Axonen haben. Die Messungen erfolgten an aufgenommenen Neuronen (DIV6). Eine Unterscheidung nach Axon und Dendriten ist schon ab DIV4 möglich (Dotti et al., 1988). Zuerst wurden die Zellkörper, dann vom Perikarya ausgehend die Axone gemessen. Hierbei wurde der längste Fortsatz (auch aufgrund der NFP- versus MAP2-Markierung) als Axon definiert. Die morphometrischen Untersuchungen ergaben keinen signifikanten Unterschied der mit $C3^{stau2}$ und $C3^{lim}$ behandelten Neuronen gegenüber der Kontrolle und bestätigten den visuellen Eindruck.

Um die anscheinend gegensätzlichen Effekte der verschiedenen C3-Isoformen weiter zu untermauern, wurden rekombinantes $C3^{bot}$, $C3^{stau2}$ und $C3^{lim}$ sowie gereinigtes $C3^{bot}$ in einem weiteren Versuch direkt verglichen.

Es zeigte sich, dass die Neuronen der mit gereinigtem $C3^{bot}$ und rekombinatem $C3^{bot}$ behandelten Zellkultur hochsignifikant längere und verzweigtere Axone als die der Kontrollkulturen ausbildeten, während die anderen C3-Isoformen diese Effekte nicht aufwiesen. Die Neuronen, die mit $C3^{stau2}$ und mit $C3^{lim}$ behandelt worden waren, zeigten keinen Unterschied sowohl die Axonlänge als auch die Axonverzweigungen gegenüber Kontrollen betreffend (Abbildung 15). Die Messung ergab jedoch, dass die Axonlängen und Axonverzweigungen bei den $C3^{stau2}$ und $C3^{lim}$ behandelten Kulturen reduziert sind. Die Morphologie der Neuronen unter verschiedenen C3 Proteinbehandlungen und deren morphometrischer Auswertung zeigt die Abbildung 15.

Um eventuelle herstellungsbedingte Kontaminationen oder Proteinveränderungen auszuschließen wurde in einem weiteren Versuch gereinigtes $C3^{bot}$ aus einer anderen Quelle (Calbiochem) auf seine Wirkung an hippokampalen Neuronen

untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigten ebenfalls die neurotrophe Wirkung, unabhängig von der Herkunft des C3^{bot} (Daten nicht gezeigt).

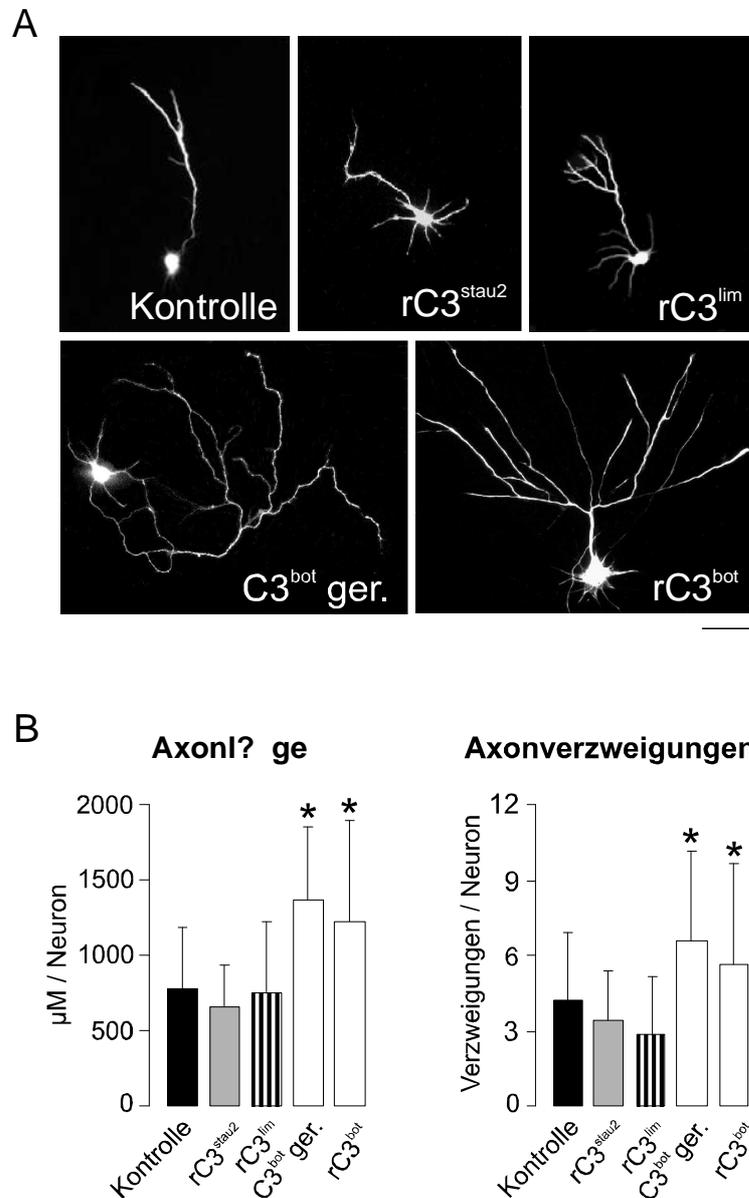


Abbildung 15

Das C3-Exoenzym (20nM) aus *Clostridium botulinum* unterschiedlicher Herkunft bewirkt stärkeres axonales Wachstum, die C3-Isoformen von *Clostridium limosum* und *Staphylococcus aureus* zeigen kein erhöhtes Wachstum gegenüber der Kontrolle

A: Hippokampale Primärkulturen wurden für 5 Tage mit C3-Exoenzym aus *Clostridium botulinum* unterschiedlicher Herkunft (C3^{bot} ger. und C3^{bot} rek. (rC3^{bot})) sowie rekombinatem C3^{lim} und C3^{stau2} behandelt, mit dem primären Antikörper gegen Neurofilamentprotein 200 markiert. Die Axone der mit C3^{bot} behandelten Neuronen zeigen gesteigertes axonales Wachstum, die anderen C3-Isoformen C3^{lim} und C3^{stau2} hingegen weisen keine tropischen Effekte auf das axonale Wachstum auf. Der Maßstab beträgt 100μm.

B: Für die morphometrischen Analysen wurden Kontrollneuronen (n=107) sowie Neuronen, die mit C3^{stau2} (n=30), C3^{lim} (n=55), C3^{bot ger.} (n=55) und rC3^{bot} (n=25) behandelt worden waren, ausgewertet. Die Kulturen, die mit C3^{stau2} (Axonlänge: p<0,0825 sowie Axonverzweigungen: p<0,0649) und C3^{lim} (Axonlänge: p<0,3884) behandelt wurden, zeigen keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Die Verzweigung der Axone nahm nach C3^{lim} Behandlung signifikant ab (p<0,0006). Die mit gereinigtem C3^{bot} behandelten Kulturen zeigen längere Axone (p<3,508E-07) und mehr Axonverzweigungen (p<0,0038) gegenüber den Kontrollen. Ebenfalls zeigen die mit rC3^{bot} behandelten Kulturen signifikant erhöhte Axonlängen (p<3,702E-09) und Axonverzweigungen (p<0,0003).

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild. Die signifikante Erhöhung der Axonlänge und Axonverzweigungen belegen die neurotrophe Wirkung der C3 Exoenzym aus *Clostridium botulinum*. Diese Effekte wurden mittels zwei verschiedener, aus Kulturüberstand gereinigter C3^{bot} Präparationen, sowie mit rekombinantem C3^{bot} Präparationen nachgewiesen. C3-Exoenzym aus *Clostridium botulinum* kann in relativ niedrigen Konzentrationen (20nM) wachstumsfördernd wirken, wogegen andere C3-Isoformen wie C3^{stau2} und C3^{lim} keine wachstumsfördernden Eigenschaften auch nicht bei Verwendung höherer Konzentrationen aufweisen.

Es stellt sich nun die Frage, ob die neurotrophe Wirkung einzigartig für die hippocampale Neurone ist. Um diese Frage zu klären wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

4.3.3 Effekte des C3^{bot} auf Dissoziationskulturen der Spinalganglien

Um zu prüfen, ob die wachstumsfördernde Wirkung von C3^{bot} aus *Clostridium botulinum* (C3^{bot ger.}) nur auf die hippocampale Neuronen des ZNS beschränkt ist, oder auch für andere Neuronen des peripheren Nervensystems gilt, wurden Dissoziationskulturen von Spinalganglien der Maus untersucht. Dazu wurden Spinalganglien präpariert, für 5 Tage mit gereinigtem C3^{bot} behandelt und bis zu DIV6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen NFP 160 markiert, Texas red markiertes Ziege anti-Maus IgG diente als sekundärer Antikörper. Zur Darstellung der Axone wurden die Spinalganglienzellen unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie fotografiert (Abbildung 16).

Die Neuronen der Spinalganglien waren überwiegend bipolar. Morphologisch sind bei den Neuronen der Spinalganglien, die mit dem gereinigten C3^{bot} behandelt worden waren, Veränderungen zu beobachten. Für die morphometrische Messungen

der Axonlängen wurde der längste Fortsatz als Axon definiert. Die Messungen von Axonlänge und Axonverzweigungen erfolgten ebenfalls nach DIV6. Abbildung 16 zeigt die morphologische und graphische Darstellung der mit gereinigten C3^{bot} behandelten Spinalganglienzellen in Bezug auf Axonlänge, Axonverzweigungen und Zellkörperfläche.

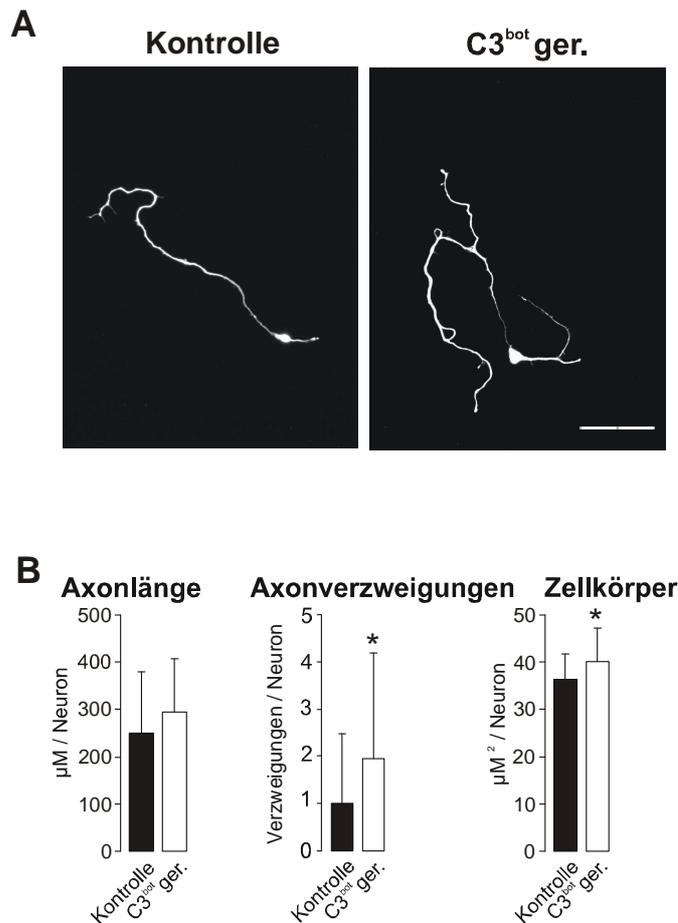


Abbildung 16

C3^{bot} (20nM) fördert bei den Spinalganglien axonales Wachstum

A: Morphologisches Erscheinungsbild der Spinalganglien nach der C3^{bot} Behandlung Primärkulturen der Spinalganglien DIV6 wurden für 5 Tage mit gereinigtem C3^{bot} behandelt, und mit dem entsprechenden primären Antikörper gegen NFP160 markiert. Mit C3^{bot} behandelten Spinalganglien zeigt eine verstärkte axonale Verzweigung gegenüber der Kontrolle. Der Maßstab beträgt 100µm.

B: Graphische Darstellung der mit gereinigtem C3^{bot} behandelten Spinalganglien Für die morphometrische Analyse wurden die Axonlängen, Anzahl der Verzweigungen und Zellkörperflächen der mit dem gereinigten C3^{bot} behandelten Spinalganglien (n=21) sowie Kontrollkulturen (n=23) gemessen. Student's t-Test ergab signifikante Erhöhung der Axonverzweigungen (p<0,029) und der Zellkörperflächen (p<0,054). Die Axonlängen sind im Gegensatz zur Kontrolle erhöht, jedoch nicht signifikant.

Die wachstumsfördernde Wirkung von C3^{bot} zeigt sich auch an Neuronen der Spinalganglien. Die Axonlänge und Axonverzweigungen sowie Zellkörperfläche sind im Gegensatz zur Kontrolle erhöht. Die neurotrophe Wirkung des C3^{bot} ist also nicht nur auf hippokampale Neuronen beschränkt, sondern auch an Neuronen des peripheren Nervensystems wirksam.

Es soll nun die Frage nachgegangen werden, ob der tropische Effekt des C3^{bot} über die für die ADP-Ribosyltransferasen bekannte Rho-Aktivität (Inaktivierung) hervorgerufen wurde.

4.3.4 Die Wirkung des enzymdefizienten C3^{bot} auf die hippokampalen Neuronen

In diesem Abschnitt soll geklärt werden, ob die beobachtete neurotrophe Eigenschaft des C3 Exoenzyms aus *Clostridium botulinum* an die ADP-Ribosyltransferase Enzymaktivität gekoppelt ist. Die C3 ADP-Ribosyltransferasen teilen die katalytische Aminosäure Glutamat (an Position 174 in C3^{bot}) mit allen anderen ADP-Ribosyltransferasen. Durch Mutation dieser Aminosäure (Austausch von Glutamat) kann die Enzymaktivität ausgeschaltet werden. Dies hat enzymatisch inaktive, also enzymdefiziente C3-Exoenzyme (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) zur Folge.

Um die Wirkung enzymdefizienter Konstrukte auf hippokampale Neuronen zu untersuchen, wurden die Kulturen mit unterschiedlichen Konstrukten behandelt.

Anschließend wurden die Neuronen fixiert, mit anti-NFP 200 markiert und unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Neuronen fotografiert. Die Messungen von Axonlänge und Anzahl der Axonverzweigungen erfolgten nach DIV6. In Abbildung 17 sind die Effekte unterschiedlicher rekombinanter C3^{bot} Proteine entweder mit oder ohne Enzymaktivität verglichen.

Die Neuronen, die mit rC3^{bot} behandelt worden waren, bildeten hochsignifikant längere und verzweitere Axone gegenüber Kontrollen (Abbildung 17). Völlig unerwartet sind jedoch die Effekte der enzymdefizienten Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A). Sie bildeten ebenfalls hochsignifikant längere und stärker verzweigte Axone (Abbildung 17). Daraus ergibt sich, dass C3-Proteine aus *Clostridium botulinum* und deren enzyminaktive Derivate eine starke neurotrophe Eigenschaft in sehr geringen Konzentrationen (nanomolarer Bereich) aufweisen, die

wahrscheinlich nicht an die ADP-Ribosyltransferase Enzymaktivität des Toxins gekoppelt ist.

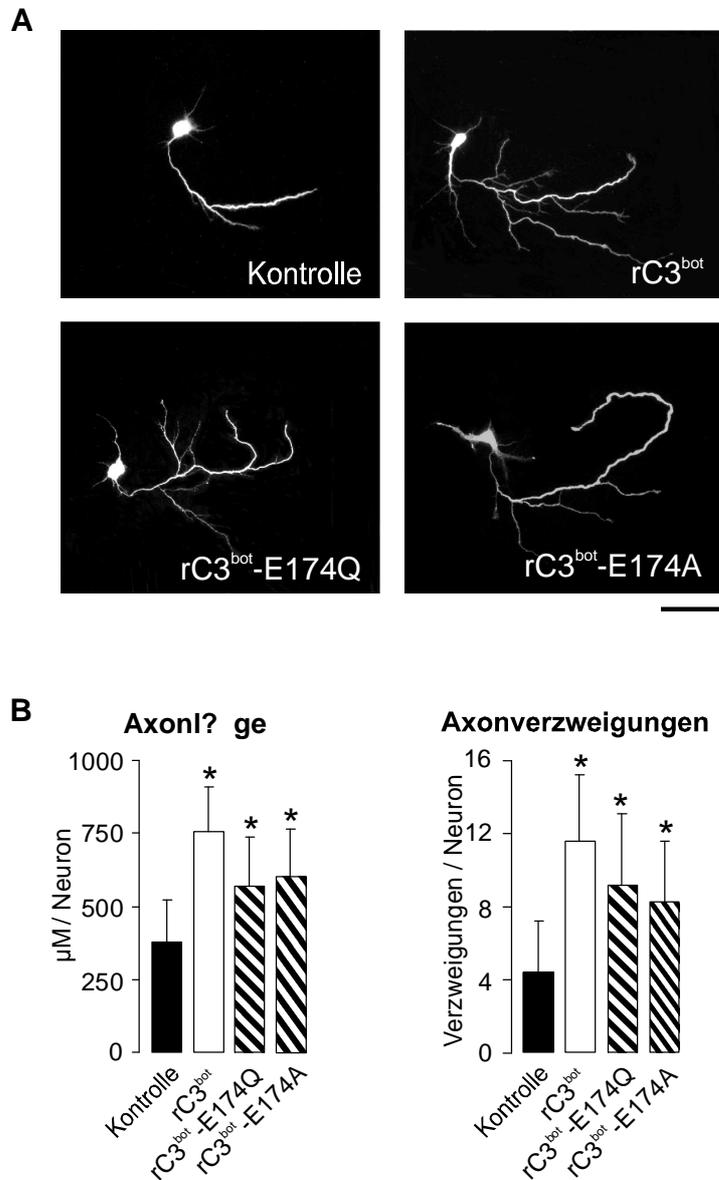


Abbildung 17

Enzymdefizientes und enzymaktives C3^{bot} fördern axonales Wachstum auf hippocampalen Neuronen

A: Morphologisches Erscheinungsbild der Neuronen nach der Behandlung mit unterschiedlichen rekombinanten C3-Proteinen

A: Morphologisches Erscheinungsbild der Neuronen nach der Behandlung mit unterschiedlichen rekombinanten C3-Proteinen

Hippokampale Primärkulturen wurden für 5 Tage mit rekombinanten C3-Proteinen behandelt, mit dem primären Antikörper gegen Neurofilamentprotein 200 markiert, mit Oregongreen (Ziege anti-Maus IgG) detektiert. Die Neuronen, die mit verschiedenen der rekombinanten C3-Proteine behandelt wurden, zeigen erhöhtes axonales Wachstum gegenüber den Kontrollen. Der Maßstab beträgt 100µm.

B: Quantitative Analyse der Effekte der rekombinanten C3 Proteine.

Mit verschiedenen rekombinanten C3 Proteinen behandelte hippokampale Primärkulturen und unbehandelte Kontrollen wurden für die morphometrische Analyse mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Neuroluzida, Neuroexplorer) untersucht. Die Axonlänge, Anzahl der Verzweigungen und Zellkörperfläche wurde gemessen. Für die Untersuchungen wurden Kontrollen (n=22), rC3^{bot} (n=27), rC3^{bot}-E174Q (n=26) und rC3^{bot}-E174A (n=23) verwendet. Der Student's t-Test ergab gegenüber Kontrollen signifikante Erhöhungen der Axonlänge und Axonverzweigungen für rC3^{bot} (p<4,317 E-06, p<0,00017); für rC3^{bot}-E174Q (p<0,0001, p<0,0156); für rC3^{bot}-E174A (p<0,00001, p<8,8 E-07). Es ist bei allen mit C3 Proteinen behandelten Neuronen eine signifikante Erhöhung der Axonlänge und Axonverzweigungen zu verzeichnen. *p<0,05

Für die Übersicht wurden Neuronen aus mehreren Präparationen (8 Präparationen) zusammenfasst und graphisch dargestellt (Abbildung 18).

Zudem soll die Frage nachgegangen werden, ob die beobachtete neurotrophe Wirkung konzentrationsabhängig ist. Dazu wurden die Neuronen jeweils mit 20 nM und 100nM rekombinanten C3-Proteinen für 5 Tagen behandelt und immunzytochemisch gegen NFP200 gefärbt. Tabelle 3 zeigt die Zusammenstellung der verwendeten C3-Proteine und deren Wirkungen auf hippokampaler Neuronen. Morphologisch sind jedoch keine Unterschiede zwischen den mit 20nM und 100nM rekombinanten C3-Proteinen behandelten Neuronen zu beobachten. Bei der quantitativen Analyse wurde eine leichte Erhöhung der Fortsätze nach Gabe von 100nM im Gegensatz zu 20nM beobachtet. Bei allen verwendeten rekombinanten C3-Proteinen unterschiedlicher Konzentrationen ergab sich eine signifikante Erhöhung der Axonlänge und Axonverzweigungen gegenüber der Kontrolle.

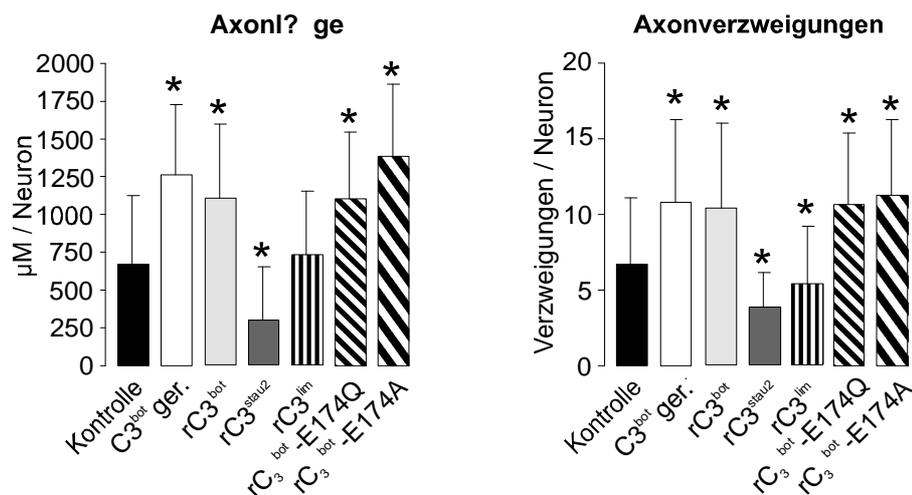


Abbildung 18

Die Wirkung der verschiedenen C3-Proteine auf hippokampale Neuronen (Übersicht)

Die hippokampale Primärkulturen wurden mit verschiedenen rekombinanten C3 Proteinen behandelt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Für die morphometrische Analyse

wurden die Axonlänge, Anzahl der Verzweigungen und Zellkörperfläche gemessen. Hierzu wurden Kontrollneuronen (n=278), C3^{bot} gereinigt (n=179), rC3^{bot} (n=141), rC3^{bot}-E174Q (n=131), rC3^{bot}-E174A (n=56), rC3^{lim} (n=103) und rC3^{stau2} (n=29) verwendet. Der Student's t-Test ergab gegenüber Kontrolle sowohl bei C3^{bot} gereinigt als auch bei rC3^{bot} signifikante Erhöhung der Axonlänge ($p < 6,85534E-35$; $p < 3,69177E-12$) und Axonverzweigungen ($p < 3,92349E-17$; $p < 2,99546E-05$). Bei der Behandlung mit rC3^{bot}-E174Q ergab es ebenfalls signifikante Erhöhung der Axonlänge ($p < 4,84818E-18$) und Axonverzweigungen ($p < 1,1632E-15$); bei rC3^{bot}-E174A eine signifikante Erhöhung der Axonlänge ($p < 1,23114E-23$) und Axonverzweigungen ($p < 2,13925E-11$); bei rC3^{lim} keine signifikante Erhöhung der Axonlänge ($p < 0,176124981$) und eine signifikante Abnahme der Axonverzweigungen ($p < 0,0014$) und bei rC3^{stau2} eine negative Signifikanz der Axonlänge ($p < 5,01315E-06$) und der Axonverzweigungen ($p < 0,0003$)

Tabelle 3

Morphometrische und statistische Analyse der C3-Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen

Die hippokampalen Neuronen wurden mit den C3-Proteinen für 5 Tagen behandelt, fixiert und immunzytochemisch untersucht. Anschließend wurden die Neuronen morphometrisch und statistisch ausgewertet (Student's t-Test).

Behandlung	Anzahl der Neuronen	Axonlänge μm/ Neuron	Axonverzweigungen/ Neuron
Kontrolle	127	812 \pm 333	8,5 \pm 4,7
rC3 ^{bot} 20nM	91	1228 \pm 517; ($p < 5,26E-12$)	11 \pm 6,1; ($p < 4,09E-4$)
rC3 ^{bot} 100nM	110	1301 \pm 426; ($p < 9,70E-20$)	10,6 \pm 4,6; ($p < 3,76E-4$)
rC3 ^{bot} -E174Q 20nM	85	1279 \pm 414; ($p < 6,11E-17$)	11,1 \pm 4,9; ($p < 9,71E-5$)
rC3 ^{bot} -E174Q 100nM	97	1220 \pm 422; ($p < 2,46E-14$)	9,3 \pm 3,7; ($p < 9,62E-2$)
rC3 ^{bot} -E174A 20nM	97	1386 \pm 475; ($p < 1,93E-17$)	11,2 \pm 5,0; ($p < 2,69E-14$)
rC3 ^{bot} -E174A 100nM	32	1349 \pm 318; ($p < 4,61E-14$)	11,7 \pm 4,7; ($p < 8,02E-9$)

Die Grafik (Abbildung 18) fasst die Effekte aller verwendeten C3-Präparationen zusammen. Sie enthält daher Daten, die in den Einzelerperimenten des obigen Abschnittes bereits dargestellt sind. Hiermit wird die Allgemeingültigkeit der Aussage über eine Vielzahl von Neuronen getroffen. Trotz großer Variabilität der verschiedenen Neuronensubgruppen im Hippokampus gilt, dass C3-Exoenzyme aus *Clostridium botulinum* und seine enzymdefizienten Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und

rC3^{bot}-E174A) neurotrophe Effekte in nanomolaren Konzentrationen aufweisen. Die C3-Isoformen von *Clostridium limosum* und *Staphylococcus aureus* hingegen weisen diese wachstumsfördernde Eigenschaft nicht auf bzw. wirken eher hemmend. Die wachstumsfördernde Eigenschaft des C3^{bot} ist nicht mit der ADP-ribosyltransferase Enzymaktivität gekoppelt und somit wahrscheinlich nicht direkt über Rho-Proteine vermittelt, eine indirekte Wirkung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.3.5 Die Bedeutung der Rho-Proteine

In diesem Abschnitt soll die Frage geklärt werden, ob die Wirkung von C3-Proteinen Rho- vermittelt oder Rho- unabhängig ist. Es gilt als erwiesen, dass C3 ADP-Ribosyltransferasen hochspezifisch die Rho-Proteine (A, B, und C) modifizieren und sie somit inaktivieren. Um Rho- abhängige von Rho- unabhängige Effekten zu unterscheiden wurden zwei verschiedene experimentelle Zugänge gewählt:

1. Die interne Applikation von C3-Exoenzym, welches dann direkt Rho ADP-ribosyliert.
2. Die direkte Transfektion mit Rho in verschiedenen Aktivitätszuständen.

Für diese Untersuchungen wurden die Neuronen mit unterschiedlichen Konstrukten der Rho-Proteine und C3-Proteine, die mit GFP markiert waren, transient transfiziert. Anschließend wurden die hippokampalen Neuronen fixiert und unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Neuronen fotografiert (Abbildung 19). Die für diese Untersuchung verwendeten Rho-Konstrukte sowie deren morphometrische und statistische Auswertung zeigt die Tabelle 4.

Tabelle 4

Morphometrische und statistische Analyse der Transfektionen verschiedener Rho-Konstrukte und C3-Proteine

Die hippokampalen Neuronen wurden mit verschiedenen Konstrukten der Rho-Proteine und C3 Proteine, die mit GFP markiert waren, transient transfiziert und nach 5 Tagen fixiert. Anschließend wurden die Neuronen morphometrisch und statistisch ausgewertet (Student's t-Test).

Behandlung	Anzahl der Neuronen	Axonlänge μm / Neuron	Axonverzweigungen/ Neuron
Versuch 1			
Vektor	15	40 \pm 35	2,0 \pm 2,1
C3 ^{stau2}	10	13 \pm 5; (p<0,0150)	0,9 \pm 0,9; (p<0,0770)
C3 ^{stau2} -E174Q	19	46 \pm 45; (p<0,3256)	2,1 \pm 1,8; (p<0,4704)
RhoA ^{N19}	17	40 \pm 23; (p<0,4850)	3,1 \pm 2,7; (p<0,1111)
RhoA ^{wt}	36	153 \pm 70; (p<3,508E-07)	6,1 \pm 3,7; (p<8,161E-05)
RhoA ^{V14}	27	128 \pm 67; (p<8,395E-06)	3,4 \pm 2,5; (p<0,0401)
Versuch 2			
Vektor	31	755 \pm 351	6,7 \pm 4,5
C3 ^{bot} wt	14	482 \pm 173; (p<0,0005)	2,7 \pm 1,1; (p<0,0002)
C3 ^{bot} -E174A	15	708 \pm 370; (p<0,1834)	7,1 \pm 5,8; (p<0,4597)
RhoA ^{wt}	18	638 \pm 413; (p<0,0621)	8,2 \pm 6,3; (p<0,2738)

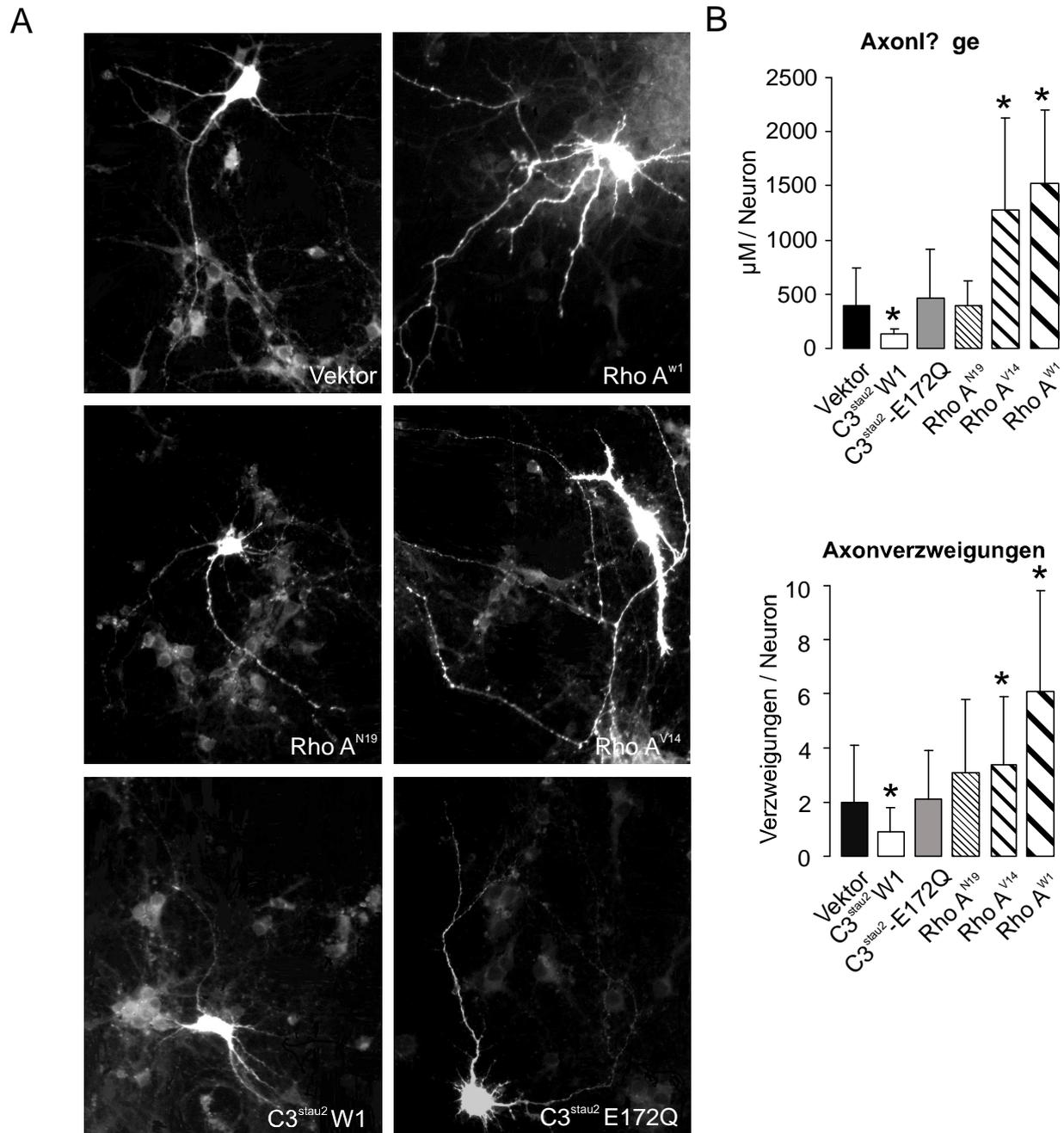


Abbildung 19

Intrazelluläre Effekte der verschiedenen Rho- und C3^{stau} Konstrukte auf hippocampalen Neuronen

A: Morphologie der mit verschiedenen Rho- und C3^{stau} Konstrukten transfizierten hippocampalen Neuronen

Hippocampale Neuronen wurden mit verschiedenen Konstrukten der Rho-Proteine, die mit GFP markiert waren, transient transfiziert und anschließend fixiert. Die Expression der Rho-GFP Peptid ist in axonalen und dendritischen Kompartimenten zu erkennen. Der Maßstab beträgt 100µm.

B: Graphische Darstellung der morphometrischen Analyse verschiedener Rho-Konstrukte. Die hippocampalen Neuronen wurden mit verschiedenen Konstrukten der Rho-Proteine, die mit GFP markiert waren, transient transfiziert und anschließend fixiert. Die Axonlänge,

Anzahl der Verzweigungen und Zellkörperfläche wurden gemessen. Der Student's t-Test ergab bei RhoA^{V14} und RhoA^{wt} signifikante Erhöhung der Axonlänge und der Axonverzweigung gegenüber der Kontrolle (Vektor). Bei den RhoA^{N19} und C3^{stau2}-E174Q ergab es keine signifikante Erhöhung; C3^{stau2}wt zeigte eine negative Wirkung auf Axonlänge sowie Axonverzweigung gegenüber Kontrolle. *p<0,05

Die Rho-Proteine werden durch Transfektion intrazellulär appliziertes C3-Exoenzym ADP-ribosyliert. Dadurch werden Rho-Proteine funktionell ausgeschaltet. Die Inaktivierung der Rho-Proteine führt zur Depolymerisation der Aktinfilamente, Veränderungen der Zellmorphologie und zu einer Abnahme des Zellwachstums. Diese Annahme wurde in unseren Versuchen mit C3-Exoenzym transfizierten Neuronen bestätigt, da sie ein vermindertes Wachstum (Axonlänge, Axonverzweigungen) zeigten. Mit C3^{stau2}wt transfizierte Neuronen zeigten eine hochsignifikante Abnahme der Axonlänge sowie Axonverzweigungen (Abbildung 19, Tabelle 4). Die intrazelluläre Applikation der C3-Toxine, die zu einem verminderten axonalem Wachstum führt, wurde wahrscheinlich durch die ADP-ribosylierung von Rho vermittelt.

Mit konstitutiv aktivem Rho (RhoA^{V14}) und Wildtyp Rho (RhoA^{W1}) transfizierte Neuronen zeigte eine starke Zunahme der Axonlänge und Axonverzweigungen. Bei den RhoA^{N19} und C3^{stau2}-E174Q transfizierten Zellen ergab es keine Veränderungen der Axonlänge und Axonverzweigungen gegenüber Kontrolle (Vektor).

In einem weiteren Versuch für die Aufklärung der Rho- abhängigen und unabhängigen Wirkung der C3-Proteine wurden die Konstrukte des C3^{bot} und seine enzymdefiziente Mutanten (Tabelle 4) auf die hippokampalen Neuronen untersucht. Dazu wurden die hippokampalen Neuronen mit enzymaktiven C3^{bot} sowie mit der enzyminaktiven Mutante (C3^{bot}-E174A) transient transfiziert. Anschließend wurden sie fixiert und unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie fotografiert (Abbildung 20).

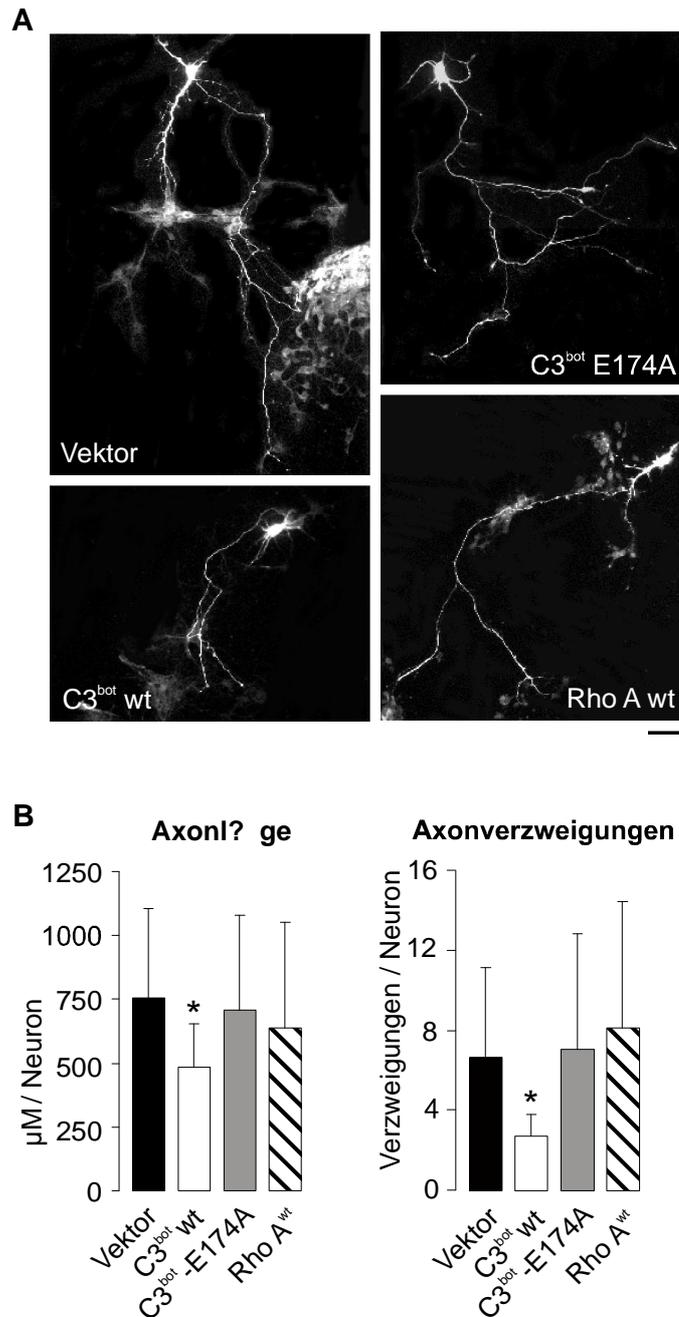


Abbildung 20

Morphologie der mit verschiedenen C3-Proteinen transfizierten hippocampalen Neuronen

A: Die hippocampalen Neuronen wurden mit verschiedenen rekombinanten Konstrukten der C3 Proteine, die mit GFP markiert waren, transient transfiziert, anschließend fixiert und unter Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die mit enzymaktiven C3^{bot} transfizierten Neuronen zeigen eine Reduzierung der Axonlänge sowie Axonverzweigungen wogegen die enzyminaktive Mutante (C3^{bot}-E174A) keinen Effekt gegenüber der Kontrolle zeigt. Der Maßstab beträgt 100µm.

B: Graphische Darstellung der morphometrischen Analyse transfizierter Neuronen

Die hippocampalen Neuronen wurden mit verschiedenen rekombinanten Konstrukten der C3-Proteine, die mit GFP markiert waren, transient transfiziert und anschließend fixiert. Die

Axonlänge, Anzahl der Verzweigungen und Zellkörperfläche wurden mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Neuroluzida, Neuroexplorer) gemessen. Student's t-Test ergab bei C3^{bot}-E174A keine signifikante Erhöhung der Axonlänge und der Axonverzweigungen gegenüber der Kontrolle (Vektor). Die Axonlänge sowie Axonverzweigungen bei den C3^{bot}wt waren gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert. *p < 0,05

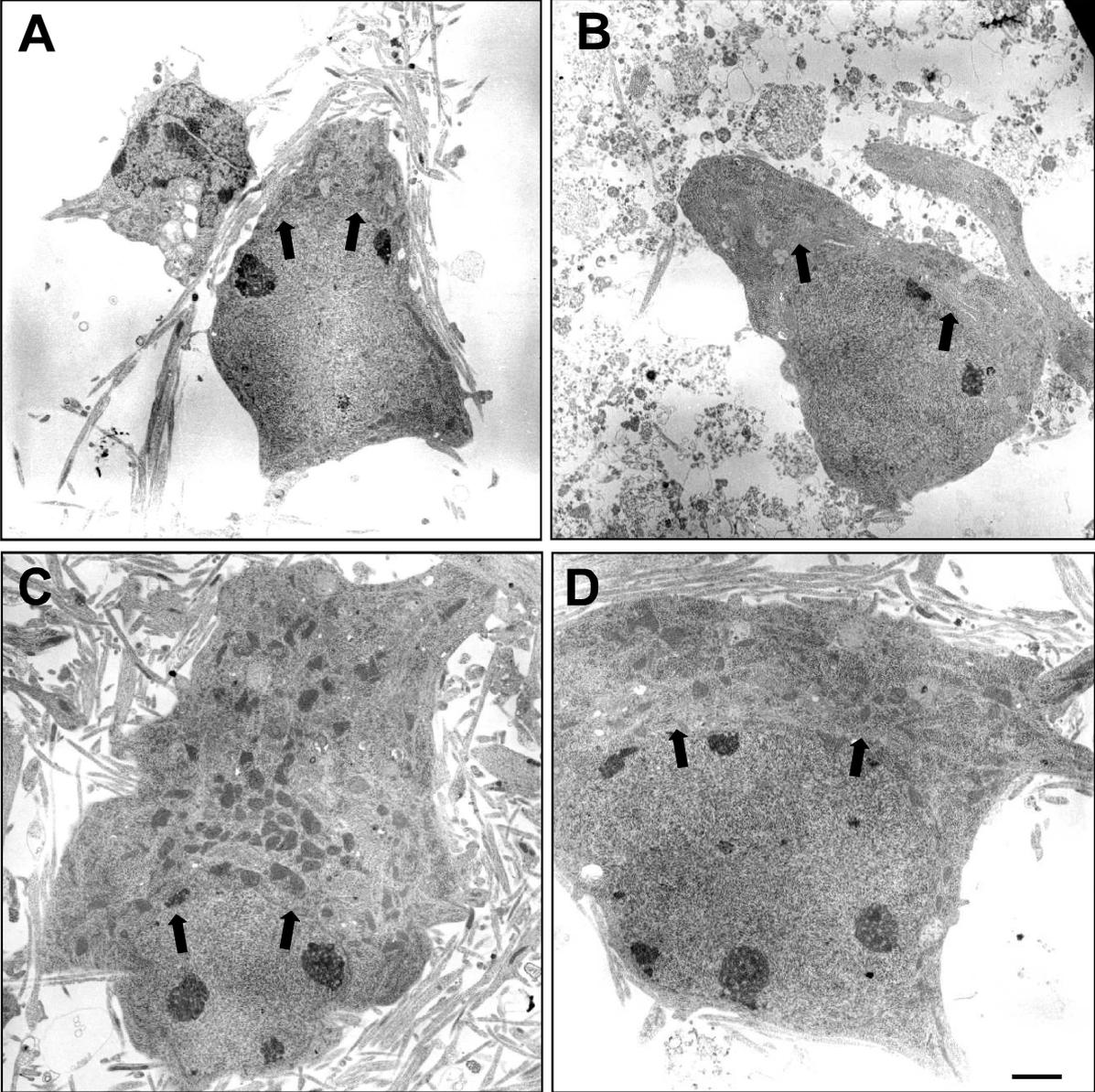
Die Ergebnisse der morphometrischen Messungen bestätigten den vorherigen Versuch. Wie erwartet, ergab es keinen signifikanten Unterschied für Axonlänge und Axonverzweigungen mit C3^{bot}-E174A transfizierten Neuronen gegenüber Vektor, da die enzymdefiziente Mutante intrazelluläres Rho nicht ADP-ribosylieren und somit nicht die Rho-abhängigen Veränderungen hervorrufen kann. Mit C3^{bot}wt transfizierte Neuronen zeigten eine hochsignifikante Abnahme des Axonwachstums (Axonlänge/Axonverzweigungen). Diese Beobachtung konnte dadurch erklärt werden, dass durch intrazellulär appliziertes C3^{bot}wt die Rho-Proteine inaktiviert wird, was zu einem verminderten Wachstum der Axone führt. Die mit enzyminaktiver Mutante (C3^{bot}-E174A) transfizierten Neuronen weisen diesen Effekt nicht auf und sind mit dem Vektor vergleichbar.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass enzymaktives C3-Toxin aus *Clostridium botulinum*, intrazellulär appliziert, zu Wachstumsinderung der Axone führt, wohingegen extrazellulär applizierte C3-Toxin in niedrigen Konzentrationen das Axonenwachstum verstärkt. Die intrazelluläre Applikation der C3-Proteine (C3^{bot} und C3^{stau2}) führt zur Inaktivierung der Rho-Proteine und somit zu Rho-abhängigen Veränderungen der Neuronen, während extrazellulär appliziertes C3^{bot} und seine enzymdefizienten C3-Mutante (C3^{bot}-E174Q) wahrscheinlich auf bisher unbekannte Wege Rho beeinflusst.

4.3.6. Ultrastrukturelle Analyse der mit rekombinantem C3-Protein behandelten Neuronen

Ob die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} (enzymaktiv/ inaktiv) auf ultrastruktureller Ebene Veränderungen hervorruft, soll in diesem Abschnitt geklärt werden. Dabei sollten subzelluläre Bereiche genauer betrachtet und die Frage geklärt werden, ob die Zellorganellen unter dem Einfluß von C3^{bot} (enzymaktiv/ inaktiv) degeneriert, vermehrt oder unverändert bleiben. Ultrastrukturelle Analysen mittels Elektronenmikroskopie können zudem Hinweise darüber liefern, welche Organellen unter der C3-Toxinbehandlung verstärkt betroffen sind. Für die Analyse der Ultrastruktur der mit C3-Proteinen behandelten Neuronen wurden die hippokampalen

Primärkulturen nach DIV1 mit verschiedenen rekombinanten C3-Proteinen für 6 Tage behandelt. Anschließend wurden die Zellkulturen für die elektronenmikroskopische Aufnahmen vorbereitet (s. Material und Methoden).



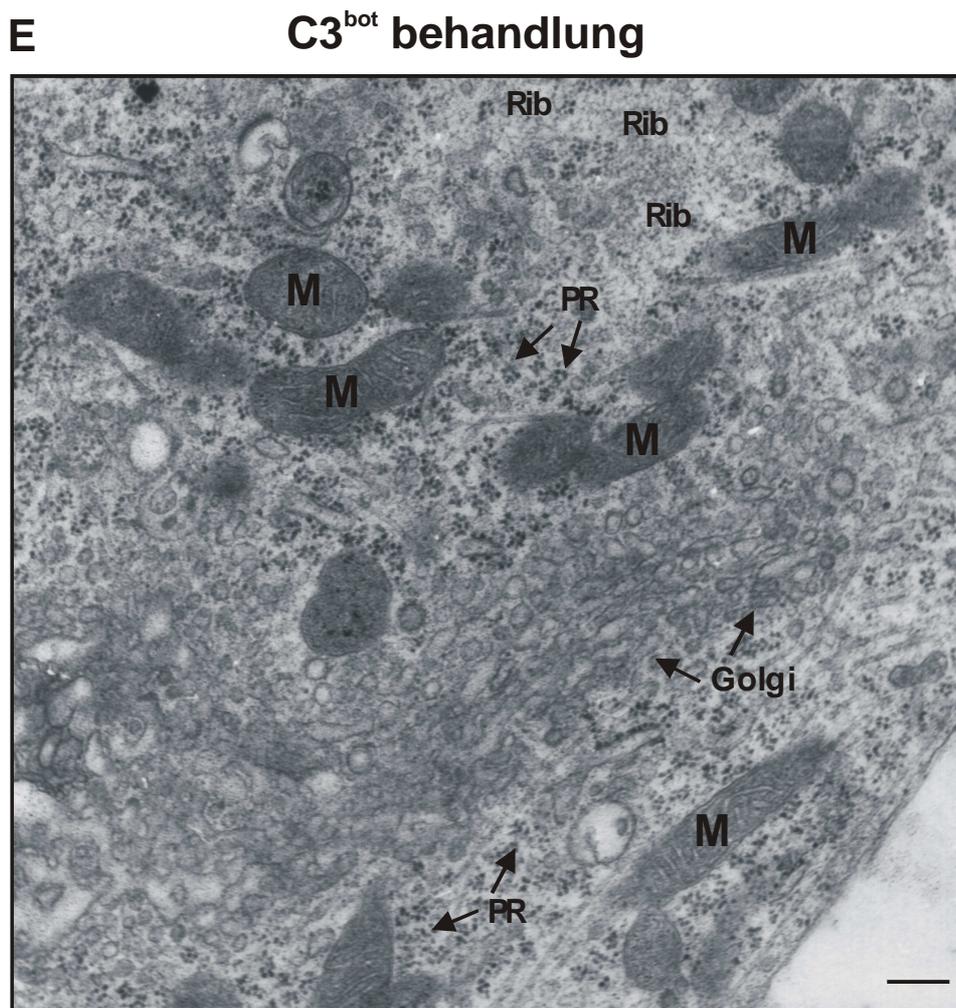


Abbildung 17

Elektronenmikroskopische Aufnahme der hippokampalen Primärkulturen nach der Behandlung mit C3-Proteinen

Hippokampale Primärkulturen (DIV7) wurden nach DIV1 für 6 Tage mit verschiedenen rekombinanten C3 Proteinen behandelt. Zur Darstellung der Ultrastruktur mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Zellen mit Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert, mit OsO_4 kontrastiert, mit Uranylacetat nachkontrastiert und in Epon eingebettet. Anschließend wurden Ultradünnschnitte angefertigt und elektronenmikroskopisch betrachtet. Die ultrastrukturellen Aufnahmen der mit verschiedenen rekombinanten C3 Proteinen behandelten Neuronen und unbehandelten Zellen sind hier gegenübergestellt. Für A, B, C und D ist der Maßstab $2,5\mu\text{m}$. Der Maßstab für E beträgt $0,6\mu\text{m}$.

A: Kontrollzellen. Perikaryen mit einem Kern und einem relativ kleinen Cytoplasma mit einigen Zellorganellen sind hier abgebildet. Der Pfeil deutet auf die Kernmembran hin.

B: Mit $\text{rC3}^{\text{stau}2}$ behandelten Zellen. Es ist kein Unterschied zu Kontrollzelle (Perikaryen mit einem Kern und einem relativ kleinen Cytoplasma mit einigen Zellorganellen) zu sehen. Der Pfeil deutet die Kernmembran an.

C: Mit $\text{rC3}^{\text{bot-E174Q}}$ (Enzymdefizient) behandelten Zellen. Es ist ein deutlicher Unterschied zur Kontrollzelle zu sehen. Das Cytoplasma ist sehr viel größer und enthält wesentlich mehr Organellen wie Mitochondrien und Ribosomen als die Kontrollen. Ein ausgeprägter Golgiapparat ist auch deutlich zu erkennen. Der Pfeil kennzeichnet die Kernmembran.

D: Mit rC3^{bot} behandelten Zellen. Im Gegensatz zur Kontrolle ist der Cytoplasma sehr viel größer und enthält wesentlich mehr Organellen wie Mitochondrien und Ribosomen. Ein ausgeprägter Golgiapparat ist auch deutlich zu erkennen.

E: Die Aufnahme einer mit rC3^{bot} behandelten Zelle in einer stärkeren Vergrößerung. Die Zellen zeigen einer starken Zunahme der darin befindlichen Organellen.

Golgi: Golgiapparat, M: Mitochondrien, PR: Polyribosomen, Rib: Ribosomen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen deuten eine erhöhte Stoffwechselaktivität der mit rC3^{bot} und rC3^{bot}-E174Q (enzymdefizient) behandelten Neuronen im Gegensatz zur Kontrolle an. Bei den rC3^{bot} und rC3^{bot}-E174Q behandelten Zellen sind ein größerer Zytoplasmasaum und wesentlich mehr Organellen zu beobachten.

Stärkere Vergrößerung (Abb. 21E) zeigt viele Mitochondrien, zahlreichen Ribosomen und einen vergrößerten Golgiapparat sowie Polyribosomen, was in den Kontrollkulturen nicht so ausgeprägt war. Der Organellenreichtum, insbesondere die erhöhte Mitochondrienanzahl sowie der deutliche ausgeprägte Golgiapparat, sind ein Hinweis für erhöhte Aktivität bzw. Proteinsynthese in den mit rC3^{bot} und rC3^{bot}-E174 behandelten Zellen. Diese erhöhte Proteinbiosynthese ist nur bei C3-Toxinbehandlung aus *Clostridium botulinum* und seine enzymdefiziente Mutante zu beobachten und nicht bei den Kontrollen.

4.3.7 Effekte der C3-Exoenzyme auf Astrozyten

Gliazellen stellen den Hauptanteil der Zellen im ZNS dar. Ihre funktionelle Bedeutung geht weit über das ursprüngliche Konzept, das ihnen eine reine Stützfunktion für die Neuronen zuschrieb, hinaus. Neuere Untersuchungen zeigen unter anderem, dass Gliazellen bei der Entwicklung des Nervensystems Leitstrukturen bilden oder an immunologischen Prozessen im Gehirn maßgeblich beteiligt sind. Man kennt drei Hauptzelltypen von Gliazellen: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia.

Primärkulturen aus dem embryonalen Hippokampus der Maus können abhängig vom Embryonalalter mehr oder weniger Astrozyten enthalten, obwohl die gewählten Bedingungen gliales Wachstum eher unterdrücken. Die Gliazellen, vornehmlich Astrozyten, setzen astrozytäre Faktoren wie ADNF (activity dependent neurotrophic factor), extrazelluläre Matrixsubstanzen, GDNF und TNF frei. Diese Substanzen könnten die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} beeinflussen oder selbst die neurotrophe Wirkung hervorrufen. So wird berichtet, dass von Astrozyten freigesetztes ADNF wiederum das Neurotrophin NT3 freisetzt, welches dann neurotroph wirkt (Blondel et al., 2000) oder dass GDNF und ähnliche Faktoren einen Einfluß auf die neuronale

Entwicklung nehmen (Airaksinen et al., 2002). Das von den Gliazellen freigesetzte TNF (Tumor-Nekrosefaktor) wiederum hemmt das Neuritenwachstum (Neumann et al., 2002). Es sollen daher die Effekte von C3-Exoenzymen auf die Gliazellen insbesondere auf die Astrozyten nachfolgend untersucht werden.

Dazu wurden die Gliazellen präpariert (Embryonaltag 17) und bis zu DIV6 kultiviert. Ab DIV1 wurden die Astrozyten mit verschiedenen C3 Proteinen (20nM) für 5 Tage behandelt. Die Zellkulturen wurden dann fixiert, mit anti-GFAP markiert und mit einem Zweitantikörper gegen Maus IgG, der mit CY2 gekoppelt ist, gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Astrozyten fotografiert (Abbildung 22a).

Anschließend morphometrische Messungen wurden an den aufgenommenen Astrozyten folgendermassen durchgeführt. Die morphometrische Messung startete zuerst an dem Zellkörper, er wurde umrandet. Dann erfolgte die Messung der Fortsätze ab Abgang vom Zellkörper. Als Fortsatzlänge wurde die Länge aller Fortsätze mit allen Verzweigungen bezeichnet. Die Gesamtlänge der Fortsätze und Gesamtanzahl der Verzweigungen wurden dann statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt (Abbildung 22b).

Es ergibt sich im Vergleich bei C3^{bot}ger. und rC3^{bot} behandelten Zellkulturen gegenüber den Kontrollkulturen ein hochsignifikanter Unterschied bezüglich der Fortsatzlänge und deren Verzweigungen. Die signifikante Erhöhung der Fortsatzlänge und Anzahl der Verzweigungen bis zu 300% belegen die trophische Wirkung der C3-Exoenzyme von *Clostridium botulinum* (C3^{bot}ger. und rC3^{bot}) auch in Astrozyten. Diese als Stellation bezeichnete morphologische Veränderung konnte bei den C3-Isoformen rC3^{lim} und bei rC3^{stau2} nicht festgestellt werden. Der Student's t-Test erbrachte keine Signifikanz bei rC3^{lim} und rC3^{stau2} im Bezug auf Gesamtlänge und Gesamtverzweigungen aller Fortsätze gegenüber den Kontrollen (Abbildung 22). Alle verwendeten enzyminaktiven rekombinanten C3-Proteinen (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) ergaben anders als bei den hippokampalen Neuronen keinen signifikanten Unterschied der Gesamtlänge und Gesamtverzweigungen aller Fortsätze. Die enzymdefizienten rekombinanten C3-Proteine haben die Fähigkeit, die Rho-Proteine zu ADP-ribosylieren und sie zu inaktivieren, verloren. Somit scheint die trophische Wirkung mit der ADP-Ribosyltransferase Aktivität gekoppelt bzw. Rho

vermittelt zu sein. C3^{lim} und C3^{stau} wirken bei höheren Konzentrationen also auch Rho-vermittelt.

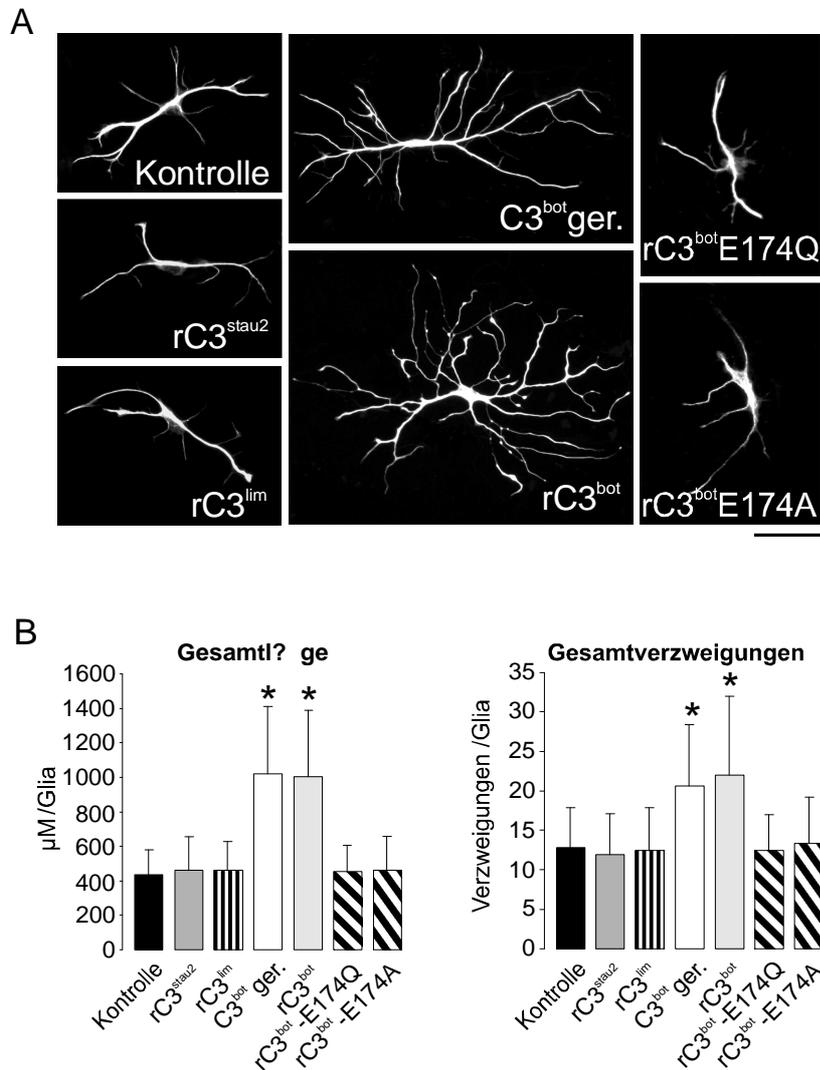


Abbildung 22

Effekte der verschiedenen C3-Proteine in Astrozyten

A: Mikroskopische Aufnahmen der Astrozyten nach der Applikation verschiedener C3-Proteine

Hippokampale Astrozyten wurden für 5 Tage mit verschiedenen rekombinanten C3-Proteinen sowie gereinigtem C3^{bot} aus *Clostridium botulinum* behandelt, fixiert und mit einem speziellen primären Antikörper gegen GFAP (glial fibrillary acidic protein) markiert und mit Fluoreszenz gekoppelten CY2 (Ziege anti-Maus IgG) detektiert. Mit C3^{bot} ger. und mit C3^{bot} rek. behandelte Gliazellen zeigen veränderte Morphologie der Astrozyten, die als Stellation bezeichnet werden gegenüber Kontrollzellen. Sowohl enzymdefiziente C3-Proteine (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) als auch enzymaktive C3-Isoformen (rC3^{stau2} und rC3^{lim}) bewirken keine Veränderung der Astrozyten gegenüber den Kontrollen. Der Maßstab beträgt 100µm.

B: Quantitative Analyse der Effekte verschiedene C3-Proteine in Astrozyten

Hippokampale Astrozytenkulturen wurden für 5 Tage mit verschiedenen rekombinanten C3-Proteinen sowie gereinigtem C3^{bot} aus *Clostridium botulinum* behandelt, fixiert und mit einem

speziellen primären Antikörper gegen GFAP (glial fibrillary acidic protein) markiert und mit Fluoreszenz gekoppelten CY2 (Ziege anti-maus IgG) visualisiert. Die Gesamtlänge der Fortsätze und die Gesamtanzahl der Verzweigungen wurden mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Neuroluzida, Neuroexplorer) gemessen. Aus 4 Präparationen wurden Kontrollneuronen (n=137) sowie C3^{bot}ger. (n=62), rC3^{bot} (n=115), rC3^{bot}-E174Q (n=101), rC3^{bot}-E174A (n=134), rC3^{lim} (n=89) und rC3^{stau2} (n=36) zusammengefasst und ausgewertet. Student's t-Test ergab gegenüber Kontrollen bei C3^{bot}ger. hochsignifikante Erhöhung der Fortsatzlänge ($p < 5,112E-36$) und Verzweigungen ($p < 2,337E-15$) aller Fortsätze; bei rC3^{bot} ebenfalls hochsignifikante Erhöhung der Fortsatzlänge ($p < 5,169E-40$) und Verzweigungen ($p < 1,585E-18$); bei rC3^{lim} keine signifikante Erhöhung der Fortsatzlänge ($p < 0,083244$) und Verzweigungen ($p < 0,299302$) aller Fortsätze; bei rC3^{stau2} ebenfalls keine signifikante Erhöhung der Fortsatzlänge ($p < 0,191$) und Verzweigungen ($p < 0,178$) sowie bei rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A keine signifikante Veränderungen der Fortsatzlänge ($p < 0,164$; $p < 0,065$) und Verzweigungen ($p < 0,266$; $p < 0,196$) aller Fortsätze. * $p < 0,05$

Zusammenfassend kann folgendes gesagt werden. Die signifikante Erhöhung der Fortsatzlänge und Anzahl der Verzweigungen belegen die trophische Wirkung der C3- Exoenzyme aus *Clostridium botulinum* (nativ sowie rekombinant) auch in Astrozyten, wogegen andere C3-Isoformen von *Clostridium limosum* und *Staphylococcus aureus* nicht die wachstumsfördernde Eigenschaft aufweisen. Der wesentliche Unterschied der Gliazellen gegenüber Neuronen besteht darin, dass die trophischen Effekte auf Astrozyten Rho- vermittelt und die der Neuronen u. U. Rho-unabhängig sind. Außerdem kann man schlussfolgern, dass die axonotrophe Wirkung des C3^{bot} wahrscheinlich direkt und nicht über gliale Faktoren vermittelt worden sind. Da C3^{bot} bei den Astrozyten ebenfalls wie bei den Neuronen in sehr niedrigen Konzentrationen stark wachstumsfördernd wirkt, scheinen sowohl Astrozyten als auch Neuronen eine extrazelluläre hochaffine Bindungsstelle zu besitzen, über die die C3-Proteine aus *Clostridium botulinum* (nativ sowie rekombinant) ihre Wirkung entfalten.

5 Diskussion

5.1 Primärkulturen des Hippokampus stellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung von neurotoxischen Effekten dar

In Kultur gebrachte Neurone aus dem embryonalen Hippokampus bilden zuerst kleine Fortsätze (Neuriten), die sich dann weiter zu einem Axon und mehrere Dendriten ausdifferenzieren (Craig et al., 1994). Während der Entwicklung durchlaufen sie mehrere Stadien (Stadium 1 bis 5) und bilden am Ende ein weit verzweigtes Fasernetz (Dotti et al., 1988). Die beiden Fortsatztypen unterscheiden sich in ihrer Morphologie und Proteinzusammensetzung. Sie besitzen die meisten typischen Eigenschaften entsprechender reifer Neuronen der in vivo Situation. Besonders zu erwähnen ist z.B. das Ausbilden von spannungsabhängigen Kaliumkanälen sowie das Ausbilden von speziellen Synapsen.

Die Expression von spannungsabhängigen Kaliumkanälen der Kv1 Kanal α -Untereinheiten (Kv1.1 bis Kv1.6) lässt sich gut in den Kulturen über mehrere Wochen nachvollziehen. So wird über die Bildung von Moosfasersynapsen berichtet, die während der mehrwöchigen Kultivierung zwischen den Pyramidenneuronen und den Körnerzellen entstehen (Große et al., 2000). Diese hochspezifischen Synapsen sind ein weiterer Hinweis dafür, dass sich in den Primärkulturen des Hippokampus wesentliche Merkmale der in vivo Situation entwickeln können.

Zudem erleichtern neuronale Primärkulturen durch ihre geringe Komplexität die genaue Analyse einzelner Neuronen. Darüber hinaus erlauben sie eine langanhaltende Manipulation über Wochen z.B. mit Insektiziden (Deltamethrin) oder verschiedenen Toxinen (Clostridiale Neurotoxine, C3-Exoenzyme). Eventuell dadurch stimulierte pathologische Störungen (aber auch positive Veränderungen) können anschließend untersucht werden. Somit stellen hippokampale Primärkulturen ein für diese Fragestellungen geeignetes Modellsystem zur Untersuchung zellbiologischer Prozesse dar.

5.2 Wirkung von Deltamethrin auf hippokampale Neuronen

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von Deltamethrin als ausgewähltem Vertreter der Insektizide auf die neuronale Entwicklung hippokampaler Zellkulturen untersucht.

5.2.1 Effekte von Deltamethrin auf die Überlebensfähigkeit der Neuronen: Die Synthese von synaptischen Proteinen und das Verteilungsmuster von Kaliumkanälen

Zuerst konnte festgestellt werden, dass Deltamethrin in niedrigen Konzentrationen (2nM-2µM) die Anzahl hippokampaler Neuronen um 16-40% reduziert. Alle untersuchten synaptischen Proteine (Synaptophysin, Synaptobrevin, Synapsin und SNAP25) sowie Kv1 Kanal α -Untereinheiten sind in Deltamethrinbehandelten Kulturen reduziert vorhanden. Während Synaptophysin gegenüber Deltamethrinbehandlung relativ resistent ist (25% Abnahme), scheinen die Kv1 Kanal α -Untereinheiten, speziell Kv1.1 sehr sensibel zu reagieren (64% Abnahme). Die SNARE-Proteine reagieren also empfindlicher auf Deltamethrin als Synaptophysin. Die Reduzierung der synaptischen Proteine korreliert mit der Verringerung der Synapsenzahl. Die verminderte Expression der Kaliumkanäle der Kv1-Familie deutet auf Funktionsverluste der Neuronen hin. Die Verminderung der synaptischen Proteine sowie der Kaliumkanäle der Kv1-Familie können als Zeichen der neuronalen Degeneration gewertet werden.

Weiterhin ist bekannt, dass Deltamethrin spannungsabhängige Natriumkanäle in den Neuronen aktiviert (Narahashi 1996). Dies führt zur anhaltenden Depolarisation und in Folge dessen zu einer Erhöhung der freien Calciumkonzentration. Die intrazellulär erhöhte Calciumkonzentration bewirkt die Ausschüttung verschiedener Transmitter (Zhao et al., 1997; Hossain et al., 2004). Darüber hinaus wurde unter Deltamethrin-Behandlung nach K^+ -Stimulation eine erhöhte GABA-Sekretion beobachtet (Große et al., 2002). Zudem bewirkt Deltamethrin die Hemmung der Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme, wie z.B. der GABA-Transferase (Ji et al., 2003), und somit eine Erhöhung der Transmitterkonzentration in vivo. Kürzlich wurde unter Deltamethrinzugabe die vermehrte Expression von *c-Fos* und *c-Jun*, beides Protoonkogen-Proteine, beobachtet (Wu et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass Deltamethrin induzierte Neurodegeneration über Glutamat-abhängige Signaltransduktionswege reguliert werden kann.

Längere Einwirkung von Deltamethrin verursacht Degenerationen, speziell von Nervenzellen und somit eine Verminderung der Zellzahl. Die durch Deltamethrin induzierte Degeneration und der apoptotische Zelltod der Hirnzellen der Ratte (Wu et al., 2000) werden vermutlich durch die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, aber auch durch die Modulation von Apoptose-relevanten Genen *p53* und *Bax*, die

nach der Deltamethrin-Behandlung erhöht exprimiert werden, hervorgerufen (Wu et al., 2000; Wu et al., 2003b). In diesem Zusammenhang wird auch die Rolle von NOS (Nitric Oxid Synthase) als Mediator der Apoptose diskutiert, da eine vermehrte Aktivität der NOS und PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) nach Behandlung mit Deltamethrin beobachtet wurden (Wu et al., 1999). Für den programmierten Zelltod nach Deltamethringabe spielen zudem die Veränderung der Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase/Phosphatase eine Rolle (Enan et al., 1996). Dieser Sachverhalt korreliert mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit über eine schädigende Wirkung von Deltamethrin auf Neuronen. Obwohl die Deltamethrinkonzentration in diesen in vivo Experimenten schwer mit den hier durchgeführten in vitro Experimenten vergleichbar ist, weisen die Daten auf eine apoptotische Schädigung der Neuronen unter Deltamethrin in vitro hin.

Deltamethrin bewirkt die vermehrte Expression der Protoonkogene *c-Fos* und *c-Junc*, was darauf hindeutet, dass die Deltamethrin-induzierte Neurodegeneration über Glutamat-abhängige Signalwege reguliert werden kann (Wu et al., 2003).

Das Alter der Embryonen (E16, E17 oder E18) sowie die Häufigkeit der Applikation scheint keinen Einfluß auf die Wirkung von Deltamethrin in hippokampalen Kulturen zu haben. Eine größere Anzahl der Neuronen reagiert offensichtlich nicht auf die Behandlung mit Deltamethrin. Jedoch scheinen in hippokampalen Kulturen Subpopulationen von Neuronen vorzukommen, die auch auf sehr geringe Deltamethrinkonzentrationen empfindlich reagieren.

5.2.2 Deltamethrin wirkt unterschiedlich auf Neuronensubpopulationen

In hippokampalen Kulturen werden die Ca^{2+} -bindenden Proteine Calretinin und Calbindin exprimiert. Calbindin kommt sowohl in kleinen Körnerzellen als auch in großen pyramidalen Neuronen und in GABAergen Neuronen vor. Die peptidergen Transmitter Somatostatin und NPY werden in Subpopulationen einiger GABAerger Neuronen exprimiert.

Alle aufgeführten peptidergen Transmitter konnten in unseren hippokampalen Kulturen nachgewiesen werden. Toxische Einflüsse von Deltamethrin auf neuronales Überleben wurden bei Deltamethrinkonzentration von 2nM-2µM beobachtet. Trotz

hoher Deltamethrin-Konzentration überlebten eine große Anzahl der Neuronen (ca. 70%), welche typische neuronale Strukturen aufwiesen. So wurden nach Deltamethrin-Behandlung bei Calcineurin- und Calretinin-positiven Neuronen keine Effekte beobachtet. Die sehr kleine Anzahl an Calcineurin-positiven Neuronen in dem Kultursystem macht eine Quantifikation unmöglich. In der Literatur ist beschrieben, dass Deltamethrin die Phosphataseaktivität von Calcineurin hemmt (Enan und Masumara, 1992). Dieser Effekt wurde jedoch bei gereinigtem Calcineurin nicht bestätigt (Fakata et al., 1998). Aufgrund der sehr kleinen Anzahl Calcineurin-positiver Neuronen müsste ein anderer Mechanismus als die Hemmung der Phosphataseaktivität für die Deltamethrin-Effekte verantwortlich sein.

Die Deltamethrin-Behandlung (2nM) reduzierte die Zahl an Calbindin-positiver Neuronen um 50%, wobei vornehmlich der Körnerzellen betroffen waren. Eine ebenfalls verminderte Calbindin-Expression konnte in *in vivo* Experimenten noch gemessen werden, in denen der Rückgang von Calbindin-positiven Körnerzellen des Gyrus dentatus nach wiederholten Elektroschocks (Tonder et al., 1994a), Kindling (Tonder et al., 1994b) oder Kainicäure induzierten „Krämpfen“ (Yang et al., 1997) zu beobachten war. Die gleiche Behandlung führt zu einer Verminderung der somatostatinerger- und zur Erhöhung der NPY-positiven Neuronen (Tonder et al., 1994b). Weitere Arbeiten mit Mäusemutanten (Epilepsie) weisen auf den gleichen Effekt hin (Erhöhung der NPY-positiven Neuronen und Verminderung der somatostatinerger Neuronen; Takahashi et al., 2000). Diese Beobachtungen korrelieren mit unseren Ergebnissen unter Deltamethrinanwendung. Es wurden bei den somatostatinerger Neuronen eine mehr als 60%ige Reduktion und in NPY-haltigen Neuronen eine ca. 300%ige Zunahme der Immunreaktivität in den Fortsätzen unter Deltamethrinzugabe (2nM) gemessen.

Im hippocampalen Netzwerk *in vivo* stellt die Übererregbarkeit ein generelles Muster der neuronalen Regulation dar, die mit einer Abnahme der Calbindin-positiven Körnerzellen sowie der somatostatinerger Neuronen und einer Zunahme der NPY-positiven Neuronen einhergeht. Somit könnte Deltamethrin für die Beantwortung der Fragen über neuronale Regulationskaskaden *in vitro*, die durch aufwendige Epilepsie-Modelle *in vivo* erreicht werden, Verwendung finden.

5.3 C3 ADP-Ribosyltransferasen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von C3 ADP-Ribosyltransferasen (C3-Exoenzyme) auf sich entwickelnde hippokampale Neuronen untersucht. Dabei sollten hauptsächlich die strukturelle bzw. morphologische Konsequenzen der Behandlung mit bakteriellen Proteinen der C3-Exoenzyme von Neuronen und gliale Zellen aufgezeigt werden.

Dabei wurden folgende Ergebnisse u.a. erhalten:

1. C3-Exoenzym aus *Clostridium botulinum* (C3^{bot}ger. und C3^{bot}rek.) fördert in hippokampalen Neuronen axonales Wachstum und Verzweigung in sehr niedrigen Konzentrationen (20nM).
2. C3-Isoformen aus *Clostridium limosum* (C3^{lim}) und *Staphylococcus aureus* (C3^{stau2}) weisen diese neurotrophischen Effekte nicht auf und wirken eher hemmend.
3. Durch Transfektion intrazellulär applizierte C3-Proteine (C3^{bot}, C3^{lim} und C3^{stau2}) wirken ebenfalls hemmend auf das axonales Wachstum.
4. Expression von konstitutiv aktivem Rho (Rho^{V14}) hat eine positive Wirkung auf das Wachstum von Axonen.
5. In nanomolaren Konzentrationen extrazellulär applizierte enzymdefiziente C3^{bot} Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) führen zu signifikant erhöhtem axonalem Wachstum und einer verstärkten Verzweigung.
6. Astrozyten zeigen ebenfalls starke trophische Effekte unter C3^{bot} Behandlung, jedoch sind diese Effekte abhängig von der funktionstüchtigen ADP-Ribosyltransferase.

5.3.1 Rho-Effekte auf das neuronale Wachstum

Das Neuritenwachstum wird durch Veränderungen des Zytoskeletts vorangetrieben. Rho-Proteine spielen dabei eine wesentliche Rolle (Bradke und Dotti, 1999). Sie sind an Wachstumskolben stark angereichert (Renaudin et al., 1999) und regulieren über die Aktivierung/Inaktivierung die neuronalen Differenzierungsschritte. Die extrazellulären Signalmoleküle wie Semaphorine, Slits, Ephrine, Chemokine und neurotrophine sowie lokale Substraten können auch über den Rho-Weg an den Differenzierungsprozessen beteiligt sein. Lokale Konzentrationen einzelner Rho-GTPasen bestimmen die Präferenz für den einen oder anderen Signalweg (Arakawa et al., 2003) und können sich aber auch gegenseitig beeinflussen (Yuan et al., 2003).

In Neuronen scheinen Rho-abhängige Signalkaskaden in Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe und den Anforderungen aus der Umgebung zu variieren (Luo L., 2002).

Rho-abhängige und unabhängige Effekte

In unseren hippokampalen neuronalen Primärkulturen, die auf neutralem Substrat und ohne Serum kultiviert wurden, führte die Expression von aktivem Rho (Rho^{V14}) zu einem verstärkten axonalen Wachstum. Durch intrazellulär appliziertes C3^{bot}, C3^{lim} und C3^{stau2} inaktiviertes RhoA führt über die Blockierung der Rho-abhängigen Signalwege zur Hemmung des Wachstums (Axonen). Transfektion mit dominant negativem RhoA-N19 führt zu hemmenden Effekten auf die Axonlänge und die Anzahl der Verzweigungen, wogegen dendritisches Wachstum und Verzweigung durch konstitutiv aktives RhoA-V14 gehemmt wird. Extrazellulär appliziertes C3^{lim} und C3^{stau2} vermindern ebenfalls durch Inaktivierung von Rho axonales Wachstum. Intrazellulär exprimiertes C3^{bot}-E174Q/A blieb jedoch ohne Effekt. Hieraus kann gefolgert werden, dass aktives Rho zumindest in diesem Entwicklungsstadium förderlich für axonales Wachstum ist. Die Inaktivierung von Rho hat demzufolge einen negativen Einfluss auf das axonales Wachstum. Der wachstumsfördernde Effekt der untersuchten C3-Isoformen ist bei den Dendriten von der enzymatischen Aktivität abhängig (Ahnert-Hilger et al., 2004).

Die in vivo Untersuchungen an Drosophila RhoA Deletionsmutanten zeigen, dass für eine korrekte Gestaltung von Axonen hinsichtlich ihres Wachstums, der Verzweigung und der Verteilung der synaptischen Vesikel Rho nicht notwendig ist, dendritisches Wachstum aber durch Rho gehemmt wird (Lee et al., 2000). In der Literatur ist weiterhin beschrieben, dass Inaktivierung von RhoA mit C3-Proteinen den Kollaps von Wachstumskegeln aufhebt (Jin und Strittmatter 1997) und das Wachstum von Neuriten und retinaler Ganglienzelle fördert (Lehmann et al., 1999; Yamashita et al., 1999; Bito et al., 2000; Dergham et al., 2002). Zurzeit werden die das Neuritenwachstum fördernde Effekte der C3-Proteine (C3^{bot}) mit der Inaktivierung von Rho in Verbindung gebracht, da Rho axonales Wachstum negativ reguliert und die Hemmung von Rho durch C3-katalysierte ADP-Ribosylierung diese negative Wirkung antagonisiert.

Weiterhin ist bekannt, dass RhoA unterschiedliche Effekte auf Axone über verschiedene Signaltransduktionswege entfalten kann. So wird die Aktivierung von RhoA über Rho/ ROCK-Signalweg negativ auf Axonen und positiv über Rho/ mDia1-Signalweg (Arakawa et al., 2003) beeinflusst.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass aktives Rho axonales Wachstum in hippokampalen Neuronen fördert. Ein ähnlich positiver Effekt findet sich auch bei kortikalen Neuronen (Threadgill et al., 1997). Diese Beobachtungen könnten dadurch zu erklären sein, dass serumhaltige Medien für die Versuche verwendet wurden, die wachstumsfördernde oder hemmende Serumkomponenten enthielten. Serum enthält z.B. LPA, das über EDG-Rezeptoren, die an G α 12/13 gekoppelt sind, eine Verkürzung von Neuriten (Kranenburg et al., 1999) bewirkt. Andere neurotrophe Faktoren wie BDNF können ebenfalls Rho-abhängige Signalkaskaden aktivieren. Ein weiterer entscheidender Faktor scheint das Alter der untersuchten Zellen zu sein. So befassen sich die meisten Untersuchungen mit dem Auswachsen bzw. dem Kollaps von Wachstumskegeln von noch undifferenzierten Fortsätzen. Zudem sind die Rho-Effekte abhängig vom Differenzierungsstadium der Neuronen und der davon abhängigen Rho-Expression. Ein anderer Aspekt könnten die C3-Konzentrationen, die bei den Untersuchungen verwendet wurden, darstellen. Viele dieser Studien wurden mit transfizierten Rho-Mutanten oder durch mechanische Trituration mit C3-Transferasen in höheren Konzentrationen (μ molar) durchgeführt. Die in unseren Untersuchungen verwendeten C3-Transferasen wurden in nanomolaren Konzentrationen, dem Medium appliziert.

Rho-Proteine sind in alle Entwicklungsschritte der Neuronen involviert. Zudem scheint aktiviertes Rho(A) mit anderen Rho-Proteinen wie Rac zu interagieren, erhöht das Wachstum von Axonen in bereits differenzierten Neuronen und vermittelt korrekte Lenkung durch Vermeidung von inhibitorischen Substraten.

Enzymdefiziente C3^{bot} Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) führen zu einer Axonverlängerung und erhöhen die Zahl der Verzweigung. Diese C3^{bot} Mutanten können Rho nicht ADP-ribosylieren. Daher können die neurotrophischen Effekte nicht durch die Hemmung der Rho-Proteine vermittelt worden sein. Intrazelluläre Expression von enzymdefizienten C3^{bot} Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) haben keinen Einfluss auf axonales Wachstum. C3^{bot} und seine enzymdefiziente

Mutanten müssen daher extrazellulär wirken, vergleichbar einer Ligandenwirkung. Darüber hinaus muss die extrazelluläre C3^{bot} Wirkung dominant über die intrazelluläre sein, da Expression von C3^{bot} in den Neuronen und die extrazelluläre Applikation gegensätzliche Effekte haben. Damit scheint C3^{bot} neben seine Enzymaktivität eine bisher unbekannte neurotrophe Wirkung zu besitzen, die nicht an der enzymatischen Aktivität gekoppelt ist und nicht direkt über Rho vermittelt wird.

C3^{bot} sowie die enzymdefizienten Mutanten binden wahrscheinlich wie ein neurotropher Faktor an einen Rezeptor der neuronalen Zellmembran. Sie könnten wie die Neurotrophine die Rezeptorkinasen wie trkA, trkB oder trkC direkt aktivieren und dadurch die neurotrophe Wirkung befördern oder als Rezeptor-Antagonist auf p75^{NTR} wirken und dadurch ihre neurotrophe Wirkung entfalten (Lee et al., 2001).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegen eine erhöhte Aktivität der mit C3^{bot} und rC3^{bot}-E174Q (enzymdefizient) behandelten Neuronen. So konnte in den mit C3^{bot} und rC3^{bot}-E174Q behandelten Neuronen eine sehr starke Zunahme von Organellen wie Mitochondrien, Ribosomen beobachtet werden. Die ultrastrukturellen Befunde unterstützen ein gesteigerte Proteinbiosynthese, die für das erhöhte Wachstum erforderlich ist.

Die in neuronalen Primärkulturen eventuell vorhandenen Gliazellen, vornehmlich Astrozyten, könnten die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} beeinflussen. Es ist bekannt, dass von Astrozyten freigesetztes ADNF (activity dependent neurotrophic factor) zur Freisetzung von Neurotrophin führt, welches dann neurotroph wirkt (Blondel et al., 2000). Zudem sind GDNF und ähnliche Faktoren bekannt, die durch RET-tyrosinkinase Rezeptoren einen Einfluss auf die neuronale Entwicklung nehmen (Airaksinen et al., 2002). Um mögliche C3-vermittelte Effekte auf Astrozyten zu untersuchen, wurden die Astrozyten mit C3-Exoenzymen behandelt und auf eventuelle trophische Wirkung hin untersucht.

5.3.2 Effekte der C3-Exoenzyme auf Astrozyten

Die signifikante Erhöhung der Fortsatzlänge und der Anzahl der Verzweigungen bis zu 300% belegen die trophische Wirkung der C3-Exoenzyme von *Clostridium botulinum* (C3^{bot}ger. und C3^{bot}rek.) auch auf Astrozyten. Diese als Stellation bezeichnete morphologischen Veränderungen wurden bei den enzymdefizienten C3-

Exoenzymen (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) nicht nachgewiesen. Die trophischen Effekte der Astrozyten sind also wahrscheinlich über Rho vermittelt. Zudem geben sie Hinweise darauf, dass die neurotrophen Effekte der C3-Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) spezifisch für Neuronen und nicht durch Effekte der Astrozyten, die in allen neuronalen Kulturen vorkommen, vermittelt worden sind.

Aufgrund der wirksamen niedrigen Konzentrationen scheinen Astrozyten ebenfalls über eine sehr affine Bindungsstelle zu verfügen, über die die enzymatisch aktive C3^{bot} in die Zelle gelangt.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden. C3^{bot} besitzt zwei biochemische Wirkungsmechanismen: Rho-abhängige und Rho-unabhängige. Extrazellulär appliziertes C3^{bot} wirkt in sehr niedrigen Konzentrationen axonotroph, ein Effekt, der nicht über die ADP-Ribosylierung der Rho-Proteine vermittelt wird. Dies ist bisher einzigartig in der Familie der C3-Proteine, da andere C3-Isoformen diesen neurotropischen Effekt nicht aufweisen. Jedoch scheinen die Effekte von C3^{bot} bei den Astrozyten und in den Dendriten Rho-abhängig zu sein (Ahnert-Hilger et al., 2004). Die nun vorgestellten Untersuchungen belegen, dass C3^{bot} sowie die enzymdefizienten Mutanten eine bisher unbekannte neurotrophe Eigenschaft besitzen, die wahrscheinlich durch einen membranständigen Rezeptor vermittelt wird.

Die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Ahnert Hilger und Prof. Dr. Ingo Just haben sich weiterhin mit der Frage, die für die neurotrophe Funktion zuständige Sequenzbereich und der Aufklärung der Signalwege, die durch den neurotrophen Faktor C3^{bot} und C3^{bot}-E174Q/A aktiviert werden, beschäftigt. Dabei wurden folgende Erkenntnisse erzielt:

1. Clostridium botulinum C3 Protein induziert bei den Astrozyten die Stellation sowie einer verstärkten Migration

Wie schon erwähnt, C3^{bot} nicht jedoch die C3^{lim} und C3^{stau} zeigt in nanomolaren Konzentrationen den als Stellation bezeichneten trophischen Effekt. Enzyminaktive Mutanten zeigen diese Effekte nicht. Zudem wurde das Migrationverhalten innerhalb „scratch-wound“ Assays als Modell für gliale Narbenbildung untersucht. C3^{bot} bedingte Hemmung der Rho-Aktivität beschleunigt die Migration von Astrozyten und somit fördert möglicherweise eine gliale Narbenbildung *in vivo* nach Läsionen (Höltje et al., 2005).

2. Clostridium botulinum C3 Protein verstärkt bei den Astrozyten die Aufnahme und Freisetzung von Glutamat

Nach der Inkubation mit C3bot konnte eine Hochregulation der glialen Glutamat-Transporter der Plasmamembran GLAST (Glutamat-Aspartat-Transporter) und GLT-1 (Glutamat-Transporter 1) in den stellaren Zellen nachgewiesen werden. Diese Ereignisse gehen mit einer verstärkten Aktivierung (nukleäre Lokalisation) des Transkriptionsfaktors NF κ B einher. Diese Daten belegen, dass durch die C3bot vermittelte Hemmung von Rho in Astrozyten neben strukturellen auch zu erheblichen funktionellen Veränderungen führt. Sie spielt bei der Glutamathomöostase und damit auch für die Funktionsweise von Neuronen im Hinblick auf degenerative sowie regenerative Prozesse eine entscheidende Rolle (Höltje et al., 2008).

3. Clostridium botulinum C3 Protein induziert eine proinflammatorische Antwort in Mikroglia

C3bot induziert auch in Mausmikroglia starke morphologische Veränderungen, die durch die vermehrte Ausbildung feiner Fortsätze sowie das Auftreten von vesikulären Strukturen im Zytoplasma. Neben der beobachteten morphologischen Veränderungen konnte auch die Sekretion typischer proinflammatorischer Mediatoren, wie etwa Stickstoffmonoxid (NO) sowie verschiedene Zytokine und Chemokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1alpha (MIP-1 α) sowie CXCL-1 nachgewiesen werden. Diese Daten belegen also eindeutig eine entscheidende Bedeutung von Rho für Mechanismen, die eine proinflammatorische Antwort in Mikroglia induzieren. Sie legen weiterhin nahe, dass der Einsatz von C3bot zu starken Effekten auf Mikroglia führt, die auch neuronale Regeneration beeinflussen könnten (Hoffmann et al., 2008).

4. Ein 29 Aminosäuren langes Fragment von C3bot ist verantwortlich für neuronales Wachstum, Konnektivität und Regeneration

Bisher konnte für C3bot eine nicht enzymgebundene Aktivität, die sich als spezifisch für Neurone nicht jedoch für Astrozyten und Mikroglia, nachgewiesen werden. Auf der Suche nach der neurotroph wirksamen Bereich von C3bot wurde ein Peptidfragment C3bot154-182, ein 29 Aminosäuren langer Sequenzbereich, identifiziert werden. Mit diesem Peptidfragment konnte die Morphologie und Konnektivität dissoziierter Neurone positiv beeinflusst werden. An den organotypischen Modellsystemen konnte mit Hilfe dieses Fragmentes neuronales

Auswachsen und Reinnervation gefördert werden. Diese Befunde lassen C3bot154-182 als hochattraktiven Kandidaten zur spezifischen Förderung neuronaler Regeneration erscheinen (Höltje et al., 2009).

Insgesamt liefern die bisherigen Ergebnisse einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Bedeutung von Rho-GTPasen für morphologische und funktionelle Mechanismen in Neuronen und glialen Zellen. In Astrozytenkulturen kommt es nach Inhibition der Rho-Kinase ROCK zu einer vermehrten Expression von wachstumshemmenden Chondroitin-Sulfat Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix. Diese auch in glialen Narben stark vorhandenen Matrixkomponenten führten zu einem verminderten Auswachsen der Neuronen (Chan et al., 2007). Auf das Axonwachstum direkt positiv wirkende Effekte sind so verstärkt hemmenden Einflüssen innerhalb glialer Narben entgegengestellt.

Die nicht an die enzymgebundene neurotrophe Aktivität des C3bot bzw. C3bot154-182 scheint spezifisch für Neurone zu sein. Das kleine Peptidfragment C3bot154-182 könnte aufgrund des kleineren Molekulargewichts und der daraus resultierenden geringeren Immunogenität im therapeutischen Einsatz gegenüber dem C3bot mögliche Vorteile bieten. Somit könnte C3bot154-182 als hochattraktiven Kandidaten zur spezifischen Förderung neuronaler Regeneration Verwendung finden.

6 Zusammenfassung

Hippokampale Primärkulturen der Maus stellen ein häufig benutztes Modellsystem zur Untersuchung zellbiologischer und degenerativer Prozesse dar. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von Deltamethrin als ausgewähltem Vertreter der Insektizide auf die neuronale Entwicklung hippokampaler Zellkulturen untersucht. Dabei wurde die Überlebensfähigkeit der hippokampalen Neurone nach Gabe von Deltamethrin sowie die Effekte von Deltamethrin auf die Synthese synaptischer Proteine und das Verteilungsmuster von Kaliumkanälen untersucht. Wiederholte Gabe von Deltamethrin (2-2000nM) reduziert die Anzahl hippokampaler Neurone um 16-40%. Neuronale Degeneration wurde von der Abnahme der synaptischen Proteine (21-35%) und synaptischen Kontakte (ca. 60%) begleitet. Alle untersuchten synaptischen Proteine (Synaptophysin, Synaptobrevin, Synapsin und SNAP25) sowie Kv Kanal α -Untereinheiten kommen in Deltamethrin behandelten Kulturen reduziert vor. Während Synaptophysin gegenüber Deltamethrin-Behandlung relativ resistent (25% Abnahme) ist, reagieren die Kv Kanal α -Untereinheiten, speziell Kv1.1 (64% Abnahme) sehr sensibel.

Trotz hoher Deltamethrinkonzentration überlebten eine große Anzahl der Neurone (ca. 70%), welche typische neuronale Strukturen aufwiesen. Somit scheint es, dass in hippokampalen Kulturen Subpopulationen von Neuronen vorzukommen, die eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Deltamethrin aufweisen. Die Deltamethrin-Behandlung reduzierte die Zahl an Calbindin-positiven Neuronen um 50%, vornehmlich der Körnerzellen sowie somatostatinerger Neurone um 60%, jedoch stieg die Anzahl der NPY-haltiger Neurone um 250% an.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von C3 ADP-Ribosyltransferasen, die von verschiedenen Bakterienstämmen wie *Clostridium botulinum* (C3^{bot}), *Clostridium limosum* (C3^{lim}) und *Staphylococcus aureus* (C3^{stau2}) produziert werden, auf die sich entwickelnde hippokampalen Neuronen untersucht. Alle diese Exoenzyme besitzen die ADP-Ribosyltransferase Aktivität, die die Rho Proteine A, B und C durch ADP-ribosylierung inaktivieren. Die mit C3-Exoenzymen aus *Clostridium botulinum* (C3^{bot}) im nanomolaren Bereich behandelten Neurone zeigten eine hochsignifikante Erhöhung der Axonlänge (ca. 70%) und Axonverzweigung (ca. 30%). C3 -Isoformen wie C3^{stau2} und C3^{lim} wiesen diese wachstumsfördernde Eigenschaft nicht auf. Die

Enzym-defiziente C3^{bot} Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) zeigten ebenfalls signifikant erhöhtes axonales Wachstum (Länge und Verzweigung). Diese C3^{bot} Mutanten ohne ADP-Ribosyltransferase Aktivität können Rho nicht ADP-ribosylieren. Daher können die neurotropischen Effekte der C3^{bot} Proteine (C3^{bot} und rC3^{bot}-E174A/Q) nicht durch die Inaktivierung der Rho Proteine vermittelt worden sein. Somit besitzen C3^{bot} Proteine eine bisher unbekannte neurotrophe Wirkung, die nicht an seine enzymatische Aktivität gekoppelt ist. C3^{bot} Proteine binden wahrscheinlich wie einem neurotrophen Faktor an einem Rezeptor der neuronalen Zellmembran, wodurch die Signale dann weitergeleitet werden.

Die mit enzymatisch aktiven C3^{bot} und C3^{stau2} transfizierten Neurone zeigten eine signifikante Reduzierung der Axonlänge (ca. 30%) und Axonverzweigungen (ca. 40%). Die intrazelluläre Expression der C3 Proteine (C3^{bot} und C3^{stau2}) reduziert axonales Wachstum (Länge und Verzweigung). Da die Expression von enzymdefizientem C3 Mutanten (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) keine Wirkung auf Axone zeigen, wurden die Wirkung von enzymdefizientem C3 Mutanten extrazellär vermittelt. Durch die ultrastrukturellen Aufnahmen konnte die wachstumsfördernde Wirkung von C3^{bot} (enzymdefizient und enzymaktiv) bestätigt werden.

Die signifikante Erhöhung der Fortsatzlänge und Anzahl der Verzweigungen bis zu 300% belegen die trophische Wirkung der C3 Exoenzyme von Clostridium botulinum (C3^{bot}) auch bei Astrozyten. Diese als Stellation bezeichnete morphologische Veränderung wurde bei enzymdefizienten C3 Exoenzymen (rC3^{bot}-E174Q und rC3^{bot}-E174A) nicht nachgewiesen. Astrozyten scheinen ebenfalls über eine sehr affine Bindungsstelle zu verfügen, über die enzymatisch aktives C3^{bot} in die Zelle gelangt.

7 Literaturverzeichnis

- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 1991, Oct 17; 353(6345):668-70.
- Adam-Vizi V, Rosener S, Aktories K, Knight DE. Botulinum toxin-induced ADP-ribosylation and inhibition of exocytosis are unrelated events. *FEBS Lett.* 1988, Oct 10; 238(2):277-80.
- Ahnert-Hilger G, Höltje M, Grosse G, Pickert G, Mucke C, Nixdorf-Bergweiler B, Boquet P, Hofmann F, Just I. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem.* 2004, Jul;90(1):9-18.
- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002, May;3(5):383-94.
- Aktories K, Frevert J. ADP-ribosylation of a 21-24 kDa eukaryotic protein(s) by C3, a novel botulinum ADP-ribosyltransferase, is regulated by guanine nucleotide. *Biochem J.* 1987, Oct 15;247(2):363-8.
- Aktories K, Rösener S, Blaschke U, Chhatwal GS. Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *Eur J Biochem.* 1988, Mar 1;172(2):445-50.
- Aktories K, Braun U, Rösener S, Just I, Hall A. The rho gene product expressed in *E. coli* is a substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, Jan 16;158(1):209-13.
- Aktories K, Mohr C, Koch G. Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992, 175:115-31.
- Aktories K. Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin Invest.* 1997, Mar 1;99(5):827-9.
- Aktories K, Wilde C, Vogelsang M. Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:1-22.
- Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Kimura K, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S. Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J Cell Biol.* 2003, Apr 28;161(2):381-91.
- Barth H, Hofmann F, Olenik C, Just I, Aktories K. The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary Clostridium botulinum C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect Immun.* 1998, Apr;66(4):1364-9.

- Beltman J, Erickson JR, Martin GA, Lyons JF, Cook SJ. C3 toxin activates the stress signaling pathways, JNK and p38, but antagonizes the activation of AP-1 in rat-1 cells. *J Biol Chem.* 1999, Feb 5;274(6):3772-80.
- Bickmeyer U, Weinsberg F, Wiegand H. Effects of deltamethrin on catecholamine secretion of bovine chromaffin cells. *Arch Toxicol.* 1994, 1;68(8):532-4.
- Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* 2000, May;26(2):431-41.
- Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 1993, Dec;12(12):4821-8.
- Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD. A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci.* 2000, Nov 1;20(21):8012-20.
- Boquet P, Munro P, Fiorentini C, Just I. Toxins from anaerobic bacteria: specificity and molecular mechanisms of action. *Curr Opin Microbiol.* 1998, Feb;1(1):66-74.
- Bradke F, Dotti CG. The role of local actin instability in axon formation. *Science* 1999, Mar 19;283(5409):1931-4.
- Burr SA, Ray DE. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol Sci.* 2004, Feb;77(2):341-6.
- BurrIDGE K., Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004, Jan 23;116(2):167-79.
- Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 1998, Nov 27;282(5394):1717-21.
- Chan CC, Wong AK, Liu J, Steeves JD, Tetzlaff W. ROCK inhibition with Y27632 activates astrocytes and increases their expression of neurite growth-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* 2007, Mar;55(4):369-84.
- Chapman ER, Jahn R. Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *J Biol Chem.* 1994, Feb 25;269(8):5735-41.
- Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM. The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J.* 1989, Apr;8(4):1087-92.
- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 1994, Nov 4;79(3):507-13.

- Craig AM, Banker G. *Neuronal polarity. Annu Rev Neurosci.* 1994, 17:267-310.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci.* 2002, Aug 1;22(15):6570-7.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 1988, Apr;8(4):1454-68.
- Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER and Jahn R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 1995, January 16; 14(2): 224–231.
- Eells JT, Bandettini PA, Holman PA, Propp JM. Pyrethroid Insecticide-Induced Alterations in Mammalian Synaptic Membrane Potential. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992, Sep;262(3):1173-81.
- Enan E, Matsumura F. Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochem Pharmacol.* 1992, Apr 15;43(8):1777-84.
- Enan E, Pinkerton KE, Peake J, Matsumura F. Deltamethrin-induced thymus atrophy in male Balb/c mice. *Biochem Pharmacol.* 1996, Feb 23;51(4):447-54.
- Eva A, Aaronson SA. Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 1985, Jul 18-24;316(6025):273-5.
- Fakata KL, Swanson SA, Vorce RL, Stemmer PM. Pyrethroid insecticides as phosphatase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1998, Jun 15;55(12):2017-22.
- Fensome A, Whatmore J, Morgan C, Jones D, Cockcroft S. ADP-ribosylation factor and Rho proteins mediate fMLP-dependent activation of phospholipase D in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1998, May 22;273(21):13157-64.
- Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997, Jun 12;387(6634):729-33.
- Forshaw PJ, Lister T, Ray DE. Inhibition of a neuronal voltage-dependent chloride channel by the type II pyrethroid, deltamethrin. *Neuropharmacology.* 1993, Feb;32(2):105-11.
- Fort P. Small GTPases of the Rho family and cell transformation. *Prog Mol Subcell Biol.* 1999, 22:159-81.
- Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol.* 1996, Jun;16(6):2689-99.

- Fransson A, Ruusala A, Aspenström P. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem.* 2003, Feb 21;278(8):6495-502.
- Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996, 6(4):347-470.
- Fujisawa K, Madaule P, Ishizaki T, Watanabe G, Bito H, Saito Y, Hall A, Narumiya S. Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *J Biol Chem.* 1998, Jul 24;273(30):18943-9.
- Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, Takai Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 1990, Sep;5(9):1321-8.
- Genth H, Schmidt M, Gerhard R, Aktories K, Just I. Activation of phospholipase D1 by ADP-ribosylated RhoA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, Feb 28;302(1):127-32.
- Genth H, Gerhard R, Maeda A, Amano M, Kaibuchi K, Aktories K, Just I. Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J Biol Chem.* 2003, Aug 1;278(31):28523-7.
- Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT. The N-terminal domain of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem.* 1999, Dec 17;274(51):36369-72.
- Goldstein SA. and Colatsky TJ. Ion Channels: Too Complex for Rational Drug Design? *Neuron* 1996, May Vol. 16, 913–919
- Goslin K., Banker G. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol.* 1989, Apr;108(4):1507-16.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 2005, Jan 1;19(1):1-49.
- Grosse G, Tapp R, Wartenberg M, Sauer H, Fox P.A, Grosse J, Gratzl M, Bergmann M. Prenatal hippocampal granule cells in primary cell culture form mossy fiber boutons at pyramidal cell dendrites. *J. Neurosci Res.* 1998, Mar 1;51(5):602-11.
- Grosse G, Draguhn A, Höhne L, Tapp R, Veh RW, Ahnert-Hilger G. Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J Neurosci.* 2000, Mar 1;20(5):1869-82.
- Grosse G, Thiele T, Heuckendorf E, Schopp E, Merder S, Pickert G, Ahnert-Hilger G. Deltamethrin differentially affects neuronal subtypes in hippocampal primary culture. *Neuroscience* 2002, 112(1):233-41.

- Hall A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 1990, Aug 10;249(4969):635-40.
- Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product. *Nature* 1991, Nov 28;354(6351):311-4.
- Hoffmann A, Hofmann F, Just I, Lehnardt S, Hanisch UK, Brück W, Kettenmann H, Ahnert-Hilger G, Höltje M. Inhibition of Rho-dependent pathways by Clostridium botulinum C3 protein induces a proinflammatory profile in microglia. *Glia* 2008, Aug 15;56(11):1162-75.
- Höltje M, Hoffmann A, Hofmann F, Mucke C, Grosse G, Van Rooijen N, Kettenmann H, Just I, Ahnert-Hilger G. Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing. *J Neurochem*. 2005, (5)1237-48
- Höltje M, Hofmann F, Lux R, Veh RW, Just I, Ahnert-Hilger G. Glutamate uptake and release by astrocytes are enhanced by Clostridium botulinum C3 protein. *J Biol Chem*. 2008, Apr 4;283(14):9289-99.
- Höltje M, Djalali S, Hofmann F, Münster-Wandowski A, Hendrix S, Boato F, Dreger SC, Grosse G, Henneberger C, Grantyn R, Just I, Ahnert-Hilger G. A 29-amino acid fragment of Clostridium botulinum C3 protein enhances neuronal outgrowth, connectivity, and reinnervation. *FASEB J*. 2009, Apr;23(4):1115-26.
- Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, Kashimoto T, Katahira J, Sugimoto N, Matsuda M. Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, Oct 14;94(21):11623-6.
- Hossain MM, Suzuki T, Sato I, Takewaki T, Suzuki K, Kobayashi H. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. *Neurotoxicology* 2004, Sep;25(5):825-33.
- Husain R, Husain R, Adhami VM, Seth PK. Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. *J Toxicol Environ Health* 1996, Aug 9;48(5):515-26.
- Jaffe AB, Hall A. RHO GTPASES: *Biochemistry and Biology Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005, 21:247-69.
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol*. 1994, Aug;126(3):801-10.
- [Ji ZY, Shi N, Wang SQ, Dong J, Chen MS. Effects of pyrethroids on the activity of gamma-aminobutyric acid transferase in rat brain *Zhongghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2003, Jun;21(3):197-9.]

- Jin Z, Strittmatter SM (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci.* Aug 15;17(16):6256-63.
- Just I, Mohr C, Schallehn G, Menard L, Didsbury JR, Vandekerckhove J, van Damme J, Aktories K. Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*. *J Biol Chem.* 1992, May 25;267(15):10274-80.
- Just I, Fritz G, Aktories K, Giry M, Popoff MR, Boquet P, Hegenbarth S, von Eichel-Streiber C. *Clostridium difficile* toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem.* 1994, Apr 8;269(14):10706-12.
- Just I, Selzer J, Jung M, van Damme J, Vandekerckhove J, Aktories K. Rho-ADP-ribosylating exoenzyme from *Bacillus cereus*. Purification, characterization, and identification of the NAD-binding site. *Biochemistry* 1995, Jan 10;34(1):334-40.
- Just I, Selzer J, von Eichel-Streiber C, Aktories K. The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *J Clin Invest.* 1995, Mar;95(3):1026-31.
- Katoh H, Aoki J, Yamaguchi Y, Kitano Y, Ichikawa A, Negishi M. Constitutively active Galpha12, Galpha13, and Galphaq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J Biol Chem.* 1998, Oct 30;273(44):28700-7.
- Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS, Der CJ. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol.* 1995, Nov;15(11):6443-53.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia. *Mol Cell Biol.* 1996, Sep;16(9):5069-80.
- Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH. Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell.* 1999, Jun;10(6):1851-7.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, Aug 15;227(5259):680-5.
- Lamaze C, Chuang TH, Terlecky LJ, Bokoch GM, Schmid SL. Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 1996, Jul 11;382(6587):177-9.
- Lancaster CA, Taylor-Harris PM, Self AJ, Brill S, van Erp HE, Hall A. Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol Chem.* 1994, Jan 14;269(2):1137-42.

- Lang P, Guizani L, Vitté-Mony I, Stancou R, Dorseuil O, Gacon G, Bertoglio J. ADP-ribosylation of the ras-related, GTP-binding protein RhoA inhibits lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Biol Chem.* 1992, Jun 15;267(17):11677-80.
- Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 1996, Feb 16;271(5251):981-3.
- Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem.* 1997, Sep 26;272(39):24141-4.
- Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol.* 2001, Jun;11(3):281-6.
- Lee T, Winter C, Marticke SS, Lee A, Luo L. Essential roles of Drosophila RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* 2000, Feb;25(2):307-16.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci.* 1999, Sep 1;19(17):7537-47.
- Lerm M, Selzer J, Hoffmeyer A, Rapp UR, Aktories K, Schmidt G. Deamidation of Cdc42 and Rac by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: activation of c-Jun N-terminal kinase in HeLa cells. *Infect Immun.* 1999, Feb;67(2):496-503.
- [Liu G, Shi N, Ma R. Effects of pyrethroids on tyrosine hydroxylase in nigrostriatum of male rats *Wei Sheng Yan Jiu.* 2004, Jul;33(4):390-3.]
- Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2000, Dec;1(3):173-80.
- Luo L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002, 18:601-35.
- Machesky LM., Hall A. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 1996, Aug;6(8):304-10.
- Mackay DJ, Esch F, Furthmayr H, Hall A. Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol.* 1997, Aug 25;138(4):927-38.
- Malcolm KC, Ross AH, Qiu RG, Symons M, Exton JH. Activation of rat liver phospholipase D by the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem.* 1994, Oct 21;269(42):25951-4.
- Maletic-Savatic M., Lenn N. J. and Trimmer J. S. (1995) Differential Spatiotemporal Expression of K⁺ Channel Polypeptides in Rat Hippocampal Neurons Developing in situ and in vitro. *The Journal of Neuroscience* May, 15(5): 3840-3851

- Michiels F, Habets GG, Stam JC, van der Kammen RA, Collard JG. (1995) A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* May 25;375(6529): 338-40.
- Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1995, Jun 30;81(7):1147-57.
- Moore MS. Ran and nuclear transport. *J Biol Chem.* 1998, Sep 4;273(36):22857-60.
- Moorman JP, Bobak DA, Hahn CS. Inactivation of the small GTP binding protein Rho induces multinucleate cell formation and apoptosis in murine T lymphoma EL4. *J Immunol.* 1996, Jun 1;156(11):4146-53.
- Moss J., Vaughan M. Activation of toxin ADP-ribosyltransferases by eukaryotic ADP-ribosylation factors. *Mol Cell Biochem.* 1999, Mar;193(1-2):153-7.
- Narahashi T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol.* 1996, Jul;79(1):1-14.
- Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem.* 1996, Aug;120(2):215-28.
- Nemoto E, Yu Y, Dennert G. Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J Immunol.* 1996, Oct 15;157(8):3341-9.
- Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA. Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci.* 2002, Feb 1;22(3):854-62.
- Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 1995, Aug;23(3):456-9.
- Ogata N., Vogel S. and Narahashi T. Lindane but not deltamethrin blocks a component of GABA-activated chloride Channels. *FASEB J.* 1998, Oct;2(13):2895-900.
- Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 1995, Sep 1;269(5228):1270-2.
- Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol.* 1990, Sep;111(3):1001-7.
- Ray DE, Sutharsan S, Forshaw PJ. Actions of pyrethroid insecticides on voltage-gated chloride channels in neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 1997,18(3):755-60.

- Renaudin A, Lehmann M, Girault J, McKerracher L. Organization of point contacts in neuronal growth cones. *J Neurosci Res.* 1999, Feb 15;55(4):458-71.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992, Aug 7;70(3):401-10.
- Rösener S, Chhatwal GS, Aktories K. Botulinum ADP-ribosyltransferase C3 but not botulinum neurotoxins C1 and D ADP-ribosylates low molecular mass GTP-binding proteins. *FEBS Lett.* 1987, Nov 16;224(1):38-42.
- Roeper J, Lorra C and Pongs O. Frequency-Dependent Inactivation of Mammalian A-Type K Channel KV1.4 Regulated by Ca²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience* 1997, May 15, 17(10):3379–3391
- Rubin EJ, Gill DM, Boquet P, Popoff MR. Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum*. *Mol Cell Biol.* 1988, Jan;8(1):418-26.
- Sahib IK, Prasada Rao KS, Desai D. Pyrethroid inhibition of basal and calmodulin stimulated Ca²⁺ ATPase and adenylate cyclase in rat brain. *J Appl Toxicol.* 1987, Apr;7(2):75-80.
- Schimmöller F, Simon I, Pfeffer SR. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem.* 1998, Aug 28;273(35):22161-4.
- Schmalzing G, Richter HP, Hansen A, Schwarz W, Just I, Aktories K. Involvement of the GTP binding protein Rho in constitutive endocytosis in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol.* 1995, Sep;130(6):1319-32.
- Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 1997, Jun 12;387(6634):725-9.
- Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K. Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 1998, Apr 14;37(15):5296-304.
- Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 1989, May 25;264(15):8602-5.
- Settleman J. Rho GTPases in development. *Prog Mol Subcell Biol.* 1999, 22:201-29.
- Shea TB. Calcium modulates aluminum neurotoxicity and interaction with neurofilaments. *Mol Chem Neuropathol.* 1995, Feb-Apr;24(2-3):151-63.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985, Oct;150(1):76-85.

- Song J, Narahashi T. Differential effects of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant single sodium channels. *Brain Research* 1996, 712 258-264
- Sorokina EM, Chernoff J. Rho-GTPases: new members, new pathways. *J Cell Biochem.* 2005, Feb 1;94(2):225-31.
- Stam JC, Michiels F, van der Kammen RA, Moolenaar WH, Collard JG. Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *EMBO J.* 1998, Jul 15;17(14):4066-74.
- Stasia MJ, Jouan A, Bourmeyster N, Boquet P, Vignais PV. ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum* and effect on the cell motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, Oct 31;180(2):615-22.
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 1995, Jun 22;375(6533):645-53.
- Sugai M, Enomoto T, Hashimoto K, Matsumoto K, Matsuo Y, Ohgai H, Hong YM, Inoue S, Yoshikawa K, Suginaka H. A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990, Nov 30;173(1):92-8.
- Tabarean IV. and Narahaschi T. Potent modulation of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels by the type II pyrethroid deltamethrin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Mar;284(3):958-65.
- Takahashi Y, Tsunashima K, Sadamatsu M, Schwarzer C, Amano S, Ihara N, Sasa M, Kato N, Sperk G. Altered hippocampal expression of neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase in Ihara's epileptic rats and spontaneously epileptic rats. *Neurosci Lett.* 2000, Jun 23;287(2):105-8.
- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 1995, Jun;20(6):227-31.
- Takaishi K, Sasaki T, Kameyama T, Tsukita S, Tsukita S, Takai Y. Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* 1995, Jul 6;11(1):39-48.
- Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1997, Feb;9(1):86-92.
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A. Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 1997, Sep;19(3):625-34.
- Tonder N, Kragh J, Bolwig T, Zimmer J. Transient decrease in calbindin immunoreactivity of the rat fascia dentata granule cells after repeated electroconvulsive shocks. *Hippocampus* 1994, Feb;4(1):79-83.

- Tonder N, Kragh J, Finsen BR, Bolwig TG, Zimmer J. Kindling induces transient changes in neuronal expression of somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin in adult rat hippocampus and fascia dentata. *Epilepsia* 1994, Nov-Dec;35(6):1299-308.
- Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, Yamamoto J, Takai Y. Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem*. 1990, Jun 5;265(16):9373-80.
- Van Aelst L., D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997, Sep 15;11(18):2295-322.
- Van Aelst L., Cline HT. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol*. 2004, Jun;14(3):297-304.
- Verschueren H, De Baetselier P, De Braekeleer J, Dewit J, Aktories K, Just I. ADP-ribosylation of Rho-proteins with botulinum C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. *Eur J Cell Biol*. 1997, Jun;73(2):182-7.
- Vizi ES, Kiss JP. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 1998, 8(6):566-607.
- Vogelsgesang M, Pautsch A, Aktories K. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2007, Feb;374(5-6):347-60.
- Wang SY, Barile M, Wang GK. A phenylalanine residue at segment D3-S6 in Nav1.4 voltage-gated Na(+) channels is critical for pyrethroid action. *Mol Pharmacol*. 2001, Sep;60(3):620-8.
- Wieggers W, Just I, Müller H, Hellwig A, Traub P, Aktories K. Alteration of the cytoskeleton of mammalian cells cultured in vitro by Clostridium botulinum C2 toxin and C3 ADP-ribosyltransferase. *Eur J Cell Biol*. 1991, Apr;54(2):237-45.
- Wilde C, Chhatwal GS, Schmalzing G, Aktories K, Just I. A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from Staphylococcus aureus modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem*. 2001, Mar 23;276(12):9537-42.
- Wilde C, Aktories K. The Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme from Clostridium botulinum and related C3-like transferases. *Toxicon* 2001, Nov;39(11):1647-60.
- Wilde C, Chhatwal GS, Aktories K. C3stau, a new member of the family of C3-like ADP-ribosyltransferases. *Trends Microbiol*. 2002, Jan;10(1):5-7.
- Wilde C, Barth H, Sehr P, Han L, Schmidt M, Just I, Aktories K. Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA. *J Biol Chem*. 2002, Apr 26;277(17):14771-6.

- Wittinghofer A, Nassar N. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci.* 1996, Dec;21(12):488-91. Review.
- Wu A, Liu Y. Effects of deltamethrin on nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in rat brain. *Brain Res.* 1999, Dec 11;850(1-2):249-52.
- Wu A, Liu Y. Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. *Neurosci Lett.* 2000, Jan 28;279(2):85-8.
- Wu A, Liu Y. Prolonged expression of c-Fos and c-Jun in the cerebral cortex of rats after deltamethrin treatment. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003, Jan 31;110(1):147-51.
- Wu A, Li L, Liu Y. Deltamethrin induces apoptotic cell death in cultured cerebral cortical neurons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003, Feb 15;187(1):50-7.
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 1999, Nov;24(3):585-93.
- Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, Hata K, Mimura F. Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol.* 2005, Oct;32(2):105-11.
- Yang Q, Wang S, Hamberger A, Celio MR, Haglid KG. Delayed decrease of calbindin immunoreactivity in the granule cell-mossy fibers after kainic acid-induced seizures. *Brain Res Bull.* 1997, 43(6):551-9.
- Yoshimura T, Arimura N, Kaibuchi K. Molecular mechanisms of axon specification and neuronal disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, Nov;1086:116-25.
- Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S. Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol.* 2003, Jan;5(1):38-45.
- Zhao H, Matsuoka S, Fujioka Y, Noma A. Effects of dopamine on L-type Ca²⁺ current in single atrial and ventricular myocytes of the rat. *Br J Pharmacol.* 1997, Aug;121(7):1247-54.
- Zheng Y, Glaven JA, Wu WJ, Cerione RA. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate provides an alternative to guanine nucleotide exchange factors by stimulating the dissociation of GDP from Cdc42Hs. *J Biol Chem.* 1996, Sep 27;271(39):23815-9.

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr angenehme und engagierte Betreuung während meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Dieser Dank umfasst auch das mir jederzeit entgegengebrachte Verständnis für meine familiäre Gegebenheiten und die daraus resultierende lange Latenzzeit zwischen der praktischen Tätigkeit und der Abgabe der Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Gisela Große, die mich in der Erarbeitung begleitete und mir in jeder Situation, sowohl fachlich als auch persönlich stets verständnisvoll zur Seite stand.

Danken möchte ich auch Frau PD. Dr. Barbara Nixdorf-Bergweiler, die mich mit geduldigem Sachverstand in ausgewählte computergestützte Analyseverfahren einwies und dadurch den Erfolg meiner Ergebnisse erst wesentlich ermöglichte.

Meinen Kollegen am Institut für Anatomie danke ich vor allem für die methodische Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Herzlichen Dank auch allen Korrekturleser meiner Dissertation.

Allen weiteren nicht namentlich erwähnten Kooperationspartnern sei für das Gelingen der Arbeit ebenfalls gedankt.

Meiner Mutter gebührt ein ganz besonderer Dank für die lebenslange Unterstützung, die sie unter großem Opfer und Hingabe leistete. Bedanken möchte ich mich hier besonders an meinem Stiefvater Hans Roth für die bisherige Unterstützung.

Abschließend möchte ich meinen vier Töchtern Rebekka, Tabea-Mathura, Hanna-Anjali und Rahel-Beiravi sowie meinem Mann Oliver für die moralische Unterstützung danken, ohne deren Hilfe mein bisheriger beruflicher Werdegang nicht möglich gewesen wäre.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Geethanjali Pickert, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Effekte von Deltamethrin und ADP-ribosylierender C3-Exoenzyme auf die Entwicklung hippokampaler Neurone in Kultur“ 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.

Geethanjali Pickert

Bad Vilbel, den 28.07.10

Lebenslauf

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