

**Analyse der neurotrophen Wirkung von C3^{bot}, sowie
dessen enzymdefizienter Mutante C3^{bot}E174Q an humanen
Modell-Neuronen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Corinna Mühlenstädt
geb. am 03.08.1978 in Wilhelmshaven

-2009-

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2004 bis Dezember 2007 am Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. Achim Gossler, Prof. Dr. Ingo Just und PD. Dr. Fred Hofmann angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Achim Gossler

Koreferent: Prof. Dr. Ingo Just

Tag der Promotion: 21.08.2009

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass Dinge sind, wie sie sind.
(Aristoteles)

Diese Arbeit widme ich in Liebe meinen Eltern und meinem Mann Stefan

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Ingo Just für die engagierte und qualifizierte Betreuung dieser Arbeit, für die konstruktiven Anregungen und besonders für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken. Seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft haben wesentlich für deren Gelingen beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Achim Gossler danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und seiner Bereitschaft zur Begutachtung der Dissertationsschrift.

Bei Herrn PD Dr. Fred Hofmann möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die direkte Betreuung meiner Arbeit bedanken. Die anregenden Diskussionen haben mir geholfen, meine Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und im Laufe der Zeit immer selbständiger zu arbeiten.

Besonderer Dank gilt Dr. Kirsten Mielke und PD. Dr. Harald Genth, die in schwierigen Zeiten immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich mit ihrer Erfahrung sehr unterstützt haben.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern des Instituts für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Stefan, der mich während der gesamten Zeit unterstützt und mir besonders in schwierigen Zeiten liebevoll zur Seite gestanden hat. Ebenso danke ich meinen Eltern und Schwiegereltern, die mir immer wieder Mut gemacht haben, diesen Weg weiterzugehen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Inhalte anderer wissenschaftlicher Arbeiten als Referenz sind immer als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Des Weiteren wurden keine früheren Promotionsversuche unternommen.

(Unterschrift)

Name: Corinna Mühlenstädt

Posterpräsentationen

Nottingham (United Kingdom), 21–25 June 2006, 5th International Meeting on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia.

Mühlenstädt C, Hofmann F, and Just I 2006. A neurotrophic factor for human neurons? In *Clostridia 2006 – Programme and Abstracts*.

Mainz (Germany), 13-15 March 2007. 48th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

Mühlenstädt C, Hofmann F, and Just I 2007. A novel neurotrophic factor for human neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **375**: 71 Suppl. 1.

Göttingen (Germany), 31st May-2nd June 2007. 2nd Neurizons Conference in the Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen

Mühlenstädt C, Hofmann F, and Just I 2007. A novel neurotrophic factor for human neurons. *Neurizon 2007 – Programme and Abstracts*.

Mainz (Germany), 11-13 March 2008. 49th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

Mützelburg MV, **Mühlenstädt C**, Just I, Hofmann F, and Pich A 2008. Toxicoproteomics: C3 exoenzyme effects protein profile of a human neuroblastoma cell line. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **377**: 87 Suppl. 1.

Zusammenfassung

Das NT2/N-System ist ein einzigartiges Modell, um die Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen zu humanen Neuronen im Kultursystem zu untersuchen. Das System basiert auf den humanen Teratomzellen NT2, die in ihrem Phänotyp neuronalen Vorläuferzellen entsprechen und sich *in vitro* durch Behandlung mit Retinsäure zu polaren, postmitotischen Neuronen (NT2/N) differenzieren lassen. Während der Entwicklung von einer einfachen, neuronalen Vorläuferzelle, zu einem komplexen, polaren Neuron mit Axon und Dendriten werden verschiedene extrazelluläre Signale in intrazelluläre Formveränderungen des Zytoskeletts umgesetzt. An der Regulation dieser zellulären Prozesse sind u. a. die kleinen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 maßgeblich beteiligt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Exoenzym C3 aus *Clostridium botulinum* (C3^{bot}) und seine enzymdefiziente Mutante C3^{bot}E174Q gleichermaßen von NT2-Zellen aufgenommen werden. In seiner Zielzelle inaktiviert C3^{bot} spezifisch die Rho-GTPasen RhoA, B und C durch ADP-Ribosylierung. In NT2-Zellen wird dabei konzentrations- und zeitabhängig die Bildung von Neuriten induziert. Neben der Ribosylierung von RhoA wird das Expressionsprofil von RhoB, aber nicht von Rac1 und Cdc42 in NT2-Zellen verändert. Ebenso erfolgt während der neuronalen Differenzierung eine starke Veränderung des Expressionsprofils, der wiederum die Ausbildung von Neuriten folgt. Das neuronale Markerprotein NF-M wird bereits sehr früh während der Differenzierung exprimiert. Die Expression von NF-M konnte deutlich in Retinsäure-behandelten, aber nicht in C3^{bot}-behandelten NT2-Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten belegen, dass C3^{bot} keine differenzierende Wirkung auf neuronale Vorläuferzellen zugeschrieben werden kann. Die morphometrischen Analysen von NT2/N-Zellen ergaben, dass C3^{bot} und dessen enzymdefiziente Mutante C3^{bot}E174Q sowohl das axonale Wachstum der humanen Modell-Neurone, als auch die Bildung von axonalen Verzweigungen mit zunehmender Kulturdauer im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöht. Zudem wurde festgestellt, dass bereits ein kleines, aus 29 Aminosäuren bestehendes Peptid (C3^{bot}154-182) gleichermaßen wie das C3^{bot}-Holoenzym in der Lage ist, axonales Wachstum, sowie die Bildung von axonalen Verzweigungen in NT2/N-Zellen zu induzieren. Im Gegensatz zu den NT2/N-Zellen reagieren die NT2-Zellen ausschließlich auf das enzymkompetente C3^{bot} mit der Bildung von Neuriten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass C3^{bot} auf humane Modellneurone eine neurotrophe Wirkung besitzt, die nicht über die Inaktivierung von RhoA vermittelt wird.

Da das NT2/N-System es ermöglicht, neuronale Vorläuferzellen und terminal differenzierte Neurone gleichen Ursprungs unmittelbar miteinander zu vergleichen, beweisen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die enzymunabhängige neurotrophe Wirkung von C3^{bot} auf den Differenzierungsgrad der Neurone zurückgeführt werden kann. Daher ist es möglich, dass terminal differenzierte Neurone Interaktionspartner besitzen, über den die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} vermittelt wird.

Stichwörter: neuronale Differenzierung, Wachstumsfaktoren, Rho-GTPasen

Summary

The NT2/N system is a unique model for researching the development of neuronal precursors into human neurons in a cell culture system. This system is based on the human teratocarcinoma cell line NT2. NT2 cells correspond in their phenotype to neuronal precursors, which can be differentiated *in vitro* by treatment with retinoic acid to polar, postmitotic neurons (NT2/N). During the development of a morphologically simple neuronal precursor cell to a complex polarized neuron with axon and dendrites precisely controlled changes in the cytoskeleton are essential. Recently it has become clear that the small Rho GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 play an important role in various aspects of neuronal development, including neurite outgrowth, differentiation and axon pathfinding.

The present thesis demonstrates that the exoenzyme C3 from *Clostridium botulinum* (C3^{bot}) and its enzymatically deficient mutant enter the NT2 cells in the same manner. Once internalized by its target cells, C3^{bot} specifically inactivates RhoA, B and C by ADP-ribosylation. The inactivation of RhoA induces neurite formation in NT2 cells. Beside the inactivation of RhoA, C3^{bot} modifies the level of expression of RhoB, but not of Rac1 and Cdc42 in NT2 cells. During neuronal differentiation the expression pattern undergoes several changes and results in neurite formation. In this context the NF-M, which is expressed at a very early stage during differentiation, has been analyzed. However, NF-M could not be detected in NT2 cells after treatment with C3^{bot}, but in NT2 cells, which have been treated with retinoic acid. These results demonstrate that a differentiating effect on neuronal precursors cannot be attributed to C3^{bot}. By means of morphometric analyses it was able to demonstrate in the course of this thesis that C3^{bot} and its enzyme deficient mutant C3^{bot}E174Q significantly increase both the axonal growth of NT2/N cells as well as the formation of axonal branches with increased culture duration compared to control cells. It was furthermore found that already a small peptide (C3^{bot}154-182), consisting of 29 amino acids is able to increase both axonal growth as well as the formation of axonal arborisation in NT2/N cells likewise the C3^{bot}-holoenzyme. These findings confirm that C3^{bot} has a novel neurotrophic effect on human model neurons, which is not mediated by inactivation of RhoA. In contrast to the NT2/N cells the NT2 cells solely reacted on the enzymatic active C3^{bot} by forming neurites.

As the NT2N system allows a direct comparison of neuronal precursors and terminal differentiated neurons of the same origin, the results of this thesis give evidence that the enzyme-independent neurotrophic effect of C3^{bot} can be attributed to the differentiation level of the neurons. In case of neuronal differentiation the neurons possibly have an interaction partner imparting the neurotrophic effect of C3^{bot}.

Keywords: neuronal differentiation, growth factors, Rho-GTPases

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
A 1	Das Nervensystem	1
A 1.1	Das neuronale Zytoskelett	2
A 2	Die Rho-GTPasen bei der neuronalen Entwicklung und Regeneration	3
A 2.1	Funktion der Rho-GTPasen in nicht-neuronalen Zellen: Das Fibroblastenmodell	5
A 2.2	Funktion der Rho-GTPasen in neuronalen Zellen	6
A 2.3	Die neuronale Morphogenese	7
A 3	ADP-Ribosyltransferasen	9
A 3.1	C3-ähnliche ADP-Ribosyltransferasen	11
A 3.2	Rho-GTPasen als Substrate für C3-ähnliche ADP-RT	13
A 3.3	Ist C3 ^{bot} nicht nur eine einfache ADP-Ribosyltransferase?	13
A 4	Das NT2/N-System	14
A 5	Ziele der Arbeit	16
B	Material und Methoden	17
B 1	Material und Geräte	17
B 1.1	Chemikalien	17
B 1.2	Material Zellbiologie	18
B 1.2.1	Eukaryotische Zelllinien	18
B 1.2.2	Zellkulturmedien	18
B 1.2.3	Stammlösungen für Zellkultur	19
B 1.3	Puffer und Stammlösungen	20
B 1.3.1	Immunfluoreszenz-Färbung	20
B 1.3.2	Protein-Biochemie	21
B 1.4	Antikörper	24
B 1.5	Protein-Standards	25
B 1.6	Geräte und sonstige Materialien	26
B 1.6.1	Glas- und Plastikwaren	27
B 1.7	Software	28
B 2	Methoden	28

<i>B 2.1 Zellbiologische Methoden</i>	28
B 2.1.1 Lösen adhärenter Zellen mit Trypsin (Abtrypsinieren) und Passagieren	28
B 2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen	29
B 2.1.3 Zellzahlbestimmung	29
B 2.1.4 Kultur von NT2- und NT2/N-Zellen	30
B 2.1.5 Kultur von SH-SY5Y-Zellen	31
<i>B 2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie</i>	32
B 2.2.1 Beschichtung von mikroskopischen Deckgläschen	32
B 2.2.2 Fixierung und Färbung von Zellen	33
B 2.2.3 Morphometrische Analysen	34
<i>B 2.3 Allgemeine Protein-Biochemische Methoden</i>	34
B 2.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	34
B 2.3.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford	37
B 2.3.3 Präparation von Zell-Lysaten	37
B 2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	38
B 2.3.5 Coomassie-Blau Färbung	39
B 2.3.6 Proteintransfer durch Elektroblob (Western-Blot)	40
B 2.3.7 Ponceau-Färbung von immobilisierten Proteinen	40
B 2.3.8 Indirekte Immundetektion	40
<i>B 2.4 Spezielle Protein-Biochemische Methoden</i>	41
B 2.4.1 Rac1 Pull-Down-Experiment	41
B 2.4.2 GTP-Beladung von RhoGTPasen (Nukleotidaustausch)	42
B 2.4.3 [³² P] ADP-Ribosylierung von Zell-Lysaten	42
B 2.4.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen C3 ^{bot} und C3 ^{bot} E174Q	43
B 2.4.5 Antikörperaufreinigung über eine Protein A-Sepharose-Säule	44
C Ergebnisse	45
<i>C 1 Wirkung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q auf das NT2- Zellsystem</i>	<i>45</i>
<i>C 1.1 Effekte von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q auf NT2-Zellen</i>	<i>46</i>
C 1.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von C3 ^{bot} auf die Morphologie von NT2-Zellen	46
C 1.1.2 Konzentrationsabhängige Internalisierung von C3 ^{bot} und C3 ^{bot} E174Q	48
C 1.1.3 Konzentrationsabhängiger Einfluss von C3 auf die Expression von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42	49

C 1.1.4	Zeitabhängige Wirkung von C3 ^{bot} und C3 ^{bot} E174Q auf die Zellmorphologie von NT2-Zellen	51
C 1.1.5	Zeitabhängiger Einfluss von C3 auf die Expression von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42	53
C 1.1.6	Aktivität von Rac1	54
C 1.2	<i>Wirkung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q, sowie den Fragmenten C3^{bot}154-182 und C3^{bot}181-211 auf humane Modell-Neurone</i>	55
C 1.2.1	Untersuchung des Axonwachstums von NT2/N-Zellen	55
C 1.2.2	Expression von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42 in humanen Modell-Neuronen	61
C 2	<i>Einfluss von C3^{bot} auf die Differenzierung von NT2-Zellen</i>	62
C 2.1	<i>Expression von Neurofilament M</i>	62
C 3	<i>Aufnahme und subzelluläre Verteilung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q in NT2-Zellen</i>	64
C 3.1	<i>Subzelluläre Verteilung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q in NT2-Zellen</i>	64
C 3.2	<i>Aufnahme von C3^{bot} über Endozytose</i>	65
C 3.3	<i>Subzelluläre Verteilung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q in murinen Hippokampusneuronen</i>	67
D	Diskussion	70
D 1	<i>Wahl eines geeigneten Zellsystems zur Untersuchung der neurotrophen Wirkung von C3^{bot}</i>	70
D 2	<i>Charakterisierung der Aufnahme und der Funktion von C3^{bot} in NT2-Zellen</i>	72
D 2.1	<i>C3^{bot} induziert Neuritenwachstum in neuronalen Vorläuferzellen über die Inaktivierung von RhoA</i>	72
D 2.2	<i>C3^{bot} gelangt nicht über klassische Endozytose in NT2-Zellen</i>	74
D 2.3	<i>C3^{bot} induziert keine neuronale Differenzierung in NT2-Zellen</i>	76
D 3	<i>Die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} ist in humanen Modell-Neuronen von ihrem Differenzierungs-Status abhängig</i>	77
D 3.1	<i>C3^{bot} besitzt unabhängig von seiner ADP-Ribosyltransferase-Aktivität eine neurotrophe Wirkung auf humane Modell-Neurone</i>	77
D 3.2	<i>Ansätze zur Klärung der neurotrophen Wirkung von C3^{bot} auf humane Modell-Neurone</i>	78

D 4	<i>Eine integrierte Sicht</i>	81
E	Literatur	82
F	Anhang	99
F 1	<i>Experimente C 1. 1: Quantitative Analyse der Zellausläuferbildung nach Behandlung mit C3^{bot}</i>	99
F 2	<i>Experimente C3. 2: Quantitative Analyse des Axonwachstums in NT2/N-Zellen nach 24 h</i>	100
F 3	<i>Experimente C3. 2: Quantitative Analyse des Axonwachstums in NT2/N-Zellen nach 48 h</i>	107
F 4	<i>Experimente C3. 2: Quantitative Analyse des Axonwachstums in NT2/N-Zellen nach 72 h</i>	114
F 5	<i>Experimente C3. 2: Quantitative Analyse der axonalen Verzweigungen in NT2/N- Zellen nach 72 h</i>	122
G	Curriculum Vitae	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung A 1: Schematische Darstellung des Rho-GTPase-Zyklus.....	4
Abbildung A 2: Aktinzytoskelett-Strukturen in Fibroblast und neuronalem Wachstumskegel.	6
Abbildung A 3: Schematische Darstellung eines sich entwickelnden Neurons.....	8
Abbildung A 4: Schema der ADP-Ribosylierung	10
Abbildung A 5: Dreidimensionale Struktur von C3 ^{bot} 1 mit NAD ⁺ (PDB-ID 1GZF)	12
Abbildung C 1: Darstellung der Morphologie von NT2- und NT2/N-Zellen.....	45
Abbildung C 2: Darstellung der Mischkultur von NT2/N- und NT2/A-Zellen	46
Abbildung C 3: C3 ^{bot} induziert konzentrationsabhängig Neuritenbildung in NT2-Zellen.....	47
Abbildung C 4: Quantitative Analyse der Neuritenbildung in NT2-Zellen nach der Behandlung mit steigenden C3 ^{bot} -Konzentrationen	48
Abbildung C 5: [³² P]-Nach-ADP-Ribosylierung-Assay von Rho aus NT2-Zellen nach Behandlung mit C3 ^{bot} und C3 ^{bot} E174Q.....	49
Abbildung C 6: Konzentrationsabhängige Immunoblot Analyse der Rho GTPase-Expression in NT2-Zellen 24 h nach Zugabe von C3 ^{bot}	50
Abbildung C 7: Zeitabhängiger Vergleich der morphologischen Veränderungen von NT2- Zellen nach Zugabe von C3 ^{bot} oder C3 ^{bot} E174Q.....	51
Abbildung C 8: Quantitative Analyse der Neuritenbildung von NT2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit C3 ^{bot}	52
Abbildung C 9: Zeitabhängige Immunoblot Analyse der Rho GTPase-Expression in NT2- Zellen nach Zugabe von C3 ^{bot} oder C3 ^{bot} E174Q	53
Abbildung C 10: Analyse der Aktivität von Rac1 in NT2-Zellen nach Behandlung mit C3 ^{bot} oder C3 ^{bot} E174Q	54
Abbildung C 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Morphologie von NT2/N- Zellen.....	55
Abbildung C 12: Effekte von C3 ^{bot} , C3 ^{bot} E174Q, C3 ^{bot} 154-182 oder C3 ^{bot} 182-211 auf das Axonwachstum von NT2/N-Zellen nach 24 h	57
Abbildung C 13: Effekte von C3 ^{bot} , C3 ^{bot} E174Q, C3 ^{bot} 154-182 oder C3 ^{bot} 182-211 auf das Axonwachstum von NT2/N-Zellen nach 48 h	58
Abbildung C 14: Effekte von C3 ^{bot} , C3 ^{bot} E174Q, C3 ^{bot} 154-182 oder C3 ^{bot} 182-211 auf das Axonwachstum von NT2/N-Zellen nach 72 h	59
Abbildung C 15: Gegenüberstellung des durch C3 ^{bot} , C3 ^{bot} E174Q, C3 ^{bot} 154-182 oder C3 ^{bot} 182-211 induzierten Axonwachstums zu verschiedenen Zeitpunkten.	60

Abbildung C 16: Zeitabhängige Immunoblot Analyse der Rho GTPase-Spiegel in NT2/N-Zellen nach Zugabe von C3 ^{bot} , C3 ^{bot} E174Q oder C3 ^{bot} 154-182	61
Abbildung C 17: Vergleich der Morphologie von NT2-Zellen nach Gabe von C3 ^{bot} oder RA	62
Abbildung C 18: Immunoblot-Analyse der NF-M-Expression in NT2-Zellen während der Differenzierung nach Gabe von C3 ^{bot} oder RA.....	63
Abbildung C 19: Vergleich der NF-M Expression in NT2- und SH-SY5Y-Zellen nach der Behandlung mit C3 ^{bot} oder RA	63
Abbildung C 20: Immunzytochemische Analyse der subzellulären Verteilung von C3 ^{bot} und C3 ^{bot} E174Q in NT2-Zellen	65
Abbildung C 21: Kolokalisationsstudie von C3 ^{bot} mit frühen Endosomen in NT2-Zellen.....	66
Abbildung C 22: Immunzytochemische Analyse der Lokalisation von C3 ^{bot} und C3 ^{bot} E174Q in primären Hippokampusneuronen	67
Abbildung C 23: Immunzytochemische Analyse der Bindung von C3 ^{bot} an primären Hippokampusneuronen	68

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
A	Ampere
Å	Angström
A, Ala	Alanin
Abb.	Abbildung
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
c	Centi
C, Cys	Cystein
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
C-terminal	carboxyterminal
D, Asp	Aspartat
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
E, Glu	Glutamat
E. coli	Escherichia coli

ECL	Erythrina cristagalli lectin, enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	Femto
F, Phe	Phenylalanin
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calve serum)
g	Gramm
G, Gly	Glycin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanin-5'-diphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSH	reduziertes Glutathion
GTP	Guanin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
H, His	Histidin
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Meerrettich Peroxidase
HS	Pferdeserum (horse serum)
I, Ile	Isoleucin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
k	Kilo
K, Lys	Lysin
k.A.	keine Angabe möglich
Da	Dalton
L	Liter
lacZ	β-Galaktosidase
LASER	Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation
LMW	Low Molecular Weight Marker (Molekülmassenstandard)
Lsg.	Lösung

m	Milli, Meter
M	Molar, Methionin
Max	Maximum
MCS	Multiple Cloning Site
Mg	Magnesium
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute(n)
mol	Mol
N	Stickstoff
n	nano
N, Asn	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NF	Neurofilament
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
Ni-NTA	Nickeltrinitrioloessigsäure
N-terminal	aminoterminal
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
p	Pico
P, Pro	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pKa	Maß für die Dissoziationsstärke einer Säure ($pK_a = -\lg K_a$)
PKN	Proteinkinase N
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPP	p-Nitro Phenyl Phosphat
POD	Peroxidase

PVDF	Polyvinylidenfluorid
R, Arg	Arginin
RA	Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S, Ser	Serin
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SE	standard error (Standardabweichung)
SH	Sulphydryl-
Smp	Schmelzpunkt
T, Thr	Threonin
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
u.	und
u.a	unter anderem
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V, Val	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
VAMP	Vesikel assoziiertes Membranprotein
W, Trp	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
wt	Wildtyp (wild type)
Y, Tyr	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem

A Einleitung

A 1 Das Nervensystem

Die am häufigsten im Gehirn vorkommenden Zelltypen sind Gliazellen und Neurone, wobei die Anzahl der Gliazellen die der Neurone um das 10-50-fache übersteigt. Die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Zelltypen spielen eine bedeutende Rolle für die Regulation der Entwicklung und der Plastizität des zentralen Nervensystems (ZNS). Gliazellen dienen zum Einen als Stützgerüst der Neurone, sowie als Leitstrukturen in der frühen Hirnentwicklung der Vertebraten, zum Anderen üben sie viele nicht strukturelle Funktionen aus (für eine Übersicht siehe Kandel *et al.*, 2000). Die Astrozyten machen den mehrheitlichen Zelltyp der Gliazellen im zentralen Nervensystem des Säugerhirns aus. Sie regulieren Transmitter- und Kaliumionen-Konzentration im Extrazellularraum, induzieren die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke und dienen zum Teil während der Entwicklung als Leitbahnen für migrierende Neurone. Die Oligodendrozyten, ein weiterer Gliazelltyp, gewährleisten die elektrische Isolation der Neurone untereinander. Dabei ummanteln sie diese mit Myelin, wodurch eine schnelle Reizleitung ermöglicht wird. Die Mikrogliazellen sind die Makrophagen des Gehirns, da sie die Zelltrümmer abgestorbener Zellen entfernen.

Die wichtigsten Funktionen des Gehirns – Verarbeitung sensorischer Information, Programmierung motorischer und emotionaler Reaktionen, Lernen und Gedächtnis – werden alle von einem hochorganisierten Netzwerk miteinander verknüpfter Nervenzellgruppen ausgeführt (Kandel *et al.*, 2000). Folglich bilden die einzelnen Neuronen, wie schon am Anfang des 20. Jahrhunderts von Ramón y Cajal postuliert, die elementaren Einheiten des zentralen Nervensystems. Die Nervenzelle verfügt über eine charakteristische polare Teilung in zwei funktionell unterschiedliche Kompartimente: ein signalempfangendes (somatodendritisches) und ein signalweiterleitendes (axonales) Kompartiment. Diese funktionelle Polarität zeigt sich in Unterschieden der Morphologie, dem Gehalt an Organellen und der molekularen Zusammensetzung von Soma, Dendriten und Axon (Craig & Banker, 1994; Prochiantz, 1995). Das Soma nimmt, je nach Zelltyp, etwa nur ein Zehntel des Zellvolumens ein und ist Zentrum des Stoffwechsels. Der Rest entfällt auf das Axon und die Dendriten. Dendriten verfügen meist über einen hohen Verzweigungsgrad und ihr Durchmesser nimmt nach distal ab. Das Axon ist im Allgemeinen länger als die Dendriten, wobei sein Durchmesser konstant bleibt. Die am Axon entstehenden Verzweigungen bilden einen rechten Winkel zum Axon. Die Informationsweiterleitung erfolgt im Axon durch elektrische Signale, an den Synapsen

zwischen Nervenzellen, oder Nervenzellen und Zielorganen, durch eine chemische Übertragung oder eine elektrische Übertragung an elektrischen Synapsen (für eine Übersicht siehe: Hall, 1992). Die Aufrechterhaltung der polaren Morphologie einer Nervenzelle, die für ihre Funktion von grundlegender Bedeutung ist, wird insbesondere durch die Organisation des neuronalen Zytoskeletts bestimmt.

A 1.1 Das neuronale Zytoskelett

Eukaryotische Zellen besitzen die Fähigkeit, verschiedene Formen anzunehmen und koordinierte Bewegungen auszuführen. Diese Fähigkeiten werden durch ein komplexes Netzwerk, das aus unterschiedlichen Proteinfilamenten besteht und sich durch das gesamte Zytoplasma erstreckt, vermittelt. Das Zytoskelett ist eine höchst dynamische Struktur, die sich in einem ständigen Umbau befindet. Es ist maßgeblich an unterschiedlichen und komplexen Vorgängen, wie der Morphogenese, Zellmigration, -teilung und -differenzierung, sowie Kontaktaufnahme zu Nachbarzellen und Substrat, Transportvorgängen im Zytoplasma und Muskelkontraktion beteiligt. Die Funktion des Zytoskeletts ist abhängig vom Zusammenspiel von drei Proteinfilament-Typen: den Aktin-Filamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten (für eine Übersicht siehe: Alberts *et al.*, 2002). Die Filamente setzen sich aus verschiedenen Protein-Monomeren zusammen. Aktin-Filamente werden aus dem Grundbaustein Aktin gebildet und sind speziell für die Veränderung der Form und der Bewegungen der Zelle verantwortlich. Mikrotubuli werden aus Tubulin aufgebaut und steuern hauptsächlich die Lage der Zellorganellen. Intermediärfilamente bestehen aus Untereinheiten einer Familie fibröser Proteine, wie z. B. Vimentin, Lamin oder Keratin und verleihen der Zelle mechanische Festigkeit.

Die Familie der neuronalen Intermediärfilamente umfasst bei Säugern sechs Proteine: neben den drei Neurofilament (NF) Untereinheiten – **NF-L** (66 kD) (Geisler *et al.*, 1985), **NF-M** (95-100 kD) (Levy *et al.*, 1987; Napolitano *et al.*, 1987) und **NF-H** (110-115 kD) (Lees *et al.*, 1988) – werden auch α -Internexin (~60 kDa) (Kaplan *et al.*, 1990), Peripherin (~50 kDa) (Thompson & Ziff, 1989) und Nestin (~200 kDa) (Lendhal *et al.*, 1990) neuronal exprimiert. Die drei Neuro-filament-Proteine wurden aufgrund ihrer Häufigkeit in Säuger-Neuronen als erste Neuronen-spezifische Intermediärfilamente identifiziert, obwohl sie erst im Laufe der Differenzierung exprimiert werden (Hoffman & Lasek, 1975; Hoffman *et al.*, 1987). Sie reichern sich vor allem in großen myelinisierten Neuronen an, wobei sie fünf- bis zehnfach häufiger als Mikrotubuli vorkommen. Während Neurofilamente überwiegend statische Strukturen sind, die vor allem der Stabilisierung der Zelle dienen, bilden Aktinfilamente und

Mikrotubuli dynamische Strukturen, die u. a. für motile Prozesse, wie Orientierung des Wachstumskegels und Auswachsen der Neuriten zuständig sind (Vale, 1992).

Mikrotubuli sind in der gesamten Nervenzelle ubiquitär verteilt, jedoch in den Neuriten konzentriert. Sie haben vielfältige Funktionen, so unterstützen sie z. B. zusammen mit den Neurofilamenten die Stabilisierung des Axons. Eine weitere wichtige Aufgabe ist der axonale Transport. Dabei gewährleisten Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine die Versorgung der präsynaptischen Endigung mit synaptischen Vesikeln und deren Vorläufern. Ebenso findet ein Rücktransport z. B. von abgebauten Membranmaterial oder endozytierten Neurotrophinen von der Nervenendigung zum Zellkörper statt.

A 2 Die Rho-GTPasen bei der neuronalen Entwicklung und Regeneration

Die Rho-GTPasen gehören zur Ras-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine. Diese Proteine sind monomere G-Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-40 kD und wirken als molekulare Schalter bei zahlreichen zellulären Prozessen. Innerhalb der Rho-Familie unterscheidet man Mitglieder der Rho-, Rac-, Cdc42, RhoH/TTF-, RhoD/Rif- und Rnd-Subfamilien, deren Anzahl je nach Spezies variiert (Aspenström, 2004). Zu den bisher am besten untersuchten Rho-Proteinen zählen RhoA, Rac1 und Cdc42 (für eine Übersicht: Jaffe & Hall, 2005). Diese Proteine werden durch GTP-Bindung aktiviert und durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP durch eine intrinsische GTPase inaktiviert (Abb. A1). Dies erklärt den vereinfachten Begriff der "Rho-GTPasen", welcher im weiteren Verlauf für die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie verwendet wird. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beschleunigen dramatisch den Austausch von GDP gegen GTP, während Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) diesen Austausch und damit die Aktivierung der Rho-GTPasen hemmen. GDIs sind außerdem für den Transfer der GTPasen von der Zellmembran in das Zytosol zuständig, wo diese in der inaktiven GDP-gebundenen Form vorliegen. Eine dritte Gruppe von Regulatoren, die der GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs), verstärkt die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine, wodurch diese in den inaktiven Zustand versetzt werden. In der GTP-gebundenen Form besitzen die Rho-GTPasen eine Konformation, die eine Interaktion mit nachgeschalteten Effektorproteinen, wie z. B. Serin/Threoninkinasen und Phosphoinositolkinasen, ermöglicht. Durch diesen Mechanismus werden die Signale für die unterschiedlichen zellulären Prozesse verstärkt und weitergeleitet.

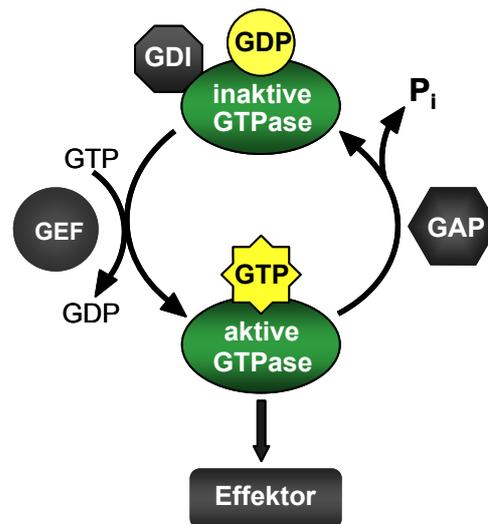


Abbildung A 1: Schematische Darstellung des Rho-GTPase-Zyklus

Die Rho-GTPasen werden durch GTP-Bindung aktiviert und durch Hydrolyse des GTPs zu GDP inaktiviert. Dabei halten GDIs die Rho-GTPasen im inaktiven Zustand im Zytosol. GEFs beschleunigen die Dissoziation von GDP und ermöglichen die Bindung von GTP. Nach Aktivierung werden über nachgeschaltete Effektoren Signale auf unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel die Regulation des Aktinzytoskeletts, übertragen. GAPs inaktivieren die Rho-GTPasen durch Stimulation der intrinsischen GTPase-Aktivität.

GDP: Guanin-5'-diphosphat

GTP: Guanin-5'-triphosphat

P_i: Orthosphosphat

Zu den Effektoren von Rho gehören ROCK I und ROCK II (Rho-Kinase), sowie die Proteinkinase N (PKN), welche bei der Regulation des Aktinzytoskeletts eine Rolle spielen (Leung *et al.*, 1995; Katoh *et al.*, 1998 a/b, Ishizaki *et al.*, 2000).

Die Rho-Kinase wird spezifisch von Rho, aber nicht von Rac oder Cdc42, aktiviert und entfaltet dann über verschiedene Substrate ihre Wirkung. Beispielsweise phosphoryliert sie eine regulatorische Untereinheit der Myosin-Phosphatase, woraus eine verstärkte Aktin-Myosin-Interaktion und damit eine Kontraktion von Aktinfasern resultiert (Kimura *et al.*, 1996). Außerdem wirkt die Rho-Kinase über direkte Phosphorylierung der leichten Kette auf das Myosin selbst, was wiederum zu einer verstärkten Aktin-Myosin-Interaktion führt (Amano *et al.*, 1996 u. 1998). Effektoren von Rac und Cdc42 sind beispielsweise die p21-aktivierte Kinase (PAK-Kinase) und das neuronale Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP) (Luo, 2000; Takai *et al.*, 2001). Bis heute sind noch viele Einzelheiten der Regulationskaskaden von Rho-GTPasen und deren Effektoren weitgehend unklar (für eine Übersicht: Luo, 2002; Govek *et al.*, 2005).

A 2.1 *Funktion der Rho-GTPasen in nicht-neuronalen Zellen: Das Fibroblastenmodell*

Erste Hinweise über die zellulären Funktionen von Rho, Rac und Cdc42 ergaben Studien in Fibroblasten (Ridley & Hall 1992; Nobes & Hall 1995a/b; Kozma *et al.*, 1995). So wurde mittels Mikroinjektion von dominant aktiven und inaktiven Rho-Proteinen gezeigt, dass die Rho-GTPasen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts spielen: Während Cdc42 zur Ausbildung von Filopodien führt, induziert Rac1 die Bildung von Lamellipodien und den Membran-Kräuselungen ("membrane ruffles"). RhoA schließlich bewirkt die Ausbildung von Aktinkabeln ("stress fibers") und Zelladhäsionskomplexen (Abb. A2) (Hall 1994; Mackay *et al.*, 1998). In einem Wundheilungs-Assay embryonaler Fibroblasten ist der Einfluss von Rho, Rac und Cdc42 auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ebenfalls gezeigt worden (Nobes & Hall, 1999). Nach dem Modell von Hall (1994) sind die Rho-GTPasen in hierarchischer Weise angeordnet: Cdc42 aktiviert Rac1, welches seinerseits RhoA aktivieren kann. Neuere Studien stellen dieses Hierarchie-Modell jedoch in Frage. Die Interaktionen der GTPasen sind vermutlich viel komplexer: So wurde in 3T3-Fibroblasten eine Rho-hemmende Wirkung von Rac und in Neuroblastomzellen eine Cdc42-kompetitive Wirkung von RhoA beschrieben (Sander *et al.*, 1999; Kozma *et al.*, 1997). Die unterschiedlichen Effekte der Rho-GTPasen auf die Organisation des Zytoskeletts sind auch in anderen Zelltypen, wie zum Beispiel Epithel- und Endothelzellen, Astrozyten, Mastzellen, Lymphozyten und Thrombozyten, gezeigt worden (Hall, 1998).

Während früher angenommen wurde, dass die Rho-GTPasen ausschließlich das Aktinzytoskelett regulieren, geht man inzwischen davon aus, dass sie zusätzlich an zahlreichen Signaltransduktionsprozessen, wie zum Beispiel an der Genexpression, beteiligt sind.

Weitere Funktionen der Rho-GTPasen beinhalten verschiedene Sekretionsvorgänge und die Endozytose (Takai, 2001), sowie eine Beteiligung an der Zellzyklusprogression und Transformation (Coso *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1995; Sahai *et al.*, 1999). Die Rho-GTPasen spielen zudem vermutlich bei der Aktivierung der JNK (c-Jun-NH₂-terminal kinase)- und MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinase)-Signalkaskade eine Rolle, wie auch bei der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SRF (serum response factor) und NFκB (Takai, 2001; Hill *et al.*, 1995).

A 2.2 Funktion der Rho-GTPasen in neuronalen Zellen

Hinweise auf eine zentrale Funktion der Rho-GTPasen im Zentralnervensystem von Säugern haben Untersuchungen über die Genexpression von Rho, Rac und Cdc42 im adulten Rattenhirn ergeben (Olenik *et al.*, 1997). Mittels *in situ* Hybridisierung und Western Blot-Analyse konnte in Hippocampus, Cerebellum, Neocortex und Thalamus eine starke Expression dieser Rho-Proteine nachgewiesen werden. Studien in neuronalen Zelllinien und Primärkulturen haben regulatorische Effekte der Rho-GTPasen auf das Auswachsen und die Rückbildung von Neuriten gezeigt. Axonales Wachstum wird über Aktin-Polymerisierung innerhalb des Wachstumskegels induziert, welcher aus Filopodien und Lamellipodien besteht (Abb. A2) (Lin *et al.*, 1994; Hall 1998).

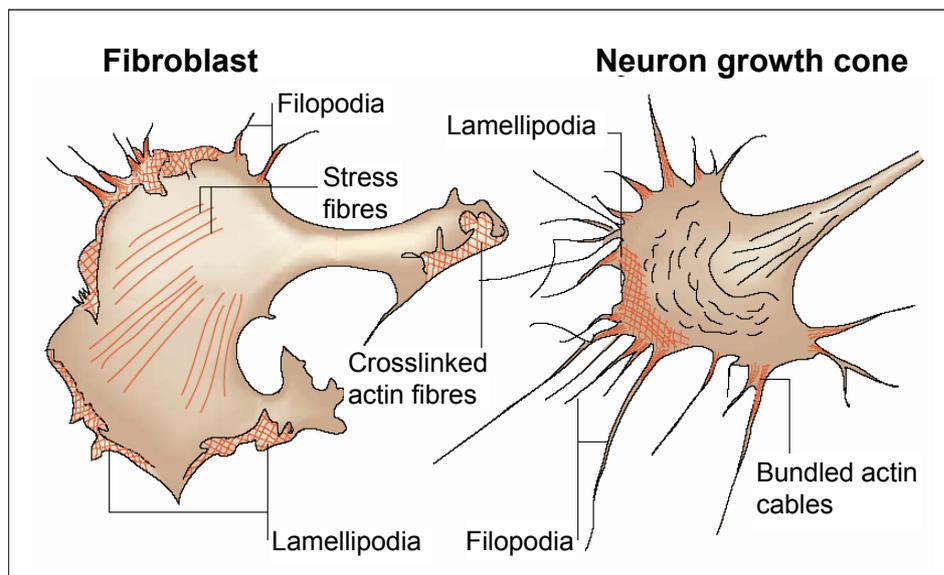


Abbildung A 2: Aktinzytoskelett-Strukturen in Fibroblast und neuronalem Wachstumskegel
 Filopodien und Lamellipodien bilden prominente, aus F-Aktin bestehende Strukturen in Fibroblasten und neuronalen Wachstumskegeln. Abbildung entnommen aus Luo, 2000.

In N1E-115 Neuroblastomzellen führt die Aktivierung von Rac und Cdc42 zur Bildung von Filopodien und Lamellipodien (Kozma *et al.*, 1997; Lamoureux *et al.*, 1997), während RhoA die Retraktion von Neuriten und Abrundung der Zellen (im Gegensatz zu den Befunden in Fibroblasten) bewirkt (Jalink *et al.*, 1994; Kozma *et al.*, 1997). Dies kann ebenso in PC12-Zellen und Hühnerneuronen beobachtet werden; umgekehrt kommt es dort nach Inaktivierung von RhoA mittels des C3 Exoenzyms aus *C. botulinum* zu einem Auswachsen von Neuriten (Nishiki *et al.*, 1990; Jalink *et al.*, 1994; Tigyi *et al.*, 1996b; Sebok *et al.*, 1999).

Dass die Inaktivierung der GTPase RhoA nicht nur das Neuritenwachstum induziert, sondern auch die Regeneration von Axonen fördert, hat eine *in vivo* Studie ergeben: Die Regeneration im ZNS wird in der Regel von inhibitorischen Proteinen blockiert. Eine Studie von Lehmann *et al.* (1999) beschreibt die Suche nach einer Methode, um die neuronale Antwort auf wachstumshemmende Signale zu verhindern. In vorbereitenden Versuchen kam es in PC12-Zellen sowohl nach Behandlung mit dem RhoA-inaktivierenden C3-Fusionstoxin, als auch nach Transfektion mit dominant negativem RhoA zum Auswachsen von Neuriten. Dieser Befund ließ sich auch bei Anwesenheit von wachstumshemmendem MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein) zeigen. Die entsprechende Behandlung retinaler Primärkulturen mit C3 führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

A 2.3 *Die neuronale Morphogenese*

Untersuchungen an kultivierten Neuronen des Hippokampus, die aus embryonalen Rattengehirnen isoliert wurden (Dotti *et al.*, 1987, Goslin & Banker, 1989; 1991), ergaben dass die neuronale Morphogenese einem sich immer wiederholendem, striktem Schema folgt (Abb. A 3). Dabei bildet die neuronale Vorläuferzelle kurz nach der Anhaftung an ihr Substrat zuerst verschiedene, morphologisch nicht unterscheidbare Zellausläufer, die Primärneuriten (Stadium 2). Anschließend beginnt einer dieser Zellausläufer schneller zu wachsen als die Übrigen und wird zum Axon (Stadium 3). Zuletzt erfolgt die Reifung der Dendriten, welche durch eine proximodistale Verjüngung und die Ausbildung baumartiger Verzweigungen ihre typische Morphologie erhalten (Stadium 4). In weiteren Stufen der Reifung wachsen Dendriten und Axon weiter aus und bilden die Dornfortsätze für synaptische Kontakte mit anderen Neuronen und Muskelzellen (Stadium 5).

Die Entstehung neuer Neuriten, ihre Elongation, Orientierung und das Ausmaß ihrer Verzweigungen muss genauestens reguliert werden. Diese Prozesse erfordern ein Zusammenspiel der einzelnen Zytoskelettelemente, das durch die Integration verschiedener intra- und extrazellulärer Signale kontrolliert wird (Goslin & Banker, 1989; Arimura & Kaibuchi, 2007). Dabei wird vermutlich das relativ dichte kortikale Aktin-Netzwerk, das die Membrantopologie stabilisiert, lokal destabilisiert. Gleichzeitig müssen vor allem Mikrotubuli polymerisiert und stabilisiert werden, um Zytoskelett-Komponenten für den entstehenden Zellausläufer zusammenzusetzen. Von zentraler Bedeutung sind dabei u. a. die Rho-GTPasen, da sie die lokale Reorganisation des Aktin-Netzwerkes regulieren, wohingegen die MAPs (microtubule associated proteins) die Polymerisation der Mikrotubuli steuern (Leger *et al.*, 1994; Luo, 2000).

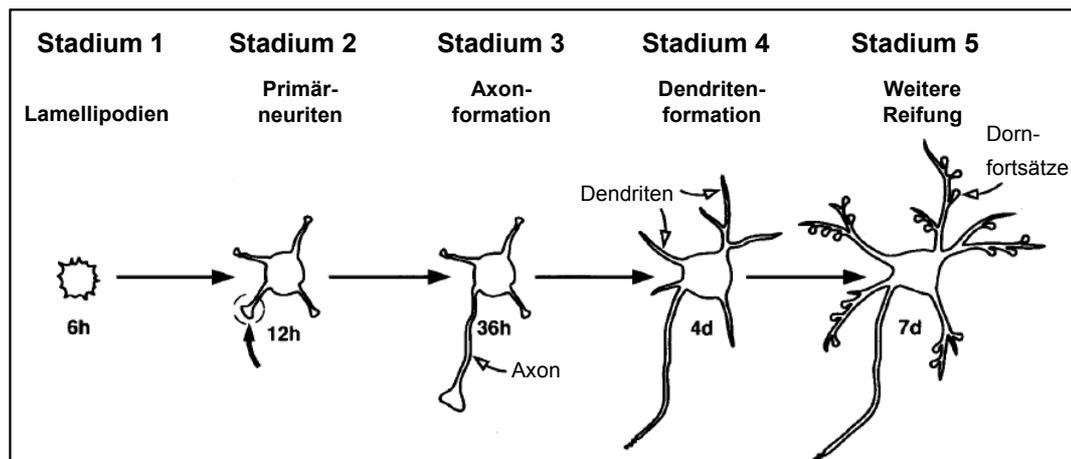


Abbildung A 3: Schematische Darstellung eines sich entwickelnden Neurons

Etwa 6 h nach der Anhaftung der Zelle an ein Substrat bildet sich zunächst ein Lamellipodiensaum (Stadium 1). Kurz darauf beginnen die Neuriten zu wachsen (Stadium 2). Nach ca. 36 h wächst nur einer der Neuriten weiter und wird zum Axon (Stadium 3). Einige Tage später beginnen auch die Dendriten zu wachsen und bilden ihre typischen baumartigen Verzweigungen (Stadium 4). Im letzten Stadium der Reifung, nach etwa 7 Tagen, entwickeln sich Dendriten und Axon weiter und an den Dendriten bilden sich die Dornfortsätze (Stadium 5). Abbildung entnommen aus Govek *et al.* 2005 und modifiziert.

Ein weiteres Auswachsen der Neuriten wird im Wachstumskegel, der sich an deren distalen Ende befindet, organisiert. Hierbei scheint GAP43 (growth associated protein 43) eine wichtige Komponente darzustellen, da es als Aktin-bindendes Plasmamembranprotein in den Wachstumskegeln sich entwickelnder und regenerierender Neuronen angereichert ist. Die Beeinflussung der F-Aktin Organisation erfolgt in einer phosphorylierungsabhängigen Weise (He *et al.*, 1997). Der Einfluss von GAP43 auf die Ausbildung von Neuriten konnte am Phänotyp transgener Mäuse, die GAP43 überexprimieren, gezeigt werden. Bei ihnen wurden fehlerhafte interneuronale Verbindungen nachgewiesen (Aigner *et al.*, 1995; Aigner & Caroni, 1995). Durch die Veränderungen in der Aktin-Dynamik im Wachstumskegel werden transient Lamellipodien und Filopodien gebildet. Daran sind wahrscheinlich ebenfalls Mitglieder der Rho-GTPase-Familie von zentraler Bedeutung. Hierbei fördern Rac und Cdc42 das Auswachsen von Neuriten, wohingegen Rho deren Auswachsen inhibiert (Luo, 2000). Neben der Steuerung der axonalen Wegfindung sind die Rho-GTPasen auch an der Bildung von dendritischen Verzweigungen und Dornen beteiligt. So ist in transgenen Mäusen mit konstitutiv-aktiv exprimiertem humanem Rac1 die Anzahl dendritischer Dornen erhöht (Luo *et al.*, 1997; Tashiro *et al.*, 2000; Nakayama *et al.*, 2000). Die konstitutive Aktivierung von RhoA hingegen führt zu einer Abnahme der Dichte und Länge der Dornfortsätze (Tashiro *et al.*, 2000; Nakayama *et al.* 2000; Pilpel & Segal, 2004). Es wird angenommen, dass die antagonistische Wirkungsweise der beiden GTPasen für eine präzise Regulierung des

Aktinzytoskeletts beispielsweise für die Stabilität während der Bildung neuronaler Fortsätze und dendritischer Dornen notwendig ist (Govek *et al.* 2005)

Auch Isoformen des MAP-Proteins Tau können mit Komponenten des Membrankortex interagieren, wodurch die Mikrotubuli dort stabilisiert werden können (Kempf *et al.* 1996). Eine Phosphoisoform von MAP1b ist an der lokalen Stabilisierung der Mikrotubuli in sich drehenden Wachstumskegeln beteiligt (Mack *et al.*, 2000). Es wird dabei davon ausgegangen, dass die selektive Stabilisierung von F-Aktin für die initiale Orientierung des Wachstumskegels wichtig ist, und dass die selektive Stabilisierung der Mikrotubuli für eine Stärkung und Etablierung der eingeschlagenen Wachstumsrichtung von Bedeutung ist (Brandt, 1998).

A 3 ADP-Ribosyltransferasen

Die bedeutende biologische Rolle der ADP-Ribosyltransferasen (ADP-RT) zeigte sich erstmals 1968 durch die Entdeckung, dass das Diphtherietoxin des Erregers *Corynebacterium diphtheriae* über diesen Mechanismus irreversibel einen Translationsschritt der Proteinbiosynthese in humanen Zellen blockiert (Honjo *et al.* 1968). Seitdem konnten ADP-RT-Familienmitglieder in vielen Prokaryonten identifiziert werden, darunter diverse bakterielle Toxine wie das Cholera Toxin, die *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxine A und S und das Pertussis Toxin, die aufgrund ihrer human-pathogenen Wirkung von großer Bedeutung sind. Die meisten dieser bakteriellen ADP-RTs sind sezernierte Enzyme, die Proteine anderer Organismen modifizieren, indem sie die Übertragung eines ADP-Riboserestes auf ein Substratprotein zu katalysieren, wobei das in Zellen ubiquitär vorkommende Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) als Kosubstrat verwendet wird (Ueda & Hayaishi, 1985; Shall, 1995).

Während der Reaktion bindet die ADP-RT das NAD⁺ und spaltet es in ADP-Ribose und Nikotinamid. Anschließend wird der ADP-Ribose-Anteil des NAD⁺ auf eine spezifische Aminosäure eines Substrats, in den meisten Fällen ein Nukleotid-bindendes Substratprotein, übertragen und das Nikotinamid ins Zytosol entlassen. Der ADP-Ribose-Transfer findet in einem transienten, ternären Komplex statt, der aus ADP-RT, Substrat und NAD⁺ besteht (Abb. A 4).

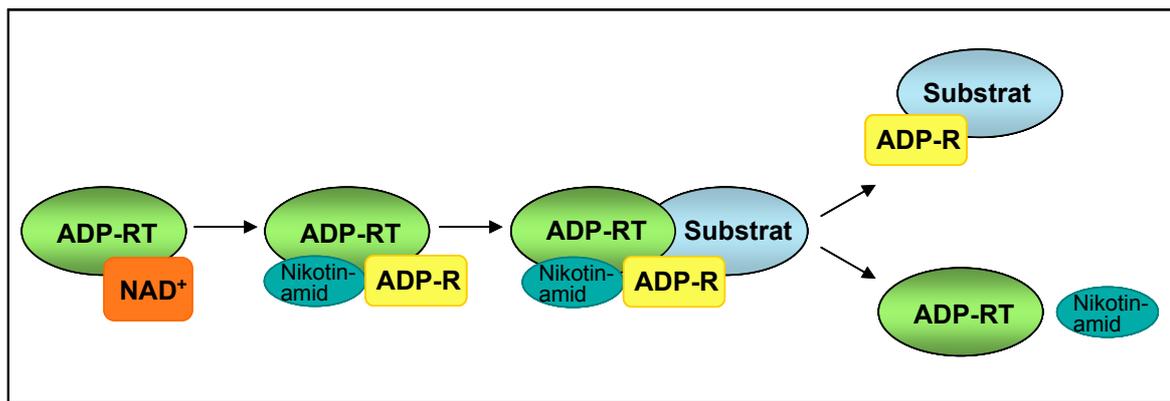


Abbildung A 4: Schema der ADP-Ribosylierung

Die ADP-RTs binden NAD^+ und spalten es in Nikotinamid und ADP-Ribose (ADP-R). Anschließend erfolgt der Transfer der ADP-Ribose auf sein spezifisches Substrat in einem ternären Komplex. Zuletzt zerfällt der Komplex in Substrat plus gebundene ADP-Ribose und ADP-RT, wobei das Nikotinamid freigesetzt wird.

Die bakteriellen ADP-RTs lassen sich in vier Gruppen einteilen, wobei das Zielprotein, auf das der ADP-Riboserest übertragen wird, die Zugehörigkeit bestimmt (Aktories & Just, 1993).

Die erste Gruppe umfasst die Toxine, die den an der Proteinsynthese eukaryotischer Zellen beteiligten Elongationsfaktor 2 (EF-2) modifizieren. Dazu gehören das Diphtherie-Toxin, das von *Corynebacterium diphtheriae* gebildet wird und das von *Pseudomonas aeruginosa* synthetisierte Exotoxin A (PAETA) (Wilson & Collier, 1992).

In der zweiten Gruppe werden die Toxine zusammengefasst, die in der Lage sind, heterotrimere G-Proteine zu modifizieren. Dies resultiert entweder in die Aktivierung oder in der Inhibierung von Signalwegen, in welche die jeweiligen G-Proteine eingeschaltet sind. Zu dieser Toxin-Gruppe gehören das Cholera-Toxin aus *Vibrio cholerae* (Zhang *et al.*, 1997), die hitzelablen Enterotoxine aus enterotoxischen *Escherichia coli* (ETEC) und das Pertussis-Toxin aus *Bordetella pertussis* (Locht & Antoine, 1997).

Zur dritten Gruppe der bakteriellen ADP-Ribosyltransferasen werden die C3-ähnlichen Enzyme gezählt, die kleine GTPasen (z. B. Rho) *in vitro* zu ADP-ribosylieren vermögen, und auf die in der vorliegenden Arbeit im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

Die vierte Gruppe wird von den binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen gebildet. Vertreter dieser Gruppe sind C2-Toxin aus *Clostridium botulinum* und Iota-Toxin aus *Clostridium perfringens*, sowie ein Toxin aus *Clostridium spiroforme* (Popoff & Boquet, 1988; Simpson *et al.*, 1989) und eine ADP-Ribosyltransferase aus *Clostridium difficile* (Popoff *et al.*, 1991; Perelle *et al.*, 1997a)

A 3.1 C3-ähnliche ADP-Ribosyltransferasen

Die C3-ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen sind einkettige Exoenzyme. Als Hauptrepräsentant dieser Familie gilt das C3-Exoenzym aus *Clostridium botulinum*, von dem die beiden Isoformen C3^{bot1} und C3^{bot2} bekannt sind (Aktories *et al.* 1988; Popoff *et al.* 1991). Die Aminosäuresequenz der zwei Isoformen ist zu 65 % identisch (Nemoto *et al.*, 1991). Aufgrund der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität und ihrer Sequenzhomologie zu C3^{bot1/2} werden auch die C3-Proteine C3^{lim} aus *Clostridium limosum* (Just *et al.*, 1992), C3^{cer} aus *Bacillus cereus* (Just *et al.*, 1995a) und C3^{stau} aus *Staphylococcus aureus* (Wilde *et al.* 2001) in die Familie der C3-ähnlichen ADP-RT eingeordnet, wobei für C3^{stau} drei Isoformen (C3^{stau}1-3) bekannt sind. Für C3^{stau} wird häufig auch das Synonym EDIN (*epidermal cell differentiation inhibitor*) verwendet, da es die morphologische Differenzierung von Keratinozyten *in vitro* inhibieren soll (Sugai *et al.*, 1990).

Die C3-ähnlichen ADP-RT sind stark basische Proteine (pI > 9) mit einem Molekulargewicht von 24-26 kD. Sie werden als einkettige Proteine produziert und besitzen eine Signalsequenz von ca. 40 Aminosäuren, welche das Signal für die Sekretion aus den Bakterien ist und bei der Ausschleusung abgespalten wird. Während C3^{bot} Phagen-kodiert ist, sind die Gene für die anderen C3-Proteine genomisch codiert.

Die Kristallstruktur von C3^{bot1} ist sowohl ohne, als auch mit gebundenem NAD⁺ aufgeklärt und zeigt eine nierenförmige Raumstruktur (Han *et al.*, 2001; Menetrey *et al.*, 2002). Das aktive Zentrum von C3^{bot1} besteht aus einem gemischten α/β -Motiv mit einem β -sandwich-Kern (Abb. A5). Dieser β -sandwich-Kern besteht aus einem 5-strängigen, gemischten β -Faltblatt, das senkrecht zu einem 3-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt angeordnet ist. Vier α -Helices umgeben das 3-strängige β -Faltblatt, während eine weitere α -Helix das 5-strängige β -Faltblatt umgibt. Die NAD⁺-Bindungstasche befindet sich zwischen dem β -sandwich-Kern und einer α -Helix α 3. Trotz geringer Aminosäuresequenz-Homologie besitzen alle C3-ähnlichen ADP-RT eine ähnliche NAD-Bindungstasche und ein konserviertes Glutamat an der Position 174 (Han & Tainer, 2002). Dieses Glutamat befindet sich im katalytischen ARTT-Loop (*ADP-ribosylating-turn-turn*) und ist notwendig für den Transfer der ADP-Ribose auf die Akzeptoraminosäure des Substrats und wird daher als katalytische Aminosäure Glu-174 bezeichnet.

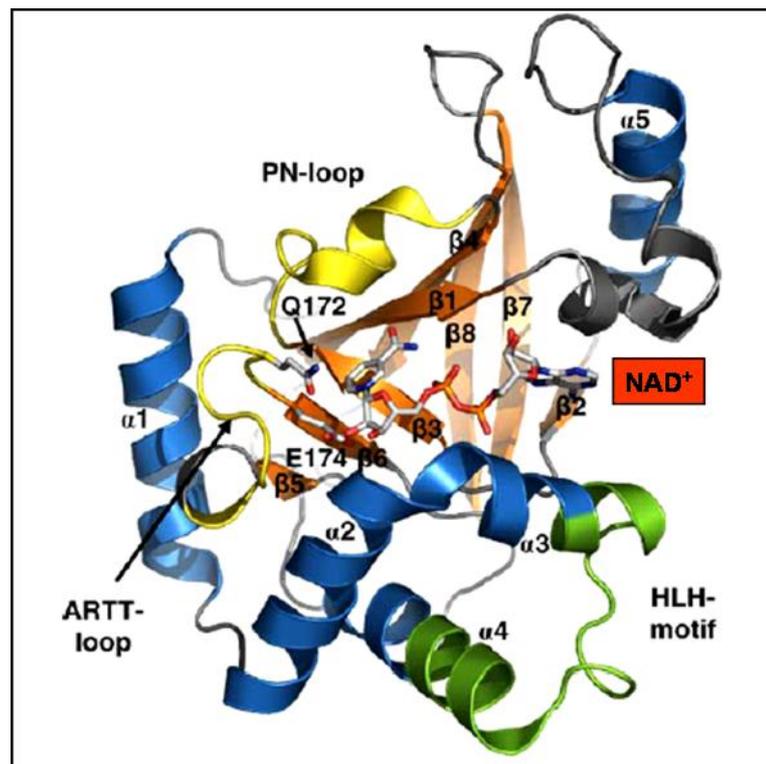


Abbildung A 5: Dreidimensionale Struktur von C3^{bot1} mit NAD⁺ (PDB-ID 1GZF)

Dargestellt ist die Kristallstruktur von C3bot1 mit gebundenem NAD⁺ (als Stäbchen-Modell). Die Elemente der Sekundärstrukturen sind farblich markiert (α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 5$), blau; die β -Faltblätter ($\beta 1$ - $\beta 8$), grün) und nach Han *et al.* 2001 beschriftet. In gelb dargestellt ist das PN- und ARTT-Loop, die die katalytischen Aminosäuren Q172 und E174 (als Stäbchen-Modell) beinhalten. Entnommen aus Vogelsang *et al.* 2007.

Die Bedeutung von Glu-174 für die Katalyse wurde zum Einen durch Mutagenese und zum Anderen durch kovalente Bindung von NAD⁺ bestätigt. Der Austausch von Glu-174 führt zu einer Abnahme der Enzymaktivität um den Faktor 1.000 (Wilde *et al.* 2002b, 2003).

Das ARTT-Loop befindet sich bei C3^{bot1} zwischen den β -Strängen $\beta 5$ - $\beta 6$ (Abb. A 5) und ist sowohl an der ADP-Ribosylierungsreaktion beteiligt, als auch für die Substraterkennung verantwortlich (Han *et al.*, 2001). Neben dem katalytischen Glutamat ist an Position 172 Glutamin (Gln-172) als eine weitere wichtige Aminosäure des ARTT-Loops identifiziert worden. Dieses Glutamin erhöht die Nukleophilie der Akzeptor-Aminosäure (Asparagin bei Rho GTPasen). Ein weiteres, für die NAD⁺-Bindung essentielles Motiv, ist das PN-Loop (Phosphat-Nikotinamid-Motiv). Es umfasst die Aminosäuren 137-146 in C3^{bot1} und liegt in der Schlaufe $\beta 3$ - $\beta 4$ (Han *et al.*, 2001; Menetrey *et al.*, 2002). Dieses PN-Loop begrenzt die NAD⁺-Bindungstasche zusammen mit der ARTT-Loop und stabilisiert dabei die NAD⁺-Bindung.

A 3.2 *Rho-GTPasen als Substrate für C3-ähnliche ADP-RT*

Alle Mitglieder der C3-ähnlichen ADP-RT inaktivieren spezifisch die Rho-GTPasen RhoA, B und C durch ADP-Ribosylierung (Aktories & Frevert, 1987; Chardin *et al.*, 1989). Die ADP-Ribose wird dabei N-glykosidisch an die Akzeptoraminosäure Asn-41 der Rho-GTPase gebunden (Sekine *et al.* 1989). Dabei hat der Einbau von ADP-Ribose nur eine geringe Auswirkung auf die Nukleotid-Bindung oder auf die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyseaktivität der Rho-GTPasen. Ebenso wenig wird die Bindung von Effektormolekülen, wie z. B. der Proteinkinase N, inhibiert, wenn das aktive GTP-gebundene Rho ADP-ribosyliert wird (Sehr *et al.*, 1998). Durch die ADP-Ribosylierung wird jedoch die Aktivierung der Rho-GTPasen durch GEFs inhibiert (Sehr *et al.*, 1998) und die Dissoziation der GDI von dem Rho-GDI-Komplex verhindert (Genth *et al.*, 2003). Zudem ist die Bindung von RhoA an die Membran nach der ADP-Ribosylierung blockiert (Fujihara *et al.*, 1997; Genth *et al.*, 2003). Somit ist die Sequestrierung des ADP-ribosylierten Rho im GDI-Komplex der entscheidende Schritt, der eine Aktivierung der Rho-GTPasen und damit die Signalweiterleitung verhindert.

Die Inaktivierung und Inhibierung von Rho-abhängigen Prozessen äußert sich besonders in der Neuverteilung von Aktinfilamenten und der Depolymerisation von Stressfasern (Paterson *et al.*, 1990; Wiegers *et al.*, 1991). Nach Zugabe von C3^{bot} zu kultivierten Zellen ist deren Abrundung aufgrund zerstörter Stressfasern zu beobachten (Chardin *et al.*, 1989). Gleiches gilt auch für andere Mitglieder der C3-ähnlichen ADP-RT (Wilde *et al.*, 2001). Weiterhin wurde festgestellt, dass durch ADP-ribosyliertes Rho Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert bleiben (Yamamoto *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1995). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ADP-Ribosylierung von Rho die nachfolgenden Signalkaskaden in den Wirtszellen erheblich beeinflusst.

A 3.3 *Ist C3^{bot} nicht nur eine einfache ADP-Ribosyltransferase?*

Im Gegensatz zu den anderen bakteriellen Toxinen fehlt den C3-ähnlichen ADP-RT eine Rezeptorbinde- und Translokationsdomäne, mit der sie sich selbst in die eukaryotische Zielzelle einschleusen können. Obwohl die C3-Exoenzyme somit keine bekannten Autotransportereigenschaften besitzen, sind ihre Substrate, die intrazellulär lokalisierten Rho-GTPasen. Die Aufnahme von C3 in die Zielzelle erfolgt vermutlich über Pinozytose. Zur Inaktivierung der Rho-Proteine durch C3 in vielen bisher untersuchten Zelllinien sind daher mikromolare Konzentration und längere Inkubationszeiten (>24h) erforderlich (Aktories *et al.*, 2000; Boquet *et al.*, 1998). Die Funktion der C3-ähnlichen ADP-RT als Virulenzfaktoren ist in dieser Hinsicht noch unklar, da unverstanden ist, wie ein Exoenzym Zielzellen beeinflussen

soll, in die es nicht eindringen kann. Einen Erklärungsansatz zeigt *S. aureus*. Das intrazellulär lebende Bakterium gibt das C3-Exoenzym in das Zytoplasma ab und modifiziert dort sofort die Rho-Proteine (Molinari *et al.*, 2006).

In verschiedenen neuronalen Zelllinien, wie NIE-115, GOTO und SH-SY5Y, konnte hingegen beobachtet werden, dass C3^{bot} bereits in nanomolaren Konzentrationen das Auswachsen von Neuriten induziert und außerdem nicht zur Zellabrundung führt (Marler *et al.*, 2005; Kamata & Hattori, 2007).

In murinen hippokampalen Primärneuronen verursacht C3^{bot}, nicht aber C3^{lim} oder C3^{stau} in nanomolaren Konzentrationen ein vermehrtes Axon- und Dendritenwachstum, sowie die Bildung von Verzweigungen. Interessanterweise wurde der gleiche Effekt auch beobachtet, wenn die Neurone in Anwesenheit der enzymdefizienten Mutante C3^{bot}E174Q kultiviert wurden (Ahnert-Hilger *et al.*, 2004). Zudem gibt es Hinweise, dass auch verkürzte Fragmente von C3^{bot} dieselbe neurotrophe Wirkung wie das vollständige C3-Protein besitzen.

Diese Befunde führen zu der Hypothese, dass C3^{bot} zum Einen eine neurotrophe Wirkung besitzt, die nicht von der RhoA-Inaktivierung abhängt und zum Anderen, dass neuronale Zellen möglicherweise eine Oberflächenstruktur besitzen, an die C3^{bot} spezifisch binden kann, da sie bereits in sehr geringen Konzentrationen auf C3^{bot} reagieren. Diese Annahmen bilden die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

A 4 Das NT2/N-System

Die Neurogenese und die daran beteiligten Faktoren sind *in situ* nur sehr schwer zu untersuchen, da die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellen innerhalb des neuronalen Gewebes sehr komplex sind. Aus diesem Grund wurden bisher vor allem Primärkulturen (z. B. isolierte Neuronen aus dem Hippokampus der embryonalen Maus) als Modellsystem herangezogen. Ein Nachteil dieser Primärkulturen ist ihre extreme Heterogenität, da sie neben Neuronen auch gliale Zellen enthalten und zudem aufwändig zu präparieren sind.

In den 90er Jahren wurde daher in der Arbeitsgruppe von Dr. V. Lee das NT2/N-System als neuronales Kulturmodell entwickelt (Pleasure & Lee, 1992, Cook *et al.*, 1994). Das System basiert auf der Zelllinie NT2/clone D1, die aus einem humanen, embryonalen Teratokarzinom isoliert wurde. In ihrem Phänotyp entsprechen diese Zellen zentralnervösen Vorläuferzellen (Pleasure & Lee, 1993). Sie können durch Behandlung mit Retinsäure (Vitamin-A-Säure) in postmitotische, terminal differenzierte, polare Neuronen (NT2/N-Zellen) differenziert werden. Neben den NT2/N Zellen sind in der Kultur nach der Behandlung mit Retinsäure (RA) und

Zytostatika noch flache Zellen enthalten. Diese Zellen wurden als Astrozyten identifiziert und in der Literatur als NT2/A-Zellen bezeichnet (Bani-Yaghoub *et al.*, 1999; Sandhu *et al.*, 2002).

NT2/N-Zellen exprimieren verschiedene neuronale Markerproteine, wie Tau, MAP2b und phosphoryliertes Neurofilament M (Lüdemann *et al.*, 2005). Sie zeigen ein morphologisch und immunzytochemisch unterscheidbares somatodendritisches (MAP2-positiv) und axonales (MAP2-negativ; Tau-positiv) Kompartiment (Pleasure & Lee, 1992). Die Ausbildung zellulärer Polarität unterscheidet diese Zellen von fast allen anderen neuronalen Zellkultursystemen, die auf Zelllinien basieren. Folglich sind sie damit als Modellsystem für die Untersuchung der molekularen Vorgänge während der Neurogenese und der Entwicklung neuronaler Polarität geeignet. NT2/N-Zellen besitzen den Charakter fetaler ZNS Neuronen. Dies zeigt sich unter anderem in der ausschließlichen Expression der fetalen Tau-Isoform (Pleasure & Lee, 1993). Allerdings nehmen NT2/N-Zellen, die in Mäusehirne transplantiert wurden, nach einigen Monaten den Phänotyp vollständig gereifter Neuronen an und exprimieren auch adulte ZNS Tau-Isoformen. Diese Zellen exprimieren zudem die adultspezifische, am stärksten phosphorylierte Form des Neurofilament H (Kleppner *et al.*, 1995). Demnach verfügen NT2/N-Zellen über das Potential zur Reifung. Bislang ist jedoch noch nicht bekannt, welche äußeren Faktoren dafür verantwortlich sind.

A 5 Ziele der Arbeit

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der C3-ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen besitzt C3^{bot} eine bisher unbekannte neurotrophe Wirkung auf murine, primäre Hippokampusneurone, die nicht über die Inaktivierung von Rho vermittelt wird. Außerdem konnte die Rho-unabhängige neurotrophe Wirkung von C3^{bot} bisher ausschließlich an primären, terminal differenzierten Neuronen, nicht aber an neuronalen Zelllinien festgestellt werden. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} möglicherweise vom Differenzierungsstatus neuronaler Zellen abhängt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das NT2/N-System zu etablieren und zu charakterisieren, um an diesem Modellsystem die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} zu studieren. Zudem sollte mit Hilfe von C-terminal verkürzten Fragmenten der Bereich, der möglicherweise an der neurotrophen Wirkung beteiligt ist, eingegrenzt werden.

- Die Wirkung des enzym-kompetenten, enzym-defizienten C3^{bot} und zweier C-terminaler C3-Peptide soll zwischen NT2 und NT2-N verglichen werden.
- Die neurotrophe Wirkung soll quantifiziert und analysiert werden.
- Es ist zu klären, ob die Wirkung des enzym-defizienten C3^{bot} und des C3-Peptids abhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle ist.

B Material und Methoden

B 1 Material und Geräte

B 1.1 Chemikalien

2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris)	ICN Biomedicals
2-Mercaptoethanol	Roth
4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
5-Fluoro-2'-deoxyuridin	Sigma
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth
Ammoniumchlorid	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Serva
Borsäure	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
Calciumchlorid, getrocknet (CaCl ₂)	Fluka
Coomassie Brilliant Blue R 250, für die Elektrophorese	Fluka
Cytosin-β-D-arabinosid	Sigma
Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p. a. (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Essigsäure, 99-100%	J.T. Baker
Ethanol, p. a.	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumsalz, p. a.	Serva
fetales Kälberserum (FCS)	PAA
Freundsches Adjuvans complete	Sigma F-5881
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma
Glyzerin	Sigma
Glyzin	ICN Biomedicals
Isopropanol	J.T. Baker
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kollagen R Solution 0.2 %	Serva

Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Methanol	J.T. Baker
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva
Natriumazid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat, p. a. (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Na-Tetraborat (Borax)	Sigma
Nicotinamidadenindinucleotid (NAD)	Sigma
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka
Paraformaldehyd, reinst (PFA)	Merck
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva
Ponceau S	Sigma
Protein A/G Sepharose	Santa Cruz
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	Amersham
³² P-NAD (800 µCi/mmol)	Perkin Elmer
all-trans-Retinsäure	Sigma
Salzsäure (HCl) 37%	Merck
Thymidin	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
TritonX-100	Sigma
Trypsin/EDTA	Biochrom AG
Tween 20	Biorad
Uridin	Sigma

B 1.2 Material Zellbiologie

B 1.2.1 Eukaryotische Zelllinien

NTera2/cl.D1(NT2) Gabe von Prof. Roland Brandt (Osnabrück)

SH-SY5Y ATCC (USA)

B 1.2.2 Zellkulturmedien

Die Zellkulturprodukte stammen von den Firmen Biochrom AG (Berlin) und GIBCO BRL Life Technologies GmbH (Karlsruhe).

Alle Zellkulturmedien wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Nährmedien vor Verwendung auf 37°C vorgewärmt.

DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (high Glucose)
DMEM-Serum	DMEM mit 10% (v/v) FCS (fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert), 5% (v/v) HS (Pferdeserum, hitzeinaktiviert), 2 mmol/L Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
NB/B27 Medium	Neurobasal Medium mit 2% (v/v) B27 Supplement, 25 M β -Mercaptoethanol, 0,5 mmol/L Glutamin, 25 μ mol/L Glutamat, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
SH-SY5Y Medium	DMEM mit 15% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 mmol/L Natriumpyruvat
<i>B 1.2.3 Stammlösungen für Zellkultur</i>	
Borat-Puffer	1,24 g Borsäure, 1,9 g Borax (Na-Tetraborat) ad 400 ml ddH ₂ O, pH 8.5
Kollagenlösung	50 μ g/ml Kollagen in 0,02 N Essigsäure
PBS	137 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 6,6 mmol/L Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mmol/L KH ₂ PO ₄
Poly-L-Lysin-Lösung	100 mg/ml Poly-L-Lysin in Borat-Puffer

Retinsäure-Lösung	10 mmol/L Retinsäure in DMSO (Lagerung -80°C)
Trypan-Blau	0,4%ige Lösung
Zell-Gefrierlösung	10% DMSO in FCS
Zytostatika-Lösung	1 mmol/L 5-Fluoro-2'-deoxyuridin, 1 mmol/L Uridin, 0,1 mmol/L Cytosin-β-D-arabinosid (Lagerung -80°C)

B 1.3 Puffer und Stammlösungen

B 1.3.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Anti-Ausbleich-Medium	2,4 g Mowiol, 6 g Glycerin ad 6 ml ddH ₂ O, 12 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8.5
DAPI-Stammlösung	1 mg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) in DMSO
Glyzin-Lösung	0,1 M Glyzin in PBS
PBS/BSA/Tween-Lösung	1% (w/v) BSA; 0,1% (v/v) Tween 20; 0,02% (v/v) Natriumazid in PBS
TritonX-100/BSA-Lösung	0,3% (v/v) TritonX-100, 5% (w/v) BSA in PBS
TritonX-100/PBS-Lösung	0,3% (v/v) TritonX-100 in PBS
Tween20/PBS-Lösung	1% (v/v) Tween 20 in PBS
Trypsin/EDTA-Lösung	0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA ad 1l PBS (PAA Laboratories)
Standard-Fixierlösung	PBS wurde auf 70°C erhitzt, 4% (w/v) Paraformaldehyd zugegeben, tropfenweise mit 1 M NaOH geklärt und nach vollständigem Lösen pH 7.0 eingestellt. Nach dem Abkühlen wurden 4% (w/v) Saccharose hinzugefügt (Lagerung -20°C).

B 1.3.2 Protein-Biochemie

4 x ADP-Ribosylierungspuffer	20 mmol/L MgCl ₂ , 10 mmol/L DTT, 400 µmol/L NAD, 40 mmol/L Thymidin, 200 mmol/L HEPES pH 7.4
5 x Laemmli-Auftragungspuffer	0,1 M DTT, 25% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,1 M Tris/HCl pH 6.8
10x Laemmli-Laufpuffer	1% (w/v) SDS, 1,9 M Glyzin, 250 mmol/L Tris
Acrylamid-Bis-Stammlösung	Rotiphorese® Gel 30 (Roth)
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert (Lagerung -20°C)
APS	10 % (w/v) Ammoniumsulfat in ddH ₂ O
Blot-Transferpuffer	25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycin, 20% (v/v) Methanol
Block-Lösung	5% (w/v) Magermilchpulver (Reformhaus) in TBST
Coomassie-Lösung	0,1% (w/v) Coomassie Blau R250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure (96%)
DTT Stammlösung	1 M Dithiothreitol in ddH ₂ O (Lagerung -20°C)
Entfärberlösung	7,5 % (v/v) Essigsäure (96%), 5 % (v/v) Methanol, 87,5% ddH ₂ O
Entwickler (Western-Blot)	Supersignal West Femto (Pierce), Lumino-Enhancer-Solution und Peroxidase-Puffer im Verhältnis 1:1, oder Immol/Lobilon Western HRP Substrate (Millipore)
Glutathion-Elutionspuffer	50 mmol/L Tris/HCl pH 8.0, 10 mmol/L Glutathion, 100 mmol/L NaCl, 100 µmol/L PMSF, PI complete

	(Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablet, eingesetzt nach Angaben des Herstellers)
GST-Fish Puffer	50 mmol/L Tris pH 7.4, 10% (v/v) Glycerin, 100 mmol/L NaCl, 1% (v/v) NP-40, 2 mmol/L MgCl ₂ , 100 µmol/L PMSF, PI complete
LB-Medium	10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extract, 10 g NaCl ad 1l mit ddH ₂ O
Laufpuffer (SDS-Gele)	25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Lower-Tris	750 mM Tris/HCl pH 8.8
Lysispuffer für Bakterien	50 mmol/L Tris/HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl ₂ , 2 mmol/L DTT, 100 µmol/L PMSF, PI complete
Lysispuffer Eukaryoten	50 mmol/L Tris/HCl pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl ₂ , 100 µmol/L PMSF, PI complete
Phosphataseinhibitoren	100 mmol/L Natrium-Pyrophosphat in ddH ₂ O
Stocklösungen	100 mmol/L Natrium-orto-Vanadat in ddH ₂ O 2 mmol/L Natriumfluorid in ddH ₂ O
Ponceau S-Färbelösung	0,15% (w/v) Ponceau S, 0,5% (v/v) Essigsäure (96%)
Proteaseinhibitoren (PI complete)	Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablet (eingesetzt nach Angaben des Herstellers) 0,2 M PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) in EtOH
Puffer A	0,5 M NaCl, 50 mmol/L NaPP pH 7.2, 100 µmol/L PMSF, Complete, EDTA-free Protease Inhibitor

Thrombinspaltpuffer	50 mmol/L Tris/HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 2,5 mmol/L MgCl ₂ , 2,5 mmol/L CaCl ₂
TBST	50 mmol/L Tris/HCl pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20
Upper-Tris	0,625 M Tris/HCl pH 6.8

B 1.4 Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Immunoblot ECL	Quelle
anti-RhoA	Maus Monoklonal	-	1:200	Santa Cruz Biotechnologie
anti-RhoB	Maus Monoklonal	-	1:200	Santa Cruz Biotechnologie
anti-Rac1	Maus Monoklonal	-	1:1000	BD Transduction Labs
anti-Cdc42	Maus Monoklonal	-	1:1000	BD Transduction Labs
anti-GAP-43	Maus Monoklonal	-	1:250	AG Brandt
anti-β-Aktin	Maus Monoklonal	-	1:5000	Sigma
anti-C3	Kaninchen polyklonales Antiserum	1:7500	1:20000	eigene Herstellung
anti-Tubulin (DM1A)	Maus Monoklonal	1:1000	1:5000	Sigma
anti-Tubulin (YL 1/2)	Ratte Monoklonal	1:500	-	Linaris
anti-MAP2	Maus Monoklonal	1:200	-	Invitrogen
anti-EEA1	Maus Monoklonal	1:250	-	BD Transduction Labs
anti-Lamp1	Maus Monoklonal	1:100	-	BD Biosciences
anti-NF-M (NL6)	Maus monoklonal	1:200	1:2000	Nina Lüdemann AG Brandt

Sekundärantikörper und Färbechemikalien	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Immunoblot ECL	Quelle
HRP-Ziege-anti-Maus	-	1:5000	Rockland
HRP-Ziege-anti-Kaninchen	-	1:5000	Rockland
Alexa 488 Ziege-anti-Ratte	1:500	-	Molecular Probes
Alexa 488 Ziege-anti-Maus	1:500	-	Molecular Probes
Alexa 488 Ziege-anti-Kaninchen	1:500	-	Molecular Probes
Alexa 555 Esel-anti-Kaninchen	1:1000	-	Molecular Probes
Alexa 594 Ziege-anti-Maus	1:1000	-	Molecular Probes
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	1:5000-1:20000	-	Sigma

B 1.5 Protein-Standards

Protein Low Molecular Weight Marker (LMW) 14.2-66.0 kDa (Sigma)

Protein Low Molecular Weight Marker prestained (LMWp) 11.0-170.0 kDa (Fermentas)

Protein High Molecular Weight Marker prestained (HMWp) 26.6-180 kDa (Sigma)

B 1.6 Geräte und sonstige Materialien

Absaugsysteme	Dymax 30 Zellkulturpumpe (Charles Austen)
Analyse-Feinwaage	Sartorius 3704, Sartorius research (Sartorius AG, Göttingen)
Autoklav	5075 EL (Tuttnauer Systec GmbH, Wettenberg)
Blotkammer	Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Eismaschine	Scotsman MF 30 (Enodis Deutschland GmbH, Herborn)
Filterpapier	Whatman 3 MM (Whatman, Kent, UK)
Fotometer	Smartspec 3000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
French Press	French Pressure Cell Press (Polytec GmbH, Waldbronn)
Geldokumentationsanlage	Image Station 440 CF (Kodak, Stuttgart)
Heizblöcke	Thermomixer Comfort, Thermostat 5320 (Eppendorf AG, Hamburg)
Hämozytometer	Neubauer-Zählkammer, 0,0025 mm ² , Tiefe 0,1 mm „Assistent“ (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim)
Immobilion-PVDF- Transfermembran	45 µm Porengröße, Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore GmbH, Eschborn)
Inkubator	HeraCell, (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
Kamera (Mikroskop)	Kappa DX4 gekühlte Kamerasysteme (Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen)
Kimwipe-Filterpapier	Kimwipe Lite (bezogen über Neolab Migge, Heidelberg)
Kulturflaschen	75 cm ² Flaschen (Nunclon™, Nunc GmbH, Wiesbaden)
Kulturplatten	4-, 6- und 24-Well-Platten, Schalen (Ø 3, 10 und 15 cm) (Nunclon™, Nunc GmbH, Wiesbaden)
Labor-Zentrifugen	Mini-Spin, Centrifuge 5415 R (Eppendorf AG, Hamburg)
Luftverdrängungspipetten	Eppendorf 2, 10, 100, 1000 mit adjustierbarem Volumen (Eppendorf AG, Hamburg)
Magnetrührer	MR 80 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach)
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M (Zeiss AG, Jena) Konfokales Laser Mikroskop, Leica Inverted-2 (Leica Microsystems AG, Wetzlar)

Mikroskopische Deckgläser	Ø 12 mm Menzel-Gläser (Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH und Co. KG, Braunschweig)
Netzgeräte	Power Pac 200 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Objektträger	76 x 26 mm (Lab Euroline, Benzinger und Partner, Walldorf)
Parafilm	Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA)
pH-Meter	Mikroprozessor pH-Meter Calimatic 766 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin)
PhosphoImager	Cyclone Storage Phosphor Screen (Packard)
Photometer	Smart Spec 3000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Sicherheitswerkbank	HeraSafe (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
Sterilfilter	Steriflip, Steritop-GP (0,22 µm Express TM Membrane) (Millipore GmbH, Eschborn)
Ultraschallgerät	Sanoplus (Bandelin Elektronik GmbH & Co. KG, Berlin)
Ultraschallstab	MS 72 (Bandelin Elektronik GmbH & Co. KG, Berlin)
Ultrazentrifugen	RC M 150 GX (Sorval, Langenselbold) L8-70 M (Beckman)
Überkopffrotator	Reax 2/104 Test tube Rotator (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
Vakuumpumpe	Typ 400171 (Ilmvac GmbH, Ilmenau)
Vakuumtrockner	Model 543 Gel Dryer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Vortexer	MS 2 Minishaker (IKA Labortechnik, Stauffen)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht)
Zentrifugen	Biofuge primo R, Megafuge 1.0 R (Heraeus, Milford, USA)

B 1.6.1 Glas- und Plastikwaren

Allgemeine Glaswaren wurden von der Firma Schott Schleiffer AG (Feldbach, Schweiz) bezogen. Allgemeine Plastikwaren wurden von Sarstedt (Nürnbrecht) und Eppendorff (Hamburg) bezogen. Die Plastikwaren für die Zellkultur stammen von Nunc (Wiesbaden) und TPP (Trasadingen, Schweiz).

B 1.7 Software

ECL Dokumentation und Auswertung	Kodak 1D Image Analysis Version 3.4.5 Software (Kodak)
Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen	Kappa Image Base (KIB) Control (Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen)
Immun fluoreszenz-mikroskopische Messungen	Kappa Image Base (KIB) Metreo (Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen)
Konfokale Laser Scan Aufnahmen	Leica LCS Lite (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg)
Statistische Testauswertungen	Microcal OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA USA)

B 2 Methoden

B 2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer biologischen Sicherheitswerkbank (HeraSafe) der Firma Kendro durchgeführt. Verwendete Glaswaren (Pasteurpipetten, Flaschen etc.), sowie Kunststoffpipettenspitzen wurden vor Gebrauch autoklaviert. Der Inkubator (HeraCell, Kendro) wurde für die NT2-, bzw. NT2/N-Zellen und SH-SY5Y auf 37°C und 10 % CO₂ eingestellt. Medien, Waschlösungen und Trypsin/EDTA wurden bei 4°C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

B 2.1.1 Lösen adhärenter Zellen mit Trypsin (Abtrypsinieren) und Passagieren

Adhärente Zellen wachsen als zusammenhängende einschichtige Zell-Lage (Monolayer) unter Anheftung an eine inerte Oberfläche. Sie zeigen eine dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition). Weitere Zellvermehrung ist nur dann möglich, wenn „passagiert“ wird. Passagieren ist in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen notwendig, damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und nicht durch die ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte sowie durch Mangel an Nährstoffen sterben.

Protokoll:

Das Medium wurde entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml (10 cm Schalen) oder 1 ml (15 cm Schalen) Trypsin/EDTA-Lsg. auf die Zellen gegeben und für 2-5 min bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vollständig gelöst hatten, wurden 4,5 ml bzw. 9 ml DMEM-Serum zugegeben und die Zellen gut resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt oder in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 (je nach Generationszeit) verdünnt auf neue Platten ausgesät.

B 2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Mitotisch aktive Zellen (hier NT2- und SH-SY5Y-Zellen) können in flüssigem Stickstoff gelagert, aufgetaut und weiter kultiviert werden.

Protokoll:

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und in eine 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM-Serum überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um sowohl das zytotoxisch wirkende DMSO, als auch tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Bis zur Verwendung in einem Experiment wurden die Zellen mindestens zwei Wochen kultiviert.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen einer konfluenten 15 cm Zellkulturschale abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt, da ca. 1×10^6 - 10^7 Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren werden sollten. Danach wurden die Zellen 5 min bei 200 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in das entsprechende Volumen der 4°C-kalten Zell-Gefrierlösung aufgenommen. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und diese, um Schädigungen der Zellen durch Kristallisationsprozesse zu vermeiden, zunächst für 1h bei -20°C heruntergekühlt. Anschließend wurden sie weitere 12-16 h bei -80°C gelagert und anschließend für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

B 2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Verwendung eines Hämocytometers ermöglicht die Bestimmung der genauen Anzahl von Zellen in einer Zellsuspension. In dieser Arbeit wurde die Methode des Trypanblau-Ausschlusses von Zellen verwendet. Sie basiert darauf, dass lebende Zellen kein Trypanblau aufnehmen, während tote Zellen durch eine zerstörte Zellmembran dieses inkorporieren. Diese erscheinen im Lichtmikroskop blau, während lebende Zellen weiß bleiben.

Protokoll:

10 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau versetzt und hiervon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden die weißen, lebenden Zellen in einem Viertel des sichtbaren Rasters (16 Kästchen) ausgezählt. Die erhaltene Zellzahl wurde mit 2 (Verdünnungsfaktor) und 10^4 multipliziert und ergab so die Anzahl von Zellen/ml.

B 2.1.4 Kultur von NT2- und NT2/N-Zellen

NT2/N-Zellen sind postmitotische, terminal differenzierte, polare Nervenzellen, die über Behandlung mit Retinsäure aus NT2-Zellen hervorgehen. Die NT2-Zelllinie wurde aus einem humanen, embryonalen Teratokarzinom isoliert. In ihrem Phänotyp entsprechen diese Zellen zentralnervösen Vorläuferzellen (Pleasure & Lee, 1992).

Neben den NT2/N Zellen sind in der Kultur nach der Behandlung mit Retinsäure (RA) und Zytostatika noch flache Zellen enthalten. Diese Zellen wurden als Astrozyten identifiziert und in der Literatur als NT2/A-Zellen bezeichnet (Bani-Yaghoub *et al.*, 1999; Sandhu *et al.*, 2002). Es wird bei der Präparation versucht, die Neurone selektiv anzureichern.

Protokoll:

NT2-Zellen wurden bis zur Konfluenz auf Schalen (Ø 10 cm) mit 10 ml DMEM-Serum kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden sie 1:5 passagiert. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt, 1 x mit PBS gewaschen und schließlich 0,5 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben. Nach vollständigem Ablösen der Zellen, (ca. 1 min bei 37°C) wurden 4,5 ml DMEM-Serum zugefügt und 1 ml Zellsuspension erneut ausplattiert.

Zur Differenzierung wurden die Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen in eine 75 cm² Kulturflasche gegeben und 12 ml DMEM-Serum hinzugefügt. Am folgenden Tag erfolgte die Zugabe der RA mit einer Endkonzentration von 10 µmol/L. Das RA- enthaltende Medium wurde 2 x pro Woche gewechselt.

5 Wochen nach der ersten RA-Zugabe wurden die Zellen das erste Mal replattiert:

Das Medium wurde abgesaugt, danach 1 x mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsin/EDTA zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C, bis sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Die Zellen wurden in 19 ml DMEM-Serum aufgenommen und auf eine mit Kollagen beschichtete Kulturschale (Ø 15 cm) überführt. Die Beschichtung einer Kulturplatte erfolgte mit Kollagen-Lösung für 1h bei 37°C. Anschließend wurde die Platte 2 x für 15 min mit PBS gewaschen.

Nach drei weiteren Tagen erfolgte die zweite Replattierung:

10 ml des Mediums wurden entfernt und mit den verbleibenden 8 ml konditioniertem Medium wurden die NT2/N-Zellen (Neurone) selektiv von der Oberfläche der Kulturschale abgespült und auf eine Kollagen-beschichtete Kulturschale (\varnothing 10 cm) überführt. Anschließend wurden noch 80 μ l der Zytostatika-Lösung zugesetzt. Das Zytostatika enthaltende DMEM-Serum wurde 2 x pro Woche gewechselt.

Nach zwei Wochen wurden dem Medium keine Zytostatika mehr zugesetzt und die Zellen wurden zum dritten Mal replattiert:

Das Medium wurde entfernt und die Zellen nach 1 x mit PBS waschen für 1-2 min bei 37°C mit 0,5 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Nachdem sich die Zellen vollständig gelöst hatten, wurden sie in 4,5 ml DMEM-Serum aufgenommen, zum Vereinzeln mehrmals auf- und abpipettiert und auf eine unbeschichtete Schale (\varnothing 10 cm) gegeben. Diese wurde für 30-60 min inkubiert, sodass sich die Astrozyten weitestgehend nach unten absetzen konnten. Der Überstand, der überwiegend Neurone enthielt, wurde abgenommen und mit einer Dichte von 8000 Zellen/cm² auf Kollagen-beschichtete runde Deckgläschen ausplattiert. Diese wurden dann am nächsten Tag für zellbiologische Experimente verwendet. Dazu wurde das DMEM-Serum entfernt und die nun an den Matrixkomponenten adhärierenden Zellen für 1h bei 37°C mit DMEM ohne Serum zur Blockierung der Serum-Proteine inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h in dem definierten Medium NB/B27 + C3^{bot} (100 nmol/L), C3^{bot}E174Q (100 nmol/L), C3^{bot}156-182 (300 nmol/L) oder C3^{bot}181-211 (300 nmol/L) kultiviert.

Die genau definierte Zusammensetzung des Mediums gewährleistet einen kalkulierbaren und nachvollziehbaren Einfluss des Mediums auf die Zellmorphologie und zellulärer Prozesse.

Für biochemische Experimente wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 auf Kollagen-beschichtete Schalen (\varnothing 3 cm) ausplattiert.

B 2.1.5 Kultur von SH-SY5Y-Zellen

Bei den SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um eine humane Neuroblastom Zelllinie, die als Sublinie aus der Neuroepitheloma Zelllinie SK-N-SH hervorgegangen ist. Sie wurde ursprünglich 1970 bei einer Knochenmarkbiopsie eines vierjährigen Mädchens isoliert (Biedler *et al.*, 1973). Die Zellen bilden nach Differenzierung mit RA einen neuronalen Phänotyp aus, der durch die Ausbildung langer dendritenähnlicher Neuriten charakterisiert ist (Pan *et al.*, 2005). Außerdem exprimieren sie als neuronalen Marker Neurofilamente, aber kein GFAP. SH-SY5Y-Zellen entwickeln jedoch keine Polarität und proliferieren weiter.

Protokoll:

Die Zellen wurden in einer 75 cm² Flasche mit 20 ml Medium kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Da die Zellen keine Konfluenz ausbilden, wurden sie bei einer Dichte von 80% abtrysiniert, 5 min bei 200 x g zentrifugiert und 1:10 in neue 75 cm² Kulturflaschen ausplattiert.

B 2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie dient als sensitive Methode zum indirekten Nachweis subzellulärer Bestandteile und der Analyse ihrer Lokalisation. Hierfür müssen Zellen auf mikroskopischen Deckgläschen kultiviert werden. Zur besseren Haftung der Zellen müssen die Deckgläschen zuvor mit bestimmten Proteinen oder Peptiden, z. B. Poly-L-Lysin oder Kollagen, beschichtet werden. Im ersten Schritt werden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Es folgt die Inkubation mit einem nicht-markiertem Primärantikörper, dessen Antigen ein Epitop des gewünschten Proteins ist. Der Primärantikörper kann monoklonal oder polyklonal sein. Antigene des Sekundärantikörpers sind speziesspezifische Regionen des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom, z. B. Rhodamin kovalent gebunden. Das Präparat kann mit der entsprechenden Filterkombination am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden.

B 2.2.1 Beschichtung von mikroskopischen Deckgläschen

1. Poly-L-Lysin (PLL) Beschichtung

Protokoll:

Die mikroskopischen Deckgläschen wurden dreimal durch die Flamme eines Gasbrenners geführt und anschließend in 99 % Ethanol für ca. 2 min inkubiert. Nach 1 x waschen mit ddH₂O wurde Poly-L-Lysin-Lösung zugegeben, sodass die Deckgläschen gut bedeckt waren (z. B. in einer 24-Well-Platte 300 µl). Es erfolgte eine Inkubation von für 5h bei 37°C. Danach wurden die Deckgläschen 2 x für 30 min mit je 500 µl ddH₂O gewaschen.

2. Kollagen Beschichtung

Protokoll:

Auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen wurden 300 µl Kollagen-Lösung/Well gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 2 x mit PBS gewaschen.

B 2.2.2 Fixierung und Färbung von Zellen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Zellen zu fixieren. Bei der Standardmethode werden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Danach wird die Membran mit Detergenzien permeabilisiert, sodass der Antikörper die Membran gut durchdringen kann und die zellulären Proteine erhalten bleiben. Bei der Methanol-Fixierung werden die Zellen gleichzeitig extrahiert und fixiert.

1. Standardfixierung und Immunfärbung

Die Deckgläschen wurden aus der Kulturschale entnommen und 1 x mit PBS gewaschen. Danach wurden sie für 20 min mit 100 µl Standardfixierungslösung inkubiert und anschließend 1 x mit PBS gewaschen. Zum Absättigen von unspezifischen Bindungen erfolgte eine 20-minütige Behandlung mit 100 µl Glyzin-Lösung. Nach 1 x Waschen wurden die Zellen für 5 min mit 0,3% TritonX-100/PBS permeabilisiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen 2 x 5 min mit PBS/BSA/Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Primärantikörper-Lösung (Antikörper in PBS/BSA/Tween) und die Inkubation für 1 h in einer feuchten Kammer bei RT. Dann wurde erneut 2 x 5 min mit PBS/BSA/Tween gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Sekundärantikörper-Lösung zugefügt und für 30-60 min bei RT in einer abgedunkelten feuchten Kammer inkubiert. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde dem Sekundärantikörper DAPI zugefügt. Zuletzt wurde 2 x 5 min mit PBS/BSA/Tween gewaschen. 5 µl Anti-Ausbleichmedium wurden auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Mit farblosem Nagellack wurde das Deckgläschen versiegelt.

2. Formaldehyd-Methanol-Fixierung und Immunfärbung

Die Deckgläschen wurden aus der Kulturschale entnommen und 1 x mit PBS gewaschen und die Zellen für 15 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Dann wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen und die Zellen für 20 min bei -20°C mit eiskaltem Methanol extrahiert und fixiert. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Zellen zum Absättigen von unspezifischen Bindungen und Permeabilisieren mit TritonX-100/BSA-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden 100 µl Primärantikörper-Lösung (Antikörper in TritonX-100/PBS) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Antikörperlösung wurde dann entfernt und die Zellen 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Um besonders feine Strukturen innerhalb der Zellen nachweisen zu können, wurde die Entfernung von möglicherweise unspezifisch gebundenem Antikörper

vorgenommen („background clearing“). Dazu wurden die Zellen mit 100 µl 0,4 M NaCl/PBS für 2 min bei RT behandelt. Anschließend wurde für 5 min mit TritonX-100/PBS gewaschen und die Sekundäntikörper-Lösung (Tween20/PBS mit DAPI) zugefügt (30-60 min, RT, abgedunkelt). Zuletzt wurde 2 x für 5 min mit Tween20/PBS gewaschen und die Deckgläschen, wie zuvor beschrieben, eingebettet.

B 2.2.3 Morphometrische Analysen

Um die Auswirkungen von C3^{bot}, C3^{bot}E174Q, sowie den Fragmenten C3^{bot}154-182 und C3^{bot}181-211 auf die Morphologie von differenzierten Neuronen zu analysieren, wurden die Axonlängen gemessen und die Anzahl axonaler Verzweigungen bestimmt. Dazu wurden NT2/N-Zellen in einer Dichte von 8000 Zellen/cm² auf Kollagen beschichteten Deckgläschen ausplattiert und mit dem definierten Medium NB/B27, das entweder C3^{bot}, C3^{bot}E174Q, C3^{bot}154-182 oder C3^{bot}181-211 enthält, inkubiert. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen standardfixiert und gegen das neuronenspezifische beta-Tubulin gefärbt. Tubulin ist ubiquitär in Zellen verteilt und gibt somit ihre Gesamtmorphologie wieder. Um die ausschließliche Vermessung von Axonen sicherzustellen, wurde zusätzlich eine Färbung gegen das mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2b vorgenommen, da dieses ausschließlich in Dendriten und Nervenzellkörper vorzufinden ist (Tucker, 1990; Johnson & Jope, 1992). Neben der MAP2b-Färbung fanden bei der Vermessung der Axone die morphologischen Merkmale der Verjüngung der Dendriten von Proximal nach Distal, sowie die Zunahme des Axondurchmessers nach Distal Berücksichtigung.

Über die Kernfärbung mit dem chemischen Reagenz DAPI wurde die Integrität des Zellkerns festgestellt, um zu gewährleisten, dass ausschließlich gesunde Neurone analysiert wurden. Die Längenmessung der Axone wurde mit Hilfe der Kappa Image Base (KIB) Metreo Software durchgeführt.

B 2.3 Allgemeine Protein-Biochemische Methoden

B 2.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Die *multiple cloning site* (MCS) der pGEX-Vektoren des GST-Systems (Amersham Biosciences, Freiburg) ist das Gen der Glutathion-S-Transferase (GST) vorgeschaltet. Dadurch können GST-Fusionsproteine generiert, in *E.coli* exprimiert und nach Lyse der Zellen affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Das Enzym GST aus *Schistosoma japonicum* besitzt ein Molekulargewicht von 26 kDa.

Zur Expression des GST-Fusionsproteins wird das entsprechende Gen in die MCS eines pGEX-Vektors kloniert. Alle pGEX-Vektoren tragen eine Ampicillinresistenz-Kassette. Die

Induktion erfolgte über das Laktose-Analog IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid).

Die affinitätschromatographische Reinigung der GST-Fusionsproteine aus dem Lysat der *E. coli*-Zellen erfolgte über die Bindung von GST an Glutathion-gekoppelte Sepharose-Kügelchen (Glutathion-Sepharose 4B, Pharmacia). Gebundene Fusionsproteine konnten anschließend mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer wieder von den Glutathion- Sepharose-Kügelchen getrennt werden. Das reduzierte Glutathion im Elutionspuffer konkurriert mit dem an die Glutathion- Sepharose-Kügelchen gekoppelten Glutathion um die Bindung an GST und löst so die Bindung zwischen den Kügelchen und den GST-Fusionsproteinen, die im Eluat angereichert werden.

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, die GST-Einheit des gereinigten Fusionsproteins abzuspalten. Stromaufwärts der MCS tragen die, in dieser Arbeit verwendeten pGEX-Vektoren (pGEX-2T) eine Erkennungssequenz für die spezifische Spaltung durch Thrombin. Nach dieser Methode wurden folgende Proteine aufgereinigt:

Protein	Beschreibung	Molekulargewicht
GST	Glutathion-S-Transferase	26 kDa
GST-C3 ^{bot}	<i>Clostridium botulinum</i> Exoenzym C3 WT	23,5 kDa
GST-C3 ^{bot} E174Q	Enzymatisch inaktive Mutante von C3 ^{bot}	23,5 kDa
GST-C3 ^{bot} 181-211	Fragment von C3 ^{bot} , bestehend aus 30 AS, ohne ARTT-Motiv	~3,5 kDa
GST-PAK (Crib)	Cdc42- und Rac1-bindende Domäne der humanen PAK1	40 kDa

Da sich das in dieser Arbeit verwendete Peptid C3^{bot}154-182 nicht über diesen Methode aufreinigen ließ, wurde es von der Firma IPF PharmaCeuticals GmbH (Hannover) synthetisiert.

Expression von GST-Fusionsproteinen

Ausgehend von einer 50 ml ü. N. Vorkultur wurden 20 ml in 1 l LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 angezogen und mit 100 μ mol/L IPTG induziert. Die Expression der Proteine erfolgte 3 h bei 37°C unter Schütteln.

Um den Erfolg der Expression zu überprüfen, wurden jeweils vor der Induktion und nach der Expression 1 ml der Kultur abgenommen und in 2 x Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen.

Die Proben wurden über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung hinsichtlich der Expression der Fusionsproteine analysiert.

Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Bakterien wurden sedimentiert (20 min, 5000 rpm, 4°C) und in 20 ml Lysispuffer für Bakterien resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal bei einem Arbeitsdruck von 1000 Psi in der French Press aufgebrochen. Durch Zentrifugation (20 min, 10000 rpm, 4°C) wurden unlösliche Zellbestandteile von löslichem Zell-Lysat abgetrennt (Überstand). Die Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose-Kügelchen („GSH-Beads“) ist zum Einen im Batch-Verfahren und zum Anderen über eine Glutathion Sepharose 4B Säule möglich. Es wurden in dieser Arbeit beide Möglichkeiten angewendet.

1. Aufreinigung im Batch-Verfahren

Die Aufreinigung im Batch-Verfahren wurde nur für die Herstellung der für die Rac1-Pull-down Experimente benötigten GST-PAK[PBD]-Domäne (p21 activated kinase Cdc42/Rac interactive binding domain) angewendet.

Dazu wurden zunächst 500 µl 50%iger GSH-Bead-Lösung mit dem Lysispuffer für Bakterien äquilibriert (nach Angaben des Herstellers).

Für die Bindung der Fusionsproteine an die Matrix wurde das Zell-Lysat zusammen mit den GSH-Beads für 1 h bei 4°C im Überkopffrotator inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurden die GSH-Beads zuerst sedimentiert (5 min, 3000 rpm, 4°C) und dann 3 x mit Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-Kügelchen, an denen nun die GST-Fusionsproteine gebunden sind, mit GST-fish-Puffer äquilibriert und sofort für die Rac1 Pull-down Experimente (siehe unter B. 2. 4. 1) verwendet.

2. Aufreinigung über eine Glutathion Sepharose 4B Säule

Vor der Zugabe des Zelllysats wurden die Säulen mit je 2 ml 50%iger Glutathion-Sepharose 4B-Lösung beladen und mit 10-fachem Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Das Zelllysate wurde noch für 30 min bei RT mit DNase behandelt und auf die Glutathion Sepharose 4B Säulen gegeben. Die Bindung erfolgte rezirkulierend mit Hilfe einer Peristaltikpumpe ü. N. bei 4°C. Nach der Inkubation wurde 2 x mit 25 ml Puffer A gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das gebundene GST-Fusionsprotein konnte anschließend mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer in 12 Fraktionen von je 1 ml eluiert werden. Von jeder Fraktion wurde ein Teil über SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau-Färbung

analysiert. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinausbeute wurden vereinigt. War die Proteinkonzentration dennoch zu gering, wurde die Proteinlösung mit Ultrafiltrationseinheiten der Firma Amicon ankonzentriert, deren Membrane Poren mit einer definierten Größe besitzen. Durch Zentrifugation von maximal 3500 x g wird die Proteinlösung durch Fliehkraft durch die Membran gedrückt. Moleküle mit geringerer Größe als die Poren der Membran passieren diese leichter, während größere Moleküle in ihr hängen bleiben. So reichern sich durch Volumenabnahme die Proteine an. Zuletzt erfolgte das Umpuffern der Proteine über eine PD-10 Desalting Säule (Amersham) in 20 mmol/L HEPES pH 7.0 (nach Angaben des Herstellers) und eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.

Spaltung der GST-Fusionsproteine mit Thrombin

Zur Gewinnung des reinen exprimierten Proteins ohne GST-Anteil erfolgte anstatt der Elution eine Thrombinspaltung direkt auf der Glutathion Sepharose 4B Säule. Dazu wurden 2 ml Thrombinspaltpuffer (+ 50Units Thrombin) auf die Säule gegeben und 3-5 h bei 4°C (o. ü. N.) inkubiert. Danach wurde das Protein mit 10 ml Thrombinspaltpuffer in 1 ml Fraktionen eluiert. Mit Hilfe von p-Diaminobenzamidin-gekoppelter Agarose-Matrix wurde im Anschluss das Thrombin aus der Proteinlösung entfernt (1 h bei 4°C).

B 2.3.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Beim Bio-Rad-Protein-Test wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie-Brilliantblau G 250 Lösung von 465 nm auf 595 nm detektiert, die bei der Bindung des Reagenz an Proteine erfolgt. Die Absorptionswerte werden anschließend auf die Messwerte eines Proteinstandards (hier BSA) bezogen. Mittels Bradford wurden nur Detergenz freie Proteinlösungen gemessen.

Protokoll:

Pro Messansatz wurden 10 µl der zu quantifizierenden Probe mit 790 µl ddH₂O und 200 µl Coomassie-Brilliantblau G 250 Lösung versetzt und gut vermischt. Nach fünf Minuten erfolgte die Extinktionsmessung der Proben gegen einen Leerwert bei 595 nm im Photometer.

B 2.3.3 Präparation von Zell-Lysaten

Um zelluläre Proteine untersuchen zu können, müssen diese zunächst aus den Zellen freigesetzt werden. Die Zerstörung der Zellmembran kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Zur Präparation von Zell-Lysaten für Western-Blot-Analysen wurde das Ultraschallverfahren angewendet. Ultraschallwellen von 10-40 kHz führen in Lösung zu

starken Druckveränderungen, die schließlich die Lyse der Zellen induzieren. Unter diesen Bedingungen wird auch die DNA fragmentiert. Die Präparation der Zell-Lysate erfolgte in Lysepuffer, der entsprechende Proteaseinhibitoren enthält, um einem möglichen Abbau der Zielproteine durch Proteasen entgegenzuwirken.

Protokoll:

Das Nährmedium wurde von den Zellkulturschalen entfernt, 1 x mit PBS gewaschen und die Zellen ca. 3-5 min mit dem Lysepuffer auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen von den Schälchen mit einem Zellkulturschaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine Homogenisierung für 10 min bei 37°C und 1400 rpm in einem Thermoschüttler. Die vollständige Lyse der Zellen wurde dann mittels Ultraschall durchgeführt (5 sec, 12-15% power, 50% cycle). Anschließend wurden die Proteine für 10 min bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE mit folgendem Western-Blot analysiert.

B 2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli ist ein hochauflösendes Trennverfahren zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Die Trennmatrix ist ein Polyacrylamidgel, das durch Kopolymerisation von Acrylamid und N'N'-Methylenbisacrylamid in wässriger Lösung gebildet wird. Die Polymerisationsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat, einem SO₄-Radikal, als Initiator gestartet. Als Mediator der Polymerisation fungiert Tetramethylenethyldiamin (TEMED). Die Auftrennungsfähigkeit des Gels hängt von der Porengröße ab und kann über die Acrylamidkonzentrationen eingestellt werden. Das anionische Detergenz SDS entfaltet Proteine durch seine Anlagerung und verleiht ihnen eine negative Überschussladung. Im elektrischen Feld wandern die Proteine mit einer Geschwindigkeit entsprechend ihrer Größe durch die Gelmatrix. Das relative Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine kann durch den Vergleich mit der Wanderungsgeschwindigkeit von Referenzproteinen (Größenmarker) bestimmt werden. Die Gele (Mini) setzen sich aus jeweils einem 2 cm hohem Sammelgel, das die etwa 1 cm tiefen Probenaschen enthält, und einem etwa 6 cm langem Trenngel zusammen. Die Dicke der Gele beträgt 0,75 cm.

Protokoll:

Es wurden 15%ige, 13,7%ige und 7,5%ige Minigele verwendet, die nach folgendem Pipettierschema präpariert wurden (Ansatz für 2 Gele).

<i>Zusätze</i>	<i>Trenngel</i> 15%	<i>Trenngel</i> 13,75%	<i>Trenngel</i> 7,5%	<i>Sammelgel</i> 5%
Lower-Tris	5280 µl	5280 µl	5280 µl	--
Upper-Tris	--	--	--	800 µl
30% Acrylamid	5500 µl	5000 µl	2750 µl	600 µl
ddH ₂ O	--	500 µl	2750 µl	2380 µl
20% SDS	55 µl	55 µl	55 µl	40 µl
10% TEMED	55 µl	55 µl	55 µl	40 µl
10% APS	110 µl	110 µl	110 µl	80 µl

Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Um für einen glatten Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel zu sorgen und vor Verdunstung zu schützen, wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels (ca. 30-45 min, RT) wurde das Isopropanol sauber entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Das nach etwa einer halben Stunde auspolymerisierte Gel wurde noch am selben Tag verwendet, oder bis zum nächsten Tag mit feuchten Tüchern abgedeckt in einer Plastiktüte im Kühlschrank aufbewahrt.

Die zu analysierenden Proben wurden mit ¼ Volumen 5 x Laemmli-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels geladen. Durch mehrmaliges Nachladen war ein Probenvolumenauftrag von bis zu 60 µl möglich. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 5 µl Protein-Standard aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA für ca. 60 min. Das Gel wurde anschließend entweder Coomassie-Blau gefärbt, oder für eine Western-Blot Analyse eingesetzt.

B 2.3.5 Coomassie-Blau Färbung

Bei der Coomassie-Blau Färbung wurden die SDS-Gele für 10 min bei 72°C im Wasserbad mit der Färbelösung inkubiert und anschließend zu Entfernung des unspezifisch gebundenen Farbstoffes 3 x 10 min bei 70°C in die Entfärberlösung gelegt. Waren die gewünschten Proteinbanden deutlich zu erkennen, konnte das Gel in Wasser aufbewahrt oder getrocknet werden. Zum Trocknen wurde ein Whatman-3MM-Papier mit Wasser angefeuchtet und das Gel darauf luftblasenfrei ausgebreitet. Danach wurde es 65 min lang unter Vakuum auf 74°C erwärmt, bis das Gel vollständig trocken war.

B 2.3.6 Proteintransfer durch Elektroblob (Western-Blot)

Die Methode des Proteintransfers erlaubt eine Immobilisierung von Proteinen für weitere Analysen. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine polymere Membran (aus Nitrozellulose oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)) transferiert, wobei das Bandenmuster eine exakte Reproduktion des Originals darstellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Nitrozellulosemembranen besitzen eine Porengröße von $0,2 \mu\text{m}^2$ (Schleicher & Schuell).

Protokoll:

Der Proteintransfer erfolgte mittels einer Trans-Blot SD-Apparatur unmittelbar im Anschluss an die SDS-PAGE. Dazu wurden 6 zurechtgeschnittene 3MM Whatman-Papiere und die Nitrozellulosemembran im Blot-Puffer äquilibriert. Der Blot-Aufbau sieht wie folgt aus: 3 x 3MM Whatman, Nitrozellulosemembran, SDS-Gel, 3 x 3MM Whatman. Das Gel wurde in Richtung Kathode und die Membran Richtung Anode orientiert. Für den Transfer wurde eine Stromspannung von 17 V für 1 h gewählt.

B 2.3.7 Ponceau-Färbung von immobilisierten Proteinen

Die Ponceau-Färbung ermöglicht eine reversible Anfärbung von Proteinen auf einer Trägermembran und wurde zur Kontrolle des Proteintransfers durchgeführt.

Dazu wurde die Membran für etwa 5 min mit der Ponceau-Färbelösung unter Schwenken inkubiert und anschließend mit ddH₂O entfärbt.

B 2.3.8 Indirekte Immundetektion

Die Chemolumineszenz ist eine nicht-radioaktive, sensitive Methode zum Nachweis geringer Mengen Protein, die auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Dabei werden Substanzen durch eine chemische Reaktion in einen angeregten Energiezustand versetzt. Beim Rückfallen in den Energiegrundzustand wird diese Energie in Form von Lichtquanten wieder frei und kann mit Hilfe einer Chemolumineszenz (ECL)-Kamera, die sich in einer Dunkelkammer befindet, detektiert und über einen Computer visualisiert werden. Bei der Immundetektion mittels Chemolumineszenz wird zunächst ein primärer Antikörper verwendet, der das immobilisierte Protein spezifisch bindet. Danach wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter Meerettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Die Meerettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diacylglycerid, was zu einer Lichtemission bei 428 nm führt.

Protokoll:

Die Immundetektion von immobilisierten Proteinen erfolgte direkt nach der SDS-PAGE und dem Proteintransfer. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran erfolgte die Behandlung mit Block-Lösung für 1 Stunde bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Danach wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit der verdünnten Primärantikörperlösung ü. N. bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation folgten nochmals 3 Waschschrte mit TBST, um den nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, und die Zugabe des in TBST-verdünnten HRP-konjugierten Sekundärantikörpers für 2 h bei RT. Anschließend wurde die Membran erneut 3 x mit TBST gewaschen. Die Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte durch Zugabe von frisch angesetztem Supersignal West Femto-Reagenz, oder Immobilon Western HRP Substrate-Reagenz (jeweils die Lösungen I und II im Verhältnis 1:1 angesetzt). Nach der Inkubation von 1 min bei RT erfolgte die Detektion mit Hilfe der Image Station von Kodak.

B 2.4 Spezielle Protein-Biochemische Methoden

B 2.4.1 Rac1 Pull-Down-Experiment

Zur Messung des Aktivitätszustandes von Rac1 in neuronalen Zellen wurden Rac1 Pull-down Experimente durchgeführt. Verschiedene Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren stimulieren den Austausch von GDP nach GTP bei GTPasen, wodurch diese aktiviert werden. Aktive GTPasen wiederum interagieren mit Effektorproteinen. In dieser Arbeit wurde als Effektorprotein von Rac1 die PAK-CRIB Domäne (p21 activated kinase Cdc42/Rac interactive binding) als GST-Fusionsprotein (GST-PAK-CRIB) verwendet. Das im Zell-Lysat befindliche aktive Rac1 reagiert spezifisch mit der GST-PAK-CRIB-Domäne und kann somit präzipitiert werden. Die Menge des GTP-gebundenen Rac1 wird durch einen Western-Blot bestimmt.

Protokoll:

Die Expression und Aufreinigung der GST-PAK-CRIB-Domäne erfolgte wie unter B 2.3.1 beschrieben.

Zur Herstellung des Zell-Lysates wurde das Nährmedium von den Zellen auf einer Ø 3 cm Schale entfernt, 1 x mit PBS gewaschen und die Zellen ca. 3-5 min mit 400 µl GST-fish-Puffer auf Eis lysiert. Danach wurden die Zellen von den Schälchen mit einem Zellkulturschaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 13200 rpm, 4°C) wurden jeweils 40 µl des Überstandes in ein neues Gefäß transferiert und

mit 10 µl 5 x Laemmli (Rohlysat) zur Bestimmung des Gesamtgehaltes von Rac1 versetzt. Der Rest des Überstandes wurde für den Pull-down in ein frisches Eppendorfggefäß überführt und mit 30 µl der GST-PAK-CRIB-Bead-Lösung versetzt. Zur Funktionsüberprüfung des Pull-downs wurde mittels Nukleotidaustausch eine Positiv-Kontrolle hergestellt (siehe unter B 2.4.2), die ebenfalls mit 30 µl der GST-PAK-CRIB-Bead-Lösung versetzt wurde. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4°C im Überkopffrotator wurden die Zellsuspensionen mit 3000 rpm bei 4°C für 3 min zentrifugiert und anschließend 3 x mit GST-fish-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 20 µl verworfen und mit 30 µl 2 x Laemmli vermischt (Präzipitat). Rohlysat und Präzipitat wurden 5 min bei 95 °C gekocht und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion analysiert.

B 2.4.2 GTP-Beladung von RhoGTPasen (Nukleotidaustausch)

Der Aktivitätsstatus von RhoGTPasen wird durch deren Bindung and Guanosintriphosphate (GTP), bzw. -diphosphate (GDP) bestimmt. Für die Herstellung einer Positiv-Kontrolle (GTP-beladene RhoGTPase) wurde NT2-Zell-Lysat mit nicht-hydrolysierbarem GTP γ S inkubiert, um die GTPasen mit dem Nukleotid zu beladen.

Protokoll:

NT2-Zell-Lysat (siehe unter B. 2. 4.1) wurde hierfür mit 10 mmol/L EDTA/NaOH-Lösung pH, 8.0 und 0,1 mmol/L GTP γ S für 15 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 60 mmol/L MgCl₂ wurde die Reaktion abgestoppt.

B 2.4.3 [³²P]ADP-Ribosylierung von Zell-Lysaten

Der Einbau von radioaktiv markiertem NAD⁺ (³²P-NAD⁺) ist die sensitivste Methode, um den Ribosylierungsstatus von RhoGTPasen zu untersuchen.

Das Exoenzym C3 aus *Clostridium botulinum* katalysiert die ADP-Ribosylierung von Rho Proteinen (RhoA, B und C) entweder aus Zell-Lysat oder rekombinanter Proteine, indem es NAD⁺ als Cosubstrat verwendet und die ADP-Ribose-Einheit auf das Asparagin 41 der Rho-GTPasen überträgt. Somit kann eine vollständige (kein weiterer Einbau von [³²P]-ADP-Ribose möglich) oder teilweise ([³²P]-ADP-Ribose wird eingebaut) abgelaufene ADP-Ribosylierung nachgewiesen werden.

Der ADP-Ribosylierungspuffer enthält zusätzlich unmarkiertes NAD, um die Gesamtkonzentration an NAD zu erhöhen und damit zu gewährleisten, dass das C3 Exoenzym die Rho-GTPasen mit maximaler Geschwindigkeit modifizieren kann.

Protokoll:

Die Zell-Lysate (10-20 µg Gesamtprotein) wurden für 30 min bei 37°C mit 1 µCi/µl ³²P-NAD, 1 µg/µl C3-Exoenzym und 5 µl 4 x Ribosylierungspuffer inkubiert. Durch Zugabe von 5 x Laemmol/Li-Puffer wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen durch fünfminütiges kochen bei 95°C denaturiert. Danach erfolgte die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau Färbung und Trocknung des Gels. Für die Dokumentation wurde das getrocknete Gel auf eine radiosensitive Folie (PhosphoImager-Screen multipurpose, Packard) ü. N. exponiert. Die Auswertung des Autoradiogramms erfolgte mit Hilfe des PhosphoImaging-Systems Cyclone Storage Phosphor Screen und der Software Optiquant.

B 2.4.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen C3^{bot} und C3^{bot}E174Q

Die Antikörperherstellung beruht auf einer humoralen Immunantwort eines Organismus bei Kontakt mit einer antigenen (immunogenen) Substanz. Dabei induzieren antigene Determinanten (Epitope) des körperfremden Stoffes die Antikörpersynthese. Handelt es sich bei dem Antigen um ein komplexes Molekül, z. B. ein Protein, ist eine Vielzahl antigenen Determinanten exprimiert. Jede dieser Determinanten induziert die Differenzierung spezifischer B-Lymphozyten und die Bildung antikörper-sezernierender Plasmazellen und damit die Ausschüttung von Antikörpern mit variierender biologischer Aktivität, Spezifität und Affinität. Daher spricht man auch von einem polyklonalen Antiserum. In dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen das C3 Exoenzym aus *Clostridium botulinum* (C3^{bot}) und seiner enzymatisch inaktiven Mutante (C3^{bot}E174Q) hergestellt.

Protokoll:

Für die Gewinnung der Antiseren wurden zwei gesunde Kaninchen (Neufundländer, weiblich) eingesetzt (Durchschnittsgewicht 3,5kg). Die Haltung der Tiere erfolgte in Einzeltierkäfigen. Die Kaninchen wurden mit Alleinfutter für Kaninchen bei ad-libitum-Aufnahme ernährt. Eine tierärztliche Kontrolle war über den gesamten Versuchsablauf gewährleistet.

Pro Protein stand ein Tier für die Immunisierung zur Verfügung.

Als Antigen wurden jeweils 160 µg C3^{bot} bzw. C3^{bot}E174Q eingesetzt und mit komplettem Freundschens Adjuvans der Firma Sigma im Verhältnis 1:1 versetzt. Bei der Erstimmunisierung wurden 400µl Konjugat in Adjuvans subkutan injiziert. Die zweite Immunisierung erfolgte an Tag 36 nach der ersten Immunisierung und die dritte an Tag 72, wobei immer 400µl Konjugat-Adjuvans-Gemisch den Tieren subkutan verabreicht wurden.

Vor der zweiten und dritten Immunisierung wurden den Tieren jeweils 6 ml Blut abgenommen, das Serum gewonnen (10min, 3000rpm, RT) und mittels Dot- und Western-Blot überprüft.

Die Tötung und Blutgewinnung erfolgte über eine Herzpunktion an Tag 110. Nach Gerinnung der Proben (1h, RT) wurden die Proben abesert (10min, 3000rpm, RT) und eine Komplement-Inaktivierung durchgeführt (30min, 56°C). Anschließend wurden die Seren nochmals mittels Dot- und Western-Blot überprüft. Die Lagerung der Seren erfolgte nach Zugabe von NaN₃ (0,02% Endkonzentration) bei 4°C. Alle drei Monate wurde erneut NaN₃ zugesetzt. Das gewonnene Serum wurde für die weiteren Untersuchungen nochmals affinitätsgereinigt.

B 2.4.5 Antikörperaufreinigung über eine Protein A-Sepharose-Säule

Protein A ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus* mit einem Molekulargewicht von 30-35 kDa. Protein A bindet spezifisch die Fc-Region von Immunglobulin-Molekülen vieler Säugetierspezies. Die Protein A-Affinitätschromatographie ist eine einfache und schnelle Aufreinigungsmethode, um die meisten Nicht-IgG-Kontaminanten zu entfernen und einen hohen Reinheitsgrad zu erzielen.

Protokoll:

Die Protein A-Sepharose CL-4B (Sigma) mit einer Bindungskapazität von 20 mg/ml wurde zunächst auf eine Säule (Ø 0,5cm, Säulenvolumen ca. 4 ml) gegeben und mit 10-fachem Säulenvolumen Waschpuffer (50 mmol/L Tris/HCl, pH 7.0) äquilibriert. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Jeweils 3 ml Antiserum wurden ü. N. mit Hilfe eines geschlossenen Kreislaufsystems (Peristaltikpumpe) bei einer Flussrate von 0,15 ml/min durch das Säulenmaterial gepumpt. Das nicht gebundene Material wurde aufgefangen und die Säule mit 20-fachem Säulenvolumen Waschpuffer von unspezifischen, ungebundenen Proteinen befreit. Anschließend wurde mit 2 ml saurem Elutionspuffer (0,3 M Glycin/HCl, pH 3.0) in 200 µl Fraktionen eluiert, wobei in jedem Eppendorfgefäß 40 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris/HCl, pH 9.0) vorgelegt wurden, um den vorherrschenden sauren pH wieder zu neutralisieren. Alle Fraktionen des Eluats wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau Färbung analysiert. Die proteinhaltigen Fraktionen (meist Fraktion 3-7) wurden vereinigt und mittels Western-Blot überprüft.

C Ergebnisse

C 1 Wirkung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q auf das NT2-Zellsystem

NT2-Zellen entsprechen in ihrem Phänotyp zentralnervösen Vorläuferzellen und lassen sich *in vitro* durch die Behandlung mit Retinsäure (RA) zu polaren, postmitotischen Neuronen (NT2/N) differenzieren. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich, die Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen zu humanen Neuronen in Kultur zu untersuchen (Kapitel B 2.1.4). NT2-Zellen wachsen in Kultur als Monolayer und besitzen große, unregelmäßig geformte Zellkerne (Abb. C 1A). Charakteristisch für NT2-Zellen sind insbesondere die prominenten Zellkörperchen. Nach einer fünfwöchigen Behandlung mit RA zeigen die uni-, bi- oder multipolaren NT2/N-Zellen einen wesentlich kleineren Zellkörper (Soma) mit sehr langen Zellausläufern, die sich morphologisch und immunzytochemisch in Axon und Dendriten unterteilen lassen (Abb. C 1B).

Zur Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit, musste das NT2/N-System zunächst in dieser Arbeitsgruppe etabliert werden.

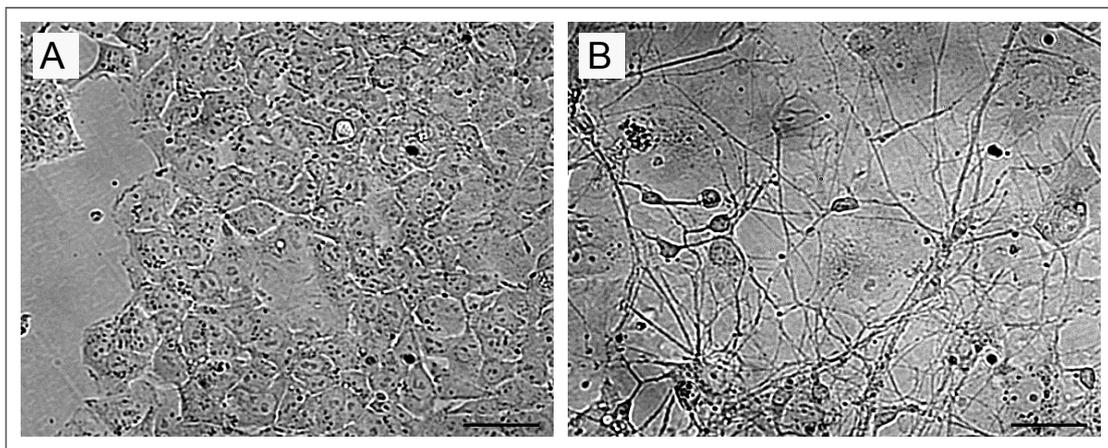


Abbildung C 1: Darstellung der Morphologie von NT2- und NT2/N-Zellen

NT2-Zellen (A) entsprechen in ihrem Phänotyp zentralnervösen Vorläuferzellen und wurden durch eine fünfwöchige Behandlung mit 10 μ M RA und anschließender Gabe von Zytostatika zu NT2/N-Zellen (B) terminal ausdifferenziert. NT2/N-Zellen können in ihren Eigenschaften mit polaren, postmitotischen humanen Neuronen gleichgestellt werden. Die Dokumentation erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie mit einer 20-fachen Vergrößerung. Maßstab: 100 μ m

Die Differenzierung von NT2-Zellen mit RA führt nicht ausschließlich zur Entstehung von NT2/N-Zellen. Neben den Neuronen mit ihrer charakteristischen Morphologie sind nach der Differenzierung in der Kultur noch große, flache Zellen vorzufinden, die als Astrozyten (NT2/A) identifiziert wurden (Kapitel A 4). In dieser Mischkultur liegen die Neurone auf den Astrozyten und bilden ein komplexes Netzwerk (Abb. C 2A und B).

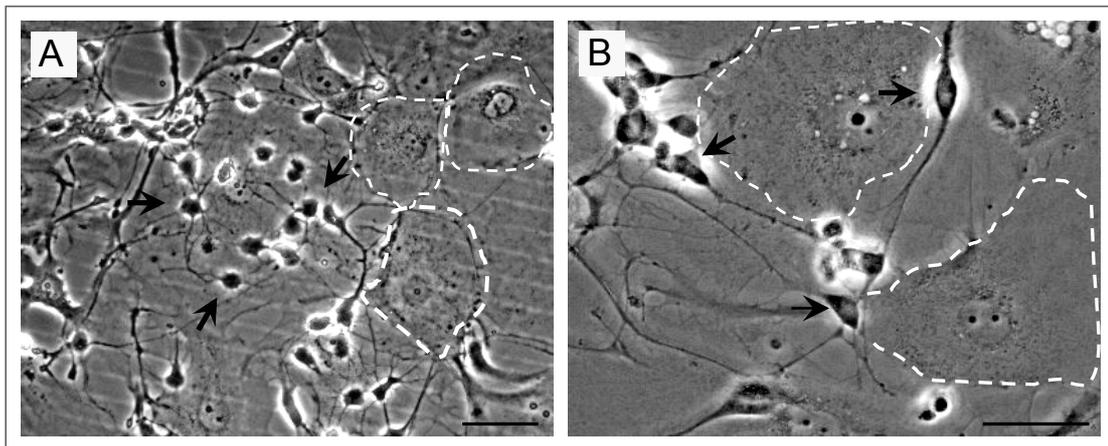


Abbildung C 2: Darstellung der Mischkultur von NT2/N- und NT2/A-Zellen

Die Behandlung mit RA induziert die Differenzierung von NT2-Zellen zu einer Mischkultur bestehend aus Neuronen (A und B, schwarze Pfeile) und Astrozyten (A und B, weiße Umrandung). Sowohl die 20-fache (A), als auch die 40-fache Vergrößerung (B) zeigt, dass die Neurone auf den Astrozyten liegen und ein komplexes Netzwerk bilden. Maßstab: 100 µm

C 1.1 Effekte von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ auf NT2-Zellen

C 1.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von $C3^{bot}$ auf die Morphologie von NT2-Zellen

Als ADP-Ribosyltransferase inaktiviert $C3^{bot}$ spezifisch RhoA, B und C, was die Reorganisation des Aktinzytoskeletts induziert und je nach Zelltyp zur Ausbildung von Zellausläufern oder Zellabrundung führt (Kapitel A 3.2).

Im Folgenden wurde zunächst konzentrationsabhängig die Wirkung von $C3^{bot}$ auf die Morphologie von NT2-Zellen analysiert. In Abbildung C 3 sind exemplarisch die morphologischen Veränderungen von NT2-Zellen dargestellt, nachdem sie über 24 h in Gegenwart von steigenden $C3^{bot}$ -Konzentrationen kultiviert wurden. Die Bilder zeigen deutlich, dass $C3^{bot}$ die Ausbildung von neuritenähnlichen Zellfortsätzen in NT2-Zellen induzierte, wobei die Anzahl der Zellen mit Zellausläufern mit steigenden $C3^{bot}$ -Konzentrationen zunahm.

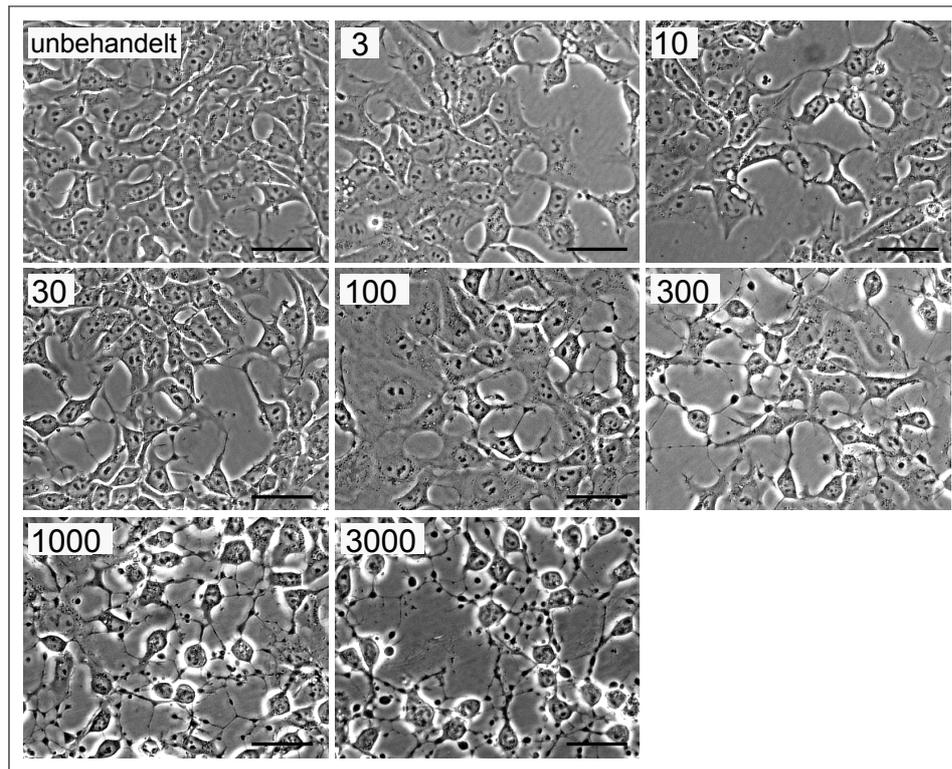


Abbildung C 3: C3^{bot} induziert konzentrationsabhängig Neuritenbildung in NT2-Zellen

Die Zellen wurden mit ansteigenden C3^{bot}-Konzentrationen (nmol/L) inkubiert und nach 24 h mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Maßstab: 50 μ m, Vergrößerung: 20x

Anhand der Phasenkontrastaufnahmen wurde zu jeder eingesetzten C3^{bot}-Konzentration die Anzahl der Zellen, die Zellausläufer gebildet hatten, quantitativ bestimmt. Abbildung C 4 zeigt in Bezug zur Gesamtzellzahl den prozentualen Anteil an NT2-Zellen mit Zellausläufern. Die quantitative Auswertung bestätigt die qualitativen Ergebnisse der Phasenkontrastaufnahmen (Abb. C 3). Außerdem kann dem Diagramm entnommen werden, dass nach 24 h bei 300 nmol/L C3^{bot} etwa die Hälfte der Zellen neuritenähnliche Zellfortsätze gebildet hatten. Eine Konzentration von 1000 nmol/L induzierte nach 24 h bei etwa 80 % der Zellen Zellausläufer. Des Weiteren zeigte sich, dass eine Erhöhung der Konzentration auf 3000 nmol/L zu keiner weiteren Zunahme des Zellanteils mit Zellausläufern führte.

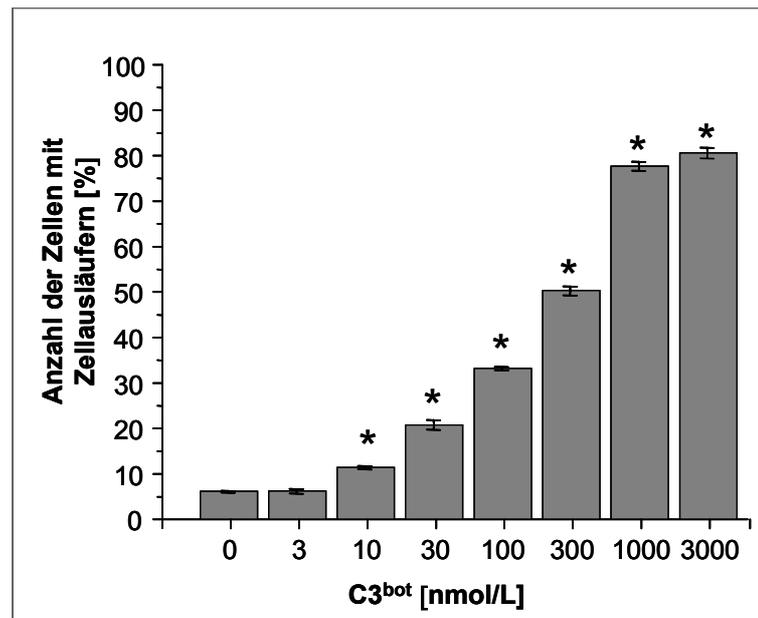


Abbildung C 4: Quantitative Analyse der Neuritenbildung in NT2-Zellen nach der Behandlung mit steigenden C3^{bot}-Konzentrationen

Mit Hilfe der Phasenkontrastaufnahmen wurde eine quantitative Analyse der Zellausläuferbildung vorgenommen. Diese erfolgte durch Auszählen der Zellen mit Zellausläufern, welche prozentual zur Gesamtzellzahl eines dokumentierten Bildes berechnet wurden. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern. Insgesamt wurden je Konzentration etwa 300-350 Zellen analysiert. Für die Analysen aller Bedingungen wurde der two-tailed student's paired t-test mit einem Signifikanzgrad von *P < 0,05 angewendet.

C 1.1.2 Konzentrationsabhängige Internalisierung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q

Da C3^{bot} ausschließlich intrazellulär die Rho-Proteine ADP-ribosyliert, kann der ADP-Ribosylierungsgrad der Rho-Proteine im Zelllysat Auskunft über das Ausmaß der C3-Internalisierung geben. Dazu werden die Zellen nach Behandlung mit C3^{bot}, oder C3^{bot}E174Q lysiert und im Zelllysat wird eine [³²P]-ADP-Ribosylierung durchgeführt. Je stärker das Rho in den intakten Zellen durch C3^{bot} ADP-ribosyliert wurde, desto geringer wird die radioaktive ADP-Ribosylierung im Zelllysat sein. Da in der vorliegenden Arbeit auch die Effekte der enzymdefizienten Mutante C3^{bot}E174Q von C3^{bot} auf das NT2-System untersucht werden sollte, konnte hiermit ihre fehlende Enzymaktivität auch unter *in vivo* Bedingungen überprüft werden.

Um die Enzymaktivität von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q in NT2-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit den steigenden C3^{bot}-, bzw. C3^{bot}E174Q-Konzentrationen behandelt und nach 24 h das Lysat mit C3^{bot} [³²P]-ADP-ribosyliert (Kapitel B 2.4.3). Mit steigenden C3^{bot}-Konzentrationen nahm das über die [³²P]-Markierung erhaltene Signal ab (Abb. C 5). Dies bedeutet, je höher die eingesetzte C3^{bot}-Konzentration ist, umso mehr Rho wurde bereits in

der intakten Zelle ADP-ribosyliert, wodurch im *in vitro* Assay weniger radioaktiv markierte ADP-Ribose nachträglich eingebaut werden konnte.

Bei den Zellen, die in Gegenwart von C3^{bot}E174Q kultiviert wurden, blieb das [³²P]-Signal bei jeder eingesetzten Konzentration konstant, d. h. dass in der intakten Zelle keine nachweisbare ADP-Ribosylierung von RhoA durch C3^{bot}E174Q stattgefunden hatte.

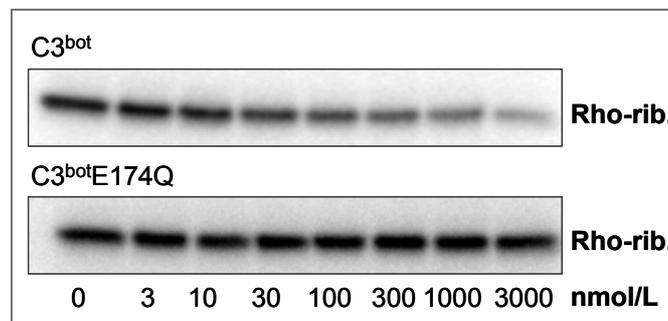


Abbildung C 5: [³²P]-Nach-ADP-Ribosylierung-Assay von Rho aus NT2-Zellen nach Behandlung mit C3^{bot} und C3^{bot}E174Q

NT2-Zellen wurden mit steigenden C3^{bot}-, bzw. C3^{bot}E174Q-Konzentrationen bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und jeweils mit 15 µg Gesamtprotein pro Zell-Lysat eine [³²P]-ADP-Ribosylierung durchgeführt. Die [³²P]-ADP-ribosylierten Rho-Proteine (Rho-rib.) wurden mit Hilfe des PhosphoImagers detektiert.

Die Ergebnisse belegen, dass C3^{bot} von NT2-Zellen bereits in nanomolaren Konzentrationen internalisiert wird und intrazellulär enzymatisch aktiv ist, wohingegen C3^{bot}E174Q auch in hohen Konzentrationen enzymatisch inaktiv ist und Rho nicht modifiziert wird.

C 1.1.3 Konzentrationsabhängiger Einfluss von C3 auf die Expression von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42

Neben den Rho-GTPasen RhoA/B und C sind auch Rac1 und Cdc42 an der Regulation der Zellausläuferbildung (Neuritogenese) beteiligt (Sarner *et al.*, 2000). Daher wurde die Wirkung von C3^{bot} auf diese GTPasen im Hinblick auf ihre Expression und Modifikation in NT2-Zellen mittels Western-Blot untersucht (Abb. C 6).

Die konzentrationsabhängige Protein-Expressionsanalyse von RhoA ergab, dass C3^{bot}-Konzentrationen bis 100 nmol/L weder eine Veränderung in der Gesamtmenge, noch eine detektierbare Modifikation von RhoA (verändertes Laufverhalten im SDS-Gel) hervorrufen. Bei einer Konzentration von 300 nmol/L C3^{bot} und höher konnte hingegen neben der 22 kD Bande eine zusätzliche, etwas höher laufende Bande detektiert werden, die dem ADP-ribosylierten RhoA (RhoA-rib.) entspricht.

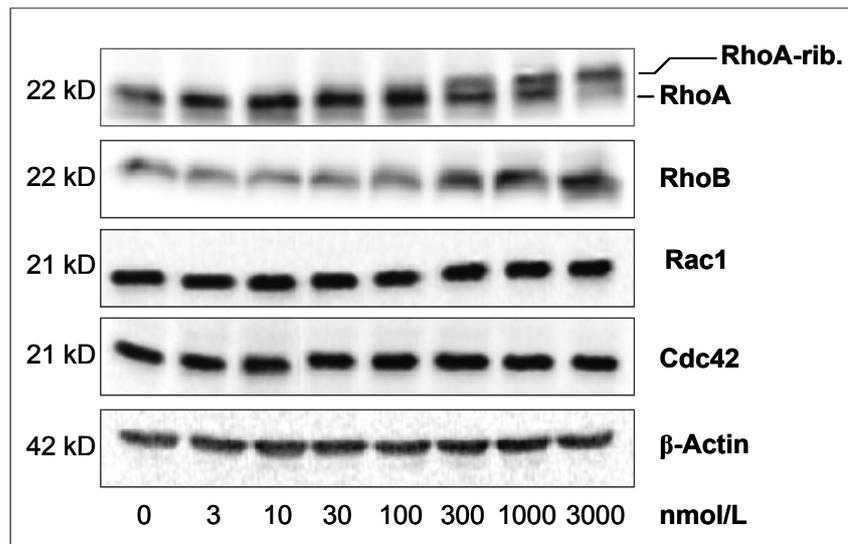


Abbildung C 6: Konzentrationsabhängige Immunoblot Analyse der Rho GTPase-Expression in NT2-Zellen 24 h nach Zugabe von C3^{bot}

NT2-Zellen wurden mit ansteigenden C3^{bot}-Konzentrationen bei 37°C inkubiert und nach 24 h lysiert. Jeweils 20 µg Probe wurden auf ein 13,7%-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und nach Elektrotransfer im Western-Blot immunologisch hinsichtlich der Spiegel von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42 analysiert. Als Referenzprotein wurde β-Aktin mitgeführt.

Ebenso wie RhoA blieb die Expression von RhoB bis zu einer C3^{bot}-Konzentration von 100 nmol/L konstant. Parallel zur ADP-Ribosylierung von RhoA konnte eine Hoch-Regulation der Expression von RhoB beobachtet werden. Die Expression von Rac1 und Cdc42 wurde in NT2-Zellen durch keine der eingesetzten C3^{bot}-Konzentration verändert. Als Ladungskontrolle wurde β-Aktin für die SDS-PAGE verwendet.

C 1.1.4 Zeitabhängige Wirkung von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ auf die Zellmorphologie von NT2-Zellen

Bisher wurde ausschließlich die RhoA-Inaktivierung durch $C3^{bot}$ für die Bildung von Neuriten in neuronalen Zellen verantwortlich gemacht. Um dies zu überprüfen, wurde im Folgenden neben $C3^{bot}$ auch die Wirkung von dessen enzymdefizienter Mutante $C3^{bot}E174Q$ auf die Morphologie von NT2-Zellen zeitabhängig untersucht.

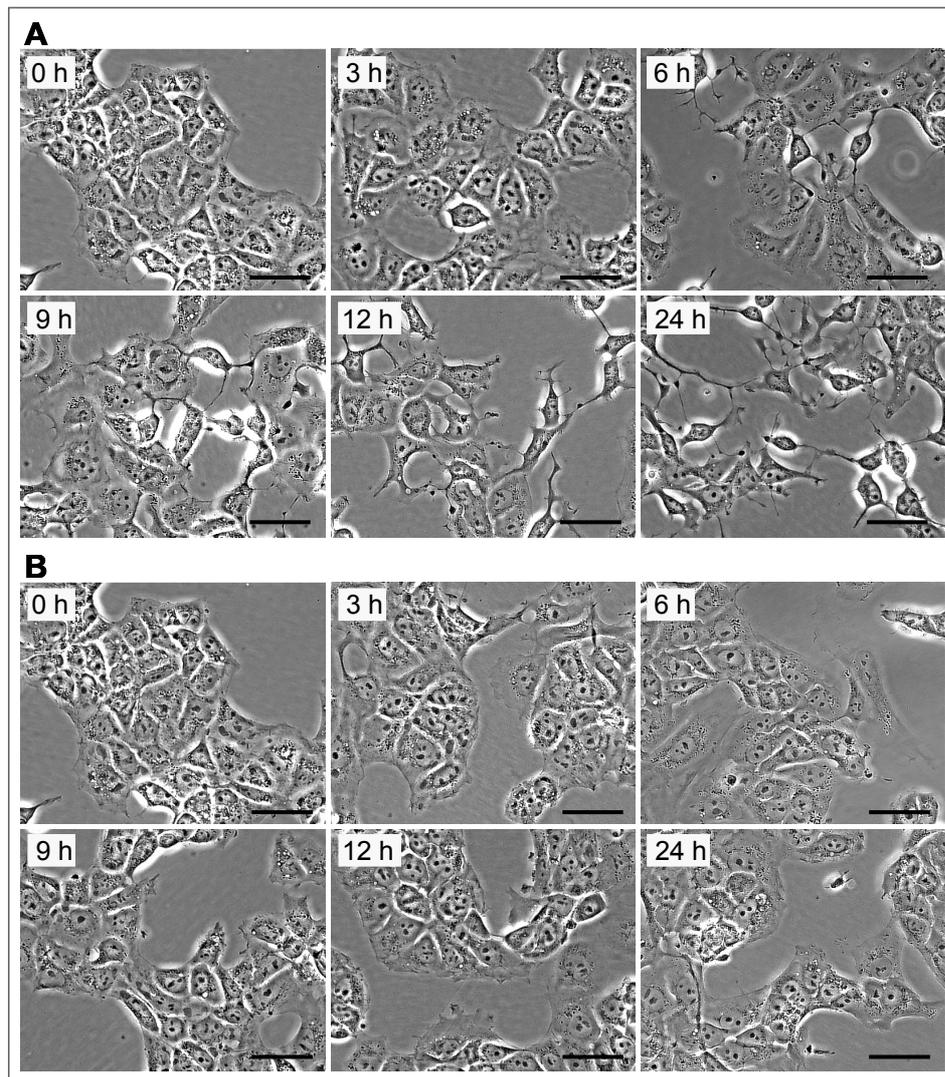


Abbildung C 7: Zeitabhängiger Vergleich der morphologischen Veränderungen von NT2-Zellen nach Zugabe von $C3^{bot}$ oder $C3^{bot}E174Q$

NT2-Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit 300 nmol/L $C3^{bot}$ (A) oder 300 nmol/L $C3^{bot}E174Q$ (B) inkubiert und mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Vergrößerung: 20x; Maßstab: 50 μ m

Abbildung C 7 zeigt exemplarisch die Morphologie von NT2-Zellen, nachdem sie über verschiedene Zeiträume in Gegenwart von 300 nmol/L $C3^{bot}$ (Abb. C 7A) oder $C3^{bot}E174Q$

(Abb. C 7B) kultiviert wurden. Anhand der Phasenkontrastaufnahmen wurde zu jedem der gewählten Zeitpunkte die Anzahl der Zellen, die nach der Behandlung mit C3^{bot} Zellausläufer gebildet hatten, in Bezug zur Gesamtzellzahl quantitativ bestimmt (Abb. C 8). Sowohl die phasenkontrastmikroskopischen Darstellungen, als auch die Quantifizierung zeigen, dass bereits 6 h nach der Gabe von C3^{bot} etwa 12% der NT2-Zellen Zellausläufer gebildet hatten. Mit steigender Kulturdauer konnte sowohl eine Zunahme in der Anzahl der Zellen mit Neuriten, als auch in der Gesamtlänge der Neuriten beobachtet werden. Nach 24 h besaßen etwa 50% aller Zellen Neuriten. C3^{bot}E174Q hingegen induzierte in NT2-Zellen unabhängig von der Behandlungsdauer keine Bildung von Zellausläufern (Abb. C 7B).

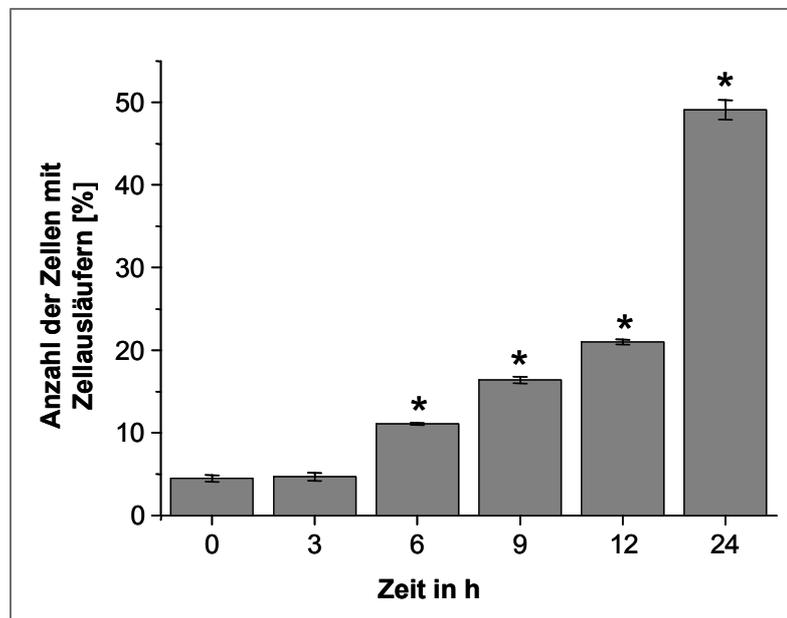


Abbildung C 8: Quantitative Analyse der Neuritenbildung von NT2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit C3^{bot}

Mit Hilfe der Phasenkontrastaufnahmen wurde eine quantitative Analyse der Zellausläuferbildung vorgenommen nach Behandlung mit 300nmol/L C3^{bot}. Diese erfolgte durch Auszählen der Zellen mit Zellausläufern, welche prozentual zur Gesamtzellzahl eines dokumentierten Bildes berechnet wurden. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern. Insgesamt wurden je Zeitpunkt etwas 300-350 Zellen analysiert. Für die Analysen aller Bedingungen wurde der two-tailed student's paired t-test mit einem Signifikanzgrad von *P < 0,05 angewendet.

C 1.1.5 Zeitabhängiger Einfluss von C3 auf die Expression von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42

Neben der Wirkung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q auf die Morphologie von NT2-Zellen wurde außerdem die Wirkung auf die Protein-Expression der Rho-GTPasen RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42 zeitabhängig untersucht. Die zeitabhängige Expressionsanalyse von RhoA ergab, dass bereits 3 h nach der Gabe von C3^{bot} eine zusätzliche, etwas höher laufende Bande detektiert werden konnte, welche dem ribosylierten RhoA entspricht (Abb. C 9). Im Vergleich zu der unmodifizierte RhoA-Bande aus den Kontrollzellen zeigt Abb. C 9 außerdem, dass die Expression von RhoA marginal ansteigt, wenn das Signal des unmodifizierten RhoAs mit dem Signal des ribosylierten RhoA addiert wird, wobei der Anstieg der RhoA-Expression parallel zu der ADP-Ribosylierung verläuft.

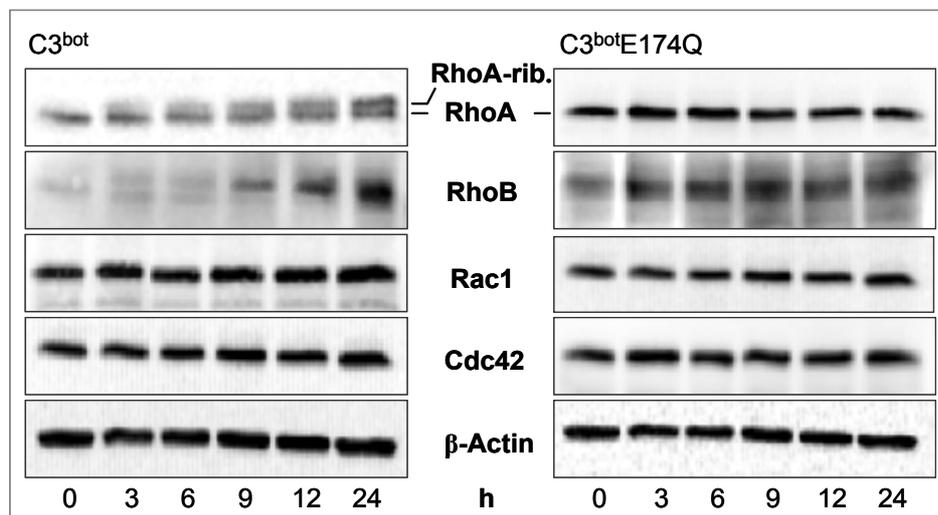


Abbildung C 9: Zeitabhängige Immunoblot Analyse der Rho GTPase-Expression in NT2-Zellen nach Zugabe von C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q

NT2-Zellen wurden mit 300 nmol/L C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q über die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert und anschließend lysiert. Jeweils 20 µg Probe wurden auf ein 13,7%-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und nach einem Western-Blot immunologisch hinsichtlich der Spiegel von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42 analysiert. Als Referenzprotein wurde β-Aktin mitgeführt.

Die Behandlung der Zellen mit C3^{bot}E174Q zeigte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Expression und die Ribosylierung von RhoA. Die ADP-Ribosylierung und die daraus resultierende Inaktivierung von RhoA wurden von einer Hochregulation der RhoB-Expression begleitet. Die RhoB-Expression blieb in den C3^{bot}E174Q-behandelten Zellen unverändert. Weder nach Behandlung mit C3^{bot}, noch mit C3^{bot}E174Q konnte eine Veränderung in der Expression von Rac1 und Cdc42 in NT2-Zellen festgestellt werden.

C 1.1.6 *Aktivität von Rac1*

In den bisherigen Untersuchungen konnte weder konzentrations-, noch zeitabhängig eine Veränderung der Expression von Rac1 nach der Behandlung mit C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q in NT2-Zellen beobachtet werden. Es ist jedoch bekannt, dass aktives Rac1 u. a. wichtig für das Auswachsen von Neuriten ist (Luo, 2000). Daher wurde im Folgenden die Aktivität von Rac1 in NT2-Zellen nach Behandlung mit C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q mit Hilfe eines Rac1-Pull-Down-Experiments untersucht (Kapitel B 2.4. ff). Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (0 h) konnte dabei mit zunehmender Behandlungsdauer keine Zunahme an aktivem Rac1 (Rac-GTPs) festgestellt werden. Ebenso blieb die Expression des Rac1-Gesamtproteins konstant (Abb. C 10). Anhand dieser Daten kann eine Aktivierung von Rac1 durch C3^{bot} und C3^{bot}E174Q in NT2-Zellen ausgeschlossen werden.

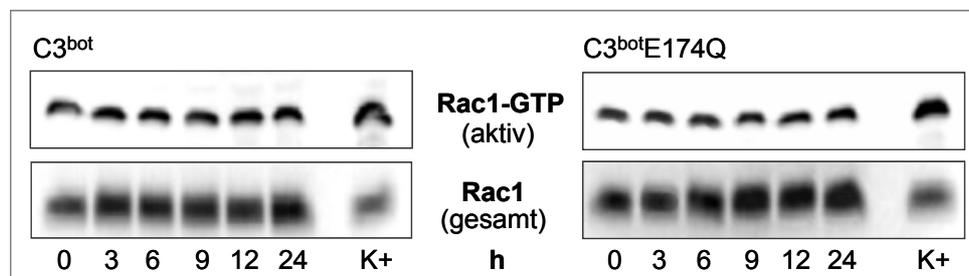


Abbildung C 10: Analyse der Aktivität von Rac1 in NT2-Zellen nach Behandlung mit C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q

Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit 300 nmol/L C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q bei 37°C inkubiert und Lysate hergestellt. Anschließend wurde ein Rac1 Pull-down mit Hilfe der GST-PAK-CRIB-Domäne durchgeführt. Mit unbehandeltem Zelllysate wurde ein Nucleotidaustausch mit nicht-hydrolysierbarem GTP γ S vorgenommen und als Positivkontrolle (K+) mitgeführt. Die Proben wurden SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Western Blot erfolgte die Immundetektion mit einem Rac1-spezifischen Antikörper.

C 1.2 Wirkung von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$, sowie den Fragmenten $C3^{bot}154-182$ und $C3^{bot}181-211$ auf humane Modell-Neurone

C 1.2.1 Untersuchung des Axonwachstums von NT2/N-Zellen

Im Gegensatz zu neuronalen Zelllinien konnte an primären murinen Hippokampusneuronen gezeigt werden, dass nicht nur $C3^{bot}$, sondern auch die enzymdefiziente Mutante $C3^{bot}E174Q$ sowohl Axonwachstum, als auch Bildung axonaler Verzweigungen induziert (Ahnert-Hilger *et al.* 2004). Daher wurde in diesem Teil der Arbeit die Wirkung von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ auf das Axonwachstum der humanen Modell-Neurone NT2/N untersucht.

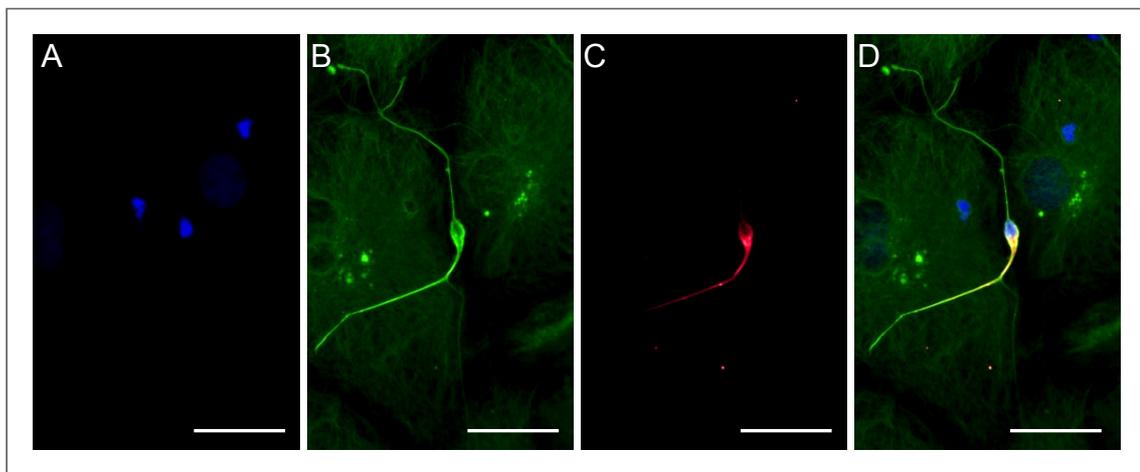


Abbildung C 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Morphologie von NT2/N-Zellen
NT2/N-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Deckgläschen ausplattiert und nach 48 h standardfixiert. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (A) und eine Immun-Doppelfärbung gegen Tubulin (mit Y/L 1-2) (B) und MAP2b (Mikrotubuli assoziiertes Protein 2b, dendritenspezifisch) (C) durchgeführt. In (D) ist die Überlagerung der drei Färbungen dargestellt. Maßstab: 50 μ m, Vergrößerung: 20x

Die systematische Analyse von C3-Fragmenten hat ergeben, dass die neurotrophe Wirkung von C3 über einen Bereich im C-Terminus vermittelt wird. Um diesen Bereich weiter einzugrenzen wurden zwei C-terminale Fragmente $C3^{bot}154-182$, welches u. a. das ARTT-Loop enthält, und $C3^{bot}181-211$, das den Bereich c-terminal des ARTT-Loops beinhaltet, hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Axonwachstum überprüft (Kapitel A 3.1 und A 3.3). Hierzu wurden die NT2/N-Zellen in Gegenwart von $C3^{bot}$, $C3^{bot}E174Q$, $C3^{bot}154-182$ oder $C3^{bot}181-211$ kultiviert. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen an primären Hippokampusneuronen (Ahnert-Hilger *et al.* 2004) und den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass 100 μ M $C3^{bot}$ bereits deutlich die Bildung von Neuriten in NT2-Zellen induziert, wurde für die Analyse der Wirkung von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ auf NT2/N-Zellen ebenso eine Konzentration von 100 μ M gewählt. Nach einer Kultivierungszeit von 24, 48 und 72 h wurden die Neurone nach einem Standardprotokoll fixiert. Anschließend wurde eine Immun-Doppelfärbung durchgeführt (Abb. C 11).

Tubulin ist ubiquitär über das gesamte Neuron verteilt, was eine morphologische Auswertung der Zellen über die Tubulinfärbung ermöglichte (Abb. C 11B). Um das Axon optisch von den Dendriten unterscheiden zu können, wurden diese mit dem Dendriten-Markerprotein MAP2b angefärbt (Abb. C 11C). Es zeigte sich, dass Neurone, die mit C3^{bot}, C3^{bot}E174Q und C3^{bot}154-182 behandelt wurden, bereits nach 24 h signifikant längere Axone besaßen, als die unter Kontrollbedingungen kultivierten Neurone. Im Gegensatz dazu entsprach die durchschnittliche Axonlänge der in Anwesenheit von C3^{bot}181-211 kultivierten Neurone der Axonlänge der Kontrollneurone (Abb. C 12).

Mit ansteigender Kulturdauer konnte unter allen Bedingungen eine generelle Zunahme der Axonlängen beobachtet werden (Abb. C 13 und C 14). Verglichen mit den Kontrollzellen waren die Axone der in Gegenwart von C3^{bot}, C3^{bot}E174Q und C3^{bot}154-182 kultivierten Neurone auch nach 48 und 72 h signifikant länger. Die mittlere Axonlänge der mit C3^{bot}181-211 behandelten Neurone blieb hingegen auf Kontrollniveau. Die Auflistung der Durchschnittswerte der gemessenen Axonlängen sowie des dazugehörigen Standardfehlers, angegeben in μm , sind in Tabelle C 1 aufgeführt. Die Einzelwerte können den jeweiligen Tabellen im Anhang unter F2 bis F4 entnommen werden.

	Kontrolle	C3 ^{bot} 181-211	C3 ^{bot} 154-182	C3 ^{bot} E174Q	C3 ^{bot}
24 h	111,9 \pm 2,1 μm	121,9 \pm 7,9 μm	158,1 \pm 7 μm	170,2 \pm 3,2 μm	168,6 \pm 4,8 μm
48 h	157,6 \pm 7,1 μm	161,9 \pm 8,8 μm	213,4 \pm 7 μm	219,3 \pm 3,2 μm	220,2 \pm 2,9 μm
72 h	195,7 \pm 8,8 μm	196,6 \pm 8,1 μm	264,1 \pm 8 μm	276,9 \pm 4,6 μm	276,6 \pm 9,4 μm

Tabelle C 1: Gemessene durchschnittliche Axonlängen in NT2/N-Zellen nach Behandlung mit C3^{bot}, C3^{bot}E174Q, C3^{bot}154-182 oder C3^{bot}181-211

Tabellarische Darstellung der ermittelten durchschnittlichen Axonlängen (Mittelwert \pm Standardfehler) von kultivierten NT2/N-Zellen unter Kontrollbedingungen und jeweils 24, 48 und 72 h nach Gabe von C3^{bot}181-211, C3^{bot}154-182, C3^{bot}E174Q und C3^{bot}. Für jede Bedingung wurden 3 unabhängige Experimente mit n = 100 durchgeführt.

Durch die Bildung von Verzweigungen und synaptischen Kontakten konnte nach 72 h unter allen Bedingungen eine Zunahme des Komplexitätsgrades der Neurone verzeichnet werden. Aufgrund dieser Beobachtung wurden nach 72 h neben den Axonlängen auch die Anzahl der axonalen Verzweigungen quantitativ ausgewertet (Abb. C. 14 C). Dabei ergab sich eine durchschnittliche Anzahl von drei Verzweigungen für Neurone, die mit C3^{bot}, C3^{bot}E174Q und C3^{bot}154-182 behandelt wurden. Für Neurone, die unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von C3^{bot}181-211 kultiviert wurden, konnte durchschnittlich eine Verzweigung gezählt werden.

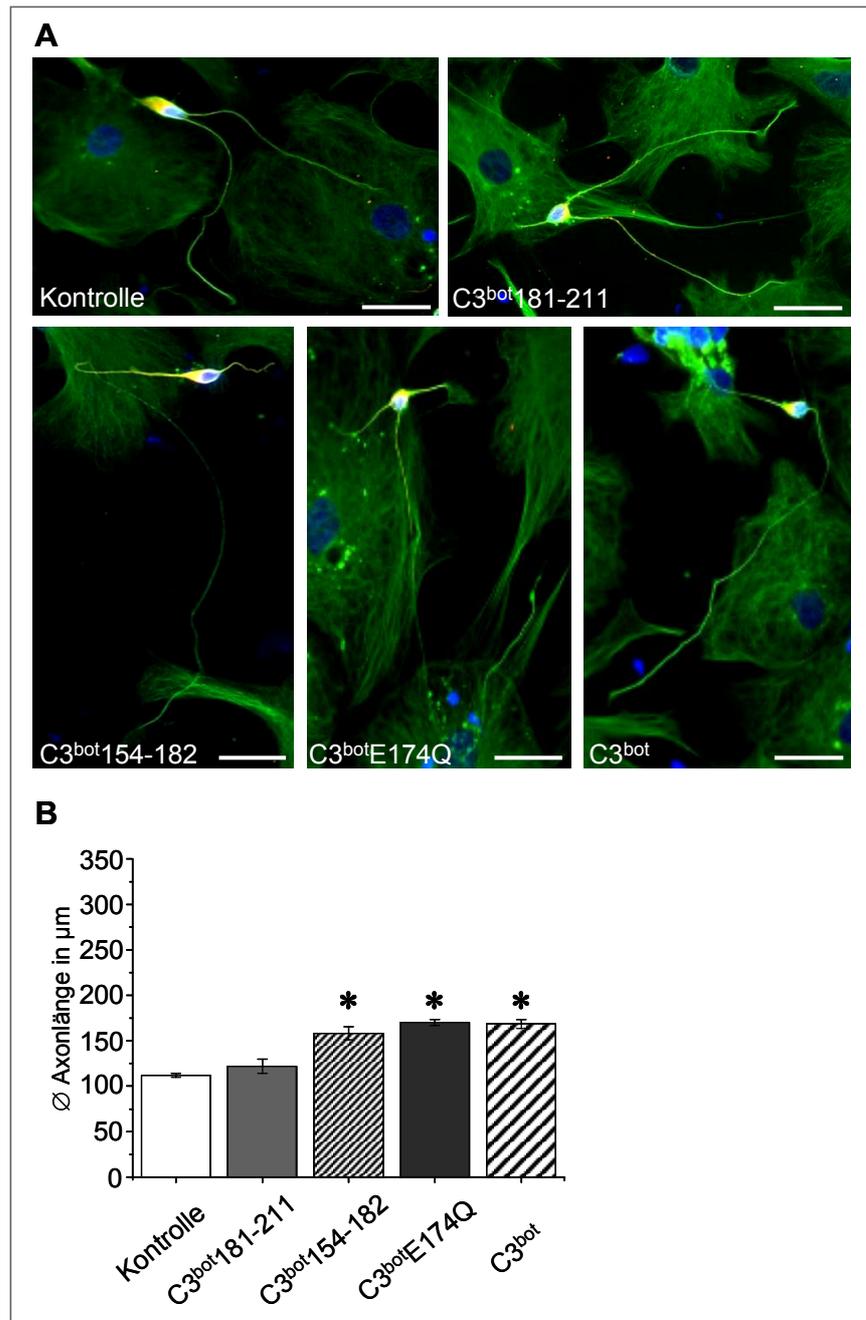


Abbildung C 12: Effekte von C3^{bot}, C3^{bot}E174Q, C3^{bot}154-182 oder C3^{bot}182-211 auf das Axonwachstum von NT2/N-Zellen nach 24 h

NT2/N-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 24h mit 100 nmol/L C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E174Q oder 300 nmol/L C3^{bot}154-182, bzw. C3^{bot}182-211 inkubiert und anschließend standardfixiert. Es wurde eine Immun-Doppelfärbung gegen Tubulin (grün) und gegen MAP2b (rot) sowie eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt, Gezeigt sind jeweils die Überlagerungen der drei Färbungen (A). Für die morphometrischen Analysen wurden die Axone der fluoreszenzmikroskopisch dokumentierten NT2/N-Zellen mit Hilfe der KIB-Metro-Software vermessen. Dargestellt sind die ermittelten Durchschnittswerte und Standardfehler der von jeder Bedingung gemessenen Axonlängen nach 24 h aus drei unabhängigen Experimenten mit n = 100 (B). Für die Analysen aller Bedingungen wurde der two-tailed student's paired t-test mit einem Signifikanzgrad von *P < 0,05 angewendet. Maßstab: 50 µm, Vergrößerung: 20x

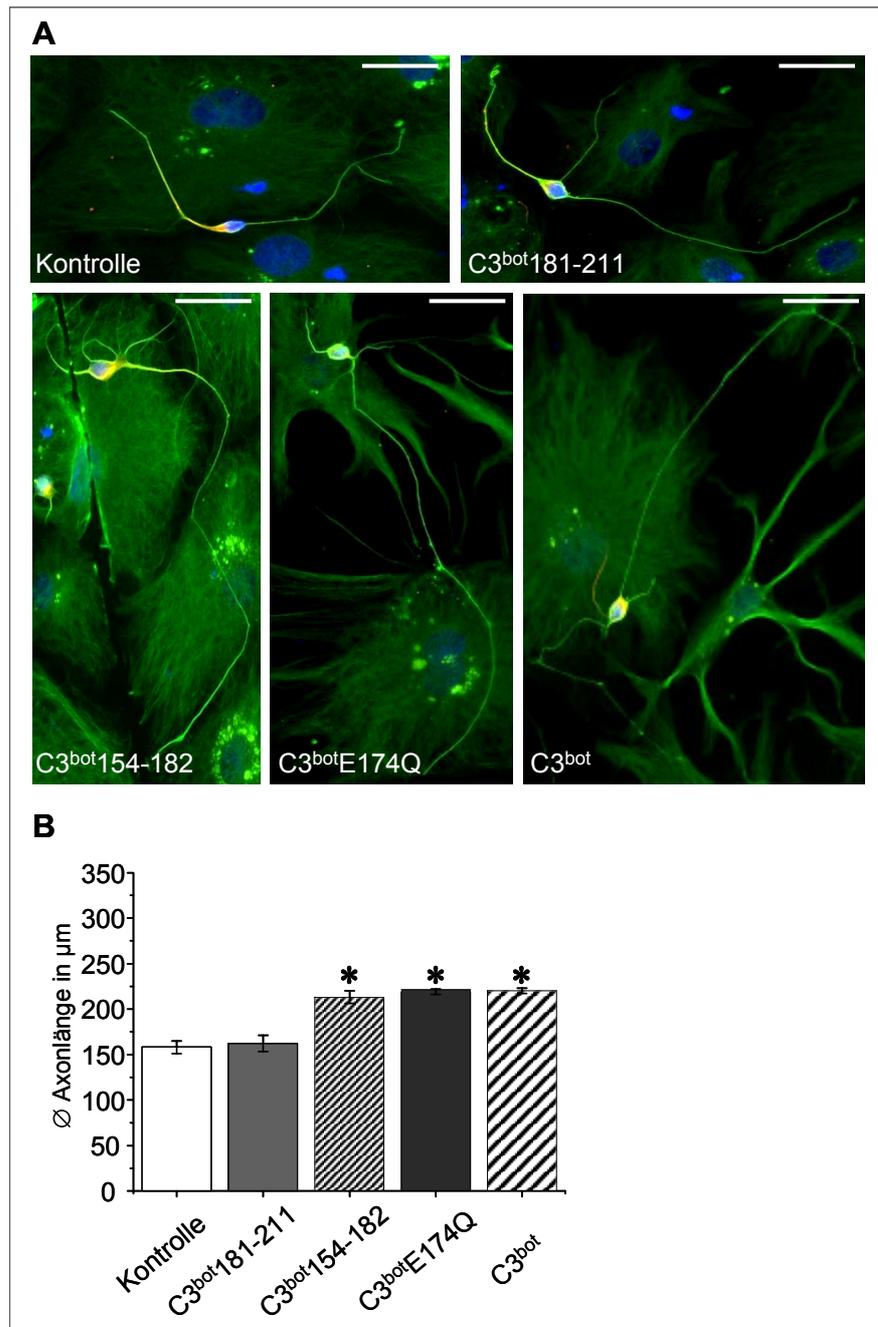


Abbildung C 13: Effekte von C3^{bot}, C3^{bot}E174Q, C3^{bot}154-182 oder C3^{bot}182-211 auf das Axonwachstum von NT2/N-Zellen nach 48 h

NT2/N-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 48h mit 100 nmol/L C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E174Q oder 300 nmol/L C3^{bot}154-182, bzw. C3^{bot}182-211 inkubiert und anschließend standardfixiert. Es wurde eine Immun-Doppelfärbung gegen Tubulin (grün) und gegen MAP2b (rot) sowie eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Gezeigt sind jeweils die Überlagerungen der drei Färbungen (A). Für die morphometrischen Analysen wurden die Axone der fluoreszenzmikroskopisch dokumentierten NT2/N-Zellen mit Hilfe der KIB-Metro-Software vermessen. Dargestellt sind die ermittelten Durchschnittswerte und Standardfehler der von jeder Bedingung gemessenen Axonlängen nach 48 h aus drei unabhängigen Experimenten mit n = 100 (B). Für die Analysen aller Bedingungen wurde der two-tailed student's paired t-test mit einem Signifikanzgrad von *P < 0,05 angewendet. Maßstab: 50 µm, Vergrößerung: 20x

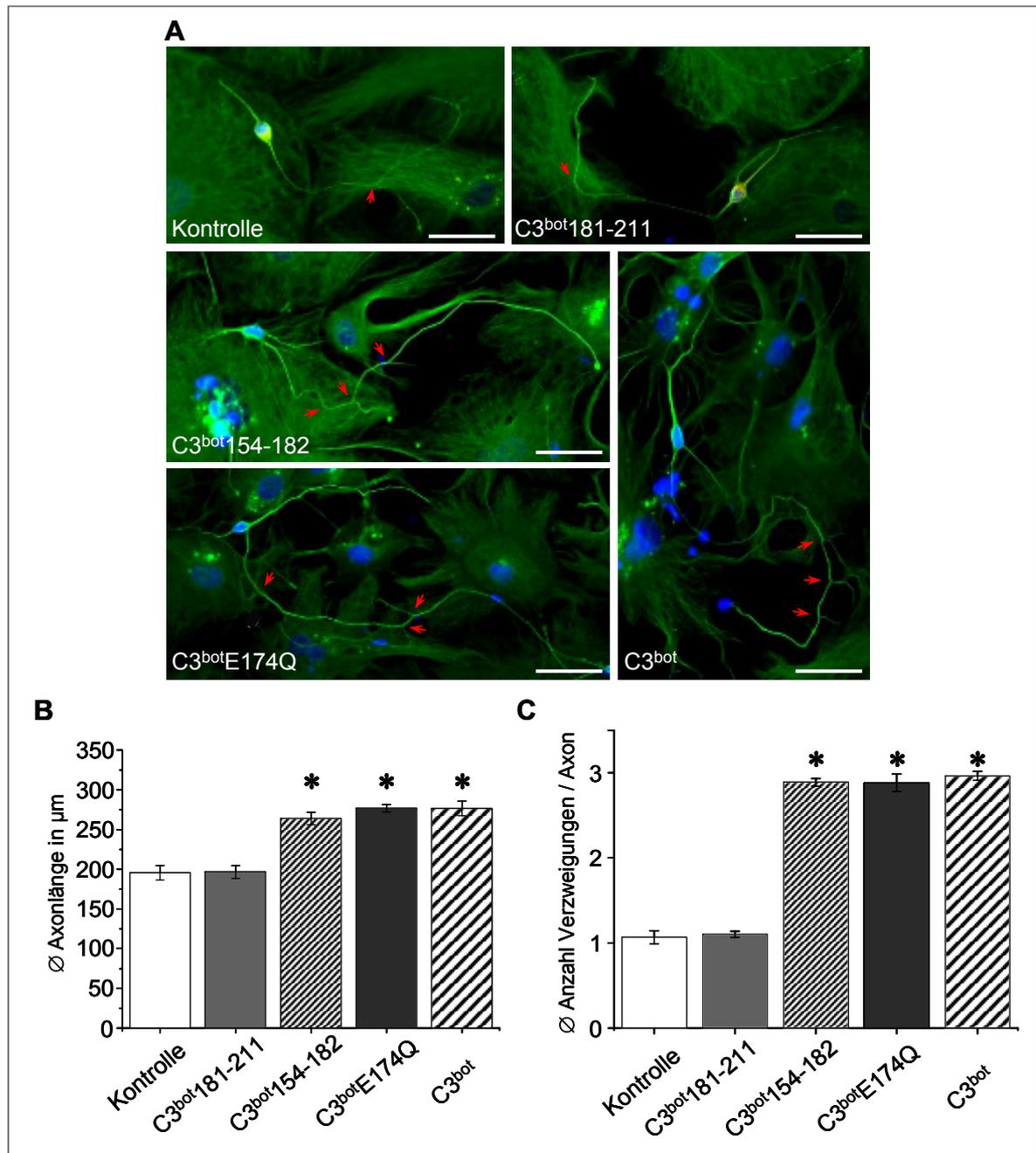


Abbildung C 14: Effekte von C3^{bot}, C3^{bot}E174Q, C3^{bot}154-182 oder C3^{bot}182-211 auf das Axonwachstum von NT2/N-Zellen nach 72 h

NT2/N-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Deckgläsern ausplattiert und für 72h mit 100 nmol/L C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E174Q oder 300 nmol/L C3^{bot}154-182, bzw. C3^{bot}182-211 inkubiert und anschließend standardfixiert. Es wurde eine Immun-Doppelfärbung gegen Tubulin (grün) und gegen MAP2b (rot) sowie eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Gezeigt sind jeweils die Überlagerungen der drei Färbungen (A). Für die morphometrischen Analysen wurden die Axone der fluoreszenzmikroskopisch dokumentierten NT2/N-Zellen mit Hilfe der KIB-Metro-Software vermessen. Dargestellt sind die ermittelten Durchschnittswerte und Standardfehler der von jeder Bedingung gemessenen Axonlängen nach 72 h aus drei unabhängigen Experimenten mit n = 100 (B). Zusätzlich wurde die Anzahl der durchschnittlichen axonalen Verzweigungen (rote Pfeile) pro Kulturbedingung durch auszählen ermittelt (D). Für die Analysen aller Bedingungen wurde der two-tailed student's paired t-test mit einem Signifikanzgrad von *P < 0,05 angewendet. Maßstab: 50 µm, Vergrößerung: 20x

In Abbildung C 15 ist die Kinetik des Axonwachstums dargestellt. Darin wird deutlich, dass $C3^{bot}$, $C3^{bot}E174Q$ und auch das C-terminale Fragment $C3^{bot}154-182$, welches das ARTT-Loop enthält, zu einem verstärkten Axonwachstum führen. Außerdem ist klar erkennbar, dass die Wirkung von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ auf das Axonwachstum über die Zeit nahezu konstant ist und sich die Wirkung von $C3^{bot}154-182$ nur geringfügig von diesen unterscheidet.

Der Kurvenverlauf über die Zeit ist von Kontrollzellen und den Zellen, die mit dem C-terminalen Fragment $C3^{bot}181-211$ ohne ARTT-Loop behandelt wurden, ebenfalls nahezu identisch. Daraus kann geschlossen werden, dass der ARTT-Loop sowohl für den axonotrophen Effekt von $C3^{bot}$, als auch für die Bildung von Verzweigungen eine zentrale Bedeutung haben könnte.

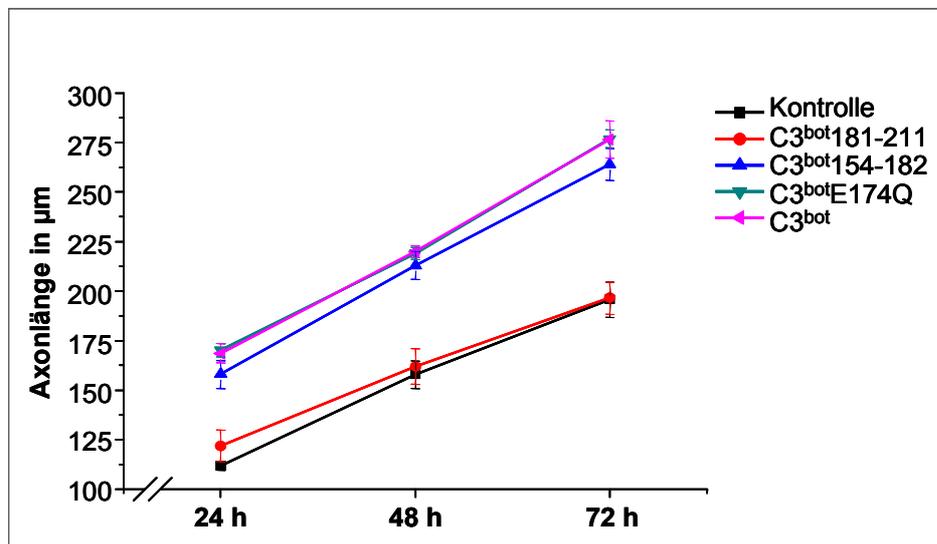


Abbildung C 15: Gegenüberstellung des durch $C3^{bot}$, $C3^{bot}E174Q$, $C3^{bot}154-182$ oder $C3^{bot}182-211$ induzierten Axonwachstums zu verschiedenen Zeitpunkten

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der morphometrisch analysierten Axonlängen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Kultivierung in Gegenwart von $C3^{bot}$, $C3^{bot}E174Q$, $C3^{bot}154-182$ oder $C3^{bot}182-211$ aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 280-320 Zellen pro Bedingung. Für die Analysen aller Bedingungen wurde der two-tailed student's paired t-test mit einem Signifikanzgrad von $*P < 0,05$ angewendet.

C 1.2.2 Expression von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42 in humanen Modell-Neuronen

Wie zuvor in den NT2-Zellen wurde die Proteinexpression von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42 auch in NT2/N-Zellen untersucht, nachdem diese über verschiedene Zeiträume in Anwesenheit von C3^{bot}, C3^{bot}E174Q und C3^{bot}154-182 kultiviert wurden.

Die Expressionsanalyse von RhoA ergab, dass in den mit C3^{bot} kultivierten Zellen bereits nach 3 h eine ADP-Ribosylierung von RhoA festgestellt werden konnte. Nach 9 h nahm die RhoB-Expression leicht zu. Im Gegensatz dazu wurde weder die Expression von RhoA, noch die Expression von RhoB durch C3^{bot}E174Q oder C3^{bot}154-182 beeinflusst. Die Analyse der Expression von Rac1 und Cdc42 ergab, dass diese im Vergleich zu Kontrollbedingungen (0 h) zu keinem Zeitpunkt durch C3^{bot}, C3^{bot}E174Q oder C3^{bot}154-182 verändert wurde.

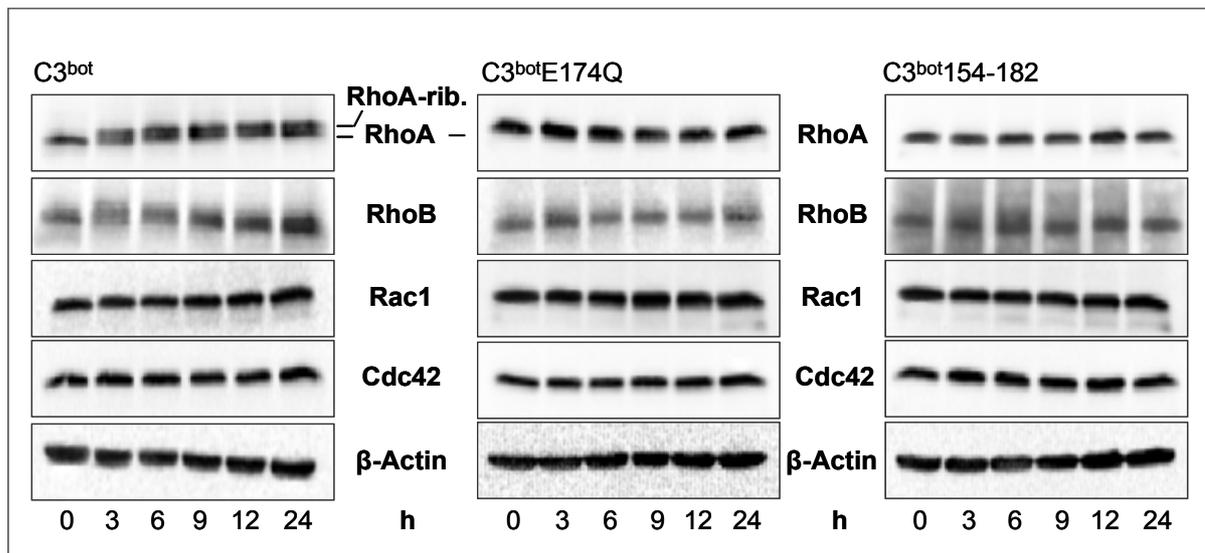


Abbildung C 16: Zeitabhängige Immunoblot Analyse der Rho GTPase-Spiegel in NT2/N-Zellen nach Zugabe von C3^{bot}, C3^{bot}E174Q oder C3^{bot}154-182

NT2/N-Zellen wurden mit 100 nmol/L C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q bzw. 300 nmol/L C3^{bot}154-182 über die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert und anschließend lysiert. Jeweils 20 µg Probe wurden auf ein 13,7 %-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und nach einem Western Transfer immunologisch hinsichtlich der Spiegel von RhoA, RhoB, Rac1 und Cdc42 analysiert.

C 2 Einfluss von C3^{bot} auf die Differenzierung von NT2-Zellen

In der Literatur wird C3^{bot} als ein Faktor beschrieben, der die Differenzierung von verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien zu Zellen mit neuronalem Phänotyp induziert (Komagome *et al.*, 1999; Kamata & Hattori, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Differenzierung von NT2-Zellen mit RA (Abb. C 17B) ebenso wie die Behandlung mit C3^{bot} (Abb. C 17C) starke morphologische Veränderungen, die einem neuronalen Phänotyp entsprechen, verursacht. Interessanterweise war kein deutlicher Unterschied in der Zellmorphologie zwischen RA-behandelten und C3^{bot}-behandelten Zellen zu erkennen. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass C3^{bot} möglicherweise die Differenzierung von NT2-Zellen zu NT2/N-Neuronen induziert.

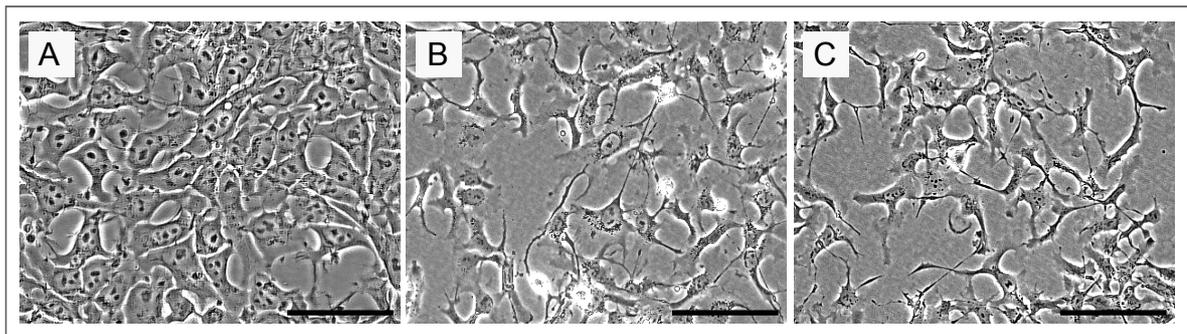


Abbildung C 17: Vergleich der Morphologie von NT2-Zellen nach Gabe von C3^{bot} oder RA
 NT2-Zellen wurden über 24 h entweder mit 300 nmol/L C3^{bot} (B) oder 10 µm RA (C) inkubiert und anschließend phasenkontrastmikroskopisch dokumentiert.
 Maßstab: 50 µm, Vergrößerung: 20x

C 2.1 Expression von Neurofilament M

Um die Reifung von NT2-Zellen zu postmitotischen NT2/N Neuronen nach Behandlung mit C3^{bot} oder RA zu überprüfen, wurde die Expression des Neurofilaments M, welches als eines der frühesten neuronalen Markerproteine bekannt ist, mittels Western Blot analysiert. Abbildung C 18 ist zu entnehmen, dass RA bereits nach 7 Tagen die Expression von NF-M induziert, welche mit zunehmender Behandlungsdauer zeitabhängig ansteigt. Im Gegensatz dazu konnte in Zellen, die in Anwesenheit von C3^{bot} kultiviert wurden, auch nach 35 Tagen kein NF-M nachgewiesen werden.

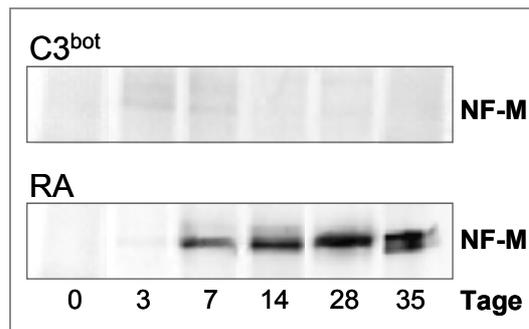


Abbildung C 18: Immunoblot-Analyse der NF-M-Expression in NT2-Zellen während der Differenzierung nach Gabe von C3^{bot} oder RA

NT2-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit 10 $\mu\text{mol/L}$ RA oder 100 nmol/L C3^{bot} behandelt, anschließend lysiert und je 15 μg Protein über eine 7,5 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot erfolgte die Immundetektion mit einem NF-M-spezifischen Antikörper (NL-6).

Da NT2-Zellen in ihrem Ursprung keine Neuroblastom-, sondern Teratomzellen sind, wurde die Expression von NF-M nach Behandlung mit C3^{bot} oder RA auch in SH-SY5Y-Zellen untersucht. Von SH-SY5Y ist ebenfalls bekannt, dass diese nach der Differenzierung mit RA einen neuronalen Phänotyp ausbilden und Neurofilamente exprimieren (Encinas *et al.*, 2000). Es zeigte sich, dass SH-SY5Y im Gegensatz zu NT2-Zellen bereits ohne Behandlung mit RA einen Grundspiegel an NF-M besitzen. Nach einer 28-tägigen Behandlung mit RA konnte sowohl bei den NT2-, als auch bei den SH-SY5Y-Zellen eine starke NF-M-Expression detektiert werden, wohingegen die Kultivierung in Anwesenheit von C3^{bot} weder bei NT2-, noch bei SH-SY5Y-Zellen die Expression von NF-M induzierte. Diese Ergebnisse belegen, dass C3^{bot} allein nicht in der Lage ist NT2-Zellen zu NT2/N-Neuronen zu differenzieren.

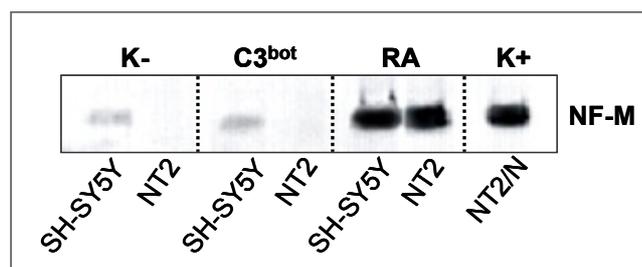


Abbildung C 19: Vergleich der NF-M Expression in NT2- und SH-SY5Y-Zellen nach der Behandlung mit C3^{bot} oder RA

Es wurden jeweils Lysate von unbehandelten NT2- und SH-SY5Y-Zellen (K-), NT2- und SH-SY5Y-Zellen, nachdem sie über 28 Tage in Gegenwart von 10 $\mu\text{mol/L}$ RA oder 100 nmol/L C3^{bot} kultiviert wurden und von NT2/N-Zellen, die eine fünfwöchige Differenzierung mit RA und anschließender Zytostatika-Behandlung durchlaufen sind (Positivkontrolle K+) angefertigt. Von jedem Lysat wurden 15 μg Protein über eine 7,5 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot die Immundetektion mit dem NF-M-spezifischen Antikörper NL-6 durchgeführt.

C 3 Aufnahme und subzelluläre Verteilung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q in NT2-Zellen

In Kapitel C 1 der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass C3^{bot}, aber nicht dessen enzymdefiziente Mutante C3^{bot}E174Q das Auswachsen von Neuriten in NT2-Zellen verursacht, wohingegen in NT2/N-Zellen sowohl C3^{bot}, als auch C3^{bot}E174Q eine axonotrophe Wirkung besitzen. Außerdem wurde festgestellt, dass bereits nanomolare C3^{bot}-Konzentrationen ausreichen, um morphologische und biochemische Effekte sowohl in NT2-, als auch in NT2/N-Zellen zu induzieren. Aus diesen Beobachtungen ergaben sich mehrere Fragen, die im Folgenden geklärt werden sollten:

1. Ist das durch C3^{bot} induzierte Neuritenwachstum ausschließlich von dessen Enzymaktivität abhängig, oder wird C3^{bot}E174Q von NT2-Zellen nicht internalisiert?
2. Welchen Aufnahmeweg benutzt C3^{bot}, um in NT2-Zellen zu gelangen?
3. Wie kann sich der Mechanismus von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q auf neuronale Vorläuferzellen und terminal differenzierte Neurone hinsichtlich ihrer neurotrophen Wirkung unterscheiden?

C 3.1 Subzelluläre Verteilung von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q in NT2-Zellen

Um die Aufnahme, sowie deren subzelluläre Verteilung zu untersuchen, wurden NT2-Zellen in Anwesenheit von C3^{bot} oder C3^{bot}E174Q kultiviert und nach 30 min fixiert. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen C3^{bot} und C3^{bot}E174Q. Um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, wurden unbehandelte NT2-Zellen mit dem jeweiligen Antikörper immungefärbt (Abb. C 20C und F). Abbildung C 20C zeigt, dass die Antikörper keine zellulären Strukturen erkennen. Somit konnte sichergestellt werden, dass diese C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E174Q mit hoher Spezifität erkennen. Da der gegen C3^{bot} gerichtete Antikörper C3^{bot} und C3^{bot}E174Q gleichermaßen erkennt, wurde bei den folgenden Lokalisierungsstudien ausschließlich mit diesem weitergearbeitet. Dabei zeigte sich sowohl bei den C3^{bot}-behandelten, als auch bei den C3^{bot}E174Q-behandelten Zellen eine punktuelle, sich über die gesamte Zelle erstreckende Färbung. Somit sind C3^{bot} und C3^{bot}E174Q nach der Aufnahme zunächst ubiquitär in der gesamten Zelle verteilt (Abb. C 20A, B, D und E). Anhand der [³²P]-ADP-Ribosylierung (Abb. C5) wurde die Internalisierung von C3^{bot} bereits biochemisch nachgewiesen. Da sich C3^{bot} und C3^{bot}E174Q lediglich in einer Aminosäure unterscheiden, zeigen diese Daten, dass C3^{bot} und C3^{bot}E174Q von NT2-Zellen gleichermaßen internalisiert werden.

Um eine Bindung von $C3^{bot}$, bzw. $C3^{bot}E174Q$ an die Zellen zu zeigen, wurden verschiedene Versuche bei $4^{\circ}C$, wobei eine Internalisierung der Proteine unterbunden wird, vorgenommen. Diese führten im Rahmen dieser Arbeit zu keinem aussagekräftigen Ergebnis.

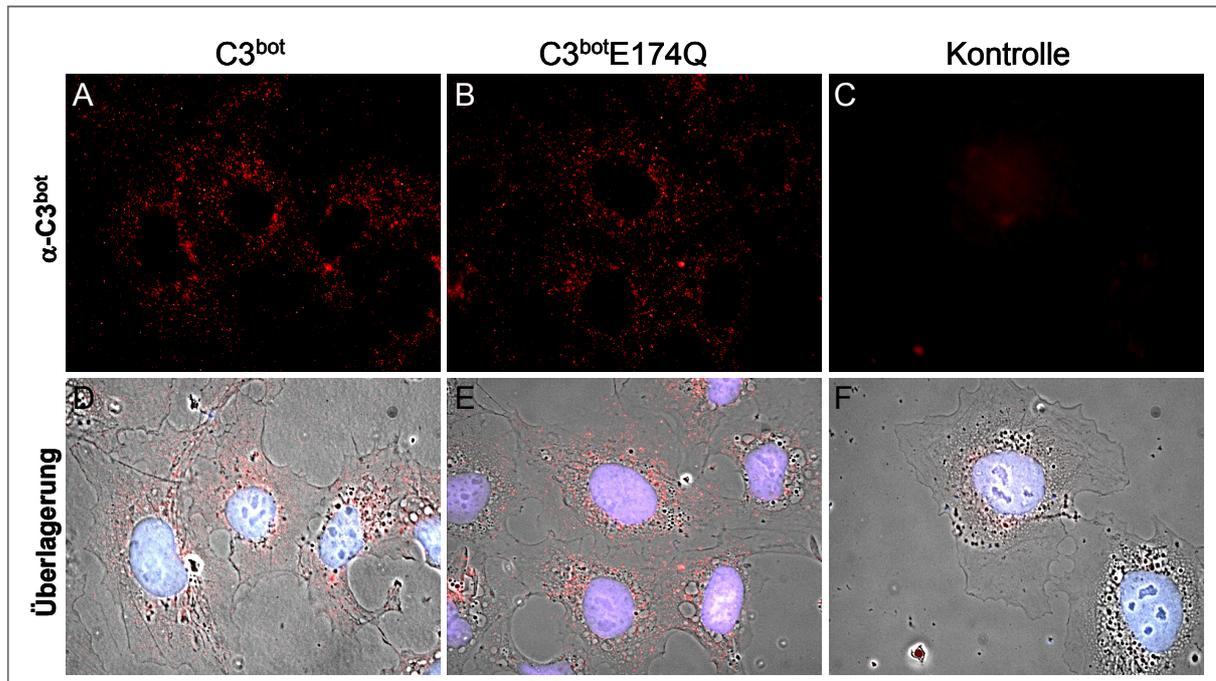


Abbildung C 20: Immunzytochemische Analyse der subzellulären Verteilung von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ in NT2-Zellen

NT2-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 30 min mit 300 nmol/L $C3^{bot}$, bzw. $C3^{bot}E174Q$ inkubiert, stringent gewaschen und anschließend mit Formaldehyd-Methanol fixiert. Mit Hilfe der polyklonalen Antikörper gegen $C3^{bot}$, bzw. $C3^{bot}E174Q$ (rot) wurden die Zellen immungefärbt und eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Gezeigt sind die $C3^{bot}$ -Färbung (A-C) und die Phasenkontrastaufnahmen der NT2-Zellen inklusive der $C3^{bot}$ - und DAPI-Färbung (D-F). Als Kontrolle wurden unbehandelte NT2-Zellen gegen $C3^{bot}$ immungefärbt (C und F) Vergrößerung 63x

C 3.2 *Aufnahme von $C3^{bot}$ über Endozytose*

Auf welchem Wege $C3^{bot}$ in seine Zielzellen gelangt, ist bis heute noch ungeklärt, da ihm eine bekannte Binde- und Translokationsdomäne fehlt. Eukaryotische Zellen besitzen verschiedene Möglichkeiten zur Internalisierung extrazellulärer Stoffe, um diese anschließend gezielt an spezifische Organellen im Zytoplasma weiterzuleiten. Dieser als Endozytose bezeichnete Prozess umfasst unterschiedliche Aufnahmemechanismen wie Phagozytose, Pinozytose, Clathrin-unabhängige und Clathrin-abhängige Endozytose (Mukherjee *et al.*, 1997).

Für einen ersten Klärungsansatz wurde überprüft, ob $C3^{bot}$ über den Weg der Endozytose in NT2-Zellen gelangen könnte. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die Kolo-kalisation von EEA1 (early endosomal antigen 1), einem bekannten Markerprotein der frühen Endosomen (Mu *et al.*, 1995; Dumas *et al.*, 2001) mit $C3^{bot}$ durchgeführt. Dabei wurden die Zellen

zeitabhängig in Anwesenheit von $C3^{bot}$ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gegen $C3^{bot}$ und EEA1 eine Immun-Doppelfärbung durchgeführt und fluoreszenz-mikroskopisch analysiert.

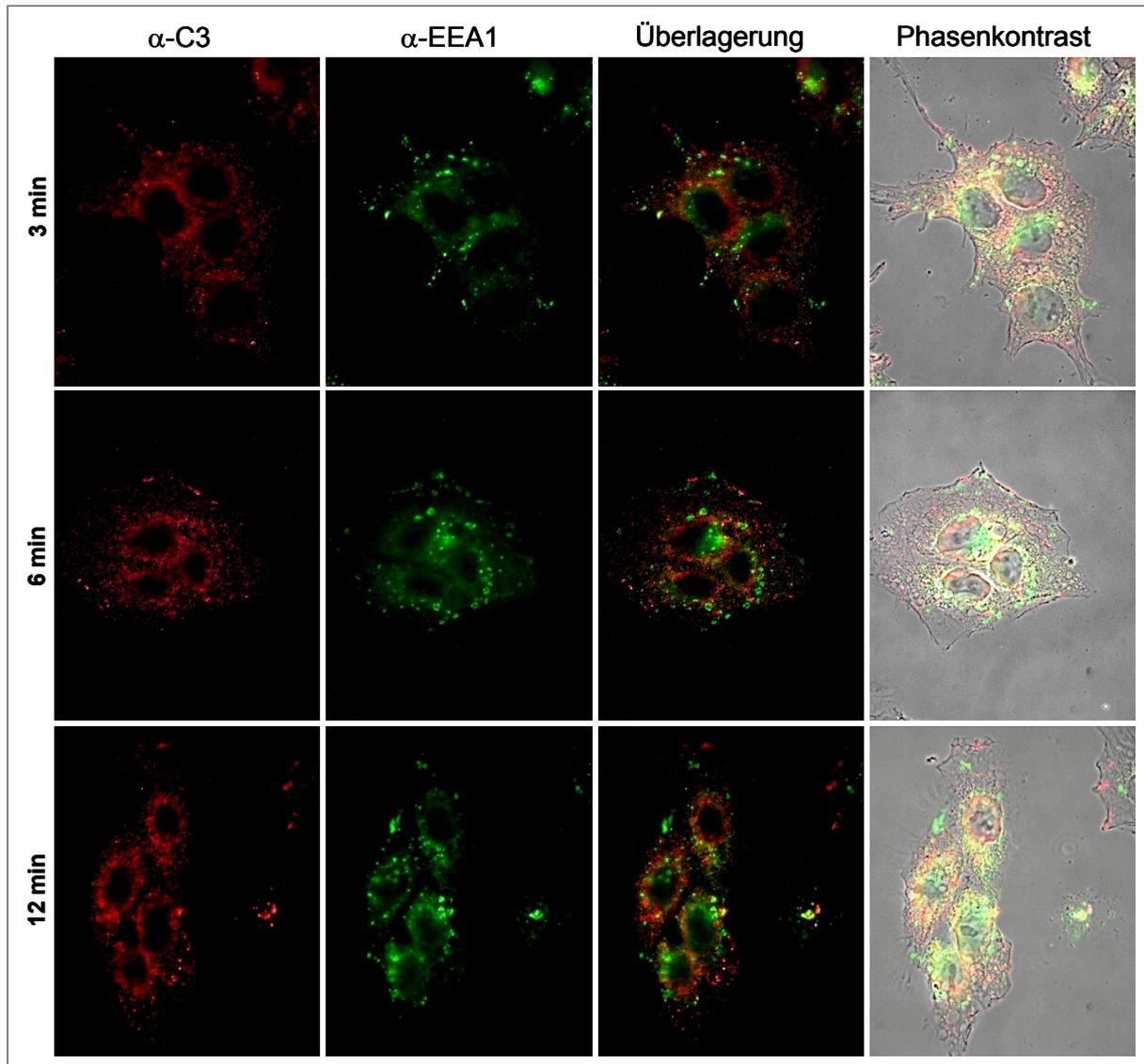


Abbildung C 21: Kolokalisationsstudie von $C3^{bot}$ mit frühen Endosomen in NT2-Zellen

NT2-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 3, 6 und 12 min. mit 300 nmol/L $C3^{bot}$ inkubiert und mit Formaldehyd-Methanol fixiert. Anschließend erfolgte eine Immun-Doppelfärbung gegen $C3^{bot}$ (rot) und gegen den frühen endosomalen Marker EEA1 (grün) durchgeführt. Gezeigt sind jeweils die Überlagerungen der zwei Färbungen und die dazugehörige Phasenkontrastaufnahme. Vergrößerung 63x

Abbildung C21 veranschaulicht, dass sich $C3^{bot}$ und EEA1 sowohl in der Nähe der Plasmamembran, als auch in der perinukleären Region befinden, und somit ein ähnliches Verteilungsbild zeigen. Anhand der Überlagerung konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine echte Kolokalisation von $C3^{bot}$ und EEA1 festgestellt werden. Um eine weitere

Charakterisierung der Aufnahme von $C3^{bot}$ vorzunehmen, bedarf es noch weiterer Experimente.

C 3.3 *Subzelluläre Verteilung von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ in murinen Hippokampusneuronen*

Um die subzelluläre Verteilung von $C3^{bot}$ und dessen enzymdefizienter Mutante $C3^{bot}E174Q$ in einem System, das möglichst physiologischen Bedingungen entspricht, zu untersuchen, wurde eine Bindungs- und Aufnahmestudie mit Hilfe des *ex vivo* Zell-Modells der primären Hippokampusneurone in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Ahnert-Hilger an der Charité Berlin durchgeführt. Das System der primären Hippokampusneurone ist in dieser Arbeitsgruppe etabliert (Methode siehe Ahnert-Hilger *et al.*, 2004).

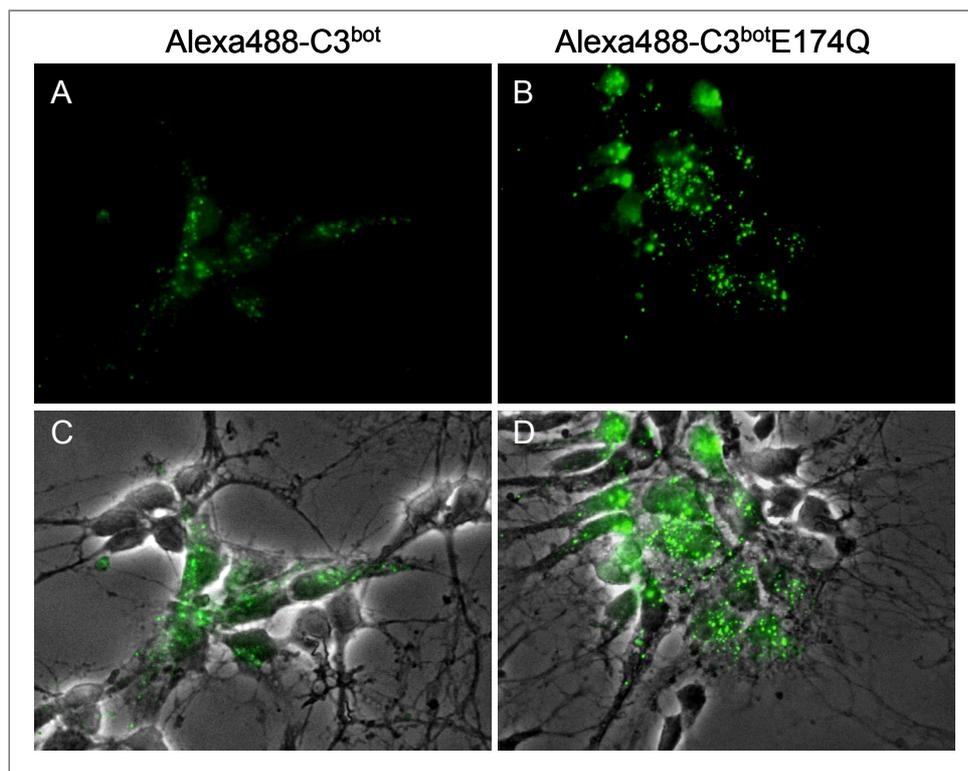


Abbildung C 22: Immunzytochemische Analyse der Lokalisation von $C3^{bot}$ und $C3^{bot}E174Q$ in primären Hippokampusneuronen

Hippokampusneurone (E15-17) wurden auf Laminin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 60 min in Gegenwart von 250 nmol/L fluoreszenzmarkiertem $C3^{bot}$ (Alexa488- $C3^{bot}$) oder $C3^{bot}E174Q$ (Alexa488- $C3^{bot}E174Q$) bei 37°C kultiviert und anschließend standardfixiert. Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen (A und B), sowie die aus Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme gebildeten Überlagerungen (C und D). Vergrößerung 63x

Für die Internalisierungsstudie wurden die primären Hippokampusneurone in Gegenwart von 250 nmol/L Alexa 488-markiertem $C3^{bot}$ bzw. $C3^{bot}E174Q$ kultiviert und anschließend nach

einer Standardmethode fixiert. Es konnte hierbei sowohl für Alexa488-C3^{bot} (Abb. C 22A und C), als auch Alexa488-C3^{bot}E174Q (Abb. C 22B und D) eine diffuse, punktuelle Verteilung im Zytoplasma beobachtet werden.

Um die eingangs aufgestellte Frage zu beantworten, ob Neurone möglicherweise eine andere Oberflächenstruktur als neuronale Vorläuferzellen besitzen, wurde eine Bindungsstudie mit Alexa488-C3^{bot} bei 4°C durchgeführt. In dieser klassischen Form der Bindungsstudie konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Abb. C 23A und C). Wurden die Zellen jedoch nach der Bindung stringent gewaschen und für 1 h bei 37°C inkubiert, konnte das Alexa488-markierte C3^{bot} in den Zellen gefunden werden (Abb. C 23B und D). Dieses Ergebnis impliziert das Vorhandensein eines Bindungspartners auf der Zelloberfläche von Neuronen.

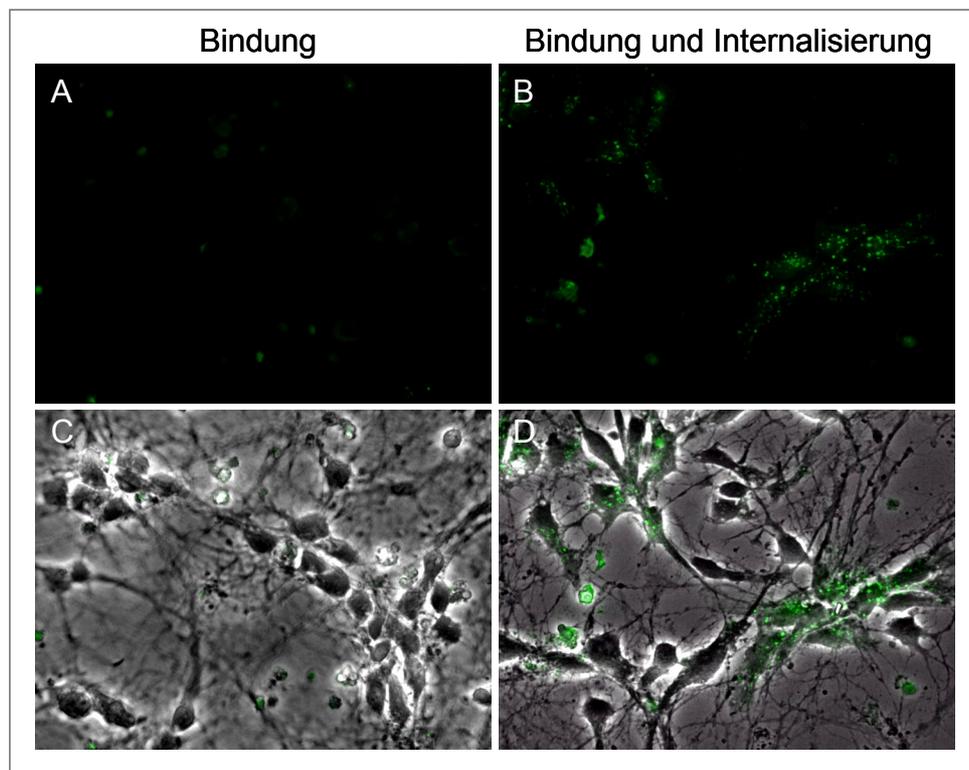


Abbildung C 23: Immunzytochemische Analyse der Bindung von C3^{bot} an primären Hippokampusneuronen

Hippokampusneurone (E15-17) wurden auf Laminin beschichtete Deckgläschen ausplattiert. Die Zelle wurden für 30 min bei 4°C in Gegenwart von 250 nmol/L Alexa488-C3^{bot} inkubiert und für die Bindungsstudie anschließend sofort standardfixiert (A und C). Für die Analyse der Bindung mit anschließender Internalisierung wurden die Zellen nach der Inkubation bei 4°C stringent gewaschen und für 60 min bei 37°C inkubiert (B und D). Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen (A und B), sowie die aus Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme gebildeten Überlagerungen (C und D). Vergrößerung 63x

Da aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch dieses *ex vivo* Modell-System ebenso wie das NT2/N-System aus einer Mischpopulation von Neuronen und Astrozyten besteht, gibt

die Morphologie der Zellen, in denen Alexa488-C3^{bot} und Alexa488-C3^{bot}E174Q, nachgewiesen werden konnten, Anlass zu der Vermutung, dass sowohl Alexa488-C3^{bot}, als auch Alexa488-C3^{bot}E174Q nicht nur in den Neuronen, sondern auch in Astrozyten lokalisiert ist. Diese Hypothese könnte anhand einer Internalisierungs- und Bindungsstudie, in der einer Immunfärbung gegen GFAP, einem spezifischen Marker für Astrozyten vorgenommen wird, verifiziert werden.

D Diskussion

D 1 Wahl eines geeigneten Zellsystems zur Untersuchung der neurotrophen Wirkung von C3^{bot}

Nach heutigem Stand der Forschung inaktiviert C3^{bot} spezifisch RhoA, B und C durch ADP-Ribosylierung. Da diese GTPasen die wichtigsten Regulatoren des Aktinzytoskeletts sind, führt ihre Inaktivierung zu einer erheblichen Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts, das wiederum starke morphologische Veränderungen der Zellen in einem physiologischen System induziert (Paterson *et al.*, 1990; Wiegers *et al.*, 1991). Je nach Zelltyp ist die Reaktion auf die RhoA-Inaktivierung unterschiedlich. In nicht-neuronalen Zelllinien verursacht C3^{bot} die Abrundung der Zellen, z. T. mit Ausbildung von Retraktionsfasern, die Neuriten sehr ähnlich sind (Chardin *et al.*, 1989), wohingegen es in verschiedenen neuronalen Zelllinien die Bildung von Neuriten induziert (Komagome, 1994; Marler *et al.*, 2005). Weitere Studien beschreiben, dass die Behandlung mit C3^{bot} nach Rückenmarksverletzungen in verschiedenen Tiermodellen zu einer Regeneration der Axone führt (Ellezam *et al.*, 2002; Dergham *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen an primären Hippokampusneuronen erstmals, dass C3^{bot} unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität sowohl axonales Wachstum, als auch die Bildung von axonalen Verzweigungen fördert (Ahnert-Hilger *et al.*, 2004). Diese Daten weisen darauf hin, dass C3^{bot} neben seiner Funktion als ADP-Ribosyltransferase eine neurotrophe Wirkung besitzt, die nicht direkt über die Inaktivierung von RhoA vermittelt wird. Da diese Beobachtungen bisher ausschließlich in primären, bereits differenzierten Neuronen gemacht wurden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} vom Differenzierungsstatus neuronaler Zellen abhängt.

Um diese Hypothese zu überprüfen musste zunächst ein Zellsystem gefunden werden, anhand dessen die Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen zu terminal differenzierten Neuronen untersucht werden kann. Für die Analyse der verschiedenen Aspekte des Nervensystems, werden in der Literatur neben primären Neuronen auch klonale Zelllinien mit neuronalen Eigenschaften verwendet, die jedoch diverse Nachteile mit sich bringen. In den häufigsten Fällen wurden diese Zellen aus Neuroblastom-, Phäochromozytom und Medulloblastom-Tumoren isoliert, also maligne Zellen, wodurch sich die hohe Proliferationsrate erklären lässt. Je schneller eine solche Zelllinie jedoch den Zellzyklus durchläuft, desto weniger hat sie mit einem Neuron gemeinsam. Einer der Gründe dafür ist, dass die Eigenschaften eines

differenzierten, reifen Neurons erst ausgebildet werden, wenn es seinen postmitotischen Zustand erreicht hat (Temple *et al.* 1990). Im Gegensatz dazu sind neuronale Tumorzelllinien nicht in der Lage terminal zu differenzieren (Greene & Tischler 1982). Werden ihnen die, für die Differenzierung benötigten Faktoren, wie z. B. NGF für PC12-Zellen entzogen, ist die Differenzierung vollkommen reversibel (He *et al.*, 1989; Lendahl & McKay 1990). Während der Differenzierung von Zelllinien werden lediglich Neuriten ausgebildet, jedoch nicht die charakteristische Morphologie von terminal differenzierten, postmitotischen Neuronen. Diese ist charakterisiert durch eine polare Aufteilung in Axon und Dendriten und den dazugehörigen zytoskelettalen Markerproteinen, wie das axonspezifische Tau und dem dendritenspezifischen Map2 (Prochiantz, 1995).

Zur Beantwortung der aufgestellten Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit das NT2/N-System gewählt. Dieses System basiert auf der Zelllinie NT2/clone D1, die aus einem humanen, embryonalen Teratokarzinom isoliert wurde. Die Besonderheit von embryonalen Teratokarzinomzellen ist, dass sie in ihren Eigenschaften humanen embryonalen Stammzellen sehr ähnlich sind (Martin 1980). NT2-Zellen entsprechen in ihrem Ursprung neuronalen Progenitorzellen und können *in vitro* mit Retinsäure oder *in vivo* durch Transplantation sowohl zu Neuronen, als auch zu Gliazellen und Oligodendrozyten differenziert werden (Miyazono *et al.* 1995; Pleasure & Lee 1992; Bani-Yaghoub *et al.*, 1999). Während der Differenzierung verändern sie nicht nur ihre Morphologie, sondern auch ihre Gen- und Proteinexpression. NT2-Zellen exprimieren verschiedene Marker, wie Nestin und Vimentin, die für neuronale Progenitorzellen typisch sind, und das mikrotubuli-assoziierte Protein Map1b, welches u. a. ein Marker für neuronale Stammzellen ist. NT2/N-Zellen hingegen exprimieren verschiedene Marker von gereiften Neuronen, wie z. B. die Neurofilamente NF-L, NF-M und NF-H, sowie das neuronenspezifische Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2b (Pleasure & Lee 1993). Zudem resultiert die Differenzierung von NT2-Zellen in einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase, wodurch die Zellen terminal differenzieren können (Spinella *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den neuronalen Tumorzelllinien besitzen terminal differenzierte NT2/N-Zellen die für Neurone charakteristische Polarität und zeigen ein morphologisch und immunzytochemisch unterscheidbares somatodendritisches (MAP2-positiv, Abb. C 11) und axonales (MAP2-negativ; Tau-positiv) Kompartiment (Pleasure & Lee, 1992).

Da sich NT2-Zellen *in vitro* durch Behandlung mit Retinsäure zu polaren, postmitotischen Neuronen differenzieren lassen, stellt diese Option ein bis heute einzigartiges Modell dar, um

die Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen zu humanen Neuronen im Kultursystem zu untersuchen.

D 2 Charakterisierung der Aufnahme und der Funktion von C3^{bot} in NT2-Zellen

D 2.1 C3^{bot} induziert Neuritenwachstum in neuronalen Vorläuferzellen über die Inaktivierung von RhoA

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass C3^{bot} in NT2- Zellen konzentrations- und zeitabhängig die Bildung von Neuriten induziert, wohingegen die enzymdefiziente Mutante C3^{bot}E174Q keine morphologischen Veränderungen verursacht (Abb. C 3, C 7). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, die beschreiben, dass die C3^{bot}-induzierte Neuritenbildung in neuronalen Zelllinien (Sebok *et al.*, 1999, Fujita *et al.*, 2001), sowie das Axonwachstum in verschiedenen primären Zellsystemen (Fischer *et al.*, 2004; Bertrand *et al.*, 2006; 2007) auf die Inaktivierung von RhoA durch ADP-Ribosylierung zurückzuführen ist. Die Rho-GTPasen sind als molekulare Schalter an der Integration von extrazellulären Signalen beteiligt und regulieren über eine Vielzahl von Effektorproteinen die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, sowie die Stabilisierung und Orientierung der Mikrotubuli (DaSilva & Dotti 2002). Der Einfluss der Rho-GTPasen auf Neuritenwachstum und -retraktion ist ebenso, wie die unterschiedlichen Ansätze zur Förderung der axonalen Regeneration nach Rückenmarksläsionen vielfach beschrieben worden (für eine Übersicht: Govek *et al.*, 2005; Linsemann & Loucks 2008). Es ist allgemein akzeptiert, dass aktives RhoA die Entstehung und Elongation von Neuriten negativ reguliert, wohingegen sowohl aktives Rac1 als auch Cdc42 die Neuritogenese positiv regulieren.

Tatsächlich konnte in NT2-Zellen eine konzentrations- (Abb. C 5, C 6) und zeitabhängige (Abb. C 9) ADP-Ribosylierung von RhoA durch C3^{bot}, aber nicht durch C3^{bot}E174Q gezeigt werden. Die ADP-Ribosylierung von RhoA und die Neuritenbildung korrelieren sowohl konzentrations-, als auch zeitabhängig miteinander. Interessanterweise induziert C3^{bot} auch in mikromolaren Konzentrationsbereichen nicht bei allen NT2-Zellen die Bildung von Neuriten, bzw. eine vollständige ADP-Ribosylierung von RhoA (Abb. C 4, C 5). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der C3^{bot}-Applikation jeweils in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden und die Zellen je nach Zellzyklus-Phase unterschiedlich sensitiv auf C3^{bot} reagieren. Eine kürzlich erschienene Arbeit von Huelsenbeck *et al.* (2007) beschreibt, dass z. B. Zellen, die sich in der S-Phase befinden für Toxin B (TcdB) aus *Clostridium difficile* besonders sensitiv sind.

Es ist bekannt, dass neben RhoA auch RhoB ein Substrat von C3^{bot} ist. RhoB gehört zu der Familie der *immediate early genes* (kurz: **IEG**, zu Deutsch etwa *zeitnah-reguliertes Gen*) und ist ein Mitglied der Rho-Subfamilie. Ein IEG ist ein Gen, das innerhalb weniger Minuten nach der Stimulation einer Zelle transkribiert wird. Die Transkription dieser Gene ist nur vorübergehend und endet bereits einige Minuten nach der Stimulation. RhoB ist das einzige Gen-Produkt der Rho-Familie, das transkriptionell reguliert wird und eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. In dieser Arbeit wurde nicht nur die ADP-Ribosylierung von RhoA und B durch C3^{bot} nachgewiesen (Abb. C 5), sondern auch parallel zu der im Immunoblot sichtbaren ADP-Ribosylierung von RhoA ein Anstieg der RhoB-Expression festgestellt (Abb. C 6, C 9). Diese Beobachtungen sind konsistent mit Studien von Huelsenbeck *et al.* (2007), die zeigen, dass die C3-Isoform aus *Clostridium limosum* zu einer Hochregulation der RhoB-Expression in Fibroblasten führt. Für die Hochregulation von RhoB sind bisher verschiedene Ursachen bekannt: 1. Wachstumsfaktoren (Jahner & Hunter, 1991); 2. genotoxischer Stress, erzeugt durch alkylierende Reagenzien, oder UV-Strahlung (Fritz *et al.*, 1995); 3. Inhibierung des Rho-Signalweges z. B. durch Statine (Holstein *et al.*, 2002), oder Toxin A aus *Clostridium difficile* (Gerhard *et al.*, 2005). Die genaue Funktion von RhoB in neuronalen Zellen ist bis heute nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert. Unter anderem wird in der Literatur beschrieben, dass die RhoB-Expression in ischämischen Neuronen ansteigt und die Apoptose in Hippokampusneuronen von einer RhoB-Hochregulation begleitet wird, was darauf hinweist, dass RhoB eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion nach ischämischen ZNS-Läsionen spielt (Trapp *et al.*, 2001; Brabeck *et al.*, 2004). In embryonalen PC19-Zellen hingegen zeigen Laplant *et al.*, (2001) einen temporären Anstieg der RhoB-Expression während der neuronalen Differenzierung. Welche Konsequenz letztendlich die C3^{bot}-vermittelte Zunahme der RhoB-Expression für NT2-Zellen hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Im Allgemeinen wird jedoch angenommen, dass die Hochregulation der RhoB-Expression häufig die Folge sowohl von der Inaktivierung von RhoA, als auch von Umstrukturierungen im Aktinzytoskelett ist (Ott *et al.*, 2003; Huelsenbeck *et al.*, 2007). Die Hochregulation von RhoB könnte somit ein Marker für die Inaktivierung von RhoA sein, wobei der RhoB-Hochregulation in diesem Zusammenhang vermutlich keine spezielle Funktion zugeschrieben werden kann, da RhoB ebenso wie RhoA durch C3^{bot} inaktiviert wird.

Die Analyse der Expression von Rac1 und Cdc42 ergab, dass diese weder durch C3^{bot} noch durch C3^{bot}E174Q beeinflusst wurde, was damit erklärt werden kann, dass beide GTPasen keine Substrate von C3^{bot} sind (Aktories & Frevort, 1987; Chardin *et al.*, 1989). Es ist jedoch

bekannt, dass Rac1 und RhoA in neuronalen Zellen wechselseitige Wirkungen haben können, die in der Literatur als „Crosstalk“ bezeichnet werden (Cox *et al.*, 2001). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass NGF in neuronalen Zelllinien über die Aktivierung von Rac1 und gleichzeitiger Inaktivierung von RhoA zur Bildung von Neuriten führt (Yamaguchi *et al.*, 2001, Nusser *et al.*, 2002). Diese Feststellungen führten zu der Hypothese, dass die C3^{bot}-induzierte Inaktivierung von RhoA möglicherweise eine Aktivierung von Rac1 zur Folge hat, die wiederum zur Bildung von Neuriten führt. Entgegen aller Erwartungen konnte in der vorliegenden Arbeit keine Aktivierung von Rac1 in NT2-Zellen durch C3^{bot} festgestellt werden (Abb. C 10). Eine Arbeit von Aoki *et al.*, (2004) zeigt mittels FRET-Analysen, dass eine besonders hohe Rac1-Aktivität während der Neuritenbildung in der distalen Hälfte der Neuritenspitzen vorliegt. Folglich macht das für die Neuritenbildung benötigte aktive Rac1 lediglich einen extrem geringen Teil des gesamten Rac1 in Zellen aus. Der in dieser Arbeit verwendete Rac1-Pull-down dient zur Bestimmung der Rac1-Aktivität in der gesamten Zelle, wodurch die Möglichkeit besteht, dass dieser nicht ausreichend sensitiv ist, um eine lokale Aktivierung von Rac1 nachzuweisen. Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass aktives Rac1 in den Neuritenspitzen vorliegt und somit maßgeblich an der Neuritenbildung beteiligt ist. Zusammengefasst zeigen die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit in Übereinstimmung mit der Literatur, dass das Neuritenwachstum in den neuronalen Vorläuferzellen NT2 in erster Linie über die Inaktivierung von RhoA durch C3^{bot} vermittelt wird.

D 2.2 *C3^{bot} gelangt nicht über klassische Endozytose in NT2-Zellen*

Aufgrund ihrer hohen Spezifität für die Rho-GTPasen werden die C3-ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen als pharmakologische Werkzeuge genutzt, um deren physiologische Funktionen zu untersuchen. Obwohl die Rho-GTPasen ausschließlich intrazellulär lokalisiert sind, besitzen die C3-ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen im Gegensatz zu anderen bakteriellen Toxinen jedoch keine klassische Rezeptorbinde- und Translokationsdomäne, mit der sie sich selbst in ihre eukaryotische Zielzelle einschleusen können. Demnach sind für die Einschleusung der C3-Exoenzyme in ihre Zielzellen entweder hohe extrazelluläre Konzentrationen oder lange Inkubationszeiten notwendig (Boquet *et al.*, 1998; Aktories *et al.*, 2000). Es ist bis heute noch nicht geklärt, auf welchem Weg C3^{bot} in seine Zielzelle gelangen könnte, es wird jedoch bisher angenommen, dass die Aufnahme über unspezifische Pinozytose erfolgt. Entgegen der Literaturdaten wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass bereits nanomolare C3^{bot}-Konzentrationen in NT2-Zellen ausreichen, um sowohl die ADP-

Ribosylierung von RhoA (Abb. C 5, 6), als auch die Bildung von Neuriten zu induzieren (Abb. C 4). Zudem ergab die immunzytochemische Analyse der subzellulären Verteilung von C3^{bot} und C3^{bot}E174, dass beide Proteine bereits nach 30 min gleichermaßen in NT2-Zellen nachgewiesen werden konnten, obwohl die extrazelluläre Konzentration zum Zeitpunkt der Applikation im nanomolaren Bereich lag (Abb. C 20). In Anbetracht der Tatsache, dass C3^{bot} bereits in sehr geringen extrazellulären Konzentrationen von NT2-Zellen internalisiert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Aufnahme über einen spezifischen Aufnahmemechanismus, wie z. B. über einen Rezeptor erfolgt.

Für einen ersten Klärungsansatz wurde überprüft, ob die Aufnahme von C3^{bot} über den endosomal Transport erfolgen könnte. Endosomen bilden ein überaus komplexes und dynamisches System, das nicht nur durch intrazelluläre Prozessierung von Liganden, sondern auch durch den Austausch von Stoffen zwischen verschiedenen Zellkompartimenten untereinander und mit der Zellmembran gekennzeichnet ist.

Im Allgemeinen können endozytotische Prozesse in unterschiedliche Schritte unterteilt werden: Invagination der Plasmamembran, Abschnürung des gebildeten Vesikels, Eintritt in den endozytotischen Transport und Abbau der aufgenommenen Partikel in den Lysosomen. Die einzelnen Kompartimente des endolysosomal Transport lassen sich grob schematisch in drei Gruppen einteilen: frühe Endosomen (*early endosomes*), späte Endosomen (*late endosomes*) und Lysosomen (Perret *et al.* 2005). Sowohl die frühen, als auch die späten endosomal Kompartimente unterscheiden sich anhand ihrer Morphologie, assoziierter Proteine, ihrer Funktion und ihres pH-Wertes.

Das Early Endosome Antigen 1 (EEA1) ist ein spezifischer Marker für die Endozytose (Dumas *et al.* 2001). In dieser Arbeit konnte jedoch keine Kollokalisierung von C3^{bot}, oder C3^{bot}E174Q mit EEA1 festgestellt werden (Abb. C 21). Zudem ergaben weitere arbeitsgruppeninterne Studien an der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, dass diese in gleicher Weise wie NT2-Zellen auf nanomolare C3^{bot}-Konzentrationen reagieren, die Aufnahme von C3^{bot} jedoch nicht durch Bafilomycin A1 gestoppt werden kann (unveröffentlichte Daten: Dissertation Stefan Werner). Bafilomycin ist ein potenter Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase und blockiert somit die für die Membrantranslokation notwendige Azidifizierung des Endosoms (Bowman *et al.*, 1988). Der Mechanismus des Eindringens von C3^{bot} in das Zytosol von NT2-Zellen konnte somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher charakterisiert werden.

D 2.3 $C3^{bot}$ induziert keine neuronale Differenzierung in NT2-Zellen

Neben der Regulation des Aktinzytoskeletts sind die Rho-GTPasen an zahlreichen zellulären Prozessen, wie z. B. der Gen- und nachfolgender Proteinexpression beteiligt (für eine Übersicht: Jaffe & Hall, 2005). Während der neuronalen Differenzierung und Morphogenese verändern neuronale Zellen nicht nur ihre Morphologie, sondern auch die Expression vieler Proteine und Enzyme. Die Tatsache, dass $C3^{bot}$ die Bildung von Neuriten, sowie eine erhöhte Aktivität von Acetylcholin-Esterase (AChE) und Cholin-Acetyltransferase (ChAT), die als Markerenzyme für die neuronale Differenzierung bekannt sind, in den neuronalen Tumorzelllinien GOTO, NG108-15 und PC12 induziert, wird in einigen Studien zum Anlass genommen, $C3^{bot}$ eine Beteiligung an der neuronalen Differenzierung über die Inaktivierung von Rho zuzuschreiben (Komagome *et al.* 1999; Kamata & Hattori, 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Retinsäure, die die Differenzierung von NT2-Zellen vermittelt (Pleasure & Lee, 1992) und $C3^{bot}$ in NT2-Zellen zu ähnlichen morphologischen Veränderungen führen (Abb. C 17), wodurch die Hypothese, dass $C3^{bot}$ in der Lage ist die Differenzierung von NT2- zu NT2-N-Zellen einzuleiten, als sehr nahe liegend erscheint. Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit kein Nachweis der Aktivität von AChE und ChAT durchgeführt, da NT2-Zellen bereits neuronal determiniert sind und gleichermaßen wie NT2/N-Zellen AChE und ChAT exprimieren (Llanes *et al.*, 1995). Daher wurde in dieser Arbeit die Expression von Neurofilament M (NF-M), einem bekannten Neuronen-spezifischen Markerprotein, das bereits sehr früh während der neuronalen Differenzierung von NT2-Zellen exprimiert wird (Pleasure & Lee, 1993; Lüdemann *et al.*, 2005), untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Expression von NF-M in NT2-Zellen zwar durch Retinsäure induziert wird, aber nicht durch $C3^{bot}$ (Abb. C 18). Ebenso wie NT2-Zellen reagieren auch die Neuroblastomzellen SH-SY5Y auf $C3^{bot}$ mit Neuritenwachstum. Zudem bilden sie nach der Differenzierung mit RA einen neuronalen Phänotyp aus, der durch die Ausbildung langer dendritenähnlicher Neuriten charakterisiert ist (Pan *et al.*, 2005). Außerdem exprimieren sie als neuronalen Marker Neurofilamente, aber kein GFAP. SH-SY5Y-Zellen entwickeln jedoch keine Polarität und proliferieren weiter. Auch in SH-SY5Y-Zellen konnte keine $C3^{bot}$ -induzierte Expression von NF-M festgestellt werden (Abb. C19). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch mit den Daten aus der Literatur (Komagome *et al.* 1999; Kamata & Hattori, 2007) und belegen, dass $C3^{bot}$ weder in NT2-, noch in SH-SY5Y-Zellen eine differenzierende Wirkung besitzt. Vermutlich spielen jedoch viele verschiedene Faktoren, unterschiedliche Signalwege und der jeweilige Zelltyp zusammen eine Rolle, und es sind weitere Versuchsmodelle notwendig, um diese unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären.

D 3 Die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} ist in humanen Modell-Neuronen von ihrem Differenzierungs-Status abhängig

D 3.1 C3^{bot} besitzt unabhängig von seiner ADP-Ribosyltransferase-Aktivität eine neurotrophe Wirkung auf humane Modell-Neurone

Im Gegensatz zu der fehlenden Wirkung von C3^{bot}E174Q auf NT2-Zellen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nicht nur C3^{bot} sondern auch C3^{bot}E174Q das Axonwachstum, sowie die Bildung von axonalen Verzweigungen in NT2/N-Zellen signifikant erhöht (Abb. C 12-15). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Studie an den primären Hippokampusneuronen von Ahnert-Hilger *et al.* (2004). Demnach besitzt C3^{bot} neben seiner ADP-Ribosyltransferase-Aktivität auch eine neurotrophe Wirkung auf humane Modell-Neurone.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass das verkürzte Fragment C3^{bot}154-182, das aus den Aminosäuren 154 bis 182 besteht und das ARTT-Motiv, inklusive dem ARTT-Loop, enthält, eine ähnliche neurotrophe Wirkung wie C3^{bot} und C3^{bot}E174Q auf NT2/N-Zellen besitzt (Abb. C 12-15). Im Gegensatz dazu induziert das Fragment C3^{bot}181-211, welches das ARTT-Motiv nicht beinhaltet, weder ein signifikant stärkeres Axonwachstum, noch die eine erhöhte Bildung axonaler Verzweigungen (Abb. C15). Dies könnte darauf hinweisen, dass das ARTT-Loop (ADP-ribosylating toxin-turn-turn motif) neben seiner Beteiligung an der ADP-Ribosylierungsreaktion und der Substraterkennung (Han *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2004), auch bei der neurotrophen Wirkung von C3^{bot} eine wichtige Rolle spielt. Sicher ist jedoch, dass sich die Sequenz, durch welche die neurotrophe Wirkung vermittelt wird, zwischen den Aminosäuren 154 und 182 befindet.

Diese neurotrophe Wirkung des Peptids C3^{bot}154-182 konnte in einer kürzlich erschienenen Studie von Höltje *et al.* 2008 an primären Hippokampusneuronen gezeigt werden.

Neben C3 aus *Clostridium botulinum* werden der Familie der ADP-Ribosyltransferasen auch die C3-Isoformen aus *Clostridium limosum* (C3^{lim}; Just *et al.*, 1992), aus *Staphylococcus aureus* (C3^{stau}; Wilde *et al.*, 2001) und aus *Bacillus cereus* (C3^{cer}; Just *et al.*, 1995a) zugeordnet, die ebenfalls RhoA, B, und C inaktivieren. Im Gegensatz zu C3^{bot} zeigen C3^{lim} und C3^{stau} keine positive Wirkung auf das Axonwachstum und die Bildung von axonalen Verzweigungen in primären Hippokampusneuronen (Ahnert-Hilger *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen unterstützen nochmals die Hypothese, dass die C3^{bot}-vermittelte neurotrophe Wirkung ein enzym-unabhängiger Effekt ist.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des neurotrophen Fragments C3^{bot}154-211 mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz von C3^{lim} ergab, dass sich C3^{bot}154-211 lediglich in

den vier Aminosäuren A155, A172, M175 und H180 von diesen unterscheidet. Um entscheiden zu können, inwiefern diese vier Aminosäuren essentiell für die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} sind, bedarf es noch weiterer Studien, bei denen u. a. die entsprechenden Aminosäuren durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht werden.

D 3.2 *Ansätze zur Klärung der neurotrophen Wirkung von C3^{bot} auf humane Modell-Neurone*

Es ist bis heute nicht bekannt, über welchen Mechanismus die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} auf terminal differenzierte Neurone vermittelt wird. Fakt ist, dass bereits nanomolare Konzentrationen von C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E174Q ausreichen, um das Axonwachstum und die Verzweigungsbildung in NT2/N-Zellen, sowie in primären Hippokampusneuronen zu fördern (Ahnert-Hilger *et al.*, 2004). Demzufolge sind drei Wirkmechanismen denkbar: 1. C3^{bot} wirkt als Ligand über einen membranständigen Rezeptor. 2. C3^{bot} wirkt nach der Aufnahme auf eine intrazelluläre Struktur. 3. C3^{bot} wirkt indirekt über die Astrozyten, die sich ebenfalls in den Kulturen befinden (Abb. C2).

Für den ersten Mechanismus spricht, dass neurotrophe Effekte von C3^{bot} an primären Hippokampusneuronen nur dann beobachtet werden, wenn C3^{bot} extrazellulär appliziert wird. Die intrazelluläre Expression von C3^{bot} und C3^{bot}E174Q hingegen induziert weder Axonwachstum, noch die Bildung von Verzweigungen (Ahnert-Hilger *et al.*, 2004). Einschränkend muss man jedoch berücksichtigen, dass die intrazelluläre Wirkung von der Lokalisation in einem bestimmten subzellulären Kompartiment abhängen kann. Dies wird nur über die endozytotische Aufnahme gewährleistet, jedoch nicht, wenn C3^{bot} in Neuronen exprimiert wird. Des Weiteren bietet der erste Mechanismus u. a. auch eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Reaktion von NT2- und NT2/N-Zellen auf C3^{bot}E174Q. Die Veränderung der Gen- und Proteinexpression während der neuronalen Differenzierung bedeutet auch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Zelloberflächenproteine. Für Neuronen des *Nervus trigeminus* konnte z. B. gezeigt werden, dass in einem frühen Stadium der embryonalen Entwicklung das Überleben der Zellen von BDNF abhängig ist. In späteren Stadien der Entwicklung hingegen spielt BDNF keine Rolle mehr und das Überleben der Zellen wird durch NGF sichergestellt. Dies bedeutet, dass die Zellen zu Beginn ihrer Entwicklung mehr Trk-B- als Trk-A-Rezeptoren besitzen. Gegen Ende der embryonalen Entwicklung präsentieren die Zellen dann mehr Trk-A- als Trk-B-Rezeptoren (Piñon *et al.*, 1996). Demnach besitzen NT2/N-Zellen möglicherweise einen Rezeptor, an den C3^{bot} binden kann, der erst während oder nach der Differenzierung

exprimiert wird, wodurch die eingangs aufgestellte Hypothese, dass die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} vom Differenzierungsgrad der Neurone abhängt, unterstützt wird. Geht man nun jedoch davon aus, dass NT2- und NT2/N-Zellen den gleichen Rezeptor für C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E74Q besitzen, das enzymdefiziente C3^{bot} jedoch ausschließlich NT2/N-Zellen einen positiven Effekt hat, könnte dies auf die Abwesenheit von intrazellulären Zielstrukturen, bzw. Signalwegen in NT2-Zellen hindeuten, die nur in terminal differenzierten Neuronen vorhanden sind, was für den zweiten Mechanismus sprechen würde. D. h. während der Differenzierung ist eine C3-Zielstruktur entstanden, die auf die Aminosäuresequenz 154-182 von C3^{bot} anspricht und die Enzymaktivität dabei keine Rolle mehr spielt. Denkbar ist auch, dass beide Wege beschritten werden müssen, wobei der Rezeptor die frühe und die intrazelluläre Struktur die lang anhaltende Wirkung vermittelt. Bisher konnte kein putativer Rezeptor, der an der neurotrophischen Wirkung von C3^{bot} beteiligt ist, identifiziert werden und auch keine Sequenzhomologie zwischen dem kleinen neurotrophischen Fragment C3^{bot}154-182 und bisher bekannten neurotrophischen Faktoren gefunden werden.

Ebenso wie der erste ist allerdings auch der zweite Mechanismus ein Beleg für die Hypothese, dass die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} abhängig vom Differenzierungsgrad der Neurone ist. In den vergangenen Jahren haben verschiedene Studien ergeben, dass gliale Zellen, insbesondere jedoch Astrozyten an Entwicklungs- und Verarbeitungsprozessen im Gehirn beteiligt sind. Dabei zeigte sich, dass z. B. Fehlfunktionen von Astrozyten eine mögliche Ursache für neurologische Störungen, wie Epilepsie und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) darstellen (für eine Übersicht: Seifert *et al.*, 2006). Außerdem gibt es immer mehr Hinweise, dass Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen für unterschiedliche Reparaturmechanismen im ZNS von zentraler Bedeutung sind (Polazzi & Contestabile, 2002; Anderson *et al.*, 2003; Silver & Miller, 2004). Schon in der Embryogenese kommen den Astrozyten wichtige Aufgaben bei der neuronalen Entwicklung zu. Dazu zählen die Förderung des Neuritenwachstums (Johansson & Stromberg, 2002; Tomaselli *et al.*, 1988) sowie der neuronalen Differenzierung (Taberner *et al.*, 2001) und Migration (Menet *et al.*, 2000). Experimente von Ullian *et al.* (2001) haben gezeigt, dass die Bildung und Reifung von Synapsen *in vitro* maßgeblich von der Anwesenheit von Astrozyten abhängt. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe belegen, dass die Mehrzahl der Synapsen *in vivo* gleichzeitig mit der Entwicklung der Gliazellen generiert wird, was einen glialen Einfluss auf die Synaptogenese impliziert. In der Regulation der Neurogenese scheinen Astrozyten wichtige Funktionen innezuhaben. So konnte gezeigt werden, dass adulte Astrozyten die Neurogenese aus neuronalen Stammzellen induzieren (Song *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 1999). Durch

Sekretion von neurotrophen Faktoren unterstützen Astrozyten die neuronale Differenzierung von neuronalen Stammzellen (Lachyankar *et al.*, 1997; Spranger *et al.*, 1990; Riley *et al.*, 2004). Der Neuritenauswuchs wird sowohl durch neurotrophe Faktoren (Geschwind *et al.*, 1996), als auch durch die Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin gefördert (Biran *et al.*, 2003; Ard *et al.*, 1993).

Weitere Studien zeigen, dass neben Astrozyten auch Gliazellen die Differenzierung von Neuronen beeinflussen, wenn sie aus derselben Region stammen. Demnach werden beispielsweise die Morphologie und der Neurotransmitterphänotyp von dopaminergen Neuronen im Mittelhirn von Gliazellen aus dem ventralen Mesencephalon reguliert (Denis-Donini *et al.*, 1984; Le Roux & Reh, 1994; Skogh & Campbell, 2003). Zudem setzen Gliazellen unter verschiedenen Umständen ebenfalls neurotrophe Faktoren frei (Nakajima & Kohsaka 2004; Streit 2005). Die Tatsache, dass sowohl Präparationen von primären Hippokampusneuronen, als auch NT2/N-Kulturen etwa zu 20-40% aus glialen Zellen bestehen (Bani-Yaghoub *et al.*, 1999; Sandhu *et al.*, 2002), bildet die Grundlage für die den dritten Mechanismus, der besagt, dass die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} möglicherweise über diese glialen Zellen verursacht wird. Diese Hypothese stützt sich außerdem darauf, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig bestimmt werden konnte, ob C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E174Q von Neuronen und Gliazellen, oder ausschließlich von glialen Zellen aufgenommen wird (Abb. C 22, C 23). In diesem Zusammenhang stellt die Hypothese, dass C3^{bot} die Freisetzung von neurotrophen Faktoren aus Astrozyten, die sich positiv auf das Axonwachstum von Neuronen auswirken, induziert, eine weitere interessante Möglichkeit zur Erklärung des neurotrophen Effekts von C3^{bot} dar.

Demgegenüber stehen kürzlich erschienene Studien, die zwar zeigt, dass C3^{bot} nicht nur eine neurotrophe Wirkung auf Neurone besitzt, sondern auch die Funktion von Gliazellen und Astrozyten beeinflusst. In Astrozyten erhöht C3^{bot} beispielsweise die Aufnahme und Freisetzung von Glutamat (Höltje *et al.*, 2008), wohingegen in Mikroglia durch C3^{bot} proinflammatorische Prozesse in Gang gesetzt werden (Hoffmann *et al.*, 2008). Hierbei ist zu beachten, dass diese Effekte ausschließlich über die ADP-Ribosylierung, d. h. die C3^{bot}-vermittelte Inhibierung des Rho-Signalweges induziert werden. Es wurde jedoch in beiden Publikationen lediglich ein geringer Anteil an Faktoren analysiert, auf die C3^{bot} wirken könnte. Um jedoch einen möglichen Zusammenhang zwischen den Gliazellen, bzw. Astrozyten und C3^{bot} während der neuronalen Morphogenese herzustellen, bedarf es weiterer Studien.

D 4 Eine integrierte Sicht

In den vergangenen Jahren wurden immer mehr Einblicke in die Struktur von C3^{bot}, sowie über dessen Funktion als ADP-Ribosyltransferase und den damit einhergehenden Konsequenzen für die Rho-Signalwege in den jeweiligen Zielzellen gewonnen. Insbesondere die bisher offenen Fragen zur Wirkweise von C3^{bot} unabhängig von seiner ADP-Ribosyltransferase-Aktivität auf dem Gebiet der neuronalen Entwicklung und Regeneration, stellen ein interessantes Feld für weitere Studien dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die neurotrophe Wirkung von C3^{bot} nicht nur auf ein murines System und Zelllinien beschränkt ist, sondern auch auf humane Modell-Neurone übertragen werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass mit Hilfe des NT2/N-Systems die *in vitro* Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen zu humanen Neuronen im Kultursystem untersucht werden kann, ergab sich in dieser Arbeit die Hypothese, dass die enzymunabhängige neurotrophe Wirkung von C3^{bot} entweder vom Differenzierungsstatus der Neurone abhängig ist, oder über die glialen Zellen, welche sich ausschließlich in der NT2/N-Kultur befinden, vermittelt wird. Über die Analyse der Effekte von C3^{bot}, bzw. C3^{bot}E174Q zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung von NT2-Zellen ist es möglich die Abhängigkeit der Wirkung von C3^{bot} vom Differenzierungsstatus der Neurone zu bestimmen. Einen ersten Klärungsansatz zur Relevanz der Astrozyten bezüglich der enzymunabhängigen neurotrophen Wirkung von C3^{bot} stellen Internalisierungs- und Bindungsstudien dar. Wichtig bei diesen Analysen ist eine Charakterisierung der Astrozyten oder Neurone über eine Immunfärbung, die darauf hinweist, ob C3^{bot} von Astrozyten und Neuronen gleichermaßen aufgenommen wird, oder ob C3^{bot} bevorzugt an einen der beiden Zelltypen bindet und internalisiert wird.

Mit Hilfe einer Co-Kultivierung von NT2-Zellen und Astrozyten, lässt sich die Hypothese verifizieren, dass die enzymunabhängige neurotrophe Wirkung von C3^{bot} über Astrozyten, bzw. andere gliale Zellen vermittelt wird.

Zusammengefasst bilden die Ergebnisse dieser Arbeit eine sehr gute Grundlage, um eine mögliche medizinische Relevanz von C3^{bot} hinsichtlich einer positiven Wirkung bei Rückenmarks- oder Hirnverletzungen mit Hilfe des humanen neuronalen Modellsystems zu analysieren.

E Literatur

- Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brener HR and Caroni P (1995) Overexpression of the neural growth-associated protein GAP43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* **83**: 269-278
- Aigner L and Caroni P (1995) Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP43-depleted growth cones. *J Cell Biol* **128**: 647-660
- Ahnert-Hilger G, Hölting M, Große G, Pickert G, Mücke C, Nixdorf-Weiler B, Boquet P, Hofmann F and Just I (2004) Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem* **90**: 9-18
- Aktories K and Frevert J (1987) ADP-ribosylation of a 21-24 kDa eukaryotic protein(s) by C3, a novel botulinum ADP-ribosyltransferase, is regulated by guanine nucleotide. *J. Biochem.* **247**: 363-368
- Aktories K, Rosener S, Blaschke U and Chatwal GS (1988) Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *Eur J Biochem* **172**: 445-450
- Aktories K and Just I (1993) GTPases and Actin as Targets for Bacterial Toxins. In: Dickey BF, Birnbaumer L (Hrsg.) GTPases in biology I. *Springer*, Berlin: 87-112
- Aktories K, Barth H, and Just I (2000) *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme and C3-like transferases. In K. Aktories and I. Just (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 245 *Bacterial Protein Toxins*, Springer, Berlin: 207-233
- Aktories K (2000) Bacterial protein toxins as tools in cell biology and pharmacology. In: Cossart P., Boquet P., Normark S., Rappuoli S. (eds) *Cellular microbiology*. ASM Press, Washington: 221-237
- Alberts AS (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* **276**(4): 2824-2830
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002) Molecular biology of the Cell, *Fourth Edition*, New York, Garland Science, a member of the aylor & Francis Group
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**(34): 20246-20249
- Amano M, Chihara K, Nakamura N, Fukata Y, Yano T, Shibata M, Ikebe M and Kaibuchi K (1998) Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes Cells* **3**: 177-188
- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS and Nilsson M (2003) Astrocytes and stroke: Networking for survival? *Neurochem Res* **28**: 293-305

-
- Aoki K, Nakamura T and Matsuda M (2004) Spatio-temporal Regulation of Rac1 and Cdc42 Activity during Nerve Growth Factor-induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *J. Bio. Chem* **279** (1): 713-719
- Ard M.D, Schachner M, Rapp JT and Faissner A (1993) Growth and degeneration of axons on astrocyte surfaces: effects on extracellular matrix and on later axonal growth. *Glia* **9**: 248-259
- Aspenström P, Fransson A and Saras J (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *J Biochem* **377**(2): 327-337
- Arimura N and Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **8**: 194-205
- Bani-Yaghoob M, Felker JM and Naus CC (1999) Human NT2/D1 cells differentiate into functional astrocytes. *Neuroreport* **10**: 3843-3846
- Barth H, Preiss J C, Hofmann F and Aktories K (1998) Characterization of the catalytic site of the ADP-ribosyltransferase *Clostridium botulinum* C2 toxin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **273**: 29506-29511
- Bertrand J, Di Polo A and McKerracher L (2007) Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol Dis* **25**(1): 65-72
- Bertrand J, Winton MJ, Rodriguez-Hernandez N, Campenot RB and McKerracher L (2005) Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats. *J Neurosci* **25**(5): 1113-1121
- Biedler JL, Helson L and Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* **33**: 2643-2651
- Biran R, Noble MD and Tresco PA (2003) Directed nerve outgrowth is enhanced by engineered glial substrates. *Exp Neurol* **184**: 141-152
- Bishop NE (1997) An Update on Non-clathrin-coated Endocytosis. *Rev Med Virol* **7**: 199-209
- Boguski MS and McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366** (6456): 643-54
- Bokoch GM and Der CJ (1993) Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J.* **7**(9): 750-759
- Boquet P, Munro P, Fiorentini C and Just I (1998) Toxins from anaerobic bacteria: specificity and molecular mechanisms of action. *Curr Opin Microbiol* **1**: 66-74
- Bourne HR, Wrischnik L and Kenyon C (1990) Ras Proteins: Some signal developments. *Nature* **348**: 678-679
-

-
- Bourne HR, Sanders DA and McCormick F (1991) The Ras Superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349** (6305): 117-127
- Bowman EJ, Siebers A and Altendorf K (1988) Bafilomycin: a class of inhibitors of membrane ATPases for microorganisms, animal cells, and plant cells. *PNAS* **85**: 7972-7976
- Brabeck C, Beschoner R, Conrad S, Mittelbronn M, Bekure K, Meyermann R, Schluesener HJ and Schwab JM (2004) Lesional Expression of RhoA and RhoB following Traumatic Brain Injury in Humans. *J Neurotrauma* **21**(6): 697-706
- Brandt R (1998) Cytoskeletal mechanisms of axon outgrowth and pathfinding. *Cell Tissue Res.*, **292**: 181-189
- Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff, MR, Rubin EJ and Gill DM (1989) The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *Embo J* **8**: 1087-1092
- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM and Schwartz MA (1994) The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**(3): 507-513
- Collier RJ (2001) Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* **39**: 1793-1803
- Cook DG, Lee VM-Y and Doms R (1994) Expression of foreign proteins in a human neuronal system. In *Protein expression in animal cells*. M.G. Roth, (eds). Academic Press, San Diego: 289-303
- Conner SD and Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37-44
- Coso O A, Chiarello M, Yu J-C, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Mild T and Gutkind JS (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146
- Cox EA, Sastry SK und Huttenlocher A (2001) Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell* **12**: 265-277
- Craig AM and Banker G (1994) Neuronal Polarity. *Ann. Rev. Neurosci.* **17**: 267-310
- Da Silva JS and Dotti CG (2002) Breaking the neuronal sphere: Regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci* **3**: 694-704
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W and Dotti CG (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J Cell Biol* **162**: 1267-1279
- Denis-Donini S, Glowinski J and Prochiantz A (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* **307**: 641-643
-

-
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD and McKerracher L (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* **22**: 6570-6577
- Dinges MM, Orwin PM and Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**: 16-34
- Dubreuil CI, Winton MJ and McKerracher L (2003) Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol* **162**: 233-243
- Dumas JJ, Merithew E, Sudharshan E, Rajamani D, Hayes S, Lawe D, Corvera S and Lambright DG (2001) Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol. Cell* **8**: 947-958
- Dotti CG and Banker GA (1987) Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* **330**: 254-256
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM and Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* **1**(5): 253-259
- Ellezam B, Dubreuil C, Winton M, Loy L, Dergham P, Sellés-Navarro I and McKerracher L (2002) Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration. *Prog Brain Res* **137**: 371-380
- Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C and Comella JX (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* **75**(3): 991-1003
- Etienne-Manneville S and Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**(6916): 629-635
- Fischer D, Petkova V, Thanos S and Benowitz LI (2004) Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci* **24**(40): 8726-8740
- Fournier AE, Takizawa BT and Strittmatter SM (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* **23**(4): 1416-1423
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S and Deretic V (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest *J Cell Biol* **154**: 631-644
- Fritz G, Kaina B and Aktories K (1995) The Ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate - early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* **270**: 25172-25177

-
- Fujihara H, Walker LA, Gong MC, Lemichez E, Boquet P, Somlyo AV and Somlyo AP (1997) Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell* **8**: 2437-2447
- Fujita A, Hattori Y, Takeuchi T, Kamata Y and Hata F (2001) NGF induces neurite outgrowth via a decrease in phosphorylation of myosin light chain in PC12 cells. *Neuroreport* **12**: 3599-3602
- Geisler N, Plessmann U and Weber K (1985) The complete amino acid sequence of major mammalian neurofilament protein (NF-L). *FEBS Lett* **182**: 475-478
- Gemmell CG (1995) Staphylococcal scalded skin syndrome. *J Med Microbiol* **43**(5): 318-327
- Genth H, Gerhard R, Maeda A, Amano M, Kaibuchi K, Aktories K and Just I (2003) Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J Biol Chem* **278**: 28523-28527
- Gerhard R, Tatge H, Genth H, Thum T, Borlak J, Fritz G and Just I (2005) Clostridium difficile toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. *J Biol Chem* **280**: 1499-1505
- Geschwind MD, Hartnick CJ, Liu W, Amat J, Van De Water TR and Federoff HJ (1996) Defective HSV-1 vector expressing BDNF in auditory ganglia elicits neurite outgrowth: model for treatment of neuron loss following cochlear degeneration. *Hum Gene Ther* **7**: 173-182
- Govek EE, Newey SE and Van Aelst L (2005) The role of Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development* **19**: 1-49
- Goslin K and Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* **108**: 1507-1516
- Goslin K and Banker GA (1991) Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: Banker GA, Goslin K and editors, Culturing nerve cells. MIT Press, Cambridge, Mass.: 251-281
- Greene LA, Tischler AS (1982) PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. In: *Advances in cellular neurobiology* (Federoff S. Hertz L. eds). Academic, New York: 373-414
- Hall ZW with 11 contributors (1992) An introduction to molecular neurobiology. *Sinauer Associates, Inc. Publishers*, Sunderlands, MA
- Hall A (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Ann Rev Cell Biol* **10**: 31-54
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514
- Hall A (2000) GTPases *Oxford University press*. USA.
-

-
- Hall A and Nobes CD (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 965-970
- Han S, Craig JA, Putnam CD, Carozzi NB and Tainer JA (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat Struct Biol* **6**: 932-936
- Han S, Arvai AS, Clancy SB and Tainer JA (2001) Crystal structure and novel recognition motif of rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum*: structural insights for recognition specificity and catalysis. *J Mol Biol* **305**: 95-107
- Han S and Tainer JA (2002) The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADPribosyltransferases. *Int J Med Microbiol* **291**: 523-529
- He X, Skapek SX, Wikstrand CJ, Friedman HS, Trojanowski JQ, Kemshead JT, Coakham HB, Bigner SH and Bigner DD (1989) Phenotypic analysis of four human medulloblastoma cell lines and transplantable xenografts. *J Neuroathol Exu Neural* **48**: 48-68
- He Q, Dent EW and Meiri KF (1997) Modulation of actin filament behaviour by GAP43 neuromodulin is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J Neurosci* **17**: 3515-3524
- Heidemann SR (1996) Cytoplasmic mechanisms of axonal and dendritic growth in neurons. *Int Rev Cytol* **165**: 235-296
- Hill CS, Wynne J and Treisman R (1995) The rho family GTPases RhoA, Rac and Cdc42 regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**:1159-1170
- Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H and Narumiya S (1998) Molecular dissection of the Rhoassociated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol* **141**: 1625-1636
- Höltje M, Hofmann F, Lux R, Veh RW, Just I and Ahnert-Hilger G (2008) Glutamate uptake and release by astrocytes are enhanced by *Clostridium botulinum* C3 protein. *J Biol Chem* **283**(14): 9289-9299
- Hoffman A, Hofmann F, Just I, Lehnhardt S, Hanisch UK, Brück W, Kenntenmann H, Ahnert-Hilger G and Höltje M (2008) Inhibition of Rho-dependent pathways by *Clostridium botulinum* C3 protein induces a proinflammatory profile in microglia. *Glia* **56**(11): 1162-1175
- Hoffman PN and Lasek RJ (1975) The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* **66**: 351-366
-

-
- Hoffman PN, Cleveland DW, Griffin JW, Landes PW, Cowan NJ and Price DL (1987) Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *PNAS USA* **84**: 3472-3476
- Holstein SA, Wohlford-Lenane CL and Hohl RJ (2002) Consequences of mevalonate depletion. Differential transcriptional, translational, and post-translational up-regulation of Ras, Rap1a, RhoA, AND RhoB. *J Biol Chem* **277**: 10678-10682
- Honjo T, Nishizuka Y and Hayaishi O (1968) Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphateribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis *J Biol Chem* **243**: 3553-3555
- Huelsbeck J, Dreger S, Gerhard R, Barth H, Just I and Genth H (2007) Difference in the cytotoxic effects of toxin B from *Clostridium difficile* strain VPI 10463 and toxin B from variant *Clostridium difficile* strain 1470. *Infect Immun* **75**(2): 801-809
- Ishizaki T, Uheata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M and Narumiya S (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinase. *Mol Pharm* **57**: 976-983
- Jaffe AB and Hall A (2005) Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-269
- Jahner D and Hunter T (1991) The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* **11**(7): 3682-3690
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S and Moolenaar WH (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP-ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* **126**(3): 801-810
- Johansson S and Stromberg I (2002) Guidance of dopaminergic neuritic growth by immature astrocytes in organotypic cultures of rat fetal ventral mesencephalon. *J Comp Neurol* **443**: 237-249
- Johnson GV and Jope RS (1992) The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res* **33**(4): 505-12
- Just I, Mohr C, Schallehn G, Menard L, Didsbury JR, Vandekerckhove J, van Damme J and Aktories K (1992) Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*. *J Biol Chem* **267**: 10274-10280
- Just I, Selzer J, Jung M, van Damme J, Vandekerckhove J and Aktories K (1995a) Rho-ADP-ribosylating exoenzyme from *Bacillus cereus*. Purification, characterization, and identification of the NAD-binding site. *Biochemistry* **34**: 334-340
- Just I, Selzer J, Wilm, M, von Eichel-Streiber C, Mann M and Aktories K (1995b) Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**: 500-503

-
- Just I, Hofmann F, Genth H and Gerhard R (2001) Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int J Med Microbiol* **291**: 243-250
- Kamata Y and Hattori Y (2007) Neural differentiation of human neuroblastoma GOTO cells via a Rho-Rho kinase-phosphorylation signal transduction and continuous observation of a single GOTO cell during differentiation. *J Vet Med Sci* **69**(1): 37-42
- Kandel ER, Schwarz JH and Jessel TM (2000) *Principles of neural science* (Fourth Edition), Mc Graw Hill Health, New York
- Kaplan MP, Chin SS, Fliegner KH and Liem RK (1990) Alpha-internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *J Neurosci* **10**: 2735-2748
- Katoh H, Aoki J, Ichikawa A and Negishi M (1998a) p160 RhoA-binding kinase ROK α induces neurite retraction. *J Biol Chem* **273**: 2489–2492
- Katoh H, Aoki J, Yamaguchi Y, Kitano Y, Ichikawa A and Negishi M (1998b) Constitutively active G α 12, G α 13, and G α q induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J Biol Chem* **273**: 28700–28707
- Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G and Brandt R (1996) Tau binds to the distal axon early in the development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci* **16**: 5583-5592
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu K and Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**: 245-248
- Kleppner SR., Robinson KA, Trojanowski JQ, and Lee VM (1995) Transplanted human neurons derived from a teratocarcinoma cell line (NTera-2) mature, integrate, and survive for over 1 year in the nude mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **357**: 618–632
- Komagome R (1994) Effects of Botulinum ADP-ribosyltransferase (Exozyme C3) on neural cells. *Jpn J Vet Res* **42**: 44
- Komagome R, Shuto B, Moriishi K, Kimura K and Saito M. (1999) Neuronal and glial differentiation of neuroblastoma and glioma cells by Rho inhibitory bacterial exoenzyme C3. *Neuropathology* (19): 288-293
- Kozma R, Ahmed S, Best A and Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**: 1942-1452
- Kozma R, Sarnier S, Ahmed S and Lim L (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodeling: Relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* **17** (3): 1201-1211
-

-
- Kranenburg O, Poland M, Gebbink M, Oomen, L and Moolenaar WH (1997) Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *J Cell Sci* **110** (19): 2417-2427
- Lachyankar MB, Condon PJ, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Recht LD and Ross AH (1997) Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF. *Exp Neurol* **144**: 350-60
- Lamoureux P, Altun-Gultekin ZF, Lin C, Wagner JA and Heidemann SR (1997) Rac is required for growth cone function but not neurite assembly. *J Cell Sci* **110**: 635-641
- Laplante I, Paquin J and Beliveau R (2001) RhoB expression is induced after the transient upregulation of RhoA and Cdc42 during neuronal differentiation and influenced by culture substratum and microtubule integrity. *Developmental Brain Research* **129**: 157-168
- Llanes C, Collman RG, Hrin R and Kolson DL (1995) Acetylcholinesterase expression in Ntera2 human neuronal cells: a model for developmental expression in the nervous system. *J Neurosci Res* **42**: 791-802
- Lees JF, Shneidman PS, Skuntz SF, Carden MJ and Lazzarini RA (1988) The structure and organisation of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. *EMBO J* **7**: 1947-1955
- Leger JG, Brandt R and Lee G (1994) Identification of tau protein regions required for process formation. *J Cell Sci* **107**: 3403-3412
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G and McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci* **19**(17): 7537-7547
- Lendahl U, Zimmerman L and McKay R (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate protein. *Cell* **60**: 585-595
- Lendahl U and McKay RDG (1990) The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci* **13**: 132-137
- Le Roux PD and Reh TA (1994) Regional differences in glial-derived factors that promote dendritic outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *J Neurosci* **14**(8): 4639-55
- Leung T, Manser E, Tan L and Lim L (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* **270**(49): 29051-29054
- Levy E, Liem R., D'Eustachio P and Cowan NJ (1987) Structure and evolutionary origin of the gene encoding mouse NF-M, the middle-molecular-mass neurofilament protein. *Eur J Biochem* **166**: 71-77
-

-
- Li X, Saint-Cyr-Proulx E, Aktories K and Lamarche-Vane N (2002) Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho-kinase activity are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **277**: 15207-15214
- Lin C-H, Thompson CA and Forscher P (1994) Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility. *Current Biol* **4**: 640-647
- Linsemann DA and Loucks FA (2008) Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci* **13**: 657-676
- Locht C and Antonie R (1997) Pertussis Toxin. In: Aktories K (Hrsg.) Bacterial Toxins. *Tools in Cell Biology and Pharmacology*. Chapman & Hall, London: 33-45
- Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell JE (2001) Molekulare Zellbiologie *Spektrum Akad. Verl.* 4. Aufl.: 813-911
- Lüdemann N, Clement A, Hans VH, Leschik J, Behl C and Brandt R (2005) O-gluco-sylation of the tail domain of neurofilament protein M in human neurons and in spinal cord tissue of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Biol Chem* **280**(36): 31648-31658
- Luo L, Jan LY and Jan YN (1997) Rho family GTP-binding proteins in growth cone signaling. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 81-86
- Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* **1**: 173-180
- Luo, L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural Plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 601-635
- Machesky LM and Hall A (1997) Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* **138**: 913-926
- Mack TGA, Koester M and Pollerberg GE (2000) The microtubule-associated protein MAB1 is involved in local stabilization of turning growth cones. *Mol Cell Neurosci* **15**: 51-65
- Mackay DJ and Hall A (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem.* **273**: 20685-20688
- Madaule P and Axel R (1985) A novel ras-related gene family. *Cell* **41**: 31-40
- Marler KJ, Kozma R, Ahmed S, Dong JM, Hall C and Lim L (2005) Outgrowth of neurites from N1E-115 neuroblastoma cells is prevented on repulsive substrates through the action of PAK. *Mol Cel Biol* **25**(12): 5226-5241
- Martin GR (1980) Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* **209**: 768-776

-
- Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A and Kaibuchi K (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO* **15**(9): 2208-16
- McKerracher L (2001) Spinal cord repair: strategies to promote axon regeneration. *Neurobiol Dis* **8**: 11-18
- Menet V, Gimenez Y, Ribotta M, Sandillon F and Privat A (2000) GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia* **31**: 267-272
- Menetrey J, Flatau G, Stura EA, Charbonnier JB, Gas F, Teulon JM, Le Du MH, Boquet P and Menez A (2002) NAD binding induces conformational changes in Rho ADP ribosylating *clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J Biol Chem* **277**: 30950-30957
- Miyazono M, VM Lee and Trojanowski JQ (1995) Proliferation, cell death, and neuronal differentiation in transplanted human embryonal carcinoma (NTera2). cells depend on the graft site in nude and severe combined immunodeficient mice. *Lab Invest* **73**: 273-283
- Miki H, Suetsugu S, Takenawa T (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO* **17**(23): 6932-41.
- Molinari G, Rohde M, Wilde C, Just I, Aktories K and Chhatwal, GS (2006) Localization of the C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* during bacterial invasion of mammalian cells. *Inf Immun* **74**: 3673-3677.
- Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP and Toh BH (1995) EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* **270**: 13503-13511.
- Mukherjee S, Ghosh RN and Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* **77**: 759-803
- Nakajima K and Kohsaka S (2004) Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Hematol Disord* **4**(1): 65-84
- Nakayama AY, Harms MB and Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **20**: 5329-5338
- Napolitano EW, Chin SS, Colman DR and Liem RK (1987) Complete amino acid sequence and the in vitro expression of rat NF-M, the middle molecular weight neurofilament protein. *J Neurosci* **7**: 2590-2599
- Naslavsky N, Weigert R and Donaldson JG (2003) Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* **14**: 417-431
-

-
- Nemoto Y, Namba T, Kozaki S and Narumiya S (1991) *Clostridium botulinum* C3 ADP-ribosyltransferase gene: Cloning, sequencing, and expression of a functional protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 19312-19319
- Nichols BJ and Lippincott-Schwartz J (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**: 406-412
- Nishiki, T, Narumiya S, Morii N, Yamamoto M, Fujiwara M, Kamata Y, Sakaguchi G and Kozaki S (1990) ADP-ribosylation of the Rho/Rac proteins induces growth inhibition, neurite outgrowth and acetylcholine esterase in cultured PC12-cells. *Biochem Biophys Res Comm* **167**(1): 265-272
- Nobes CD and Hall A (1995a) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibres, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62
- Nobes CD and Hall A (1995b) Rho, Rac and Cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion, and motility. *Biochem Soc Trans* **23**: 456-459
- Nobes C and Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144** (6): 1235-1244
- Nusser N, Gosmanova E, Zheng Y and Tigyi G (2002) Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* **277**: 35840-35846
- Olenik C, Barth H, Just I, Aktories A and Meyer DK (1997) Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1, and Cdc42 in adult rat brain. *Mol Brain Res* **52**, 263-269
- Olson M F, Asworth H and Hall A (1995) An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**: 1270-1272
- Ott C, Iwanciw D, Graness A, Giehl K, and Goppelt-Struebe M (2003) Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem* **278**: 44305-44311
- Pan J, Kao Y-L, Joshi S, Jeetendran S, DiPette D and Singh US (2005) Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase *in vivo*: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **93**: 517-583
- Paterson, HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K and Hall A (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* **111**: 1001-1007
- Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G and Popoff MR (1997a) Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* **65**: 1402-1407

-
- Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R and Rodriguez-Boulan E (2005) Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol* **17**: 423-434
- Pilpel Y and Segal M (2004) Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac1 and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci* **19**: 3151-3164
- Pinoñ LGP, Minichiello L, Klein R and Davies AM (1996) Timing of neuronal death in trkA, trkB and trkC mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signalling. *Development* **122**: 3225-3261
- Pleasure SJ, Page C and Lee VM-Y (1992) Pure, postmitotic, polarized human neurons from NTera2 cells provide a system for expressing exogenous protein in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* **12**(5): 1802-1815
- Pleasure SJ, Page C and Lee VM-Y (1993) NTera2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res* **35**: 585-602
- Polazzi E, Contestabile A (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Rev Neurosci* **13**: 221-242
- Popoff MR and Boquet P (1988) Clostridium spiroforme toxin is a binary toxin which ADPribosylates cellular actin. *Biochem Biophys Res Commun* (152): 1361-1368
- Popoff MR, Hauser D, Boquet P, Eklund MW and Gill DM (1991) Characterization of the C3 gene of *Clostridium botulinum* types C and D and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **59**: 3673-3679
- Prochiantz A (1995) Neuronal Polarity: Giving Neurons Heads and Tails, *Neuron* **15**, 743-746
- Ramakers GJ (2002) Rho-proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* **25**: 191-199
- Ridley AJ and Hall A (1992) The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389-99.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D and Hall A (1992) The small GTPbinding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401- 410
- Ridley AJ (1996) Rho: theme and variations. *Curr Biol* **6**: 1256-1264
- Riley CP, Cope TC and Buck CR (2004) CNS neurotrophins are biologically active and expressed by multiple cell types. *J Mol Histol* **35**: 771-783
- Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Nurmahomed K, Owen D, Laue E, Gamblin S J and Smerdon SJ (1997a) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* **388** (6643): 693-697

-
- Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Smerdon SJ and Gamblin SJ (1997b) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* **389** (6652): 758-762
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T and Kirschner MW (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**(2): 221-231
- Sahai E, Ishizaki T, Narumiya S and Treisman R (1999) Transformation mediated by RhoA requires activity of ROCK kinases. *Curr Biol* **9**: 136-145
- Sander EE, Ten Klooster JP, Van Delft S, Van Der Kammen RA and Collard JG (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behaviour. *J Cell Biol* **29**: 1009-1021
- Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM and de Lanerolle P (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**(5410): 2083-2085
- Sandhu JK, Sikorska M and Walker PR (2002) Characterization of Astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells. *J Neurosci Res* **68**: 604-614
- Sarner S, Kozma R, Ahmed S and Lim L (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* **20**(1): 158-172
- Schwamborn JC and Puschel AW (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* **7**: 923-929
- Schwamborn JC, Li Y and Puschel AW (2006) GTPases and the control of neuronal polarity. *Methods Enzymol* **406**: 715-727
- Sebok A, Nusser N, Debreceni B, Guo Z, Santos MF, Szeberenyi J and Tigyi G (1999) Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells. *J. Neurochem.* **73**: 949-960
- Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E and Aktories K (1998) Glucosylation and ADP-ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* **37**: 5296-5304
- Seifert G, Schilling K and Steinhäuser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* **7**(3): 194-206
- Sekine A, Fujiwara M and Narumiya S (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **264**: 8602-8605
- Sells MA, Knaus UG, Bagrodia S, Ambrose DM, Bokoch GM and Chernoff J (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* **7**(3): 202-210
- Shall S (1995) ADP-ribosylation reactions. *Biochemie* **77**: 313-318
-

-
- Silver J and Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* **5**:146–156
- Simpson LL, Stiles BG, Zepeda H and Wilkins TD (1989) Production by *Clostridium* spiroforme of an Iotalike Toxin That Possesses Mono(ADP-ribosyl)transferase Activity: Identification of a Novel Class of ADP-Ribosyltransferases. *Infect Immun* **57**: 255-261
- Skogh C and Campbell K (2003) Homotopic glial regulation of striatal projection neuron differentiation. *Neuroreport* **14**(7): 1037-40
- Song H, Stevens CF and Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**: 39-44
- Spinella MJ, Freemantle SJ, Sekula D, Chang JH, Christie AJ and Dmitrovsky E (1999) Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *J Biol Chem* **274**: 22013–22018
- Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Naher-Noe M, and Thoenen H (1990) Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: Comparison between the effects of Interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and in vivo. *Eur J Neurosci* **2**: 69-76
- Streit WJ (2005) Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* **48**(2): 234-239
- Sugai M, Enomoto T, Hashimoto K, Matsumoto K, Matsuo Y, Ohgai H, Hong YM, Inoue S, Yoshikawa K and Suginaka H (1990) A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **173**: 92-98
- Sun J, Maresso AW, Kim JJ and Barbieri JT (2004) How bacterial ADP-ribosylating toxins recognize substrates. *Nat Struct Mol Biol* **9**: 868-876
- Symons M and Settleman J (2000) Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* **10**(10): 415-419
- Taberner A, Lavado EM, Granda B, Velasco A, Medina JM (2001) Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* **79**: 606-616
- Takai Y, Sasaki T and Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**(1): 153-208
- Tashiro A, Minden A and Yuste R (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the Rho-family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* **10**: 927-938
- Temple S (1990) Characteristics of cells that give rise to the central nervous system. *J Cell Sci* **97**(2):212-218
-

-
- Thompson MA and Ziff EB (1989) Structure of the gene encoding peripherin, an NGF-regulated neuronal-specific type III intermediate filament protein. *Neuron* **2**: 1043-1053
- Tigyi G, Fischer DJ, Sebök A, Yang C., Dyer DL and Miledi R (1996b) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca⁺⁺ signaling and Rho. *J Neurochem* **66**: 537-548
- Tomaselli KJ, Neugebauer KM, Bixby JL, Lilien J and Reichardt LF (1988) N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron* **1**: 33-43
- Trapp T, Olah L, Hölker I, Basselmann M, Tiesler C, Maeda T and Hossmann KA (2001) GTPase RhoB: an early predictor of neuronal death after transient focal ischemia in mice. *Mol Cell Neurosci* **17**: 883–894
- Tsuge H, Nagahama M, Nishimura H, Hisatsune J, Sakaguchi Y, Itogawa Y, Katunuma N and Sakurai J (2003) Crystal structure and site-directed mutagenesis of enzymatic components from *Clostridium perfringens* iota-toxin. *J Mol Biol* **325**: 471-483
- Tucker RP (1990) The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Res* **15** (2): 101-120
- Ueda K and Hayaishi O (1985) ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem* **54**: 73-100
- Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, Yamamoto J and Takai Y (1990). 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* **265**(16): 9373-9380
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS and Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* **291**: 657-661
- Vale RD, Banker G and Hall ZW (1992) *The neural cytoskeleton*. In *An introduction molecular neurobiology* Z. W. Hall, editors. Sinauer, Sunderland: 247-280
- Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A and Sander C (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved aminoacids. *Biochemistry* **30**: 4637-4648
- van Aelst L and D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* **11**: 2295-322.
- Vogelsgesang M, Pautsch A and Aktories K (2007) C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **374**(5-6):347-360
- Vogelsgesang M, Stieglitz B, Herrmann C, Pautsch A, and Aktories K (2008) Crystal structure of the *Clostridium limosum* C3 exoenzyme. *FEBS Lett* **582**(7):1032-1036

-
- Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T, and Arenas E (1999) Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1- overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* **17**: 653-659
- Wennerberg K and Der CJ (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**: 1301-1312
- Wiegers W, Just I, Muller H, Hellwig A, Traub P and Aktories K (1991) Alteration of the cytoskeleton of mammalian cells cultured in vitro by *Clostridium botulinum* C2 toxin and C3 ADP-ribosyltransferase. *Eur J Cell Biol* **54**: 237-245
- Wilde C, Genth H, Aktories K and Just I (2000) Recognition of RhoA by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J Biol Chem* **275**: 16478-16483
- Wilde C, Chhatwal GS, Schmalzing G, Aktories K and Just I (2001) A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem* **276**: 9537-9542
- Wilde C., Barth H, Sehr P, Han L, Schmidt M, Just I and Aktories K (2002a) Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA. *J Biol Chem* **277**: 14771-14776
- Wilde C, Just, I and Aktories K (2002b) Structure-function analysis of the Rho-ADPribosylating exoenzyme C3stau2 from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **41**: 1539-1544
- Wilde C, Vogelsgesang M and Aktories K (2003) Rho-specific *Bacillus cereus* ADPribosyltransferase C3cer cloning and characterization. *Biochemistry* **42**: 9694-9702
- Wilson BA and Collier RJ (1995) Diphtheria toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: active-site structure and enzymic mechanism. *Curr Top Microbiol Immunol* **175**: 27-41
- Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K and Negishi M (2001) RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **276**: 18977-18983
- Yamamoto M, Marui N, Sakai T, Morii N, Kozaki S, Ikai K, Imamura S and Narumiya S (1993) ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**: 1449-1455
- Zhang GF, Patton WA, Moss J and Vaughan M (1997) Cholera Toxin: Mechanism of Action and Potential Use in Vaccine Development. In: Aktories K (Hrsg.) Bacterial Toxins. Tools in *Cell Biology and Pharmacology*. Chapman & Hall, London: 1-13

F Anhang

Zusammenstellung der Einzelwerte der durchgeführten Experimente

F 1 Experimente C 1. 1: Quantitative Analyse der Zellausläuferbildung nach Behandlung mit C3^{bot}

Prozentualer Anteil der Zellen mit Zellausläufern bezogen auf die Gesamtzellzahl pro Experiment.

1. Konzentrationsabhängigkeit

Experiment	1	2	3
3 nmol/L	6,1 %	5,5 %	7,1 %
10 nmol/L	10,9 %	12 %	11,3 %
30 nmol/L	19,3 %	20,2 %	22,8 %
100 nmol/L	33,6 %	32,5 %	33,5 %
300 nmol/L	50,4 %	51,9 %	48,5 %
1000 nmol/L	77 %	76,4 %	79,6 %
3000 nmol/L	79,3 %	79,6 %	83 %

2. Zeitabhängigkeit

Experiment	1	2	3
0 h	4,8 %	3,9 %	5,2 %
3 h	3,7 %	5,3 %	5,1 %
6 h	11,3 %	10,9 %	11,2 %
9 h	16,4 %	17,1 %	15,7 %
12 h	21,2 %	20,4 %	21,4 %
24 h	47,1 %	51,2 %	49,9 %
0 h	4,8 %	3,9 %	5,2 %

F 2 Experimente C3. 2: Quantitative Analyse des Axonwachstums in NT2/N-Zellen nach 24 h

Einzelwerte der gemessenen Axonlängen pro Bedingung angegeben in μm .

24 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	140,61	153,54	120,45	153,89	138,64	133,32
	25,66	44,65	135,21	105,99	94,7	84,24
	56,12	215,64	68,46	202,41	97,92	97,23
	166,9	168,26	69,33	164,9	126,45	87,54
	68,7	96,52	103,05	87,89	95,47	143,37
	104,47	69,19	143,51	366,94	196,26	98,14
	60,27	101,31	113,3	89,6	156,66	73,95
	138,12	126,56	137,2	193,43	116,14	101,77
	165,72	92,53	113,26	74,48	76,19	141,71
	46,4	279,82	177,14	199,4	84,33	91,05
	109,62	97,63	99,7	139,78	53,93	90,49
	53,55	108,29	101,77	149,75	129,06	95,84
	112,34	85,5	85,79	59,87	66,07	102,71
	39,14	113,01	83,18	82,3	62,69	120,01
	127,3	81,12	56,28	126,01	70,84	100,71
	95,45	108,7	63,09	155,89	74,92	87,48
	81,09	138,01	125,31	204,69	148,01	91,31
	65,74	116,25	107,15	51,1	278,49	103,4
	126,5	91,63	83,14	246,8	84,29	127,61
	34,44	86,85	68,67	218,03	60,42	70,31
	282,03	56,1	83	176,56	141,2	113,6
	146,8	66,22	98,38	144,6	220,69	82,87
	145,31	93,42	64,26	190,15	119,52	67,82
	83,58	89,76	99,91	161,94	62,1	58,09
	92,77	68,05	68,55	170,21	122,26	90,1
	152,75	157,08	126,52	268,09	199,34	133,44
	114,3	117,15	63,4	88,52	88,17	68,45
	91,62	114,79	155,85	71,92	95,26	130,96
	104,65	86,75	166,92	233,06	63,09	94,1
	120,24	234,13	109,17	69,51	172,5	85,78
	43,78	89,8	122,29	158,86	71,93	164,65
	79,42	82,74	136,91	89,13	109,16	104,38

118,23	97,33	59,47	56,85	177,55	78,38
92,1	140,82	117,87	139,06	137,81	115,86
247,66	155,88	84,58	230,9	120,65	119,76
126,2	67,73	143,03	165,66	124,92	87,17
141,48	69,4	131,66	76,43	111,58	81,97
88,18	125,55	76,57	100,61	164,16	122,77
117,46	68,54	118,22	248,4	103,09	174,94
105,78	88,05	108,27	101,04	49,21	131,59
58,38	220,96	189,28	88,07	229,25	76,45
179,54	101,82	91,46	188,24	128,6	151,62
104,18	79,33	98,45	72,02	170,02	91,19
108,65	115,91	100,67	146,48	91,08	59
104,35	174,08	104,06	99,03	104,66	101,88

24 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	277,29	121,97	94,43	194,27	84,63	68,23
	46,64	160,39	298,05	86,95	100,74	100,15
	73,11	71,96	74,16	111,06	104,44	148,9
	72,02	119,8	104,5	204,18	78,8	146,21
	196,03	138,78	129,81	63,95	124,26	116,78
	32,89	127,64	70,18	122,02	102,14	109,46
	114,5	119,41	83,5	106,63	110,12	113,55
	116,3	161,83	86,33	292,29	157,25	174,51
	76,26	144,92	152,1	134,52	60,78	120,87
	104,41	61,78	114,87	208,22	124,61	68,12
	228,53	81,4	89,25	105,1	97,24	117,76
	44,71	78,83	107,52	120,49	109,46	149,08
	182,8	78,2	89,92	115,32	115,48	113,25
	219,85	129,88	77,58	116,09	165,24	122,44
	103,74	63,09	139,59	143,37	133,97	217,33
	131	97,47	206,78	101,15	224,3	104,68
	156,87	138,57	121,37	98,57	100,89	193,07
	180,58	64,2	79,36	77,77	160,38	90,38
	110,34	57,25	141,48	132,69	99,78	71,57
	161,44	75,65	61,06	113,32	74,2	97,26
	318,45	90,35	122,65	77,74	149,63	133,87
	105,52	56,72	84,81	44,11	104,5	123,97
	67,72	146,53	98,42	131,07	127,33	71,15

65,01	96,67	131,29	129,12	105,57	109,51
244,83	113,75	89,66	122,14	107,95	75,62
231,63	58,69	105,88	94,89	155,94	119,86
84,68	77,61	79,01	155,4	124,14	222,73
86,02	139,76	151,03	187,97	62,85	69,04
49,1	84,16	122,28	114,76	106,05	145,93
55,08	191,36	112,63	131,96	114,88	112,31
175,86	56,39	124,57	76,02	192,1	88,74
106,13	97,04	85,43	205,39	125,47	71,04
76,74	73,03	79,06	198,63	63,45	124,61
72,98	156,83	157,74	115,4	156,19	104,39
90,64	87,56	65,71	58,43	67,71	82,04
67,76	155,45	66,35	105,84	193,97	172,78
105,81	65,96	146,33	152,42	228,94	86,92
92,59	85,13	83,72	58,36	108,89	161,75
85,84	123,93	119	85,09	129,11	133,19
40,08	167,15	122,8	132,62	138,09	146,78
58,74	140,42	87,79	139,51	86,65	80,39
59,31	186,7	91,61	147,92	51,08	98,8
161,09	81,77	90,63	204,37	78,68	121,79
125,93	105,27	112,2	176,37	104,87	111,42
61,1	129,79	86,93	132,39	120,63	162,83
54,24	116,09	98,3	41	120,95	73,72
177,55	122,99	81,04	95,22	113,75	89,15
129,73	50,42	180,33	80,74	130,57	
132,86	101,88	160,05	146,5	86,08	
183,44	72,15	138,09	52,58	150,34	

24 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	86,14	172,05		100,29	93,22	
	87,79	135,28		136,03	180,58	
	211,4	62,85		141,88	73,68	
	213,71	55,19		364,85	67,23	
	195,59	53,52		112,36	242,8	
	95,06	131,24		198,15	101,19	
	171,11	88,48		94,44	130	
	145,07	111,75		103,67	65,51	
	173,13	137,37		108,72	83,18	

123,33	58,63		93,46	145,82	
89,94	161,62		76,27	107,63	
117	136,02		141,55	61,28	
168,64	120,8		171,9	125,68	
151,97	165,74		163,97	62,66	
37,8	133,82		161,54	143,41	
38,41	114,75		119,72	115,63	
73,06	79,66		133,23	83,87	
67,62	104,87		85,14	151,15	
	96,35		148,29	58,65	
	155,54		256,78	119,61	
	102,79		160,88	152,86	
	79,13				
	147,55				
	76,26				
	94,27				
	94,25				
	136,65				
	100,76				
	69,59				
	71,68				
	123,28				
	189,19				
	75,99				
	94,19				
	115,19				
	161,45				
	70,16				
	225,97				
	65,44				
	92,89				
	61,31				
	153,99				
	86,34				
	128,58				
	111,52				

24 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	168,48	169,81	195,61	269,41	138,14	263,38	60,35	153,87	255,42
	72,25	154,34	173,83	48,26	119,92	184,8	130,49	261,21	194,72
	96,33	168,39	201,84	153,28	152,3	185,39	153,51	223,94	146,43
	126	208,98	220,48	348,44	345,89	151,89	332,46	223,51	175,74
	132,5	136,78	111,93	219,81	210,73	232,55	365,64	152,28	200,57
	131,6	186,24	263,71	108,5	123,41	160,67	181,26	136,77	186,56
	145,45	247,14	217,75	119,45	119,83	174,46	88,14	222,52	314,59
	53,98	79,62	122,3	328,54	83,69	154,45	61,04	98,99	203,28
	125,23	163,51	148,89	298,66	170,27	156,68	116,66	120,9	124,36
	250,8	92,48	240,61	75,87	177,32	177,67	135,79	128,15	166,72
	135,84	208,75	203,93	159,3	177,04	153,06	131,12	180,75	118,52
	132,39	149,32	124,89	96,96	131,83	123,19	169,69	165,01	117,3
	184,17	184,29	143,23	113,67	138,38	120,54	86,25	183,86	375,55
	113,35	171,37	178,61	60,85	219,7	246,62	258,49	192,67	174,78
	160,5	156,71	150,21	191,53	139,53	210,14	296,64	106,88	103,87
	140,18	145,8	174,04	138,43	275,14	143,95	105,98	143,55	155,23
	204,01	101,3	180,16	146,96	254,66	236,02	124,76	166,58	158,2
	68,32	174,27	137,78	125,83	189,7	162,92	80,4	192,52	144,06
	131,91	131,37	210,78	299,99	116,98	185,9	61,45	173,28	225,77
	364,72	153,01	179,19	220,53	247,88	192,68	200,45	244,11	163,31
	146,99	218,77	117,84	230,46	158,5	108,36	118,93	130,92	255,77
	97,34	153,01	176,37	104,93	250,89	122,89	413,93	129,19	210,99
	45,46	198,1	160,18	103,21	179,41	149	106	151,38	114,63
	305,6	106,3	127,68	46,77	102,95	150,52	81,87	211,76	146,78
	164,19	138,16	109,65	135,81	112,61	160,98	151,65	202,33	187,44
	88,35	137,77	144,28	206,81	150,65	210,72	216,02	72,06	176,97
	242,62	208,72	238,78	352,45	46,71	151,71	145,07	200,7	255,47
	77,91	134,71	177,57	150,68	61,65	218,49	109,27	273,59	132,88
	165,19	154,54	233,26	187,08	70,15	170,89	82,87	122,24	90,73
	133,31	167,06	150,19	108	193	178,99	99,23	170,23	140,8
	312,79	144,84	128,22	225,15	214,54	176,95	282,13	168,87	196,99
	136,32	233,69	150,08	238,62	110,16	97,98	221	258,77	145,83
	118,51	217,85	164,32	107,22	117,72	196,07	76,45	184,41	180,78
	126,06	233,92	197,68	238,18	221,63	205,05	72,75	218,68	119,24
	67	118,3	155,78	91,28	355,46	203,49	130,26	164,77	184,15
	146,63	73,83	152,02	217,15	138,57	176,81	121,39	159,92	185,48
	67,6	129,12	273,3	77,25	136,99	160,29	153,77	184,03	164,12
	176,58	161,32	192,24	117,71	168,4	115,35	248,92	112,55	158,18
	247,29	202,66	158,18	200,88	209,09	133,62	262,55	84,73	216,17
	73,98	117,91	227,93	141,54	141,3	187,9	182,04	135,81	126
	122,6	161,32	200,78	184	229,78	145,23	111,06	81,24	136,29
	232,37	174,06	104,2	154,79	172,64	193,33	131,75	223,56	85,16
	111,84	108,89	174,42	74,7	213,91	142,23	247,71	147,96	252,19
	96,24	183,85	135,81	96,56	197,03	294,07	88,79	172,63	187,17
	214,66	177,18	211,18	159,66	151,7	154,02	149,89	113,26	172,42
	126,21	162,87	150,5	246,54	177,86	139,79	157,19	215,01	190,95

121,69	155,48	158,39	141,33	139,42	287,18	87,67	170,81	157,14
223,43	169,9	213,16	115,45	121,43	173,46	182,22	112,63	221,36
213,51	107,14	119,46	196,82	260,71	113,91	98,13	121,9	259,38
67,98	139,13	151,61	111,32	200,83	187,46	111,66	289,64	168,35

24 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	99,76	150,64	215,32	188,43	213,34	189,14	177,92	167,62	90,14
	144,65	123,63	125,85	147,12	173,59	110,31	261,17	319,62	243,96
	113,7	119,51	204,29	159,69	314,32	163,63	173,62	307,85	159,62
	309,44	162,14	158,45	157,99	136,7	182,92	114,25	139,38	81,22
	142,04	267,98	131,7	167,68	168,18	159,98	73,34	201,15	289,24
	168,16	73,56	163,66	105,95	182,83	123,47	149,37	144,15	247,4
	181,28	172,13	177,68	208,43	132,44	152,31	149,43	94,79	190,57
	102,96	109,72	193,49	116,83	127,53	209,91	363,99	112,52	174,85
	152,71	199,11	130,02	149,87	119,96	135,53	101,06	267,18	280,96
	139,89	135,45	156,7	121,46	166,61	140,43	89,28	144	107,47
	142,02	158,64	127,18	101,39	240,38	169,96	128,14	267,97	173,5
	56,24	167,1	166,76	124,28	146,5	204,65	164,21	200,57	111,98
	231,39	71,23	111,77	118,86	128,61	114,13	278,17	135,98	298,87
	108,28	141,03	210,73	197,4	327,99	148,99	244,16	145,65	138,93
	139,54	126,11	187,86	248,17	161,69	140,04	157,52	164,45	156,09
	62,61	208,4	287,33	142,09	172,33	154,7	94,61	163,93	198,35
	261,53	226,3	151,12	273,84	183,58	172,79	133,99	88,28	117,54
	125	145,46	138,8	79,8	302,46	211,19	124,33	189,89	179,44
	129,13	109,78	218,33	285,3	84,49	243,05	104,12	173,19	151,33
	62,63	221,45	151,92	222,11	194,54	198,94	94,86	169,74	182,05
	109,74	163,35	171,78	127,86	186,74	132,11	132,73	123,42	236,07
	205,75	123,11	138,6	122,32	131,14	199,89	87,3	204,81	233,08
	61,96	143,55	186,45	205,43	166,43	152,16	46,43	91,32	177,14
	100,2	133,43	189,31	288,82	226,85	154,79	102,97	191,64	138,1
	71,32	186,88	163,95	69,82	104,25	127,02	115,36	216,34	204
	171,47	197,33	219,26	161,9	247,8	206,98	107,92	102,81	164,21
	78,98	95,14	143,48	142,88	175,85	127,08	347,07	146,75	169,85
	97,04	157,42	201,4	270,47	177,72	126,85	248,34	153,85	135,88
	106,18	175,32	143,85	320,25	242,66	151,86	247,25	163,51	316,27
	135,03	186,13	248,44	165,76	117,02	147,12	88,2	211,88	141,67
	252,37	134,32	142,53	140,22	209,04	175,56	87,8	100,06	168,19
	85,34	107,54	160,76	179,24	141,35	206,35	217,76	178,39	228,48
	229,75	170,94	171,4	80,57	174,74	243,43	148,28	180,13	181,76
	113,71	116,69	232,28	55,47	199,2	177,88	132,48	153,86	156,07
	185,66	113,01	134,48	179,5	300,92	120,99	127,83	134,91	141,97
	93,69	139,92	206,5	63,31	217,28	191,56	93,85	131,23	150,21
	81,93	192,14	172,22	204,15	239,51	200,8	170,12	224,08	236,75
	116,67	172,13	100,69	220,92	181,11	198,08	315,22	204,59	135,58
	190,49	110,26	115,37	135,89	186,29	131,13	149,61	168,69	120,68
	203,52	106,48	113,28	136,65	206,2	175,19	104,58	125,66	187,88
	185,92	203,92		98,73	167,09	175,77	241,92	107,34	211,56

102,94	140,12		122,52	102,42	301,82	111	180,96	230,18
44,3	96,31		104,9	118,38	179,71	207,87	183,92	118,34
120,13	117,71		257,55	130,31		148,09	194,41	144,13
82	198,13		110,5	135,64		233,19	148,93	242,44
312,19	188,18		86,41	210,73		336,69	136,81	93,21
95,74	132,12		210,32	137,43		307,54	136,14	158,1
141	191,06		180,89	159,29		94,54	94,3	147,12
245,66	123,35			130,33			169,46	168,65
186,26	220,56			206,97			136,18	160,73

24 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	444,89	165,1			65,52			158,65	198,8
	163,65	142,16			153,55			276,44	111,22
	120,43	114,72						134,77	152,7
	108,95	150,26							
	111,78	228,58							
	298,4	144,94							
	107,39	67,76							
	119,32	137,32							
	161,6	215,17							
	52,7	155,26							
	159,74	150,57							
	126,73	165,72							
		162,74							
		139,29							
		138,83							
		209,01							
		188,06							
		140,83							

24 h	Anzahl (n) der vermessenen Axone		
	Experiment		
	1	2	3
Kontrolle	113	140	95
C3 ^{bot} 181-211	116	116	92
C3 ^{bot} 154-182	112	118	90
C3 ^{bot} E174Q	98	102	93
C3 ^{bot}	98	103	103

F 3 Experimente C3. 2: Quantitative Analyse des Axonwachstums in NT2/N-Zellen nach 48 h

48 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	110,85	136,72	212,79	226,51	160,95	119,07
	98,16	113,85	139,29	132,8	150,94	221,14
	149,49	108,83	195,46	114,92	194,78	243,22
	234,53	117,58	131,81	146,24	216,42	113,56
	224,37	96,38	187,83	95,98	133,92	131,41
	195,77	131,66	133,37	277,63	114,87	164,8
	100,69	136,83	189,88	145,45	127,36	154,88
	200,59	71,78	124,93	378,95	85,44	210,29
	82,25	265,11	141,25	105,43	97,84	183,61
	418,18	173,7	238,84	235,83	274,16	167,8
	51,32	111,97	131,17	88,96	219,8	142,64
	307,83	204,09	128,27	258,69	345,75	109,46
	65,71	168,66	118,59	247,4	155,29	145,33
	144,7	210,72	196,61	286,87	116,5	165,51
	88,56	157,67	159,94	326,86	196,14	125,69
	229,06	55,32	197,45	144,62	157,04	138,7
	297,23	90,86	111,29	256,48	105,14	173,39
	119,6	108,24	200,7	251,78	138,15	119,14
	321,05	96,17	102,27	257,62	221,04	178,31
	111,7	127,56	112,3	172,86	152,86	134,68
	112,16	157,4	128,27	152,2	121,24	145,02
	173,97	122,03	132,68	80,8	158,78	123,87
	225,37	71,55	108,6	216,3	186,35	145,89
	189,46	156,19	137,99	137,83	98,15	116,08
	164,28	133,29	178,91	83,59	163,42	127,42
	220,7	145,05	166,44	312,3	161,82	134,44
	191,93	78,15	141	128,33	121,18	135,75
	120,07	94,89	168,82	230,14	206,64	178,97
	167,31	307,61	196,65	140,86	123,63	159,38
	100,62	82,25	82,33	146,55	183,49	157,21
	271,48	195,16	138,52	141,03	148,2	167,83
	191,18	263,68	108,3	115,19	221,31	184

152,53	140,53	152,44	140,34	93,98	155,74
158,13	271,99	114,38	156	160,88	136,71
196,5	268,93	116,2	177	96,65	198,89
126,4	83	84,84	193,96	124,74	164,47
112,13	157,06	198,37	178,9	153,6	114,23
196,54	184,87	230	188,03	196,42	140,44
119,4	174,87	123,06	115,32	80,25	166,02
118,92	150,86	166,07	217,34	204,91	166,07
116,11	116,78	103,39	106,47	225,12	124,57
192,15	283,61	109,93	247,15	279,02	168,02
123,96	109,83	186,3	121,96	105,03	141,71
84,04	212,16	108,91	56,11	183,19	122,64
162,17	137,86	137,7	104,1	134,67	217,44

48 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	103,49	93,93	122,86	251,24	205,13	122,37
	66,56	119,06	134,08	86,59	142,74	173,2
	110,2	96,27	251,83	341,42	147,94	188,48
	348,77	151,95	107,61	78,33	144,67	138,18
	70,65	88,31	85,14	136,96	173,66	121,57
	102,59	108,35	129,74	205,09	149,3	133,36
	342,09	54,89	216,2	99,32	137,19	143,87
	122,11	188,99	202,14	151,46	146,87	155,43
	99,62	158,58	123,68	153,89	181,62	150,41
	234,64	129,54	118,17	130,5	89,48	139,95
	203,76	176,69	163,98	136,83	100,64	211,49
	151,11	101,44	212,82	123,36	111,93	164,99
	150,94	142,67	102,98	221,92	152,24	153,45
	182,53	108,65	134,62	124,87	126,55	176,31
	150,3	145,76	142,68	132,6	108,38	178,52
	239,63	181,19	157,24	102,15	193,49	126,35
	87,43	251,86	107,56	85,42	151,94	114,04
	69,11	179,06	186,41	245,2	173,96	219,48
	158,71	178,62	120,49	174,73	272,7	202,11
	162,35	219,16	112,77	114,56	100,18	170,69
	106,91	172,19	133,9	117,65	219	93,18
	233,52	97,83	178,54	386,45	88,01	109,25

148,2	183,81	169,73	133,74	83,56	124,08
170,25	292,33	128,29	113,9	163,04	116,2
136,19	120,87	153,09	132,05	128,06	109,7
231,51	200,85	213,45	186,31	142,61	178,33
74,31	167,03	126,76	172,42	96,04	145,55
135,79	135,59	150,3	170,96	365,34	144,87
147,03	232,96	218,49	187,67	97,72	97,25
266,28	148,95	122,77	171,71	164,36	88,46
150,88	102,32	127,68	199,41	150,65	148,37
61,18	151,94	128,31	134,02	108,68	200,42
133,41	115,94	176,92	146,11	126,49	101,02
342,06	129,62	176,75	301,89	178,05	114,94
170,32	132,42	106	121,22	112,94	123,19
175,92	117,9	175,14	137,95	168,95	95,21
212,68	179,7	179,13	128,74	158,76	202,3
183,27	211,38	124,49	232,74	176,3	154,61
258,06	269,05	145,46	289,08	162,2	111,37
112,33	139,31	153,7	117,84	81,13	128,27
125,9	110,23	132,03	109,86	118,51	99,78
180,57	173,5	168,41	162,61	168,66	225,17
158,49	156,69	127,35	246,88	134,45	
46,84	132,88	183,73	202,46	183,2	
192,51	114,04	111,42	164,71	204,79	
168,6	187,35	109,31	279,98	151,22	
109,69	138,05	92,16	218,69	189,45	
93,36	217,18	107,35	163,91	228,14	
155,07	179,33	118,15	170,01	140,35	
119,79	266,77	141,6	98,85	119,36	

48 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	227,78	103,7	138,59	164,72	295,71	
	64,47	205,93	126,76	209,84	155,49	
	192,15	110,5	139,01	163,07	127,3	
	194,88	82,01	112,37	384,38	190,96	
	104,55	164,18	102,26	118,22	177,79	
	92,66	99,54	174,34	139,27	98,96	
	159,56	151,19	161,45	210,7	137,89	
	104,05	62,21	134,49	166,78	203,7	
	242,28	157,75	148,6	254,33	86,33	

453,5	75,68	124,7	218,68	102,71	
117,46	247,76	256,17	103,4	114,1	
122,39	135,7	178,25	120,36	135,64	
187,97	226,77	204,36	411,77	147,54	
186,94	158,57		122,46	100,15	
188,31	242,11		426,29	316,82	
227,19	194,89		95,94	162,38	
315,89	113,35		217,92	70,31	
140,64	111,55		177,71	170,78	
135,37	180,55		174,01	139,03	
507,43	139,67		190,73	109,62	
320,51	159,06			139,01	
285,01	153,54			121,2	
169,21				141,62	
117,22				243,37	
102,55				179,97	
64,37				101,8	
284,89				153,19	
234,71				255,45	
238,09					

48 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	155,74	231,96	151,23	135,73	188,96	391,07	190,09	168,05	231,31
	72,5	198,91	257,86	113,28	333,73	253,92	72,2	250,03	279,66
	335,31	173,46	201,08	248,92	269,08	238,57	313,08	178,63	239,83
	370,44	194,49	307,19	105,13	261,31	322,46	144,96	199,76	365,12
	218,57	155,35	192,6	237,25	108,77	269	166,48	109,64	249,85
	361,02	212,53	197,93	221,05	106,59	154,99	235	152,18	138,34
	172,1	247,13	279,66	165,7	468,2	236,02	81,78	116,58	233,49
	151,79	127	249,98	451,11	187,68	263,76	323,79	291,54	160,83
	376,8	231,06	167,61	153,69	122,96	313,59	233,45	207,09	205,79
	202,29	219,71	239,9	175,22	262,74	250,81	166,52	187,9	241,36
	182,31	193,18	221,76	267	293,87	187,21	335,72	162,29	200,98
	214,13	233,05	280,65	443,33	192,23	183,7	186,96	140,68	371,68
	185,06	180,35	174,91	226,02	271,4	207,23	178,08	172,04	134,03
	148,02	209,33	202,02	238,65	192,32	242,6	67,16	217,34	184,43
	336,46	286,32	246,94	433,58	157,15	164,74	316,76	148,48	175,26
	223,25	89,74	133,02	115,33	154,69	262,75	192,26	175,79	230,54
	388,15	125,09	150,71	213,13	151,29	174,22	257,62	101,59	171
	151,52	267,26	243,36	396,6	155,72	186,9	430,38	159,83	178,68
	130,78	237,43	266,52	245,53	188,86	295,34	281,99	162,11	237,82
	268,83	276,59	184,86	264,97	184	195,7	149,13	396,82	232,83
	261,32	119,52	211,19	257,02	192,43	143,91	172,46	209,67	210,51
	263,86	162,38	299,75	204,34	458,97	218,01	224,43	256,83	265,08
	233,34	179,12	351,7	371,19	135,36	188,78	231,15	349,69	204,37
	125,89	210,16	302,05	203,95	185,44	182,24	226,05	189,15	193,05

352,12	302,89	191,55	196,02	212,14	164,14	177,88	238,67	251,24
103,04	170,01	190,9	170,55	224,12	235,1	172,91	119,61	167,73
160,35	293,72	341,74	176,73	150,59	431,62	180,16	198,83	177,36
529,29	342,54	127,66	279,51	133,58	241,58	189,32	197,14	159,23
302,66	340,35	194,16	204,51	173,25	236,56	345,52	333,65	191,64
75,37	222,19	191,89	166,42	312,01	142,55	403,09	180,51	325,06
354,25	341,58	229,53	267,14	220,77	248,95	218,95	73,19	280,48
240,8	193,24	183,74	344,7	169,16	189,18	573,27	200,49	174,12
205,8	109,27	215,71	280,54	284,51	219,01	219,62	309,28	161,62
179,53	255,87	196,54	345,92	102,07	217,02	246,32	216,71	108,52
193,03	150,64	188,48	186,22	134,93	263,42	348,7	189,53	238,88
75,1	249,46	278	265,24	281,03	86,66	255,54	176,52	202,16
90,96	150,03	184,77	221,46	298,96	174,62	352,83	262,64	149,89
175,79	110,55	193,16	269,97	283,65	189,12	267,75	155,31	199,32
159,81	180,31	137,19	255,23	138,33	179,9	212,58	219,41	162,19
125,83	271,26	199,98	101,45	241,39	260,07	160,55	343,07	223,75
319,5	133,06	304,45	156,32	282,23	287,43	286,98	180,37	211,1
176,48	259,19	235,75	162,94	283,53	183,81	215,59	254,41	200,85
246,16	141,63	127,93	290,39	188,23	199,85	197,85	258,3	247,9
132,24	131,98	170,51	194,14	184,71	160,12	187,23	289	220,79
140,43	103,56	224,23	256,03	221,25	214,11	465,4	221,54	210,23
364,52	228,29	224,05	232,62	250,11	295,55	181,46	277,05	307,14
216,25	88,09	174,95	223,57	200,72	265,94	145,55	291,73	243,49
231,77	142,8	179,06	305,77	197,42	248,97	180,35	199,46	162,79
224,58	204,16	153,51	262,18	174,44	320,18	228,6	196,96	223,77
59,27	281,85	251,31	347,14	271,49	202,18	175,48	245,06	320,43

48 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	271,79	290,59	299,33	346,56	259,4	136,12	209	156,55	174,77
	229,19	320,96	386,25	79,46	186,74	330,47	315,53	216,99	225,09
	106,01	188,27	237,5	339,24	218,91	293,84	87,86	245	248
	260,68	167,49	199,72	234,27	248,42	277,12	258,74	187,51	159,52
	168,6	225,92	344,39	407,48	291,59	146,8	162,9	349,26	245,68
	114,43	202,54	132,37	181,24	143,74	319,7	292,17	185,26	237,14
	156,98	166,17	235,74	448,69	235,38	215,74	100,92	273,91	321,44
	194,9	176	236,69	297,77	123,36	264,91	210,21	235,52	215,71
	192,24	139,47	244,95	285,59	194,34	233,04	283,95	185,26	274,47
	217,37	220,78	202,27	121,86	300,57	388,9	178,83	180,67	240,23
	161,55	182,65	219,04	227,01	210,62	139,42	100,16	139,66	202,74
	199,38	255,31	198,99	135,18	222,33	248,06	121,21	271,71	233,03
	292,75	229,2	178,49	231,05	357,37	189,9	250,95	303,53	162,2
	248,84	224,08	315,43	185,35	195,89	251,06	369,62	283,08	249,63
	97,82	112,29	175,11	119,68	84,06	176,45	278,17	158,64	300,51
	253,88	189,55	191,76	224,53	253,72	167,57	294,05	255,48	236,38
	324,14	90,25	234,29	233,57	349,03	193,29	203,67	206,36	236,89
	126,49	175,58	296,59	153,3	277,96	109,47	180,13	170,94	172,72

92,02	174,62	270,34	164,59	209,15	277,81	193,58	208,14	306,32
298,91	129,9	296,01	218,87	144,67	164,31	234,93	108,86	239,1
190,59	179,93	213,3	143,9	219,22	199,2	166,99	256,09	302,84
130,42	208,44	199,13	211,79	144,5	117,95	267,35	257,05	254,62
371,37	144,79	214,4	171,36	157,96	289,04	157,16	238,41	302,77
507,99	172,41	191,93	277,55	212,56	204,25	247,87	240,82	
135,14	281,86	259,37	196,25	251,38	177,99	281,05	239,58	
237,94	237,85	237,93	119	285,09	194,02	130,05	374,31	
108,2	101,77	285,31	229	179,58	256,2	170,66	279,04	
131,73	246,31	308,14	199,92	170,11	235,89	136	249,06	
112,85	117,59	191,86	129,73	228,96	221,07	140,17	211,18	
136,5	151,89	238,17	144,8	231,98	265,93	175,47	122,46	
119,71	176,74		140,94	145,58	194,38	209,94	338,8	
319,45	126,08		156,62	203,79	128,58	306,12	331,11	
200,88	223,24		191,25	233,46	234,38	99,85	194,54	
71,65	146,38		218,65	194,51	226,58	225,49	177,43	
120,18	200,99		191,76	259,79	194,5	242,73	152,28	
143,72	340,83		259,87	238,38	263,71	85,62	177,86	
105,46	303,76		184,87	188,19	335,3	94,3	143,86	
288,56	154,1		297,17	179,47	194,22	237,47	334,39	
248,08	216,71		120,33	236,86	139,2	212,71	110,34	
182,27	246,23		172,61	189,95	206,66	156,66	186,95	
153,19	179		183,68	187		109,06	174,43	
184,15	251,81		131,36	216,17		206,33	194,28	
41,33	203,92		188,61	138,52		207,89	451,25	
192,31	213,31		424,25	211,81		207,03	156,29	
284,03	236,96		241,37	250,01		157,87	277,53	
63,17	99,2		230,8	91,98		85,43	243,91	
164,11	191,58		276,38	103,58		192,75	224,67	
240,15	211,67		205,84	210,39		207,33	173,03	
168,08	206,73		205,51	217,85		266,07	158,45	
236,43	235,44		452,79	236		186,47	252,01	

48 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	248,1	215,24		127,65	193,65		254	277,39	
	229,49	137,75		109,12			235,77	66,26	
	361,19	201,9		244,69			277,76	343,21	
	201,99	257,2		78,11			237,31	289,89	
	254,45	229,75		216,37			313,67	156,91	
	199,59	132,87		110,94			153,17	210,05	
	253,44	155,94		144,74			356,72	86,27	
	212,79	170,56		151,83			270,27	189,48	
	310,46	192,62		172,78			347,29	225,47	
	164,28	208,61		125,53			236	196,97	
	127,17	180,17		191,2			205,24	122,28	
	219,05	205,43		337,69				199,45	

82,66	207,21		196,29				258,94	
187,72	301,86		247,47				141,63	
479,73	264,99		111,69				279,46	
422,02	215,47		181,41				170,78	
111,22	195,97		305,73				180,56	
148,72	219,23		217,32				174,41	
136,29	190,9		252,31					
234,71	222,27		135,75					
228	176,05		257,01					
148,8			149,06					
309,96			78,81					
142,24			269,36					
379,19			217,97					
221,65								
178,83								
379,19								
204,47								
218,01								
140,8								
118,31								
209,21								
254,07								
143,47								
428,64								
171,15								
322,9								
163,29								
272,83								
128,97								
262,06								
251,11								
135,05								
136,87								
333,85								
327,63								
113,84								
134,31								
348,38								

48 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	216,19								
	248,63								
	124,48								
	249,22								
	223,75								
	322,47								
	174,93								

48 h	Anzahl (n) der vermessenen Axone		
	Experiment		
	1	2	3
Kontrolle	124	117	108
C3 ^{bot} 181-211	115	123	87
C3 ^{bot} 154-182	157	121	80
C3 ^{bot} E174Q	125	101	90
C3 ^{bot}	111	118	73

F 4 Experimente C3. 2: Quantitative Analyse des Axonwachstums in NT2/N-Zellen nach 72 h

72 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	87,17	119,67	184,72	253,71	220,51	227,29
	183,97	132,17	174,65	107,31	208,79	145,34
	113,27	128,78	148,23	109,13	219,21	113,04
	96,11	124,21	170,74	164,71	242,01	245,92
	126,05	177,85	220,21	191,6	312,5	166,01
	123,51	141,83	175,36	257,4	167,16	193,53
	131,28	109,46	166,96	264,7	144,21	225,78
	188,06	114,88	171	223,33	301,88	222,76
	282,67	132,52	121,05	142,45	191,68	200,27
	164,54	198,56	205,65	202,16	134,26	282,52
	183,92	224,68	129,64	277,34	177,56	200,23
	298,04	220,51	179,9	287,27	226,68	250,2
	96,04	201,41	114,67	301,47	191,74	196,54
	208,36	309,62	234,99	117,18	155,29	174,07
	235,36	165,25	129,37	139,27	115,26	156,44
	217,32	181,11	284,88	104,41	141,13	218,78
	306,1	124,38	200,2	251,04	213,66	191,38
	112,2	76,41	116,6	186,18	163,15	205,84
	184,53	172,82	420,89	217,31	169,82	193,99
	152,4	244,75	146,01	148,28	164,87	203,68
	129,71	129,25	230,69	180,61	234,19	193,56
	163,05	123,04	207,87	216,07	170,45	185,07
	181,7	228,44	127,83	170,91	167,75	354,75
	129,69	219,92	157,2	137,88	186,47	235,73
	286,24	155,58	233,51	170,05	151,33	192,45
	205,85	221,89	287,89	155,35	180,36	140,98
	268,37	224,6	214,26	547,12	91,61	188,94

275,48	128,37	142,97	246,52	158,34	147,52
203,81	303,54	123,46	596,64	205,84	180,27
204,79	184,65	176,64	221,26	306,97	139,95
243,48	238,51	186,01	134,64	207,05	213,41
161,26	84,79	193,42	168,56	304,19	192,22
519,15	226,18	302,09	288,44	146,06	181,7
483,88	267,73	146,76	258,7	114,28	289,08
488,86	175,8	142,89	262,06	223,7	174,76
268,06	258,01	158,01	112,32	147,17	156,53
311,03	138,01	187,76	134,43	161,43	262,46
281,33	208,11	235,01	175,39	207,07	211,05
590,14	164,01	172,5	197,01	261,67	189,97
371,1	174,96	184,37	232,61	207,76	157,19
257,3	127,4	164,46	217,69	127,75	184,57
220,47	141,17	338,12	303,03	115,05	144,87
345,92	148,56	191,38	95,75	132,37	207,62
313,61	152,15	242,38	171,9	216,49	225,82
222,98	137,04	218,88	304,8	133,63	130,31

72 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	184,09	302,42	149,35	304,57	213,75	169,02
	199,16	212,2	217,65	215,87	149,85	200,39
	181,95	240,47	180,6	227,64	154,54	164,95
	131,46	437,4	227,16	130,58	223,73	128,38
	206,08	126,61	164,02	299,96	175,05	142,34
	178,15	165,17	307,19	255,64	147,97	172,97
	98,14	122,66	192,94	278,15	155,39	254,39
	302,36	158,96	126,39	139,11	166,89	156,41
	106,33	194,14	132	116,96	211,75	189,56
	34,04	198,62	177,1	144,45	202,33	198,85
	110,1	88,96	221,29	154,95	186,23	155,11
	172,12	211,77	181,59	423,37	134,85	327,81
	193,92	191,26	164,33	274,5	161,79	134,31
	186,85	278,39	183,99	116,21	90,15	208,43
	560,24	197,01	213,89	185,7	149,79	176,81
	108,43	124,37	165,89	223,09	179,8	185,43
	238,03	223,22	145,93	433,89	139,43	157,46
	165,13	191,15	147,41	196,07	257,75	175,97
	159,11	169,77	166,37	317,71	161,31	194,04
	158,45	189,14	215,68	157,43	121,69	142,63
	145,05	105,2	130,01	72,05	213,77	234,63
	231,28	126,35	190,19	220,1	202,7	210,1
	86,21	239,3	143,77	195,37	76,53	146,18
	205,51	225,88	146,78	191,52	165,14	194,95
	81,54	200,16	136,57	222,36	114,84	100,41
	508,31	100,56	230,57	328,29	145,18	174,49

204,03	104,57	228,23	234,88	236,1	155,91
149,66	185,51	257,9	116,38	219,51	261,33
138,77	340,69	271,39	93,22	147,11	142,19
252,46	210,32	304,37	235,7	269,22	166,59
109,03	97,18	270,1	178,04	133,17	162,42
117,64	240,54	157,17	147,97	96,4	155,02
395,41	245,56	105,52	203,33	194,03	329,87
78,22	154,76	272,46	302,75	375,11	291,39
184,23	178,85	198,31	183,82	321,56	229,7
215,67	119,92	239,88	145,99	135,47	184,84
168,79	289,03	168,05	283,36	155,5	192,3
447,32	206,98	380,24	117,19	256,78	179,28
259,07	122,82	164,92	171,66	91,18	143,89
164,43	221,06	144,32	281,29	219,05	133,32
130,69	270,16	217,88	372,45	153,92	183,42
101,08	172,29	211,04	104,29	109,19	229,32
84,6	196,17	144,43	198,33	237,51	142,33
125,65	137,44	191,52	180,16	122,08	113,31
245,21	230,03	146,79	127,06	118,04	
114,89	226,01	178,62	280,78	121,03	
214,24	126,71	248,11	375,18	178,05	
121,93	156,67	174,24	174,32	213,19	
168,25	188,46	135,16	213,11	335,34	
194,06	267	241,38	160,51	189,67	

72 h Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211		
	1	2	3	1	2	3
	284,55	166,88	192,36	216,11	261,12	
	363,06	193,89	209,98	310,93	177,9	
	189,39	261,86	146,19	259,6	242,61	
	141,64	115,73	168,65	166,12	217,92	
	257,35	232,83	147,57	209,79	228,99	
	118,08	117,39	202,21	293,97	217,06	
	131,8	167,99	157,32	137,61	161,05	
	469,98	174,78	205,95	182,5	251,89	
	204,85	189,4		229,88	264,65	
		190,9		301,23	127,42	
		181,08		137,48	121,32	
		83,66		187,84	139,81	
		126,73		212,22	191,02	
		228,27		152,69	141,78	
		154,3		116,24	174,69	
		153,74		244,69	278,42	

	245,93		144,07	154,74	
	167,73		118,81	138,27	
	158,82		270,54	119,41	
	123,7			193,13	
	199,03			114,5	
	174,71			123,77	
	152,32			226,73	
	185,05			258,26	
	263,65			323,53	
	136,15			165,17	
	128,44			187,19	
	411,51			242,53	
	206,22			351,16	
	151,05			182,4	
	189,21			139,23	
	141,7			204,53	
	220,27			169,82	
	187,49				
	111,52				
	159,11				
	165,31				
	162,86				
	147,19				
	147,92				
	137,46				
	127,94				
	174,03				
	213,22				
	181,63				
	237,77				

72 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	495,65	331,85	323,51	298,56	299,54	391,54	186,96	289,33	288,74
	180,41	153,15	278,24	224,32	316,36	292,29	134,7	243,64	266,84
	442,45	190,1	215	486,18	215,82	256,02	506,29	250,45	184,48
	358,07	149,24	234,25	246,13	305	325,63	293,51	214,68	150,91
	190,05	275,18	375,65	403,13	265,48	306,94	326,16	264,51	454,76
	361,96	233,77	272,77	286,46	337,06	277,8	242,82	160,1	236,57
	253,73	150,55	282,3	253,88	258,15	302,56	208,14	231,78	214,29

195,01	268,72	285,9	230,47	269,24	229,4	255,72	188,67	291,47
183,7	344,37	346,98	337,85	200,43	328,57	199,65	260,56	254,35
177,19	338,74	412,58	213,22	250,82	408,43	192,1	325,22	314,47
285,47	180,54	211,69	264,82	194,48	264,82	238,74	467,08	453,79
225,49	233,85	226,93	324,29	192,8	254,19	201,08	198,62	225,55
283,57	253,65	407,85	253,69	195,14	275,26	259,57	328,81	278,81
158,15	270,77	190,23	358,69	321,42	242,84	232,29	348,53	464,87
350,23	223,71	327,05	233,44	286,53	255,66	304,17	223,37	389,5
364,09	200,79	353,24	246,61	278,91	295,95	375,07	275,39	286,61
298,3	232,39	287,38	253,11	203,66	334,07	534,9	183,33	279,36
433,09	340,78	203,65	203,3	231,22	308,55	265,7	203,28	278,17
211,74	195,25	227,01	206,33	142,73	189,39	205,09	299,94	242,18
212,48	220,15	222,2	203,72	250,45	437,33	277,2	282,63	263,58
311,79	196,34	353,26	389,21	426,2	247,67	345,51	224,53	227,12
160,97	438,5	340,54	303,06	256,13	281,75	228,08	356,38	234,78
180,85	212,34	344,38	187,51	399,59	331,75	183,6	250,23	407,68
160,87	288,68	269,69	346,51	386,57	246,72	201,41	332,53	320,3
221,04	428,15	333,01	290,21	247,95	148,68	270,48	221,79	246,64
222,57	127,26	292,46	345,52	310,85	444,83	231,65	232,42	236,32
311,1	283,59	177,72	405,33	263,25	255,35	202,31	247,85	203,56
468,75	520,51	186,04	442,34	228,15	407,11	224,78	118,51	386,79
313,93	220,09	220,96	128,72	212,84	284,66	171,02	307,34	295,92
358,87	265,99	229,82	159,12	218,33	317,03	291,44	394,54	322,36
337,75	175,07	406,68	200,14	177,52	215,11	228,53	216,66	232,19
434,8	251,03	228,22	272,74	483,21	204,16	294,42	207,52	353,12
227,61	292,77	263,68	411,05	203,84	327,24	304,33	258,89	297,91
247,23	359,73	200,51	211,34	235,91	362,24	171,1	195	363,04
421,12	186,7	158,33	216,34	278,26	221,52	185,36	160,76	135,68
211,99	161,4	174,87	375,41	308,27	140,01	215,94	200,45	488,35
299,92	214,04	310,62	343,18	315,7	306,11	210,85	213,61	269,42
243,91	177,49	329,93	108,97	268,47	267,17	470,53	289,61	292
121,93	264,48	284,87	206,4	289,66	188,85	252,51	181,57	285,38
255,9	240,36	333	243,85	237,38	208,03	266,28	133,41	353,99
303,27	263,02	222,25	421,14	506,41	239,17	315,66	312,46	282,98
302,08	183,22	259,19	210	224,72	240,56	236	292,59	182,17
297,43	281,09	326,5	214,06	362,68	253,83	241,45	162,92	285,36
162,62	221,81	239,36	314,02	231,94	179,75	316,92	218,32	295,12
175,63	426,16	269,18	196,05	275,82	321,91	249,25	284,03	245,71
170,26	137,13	315,84	174,44	428,78	210,71	166,53	243,88	230,38
235,85	408,72	375,02	269,38	313,77	330,04	730,2	274,84	280,16
153,7	313,9	349,64	228,01	327,17	385,58	391,75	128,52	290,95
303,68	239,47	211,82	307,68	271,6	385,72	172,43	263,96	251,3
107,53	359,75	243,29	348,52	320,82	200,69	271,69	262,13	346,88

72 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	205,43	220,34	379,17	289,65	190,74	196,57	187,15	353,32	303,9
	382,82	176,81	267,78	390,2	233,24	324,75	136,92	320,98	277,76
	327,59	330,39	257,59	276,06	165,52	288,39	157,71	378,56	404,06
	249,1	177,86	313,56	247,23	213,13	298,9	158,02	277,84	279,58
	281,47	251,79	221,2	276,67	259,11	323,19	109,77	327,14	357,73
	171,25	453,36	374,67	151,67	165,97	221,41	213,01	237,36	201,96
	131,6	290,18	206,16	375,51	339,34	299,48	563,19	225,83	257,8
	364,9	217,36	393,15	135,88	224,87	316,87	135,44	185,87	130,32
	311,88	283,25	362,12	175,43	234,46	265,58	216,82	159,34	276,99
	152,48	267,94	237,95	305,08	329,26	414,99	313,2	169,71	298,32
	132,36	197,62	255,41	193,31	161,72	276,96	159,47	367,57	336,71
	277,26	284,46	275,52	256,49	264,83	263,65	171,59	209,03	282,65
	426,97	251,27	211,73	280,64	215,42	284,5	342,61	242,25	415,6
	187,85	155,77	379,88	286,56	404,49	220,53	214,81	240,31	226,45
	193,63	149,44	232,37	363,73	240,56	225,5	159,23	324,18	356,29
	316,07	189,75	348,35	214,09	192,43	295,44	360,12	165,65	234,6
	297,39	224,22	251,37	261	133,75	293,93	257,76	269,31	264,17
	278,82	367,98	264,93	221	399,63	442,72	406,56	303,14	358,94
	301,35	153,15	317,58	213	337,92	202,52	278,36	312,31	329,5
	458,82	111,36	185,07	429,53	185,44	345,24	291,11	290,14	161,49
	272	143,69	206,03	255,09	314,64	230,15	364,21	303,72	255,24
	161,03	160,74	265,65	370,12	203,69	341,54	224,7	294,92	409,03
	252,23	295,85	189,86	204,05	209,39	256,74	276,18	249,75	348,51
	366,41	222,63	331,8	261,38	292,15	322,14	207,82	143,68	261,47
	242,61	186,02	256,37	235,26	397,79	296,56	414,94	218,92	284
	324,04	314,95	250,41	420,79	279,19	238,65	328,29	316,86	379,66
	205,32	226,67	219,35	272,78	108,45	296,85	274,65	297,08	312,5
	300,13	302,65	235,74	237,61	457,12	295,69	220,67	332,17	151,33
	385,92	251,33	301,42	393,23	298,9	171,51	346,56	358,76	307,49
	191,07	278,92	354,38	160,25	145,27	234,24	268,29	314,48	340,42
	235,74	291,39	247,92	220	229,54	238,07	336,96	187,35	398,63
	316,27	325,29	314,76	298,12	256,26	315,97	337,13	163,52	275,83
	179,19	140,04	315,18	274,24	318,99	381,33	351,46	249,55	
	225,54	347,98	233,49	201,59	174,46	248,95	566,98	175,13	
	300,35	165,72	267,91	262,1	244,41	152,13	326,8	185,07	
	266,16	229,14	312,49	319,41	287,98	383,81	251,05	287,98	
	196,91	162,02	150,92	363,93	213,39	223,31	357,38	201,53	
	253,82	224,27	159,61	350,4	161,77	308,6	105,98	161,24	
	179,26	157,53	294,11	588,96	246,23	291,27	486,12	194,3	
	196,35	251,99	251,32	259,72	270,39		250,64	589,24	
	349,31	242,7	308,08	440,13	277,94		255,58	353,17	
	284,95	211,29	403,67	226,44	206,53		211,98	275,09	
	294,22	205,3	149,68	286,81	158,58		344,59	202,41	
	267,64	363,32	261,22	174,07	250,34		235,47	204,59	
	352,03	301,71		500,98	301,87		323,67	242,82	

242,57	193,97		652,31	281,88		290,03	135,59	
157,78	280,38		118,42	194,94		239,43	535,32	
302,64	198,69		165,29	269,62		339,3	192,31	
241,67	285,54		211,48	345,07		270,85	181,13	
333,01	195,45		291,51	371,28		275,53	196,58	

72 h Experiment	C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
		264,9		324,02	241,07		229,81	251,02	
		167,53		297,11	434,29		231,2	280,59	
		215,85		276,49	203,71		321,49	399,2	
		134,64		203,88	207,6		343,82	392,7	
		298,76		239,25	319,48		322,24	278,88	
		207,65		153,37	276,27		165,5	174,47	
		301,16		452,67	222,89		563,68	224,82	
		230,73		344,67	232,56		209,55	192,75	
		178,13		149,42	310,15		320,49	242,04	
		217,06		209,47	455,2		360,95	347,18	
		203,58			190,69		343,07	228,66	
		381,17			178,35		280,38	283,45	
		315,93			243,62		175,91	470,26	
		130,27			304,75		204,78	207,35	
		236,24			255,55		519,1	437	
		414,04			183,52		366,7	193,33	
		182,36			232,37		236,85	241,3	
		380,6			271,89		156,54	388,31	
		283,45			339,29		226,83	205,88	
		236,13			352,14		185,38	234,7	
		172,97			354,84		298,53	494,17	
		220,86			301,38		485,35	198,83	
		139,42			198,48			189,58	
		274,77			156,45			214,37	
		258,64			227,52			323,41	
		259,98			376,4			167,91	
		289,48						300,05	
		341,81						233,05	
		304,39						229,03	
		201,84						263,24	
		261,59						161,86	
		212,44						267,56	
		294,03							
		153,99							
		147,57							
		238,24							
		279,15							
		221,78							
		420,77							

	243,31							
	283,44							
	280,23							
	326,51							
	317,62							
	214,78							
	216,27							
	181,02							

72 h	Anzahl (n) der vermessenen Axone		
	Experiment		
	1	2	3
Kontrolle	104	141	103
C3 ^{bot} 181-211	114	128	99
C3 ^{bot} 154-182	100	147	94
C3 ^{bot} E174Q	110	126	89
C3 ^{bot}	122	132	82

F 5 Experimente C3. 2: Quantitative Analyse der axonalen Verzweigungen in NT2/N-Zellen nach 72 h

Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211			C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	0	1	2	0	1	3	3	1	3	3	1	3	2	1	3
	1	0	4	1	0	2	2	2	2	3	3	4	2	1	0
	0	1	1	1	1	0	2	3	3	2	4	3	3	4	4
	0	1	2	2	0	1	3	3	4	2	2	1	2	3	3
	2	1	0	1	2	1	3	5	2	4	3	2	4	4	3
	1	1	0	2	1	2	2	4	3	3	2	5	2	2	3
	0	2	3	1	3	1	3	3	3	4	3	2	3	3	2
	1	0	2	1	0	2	1	3	2	4	3	4	3	2	3
	1	2	1	0	1	1	3	2	1	1	4	4	2	4	5
	2	1	0	2	3	0	2	2	5	2	0	4	1	0	2
	1	1	5	2	1	3	2	3	1	3	1	2	3	3	1
	0	1	1	1	0	2	5	3	0	1	1	5	2	4	4
	0	3	2	1	1	0	4	5	5	3	3	0	1	4	3
	1	0	0	1	1	1	1	3	6	1	2	2	4	6	4
	2	0	0	0	1	1	3	2	3	3	5	3	1	3	6
	0	1	3	0	2	0	3	1	2	0	2	4	3	3	4
	1	1	0	0	0	0	1	2	3	3	4	2	3	2	5
	1	1	0	1	1	1	4	3	2	4	5	3	2	3	0
	2	0	2	0	2	2	2	2	3	0	2	1	4	1	3
	2	1	2	1	1	2	3	3	3	3	3	3	0	1	2
	1	2	0	2	1	1	2	3	4	3	3	5	3	3	3
	0	3	3	1	0	0	3	6	2	3	3	0	3	3	5
	1	1	0	1	1	1	3	5	4	2	2	2	4	2	3
	1	1	3	1	2	0	2	3	3	6	1	5	2	3	3
	0	2	1	2	1	1	4	4	4	3	4	3	2	5	4
	1	1	1	0	0	2	3	3	2	3	3	3	5	4	6
	2	0	0	0	1	0	3	4	1	5	2	4	0	3	3
	2	2	0	1	1	3	4	2	4	3	3	1	2	3	1
	0	0	1	2	1	0	2	3	3	2	3	5	0	4	3
	1	2	3	2	1	1	2	3	2	3	2	5	3	3	2
	0	1	0	2	2	2	1	4	3	4	2	2	3	4	4
	1	1	0	1	0	0	2	3	2	2	0	3	2	2	1
	1	0	4	0	1	1	3	1	2	3	1	3	3	2	3
	2	2	1	0	3	0	2	0	3	1	4	2	3	3	1
	0	2	0	1	0	3	4	4	5	3	5	4	2	4	4
	1	1	4	2	1	1	5	4	4	2	3	2	4	4	2
	2	0	1	1	2	2	2	2	2	2	4	3	3	3	3
	1	2	0	2	1	0	3	3	5	3	3	1	3	3	5
	0	2	0	0	3	2	2	3	2	0	2	5	2	4	6
	1	0	1	1	0	0	2	2	3	3	2	3	1	1	3
	1	1	0	1	1	1	3	3	2	2	3	4	1	3	5
	2	0	0	2	2	2	4	4	1	4	4	0	5	3	3

0	1	1	0	1	1	2	3	5	1	3	2	3	2	7
0	2	1	1	1	0	3	4	3	2	2	5	4	3	2
1	1	0	0	1	2	1	2	3	3	4	3	2	2	3

Experiment	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211			C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	0	1	0	1	1	1	2	3	4	1	3	6	3	2	4
	0	0	2	1	0	0	4	3	3	1	5	4	4	3	2
	1	1	3	0	2	3	2	2	3	3	3	1	2	4	3
	2	2	1	1	1	0	2	1	2	4	1	3	3	3	3
	4	1	1	3	0	2	3	4	2	2	4	1	1	2	4
	0	1	2	3	1	0	1	5	3	4	3	3	2	5	0
	1	0	2	1	1	1	3	3	1	1	3	5	4	4	5
	1	0	0	1	3	1	2	2	4	2	4	3	2	5	1
	0	2	0	1	1	2	3	5	3	3	3	1	0	3	3
	1	3	1	3	2	1	0	2	5	3	2	3	3	3	0
	1	1	2	1	0	1	3	3	2	5	5	3	3	2	1
	0	1	1	1	1	1	2	3	1	2	1	4	3	1	3
	1	1	3	1	0	1	4	1	5	6	2	1	3	2	1
	1	1	0	1	1	0	3	3	3	2	1	4	3	4	4
	2	0	2	0	2	2	2	3	2	3	4	3	1	1	3
	1	1	2	1	0	0	2	3	0	2	2	4	4	3	2
	2	0	1	0	0	0	5	4	1	0	3	2	5	5	5
	0	1	0	1	1	2	3	2	4	2	2	2	2	6	3
	1	3	1	2	0	2	4	5	3	4	2	3	5	2	4
	2	2	0	2	2	1	2	4	3	3	3	4	5	3	3
	0	0	1	0	1	4	3	3	5	2	4	3	2	6	2
	1	1	1	1	1	2	3	1	0	3	3	5	3	5	2
	0	0	1	3	0	1	4	0	3	1	3	2	1	3	4
	1	1	0	0	2	1	4	4	2	0	4	2	3	3	3
	2	2	1	1	0	0	2	3	4	2	3	3	1	1	0
	1	0	2	1	1	3	3	1	3	3	4	4	2	2	5
	1	3	0	1	0	1	6	2	3	3	3	4	3	3	1
	0	1	1	2	1	2	2	3	1	1	4	2	5	4	2
	2	0	1	1	1	3	3	2	5	3	5	3	4	3	3
	1	1	2	0	2	1	1	2	4	4	3	3	3	4	3
	0	1	0	1	1	0	4	3	7	2	3	1	2	3	2
	1	2	1	1	0	1	3	4	3	0	4	4	3	2	4
	1	1	2	1	2	1	2	2	2	1	3	3	3	3	5

1	0	1	2	0	3	3	6	2	2	2	2	6	4	2
1	2	1	0	2	0	3	3	3	2	2	6	1	3	3
0	2	0	1	3	1	3	3	4	3	2	3	2	3	1
1	1	1	0	1	0	2	4	5	3	4	4	3	2	6
1	1	1	1	1	2	3	2	2	4	5	2	4	4	
2	1	1	2	0	0	4	2	3	3	2	3	3	3	
0	0	2	2	2	1	3	4	2	5	3	3	3	5	
0	0	3	1	1	2	4	3	4	3	4	5	4	3	
1	1	2	2	0	2	2	5	3	2	4	3	1	4	
2	1	1	0	1	1	3	4	5	4	3	2	4	2	
2	2	1	1	1	0	3	2	3	3	3	6	3	0	
0	2	0	3	2		4	3	3	3	4		4	3	
1	1	2	1	0		3	3	2	4	2		3	3	
0	1	3	1	2		4	3	3	2	4		5	2	
1	1	1	1	1		3	3	0	3	3		2	5	
1	0	1	0	2		1	4	6	1	2		4	3	
2	1	3	1	0		4	3		5	3		4	3	

	Kontrolle			C3 ^{bot} 182-211			C3 ^{bot} 154-182			C3 ^{bot} E174Q			C3 ^{bot}		
Experiment	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	1	1	1	1	1		4	1		2	3		3	2	
	1	0	0	0	1		5	4		4	1		5	1	
	3	2	1	4	2		2	3		3	0		2	3	
	0	2	0	0	1		3	2		4	5		2	4	
	1	1	4	0	0		4	3		3	4		3	3	
	3			3			4			4			3		
	1			1			3			2			2		
	0			1			1			4			4		
	0			0			3			3			3		
	2			2			3						4		
	1			1			5						3		
	3						3						2		
	2						4						4		
	1						6						1		
	1						3						3		
	0						3								
	1						4								
	1						3								
	2						3								

1						2								
0						1								
0						2								
1						4								
2						3								
						0								
						1								
						5								
						4								
						3								
						2								

72 h	Anzahl (n) der ausgewerteten Neurone		
	Experiment		
	1	2	3
Kontrolle	119	101	101
C3 ^{bot} 181-211	106	101	96
C3 ^{bot} 154-182	125	100	99
C3 ^{bot} E174Q	104	100	99
C3 ^{bot}	110	100	82

G Curriculum Vitae

Corinna Mühlenstädt, geb. Herrnsdorf

Geburtstag: 03.08.1978

Geburtsort: Wilhelmshaven

Akademischer Werdegang

1985: Einschulung, Grundschule Roffhausen

1987: Grundschule Uhdlingen-Mühlhofen

1989: Gymnasium Überlingen

1991: Gymnasium Marianum Meppen

1998: Abitur am Gymnasium Marianum Meppen

10/1998: Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Osnabrück

11/2000: Vordiplom an der Universität Osnabrück

Gesamtnote „gut“

11/2004: Diplom in Biologie an der Universität Osnabrück,

Gesamtnote „sehr gut“

Titel der Diplomarbeit: „Die Verteilung von Gravin als putativem Organisator von Signaltransduktionspartikeln bei der neuronalen Morphogenese.“

Ab 11/2004: Anfertigung der Dissertation in der Abteilung Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Thema: „Analyse der neurotrophen Wirkung von C3^{bot}, sowie dessen enzymdefizienter Mutante C3^{bot}E174Q an humanen Modell-Neuronen.“

Betreuer: Prof. Dr. Achim Gossler, Prof. Dr. Ingo Just

Wissenschaftliche Methoden

Zellbiologische Methoden

Kultivierung adhärenter und Suspensionszelllinien, Immunhistochemische Untersuchungen, Fluoreszenz- und Konfokal-Laser-Raster-Mikroskopie, Transfektionen, zellbasierte Assays etc.

Proteinbiochemische Methoden

Herstellung rekombinanter Proteine, Proteinaufreinigung, proteinanalytische Verfahren: Immunpräzipitation, ELISA, Western Blot, SDS-PAGE, etc.)

Molekularbiologische Methoden

konventionelle PCR, Elektrophorese, Klonierung, Plasmidisolierung