

**Proteinkinase C (PKC) vermittelte Oberflächenexpression
von Glutamattransportern in kultivierten zerebellären
Körnerzellen der Maus**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Emine Ufuk Karatas-Wulf

aus Ankara

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter : Herr Prof. Dr. P.Kugler

Gutachter: Herr Prof. Dr. E. Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glutamaterge Neurotransmission	1
1.1.1	Glutamatrezeptoren	1
1.1.2	Glutamatttransporter	2
	GLT1v	3
	Regionale, zelluläre und subzelluläre Verteilung.....	3
	Molekulare Struktur.....	4
	Bedeutung.....	4
	EAAC1	5
	Regionale, zelluläre und subzelluläre Verteilung.....	5
	Molekulare Struktur.....	5
	Regulation.....	6
	Bedeutung.....	7
1.2	Kleinhirn.....	9
1.2.1	Zerebelläre Körnerzellkulturen	9
1.3	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Zellkultur	12
2.1.1	Tiere.....	12
2.1.2	Vorbereitung der Deckgläser und Kulturgefäße.....	12
2.1.3	Präparation der Kleinhirne und Anlegen der Zellkultur.....	12
2.1.4	Kulturversuche	14
2.2	Immunfluoreszenzmikroskopie	15
2.2.1	Antikörper.....	15
2.2.2	Fixierung.....	17
2.2.3	Inkubation mit Antikörpern.....	17
2.2.4	Mikroskopieren.....	17
2.3	Immunelektronmikroskopie	18
2.3.1	Perfundieren der Tiere	19
2.3.2	Vibratomschnitte	20
2.3.3	Preembedding	20
2.3.4	Herstellung von Ultradünnschnitten.....	22
2.3.5	Kontrastierung der Ultradünnschnitte	22
2.3.6	Elektronenmikroskopische Auswertung.....	23
2.4	Biotinilierung.....	23
2.5	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	29
2.6	Westernblot-Analyse	30

2.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.6.2	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen.....	31
2.6.3	Immundetektion spezifischer Proteinbanden	31
2.6.4	Nachweis der Sekundärantikörper mit der Chemoluminiszenz-Methode.....	32
2.6.5	Auswertung der Westernblots und statistische Analyse.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Zellanalysen an zerebellären Primärkulturen	34
3.1.1	Spezifitätskontrolle der in der Immunzytochemie verwendeten Antikörper	34
3.1.2	Zelluläre Zusammensetzung.....	35
3.1.3	Immunzytochemischer Nachweis der Glutamattransporter GLT1v und EAAC1	37
3.1.4	Einfluss unterschiedlicher Kaliumkonzentrationen auf die Körnerzellen in Kulturen.....	40
3.1.5	PKC-Aktivierung und -Inhibition in kultivierten Körnerzellen	40
3.2	Westernblot-Analysen an zerebellären Primärkulturen.....	43
3.2.1	GLT1v	44
3.2.2	EAAC1	46
4	Diskussion.....	49
5	Zusammenfassung	55
6	Summary	56
7	Literaturverzeichnis	57
8	Abkürzungen.....	72

1 Einleitung

1.1 Glutamaterge Neurotransmission

Im Zentralnervensystem (ZNS) ist die Aminosäure L-Glutamat eine der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter (Übersicht bei Fonnum et al. 1984; Ottersen und Storm-Mathisen 1984; Collingridge und Lester 1989; Headley und Grillner 1990). Glutamat wird in der präsynaptischen Nervenendigung (Terminale) in synaptischen Vesikeln gespeichert und bei Erregung in den synaptischen Spalt ausgeschüttet (Übersicht bei Südhof 1995; Augustine et al. 1996; Johannes und Galli 1998; Cousin und Robinson 1999). Glutamat bindet dann an Glutamatrezeptoren der postsynaptischen Membran. Es gibt unterschiedliche Glutamatrezeptoren (Übersicht bei Nakanishi et al. 1992; Hollmann und Heinemann 1994; Schoepfer et al. 1994; Borges 1998; Ozawa et al. 1998; Dingledine et al. 1999), die zur Erregungsübertragung benutzt werden (s.u.). Die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt liegt unter Ruhebedingungen im Bereich von 1–3 μM (Fonnum et al. 1984; Shaw et al. 1995) und steigt bei Erregung auf 1–3 mM (Clements et al. 1992) an. Die Signaltransduktion wird dann beendet, wenn Glutamat vom Rezeptor dissoziiert. Dies ist dann der Fall, wenn die Glutamatkonzentration unter die Affinitätsgrenze der Rezeptoren abfällt. Ursache hierfür ist die Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt durch Diffusion und Glutamattransporter (Kanner und Sharon 1978; Brew und Attwell 1987; Wadiche et al. 1995). Die präzise Kontrolle des extrazellulären Glutamatspiegels ist für eine normale Neurotransmission und den Schutz von Neuronen vor Exzitotoxizität wichtig. Im ZNS sind verschiedene hochaffine Na^+ -abhängige Glutamattransporter (s.u.) für die Kontrolle des Glutamatspiegels zuständig.

1.1.1 Glutamatrezeptoren

Glutamatrezeptoren sind Transmembranproteine, die aus mehreren Proteinuntereinheiten bestehen. Besonders groß ist die Dichte von Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Membran glutamaterger Synapsen. Prinzipiell kann man aufgrund der Signaltransduktionsmechanismen zwei Gruppen von Glutamatrezeptoren unterscheiden.

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Kationenkanäle, wobei die Bindungsstelle für den Neurotransmitter und der Ionenkanal in einem transmembranären Makromolekül vereint sind. Aufgrund ihrer pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften werden ionotrope Glutamatrezeptoren in drei Subgruppen unterteilt: NMDA-, Kainat- und AMPA-Rezeptoren (Übersicht bei Nakanishi 1992; Hollmann und Heinemann 1994; Kandel et al. 2000).

Diese Rezeptoren bewirken eine direkte und schnelle synaptische Übertragung. (Hollmann und Heinemann, 1994, Dingledine et al. 1999). Es strömen entsprechend ihrem elektrochemischen Gradienten Na^+ - und z.T. auch Ca^{2+} - Ionen in das Zellinnere, während gleichzeitig K^+ -Ionen aus der Zelle herausströmen. Insgesamt resultiert daraus ein in das Zellinnere gerichteter Ionenstrom, der die Zelle depolarisiert. Deshalb sind alle ionotropen Glutamatrezeptoren exzitatorisch.

Metabotrope Glutamatrezeptoren sind an G-Proteine gekoppelte Rezeptoren. Bis jetzt wurden acht verschiedene metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) identifiziert, die als mGluR1 bis 8 bezeichnet wurden (Übersicht bei Bortolotto und Collingridge 1993; Pin und Duvoisin 1995; Conn und Pin 1997; Michaelis 1998; Kandel et al. 2000). Im Gegensatz zu den ionotropen Rezeptoren sind bei den metabotropen Rezeptoren an der Signaltransduktion mehrere Moleküle beteiligt: Rezeptor, G-Proteine und Effektormoleküle. Die Aktivierung der G-Proteine führt entweder über die Phosphatidylinositol (IP3)-Calciumkaskade und die Phospholipase C (PLC; vermittelt intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung) oder über die Adenylat-Zyklase-Kaskade zur intrazellulären Signaltransduktion. Dabei wird Phosphatidylinositol in Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) gespalten. DAG verbleibt vorwiegend in der Membran und aktiviert dort die Proteinkinase C (PKC). Aufgrund der vielgliedrigen Signaltransduktion führen metabotrope Glutamatrezeptoren zu langsameren aber länger anhaltenden (Sekunden bis Minuten) Änderungen der Neurotransmission (Batchelor et al. 1994; Batchelor und Garthwaite 1997; Tempia et al. 1998).

1.1.2 Glutamattransporter

Für die Entfernung des aus dem synaptischen Spalt diffundierten Glutamats sind hochaffine Glutamattransporter verantwortlich. Diese sind vor allem in Gliazellen, insbesondere Astrozyten, lokalisiert, so dass Glutamat vor allem von diesen beseitigt wird. Das in glutamaterge Neurone aufgenommene Glutamat kann wieder direkt in das Transmitterreservoir überführt werden, während in Astrozyten aufgenommenes Glutamat enzymatisch rasch verändert wird (Übersicht bei Kugler 1993).

Die Glutamataufnahme durch die Glutamattransporter in Neuronen oder Gliazellen ist an den elektrochemischen Gradienten von Na^+ und K^+ gekoppelt (Zarangué und Kavanaugh 1996; Levy et al. 1998). Dabei wird Glutamat zusammen mit drei Na^+ -Ionen und einem Proton in die Zelle hineintransportiert und im Gegenzug wird ein K^+ -Ion aus der Zelle heraustransportiert. Die Aufrechterhaltung der Na^+ - und K^+ Konzentrationsgradienten wird durch die Na^+/K^+ -ATPase gewährleistet (Thomas 1972).

Bisher wurden fünf verschiedene Na^+ -abhängige hochaffine Glutamattransporter (EAATs; Excitatory Amino Acid Transporters 1-5) aus dem ZNS verschiedener Spezies kloniert, die untereinander eine Homologie von ca. 50 % aufweisen (Kanai et al. 1993;

Arizza et al. 1997; Grunewald et al. 2002). Dazu gehören der Glutamat-Aspartat Transporter GLAST (EAAT1; Storck et al. 1992), der Glutamatttransporter GLT1 (EAAT2; Pines et al. 1992), EAAC1 (EAAT3; Kanai und Hediger 1992), EAAT4 (Fairman et al. 1995; Yamada et al. 1996) und EAAT5 (Arizza et al. 1997). Darüber hinaus wurde eine GLT1-Splice-Variante (GLT1v) kloniert (Schmitt et al. 2002; Chen et al. 2002), so dass GLT1 unter physiologischen Bedingungen in mindestens zwei Formen vorliegt.

GLT1, EAAC1 und GLAST liegen nahezu ubiquitär im ZNS vor, während EAAT4 vor allem im Kleinhirn vorkommt und EAAT5 auf die Retina beschränkt zu sein scheint (Danbolt 2001). GLT1 ist der häufigste gliale (astrozytäre) (Danbolt et al. 1990; Pines et al. 1992; Danbolt et al. 1992; Haugeto et al. 1996; Tanaka et al. 1997; Peghini et al. 1997; Lehre und Danbolt 1998) und EAAC1 bzw. GLT1v der häufigste neuronale Glutamatttransporter (Conti et al. 1998; Kugler und Schmitt 1999; Schmitt et al. 2002). Knockoutstudien haben gezeigt, dass 94 % des extrazellulären Glutamats im Vorderhirn über GLT1 in Astrozyten aufgenommen wird (Tanaka et al. 1997).

Da EAAC1 und GLT1v im Mittelpunkt vorliegender Untersuchung stehen, sollen sie im Folgenden genauer beschrieben werden.

GLT1v

Regionale, zelluläre und subzelluläre Verteilung

GLT1v wird von Neuronen und nicht-astrozytären Gliazellen in ZNS und PNS exprimiert. Dabei ist GLT1v nicht nur in glutamatergen Neuronen z.B. in Körner- und Pyramidenzellen des Hippocampus, sondern auch in GABAergen-Neuronen z.B. in Purkinje Zellen der Kleinhirnrinde lokalisiert (Schmitt et al. 2002; Chen et al. 2002).

Hinsichtlich der zellulären und subzellulären Verteilung von GLT1v (Schmitt et al. 2002; Chen et al. 2002) gibt es eine große Übereinstimmung mit dem Glutamatttransporter EAAC1 (Kugler und Schmitt 1999). GLT1v kommt wie EAAC1 neben Neuronen auch in nicht-astrozytären Gliazellen vor, d.h. Oligodendrozyten, Ependymzellen, Epithelzellen des Plexus choroideus, Satellitenzellen der Spinalganglien und Schwannzellen (Schmitt et al. 2002). Für GLT1v wurde jedoch auch eine astrozytäre Lokalisation beschrieben (Chen et al. 2002; Berger et al. 2005).

Subzellulär kommt GLT1v vor allem zytoplasmatisch und zwar in Vesikeln von Neuronen und Gliazellen vor (Schmitt et al. 2002; Chen et al. 2002). Im Gegensatz dazu ist der generische GLT1 (GLT1a) in der Zellmembran von Astrozyten lokalisiert (Übersicht bei Danbolt 2001).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde auch eine präsynaptische Lokalisation von GLT1v gezeigt (Chen et al. 2002). In Übereinstimmung hiermit wurde eine

Anreicherung von GLT1v in präsynaptischen Terminalen von Photorezeptoren nachgewiesen (Kugler und Beyer 2003).

Molekulare Struktur

Die GLT1v-Sequenz hat eine längere nicht kodierende 3'-Region (UTR) als der ursprünglich klonierte GLT1 (GLT1a) und einen längeren Poly(A)-Schwanz. GLT1- und GLT1v-cDNAs zeigen eine Homologie im offenen Leseraster von 97 % mit Sequenzvariationen am 3'-Ende und sind komplett unterschiedlich in der nicht kodierenden 3'-Region. Der offene Leseraster der GLT1v-cDNA kodiert ein Protein mit 562 Aminosäuren, d.h. dass GLT1v um 11 Aminosäure kürzer ist als GLT1. Die C-terminalen 11 Aminosäuren sind bei GLT1v und GLT1a völlig different (Schmitt et al. 2002). Die molekulare Masse von GLT1v beträgt rechnerisch 60,9 kDa. Über das Ausmaß der Glykosylierung von GLT1v ist nichts bekannt. Im Gegensatz zu GLT1v ist GLT1a an zwei Stellen glykosyliert (Gordon und Kanner 1988; Danbolt et al. 1990; Seal und Amara 1999). Ein wichtiger Befund ist, dass GLT1v am gespleißten 3'-Ende ein PDZ-Domänen-Bindungsmotiv aufweist (T-C-I; Schmitt et al. 2002).

Bedeutung

Die Bedeutung des Vorhandenseins der alternativ gespleißten GLT1-Isoformen ist ungeklärt. Funktionsstudien haben auch gezeigt, dass beide Isoformen ähnliche Glutamat-Transporteigenschaften haben. Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden GLT1-Varianten besteht jedoch darin, dass nur GLT1v ein PDZ-Domänen-Bindungsmotiv besitzt (Schmitt et al. 2002). Es wurde gezeigt, dass C-terminale PDZ-Domänen-Bindungsmotive am intrazellulären Transfer von Proteinen (Übersicht bei Daw et al. 2000; Torres et al. 2001) und an der korrekten Membranpositionierung beteiligt sind (Übersicht bei Danbolt 2001). Eine Translokation der GLT1-Variante (GLT1v) von Speichervesikeln zur Zellmembran und umgekehrt ist damit denkbar. Dafür spricht auch, dass im Yeast Two Hybrid Screen GLT1v mit PICK1 (protein interacting with C kinase 1) interagiert (Berger et al. 2005). PICK1 ist nicht nur ein Interaktor mit Proteinkinase C (Staudinger et al. 1995; 1997) sondern auch mit metabotropen und ionotropen Glutamatrezeptoren (Dev et al. 1999; 2000; Boudin et al. 2000; El Far et al. 2000). Die Interaktion zwischen GLT1v und PICK1 ist spezifisch und scheint eine Herabregulation der GLT1-Funktion durch aktivierte Proteinkinase C zu steuern (Lit. bei, Berger et al. 2005).

EAAC1

Regionale, zelluläre und subzelluläre Verteilung

EAAC1 wird nicht nur im ZNS sondern auch in peripheren Geweben exprimiert (Kanai und Hediger 1992; Velaz-Faircloth et al. 1996; Nakayama et al. 1996; Hediger 1999). Seine Expression im Gehirn ist nicht besonders hoch und regional relativ gleichmäßig verteilt. Eine etwas stärkere Expression scheint in Hippocampus, Basalganglien und Bulbus olfactorius vorzuliegen (Conti et al. 1998; Kugler und Schmitt 1999; Utsimi et al. 2001).

Zellulär kommt EAAC1 in glutamatergen und GABAergen Neuronen, z.B. Purkinje-Zellen des Kleinhirns, (Übersicht bei Danbolt 2001) aber auch cholinergen und aminergen Neuronen vor (Übersicht bei Danbolt 2001). Neben Neuronen ist EAAC1 auch in nicht-astrozytären Gliazellen lokalisiert (Kugler und Schmitt 1999). EAAC1 ist in Neuronen vor allem somatodendritisch nachweisbar (Coco et al. 1997; Shashidharan et al. 1997; Conti et al. 1998; He et al. 2000).

Auf subzellulärer Ebene haben die wenigen ultrastrukturellen Untersuchungen ergeben, dass EAAC1 hauptsächlich postsynaptisch außerhalb der Synapse (perisynaptisch) lokalisiert ist (Übersicht bei Danbolt 2001). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine präsynaptische Lokalisation (He et al. 2000). Eine andere wichtige Beobachtung ist, dass EAAC1 vor allem in zytoplasmatischen Vesikeln von Neuronen nachweisbar ist (Davis et al. 1998; Kugler und Schmitt 1999).

Molekulare Struktur

Die molekulare Masse von EAAC1 beträgt ca. 64 kDa. Zur Bildung der Transporterporre soll EAAC1 Oligomere bilden (Yang und Kilberg 2002). EAAC1 besitzt acht bis zehn Transmembrandomänen, die α -helikal angeordnet sind (Kanai und Hediger 1992), wobei N- und C-Termini intrazellulär lokalisiert sind. EAAC1 weist in der großen extrazellulären hydrophilen Schleife zwischen Transmembrandomäne 3 und 4 Glykosylierungsstellen auf (Conradt et al. 1995; Seal und Amara 1999). Glykosylierung scheint eine wichtige Rolle für die Transporteraktivität zu spielen (Ferreze-Martinez et al. 1995). Es wurden mehrere Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) und A (PKA) nachgewiesen. Auch gibt es eine hoch konservierte Konsensussequenz für Phosphorylierung durch Proteinkinase C in der ersten intrazellulären Schleife von EAAC1 (Kanai und Hediger 1992). Die Phosphorylierung hat für die Regulation von EAAC1 Bedeutung (s.u.).

Regulation

Neben verschiedenen gegenwärtig untersuchten Mechanismen, (Trotti 1997a, b; Sims et al. 2000; Gegelashvili et al. 2000; Lin et al. 2001; Butchbach et al. 2002; Najimi et al. 2002; Canolle et al. 2004; Fournier et al. 2004; Zhu et al. 2005), spielt für die Regulation von EAAC1-Aktivitäten vor allem PKC eine wichtige Rolle (s.u.).

Die Mitglieder der PKC-Familie sind monomere 82 kDa große Enzyme, die Serin- und Threonin-Reste vieler Zielproteinen phosphorylieren und dadurch in verschiedene Signalwege eingreifen (Übersicht bei Azzi et al. 1992; Nishizuka et al. 1992; Clemens 1992; Yong 1992; Dekker und Parker 1994).

Die PKC Isozyme liegen als Polypeptide mit einer N-terminalen regulativen Domäne (20-40kDa) und einer C-terminalen katalytischen Domäne (~45kDa) vor. Im Allgemeinen enthalten PKC Isozyme vier konservierte Regionen, nämlich C1-C4. C1 enthält ein Cystein-reiches Motiv und bildet die DAG-Bindungsstelle (Newton 1995). In dieser Region liegt auch eine Pseudosubstratsubdomäne, welche das Ziel für die PKC-Autophosphorylierung ist. C2 enthält die Erkennungstelle für saure Lipide und bei manchen Isozymen die Ca^{2+} -Bindungsstelle. Die C3- und C4-Regionen entsprechen der katalytischen Domäne. C3 und C4 bilden die ATP- bzw. Substratsbindungsstelle.

Die PKC-Familie besteht aus drei Gruppen. Die erste Gruppe (klassische PKC) umfasst drei Mitglieder (α , β und γ), die durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden und Ca^{2+} als Cofaktor benötigen. Die Mitglieder der zweiten Gruppe werden als neue PKC bezeichnet und bestehen aus vier Mitgliedern (δ , ϵ , θ und η). DAG aktiviert auch diese, aber sie benötigen kein Ca^{2+} als Cofaktor. Klassische und neue PKCs werden durch Phorbolster aktiviert. Die dritte Gruppe (atypische PKC) besteht aus zwei Mitgliedern (ζ und λ). Sie benötigen kein Ca^{2+} und sind gegenüber DAG und Phorbolster unempfindlich (Übersicht bei Kazanietz et al. 2000; Newton et al. 2001). Die biologische Wertigkeit der einzelnen Mitglieder der PKC-Familie ist überwiegend ungeklärt. Einige Isozyme haben ein überlappendes Expressionsmuster, während die Expression anderer Subtypen auf spezifische Zelltypen und bestimmte Organelle beschränkt ist. Dies weist darauf hin, dass unterschiedliche Subtypen an der Regulation unterschiedlicher Zellfunktionen beteiligt sein könnten.

PKC-Aktivierung durch Phorbolster führt zu einer starken Zunahme des EAAC1-vermittelten Glutamattransports. Diese Aktivitätszunahme wird durch Translokation von EAAC1-haltigen Vesikeln aus dem Zytoplasma in die Zellmembran hervorgerufen. Dieser Vesikeltransfer kann durch Hemmung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) unterbunden werden (Davis et al. 1998). Entsprechende PKC-vermittelte Translokationen von EAAC1 zur Zelloberflächen wurden vor allem an C6-Gliomazellkulturen (Übersicht bei Robinson 2002), aber auch an primären Neuronenkulturen (Gonzalez et al. 2002; Guillet et al. 2005) nachgewiesen. Demgegenüber berichteten Trotti et al.

(2001), dass die Aktivierung von PKC zu einer Abnahme der EAAC1-Oberflächenexpression in *Xenopus laevis* Oozyten und in MDCK-Zellen führt. Daraus lässt sich schließen, dass die Richtung des Vesikeltransfers vom untersuchten Zelltyp abhängt.

Es wurde gezeigt, dass in C6-Gliomazellen und in primären Neuronenkulturen zwei PKC-Subtypen EAAC1-Aktivitäten beeinflussen können (Gonzalez et al. 2002; 2003). Dabei scheint PKC α die Zunahme der EAAC1-Aktivitäten zu vermitteln, die durch eine Zunahme der Oberflächenexpression von EAAC1 bedingt ist. Demgegenüber scheint PKC ϵ die EAAC1-Aktivität durch einen Mechanismus zu erhöhen, der unabhängig von der Änderung der Transporterzahl in der Plasmamembran ist, möglicherweise durch die Erhöhung der katalytischen Effizienz/Turnover-Zahl des Transporters (Gonzalez et al. 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aktivierung von PKC eine Interaktion zwischen EAAC1 und PKC α fördert. Diese Interaktion ist für PKC α spezifisch und wird durch Bisindolylmaleimid II (ein allgemeiner PKC Inhibitor) und durch Gö6976 blockiert (ein Inhibitor klassischer PKC-Isoformen; Gonzalez et al. 2003). Diese PKC-abhängige Interaktion zwischen EAAC1 und PKC α wurde in C6-Gliomazellen und in Synaptosomen nachgewiesen. Es wurde auch gezeigt, dass PKC α in Lipidrafts lokalisiert ist (Mineo et al. 1998). Solch eine Interaktion könnte so zur Stabilisierung der Transporter an der Plasmamembran beitragen. Oberflächenexpression und Rücknahme von EAAC1 erfolgen rasch. So wurde geschätzt, dass EAAC1 in der Plasmamembran eine Halbwertszeit von 5 bis 7 Minuten hat (Fournier et al. 2004).

Insgesamt ist zu vermuten, dass der Vesikeltransfer durch verschiedene, jedoch miteinander interagierende Signaltransduktionswege geregelt wird (Davis et al. 1998; Robinson 2002; Gonzalez et al. 2003). Es gibt Hinweise, dass die G-Proteine gekoppelte Signaltransduktion, die zur Aktivierung von PKC führt, u.a. durch Aktivierung von prä- und postsynaptischen metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) vermittelt wird (Amaral und Fontana 2002). Auf diese Weise könnte bei einer erhöhten Glutamatfreisetzung und folgender Erregung von mGluRs eine PKC vermittelte Oberflächenexpression von EAAC1 erfolgen, die wieder zur verstärkten Rücknahme von Transmitterglutamat führt.

Bedeutung

Es ist bekannt, dass EAAC1 keine essentielle Bedeutung hinsichtlich der mengenmäßigen Aufnahme von Glutamat aus dem extrazellulären Raum spielt (Rothstein et al. 1996). Diese Aufgabe wird hauptsächlich von den die Neurone umgebenden Gliazellen erfüllt. EAAC1 dürfte jedoch bei der Feinabstimmung neuronaler Glutamattransportsysteme im adulten Gehirn eine Rolle spielen (Nieoullou et al. 2006).

EAAC1 scheint in der Hirnentwicklung als Glutamattransporter wichtig zu sein (Torp et al. 1994; Furuta et al. 1997). Seine Expression geht der von GLAST und GLT1 während der frühen pränatalen Gehirnentwicklung voran, und bleibt nahezu unverändert auch im adulten Gehirn (Sims und Robinson 1999). In primären kortikalen Kulturen wurde gezeigt, dass EAAC1 die extrazelluläre Glutamat-Konzentration (Kulturmedium) in frühen Kulturstadien niedrig halten kann, zu einem Zeitpunkt, an dem die glialen Transporter noch nicht leistungsfähig sind (Guillet et al. 2002).

Eine wichtige Bedeutung scheint EAAC1 in GABAergen Neuronen zu haben. Wird bei diesen der Glutamattransport pharmakologisch inhibiert, führt dies zu deutlich reduzierten, GABA-vermittelten mIPSC (miniature inhibitory postsynaptic current) im Hippocampus (Mathews und Diamond 2003). Dieser Effekt wird so interpretiert, dass EAAC1 Glutamat für GABAerge Zellen als Vorläufer für die GABA-Synthese zur Verfügung stellt. Ähnliche Befunde wurden auch am Hippocampus erhoben (Sepkuty et al. 2002).

An Parallelfaser-Synapsen wurde gezeigt, dass die Glutamataufnahme durch neuronale Transporter die Aktivierung metabotroper Rezeptoren limitiert. Durch die Kontrolle der mGluRs über postsynaptische Glutamattransporter könnte die Langzeitdepression reguliert werden (LTD; Brasnjo 2001). Im Hippocampus ist Langzeitpotenzierung (LTP) mit einer erhöhten Glutamataufnahme und einer vermehrten neuronalen Oberflächenexpression von EAAC1 verbunden (Levenson 2002). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass EAAC1 für die erhöhte Glutamataufnahme während der initialen Phase der Langzeitpotenzierung (E-LTP) und GLT1 für die spätere Phase der Langzeitpotenzierung (L-LTP) verantwortlich sind. Auch wurde beobachtet, dass die Glutamataufnahme nach LTP-Induktion innerhalb von Minuten zunimmt, und diese Aufnahmeerhöhung für mindestens drei Stunden anhält (Pita-Almenar et al. 2006).

Neben einer Glutamataufnahme wurde auch gezeigt, dass EAAC1 wegen der hohen Affinität für Cystein den Neuronen Cystein zur Verfügung stellen kann (Shanker et al. 2001), das zur Synthese von Glutathion (ein Hauptantioxidans) wichtig ist (Dringen et al. 2000). An neuronalen Primärkulturen wurde nachgewiesen, dass die Hemmung der Cysteinaufnahme zur Abnahme der neuronalen Glutathionsynthese führt (Chen und Swanson 2003; Himi et al. 2003). Die Blockade der Glutathionbiosynthese kann Neurodegeneration und neuronalen Zelltod zur Folge haben (Jain et al. 1991; Schulz et al. 2000).

1.2 Kleinhirn

Das Kleinhirn (Cerebellum) dient der Koordination und Feinabstimmung der Motorik und ist für die Regulation des Muskeltonus zuständig (Morton und Bastian 2004).

In der Kleinhirnrinde kommen mindestens 6 verschiedene Neurontypen vor. Neben Korb-, Stern-, Golgi-, monodendritischen und Purkinjezellen sind Körnerzellen zahlenmäßig am häufigsten (Übersicht bei Chan-Palay und Palay 1987; Altman und Bayer 1997). Im Kleinhirn des Menschen sind ca. $10,9 \times 10^{10}$ Körnerzellen enthalten (Andersen et al. 2003), wodurch die Kleinhirnrinde deutlich mehr Neurone als die Großhirnrinde enthält (Pakkenberg und Gundersen 1997).

Die Kleinhirnrinde weist eine Gliederung in drei Schichten auf (Übersicht bei Chan-Palay und Palay 1987): eine äußere Molekularschicht (Str. moleculare), eine mittlere Purkinje-Zellschicht (Str. purkinjense) und eine innere Körnerzellschicht (Str. granulosum). In der zellarmen Molekularschicht befinden sich die Axone der glutamatergen Körnerzellen (sog. Parallelfasern) und die reichverzweigten Dendritenbäume der GABAergen Purkinje-Zellen. Die Parallelfasern bilden mit ihren Varikositäten exzitatorische Synapsen mit den dendritischen Dornen (Spines) der Purkinjezellen aus. In der Molekularschicht kommen auch die GABAergen, Korb- und Sternzellen vor. Sie sind Interneurone mit inhibitorischer Wirkung auf die Purkinje-Zellen. Im Str. purkinjense sind die Perikarya der Purkinje-Zellen und im Str. granulosum die sehr kleinen, dicht gelagerten Körnerzellen und die deutlich größeren und selteneren Golgi-Zellen lokalisiert. Die Axone der Purkinje-Zellen bilden die alleinigen Efferenzen der Kleinhirnrinde (Übersicht bei Llinas 1981). Im Str. granulosum kommen glomeruli cerebellares vor. Sie sind kleine zellfreie Areale, in deren Zentrum sich die Moosfaserterminale befinden. Mit den Moosfaserterminalen bilden Dendriten von benachbarten Körnerzellen und auch von Golgi-Zellen Synapsen aus.

Afferenzen aus verschiedenen ZNS-Gebieten erreichen die Kleinhirnrinde im Wesentlichen über zwei exzitatorische Fasersysteme, die Kletter- und die Moosfasern. Die glutamatergen Kletterfasern terminieren an den Stammdendriten der Purkinje-Zellen, während die glutamaterge Moosfasern (s.o.) exzitatorische Synapsen mit den Körnerzellendriten ausbilden (s.o.). Die Körnerzellen wiederum erregen mit ihren Parallelfasern die Purkinje-Zellen (s.o.).

1.2.1 Zerebelläre Körnerzellkulturen

Die Entwicklung des Kleinhirns erfolgt deutlich später als die des Großhirns. So haben morphologische Untersuchungen am Kleinhirn der Ratte gezeigt, dass Purkinje-Zellen zwischen Embryonaltag 13 und 16, Golgi-Zellen zwischen Embryonaltag 19 und

Postnataltag 8 entstehen (Altman und Bayer 1997, Hatten und Heintz 1995, Zhang und Goldman 1996a, b) und Körnerzellen, Korb-, und Sternzellen im wesentlichen erst postnatal differenzieren. Dadurch ist das postnatale Kleinhirn zur Herstellung neuronaler Primärkulturen geeignet.

Primäre Zellkulturen des postnatalen Kleinhirns (meist zwischen Postnataltag 4 und 8 angelegt) enthalten mehr als 90 % glutamaterge Körnerzellen (Thangnipon et al. 1983; Kingsbury et al. 1985) und eine kleine Population von GABAergen Neuronen (Schousboe et al. 1989; Sonnewald et al. 2004) und Gliazellen (Thangnipon et al. 1983). Nach 4-5 Tage in Kultur zeigen die meisten Körnerzellen (78 %) die Morphologie von multipolaren Neuronen, die denen *in situ* ähnlich sind (Powell et al. 1997; Zmuda und Rivas 1998). Körnerzellkulturen sind ein etabliertes und gut charakterisiertes neuronales Primärkultursystem, das zum Studium verschiedener Hirnfunktionen verwendet wurde (Altman 1982; Gallo et al. 1987; Burgoyne und Cambray-Deakin 1988; Balazs et al. 1988b; Cox et al. 1990; Balazs et al. 1992; D'Mello et al. 1993; Galli et al. 1995; Dargent et al. 1996; Tanabe et al. 1998; Guerini et al. 1999; Padmanabhan et al. 1999).

Die kultivierten Körnerzellen besitzen reich verzweigte Neuriten mit vielen unterschiedlich großen Varikositäten. Die Varikositäten enthalten Anhäufungen von Vesikeln und liegen präsynaptisch zu Dendriten, vermutlich von Körnerzellen (Anelli et al. 2000). Obwohl die meisten dieser Vesikeln recycelbar sind und vermutlich äquivalent zu den synaptischen Vesikeln sind (Marxen et al. 1999), wurden sie als synaptische Vesikel ähnliche Vesikel (SVV) bezeichnet, da die Neuriten von Körnerzellen in Kultur keine morphologisch typischen Synapsen untereinander ausbilden (Urakubo et al. 2003).

Hohe Kalium-Konzentrationen (z.B. 25 mM KCl), die zu einer chronischen Depolarisation führen, sind für das längerfristige Überleben von Körnerzellen in Kultur wichtig (Lasher und Zagon 1972; Levi et al. 1984; Gallo et al. 1987; Balazs et al. 1988a). Körnerzellen überleben unter physiologischen Kaliumkonzentrationen (5 mM KCl) 5 bis 6 Tage bei stetiger Abnahme der Zellzahl, während bei chronischer Depolarisation deutlich mehr Körnerzellen für mehrere Wochen überleben. Eine chronische Depolarisation von Körnerzellen in Kultur verursacht einen anhaltenden Ca^{2+} -Einsturm durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Erhöhtes zytosolisches Ca^{2+} aktiviert Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, die schließlich das Überleben der Körnerzellen sichern (Gallo et al. 1987; Connor et al. 1987; Kingsbury und Balázs 1987; Balázs et al. 1988a; 1989; Becherer et al. 1997). Die für das Überleben von kultivierten Körnerzellen wichtigen Dauerdepolarisationen sollen die *in situ* durch Moosfasern ausgelösten Erregungen imitieren (Gallo et al. 1987; Balazs et al. 1988a; Hack et al. 1993).

Von Bedeutung ist weiterhin, dass in Kleinhirnkulturen die meisten PKC-Isoformen nachweisbar sind und dass eine Phorbolster-Behandlung eine Translokation von allen

klassischen und neuen PKC-Isoformen aus dem Zytoplasma in die Zellmembran verursacht (Popp et al. 2006).

1.3 Fragestellung

Untersuchungen über Translokation und Oberflächenexpression von EAAC1 liegen in der Literatur bereits vor (Davis et al. 1998; Trotti et al. 2001; Robinson 2002; Gonzalez et al. 2002; Guillet 2005). Die Bedeutung der PKC für die Zelloberflächenexpression von EAAC1 wurde an C6-Gliomazellen bzw. an primären kortikalen Neuronen gezeigt (Davis et al. 1998; Gonzalez et al. 2002; Guillet 2005). Biotinilierungs- und Immunblot-Experimente ergaben dabei, dass die Oberflächenexpression von EAAC1 durch PKC-Aktivierung mittels Phorbol ester zunimmt und nach PKC-Inhibition mittels Bisindolylmaleimid II, Gö6976 oder Staurosporin abnimmt (Davis et al. 1998; Gonzalez et al. 2002; Guillet et al. 2005).

Da eine ähnliche zelluläre und subzelluläre Verteilung von GLT1v wie bei EAAC1 vorliegt und zudem GLT1v ein PDZ-Domänen-Bindungsmotiv aufweist, sollte in der vorliegenden Untersuchung herausgefunden werden, ob die GLT1v-Oberflächenexpression ähnlich reguliert wird wie die von EAAC1. Hierfür wurden Körnerzellkulturen aus der Maus verwendet und der Einfluss der PKC-Aktivierung und -Inhibition auf die subzelluläre Verteilung von GLT1v untersucht. Als Methoden wurden Immunfluoreszenzmikroskopie, Biotinilierungs- und quantitative Westernblot-Methoden eingesetzt. Zum Vergleich erfolgte mit denselben Methoden der Nachweis von EAAC1.

Eine weitere Zielsetzung war, herauszufinden, ob der elektrophysiologische Status der Körnerzellen eine Bedeutung für eine mögliche PKC-vermittelte Oberflächenexpression von GLT1v und EAAC1 hat. Hierzu wurden Körnerzellen unter chronischer Depolarisation (27 mM KCl) und ohne Aktivierung (5 mM KCl) kultiviert und miteinander verglichen.

Außerdem sollte mittels Preembedding-Immungold-Elektronenmikroskopie herausgefunden werden, ob Körnerzellen des adulten Kleinhirns der Maus eine ähnliche Verteilung von GLT1v und EAAC1 aufweisen wie in Kultur.

	25 mM NaHCO ₃
	14 mM D-Glukose
	Phenolrot (eine Spatelspitze)
	3 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA; Sigma)
	1,2 mM MgSO ₄ (Sigma)
Lösung 2:	0,25 mg/ml Trypsin (Typ I, Sigma)
	ad Lösung 1
Lösung 3:	12,8 µg/ml DNase I (Sigma)
	83 µg/ml soybean Trypsin Inhibitor (Sigma)
	ad Lösung 1
Lösung 4:	80 µg/ml DNase I
	0,52 mg/ml soybean Trypsin Inhibitor
	1,5 mM MgSO ₄
	ad Lösung 1
Lösung 5:	1,2 mM MgSO ₄
	0,1 mM CaCl ₂ (Sigma)
	ad Lösung 1

Kulturmedium

Basal Eagle's Medium (BME; Biochrom, Berlin)

10 % (v/v) Fetales Kälberserum (FCS; Biochrom)

2 mM Glutamin (Sigma)

100 µg/ml Gentamycin (Sigma)

Kleinhirnpräparation

Die 5-6 Tage alten Mäuse wurden dekapitiert und die Köpfe mit 70 % Ethanol abgespritzt. Nachdem die Schädelkalotte seitlich aufgeschnitten und das Gehirn freipräpariert worden waren, wurde das Kleinhirn mit einer feinen, gebogenen Pinzette entfernt. Die Kleinhirne wurden in eine Petrischale mit Lösung 1 überführt. Anschließend wurden Meningen und anhaftende Blutgefäße entfernt. Die weiteren Präparationsschritte wurden auf der Sterilbank durchgeführt.

Die Kleinhirne wurden mit einem Skalpell zerkleinert, mit 10 ml Lösung 1 in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 Min. bei 900 U/min (Heraeus Minifuge 1.0) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit 7 ml Lösung 2 (Trypsin) überschichtet, aufgeschüttelt, in eine 6 cm Petrischale überführt und 13 Min. bei 37° C in einem Brutschrank inkubiert. Es folgten die Zugabe von 7 ml Lösung 3 und eine Zentrifugation der Präparation (3 Min. bei 900 U/min).

Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet wurden 2 ml Lösung 4 (DNase I und Trypsininhibitor) pipettiert. Die Gewebepreparation wurde daraufhin mit einer Pasteurpipette mechanisch dissoziiert (Trituration). Die scharfe Schnittkante an der Öffnung der Pasteurpipette wurde vorher mit einem Bunsenbrenner rundgeschmolzen.

Bei der Trituration wurden die Gewebestücke langsam zehnmal in die Pasteurpipette gesogen und wieder ausgeblasen. Nach zehnminütiger Wartezeit, in der sich noch nicht dissoziierte Gewebeteile am Boden absetzen, wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Dissoziation des Bodensatzes wurde die beschriebene Trituration noch einmal wiederholt.

Zur Zellsuspension (gesammelte Überstände) wurden 3 ml Lösung 5 (Calcium-Magnesium) gegeben und für 10 Min. bei 900 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette (s.o.) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml bestimmt. Die Zählung von den Zellkernen erfolgte mit einer gängigen Zählmethode in der Neubauer-Kammer.

Anlegen der Zellkulturen

Die Zellsuspension wurde auf die 35 mm Petrischalen bzw. 6-Well-Platten (s.o.) so verteilt, dass eine Zahl von 90.000 Zellen/cm² bzw. 170.000 Zellen/cm² resultierte.

Die Zellen wurden im Brutschrank unter Begasung mit 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit bei 37° C kultiviert. Um eine Gliaproliferation zu unterbinden, wurde den Kulturen 10 µM Cytosine-Arabinofuranoside/HCl (Sigma) 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen zugesetzt. Es erfolgte kein weiterer Medienwechsel. Die Kulturen wurden nach einer Kultivierungsdauer von 4 bis 6 Tagen für die Kulturversuche verwendet.

2.1.4 Kulturversuche

Die ruhenden Körnerzellen wurden in einem Kulturmedium mit 5 mM Kalium kultiviert, während die chronisch depolarisierten Körnerzellen mit 27 mM Kalium (Endkonzentration) kultiviert wurden. Für PKC-Experimente wurden beide Kulturtypen benutzt.

Der PKC-Aktivator Phorbol-Myristat-Acetat (PMA; Sigma) und der PKC Inhibitor Staurosporin (Calbiochem; Darmstadt) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma) gelöst. Die Kulturen wurden nach Zugabe von 100 nM PMA oder 1 µM Staurosporin

zum Kulturmedium für eine halbe Stunde bei 37° C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Kulturen nur mit DMSO behandelt. Die DMSO-Endkonzentration im Kulturmedium betrug 0.1% (v/v).

2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.2.1 Antikörper

Folgende **Primärantikörper** wurden verwendet:

- EAAC1:** Es handelte sich um einen Peptidantikörper gegen den Glutamattransporter EAAC1, der im Kaninchen hergestellt worden war (Kugler und Schmitt 1999). Die zur Immunisierung verwendete Peptidsequenz lautet: I-V-N-P-F-A-L-E-P-T-I-L-D-N-E-D-S-D-T-K (Kanai und Hediger 1992; Kanai et al. 1995). Das Immuneserum wurde 1:100 verdünnt.
- GLT1v:** Der Peptidantikörper gegen den Glutamattransporter GLT1v war im Kaninchen hergestellt worden (Schmitt et al. 2002). Die zur Immunisierung verwendete Peptidsequenz lautet: K-V-P-F-P-F-L-D-I-E-T-C-I (Schmitt et al. 2002). Das Immuneserum wurde 1:100 verdünnt.
- GLAST:** Der Peptidantikörper gegen den Glutamattransporter GLAST war im Kaninchen hergestellt worden (Schmitt et al. 1997). Die zur Immunisierung verwendete Peptidsequenz lautet: Q-L-I-A-Q-D-N-E-P-E-K-P-V-A-D-S-E-T-K (Storck et al. 1992; Lehre et al. 1995). Der affinitätsgereinigte Peptidantikörper wurde 1:100 verdünnt.
- VGLUT1, 2:** Die polyklonalen Antikörper gegen vesikuläre Glutamattransporter VGLUT1 und 2 stammten aus dem Meerschweinchen und wurden von der Firma Chemicon (Hofheim) bezogen. VGLUT1 und 2 sind Membranproteine synaptischer Vesikel glutamaterger Terminale (u.a. Takamori et al. 2000; Bai et al. 2001; Fremeau et al. 2001). Die Antikörper wurden 1:5000 verdünnt.

- GAP43:** Der gegen das Growth-Associated Protein 43 (Sigma) gerichtete Antikörper war ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (Jacobson et al., 1986; Meiri et al., 1991). GAP43 ist neuronenspezifisch und in den Zellmembranen von Perikarya und Fortsätzen lokalisiert (Burry et al. 1991). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.
- Synaptophysin:** Ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Synaptophysin wurde von der Firma Sigma bezogen. Synaptophysin ist ein Membranprotein synaptischer Vesikel (Jahn et al., 1985; Wiedenmann 1985). Der Antikörper wurde 1:100 verdünnt.
- NeuN:** NeuN (Neuronal Nuclei) ist ein neuronales Protein in überwiegend nukleärer Lokalisation. Seine Expression im Kleinhirn ist auf Körnerzellen beschränkt (Weyer und Schilling 2003). Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen NeuN (Chemicon) in einer Verdünnung von 1:100 benutzt.
- PKC (α , β , γ):** Der gegen die Proteinkinase C (α -, β -, γ -Untereinheiten) (Chemicon) gerichtete Antikörper war ein monoklonaler Antikörper aus der Maus. Der Antikörper wurde 1:100 verdünnt.

Folgende **Sekundärantikörper** wurden verwendet:

Sekundäre Antikörper, an die Indocarbocyanin (Cy3, rot) bzw. an die Carboocyanin (Cy2, grün) gekoppelt war, wurden von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen. Die Seren stammten aus der Ziege und waren gegen die Primärantikörper aus Maus, Kaninchen oder Meerschweinchen gerichtet.

Die Verdünnungen der sekundären Antikörper waren: Anti-Kaninchen IgG-Cy3: 1:800; Anti-Maus IgG-Cy2: 1:200; Anti-Meerschwein IgG-Cy2 1:400.

Die Spezifität von Antikörpern, die für die Immunzytochemie benutzt wurden, wurde mittels Westernblot-Analyse (s.u.) an der Lysat-Fraktion (Kontroll-Lysate; s.u.) überprüft. Als Positivkontrolle diente der Nachweis von EAAC1, GLT1v und GLAST am Kleinhirnhomogenat aus der Maus (Kugler und Schmitt 1999; Schmitt et al., 2002). Die Negativkontrollen erfolgten ohne Primärantikörper und ergaben keine positive Immunreaktion (Abb. 3.1, s. Ergebnisse).

2.2.2 Fixierung

Die Kultur-Deckgläser wurden mit PBS gespült und 5 Min. in Methanol bei -20°C fixiert. Anschließend wurden sie dreimal 1 Min. mit PBS gespült. Damit sich die Antikörperlösung auf den Deckgläsern gleichmäßig verteilen konnte, wurden die Deckgläser in 0.05 % (v/v) Tween 20 (Sigma) in PBS eingetaucht und sofort für die weitere Inkubation verwendet.

2.2.3 Inkubation mit Antikörpern

Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um eine Austrocknung zu verhindern. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 0.1 % (v/v) BSA-c (Rinderserumalbumin, Biotrend, Köln), 10 % (v/v) normalem Ziegen Serum (NGS; Sigma) und 0.05 % (v/v) Tween 20 in PBS für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Für den gleichzeitigen Nachweis zweier Antigene wurde eine Doppelimmunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden die Antikörperlösungen vom ersten und zweiten Antikörper in den angegebenen Verdünnungen (s.o.) zusammenpipettiert. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte für 24-72 h bei 4°C . Anschließend wurden die Antikörperlösung verworfen und die Deckgläser dreimal 5 Min. mit PBS gespült (zur Beseitigung nicht gebundener Antikörper). Die Inkubation mit einem entsprechenden sekundären Antikörper (s.o.) erfolgte für 45 Min. bei Raumtemperatur. Danach wurden die Deckgläser dreimal 5 Min. mit PBS gespült und kurz in A. bidest. eingetaucht. Zuletzt wurden die Präparate mit 1 % (w/v) n-Propylgallat (3,4,5-Trihydroxybenzolsäure n-propylester: Fluka, Berlin) in 60 % iger (v/v) Glycerinlösung auf Objektträger montiert. N-Propylgallat verzögert nach Giloh und Sedat (1982) das Ausbleichen der Präparate durch kurzwelliges Licht.

2.2.4 Mikroskopieren

Die Beobachtung und die Aufnahmen der Präparate erfolgten mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510 bei Zeiss, Oberkochen). Der Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie (Abb 2.1) besteht darin, dass das von einer Probe emittierte Licht aus einer einzigen Ebene gesammelt werden kann. Eine zur Fokusebene konjugiert angeordnete Lochblende (Pinhole) sorgt dafür, dass sämtliches nicht aus dieser Ebene stammende Licht vom Detektor nicht erfasst wird. Der durch punkt- und zeilenweises Abtasten mit einem Laserstrahl erzeugte optische Schnitt ist eine kontrastreiche, in x-, y- und z-Achse hochaufgelöste Abbildung der Probe.

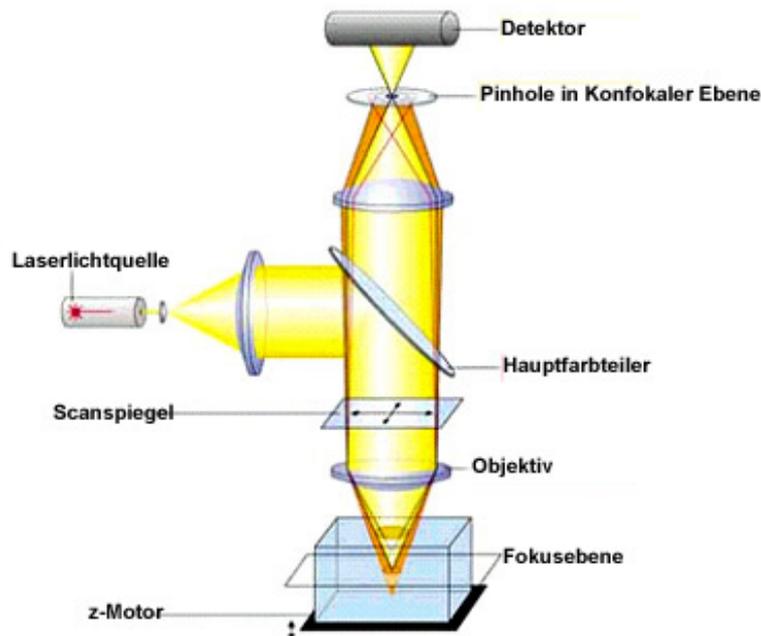


Abb. 2.1: Strahlengang des Anregungs- und Emissionslichtes im konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Die konfokale Blende (Pinhole) ermöglicht die Erzeugung von optischen Schnitten, indem sie Fluoreszenzsignale aus nichtfokussierten Ebenen ausblendet.

Am LSM wurden die Zellen mit einem 63 x / 1.4 Oil Plan-Apochromat-Objektiv optisch mit 1 oder 0,5 μm Schrittweiten beobachtet und digital aufgenommen. Die Anregung von Cy2 (grün) erfolgte bei 488nm (Ar-Laser, 30mW nominale Ausgangsleistung, Pinhole = 130 μm) und die von Cy3 (rot) bei 543nm (HeNe-Laser, 1 mW nominale Ausgangsleistung, Pinhole = 130 μm). Fluoreszenzsignale beider Wellenlängen wurden simultan aufgenommen [AOTF (akusto-optischer Filter), jeweils 50%]. Die Bilder wurden mit dem Software System Zeiss LSM Image Browser Version 3.1.0.99 dargestellt und digital gespeichert.

2.3 Immunelektronmikroskopie

Für die Untersuchung der Lokalisation von EAAC1 und GLUT1v in der Kleinhirnrinde der adulten Maus auf ultrastruktureller Ebene wurde die Immunelektronmikroskopie mittels Preembedding-Technik eingesetzt.

Im Folgenden werden nur die optimalen Nachweisbedingungen beschrieben. In Vorversuchen wurden verschiedene Fixationskonzentrationen und Kombinationen [4 % Formaldehyd, 2 % (w/v) Formaldehyd oder 2 % (w/v) Formaldehyd mit 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd oder 4 % (w/v) Formaldehyd und 15 % gesättigter Pikrinsäure in 0,1 M Phosphat-

puffer (pH 7,2) mit 0,05 % (v/v) Glutaraldehyd (Somogyi und Takagi 1982)], die Gefriersubstitution und auch die Postembedding-Technik getestet. Die dabei erzielten Ergebnisse waren den im Folgenden beschriebenen Preembedding-Ergebnissen unterlegen.

2.3.1 Perfundieren der Tiere

Um eine optimale Strukturhaltung des Gewebes zu gewährleisten, wurden die Mäuse perfusionsfixiert. Die Mäuse wurden mit Äther narkotisiert und dann auf einem Operationstisch fixiert. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet, das Herz aus dem Herzbeutel freipräpariert und die Tiere über eine in den linken Herzventrikel eingeführte Kanüle perfundiert. Die Tiere wurden erst mit einer physiologischen Kochsalzlösung (0.9 % w/v NaCl in PBS) vorgespült, um das Blut auszuwaschen. Zur Vermeidung von Thrombenbildung wurden 1,333 g/ml Liqemin N25.000 (Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen) der Kochsalzlösung zugegeben. Nach der Vorspülung folgte die Fixierung, indem 2 Fixationslösungen mit unterschiedlichem pH (s.u.) nacheinander durch das Gefäßsystem der Tiere gespült wurden. Bei dieser Fixation handelte es sich um die sog. Doppel-pH-Methode (Berod et al. 1981; Liposits et al. 1986).

Doppel pH-Methode

Fixans 1	4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA; Appli-chem, Darmstadt) in 0,2 % (w/v) Natriumacetat, pH 6.5 für 10 Min.
Fixans 2	4 % PFA (w/v) in 0,1 M Natriumkarbonat/bikarbonat pH 11 und 0,02 % (v/v) Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe) für 15 Min.

Nach der Perfusionsfixation wurden die Tiere eine Stunde mit dem inkorporierten Fixans belassen (Nachfixation *in situ*). Die Tiere wurden dann dekapitiert und die Kopfhaut, das Schädeldach und die Hirnhäute entfernt. Das Gehirn wurde mit einem Spatel nach Durchtrennung der Hirnnerven von der Schädelbasis gelöst. Das abgetrennte Kleinhirn wurde anschließend für 2 h bei Raumtemperatur in Fixans 2 ohne Glutaraldehyd postfixiert. Nach der Postfixation wurde das Kleinhirn mehrmals in PBS gespült.

2.3.2 Vibratomschnitte

Mit Hilfe des Vibratome Leica VT 1000S (Leica, Bensheim) wurden 50 µm dicke frontale Kleinhirnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend in einer kryoprotektiven Lösung bei -40° C für die weiteren Inkubationen aufbewahrt oder sofort verwendet.

Kryoprotektive Lösung: 30 % (v/v) Ethylenglykol
25 % (v/v) Glycerin in 0,05 M PB

2.3.3 Preembedding

Alle im Folgenden beschriebenen Inkubationen erfolgten als flottierende Inkubation der Vibratomschnitte in 12-Well-Platten.

Folgenden Lösungen und Antikörper wurden verwendet:

Lösungen

Blocklösung: 0,01 M PBS
5 % (v/v) Normales Ziegen Serum (NGS)

Inkubationslösung: 0,1 % (w/v) BSA-c (von Aurion; Biotrend, Köln)
1 % NGS (v/v)
0,05 % (w/v) Natriumazid

Primärantikörper

anti-EAAC1-Immunsereum vom Kaninchen: 1 : 250 oder 1 : 500

Affinitätsgereinigter anti-EAAC1-Antikörper (Kugler und Schmitt 1999): ca. 5 µg/ml

anti-GLT1v Immunsereum vom Kaninchen: 1 : 250 oder 1 : 500

Affinitätsgereinigter anti-GLT1v-Antikörper (Schmitt et al. 2002): ca. 5 µg/ml

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen goldmarkierter Antikörper Ultrasmall (von Aurion; Biotrend, Köln) 1:80

Durchführung

Nach mehrmaligem Spülen wurden die Vibratomschnitte mit 0,1 % (w/v) Natriumborhydrid (Serva, Heidelberg) in PBS für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um Aldehyd-Gruppen zu inaktivieren. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS gespült. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurden die Gewebeschnitte 1 h bei Raumtemperatur in der Blocklösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den affinitätsgereinigten Primärantikörpern bzw. Immunsereen, die mit der Inkubationslösung verdünnt wurden. Um Kontaminationen der Präparate zu vermeiden, wurde 0,05 % (w/v) Natriumazid zugegeben. Die Schnitte wurden 72 h bei 4° C auf dem Schüttler bei niedriger Frequenz inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte sechsmal 10 Min. in PBS gespült und mit dem Sekundärantikörper, der mit der Inkubationslösung verdünnt wurde, für weitere 48 h inkubiert.

Als Negativkontrolle diente die Inkubation ohne Primärantikörper.

Nach den Antikörperinkubationen wurden die Schnitte sechsmal 10 Min. in der Inkubationslösung und zweimal 10 Min. in PBS gespült. Anschließend wurden die Schnitte in 2 % (v/v) Glutaraldehyd postfixiert und danach viermal 10 Min. mit A. bidest. gespült. Die in den Vibratomschnitten gebundenen Goldkörner wurden zum einen für die lichtmikroskopischen Beobachtung und zum anderen für die Elektronenmikroskopie mit dem R-Gent SE-EM Versilberungskit (von Aurion; Biotrend, Köln) verstärkt.

Die Entwicklung der Reaktion wurde lichtmikroskopisch beobachtet und der Zeitpunkt einer sichtbaren Immunreaktion (nach ca. 2 h) ermittelt. Die Versilberung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie erfolgte entsprechend dieser Zeitvorgabe, aber zur Vermeidung übergroßer Silberaggregate ca. 30 Min. kürzer (insgesamt ca. 90 Min.). Die Schnitte wurden dann viermal in A. bidest. gespült, 1 h mit 1 % Osmiumtetroxid (OsO₄; Roth, Karlsruhe) gelöst in PBS im Dunkeln postfixiert und dann dreimal 15 Min. mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Entwässerung des Gewebes in der aufsteigenden Alkoholreihe: 30-, 50-, 70-, 80-, 90-, 96- und zweimal 100%igem Ethanol jeweils für 5 Minuten. Dann wurden die Schnitte für 2 x 30 Min. in Propylenoxid (Roth, Karlsruhe) und über Nacht in Propylenoxid / Epon-Glycidether (Serva, Heidelberg) im Verhältnis 1:1 inkubiert. Abschließend erfolgte die Infiltration mit Epon 4 h bei Raumtemperatur.

Nach der Infiltration wurden die Schnitte zwischen zwei Aclarfolien (Plano, Wetzlar) auf einer Teflonplatte ausgebreitet und mit Gewichten beschwert (Flacheinbettung). In einem Inkubator erfolgte bei 60° C für 24 h die Kunstharzpolymerisation. Eine Folie wurde dann entfernt und aus den Präparaten unter stereomikroskopischer Kontrolle kleine, gut angefärbte Regionen mit Hilfe einer Federschere ausgeschnitten. Diese wurden auf einen Epon-Leerblock mit Epon aufgeblockt und nochmals für 24 h polymeri-

siert. Die Reihenfolge im Blockpräparat war von oben nach unten: Aclarfolie - Schnitt - Leerblock.

2.3.4 Herstellung von Ultradünnschnitten

Nach der Einbettung wurde mit einer Rasierklinge ein pyramidenförmiger Block getrimmt und dieser in einen speziellen Präparatehalter eingespannt. Mit einem Ultramikrotom (Ultracut E; Reichert-Jung, Wien, Österreich) (bestückt mit einem Glasmesser) wurden die oberflächlichen 4 μm des Blocks abgetragen und verworfen, um die oberflächlich gebundenen unspezifischen Silberaggregate zu entfernen. Dann wurde ein 0,5 μm dicker Semidünnschnitt auf einen Objektträger aufgezogen und mit Methylenblau gefärbt, bei 60° C getrocknet und ein geeignetes Areal der Kleinhirnrinde lichtmikroskopisch ermittelt. Dieses Areal wurde dann unter der Stereolupe mit einer Rasierklinge aus dem Block getrimmt. Danach wurden mit einem Diamantmesser (Druker, München) Ultradünnschnitte hergestellt.

Die Schnittdicke wurde anhand der Interferenzfarben der Schnitte auf der Wasseroberfläche des Schnittauffangtroges ermittelt (Peachey, 1958; Bachmann und Sitte, 1959). Es wurden silberglänzende Ultradünnschnitte verwendet, was einer mittleren Dicke von ca. 70 nm entspricht. Anschließend wurden die Schnitte mit Toluol-Dampf geglättet und dann mit einem Haarpinsel auf mit Formvar (Plano, Wetzlar) beschichteten 100 Mesh Nickelnetzchen (Typ: Athene New 100, Plano, Wetzlar) aufgezogen und luftgetrocknet.

2.3.5 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Die Kontrastierung erfolgte mit Uranylazetat und Bleizitrat.

Lösungen

2 % (w/v) **Uranylazetat** (Electron Microscopy Science, München) wurde in 50 % (v/v) Ethanol gelöst.

0,3 % (w/v) **Bleizitrat** (Fluka, Berlin) wurde in 9 ml A. bidest. (frisch abgekocht) und 1 ml 1 N NaOH gelöst.

Beide Lösungen wurden vor Gebrauch 5 Min. mit der Tischzentrifuge bei höchster Stufe zentrifugiert.

Durchführung

Die Netzchen wurden auf eine mit Parafilm bedeckte Keramikplatte gelegt, mit einem Tropfen 2 % (w/v) Uranylazetat-Lösung bedeckt, zum Lichtschutz mit einem Metalldeckel wird abgedeckt und für 20 Min. inkubiert. Dann wurden die Netzchen einmal in 50 % (v/v) Ethanol und viermal in A. bidest. gespült. Im nächsten Schritt wurden Na-

OH-Plätzchen (Roth) auf der Keramikplatte unter dem Metalldeckel verteilt, um Niederschläge von Natriumcarbonat zu vermeiden. Dann wurde 0,3 % (w/v) Bleizitratlösung auf den Parafilm aufgetropft und die Netzchen für 7 Min. mit der Schnittseite auf die Lösungstropfen aufgelegt. Rückstände wurden mit A. bidest abgespült und die Netzchen in einer Gridbox (Plano) 15 Min. luftgetrocknet.

2.3.6 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die ultrastrukturellen Studien wurden mit dem Elektronenmikroskop LEO 912 AB (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Präparate wurden mit 20.000- bis 63.000-facher Vergrößerung bei 80 kV ausgewertet. Die Aufnahmen erfolgten mit der eingebauten Planfilmkamera mit automatischer Belichtungssteuerung. Die Planfilmkamera war mit Kodak SO 163-Filme bestückt.

2.4 Biotinilierung

Die Biotinilierungsexperimente wurden mit einer Methode nach Robinson (persönliche Mitteilung), Davis et al. (1998) bzw. Gonzalez et al. (2002) mit geringen Modifikationen durchgeführt.

Prinzip

Sulfo-NHS-SS-Biotin (Abb. 2.2) ist ein durch Thiole spaltbares, mit Aminogruppen reaktives Biotinierungsreagenz. Es enthält einen Spacerarm, um eine sterische Behinderung der Avidinbindung zu vermeiden. Dieses sulfonierte NHS-Biotin kann Zellmembranen nicht permeieren und ist deshalb für eine spezifische Markierung von oberflächlichen Proteinen der Zellmembran geeignet. Dabei reagiert es bevorzugt mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin der Membranproteine und bildet mit diesen ein stabiles Produkt.

An das Biotin der biotinierten Proteine bindet angebotenes Avidin, das an Sepharosebeads gekoppelt ist. Nach Lyse der Zelle können die an die Beads gebundenen Membranproteine durch Zentrifugation gewonnen werden (Abb. 2.3). Schließlich werden die Membranproteine durch Thiole von den Biotin-Avidin-Beads gespalten und stehen für eine weitere Aufarbeitung zur Verfügung.

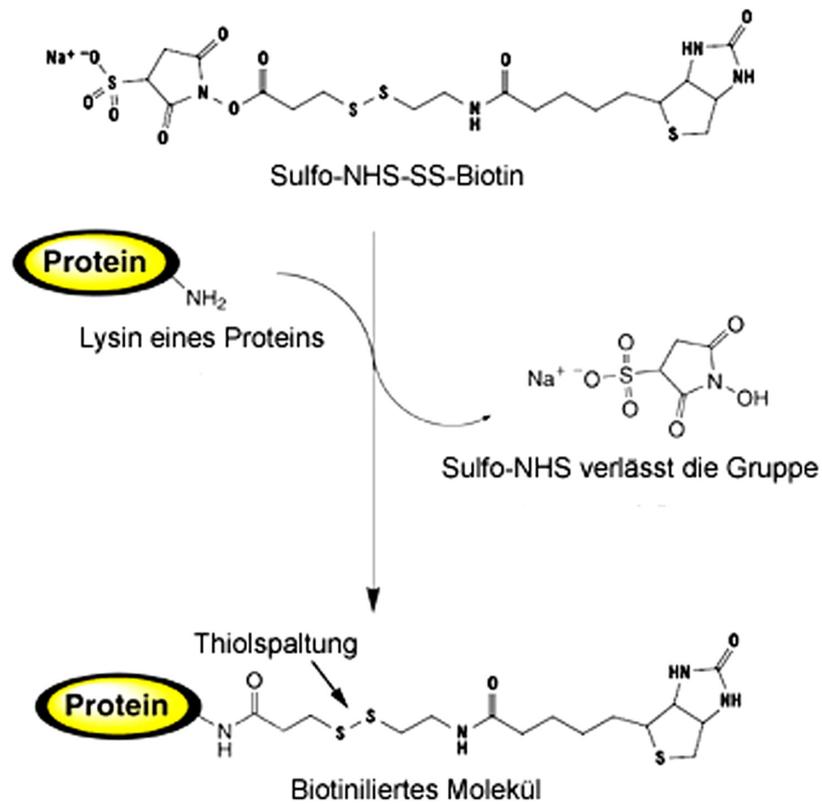


Abb. 2.2: Sulfo-NHS-SS-Biotin-Reaktion mit der Lysin-Aminogruppe eines Proteins. Die ϵ -Aminogruppe reagiert mit NHS-Ester und dabei wird Sulfo-NHS als Nebenprodukt freigesetzt.

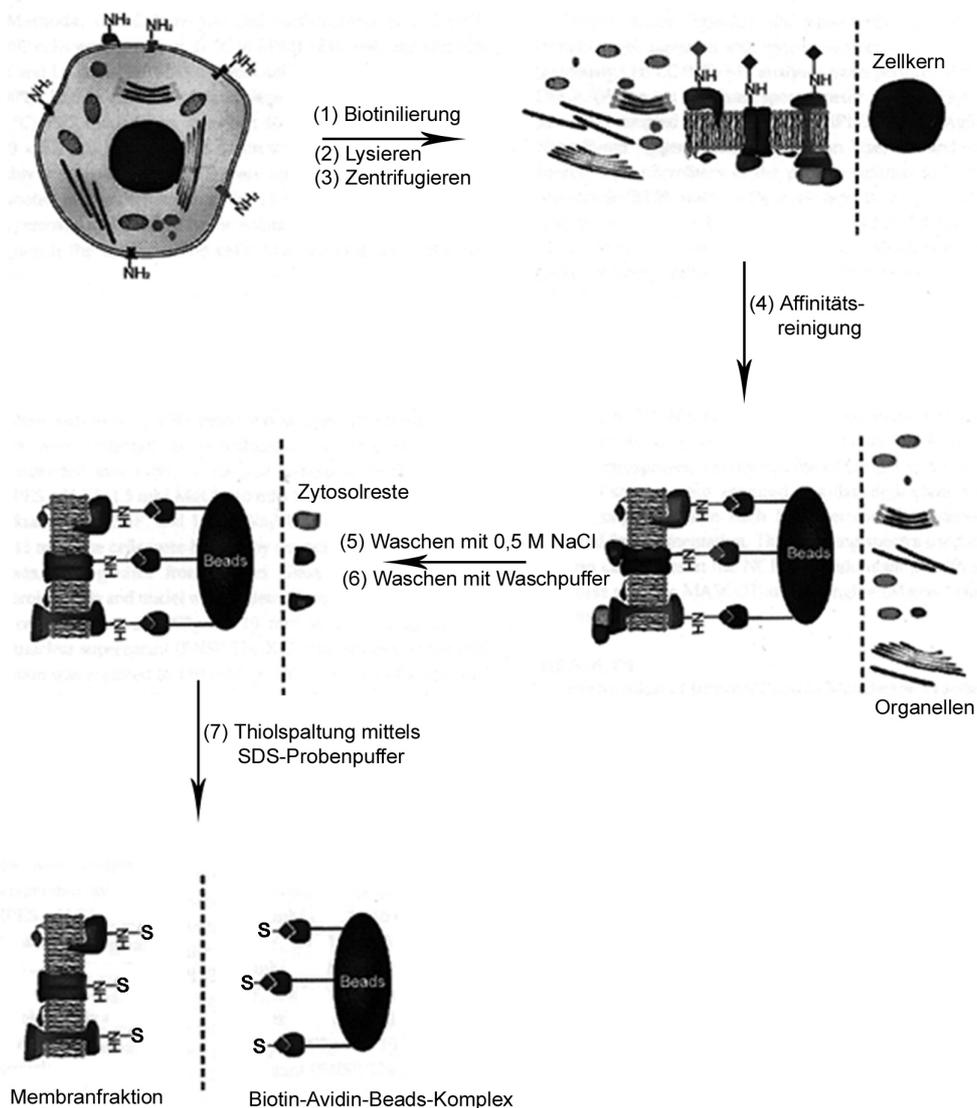


Abb. 2.3: Prinzip der Affinitätsreinigung von biotinierten Plasmamembranproteinen mit Avidin-Beads. Impermeables Biotinierungsreagenz biotiniert Proteine der Plasmamembran (1). Nach der Biotinilierung werden die Zellen lysiert (2) und das Zelllysate wird zentrifugiert (3), um Zellkerne und größere Fragmente vom Lysat zu trennen. Die biotinierten Zellmembranproteine werden durch Avidin beschichtete Sepharose-Beads gebunden und durch Zentrifugation von der Zytosolfraktion getrennt (4). Um Zytosolreste von dem Beadkomplex zu beseitigen werden sie mit hochkonzentriertem Salzpuffer (5) und danach mit Waschlösung (6) gewaschen. Biotin-Avidin-Beads-Komplexe werden dann durch Spaltung von S-S Brücken mittels SDS-Probenpuffer von dem Membranprotein getrennt (7) (Abb. 2.3 modifiziert nach Zhao et al. 2004).

Lösungen

Lösung 1 (PBS Ca ²⁺ /Mg ²⁺):	138 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	9,6 mM Na ₂ H PO ₄
	1 mM MgCl ₂ (Merck, Darmstadt)
	0,1 mM CaCl ₂ (Sigma)
	pH 7,3
Lösung 2 (Biotin):	1mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin (Perbio Science, Bonn) in Lösung 1
Lösung 3 (Glycin):	100 mM Glycin in Lösung 1
Lösung 4 [Radioimmunpräzipitationsproben-(RIPA) Puffer mit Protease-Inhibitoren]:	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	100 mM Tris-HCl
Zum Auflösen erhitzen, abkühlen lassen und dann pH 7,4 einstellen und die folgenden Bestandteile zugeben:	
	1 % (w/v) Triton-X-100
	1 % (w/v) Natriumdeoxycholate
	0,1 % (w/v) SDS
	1 µg/ml Leupeptin (Applichem, Darmstadt)
	1 µg/ml Aprotinin (Applichem)
	1 µM Pepstatin (Applichem)
	1 mg/ml Trypsin-Inhibitor (Fluka, Steinheim)
	1 mM Iodoacetamid (Sigma)
	250 µM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid; Roth, Karlsruhe)
Lösung 5 (4 X SDS-Probenpuffer):	8 % (w/v) SDS
	240 mM Tris pH 6.8
	0,08 % (w/v) Bromphenolblau
	40 % (v/v) Glycerin
	4 % (w/v) Betamercaptoethanol (frisch zugeben)

Lösung 6 (Salz-Waschpuffer):	0,1 % (w/v) Triton-X 500 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris pH 7,5
Lösung 7 (Waschpuffer):	50 mM Tris pH 7,5
Lösung 8 (2 X SDS-Probenpuffer):	4 % (w/v) SDS 120 mM Tris pH 6.8 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) Betamercaptoethanol (frisch zugeben)

Durchführung

Nach den Kulturversuchen (s.o.) wurden die 6 Well-Platten auf Eis verbracht und die Kulturen zweimal mit eiskalter Lösung 1 (PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 2 ml pro Well) gespült. Danach wurden sie mit Lösung 2 (Biotin, 750 μl pro Well) für 30 Min. auf einem Schüttler bei 4° C (Kühlraum) inkubiert. Nach Absaugen der Biotinlösung wurde zweimal mit Lösung 3 (Glycin) gespült und der Biotinilierungsvorgang mit Lösung 3 (2 ml pro Well) für 20 Min. bei 4° C (Kühlraum) auf dem Schüttler gestoppt.

Nach Verwerfen der Lösung 3 wurden die Kulturen zweimal mit Lösung 1 (PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gespült. Anschließend erfolgte die Zellyse mit Lösung 4 (RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren, 170 μl /well) für eine Stunde bei 4° C. Die Zellysate (ca. 1 ml pro 6-Well-Platte) wurden dann mit einem Zellschaber (Greiner) abgeschabt und in einem Reaktionsgefäß (1.5 ml Eppendorf Cap) gesammelt. Die Zellysate wurden bei 16.300 g 20 Min. bei 4° C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417 R). Ca. 600 μl des Überstandes wurden für die Inkubation mit Avidin-Beads verwendet (s.u.). Weitere 300 μl Überstand von jeder Probe wurden mit 300 μl (gleiche Volumenmenge) Lösung 5 (4 X SDS) versetzt. Der so behandelte Überstand wurde portioniert und als Lysatfraktion eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -40° C gelagert.

Für die weitere Bearbeitung der Lysate wurden zunächst 300 μl UltraLink Immobilized Monomeric Avidin-Beads-Suspension (Perbio Science, Bonn) in einem Reaktionsgefäß für 5 Min. bei 16.300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Avi-

din-Bead-Pellet wurden 300 µl Zellysat gegeben. Die Zellysat Avidin-Beads-Suspension wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C unter Bewegung inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Inkubation 24 Stunden nicht überschreitet, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurde die Suspension für 15 Min. bei 16.300 g zentrifugiert.

Vom Überstand wurde 200 µl in ein Reaktionsgefäß aufgenommen und mit der gleichen Volumenmenge (200 µl) Lösung 5 (4 X SDS) versetzt. Der so behandelte Überstand wurde portioniert und als Zytosolfraktion eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -40° C gelagert. Das Avidin-Beads-Pellet wurde in 1 ml PBS mit 0.05 % (v/v) Tween 20 resuspendiert und für 5 Min. bei 16.300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit Lösung 6 (Salz-Waschpuffer, 1 ml) und einmal mit Lösung 7 (Waschpuffer, 1 ml) gewaschen und zentrifugiert. Nach den Waschschritten wurde das Avidin-Beads-Pellet mit 600 µl Lösung 8 (2 X SDS) versetzt und für 10 Min. bei Raumtemperatur und für 30 Min. bei 37° C unter Bewegung inkubiert. Diese Inkubation führte zur Ablösung der Beads durch Spaltung der SS- Brücke zwischen Aminogruppen von Membranproteinen und Biotinmolekül (s.o.). Die Beadsuspension wurde dann für 5 Min. bei 16.300 g zentrifugiert. Der beadfreie Überstand wurde portioniert und als biotinierte Membranfraktion eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -40° C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4° C durchgeführt.

Im letzten Waschschriff wurde mittels Westernblot (s.u.) weder GLT1v- noch EAAC1-Immunreaktion nachgewiesen (Abb. 2.4).

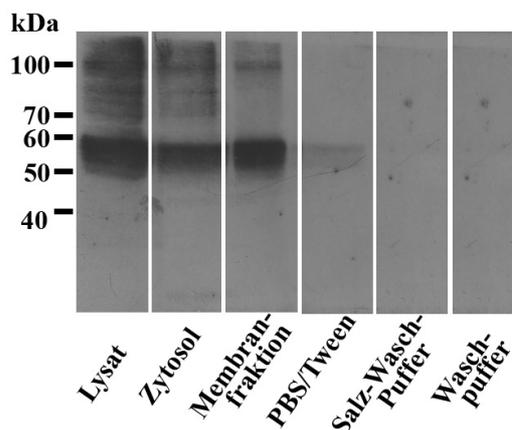


Abb. 2.4: Die Westernblot-Analysen (10 % SDS-PAGE) zeigen einen EAAC1-Nachweis in Lysat-, Zytosol- und Membran-Fraktion von Körnerzellen (DMSO behandelt; Kontrolle) nach den Biotinilierungsexperimenten und in den Waschlösungen nach dem Waschen der Avidin-Beads-Pellets. Lysat-, Zytosol- und Membran-Fraktionen zeigen eine starke EAAC1-Immunreaktivität. Der Waschschriff mit PBS/Tween zeigt eine schwache Immunreaktivität für EAAC1, während die letzten beiden Waschschriffe keine Immunreaktion für EAAC1 mehr aufweisen. Das anti-EAAC1 Antiserum wurde 1:1000 verdünnt. Bei den Fraktionen wurden gleiche Proteinmengen (3 µg) und für die Waschschriffe wurden gleiche Volumina aufgetragen.

2.5 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Prinzip

Diese Methode (Dieckmann-Schuppert und Schnittler 1997) erlaubt eine genaue Proteinbestimmung auch in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Detergentien oder Salzen, d.h. auch im SDS-Probenpuffer gelöste Proteine können verwendet werden. Amidoschwarz ist ein Azofarbstoff, der sich an Polypeptidketten anlagert. Der Farbstoff bleibt auch nach Ausfällung der Proteine mit einer Methanol-Essigsäure-Lösung an diese gebunden. Die Menge an gebundenem Farbstoff und damit an Protein lässt sich photometrisch bestimmen. Als Standard dienten BSA-Lösungen mit bekannten Mengen an BSA. Wie auch bei anderen färbereichen Proteinnachweisen muss darauf jedoch geachtet werden, dass die Proteinbestimmungen im linearen Bereich der Eichkurve erfolgen.

Lösungen

Färbelösung:	2,5 g Amidoschwarz
	225 ml Methanol
	225 ml A. bidest.
	50 ml 100 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	237,5 ml Methanol
	237,5 ml A. bidest.
	25 ml 100 % (v/v) Essigsäure
Lyselösung:	10 g Trichloressigsäure
	80 ml 100 % (v/v) Ameisensäure
	10 ml 100 % (v/v) Essigsäure

Durchführung

Zuerst wurde eine Zelluloseazetatfolie (Sartorius, Göttingen) in 1 cm² große Felder aufgeteilt und mit zwei Metallklammern beweglich aufgehängt. Von den in SDS-Probenpuffer gelösten Proben (Zellysate, Zytosol- und Membranfraktion s.o.) wurden je 10 µl auf die Felder aufgetragen. In gleicher Weise wurden auch 10 µl BSA-Standard (0,625 µg bis 20 µg in SDS-Probenpuffer) aufgetragen. Nach der Probenbeschichtung wurden die Folien trocken geföhnt und anschließend für 10 Min. in die Färbelösung auf einen Schüttler überführt. Die Folien wurden dann in die Entfärbelösung verbracht. Dabei wurde der Hintergrund der Folie wieder entfärbt, während die Proteinbanden den Farbstoff gebunden hielten. Die Zelluloseazetatfolien wurden aus der Entfärbelösung entnommen und mit einem Fön getrocknet. Die Felder wurden dann geschnitten und in

1.5 ml Reaktionsgefäße gelegt. Nach Zugabe von 1 ml Lyselösung und 30 Min. Inkubation im 50° C Wasserbad löste sich die Zelluloseazetatfolie vollständig auf. Abschließend wurden die Extinktion der Probe bei 620 nm mit einem Photometer gemessen und mittels Eichgerade der BSA-Standards die Proteinkonzentration berechnet. Vor dem Westernblot wurde die Proteinmenge für jede Fraktion bestimmt.

2.6 Westernblot-Analyse

Die Glutamattransporter EAAC1 und GLT1v wurden in Lysat-, Zytosol- und Zellmembranfraktionen (s.o.) mittels Westernblot nachgewiesen.

2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Pro Kulturexperiment wurde jeweils eine Doppelbestimmung der SDS-PAGE durchgeführt.

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurden mit den vertikalen Elektrophorese-Gelsystemen der Firma Biorad (München) analysiert. Es wurden Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 10 % (w/v) im Trenngel und 5 % (w/v) im Sammelgel verwendet. Die Dicke der Gele betrug 1 mm, die Länge des Sammelgels ca. 8 mm und die Länge des Trenngels 7 cm.

Die im Probenpuffer enthaltenen Proteine (s.o.) wurden zunächst 2 Min. bei 95° C im Heizblock denaturiert und anschließend mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gefüllt. Aufgetragen wurde jeweils 3 µg Protein. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard (Fermentas, Leon-Rot) mitgeführt.

Für die Sammlung der Proteine im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt, die Trennung der Proteine im Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 200 V.

Lösungen

Sammelgel:	5 % (w/v) Acrylamid
	125 mM Tris pH 6.8
	0,1 % (v/w) SDS
	1 mg/ml APS
	3 µl/ml TEMED
Trenngel:	10 % (w/v) Acrylamid
	375 mM Tris pH 8.8
	0,1 % (w/v) SDS

	1 mg/ml APS
	1,5 µl/ml TEMED
Elektrophorese-Puffer:	25 mM Tris-HCl pH 8.3
	192 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS

2.6.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra; Amersham, Braunschweig) überführt (Towbin et al. 1979). Der Transfer erfolgt für 3h in einer mit Transferpuffer gefüllten Mini Trans-Blot-Kammer (Biorad) bei 100 mA. Um den Erfolg des Transfers von Proteinen aus dem Acrylamid-gel auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt (Salinovich und Montelaro, 1986). Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde überschüssiges Ponceau durch Spülen der Membranen mit A. bidest. entfernt. Schließlich wurden die Membranen mit PBS vollständig entfärbt.

Lösungen

Transblotpuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20 % (v/v) Methanol
Ponceau S:	0,5 % (w/v) Ponceau S
	3 % (w/v) Trichloressigsäure

2.6.3 Immundetektion spezifischer Proteinbanden

Freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden 3 h bei Raumtemperatur mit 5 % (w/v) Magermilch in PBS abgesättigt. Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden primären Antikörpern (s.u.) gelöst in Magermilch bei 4° C auf dem Schüttler inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Spülen der Membranen für je 5 Min. bei Raumtemperatur in PBS/ 0,05 % (w/v) Tween entfernt. Dann wurden die Membranen 90 Min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem sekundären Antikörper (s.u.) inkubiert. An die sekundären Antikörper war HRP (horse-radish-peroxidase) gekoppelt. Anschließend wurden die Membranen dreimal 10 Min. bei Raumtemperatur in PBS/ 0,05 % (w/v) Tween gespült und für den Chemoluminiszenz-Nachweis verwendet.

Primäre Antikörper:

anti-GLT1v- Immuneserum::	1 : 1500
anti-EAAC1-Immuneserum:	1 : 1000

Sekundäre Antikörperverdünnungen:

anti-Kaninchen IgG HRP (Biorad):	1 : 3000
----------------------------------	----------

Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen.

2.6.4 Nachweis der Sekundärantikörper mit der Chemoluminiszenz-Methode**Prinzip**

Die HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurden mit Hilfe der ECL-Methode (enhanced chemiluminescence; Whitehead et al., 1979) in den Nitrozellulosemembranen nachgewiesen. Bei der Chemoluminiszenz-Methode handelt es sich um eine lichtemittierende Reaktion: Die durch HRP vermittelte Wasserstoffperoxid-Katalyse führt zur Oxidation von Luminol. Dies führt zur Anregung von Elektronen. Kehren die Elektronen in ihren Grundzustand zurück, so geben sie Energie im Bereich des sichtbaren Spektrums ab. Die Lichtemission erfolgt bei 428 nm, wodurch eine Schwärzung eines photographischen Films erfolgt.

Lösungen

ECL-Lösung 1:	2,5 mM Luminol in DMSO gelöst
	0,4 mM p-Coumaric-Acid in DMSO gelöst
	100 mM Tris-HCl (pH 8.5)
ECL-Lösung 2:	0,02 % (v/v) H ₂ O ₂
	100 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Mischung von ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1 : 1

Röntgenentwickler:	LX 24 (Kodak, über Hartenstein)
Röntgenfixierbad:	A L4 (Kodak)

Durchführung

Die Nitrozellulosemembranen (s.o.) wurden für 1 Min. in die ECL-Lösung gegeben, anschließend in eine Filmkassette verbracht und mit Klarsichtfolie bedeckt. Darauf wurde ein Röntgenfilm gelegt, und die Kassette wurde verschlossen. Die Exposition des Röntgenfilms (HyperfilmTM ECL, Amersham, Braunschweig) erfolgte für 10 s, 30 s und 1 Min.. Der Röntgenfilm wurde dann entwickelt, fixiert und nach dem Trocknen ausgewertet.

2.6.5 Auswertung der Westernblots und statistische Analyse

Die Röntgenfilme wurden digital gescannt. Diese digitalen Aufnahmen wurden dann mit Hilfe des Grauwert-Analyse-Programms „nih image analysis software“ (Image J, Version 1.62) quantifiziert. Hierzu wurde erst die Fläche, die ausgewertet werden sollte, mit einem rechteckigen Messfeld-Werkzeug markiert (Abb. 2.5). Danach wurde die Grauwertintensität der markierten Fläche und des Röntgenfilmhintergrunds gemessen.

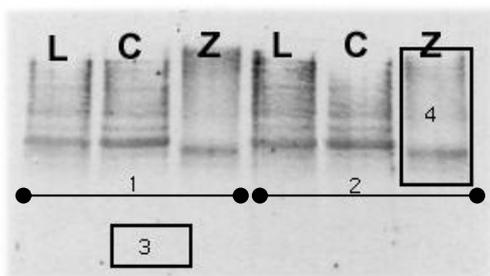


Abb. 2.5: Auswertungsprinzip von Westernblots. Die Westernblot-Analysen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. 1= erste Bestimmung, 2= zweite Bestimmung, 3= Hintergrundmessung, 4= gemessene Gesamtfläche einer Probe

L= Lysat-, C= Zytosol-, Z= Membranfraktion

Für die Auswertungen der Westernblots wurde auf Folgendes geachtet (Abb. 2.5):

- Es wurden immer Doppelbestimmungen jeder Probe auf dem gleichen Westernblot durchgeführt.
- Die ermittelten Grauwerte wurden auf die pro Spur aufgetragene Proteinmenge (3 µg Protein) bezogen.
- Die Grauwerte des Röntgenfilmhintergrunds wurden bestimmt und von den Grauwerten der Proteinbanden abgezogen.
- Die Absolutwerte der Grauwertanalyse wurden in Prozentwerte umgerechnet. Hierbei wurden die Kontrolle -Werte (DMSO behandelte Kulturen) gleich 100 % gesetzt.

Der Mann Whitney U-Test (zweiseitig) wurde für die Analyse der Messergebnisse verwendet. (Signifikanzniveau von $p < 0,05$).

Anzahl der Experimente, die durchgeführt und mit dem Mann Whitney U-Test analysiert wurden:

	5 mM Kalium im Medium	27 mM Kalium im Medium
EAAC1	n = 11	n = 8
GLT1v	n = 6	n = 7

3 Ergebnisse

3.1 Zellanalysen an zerebellären Primärkulturen

3.1.1 Spezifitätskontrolle der in der Immunzytochemie verwendeten Antikörper

Die Spezifität von Antikörpern, die für die Immunzytochemie benutzt wurden, wurde mittels Westernblot-Analyse an der Lysat-Fraktion (Kontroll-Lysate) überprüft (für die Westernblot-Analyse und Lysat-Fraktion s. Material u. Methoden). Als Positivkontrolle diente der Nachweis von EAAC1, GLUT1v und GLAST am Kleinhirnhomogenat aus der Maus (Kugler und Schmitt 1999; Schmitt et al., 2002). Die molekularen Massen von Antigenen, die durch diese Westernblots nachgewiesen wurden, entsprechen denen des Herstellers oder den in der Literatur angegebenen Werten (Abb. 3.1). Negativkontrollen erfolgten ohne Primärantikörper und ergaben keine positive Immunreaktion.

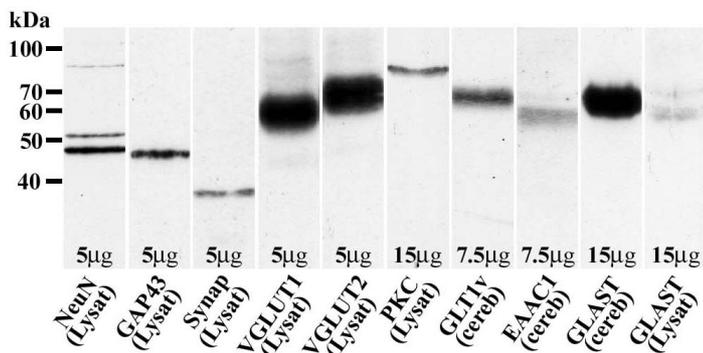


Abb. 3.1: Spezifitätskontrolle der in der Immunzytochemie verwendeten Antikörper. Für den Westernblot (10 % SDS-PAGE) wurde die Lysat-Fraktion von Körnerzellkulturen (DMSO behandelt; Kontrolle) oder das 100.000 g Pellet vom Kleinhirnhomogenat aus der Maus verwendet. Die Menge des aufgetragenen Proteins pro Spur wurde in μg Protein am Ende der Spuren vermerkt. Die folgenden Antikörperverdünnungen wurden verwendet: monoklonaler anti-NeuN Antikörper 1:500; monoklonaler anti-GAP43 Antikörper 1:400; monoklonaler anti-Synaptophysin (Synap) Antikörper 1:400; anti-VGLUT1 Antiserum 1:2500; anti-VGLUT2 Antiserum 1:5000; monoklonaler anti-PKC Antikörper 1:250; anti-GLUT1v Antiserum 1:1500; anti-EAAC1 Antiserum 1:1000; affinitätsgereinigte anti-GLAST Antikörper $\sim 1,8 \mu\text{g/ml}$. Die Höhe der Banden stimmt mit den Angaben des Herstellers oder den in der Literatur angegebenen Werten überein.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die GLAST-Bande in der Lysat-Fraktion eine offensichtlich schwache Immunfärbung zeigt im Vergleich zum Kleinhirnhomogenat (Abb. 3.1). Dieser Befund bestätigt, dass in Kleinhirnkulturen nur wenige astrozytäre Gliazellen vorkommen (s.u.).

3.1.2 Zelluläre Zusammensetzung

Primäre Zellkulturen des Kleinhirns bestehen unter den von uns gewählten Kulturbedingungen vor allem aus Körnerzellen (Thangnipon et al. 1983; Kingsbury et al. 1985) und zum geringen Anteil aus Gliazellen (vor allem Astrozyten bzw. Bergmann-Gliazellen; Thangnipon et al. 1983).

Neurone. Der Nachweis, dass es sich bei den Neuronen in der zerebellären Primärkultur vor allem um Körnerzellen handelt, erfolgte durch den immunzytochemischen Nachweis von Neuronal Nuclei (NeuN; Abb. 3.2). NeuN ist ein nukleäres Protein (Mullen et al. 1992), das in den von uns verwendeten Primärkulturen nur in Körnerzellen vorkommt (Weyer und Schilling 2003).

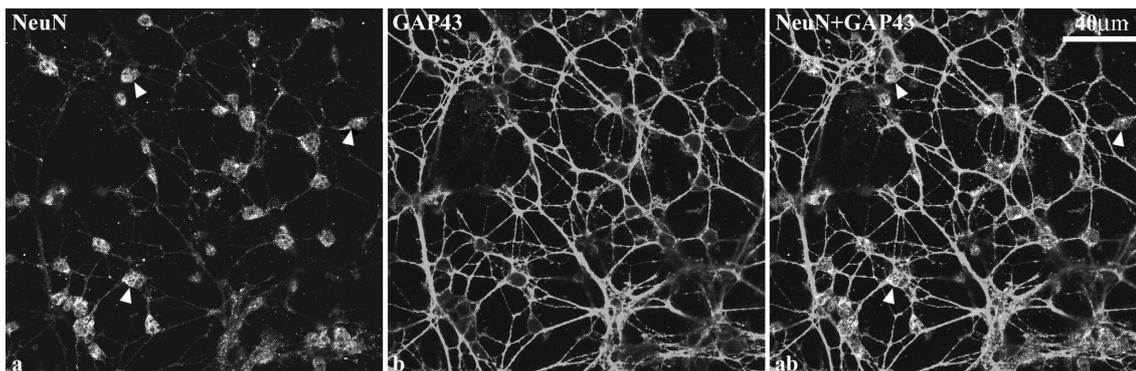


Abb. 3.2: Nachweis von Körnerzellen in der zerebellären Primärkultur. Es handelt sich um einen Doppelimmunfluoreszenznachweis mit Antikörpern gegen NeuN (a) und GAP 43 (b). Die Zellkörper von kultivierten Körnerzellen sind immunpositiv für NeuN (Pfeilspitzen in a und ab), während die reich verzweigten Fortsätze dies für GAP 43 (b) sind.

Die kultivierten Körnerzellen besitzen zahlreiche schlanke, sich verzweigende Fortsätze, die als Neuriten bezeichnet werden. Entlang dieser Neuriten sind unterschiedlich viele Erweiterungen, sog. Varikositäten zu beobachten (Abb. 3.3). Schon nach 4 Tagen bilden die kultivierten Körnerzellen ein ausgeprägtes Netzwerk von Neuriten, was mit dem Antikörper gegen GAP43 nachgewiesen werden kann. GAP43 ist ein Plasmamembranprotein von Zellkörper, Neuriten und Wachstumskegel der sich entwickelnden Körnerzellen (Burry et al. 1991). Je nach experimenteller Bedingung sind die Varikositäten unterschiedlich groß und zahlreich (s.u.).

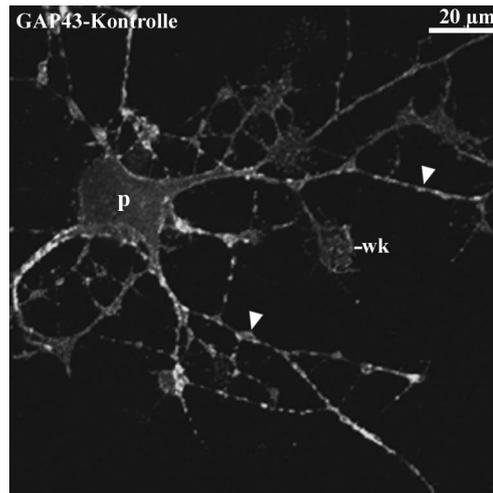


Abb. 3.3: Morphologie einer Körnerzelle in Kultur. Immunfluoreszenznachweis von GAP43. Die Körnerzelle wurde mit 5 mM Kalium im Kulturmedium kultiviert und einem Kontrollexperiment mit DMSO unterzogen. GAP43 ist spezifisch für Neurone und kommt in den Membranen von Perikaryon, Fortsätzen und Varikositäten (Pfeilspitzen) vor. p: Perikaryon; wk: Wachstumskegel.

Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt (Marxen et al. 1999), dass die Varikositäten Anhäufungen von Vesikeln enthalten, die synaptischen Vesikeln ähneln (synaptischen Vesikel ähnliche Vesikel, SVV). Aufgrund ihrer geringen Größe (Durchmesser 50-60 nm) sind SVV als einzelne Vesikel lichtmikroskopisch nicht erkennbar. Vesikelaggregate sind jedoch immunfluoreszenzmikroskopisch mit Antikörpern gegen z.B. Synaptophysin darstellbar (Abb. 3.5a, ab). Es wurde vermutet, dass die SVV Transmitterglutamat enthalten (Pearce et al. 1981) und dieses auch durch Exozytose freisetzen (Antonov et al. 1999). Für die Glutamathaltigkeit der SVV sprechen auch unsere immunzytochemischen Befunde mit Antikörpern gegen VGLUT1 und 2. VGLUT1 und 2 sind in Synaptophysin positiven Aggregaten von SVV nachweisbar (Abb.3.5ab) und weisen auf einen Glutamattransport in die SVV hinein hin.

Die Varikositäten sind nicht an der Bildung typischer Synapsen beteiligt, da die Neuriten von Körnerzellen in Kultur keine typischen Synapsen untereinander ausbilden (Marxen et al. 1999) und die zellulären Partner (z.B. Purkinjezellen) in Kultur fehlen. Dies spiegelt die Situation *in vivo* wieder, da Körnerzellen des Kleinhirns keine morphologisch typische Synapsen untereinander ausbilden (Urakubo et al. 2003).

Gliazellen. Neben den Körnerzellen kommen in der Primärkultur auch in geringer Zahl Gliazellen vor (Thangnipon et al. 1983). Bei diesen handelt es sich nach unseren Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen mit Antikörpern gegen GAP43 (spezifisch für Neurone; Burry et al. 1991) und gegen den Glutamattransporter GLAST (spezifisch für astrozytäre Gliazellen), vor allem um Astrozyten und Bergmann-Gliazellen (Schmitt et

al. 1997). Dabei sind diese Gliazellen sehr dünn und flächig ausgebreitet, auf denen zum Teil die Körnerzellen mit ihren Fortsätzen ausgebreitet liegen (Abb. 3.4).

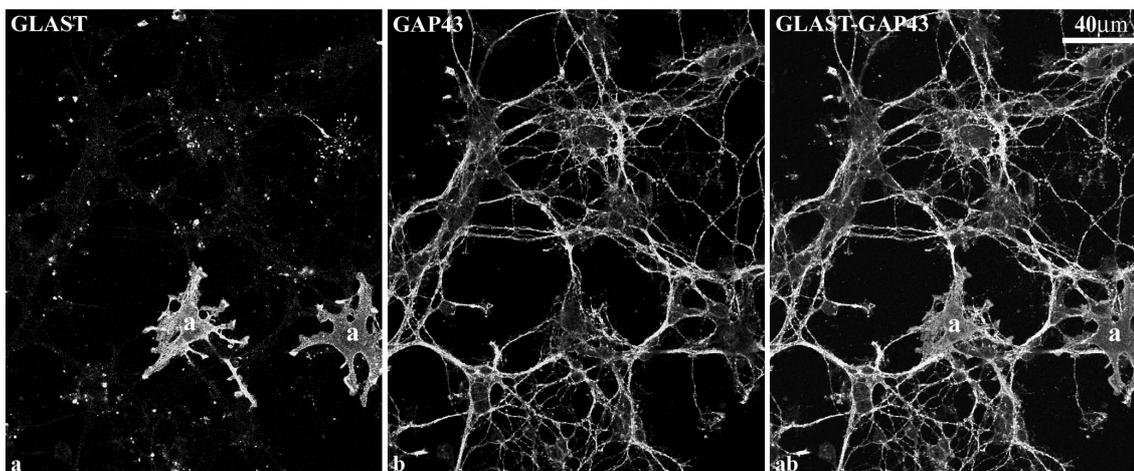


Abb. 3.4: Nachweis von astrozytären Gliazellen in der zerebellären Primärkultur. Es handelt sich um einen Doppelimmunfluoreszenznachweis mit Antikörpern gegen GLAST (a) und GAP 43 (b). Zwei astrozytäre Gliazellen (a in a und ab) wurden mit GLAST dargestellt. Die GLAST-positiven Gliazellen (Astrozyten/Bergmann-Gliazellen) bilden dünn/ausgebreitete „Matten“ auf denen die GAP 43-positiven Neurone mit ihren reich verzweigten Fortsätzen liegen.

3.1.3 Immunzytochemischer Nachweis der Glutamattransporter GLT1v und EAAC1

Aus Untersuchungen am adulten Kleinhirn der Ratte ist bekannt, dass EAAC1 (Schmitt et al. 1997) und GLT1v (Schmitt et al. 2002) vor allem in Neuronen exprimiert werden. In Übereinstimmung hiermit, können wir in zerebellären Primärkulturen diese Glutamattransporter ebenfalls bevorzugt in Neuronen, d.h. Körnerzellen (s.o.), nachweisen. Dieses geht aus den Doppelimmunfluoreszenznachweisen mit Antikörpern gegen GLT1v bzw. EAAC1 und das neuronale Markerprotein GAP43 hervor (Abb. 3.5 c, e, g, h; Abb. 3.7-9).

Da das lichtmikroskopische Auflösungsvermögen nur begrenzt ist und die Körnerzellen klein und ihre Fortsätze sehr dünn sind, lässt sich die genaue Lokalisation der beiden Glutamattransporter in den Körnerzellen nur bedingt feststellen. Im Bereich des Körnerzellperikarya ist z.T. eine zytoplasmatische, granuläre Lokalisation und z.T. eine Lokalisation in der Zellmembran nachweisbar. Dies trifft überwiegend auch für die Zellfortsätze zu. Dabei hängt die Lokalisation vor allem von den Kulturbedingungen und -experimenten ab (s.u.).

Die beiden Glutamattransporter sind kaum in den astrozytären Gliazellen der Primärkultur nachweisbar und spielen damit bei den Kulturexperimenten bzw. Westernblot-Analysen eine untergeordnete Rolle.

Nach Untersuchungen von Kugler (1999) und Schmitt (2002) am ZNS der Ratte kommen EAAC1 und GLT1v hauptsächlich in zytoplasmatischen Vesikeln und weniger in den Zellmembranen vor. Eine Charakterisierung dieser transporterhaltige Vesikel steht bisher aus. Nach unseren Untersuchungen an kultivierten Körnerzellen kommen GLT1v und EAAC1 nicht in synaptischen Vesikeln vor. Dieses geht aus Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen hervor, bei denen GLT1v bzw. EAAC1 zusammen mit Markerproteinen synaptischer Vesikel, nämlich Synaptophysin, VGLUT1 und 2 in Körnerzellen nachgewiesen wurden (Abb. 3.5 a-ef). Dieses Ergebnis zeigt, dass die untersuchten Glutamattransporter in einer eigenen Vesikelpopulation vorkommen. Aus unseren Untersuchungen geht jedoch auch hervor, dass EAAC1 und GLT1v in zwei unterschiedlichen Transportervesikel-Populationen vorkommen (Abb. 3.5 g-gh).

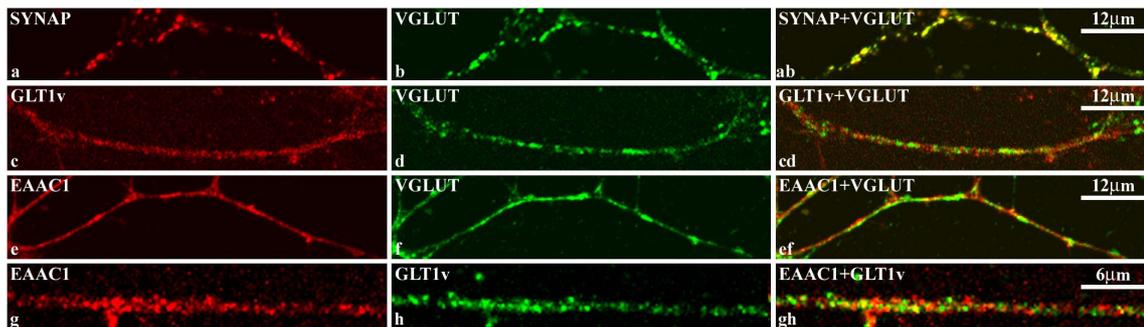


Abb. 3.5: Nachweis synaptischer Vesikel- und Transportervesikel-Aggregate in kultivierten Körnerzellen. Die Körnerzellen wurden mit 5 mM Kalium im Kulturmedium kultiviert. Synaptophysin- (SYNAP; a) und VGLUT- (b) Immunfärbung zeigen eine Kolo-kalisation in den gleichen vesikulären Aggregaten (gelb in ab). GLT1v (rot in c und cd) und VGLUT (grün in d und cd) bzw. EAAC1 (rot in e und ef) und VGLUT (grün in f und ef) ergeben demgegenüber keine Kolo-kalisation. Eine ebenfalls separate Lokalisation zeigen GLT1v (h) und EAAC1 (g) bei Übereinanderlagerung der Immunfärbungen (gh).

Auf elektronenmikroskopischer Ebene wurden mittels Immungold-Preembedding-Technik GLT1v und EAAC1 ebenfalls in Varikositäten (präsynaptische Elemente) von Parallelfasern des adulten Kleinhirns der Maus nachgewiesen (Abb. 3.6 a-c). Im Kleinhirn der Maus erscheinen Parallelfaser-Varikositäten als kleine axonale Erweiterungen mit kugelförmigen synaptischen Vesikeln und einzelnen Mitochondrien. Obwohl die Mehrheit der Parallelfaser-Varikositäten mit einem einzelnen dendritischen Dorn einer Purkinjezelle eine Synapse ausbildet, konnten wir gelegentlich zwei dendritische Dornen in synaptischem Kontakt mit einer Parallelfaser-Varikosität beobachten. Die Aus-

bildung von Synapsen zwischen 2 Dornen und 1 Varikosität ist charakteristisch für Parallelfaser-Synapsen (Palay und Chan-Palay 1974; Abb. 3.6 a, b, c, e, f). Die Parallelfasern und ihre Varikositäten sind das *in situ* Äquivalent von Neuriten und ihren Varikositäten kultivierter zerebellärer Körnerzellen (Powell et al. 1997). Das Immunreaktionsprodukt wurde auch in postsynaptischen Elementen (Abb. 3.6 b, c) und in den Perikarya von Körnerzellen (Abb. 3.6 d) nachgewiesen. Insgesamt ist die Lokalisation von GLT1v und EAAC1 in Körnerzellen *in situ* und *in vitro* identisch.

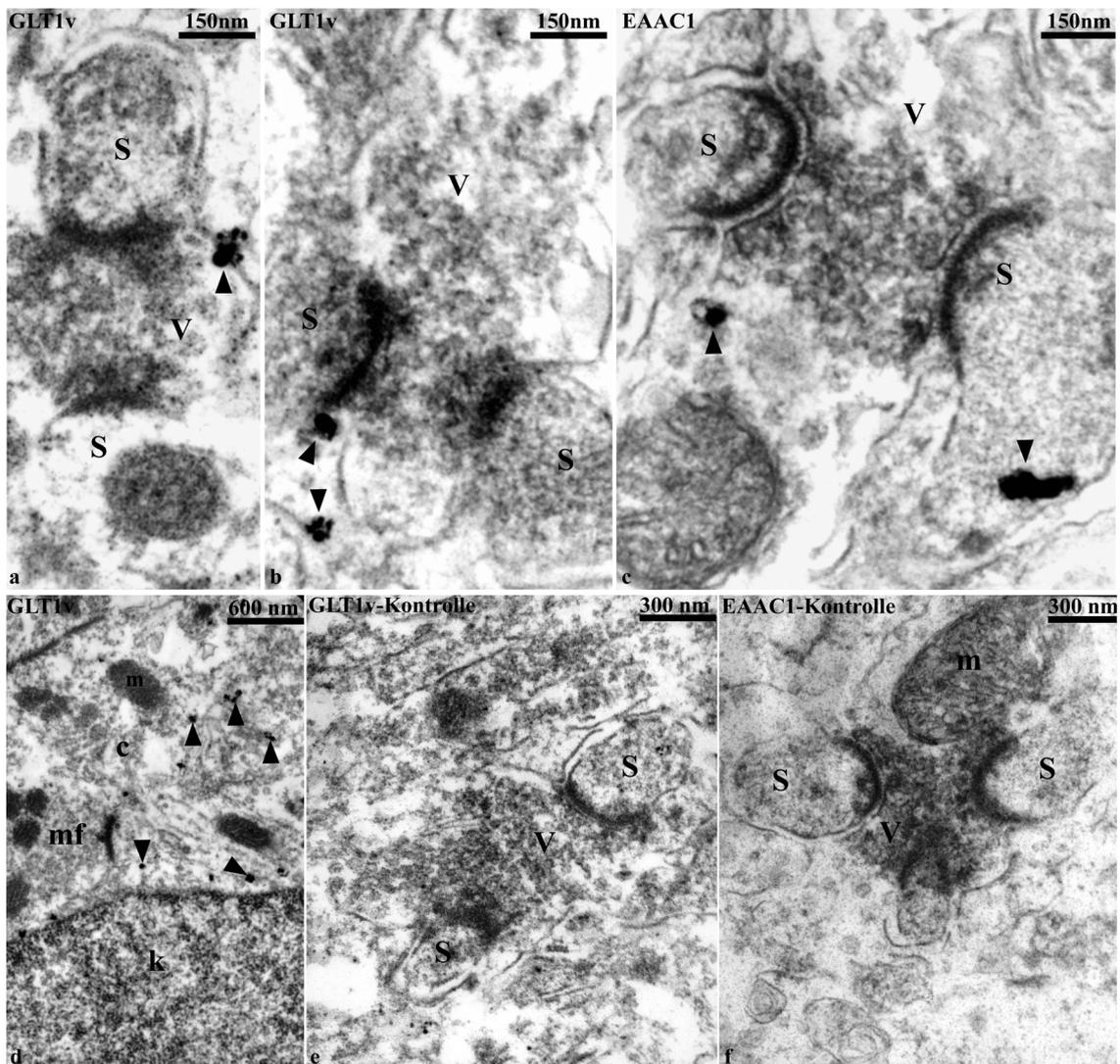


Abb. 3.6: Preembedding-Immungold-Elektronenmikroskopie zum Nachweis von GLT1v (a, b, d) und EAAC1 (c) in Körnerzellen des adulten Kleinhirns. a, b, c, e, f zeigen Varikositäten (V) von Körnerzellen-Parallelfasern, die mit dendritischen Dornen (S) von Purkinje-Zellen asymmetrische Synapsen ausbilden. Varikositäten (präsynaptische Elemente) enthalten synaptische Vesikel. Silber-verstärkte Ultra-Small Goldpartikel als Immunreaktionsprodukt (Pfeilspitzen) sind in presynaptischen Varikositäten zu sehen (a, c) und in postsynaptischen Dornen (b, c). d, Ausschnitt aus dem Perikaryon einer Körnerzelle (mf= mit Moosfaserterminale). Goldkörner liegen verstreut im Zytoplasma der Körnerzelle (Pfeilspitzen). m, Mitochondrium, k, Zellkern. e und f, Kontrollen für GLT1v und EAAC1. (Inkubation nur mit sekundärem Antikörper). Es ist kein Immunreaktionsprodukt zu beobachten.

3.1.4 Einfluss unterschiedlicher Kaliumkonzentrationen auf die Körnerzellen in Kulturen

Es ist bekannt, dass hohe Kalium-Konzentrationen im Medium das Überleben von zerebellären Primärkulturen fördern. Körnerzellen überleben unter physiologischer Kalium-Konzentration (5 mM KCl) nur 5 bis 6 Tage bei stetiger Abnahme der Zellzahl. Während Körnerzellen bei chronischer Depolarisation (Zugabe von 25 mM KCl zum Kulturmedium) viel länger und in größerer Anzahl überleben (Gallo et al. 1987; Balazs et al. 1988a). Die chronische Depolarisation führt auch zu einer vermehrten Exozytose und einer verminderten Anzahl von SVV, ein Vorgang, der unter 5 mM KCl nicht zu beobachten ist (Urakubo et al. 2003).

Wir haben Körnerzellen mit 5 und 27 mM Kalium im Medium kultiviert. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit Antikörper gegen GAP43 ergaben unter Kontrollbedingungen (DMSO), dass die chronisch depolarisierte Körnerzellen etwas feinere Fortsätze und kleinere Varikositäten besitzen als bei der Kultur mit 5 mM KCl. Überwiegend sehen die Körnerzellen unter beiden Kulturbedingungen recht ähnlich aus.

3.1.5 PKC-Aktivierung und -Inhibition in kultivierten Körnerzellen

Es ist bekannt, dass nahezu alle PKC-Isoformen in kultivierten zerebellären Körnerzellen vorkommen (Popp et al. 2006) und somit die Auswirkungen einer PKC-Aktivierung oder -Inhibition bei Körnerzellen untersucht werden können. In vorliegender Untersuchung erfolgte eine PKC-Aktivierung durch 30 minütige Inkubation der Kulturen mit 100 nM PMA und eine PKC-Inhibition mit 1 μ M Staurosporin anstelle von PMA. Zum Vergleich (Kontrolle) wurden entsprechende Inkubationen nur mit DMSO (Lösungsmittel für PMA und Staurosporin) durchgeführt. Die Experimente erfolgten an ruhenden (5 mM KCl) und chronisch depolarisierten Körnerzellen (27 mM KCl).

Strukturelle Veränderungen

Die strukturellen Veränderungen wurden mittels GAP43-Immunzytochemie untersucht.

Chronisch depolarisierte Körnerzellen (27 mM KCl). Nach Behandlung mit PMA oder Staurosporin kommt es zu keinen auffälligen strukturellen Veränderungen der Körnerzellen verglichen mit Kontrollen (DMSO) (Abb. 3.8 b, d, f). Die Fortsätze der Körnerzellen sind schlank und besitzen sehr kleine Varikositäten.

Ruhende Körnerzellen (5 mM KCl). Nach Behandlung mit PMA treten bei den Neuriten von Körnerzellen zahlreiche, große Varikositäten (Abb. 3.9 b, f) im Vergleich zur Behandlung mit Staurosporin (Abb. 3.9 d, h) oder zur Kontrollen (DMSO) auf. Nach Behandlung mit Staurosporin bestehen keine Unterschiede zu Kontrollen, d.h. die Fort-

sätze der Körnerzellen sind schlank und deren Varikositäten klein (Abb. 3.9 d, h; Abb. 3.8 b).

Immunzytochemischer Nachweis der PKC

Wir beschränkten unsere immunzytochemischen Nachweise auf die klassischen PKC-Isoformen (α , β , γ), die durch PMA aktiviert und Staurosporin inhibiert werden können und auf ruhende Körnerzellen (5 mM KCl im Kulturmedium). Nach PMA und Staurosporin sowie DMSO sind die PKC-Isoformen sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran darstellbar. Nach PMA ist jedoch die Membranreaktion oft stärker als nach Staurosporin und DMSO, während zwischen der Staurosporin- und der DMSO-Behandlung keine Unterschiede bestehen (Abb. 3.7 b, b', d, d').

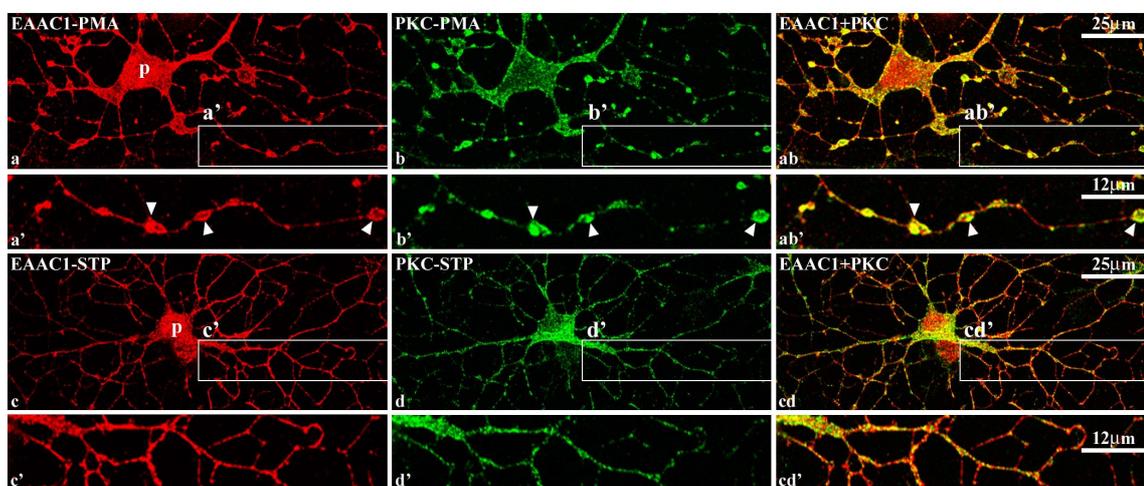


Abb. 3.7: Immunzytochemischer Nachweis von PKC (α , β , γ) und EAAC1 in kultivierten Körnerzellen (mit 5 mM Kalium im Kulturmedium) nach PMA- und Staurosporin (STP)-Behandlung. Körnerzellen wurden vor dem immunzytochemischen Nachweis für eine halbe Stunde mit PMA (100 nM) oder Staurosporin (1 μ M) behandelt. EAAC1- und PKC- Immunfärbungen zeigen z.T. eine Kolo-kalisation in Zytoplasma und Zellmembranen (gelb in ab, ab', cd, cd'). Nach PKC-Aktivierung durch PMA nehmen die Varikositäten an Größe zu (Pfeilspitzen in a'-ab'). Perikaryon und Fortsätze zeigen z.T. eine membranständige Immunreaktion (a-ab'). Nach PKC-Inhibition durch Staurosporin sind bei den Körnerzellen die Fortsätze dünn und die Varikositäten klein. Es scheint vor allem eine zytoplasmatische Immunreaktion vorzuliegen (c-cd'). p, Perikaryon.

Immunzytochemischer Nachweis von EAAC1 und GLT1v

Die Nachweise erfolgten mittels Doppelimmunfluoreszenz, wobei GAP43 als Markerprotein diente, das in den Zellmembranen von Neuronen, d.h. Körnerzellen lokalisiert ist. Die lokalisatorische Verteilung von EAAC1 und GLT1v in den Körnerzellen ist übereinstimmend. Häufig ist eine granuläre Reaktion im Perikaryon nachweisbar, die Vesikelaggregaten entsprechen dürfte.

Chronisch depolarisierte Körnerzellen (27 mM KCl). Nach Behandlung mit Staurosporin (EAAC1: Abb. 3.8 e, 3.7 c, c', 3.9 g; GLUT1v: Abb. 3.9 c) bzw. DMSO (EAAC1: Abb. 3.8 a, 3.5 e, g; GLUT1v: Abb. 3.5 c, h) sind EAAC1 und GLUT1v in dünnen Fortsätzen und kleinen Varikositäten nachweisbar. Ähnliches ergibt sich nach einer PMA-Behandlung (Abb. 3.8 c). Aufgrund dieser morphologischen Gegebenheiten ist eine Differenzierung zwischen einer granulär zytoplasmatischen und einer Membranreaktion nicht möglich.

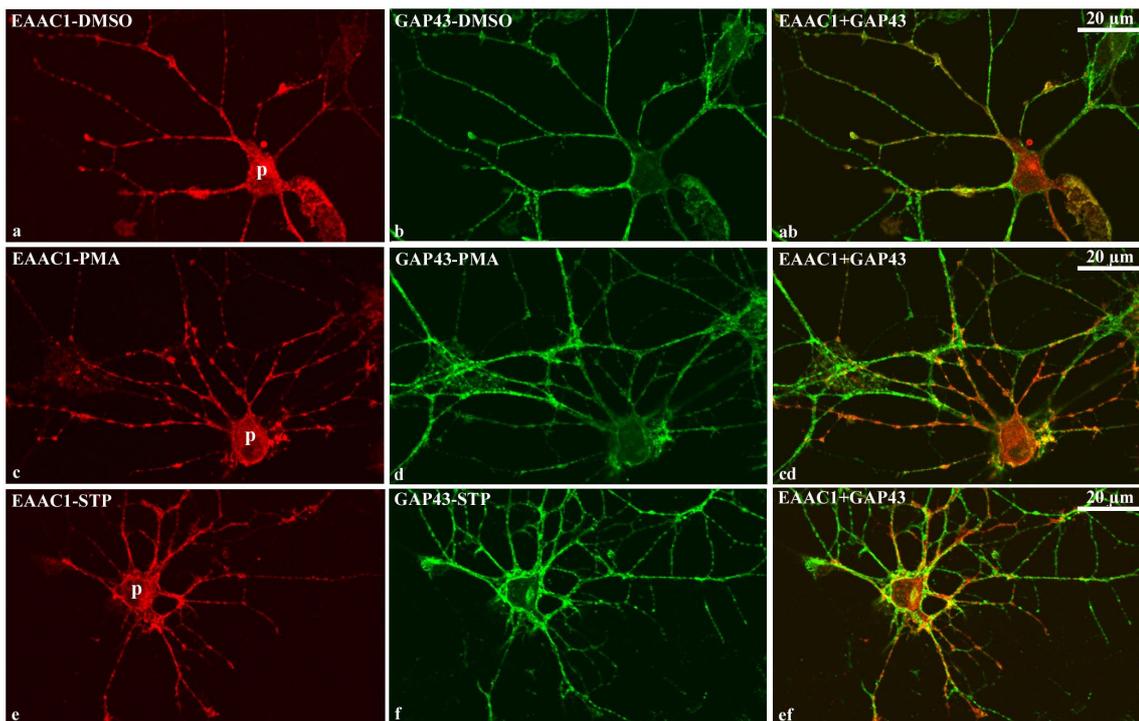


Abb. 3.8: Immunzytochemischer Nachweis von EAAC1 und GAP43 in chronisch depolarisierten (27 mM Kalium) Körnerzellen nach PMA- und Staurosporin (STP)-Behandlung. EAAC1 (a, c, e) und GAP43 (b, d, f) kommen in den Somata und Neuriten (sowie deren Varikositäten) von Körnerzellen vor. Die Staurosporin-behandelten Körnerzellen (e-ef) und die Kontrollzellen (DMSO: a-ab) zeigen schlanke Fortsätze und sehr kleine Varikositäten. Nach Aktivierung der PKC mittels PMA (c-cd) sind keine Unterschiede im Vergleich zu DMSO (a-ab) und Staurosporin (e-ef) zu beobachten. p, Perikaryon.

Ruhende Körnerzellen (5 mM KCl). Die Ergebnisse nach der Behandlung mit Staurosporin (Abb. 3.9 c-cd, g-gh) bzw. DMSO (Abb. 3.8 a-ab) sind bei ruhenden Körnerzellen denen von chronisch depolarisierten Körnerzellen (Abb. 3.8 a-ab, e-ef) sehr ähnlich. Nach der PMA-Behandlung sind GLUT1v (Abb. 3.9 a, ab) und EAAC1 (Abb. 3.9 e, ef) jedoch in zahlreichen, großen Varikositäten nachweisbar. Aufgrund der morphologischen Gegebenheiten (s.o.) ist eine eindeutige Membranreaktion der Varikositäten nur

ausnahmsweise feststellbar. Häufiger erstreckt sich die Immunreaktivität über die gesamte Varikosität.

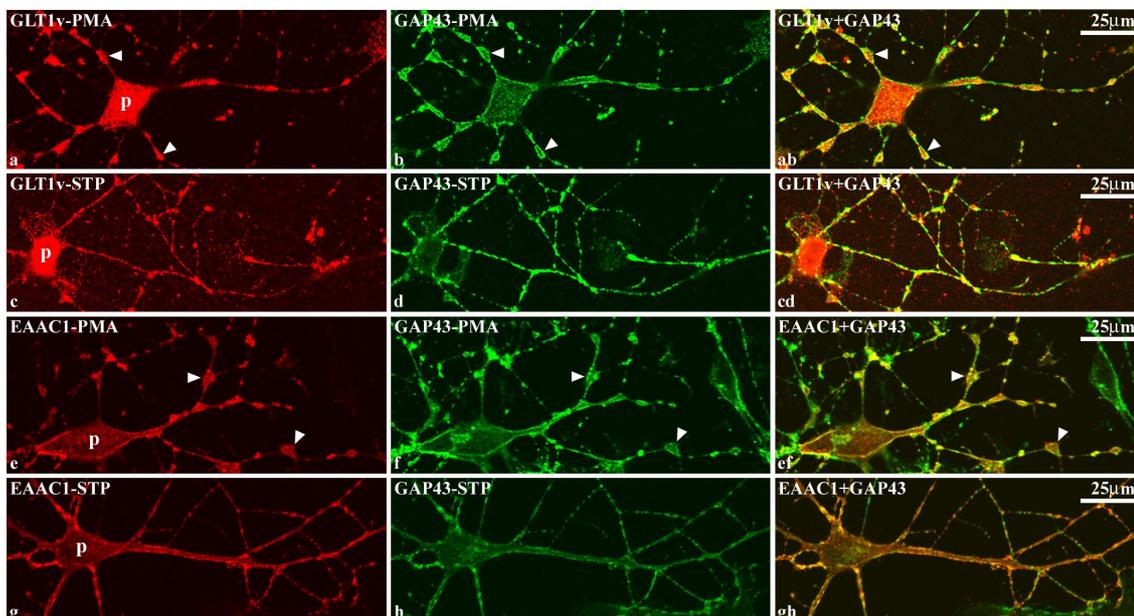


Abb. 3.9: Immunzytochemischer Nachweis von GLUT1v und EAAC1 mit GAP43 in ruhenden (5 mM Kalium) Körnerzellen nach PMA- und Staurosporin (STP)-Behandlung. GLUT1v (a, c) und GAP43 (b, d) bzw. EAAC1 (e, g) und GAP43 (f, h) zeigen eine Kolokalisation in den Somata und Neuriten (sowie deren Varikositäten) von Körnerzellen. Nach Aktivierung der PKC mittels PMA (GLUT1v: a, ab; EAAC1: e, ef) nehmen die Varikositäten an Größe zu. Perikaryon und Fortsätze zeigen z.T. eine membranständige Immunreaktion. Nach PKC-Inhibition durch Staurosporin sind die Fortsätze schlank und die Varikositäten klein (GLUT1v: c, cd; EAAC1: g, gh). Pfeilspitzen (a-ab, e-ef) weisen auf einzelne vergrößerte Varikositäten nach der PMA-Behandlung hin, p, Perikaryon.

3.2 Westernblot-Analysen an zerebellären Primärkulturen

Die Westernblot-Analysen wurden an zerebellären Primärkulturen durchgeführt, die mit 5 oder 27 mM Kalium im Medium kultiviert worden waren und an denen eine Aktivierung der PKC (mittels PMA) oder eine Inhibition der PKC (mittels Staurosporin) erfolgte. Bei den PKC-Versuchen diente DMSO im Medium (Lösungsmittel für PMA und Staurosporin) als Kontrolle. Bei den einzelnen Experimenten wurden jeweils Lysat-, Zytosol- und Zellmembran-Fractionen untersucht. Die Zellmembran-Fraktion bestand aus Membranproteinen, die durch Biotinilierung und anschließende Isolation mittels Avidin-Beads gewonnen wurden.

3.2.1 GLT1v

Ruhende Körnerzellen (5 mM KCl)

Abbildung 3.10 a zeigt einen repräsentativen Westernblot und Abbildung 3.10 b die Ergebnisse der Quantifizierung der Westernblots. Die bei Kontrollen bestimmten GLT1v Immunreaktivitäten in den Lysat-, Zytosol- und Zellmembran-Fractionen wurden gleich 100 % gesetzt.

Die Oberflächenexpression von biotinierten (Oberflächenmembran) GLT1v nimmt, – verglichen mit den Kontrollen- nach der PKC-Aktivierung (PMA) nicht signifikant um 41 % (141 ± 20 %; n=6) zu und nach der Inhibition (Staurosporin) um 44 % (66 ± 15 %; n=6) ab (nicht signifikant). Verglichen mit der Immunreaktivität nach Staurosporin ergibt sich damit nach PMA eine signifikante Zunahme um 115 % in der Oberflächenexpression.

Die Immunreaktivität in der Zytosolfraction zeigt nach der PKC-Aktivierung (PMA) (102 ± 16 %; n=6) keinen Unterschied zur Kontrolle und nimmt nach der Inhibition (Staurosporin) um 33 % (67 ± 18 %; n=6) ab (nicht signifikant). Verglichen mit der Immunreaktivität nach Staurosporin ergibt sich damit nach PMA eine Zunahme (nicht signifikant) um 52 % in der Zytosolfraction.

In der Lysatfraction besteht nach der PMA-Behandlung kein Unterschied (116 ± 18 %; n=6) zur Kontrolle. Nach der Staurosporin-Behandlung kommt es zwar zu Abnahme der Immunreaktivität um 35 % (65 ± 17 %; n=6) im Vergleich zur Kontrolle, jedoch ist die Abnahme nicht signifikant. Verglichen mit der Immunreaktivität nach Staurosporin ergibt sich damit nach PMA eine Zunahme (nicht signifikant) um 78 % in der Lysatfraction.

Chronisch depolarisierte Körnerzellen (27 mM KCl)

Abbildung 3.10 c zeigt einen repräsentativen Westernblot und Abbildung 3.10 d die Ergebnisse der Quantifizierung der Westernblots. Die unter Kontrollbedingungen bestimmten GLT1v Immunreaktivitäten in den Lysat-, Zytosol- und Zellmembran-Fractionen wurden gleich 100 % gesetzt. Bei den einzelnen Fractionen bestehen zwischen den verschiedenen Experimenten keine signifikanten Unterschiede.

Verglichen mit den Kontrollen ist die Oberflächenexpression nach PKC-Aktivierung (mittels PMA) $114 \pm 12,5$ % (n=7) und nach der PKC-Inhibition (mittels Staurosporin) $132 \pm 10,3$ % (n=7).

Die EAAC1-Immunreaktivität in der Zytosolfraction nimmt nach PKC-Aktivierung (PMA) um 27 % ($127 \pm 22,90$ %; n=7) und nach der PKC-Inhibition (Staurosporin) um 40 % ($140 \pm 15,50$ %; n=7) im Vergleich zur Kontrolle zu.

In der Lysatfraktion ergibt sich nach der PMA-Behandlung eine Zunahme um 29 % (129 ± 18 %; n=7) und nach der Staurosporin-Behandlung eine ähnliche Zunahme ($127 \pm 11,40$ %; n=7) im Vergleich zu Kontrollen.

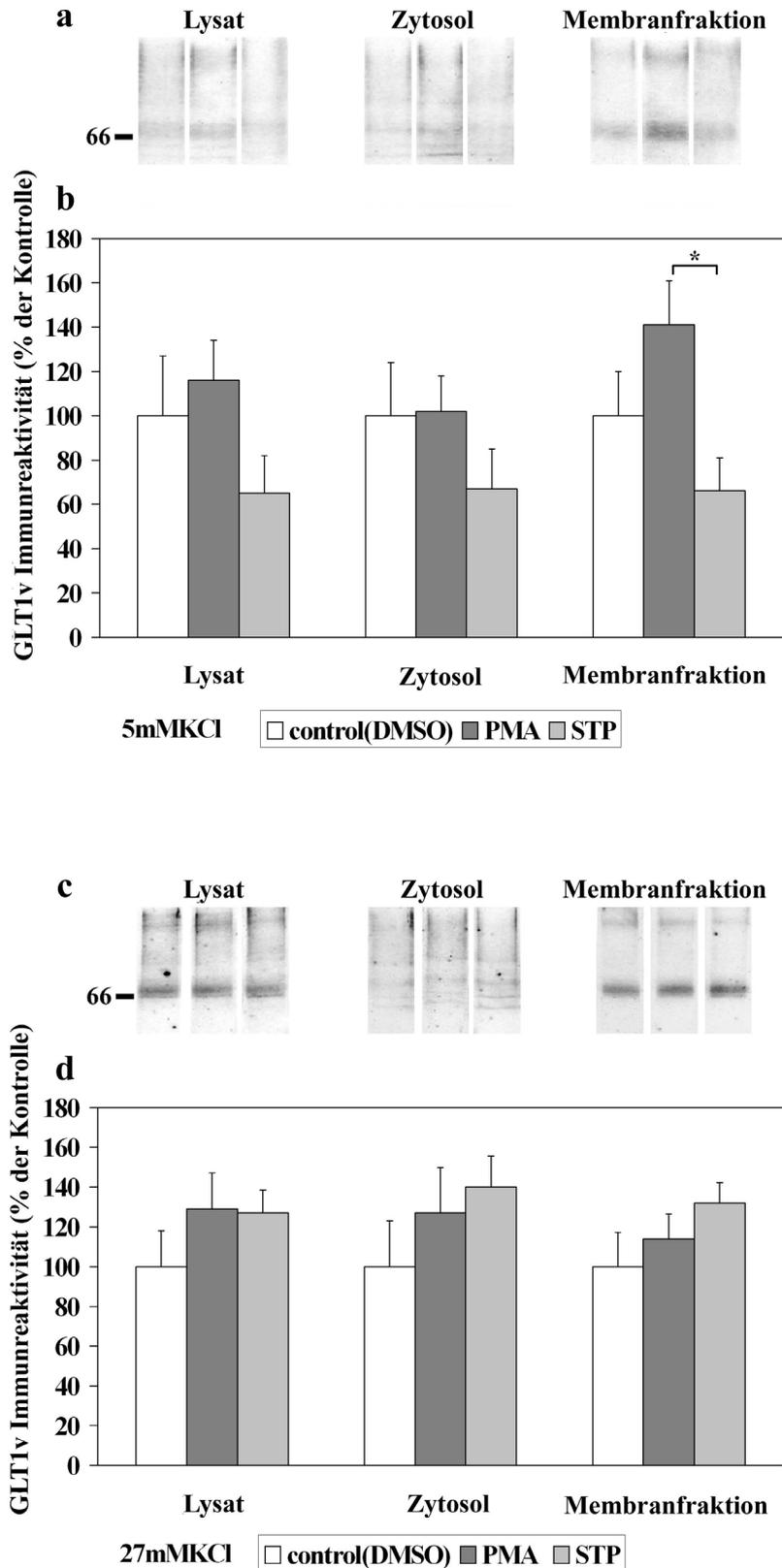


Abb. 3.10: Legende s. nächste Seite.

Abb. 3.10: Wirkung von PMA und Staurosporin (STP) auf die GLUT1v Zelloberflächenexpression in kultivierten Körnerzellen. Die Körnerzellen wurden entweder in einem Medium mit 5 mM (a, b) oder 27 mM KCl (c, d) kultiviert und mit 100 nM PMA, 1 μ M Staurosporin oder dem Lösungsmittel für beide Substanzen (DMSO) für 30 Min. bei 37° C am Kulturende behandelt. Zelloberflächenproteine wurden dann mit Biotinierungsreagenz inkubiert und biotinierte Proteine wurden von nicht biotinierten Proteinen mit Avidin-beschichteten Beads extrahiert. Die Proben wurden mittels Westernblot analysiert. Die auf 10 % SDS Polyacrylamid Gel aufgetragene Proteinmenge betrug für alle Experimente und für alle Fraktionen 3 μ g. (a, c) Repräsentative Westernblots von GLUT1v in Lysat-, Zytosol-, und Membranfraktionen. (b, d) Die Säulendiagramme resultierten aus mindestens 6 unabhängigen Experimenten (pro Experiment eine Doppelbestimmung), die in Prozent der Kontrolle dargestellt sind (Mittelwert \pm S.E). *, $p < 0,05$ (U-Test).

3.2.2 EAAC1

Ruhende Körnerzellen (5 mM KCl)

Abbildung 3.11a zeigt einen repräsentativen Westernblot und Abbildung 3.11b die Ergebnisse der Quantifizierung der Westernblots. Die unter Kontrollbedingungen (DMSO) ermittelten EAAC1 Immunreaktivitäten in der Lysat-, Zytosol- und Zellmembran-Fraktion wurden gleich 100 % gesetzt.

Im Vergleich zur Kontrolle nimmt die Oberflächenexpression von EAAC1 nach der PKC-Aktivierung (PMA) signifikant um 31 % ($131 \pm 10,94$ %; $n=11$) zu und nach der Inhibition (Staurosporin) um 23 % ($77 \pm 6,07$ %; $n=10$) ab (nicht signifikant). Verglichen mit der Immunreaktivität nach Staurosporin ergibt sich nach PMA eine signifikante Zunahme um 69 % in der Oberflächenexpression.

Die Immunreaktivität in der Zytosolfraktion nimmt nach PKC-Aktivierung (PMA) um 14 % ($114 \pm 14,30$ %; $n=11$) zu (nicht signifikant) und nach Inhibition (Staurosporin) um 19 % ($81 \pm 6,45$ %; $n=10$) ab (nicht signifikant) im Vergleich zur Kontrolle. Verglichen mit der Immunreaktivität nach Staurosporin ergibt sich damit nach PMA eine signifikante Zunahme um 41 % in der Zytosolfraktion.

In der Lysatfraktion besteht nach der PMA- ($106,5 \pm 13,95$ %; $n=11$) und nach der Staurosporin-Behandlung ($82,15 \pm 7,32$ %; $n=10$) kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Verglichen mit der Immunreaktivität nach Staurosporin ergibt sich damit nach PMA eine Zunahme (nicht signifikant) um 29 % in der Lysatfraktion.

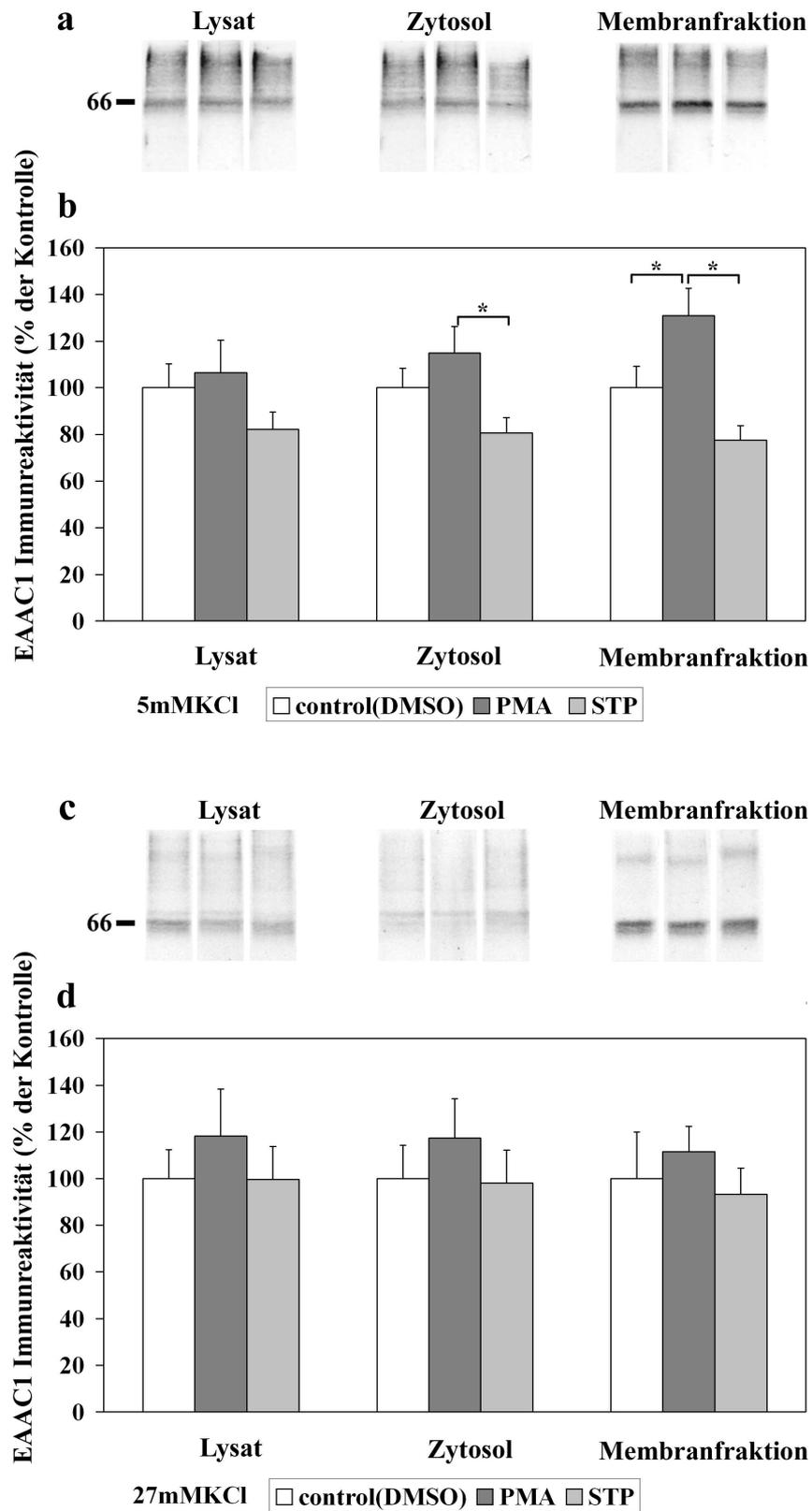


Abb. 3.11: Legende s. nächste Seite.

Abb. 3.11: Wirkung von PMA und Staurosporin (STP) auf die EAAC1 Zelloberflächenexpression in kultivierten Körnerzellen. Die Körnerzellen wurden entweder in einem Medium mit 5 mM (a, b) oder 27 mM KCl (c, d) kultiviert und mit 100 nM PMA, 1 μ M Staurosporin oder dem Lösungsmittel für beide Substanzen (DMSO) für 30 Min. bei 37° C am Kulturende behandelt. Zelloberflächenproteine wurden dann mit Biotinierungsreagenz inkubiert und biotinierte Proteine wurden von nicht biotinierten Proteinen mit Avidin-beschichteten Beads extrahiert. Die Proben wurden mittels Westernblot analysiert. Die auf 10 % SDS Polyacrylamid Gel aufgetragene Proteinmenge betrug für alle Experimente und für alle Fraktionen 3 μ g. (a, c) Repräsentative Westernblots von EAAC1 in Lysat-, Zytosol-, und Membranfraktionen. (b, d) Die Säulendiagramme resultierten aus mindestens 8 unabhängigen Experimenten (pro Experiment eine Doppelbestimmung), die in Prozent der Kontrolle dargestellt sind (Mittelwert \pm S.E). *, $p < 0,05$ (U-Test).

Chronisch depolarisierte Körnerzellen (27 mM KCl)

Abbildung 3.11 c zeigt einen repräsentativen Westernblot und Abbildung 3.11 d die Ergebnisse der Quantifizierung der Westernblots. Die unter Kontrollbedingungen bestimmten GLT1v Immunreaktivitäten in der Lysat-, Zytosol- und Zellmembran-Fraktion wurden gleich 100 % gesetzt. Bei den einzelnen Fraktionen bestehen zwischen den verschiedenen Experimenten keine signifikanten Unterschiede.

Verglichen mit Kontrollen beträgt die Oberflächenexpression nach der PKC-Aktivierung (mittels PMA) $111,5 \pm 10,9$ % (n=8) und nach der PKC-Inhibition (mittels Staurosporin) 93 ± 11 % (n=8).

Die EAAC1-Immunreaktivität in der Zytosolfraktion nimmt nach PKC-Aktivierung (PMA) um 17 % ($117,4 \pm 16,7$ %; n=8) zu und ergibt keinen Unterschied nach PKC-Inhibition (Staurosporin) (98 ± 14 %; n=8) im Vergleich zur Kontrolle.

In der Lysatfraktion ergibt sich nach der PMA-Behandlung eine Zunahme um 18 % ($118,4 \pm 20,1$ %; n=8), während nach der Staurosporin-Behandlung kein Unterschied ($99,5 \pm 14,1$ %; n=8) im Vergleich zur Kontrolle besteht.

4 Diskussion

Neuronale Verteilung von GLT1v und EAAC1 *in situ*

Die Spleißvariante GLT1v des Glutamatttransporters GLT1 wurde aus dem Rattengehirn (Schmitt et al. 2002) und den Neuronenkulturen des Vorderhirns der Ratte kloniert (Chen et al. 2002) und zeigt ähnliche Transporteigenschaften wie der generische, hochaffine GLT1 (Utsunomiya-Tate et al. 1997; Chen et al. 2002). GLT1v ist hauptsächlich in Neuronen nachweisbar (Schmitt et al. 2002; Kugler und Schmitt 2003). In Neuronen des somatosensorischen Kortex wurde GLT1v mittels Elektronenmikroskopie (Preembedding Immungold) in präsynaptischen Terminalen sowie in Dendriten gefunden (Chen et al. 2002). Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an der Retina der Ratte haben eine ebenfalls präsynaptische Lokalisation in Photorezeptorzellen ergeben (Kugler und Beyer 2003). Aufgrund dieser Lokalisation wurde vermutet, dass GLT1v ein wichtiger präsynaptischer Glutamatttransporter sein könnte (Chen et al. 2002).

Eine Studie am Gehirn der GLT1 Knockout-Maus ließ jedoch Zweifel an der Spezifität des GLT1v-Peptidantikörpers entstehen. So wurde gezeigt, dass bei der Immunreaktion von Gehirnschnitten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen bestanden (Chen et al. 2004). Dieser Befund wurde mit einem polyklonalen Peptidantikörper vom Kaninchen gegen die einzigartige 11 Aminosäure-Sequenz des GLT1v-C-Terminus erhoben. Dieser Antikörper wurde auch in vorliegender Untersuchung benutzt. Ein mögliches Spezifitätsproblem wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet (Kugler, unveröffentlicht). Dabei wurde mittels Westernblot-Analyse herausgefunden, dass im Gehirn von Wildtyp- und Knockout-Mäusen eine GLT1v-Form mit einer molekularen Masse von ~ 35 kDa vorkommt, die am N-Terminus trunziert ist. Diese verkürzte GLT1v-Form ist auch mit dem gegen den C-Terminus gerichteten GLT1v-Antikörper in Hirnschnitten nachweisbar. Dies dürfte erklären, warum beim immunhistochemischen Nachweis von GLT1v keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen zu beobachten sind. Eine ähnliche Situation wurde von der Serotonintransporter Knockout-Maus berichtet. Diese Maus exprimiert ein am N-Terminus verkürztes, inaktives Serotonintransporter-Protein, das in Gehirnschnitten mit einem Antikörper gegen den C-Terminus des Serotonintransporters nachgewiesen werden kann (Ravary et al. 2001) und somit ein ähnliches Reaktionsmuster ergibt wie die Wildtyp-Maus.

Eine Reihe von Untersuchungen haben ergeben, dass der hochaffine Glutamatttransporter EAAC1 in Perikarya und Dendriten von Neuronen lokalisiert ist (Rothstein et al. 1994; Velaz-Fairecloth et al. 1996; Coco et al. 1997; Shashidharan et al. 1997; Kugler

und Schmitt 1999). Mittels Preembedding-Immungold-Elektronenmikroskopie wurde darüberhinaus gezeigt, dass EAAC1 zusätzlich in Axonen und Terminalen vorkommt (He et al. 2000). Daraus ergibt sich, dass EAAC1 eine ähnliche neuronale Verteilung wie GLT1v aufweist. Außerdem ergaben Untersuchungen auf subzellulärer Ebene, dass EAAC1 (Davis et al. 1998; Kugler und Schmitt 1999; He et al. 2000) und GLT1v (Schmitt et al. 2002; Chen et al. 2002) bevorzugt zytoplasmatisch in granulärer Form vorkommen, was auf eine vesikuläre Lokalisation beider Transporterproteine hinweist.

Für die vorliegende Untersuchung ist es wichtig, dass die beiden Glutamattransporter auch im Kleinhirn vorkommen. So wurde mittels *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenzmikroskopie am Kleinhirn der Ratte nachgewiesen, dass EAAC1 (Schmitt et al. 1997) und GLT1v (Schmitt et al. 2002) in Körnerzellen vorkommen. Eine subzelluläre Analyse über die Verteilung der beiden Glutamattransporter in Neuronen des Kleinhirns liegt jedoch bisher nicht vor.

Kultivierte zerebelläre Körnerzellen enthalten GLT1v, EAAC1 und PKC (α , β , γ)

Die primäre Kleinhirnkultur aus der Maus enthält hauptsächlich Körnerzellen (Thangnipon et al. 1983; Kingsbury et al. 1985). Wie bereits *in situ* gezeigt wurde (Schmitt et al. 1997; Schmitt et al. 2002), konnten wir GLT1v und EAAC1 auch in kultivierten zerebellären Körnerzellen immunzytochemisch nachweisen. Bis jetzt wurde das Vorkommen von EAAC1 in zerebellären Kulturen nur mittels Westernblot gezeigt (Chan et al. 2003). Neben den Körnerzellen kommen in der Kleinhirnkultur nur wenige astrogliale Zellen vor (Thangnipon et al. 1983; Kingsbury et al. 1985), die wir mittels GLAST-Immunzytochemie nachweisen konnten. Die von uns untersuchten Glutamattransporter GLT1v und EAAC1 werden von diesen Gliazellen in geringem Ausmaß exprimiert und spielen damit für unsere Körnerzelleexperimente eine untergeordnete Rolle.

Für die von uns durchgeführten Körnerzelleexperimente ist es wichtig, dass in primären zerebellären Zellkulturen zwischen dem 6. bis 14. Entwicklungstag die meisten PKC-Isoformen (α , β I, β II, δ , ϵ , γ , λ , θ , ζ) exprimiert werden, wie dies mittels Westernblot gezeigt wurde (Popp et al. 2006). Diese PKC-Formen wurden auch in Kleinhirnhomogenaten von 6, 14 und 21 Tage alten Ratten nachgewiesen. Wir konnten nun mittels Immunzytochemie auch nachweisen, dass die klassischen PKC-Isoformen (α , β , γ) vor allem in kultivierten Körnerzellen lokalisiert sind. Die Bedeutung des Vorkommens der PKC wird daraus ersichtlich, dass nach Aktivierung der PKC α eine Zunahme der Zelloberflächenexpression von EAAC1 in C6 Gliomazellen erfolgt (Gonzalez et al. 2002). Demgegenüber ist über eine Interaktion zwischen PKC und GLT1v nichts bekannt, jedoch enthält GLT1v am C-Terminus ein putatives PDZ-Domänen Bindungsmotiv (Schmitt et al. 2002). Dieses Bindungsmotiv interagiert mit PICK1 (protein interacting with C kinase 1), ein mit PKC interagierendes Protein (Lit. bei, Berger et al. 2005). Es

ist daher denkbar, dass durch Interaktion zwischen GLT1v und PICK1 die GLT1v-Translokation über einen PKC abhängigen Weg reguliert wird.

Nach unseren immunzytochemischen Untersuchungen kommen GLT1v, EAAC1 und klassische PKC in Zytoplasma und Zellmembranen von Perikarya und Fortsätzen kultivierter Körnerzellen vor. Die Neuriten von Körnerzellen besitzen zahlreiche Varikositäten in unterschiedlicher Größe. Wir konnten auch mit einer Immungold-Preembedding-Elektronenmikroskopie im Kleinhirn der adulten Maus zeigen, dass GLT1v und EAAC1 in den Varikositäten (präsynaptische Elemente) der Parallelfasern aber auch in postsynaptischen Dornen der Purkinjezellen lokalisiert sind. *In situ* bilden die Parallelfasern von Körnerzellen mit Dendritendornen von Purkinjezellen Synapsen (s. Einleitung). Die Parallelfasern und ihre Varikositäten sind das *in situ* Äquivalent von Neuriten und ihren Varikositäten kultivierter zerebellärer Körnerzellen (Powell et al. 1997). Aufgrund dieser Übereinstimmungen *in situ* und *in vitro* können kultivierte zerebelläre Körnerzellen als ein Modellsystem für die *in situ* Verhältnisse betrachtet werden.

In den Varikositäten kultivierter Körnerzellen wurde eine große Zahl von Vesikeln nachgewiesen, die verschiedene synaptische Vesikelmembranproteine enthalten, u.a. SV2, VAMP2, SNAP25, und Synaptophysin (Marxen et al. 1999). Wir haben auch auf lichtmikroskopischer Ebene in Neuriten und ihren Varikositäten granuläre Aggregate beobachtet, die Anhäufungen von Vesikeln entsprechen dürften. Diese granulären Aggregate sind nach unseren Befunden für den vesikulären Glutamattransporter VGLUT 1 und 2 und für das synaptische Vesikelmembranprotein Synaptophysin immunpositiv. Auch von Immunblot-Analysen ist bekannt, dass die VGLUTs in zerebellären Kulturen vorkommen (Hallberg et al. 2006). Unsere Doppelimmunfluoreszenzanalysen zeigen, dass VGLUT und Synaptophysin in der gleichen Vesikelpopulation lokalisiert sind. Jedoch enthalten diese Vesikel weder GLT1v noch EAAC1. Ein ähnlicher Befund wurde bereits für den GABA-Transporter GAT1 in kultivierten Neuronen des Hippocampus erhoben. GAT1 wurde in Vesikelpopulationen gefunden, die nicht synaptischen Vesikeln entsprechen (Deken et al. 2003). Von besonderer Bedeutung ist jedoch nach unseren Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen, dass GLT1v und EAAC1 zudem in zwei unterschiedlichen nicht-synaptischen Vesikelpopulationen vorzukommen scheinen. Folglich scheinen die SVVs (Urakubo et al. 2003) eine gemischte Vesikelpopulation zu sein, die nicht nur an der Exozytose und am Recycling von synaptischen Vesikeln beteiligt sein dürften (Marxen et al. 1999), sondern auch an der Umverteilung von GLT1v und EAAC1 von und zur Oberflächenmembran.

Die Translokation von GLT1v und EAAC1 hängt vom elektrophysiologischen Status der zerebellären Körnerzellen ab

Zerebelläre Körnerzellen, die in einem Medium mit hoher Kaliumkonzentration (z.B. 25 mM KCl) kultiviert werden, befinden sich unter chronischer Depolarisation (Gallo et al.

1987; Balazs et al. 1988a). Demgegenüber befinden sich solche, die in einem Medium mit niedriger Kaliumkonzentration (z.B. 5 mM KCl) kultiviert werden, in einem elektrophysiologischen Ruhezustand. Bei unseren Kulturen wurden zerebelläre Körnerzellen 4 bis 6 Tage mit 5 oder 27 mM KCl kultiviert und dann für die PKC-Experimente verwendet. Für diese Experimente wurden die Kulturen mit dem PKC-Aktivator PMA oder mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin oder mit dem Lösemittel (DMSO) für beide Substanzen (als Kontrolle) inkubiert. Phorbolster, unter anderem PMA, aktivieren PKC durch Imitation des Diacylglycerol (DAG)-Effekts (DAG ist ein endogener PKC-Aktivator). DAG und Phorbolster aktivieren die PKC-Isoformen α , β , γ , δ , ϵ , η , μ und θ , während die atypischen Isoformen λ und ζ unempfindlich gegenüber Phorbolestern sind (Mizukami et al. 1997).

Beim Vergleich der verschiedenen Kulturexperimente ergab sich nur bei Körnerzellen, die bei niedriger Kaliumkonzentration kultiviert wurden, eine deutliche morphologische Veränderung nach PKC-Aktivierung mit PMA, und zwar nahmen die Varikositäten der Neuriten stark an Größe zu. In Perikarya und Varikositäten war unter diesen Bedingungen eine deutliche Immunreaktion beim Nachweis von PKC, GLUT1v und EAAC1 zu beobachten.

Um die Translokation der Glutamattransporter GLUT1v und EAAC1 in zerebellären Körnerzellen aus dem Zytoplasma zur Zellmembran und umgekehrt nachzuweisen, wurden Zelloberflächenproteine mit einem Zellmembran impermeablen Reagenz (Sulfo-NHS-Biotin) biotiniliert. Die biotinilierten Membranproteine wurden dann mittels Avidinbeads isoliert und die verschiedenen Zellfraktionen mittels Westernblot-Analysen quantifiziert. Die PKC-Aktivierung durch PMA ergab in ruhenden zerebellären Körnerzellen (5 mM Kalium) eine 41 % bzw. 31 % (signifikant) Zunahme von biotiniliertem (Zelloberflächen) GLUT1v bzw. EAAC1 im Vergleich zur Kontrolle. Eine ähnliche Zunahme in der EAAC1-Oberflächenexposition von etwa 38 % bzw. 45 % wurde in primären Neuronen-angereicherten Kulturen vom fötalen Vorderhirn der Ratte (Guillet et al. 2005) bzw. in primären Neuronen-angereicherten Kulturen vom embryonalen Kortex der Ratte beobachtet (Gonzalez et al. 2002).

Eine offensichtlich höhere EAAC1-Oberflächenexposition von etwa 60 % wurde in C6-Gliomazellen nach PMA-Behandlung nachgewiesen (Davis et al. 1998). Dieser größere Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass PKC in diesen Zellen in einem nicht-aktivierten Zustand vorliegt und erst durch PMA eine volle Aktivierung erfährt. Dies lässt sich aus vergleichenden Hemm- und Aktivierungsversuchen der PKC schließen (Davis et al. 1998). Anders verhält es sich in unserem Kultursystem. So war bei den Staurosporin-behandelten Körnerzellen die Oberflächenexposition von GLUT1v und EAAC1 um 44 % bzw. 23 % niedriger (obwohl nicht signifikant) als in Kontrollzellen. Vergleicht man somit Körnerzellen nach PMA mit solchen nach einer Staurosporinbehandlung, so beträgt die Oberflächenzunahme nach der PMA-Behandlung bei GLUT1v

bzw. EAAC1 115 % bzw. 69 %. Die Ursache hierfür könnte sein, dass PKC in Körnerzellen unter Kontrollbedingungen in einem bereits aktivierten Zustand vorliegt, wie dies von Lin et al. (1997) beschrieben wurde. Sie konnten zeigen, dass die PKC α -Aktivitäten in zerebellären Körnerzellen bis zu 4 Tage in Kultur mit 5 mM Kalium zunehmen und dann keine weiteren Änderungen zwischen Kulturtag 4 und 6 zeigen; also in der Zeitphase, in der wir unsere PKC-Experimente durchführten. Insgesamt zeigt die Zunahme von biotinierten (Zelloberflächen) GLUT1v und EAAC1 nach PMA, dass ein bedeutender Anteil von GLUT1v und EAAC1 als mobilisierbarer Reservepool im Zytoplasma vorliegt.

Zerebelläre Körnerzellen, die mit 27 mM KCl kultiviert wurden (chronische Depolarisation) ergaben demgegenüber keine signifikanten Änderungen in der Oberflächenexposition von GLUT1v und EAAC1, wenn die verschiedenen experimentellen Bedingungen miteinander verglichen werden (PMA, Staurosporin). In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass unter chronischer Depolarisation eine erhöhte Exozytoserate und eine Abnahme der SVVs zu beobachten ist (Urakubo et al. 2003). Zudem wurde beim GABA-Transporter GAT1 nachgewiesen, dass die GAT1-Rezirkulierung und die relative Menge von GAT1 in der Oberflächenmembran in Anwesenheit von hoher Kaliumkonzentration zunehmen (Deken et al. 2003). Es wurde außerdem gezeigt, dass es zwischen den Kulturtagen 4 und 6 zu einer starken Zunahme der PKC α -Aktivitäten in zerebellären Körnerzellen kommt, die bei hoher Kaliumkonzentration kultiviert wurden (Lin et al. 1997). Insgesamt könnten diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass eine weitere Aktivierung von PKC durch PMA zu keiner weiteren Zunahme der Oberflächenexposition von GLUT1v und EAAC1 führt. Es bleibt jedoch zu klären, warum die PKC-Inhibition durch Staurosporin zu keiner Abnahme von biotinierten (Oberflächenmembran) GLUT1v und EAAC1 führt. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass ein Trafficking von EAAC1 nicht nur von PKC sondern auch von weiteren Signalwegen abhängt. So führt die Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) mittels Wortmannin zu einer vollständigen Blockade der PKC-abhängigen Umverteilung von EAAC1 (Davis et al. 1998). Somit ist es denkbar, dass weitere Signalwege bei chronisch depolarisierten zerebellären Körnerzellen berücksichtigt werden müssen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Signalwege hierbei eine Rolle spielen.

Insgesamt lassen die Untersuchungen den Schluß zu, dass die Oberflächenexposition von GLUT1v und EAAC1 in kultivierten zerebellären Körnerzellen (a) ähnlich reguliert werden dürfte, (b) in Varikositäten der glutamatergen Körnerzellen stattfindet (dem Ort der synaptischen Freisetzung von Glutamat), und (c) vom elektrophysiologischen Status von Körnerzellen abhängt. Unter *in vivo* Bedingungen dürfte eine PKC-Aktivierung durch Bindung synaptisch freigesetzten Glutamats an metabotrope Glutamatrezeptoren erfolgen (Amara und Fontana 2002). Die PKC-Aktivierung ihrerseits führt zur vermehr-

ten Oberflächenexposition von EAAC1 und GLT1v, was zu einer gesteigerten Rücknahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt in die Terminale führt.

5 Zusammenfassung

Der Glutamattransporter GLUT1v, eine Spleißvariante von GLUT1, kommt hauptsächlich im Zytoplasma von Neuronen vor. Es wurde gezeigt, dass GLUT1v ein putatives PDZ-Domänen-Bindungsmotiv am C-Terminus enthält und mit PICK1, ein mit PKC interagierendes Protein, interagiert. Es ist daher denkbar, dass durch Interaktion zwischen GLUT1v und PICK1 die GLUT1v-Translokation über eine PKC-abhängigen Phosphorylierung reguliert wird.

In der vorliegenden Untersuchung wurden kultivierte zerebelläre Körnerzellen aus der Maus benutzt, um mittels Immunzytochemie und Biotinilierung/Westernblot zu zeigen, ob eine GLUT1v-Translokation über einen PKC-abhängigen Signalweg reguliert wird und sollte dies der Fall sein, ob diese Regulation vom elektrophysiologischen Status der zerebellären Körnerzellen abhängt. Vergleichstudien wurden mit EAAC1 durchgeführt.

Die Körnerzellen wurden in einem Medium mit 27 mM KCl (chronisch depolarisierte Körnerzellen) und mit 5 mM KCl (ruhende Körnerzellen) kultiviert. Eine 30 minütige PKC-Aktivierung durch Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) ergab in ruhenden Körnerzellen eine 41 % bzw. 31 % (signifikante) Zunahme in der Zelloberflächenexposition von GLUT1v bzw. EAAC1 im Vergleich zur Kontrolle. Vergleicht man Körnerzellen nach PMA- mit solchen nach 30 minütiger Staurosporinbehandlung (PKC-Inhibitor), so beträgt die Oberflächenzunahme nach der PMA-Behandlung bei GLUT1v bzw. EAAC1 115% bzw. 69%. Zerebelläre Körnerzellen, die mit 27 mM KCl kultiviert wurden (chronische Depolarisation), ergaben demgegenüber keine signifikanten Änderungen in der Oberflächenexpression von GLUT1v und EAAC1, beim Vergleich der verschiedenen experimentellen Bedingungen (PMA, Staurosporin).

Die immunzytochemischen Untersuchungen ergaben, dass bei ruhenden Körnerzellen (5mM KCl) nach PKC-Aktivierung mittels PMA zahlreiche, große Varikositäten (prä-synaptische Elemente der Neuriten) auftreten, die eine intensive Immunreaktivität für GLUT1v und EAAC1 zeigen. Wir konnten auch nachweisen, dass beide Transporter in getrennten Vesikelpopulationen vorkommen. Die Immunelektronenmikroskopie am Kleinhirn der adulten Maus hat ergeben, dass GLUT1v und EAAC1 in Varikositäten der Parallelfasern von Körnerzellen lokalisiert sind. Dieses *in situ* Ergebnis stimmt somit mit den kultivierten Körnerzellen überein.

Insgesamt lassen die Untersuchungen den Schluss zu, dass die Oberflächenexpression von GLUT1v und EAAC1 (1) ähnlich reguliert zu werden scheint, (2) in Varikositäten von glutamatergen Körnerzellen stattfindet, aus denen Glutamat freigesetzt wird, und (3) vom elektrophysiologischen Status der zerebellären Körnerzellen abhängt.

6 Summary

The glutamate transporter GLT1v, a splice variant of GLT1, is present mainly in the cytoplasm of neurons. It is shown that GLT1v contains a putative PDZ domain binding motif and interacts with PICK1, a protein kinase C (PKC) interacting protein. The interaction between GLT1v and PICK1 could regulate trafficking of GLT1v via PKC dependent phosphorylation. In the present study we used cultured cerebellar granule cells (CGCs) from mice to demonstrate, applying immunocytochemistry and biotinylation/Western blotting, whether GLT1v trafficking is regulated by PKC and if so, whether this depends on the electrophysiologic state of CGCs. Comparative studies were performed with EAAC1.

The CGCs were cultured in high-potassium medium (chronic depolarization of CGCs) and in low-potassium medium (resting CGCs). Stimulation of PKC by phorbol ester resulted in resting CGCs in a 41% and 31% (significant) increase of cell surface localization of GLT1v and EAAC1, respectively, compared to controls, and a 115% and 69% increase, respectively, compared to staurosporine inhibition. No significant changes were observed in chronically depolarizing CGCs.

In resting CGCs stimulation of PKC enhanced the formation of large varicosities in neurites showing intense immunoreactivity for GLT1v and EAAC1. We showed also that both transporters were contained in different vesicle populations, and were localized *in situ* in varicosities of CGC parallel fibres. These findings provide evidence that the surface exposition of GLT1v and EAAC1 (1) seems to be similarly regulated, (2) takes place in varicosities of glutamatergic CGCs, where glutamate is thought to be released, and (3) depends on the electrophysiologic state of CGCs.

7 Literaturverzeichnis

- Altman J. (1982) Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *Exp. Brain Res.* 6, 8-49.
- Altman J und Bayer SA (1997) *Development of the Cerebellar System*. Boca Raton, CRC Press.
- Amara SG, Fontana AC (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41:313-318.
- Andersen BB, Gundersen HJ, Pakkenberg B (2003) Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J Comp Neurol* 466:356-365.
- Anelli R, Dunn ME, Mugnaini E (2000) Unipolar brush cells develop a set of characteristic features in primary cerebellar cultures. *J Neurocytol* 29:129-144.
- Antonov I, Chang S, Zakharenko S, Popov SV (1999) Distribution of neurotransmitter secretion in growing axons. *Neuroscience* 90:975-984.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4155-4160.
- Augustine GJ, Burns ME, DeBello WM, Pettit DL, Schweizer FE (1996) Exocytosis: proteins and perturbations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:659-701.
- Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C (1992) The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208:547-557.
- Bachmann L, Sitte P (1959) [Tolansky's method of determination of thickness of ultra-thin sections.]. *Mikroskopie* 13:289-304.
- Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK (2001) Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 276:36764-36769.
- Balazs R, Gallo V, Kingsbury A (1988a) Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res* 468:269-276.
- Balazs R, Jorgensen OS, Hack N (1988b) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437-451.
- Balazs R, Hack N, Jorgensen OS, Cotman CW (1989) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells: pharmacological characterization. *Neurosci Lett* 101:241-246.

- Balazs R, Resink A, Hack N, Van der Valk JB, Kumar KN, Michaelis E (1992) NMDA treatment and K(+)-induced depolarization selectively promote the expression of an NMDA-preferring class of the ionotropic glutamate receptors in cerebellar granule neurones. *Neurosci Lett* 137:109-113.
- Batchelor AM, Madge DJ, Garthwaite J (1994) synaptic activation of metabotropic glutamate receptors in the parallel fibre-Purkinje cell pathway in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 63:911-915. .
- Batchelor AM, Garthwaite J, (1997) Frequency detection and temporally dispersed synaptic signal association through a metabotropic glutamate receptor pathway. *Nature* 385:74-77.
- Becherer U, Rodeau JL, Feltz A (1997) Resting potential of rat cerebellar granule cells during early maturation in vitro. *J Neurobiol* 32:11-21.
- Berger UV, DeSilva TM, Chen W, Rosenberg PA (2005) Cellular and subcellular mRNA localization of glutamate transporter isoforms GLT1a and GLT1b in rat brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 492:78-89.
- Berod A, Hartman BK, Pujol JF (1981) Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem* 29:844-850.
- Borges K DR (1998) AMPA receptors: molecular and functional diversity. *Prog Brain Res* 116:153-170.
- Bortolotto ZA, Collingridge GL (1993) Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. *Neuropharmacology* 32:1-9.
- Boudin H, Doan A, Xia J, Shigemoto R, Huganir RL, Worley P, Craig AM (2000) Pre-synaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* 28:485-497.
- Brasnjo G, Otis TS (2001) Neuronal glutamate transporters control activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors and influence cerebellar long-term depression. *Neuron* 31:607-616.
- Brew H, Attwell D (1987) Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* 327:707-709.
- Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA (1988) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res* 472:77-101.
- Burry RW, Lah JJ, Hayes DM (1991) Redistribution of GAP-43 during growth cone development in vitro; immunocytochemical studies. *J Neurocytol* 20:133-144.

- Butchbach ME, Lai L, Lin CL (2002) Molecular cloning, gene structure, expression profile and functional characterization of the mouse glutamate transporter (EAAT3) interacting protein GTRAP3-18. *Gene* 292:81-90.
- Canolle B, Masméjean F, Melon C, Nieoullon A, Pisano P, Lortet S (2004) Glial soluble factors regulate the activity and expression of the neuronal glutamate transporter EAAC1: implication of cholesterol. *J Neurochem* 88:1521-1532.
- Chan H, Zwingmann C, Pannunzio M, Butterworth RF (2003) Effects of ammonia on high affinity glutamate uptake and glutamate transporter EAAT3 expression in cultured rat cerebellar granule cells. *Neurochem Int* 43:137-146.
- Chan-Palay V und Palay SL (1987) *Cerebellum*. Boston, Birkhäuser.
- Chen W, Aoki C, Mahadomrongkul V, Gruber CE, Wang GJ, Blitzblau R, Irwin N, Rosenberg PA (2002) Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci* 22:2142-2152.
- Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV, Bassan M, DeSilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg PA (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:1136-1148.
- Chen Y, Swanson RA (2003) The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem* 84:1332-1339.
- Clemens MJ, Trayner I, Menaya J (1992) The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 103 (Pt 4):881-887.
- Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258:1498-1501.
- Coco S, Verderio C, Trotti D, Rothstein JD, Volterra A, Matteoli M (1997) Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 9:1902-1910.
- Collingridge GL, Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Connor JA, Tseng HY, Hockberger PE (1987) Depolarization- and transmitter-induced changes in intracellular Ca²⁺ of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J Neurosci* 7:1384-1400.

- Conradt M, Storck T, Stoffel W (1995) Localization of N-glycosylation sites and functional role of the carbohydrate units of GLAST-1, a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter. *Eur J Biochem* 229:682-687.
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M (1998) EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* 8:108-116.
- Cousin MA, Robinson PJ (1999) Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J Neurochem* 73:2227-2239.
- Cox JA, Felder CC, Henneberry RC (1990) Differential expression of excitatory amino acid receptor subtypes in cultured cerebellar neurons. *Neuron* 4:941-947.
- D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10989-10993.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danbolt NC, Pines G, Kanner BI (1990) Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochemistry* 29:6734-6740.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An $[Na^+ + K^+]$ -coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51:295-310.
- Dargent B, Arzac C, Tricaud N, Couraud F (1996) Activation of voltage-dependent sodium channels in cultured cerebellar Purkinje cells induces neurotoxicity that is not mediated by glutamate release. *Neuroscience* 73:209-216.
- Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18:2475-2485.
- Daw MI, Chittajallu R, Bortolotto ZA, Dev KK, Duprat F, Henley JM, Collingridge GL, Isaac JT (2000) PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 28:873-886.
- Deken SL, Wang D, Quick MW (2003) Plasma membrane GABA transporters reside on distinct vesicles and undergo rapid regulated recycling. *J Neurosci* 23:1563-1568.
- Dekker LV, Parker PJ (1994) Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 19:73-77.

- Dev KK, Nishimune A, Henley JM, Nakanishi S (1999) The protein kinase C alpha binding protein PICK1 interacts with short but not long form alternative splice variants of AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* 38:635-644.
- Dev KK, Nakajima Y, Kitano J, Braithwaite SP, Henley JM, Nakanishi S (2000) PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGLUR7. *J Neurosci* 20:7252-7257.
- Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ (1997) A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res* 288:119-126.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912-4916.
- Dutton GR, Currie DN, Tear K (1981) An improved method for the bulk isolation of viable perikarya from postnatal cerebellum. *J Neurosci Methods* 3:421-427.
- El Far O, Airas J, Wischmeyer E, Nehring RB, Karschin A, Betz H (2000) Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *Eur J Neurosci* 12:4215-4221.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- Ferrer-Martinez A, Felipe A, Nicholson B, Casado J, Pastor-Anglada M, McGivan J (1995) Induction of the high-affinity Na(+)-dependent glutamate transport system XAG- by hypertonic stress in the renal epithelial cell line NBL-1. *Biochem J* 310 (Pt 2):689-692.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11.
- Fournier KM, Gonzalez MI, Robinson MB (2004) Rapid trafficking of the neuronal glutamate transporter, EAAC1: evidence for distinct trafficking pathways differentially regulated by protein kinase C and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 279:34505-34513.
- Freneau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31:247-260.

- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363-8375.
- Galli C, Meucci O, Scorziello A, Werge TM, Calissano P, Schettini G (1995) Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* 15:1172-1179.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203-2213.
- Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, Schousboe A (2000) The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signaling mechanisms. *Neurochem Int* 37:163-170.
- Giloh H, Sedat JW (1982) Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217:1252-1255.
- Gonzalez MI, Kazanietz MG, Robinson MB (2002) Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Mol Pharmacol* 62:901-910.
- Gonzalez MI, Bannerman PG, Robinson MB (2003) Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase Calpha and the neuronal glutamate transporter EAAC1. *J Neurosci* 23:5589-5593.
- Gordon AM, Kanner BI (1988) Partial purification of the sodium- and potassium-coupled L-glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 944:90-96.
- Grunewald M, Menaker D, Kanner BI (2002) Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1. *J Biol Chem* 277:26074-26080.
- Guerini D, Garcia-Martin E, Gerber A, Volbracht C, Leist M, Merino CG, Carafoli E (1999) The expression of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in cerebellar granule neurons is modulated by Ca²⁺. *J Biol Chem* 274:1667-1676.
- Guillet B, Lortet S, Masméjean F, Samuel D, Nieoullon A, Pisano P (2002) Developmental expression and activity of high affinity glutamate transporters in rat cortical primary cultures. *Neurochem Int* 40:661-671.
- Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL, Pisano P (2005) Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46:337-346.

- Hack N, Hidaka H, Wakefield MJ, Balazs R (1993) Promotion of granule cell survival by high K⁺ or excitatory amino acid treatment and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase activity. *Neuroscience* 57:9-20.
- Hallberg OE, Bogen IL, Reistad T, Haug KH, Wright MS, Fonnum F, Walaas SI (2006) Differential development of vesicular glutamate transporters in brain: an in vitro study of cerebellar granule cells. *Neurochem Int* 48:579-585.
- Hatten ME, Heintz N (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 18:385-408.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.
- He Y, Janssen WG, Rothstein JD, Morrison JH (2000) Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 418:255-269.
- Headley PM, Grillner S (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 11:205-211.
- Hediger MA (1999) Glutamate transporters in kidney and brain. *Am J Physiol* 277:F487-492.
- Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Nishida M, Morita I (2003) Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *J Neural Transm* 110:1337-1348.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Jacobson RD, Virag I, Skene JH (1986) A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci* 6:1843-1855.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4137-4141.
- Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, Meister A (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1913-1917.
- Johannes L, Galli T (1998) Exocytosis: SNAREs drum up! *Eur J Neurosci* 10:415-422.
- Kanai Y, Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:467-471.
- Kanai Y, Smith CP, Hediger MA (1993) A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. *Faseb J* 7:1450-1459.

- Kanai Y, Bhide PG, DiFiglia M, Hediger MA (1995) Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *Neuroreport* 6:2357-2362.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, New York.
- Kanner BI, Sharon I (1978) Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 17:3949-3953.
- Kazanietz MG (2000) Protein kinase C and novel receptors for the phorbol esters and the second messenger diacylglycerol. *Medicina (B Aires)* 60:685-688.
- Kingsbury A, Balazs R (1987) Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol* 140:275-283.
- Kingsbury AE, Gallo V, Woodhams PL, Balazs R (1985) Survival, morphology and adhesion properties of cerebellar interneurons cultured in chemically defined and serum-supplemented medium. *Brain Res* 349:17-25.
- Kugler P (1993) Enzymes involved in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Int Rev Cytol* 147:285-336.
- Kugler P, Schmitt A (1999) Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27:129-142.
- Kugler P, Beyer A (2003) Expression of glutamate transporters in human and rat retina and rat optic nerve. *Histochem Cell Biol* 120:199-212.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lasher RS, Zagon IS (1972) The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res* 41:482-488.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18:8751-8757.
- Levenson J, Weeber E, Selcher JC, Kategaya LS, Sweatt JD, Eskin A (2002) Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nat Neurosci* 5:155-161.
- Levi G, Aloisi F, Ciotti MT, Gallo V (1984) Autoradiographic localization and depolarization-induced release of acidic amino acids in differentiating cerebellar granule cell cultures. *Brain Res* 290:77-86.

- Levy LM, Warr O, Attwell D (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 18:9620-9628.
- Lin WW, Wang CW, Chuang DM (1997) Effects of depolarization and NMDA antagonists on the role survival of cerebellar granule cells: a pivotal role for protein kinase C isoforms. *J Neurochem* 68:2577-2586.
- Lin CI, Orlov I, Ruggiero AM, Dykes-Hoberg M, Lee A, Jackson M, Rothstein JD (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 410:84-88.
- Liposits Z, Sherman D, Phelix C, Paull WK (1986) A combined light and electron microscopic immunocytochemical method for the simultaneous localization of multiple tissue antigens. Tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Histochemistry* 85:95-106.
- Llinas RR (1981) Cerebellar modelling. *Nature* 291:279-280.
- Marxen M, Volkhardt W, Zimmermann H (1999) Endocytic vacuoles formed following a short pulse of K⁺ -stimulation contain a plethora of presynaptic membrane proteins. *Neuroscience* 94:985-996.
- Mathews GC, Diamond JS (2003) Neuronal glutamate uptake Contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *J Neurosci.* 23:2040-2048.
- Meiri KF, Burdick D (1991) Nerve growth factor stimulation of GAP-43 phosphorylation in intact isolated growth cones. *J Neurosci* 11:3155-3164.
- Michaelis EK, (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369-415.
- Mineo C, Ying YS, Chapline C, Jaken S, Anderson RG (1998) Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J Cell Biol* 141:601-610.
- Morton SM, Bastian AJ (2004) Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist* 10:247-259.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.
- Najimi M, Maloteaux JM, Hermans E (2002) Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1. *FEBS Lett* 523:224-228.

- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function *Science* 258 (5082):597-603.
- Nakayama T, Kawakami H, Tanaka K, Nakamura S (1996) Expression of three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 36:189-192.
- Newton AC (1995) Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol* 5:973-976.
- Newton AC (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101:2353-2364.
- Nieoullon A, Canolle B, Masméjean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S. (2006) The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? *J Neurochem.* 98:1007-1018.
- Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229:374-392.
- Ozawa S KH, Tsuzuki K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.
- Padmanabhan J, Park DS, Greene LA, Shelanski ML (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci* 19:8747-8756.
- Pakkenberg B, Gundersen HJ (1997) Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* 384:312-320.
- Palay S, Chan-Palay V (1974) *Cerebellar cortex*. Springer, Berlin.
- Peachey LD (1958) Thin sections. I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. *J Biophys Biochem Cytol* 4:233-242.
- Pearce BR, Currie DN, Dutton GR, Hussey RE, Beale R, Pigott R (1981) A simple perfusion chamber for studying neurotransmitter release from cells maintained in monolayer culture. *J Neurosci Methods* 3:255-259.
- Peghini P, Janzen J, Stoffel W (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *Embo J* 16:3822-3832.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.

- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-467.
- Pita-Almenar JD, Sol Collado M, Colbert CM, Eskin A (2006) Different mechanisms exist for the plasticity of glutamate reuptake during early long-term potentiation (LTP) and late LTP. *J Neurosci* 26:10461-10471.
- Popp RL, Velasquez O, Bland J, Hughes P (2006) Characterization of protein kinase C isoforms in primary cultured cerebellar granule cells. *Brain Res* 1083:70-84.
- Powell SK, Rivas RJ, Rodriguez-Boulan E, Hatten ME (1997) Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J Neurobiol* 32:223-236.
- Ravary A, Muzerelle A, Darmon M, Murphy DL, Moessner R, Lesch KP, Gaspar P (2001) Abnormal trafficking and subcellular localization of an N-terminally truncated serotonin transporter protein. *Eur J Neurosci* 13:1349-1362.
- Robinson MB (2002) Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *J Neurochem* 80:1-11.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Salinovich O, Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156:341-347.
- Schmitt A, Asan E, Puschel B, Kugler P (1997) Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci* 17:1-10.
- Schmitt A, Asan E, Lesch KP, Kugler P (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109:45-61.
- Schoepfer R MH, Sommer B, Wisden W, Sprengel R, Kuner T, Lomeli H, Herb A, Kohler M, Burnashev N, et al. (1994) Molecular biology of glutamate receptors. *Prog Neurobiol* 42(2):353-357.

- Schousboe I, Larsson OM, Schousboe A (1989) Development of homospecific activity of GABA-transaminase in the mouse cerebral cortex and cerebellum and in neurons cultured from these brain areas. *Int J Dev Neurosci* 7:115-121.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904-4911.
- Seal RP, Amara SG (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:431-456.
- Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, Ganel R, Coulter DA, Rothstein JD (2002) A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J Neurosci* 22:6372-6379.
- Shanker G, Allen JW, Mutkus LA, Aschner M (2001) The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. *Brain Res* 902:156-163.
- Shashidharan P, Huntley GW, Murray JM, Buku A, Moran T, Walsh MJ, Morrison JH, Plaitakis A (1997) Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Res* 773:139-148.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ (1995) CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4:209-216.
- Sims KD, Robinson MB (1999) Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 13:169-197.
- Sims KD, Straff DJ, Robinson MB (2000) Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:5228-5237.
- Somogyi P, Takagi H (1982) A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* 7:1779-1783.
- Sonnewald U, Olstad E, Qu H, Babot Z, Cristofol R, Sunol C, Schousboe A, Waagepetersen H (2004) First direct demonstration of extensive GABA synthesis in mouse cerebellar neuronal cultures. *J Neurochem* 91:796-803.
- Staudinger J, Lu J, Olson EN (1997) Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with the COOH terminus of protein kinase C- α . *J Biol Chem* 272:32019-32024.

- Staudinger J, Zhou J, Burgess R, Elledge SJ, Olson EN (1995) PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J Cell Biol* 128:263-271.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10955-10959.
- Sudhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407:189-194.
- Tanabe H, Eguchi Y, Shimizu S, Martinou JC, Tsujimoto Y (1998) Death-signalling cascade in mouse cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* 10:1403-1411.
- Tanaka J, Ichikawa R, Watanabe M, Tanaka K, Inoue Y (1997) Extra-junctional localization of glutamate transporter EAAT4 at excitatory Purkinje cell synapses. *Neuroreport* 8:2461-2464.
- Tempia F, Miniaci MC, Anchisi D, Strata P (1998) Postsynaptic current mediated by metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 80:520-528.
- Thangnipon W, Kingsbury A, Webb M, Balazs R (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Brain Res* 313:177-189.
- Thomas RC (1972) Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 52:563-594.
- Torp R, Danbolt NC, Babaie E, Bjoras M, Seeberg E, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1994) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 6:936-942.
- Torres GE, Yao WD, Mohn AR, Quan H, Kim KM, Levey AI, Staudinger J, Caron MG (2001) Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 30:121-134.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.

- Trotti D, Nussberger S, Volterra A, Hediger MA (1997a) Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *Eur J Neurosci* 9:2207-2212.
- Trotti D, Peng JB, Dunlop J, Hediger MA (2001) Inhibition of the glutamate transporter EAAC1 expressed in *Xenopus* oocytes by phorbol esters. *Brain Res* 914:196-203.
- Trotti D, Rizzini BL, Rossi D, Haugeto O, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A (1997b) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci* 9:1236-1243.
- Urakubo T, Tominaga-Yoshino K, Ogura A (2003) Non-synaptic exocytosis enhanced in rat cerebellar granule neurons cultured under survival-promoting conditions. *Neurosci Res* 45:429-436.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1997) Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett* 416:312-316.
- Utsumi M, Ohno K, Onchi H, Sato K, Tohyama M (2001) Differential expression patterns of three glutamate transporters (GLAST, GLT1 and EAAC1) in the rat main olfactory bulb. *Brain Res Mol Brain Res* 92:1-11.
- Velaz-Faircloth M, McGraw TS, alandro MS, Fremeau RT, Jr., Kilberg MS, Anderson KJ (1996) Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain. *Am J Physiol* 270:67-75.
- Wadiche JI, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP (1995) Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* 14:1019-1027.
- Weyer A, Schilling K (2003) Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73:400-409.
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 25:1531-1546.
- Wiedenmann B FB (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41:1017-1028.
- Yamada H, Yamamoto A, Takahashi M, Michibata H, Kumon H, Moriyama Y (1996) The L-type Ca²⁺ channel is involved in microvesicle-mediated glutamate exocytosis from rat pinealocytes. *J Pineal Res* 21:165-174.
- Wilkin GP, Balazs R, Wilson JE, Cohen J, Dutton GR (1976) Preparation of cell bodies from the developing cerebellum: structural and metabolic integrity of the isolated cells. *Brain Res* 115:181-199.

- Yamada H, Yamamoto A, Takahashi M, Michibata H, Kumon H, Moriyama Y (1996) The L-type Ca²⁺ channel is involved in microvesicle-mediated glutamate exocytosis from rat pinealocytes. *J Pineal Res* 21:165-174.
- Yang W, Kilberg MS (2002) Biosynthesis, intracellular targeting, and degradation of the EAAC1 glutamate/aspartate transporter in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 277:38350-38357.
- Yong VW (1992) Proliferation of human and mouse astrocytes in vitro: signalling through the protein kinase C pathway. *J Neurol Sci* 111:92-103.
- Zerangue N, Kavanaugh MP (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383:634-637.
- Zhang L, Goldman JE (1996a) Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol* 370:536-550.
- Zhang L, Goldman JE (1996b) Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron* 16:47-54.
- Zhao Y, Zhang W, Kho Y, Zhao Y (2004) Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. *Anal Chem* 76:1817-1823.
- Zhu Y, Fei J, Schwarz W (2005) Expression and transport function of the glutamate transporter EAAC1 in *Xenopus* oocytes is regulated by syntaxin 1A. *J Neurosci Res* 79:503-508.
- Zmuda JF, Rivas RJ (1998) The Golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* 41:18-38.

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidestillata
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BME	Basal Eagle's Medium
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocyocarbonin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAATs	Excitatory Amino Acid Transporters
ECL	enhanced chemiluminescence
E-LTP	early phase long-term potentiation
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP43	Growth-Associated Protein 43
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HRP	horse-radish-peroxidase
IP3	Phosphatidylinositol
IP3-K	Phosphatidylinositol3-Kinase
kDa	Kilodalton
LSM	Laserscanningmikroskop
L-LTP	late-phase long-term potentiation
LTD	Langzeitdepression

LTP	Langzeitpotenzierung
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-Terminus	Amino-Terminus
MDCK	Madin-Darby canine kidney (Zellen)
mGLURs	metabotrope Glutamatrezeptoren
mIPSC	miniature inhibitory postsynaptic currents
M	Molar
Min.	Minute
NGS	Normales Ziegenserum
NeuN	Neuronal Nuclei
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PICK1	protein interacting with C kinase 1
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E	standard error
STP	Staurosporin
Str.	Stratum
SVV	Synaptische Vesikel ähnliche Vesikel
TEMED	Tetramethylethylendiamin

U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region (nicht kodierende Region)
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
VGLUT	vesikulärer Glutamattransporter
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danke

Ich möchte mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Professor Dr. Peter Kugler für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und Betreuung meiner Dissertation, die es mir ermöglichte, Erfahrungen in der Neurobiologie zu sammeln. Überaus dankbar bin ich für seine unermüdliche Unterstützung, seine motivierenden Diskussionen, die konstruktive Kritik und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Professor Dr. E. Buchner danke ich für das Interesse an der vorliegenden Arbeit sowie die Übernahme des Koreferats.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Lehrstuhl II des Anatomischen Institutes der Universität Würzburg und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. Detlev Drenckhahn.

Ein besonderes Dankeschön geht an die technischen Assistenten Frau Julia Medvedev und Frau Erna Kleinschroth, die mir sehr durch methodische Tipps, praktische Ratschläge und ihre uneingeschränkte ständige Unterstützung bei Labortätigkeiten geholfen haben.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau Professor Esther Asan bedanken, die mir die verschiedenen Methoden der Elektronenmikroskopie erklärt hat und mich bei meinen ersten Schritten beim Elektronenmikroskopieren begleitet hat. Vielen Dank auch für die investierte Zeit und die zahlreichen guten Ideen und Anregungen.

Insbesondere bin ich Frau Karin Reinfurt-Gehm und Frau Sieglinde Schenk für ihre ständige Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und Frau Rita Herrmann für die gelungenen Perfusionen dankbar. Für die zahllosen Entwicklungen der ELMI-Bilder bedanke ich mich bei Frau Doris Dettelbacher-Weber.

Herrn PD Dr. Stefan Hübner danke ich für seine Geduld und sein Können beim Umgang mit den Programmen Image J und EndNote, die für meine Arbeit sehr hilfreich waren.

Für die Geduld, Aufmunterungen und Unterstützung besonders in der letzten recht stressigen Phase bedanke ich mich bei meinen Eltern, Schwiegereltern und meinem Mann. Meiner Schwägerin und Lektorin Frau Christine Wulf danke ich für die schnelle Durcharbeitung dieser Dissertation.

Lebenslauf

Name: E. Ufuk Karatas-Wulf

Anschrift: Friedenstr. 39
97072 Würzburg

E-Mail: ufukkaratas@yahoo.de

Geburtsdatum: 16.07.1976

Geburtsort: Ankara

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: türkisch

Schulbildung: Grundschule Ankara 1982 - 1987
Gymnasium Adana 1987 - 1994

Studium: Lehramt für Biologie an der Hacettepe Universität/Ankara Sept. 1994 - Juli 1998

Diplom Biologie an der Universität Würzburg Apr. 1999 - Jan. 2002

Diplomarbeit in der Zell- und Entwicklungsbiologie unter Betreuung von Hr. Prof. U. Scheer mit dem Thema: „Expression und Lokalisierung von GFP-Fluoreszierenden ribosomalen Proteinen“
Abschluß: Diplom Januar 2003

Doktorarbeit im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg Juli 2003 – März 2004
nicht beendet, wegen schwerer Krankheit des Betreuers
Hr. PD Dr. U. Ernsberger

Doktorarbeit im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Kugler Apr. 2004 -

Würzburg, den 23.3.2007

Publikationsliste

Originalarbeit:

Eingereicht bei *The Journal of Neuroscience* (2007)

Ufuk Karatas-Wulf and Peter Kugler

Protein kinase-dependent trafficking of glutamate transporters GLT1v (EAAT2b) and EAAC1 in cultured cerebellar granule cells depends on their electrophysiologic state.

Posterpräsentationen:

23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg (2006)

E.U Karatas-Wulf und P. Kugler

Proteinkinase C (PKC) vermittelte Oberflächenexpression von Glutamattransportern in kultivierten cerebellären Körnerzellen der Maus.

Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen angewandt wurden. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen und Abbildungen sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt.

Ich erkläre ferner, dass ich bisher noch keinen weiteren akademischen Grad erworben habe oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 23.3.2007

Emine Ufuk Karatas-Wulf

