

Ziele

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es herauszufinden, ob a) eine Abnahme der glutamatergen Transmission im Terminationsfeld des Tractus perforans, d. h. in den äußeren zwei Dritteln des Stratum moleculare des Gyrus dentatus (nach Läsion der Regio entorhinalis) einhergeht mit einer Abnahme der astrozytären Expression von Glutamattransportern (GLT1 und GLAST) und ob es b) Unterschiede in der Expression von GLT1 und GLAST gibt.

Zu diesem Zweck wurde an adulten Ratten eine unilaterale elektrolytische Läsion der Regio entorhinalis vorgenommen. Die Hippocampi wurden ipsi- und kontralateral drei, 14 und 60 Tage nach Läsion untersucht und mit "scheinladierten" Kontrolltieren verglichen. Mit Hilfe einer quantitativen *in situ* Hybridisierung (ISH) wurden die relativen Veränderungen des mRNA-Gehalts von GLT1 und GLAST im Stratum moleculare des Gyrus dentatus gemessen. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die ISH mittels mit alkalischer Phosphatase (aP) markierten Oligonukleotidsonden eine geeignete Methode für mikrophotometrische Bestimmungen der relativen mRNA-Menge im Nervengewebe ist (Asan & Kugler, 1995). Es wurde auch die Schrumpfung des äußeren Drittels des Stratum moleculare, die nach der oben beschriebenen Läsion ipsilateral auftritt (Scheff *et al.*, 1980; Wagner *et al.*, 1983; Scheff, 1989; Kugler *et al.*, 1995), bestimmt und in die Auswertung der Ergebnisse der ISH einbezogen. Um die Validität der ISH mit Oligonukleotidsonden zu überprüfen, wurden ebenfalls nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierungen mit cRNA-Sonden durchgeführt. Schließlich wurden die Ergebnisse durch immunzytochemische Untersuchungen vervollständigt, um auch auf Proteinebene postläsionale Veränderungen nachweisen zu können. Dabei wurden Antikörper gegen synthetisch hergestellte GLT1- und GLAST-Peptide verwendet (Schmitt *et al.*, 1996, 1997).

Material und Methoden

Tiere

Für die Untersuchungen wurden 25 männliche, acht bis zwölf Wochen alte Wistar Ratten verwendet, die von Winkelmann Versuchstierzucht (Borchen) bezogen wurden. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten. Für die Operation wurden die Ratten mit 0,2 mg/kg Fentanyl i.m. (Hyponorm[®], Janssen, Neuss) betäubt. Mit Hilfe eines stereotaktischen Apparates wurden die Ratten einer unilateralen elektrolytischen Läsion des entorhinalen Cortex an fünf Punkten unter Verwendung folgender stereotaktischer Koordinaten unterzogen: caudal 25°, frontal 2 mm, lateral 4,2 und 5,2 mm, horizontal 1,6 mm fixiert und 2,2 mm mit zurückgezogener Elektrode; rostral 25° und lateral 6°, frontal 3,7 mm, lateral 6,4 mm, horizontal 0,8 mm, Inzisionsstab - 3,3 mm. Es wurde ein Stromstärke von 40 mA über eine unipolare Elektrode geleitet (RF Generator, Model L; Owl Instruments Ltd., Downsview, Ontario, Canada). Die elektrolytischen Läsionen wurden von Herrn Augstein (Neurobiologische Forschungsabteilung, Tropon-Werke, Köln) ausgeführt. Die Ratten wurden in leichter Äthernarkose drei, 14 und 60 Tage nach Läsion dekapitiert (jeweils fünf bzw. sechs Ratten pro Zeitpunkt). Sechs Tiere wurden 14 Tage nach Scheinläsion (Einführen der Elektrode ohne Elektrolyse) dekapitiert und dienten als Kontrollen.

Gewebepräparation

Die Gehirne wurden rasch entnommen und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren. Es wurden 12 µm dicke horizontale Kryostat-Schnitte (-20°C; Frigocut 2800 E, Reichert-Jung, Nussloch) angefertigt. Die Horizontalschnitte wurden in Höhe von interauralem Niveau 2,9-5,9 mm und Bregma 7,1-4,1 mm (Paxinos & Watson, 1986) angefertigt. Sie wurden auf raumtemperierte Superfrost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig) montiert und sofort für die ISH mit Oligonukleotidsonden verwendet (siehe unten). Weitere Schnitte wurden in 4% Formaldehyd fixiert und einer

Ethanol-Behandlung unterzogen (Kugler & Schmitt, 1999). Diese wurden für die ISH mit cRNA-Sonden und für die GFAP-Immunzytochemie verwendet (siehe unten). Die Schnitte für die GLT1- und GLAST-Immunzytochemie wurden in 1% Formaldehyd fixiert und anschließend mit Aceton behandelt (Schmitt *et al.*, 1996).

***In situ* Hybridisierung**

a) cRNA-Sonden

Es wurden mit Digoxigenin (DIG) markierte cRNA-Sonden (antisense und sense) verwendet, die nach Beschreibungen in der Literatur hergestellt wurden (GLT1: Schmitt *et al.*, 1996; GLAST: Schmitt *et al.*, 1997). Die GLT1-Sonde war komplementär zu den Nukleotiden 36-1748 der GLT1-Sequenz (Pines *et al.*, 1992). Die GLAST-cRNA-Sonde war komplementär zu den Nukleotiden 5-1710 der GLAST-Sequenz (Storck *et al.*, 1992).

Die Schnitte wurden nach der Ethanol-Behandlung (siehe oben) in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert, dann in 2 x Standard-Salz-Zitratlösung (SSC) überführt und schließlich mit 0,05 N HCl für 30 min behandelt. Nach Spülung mit 2 x SSC wurden die Schnitte mit frisch zubereitetem 0,25%igem Acetanhydrid inkubiert, wieder mit 2 x SSC gespült und schließlich mit der Hybridisierungslösung bedeckt. Diese setzte sich aus der DIG-markierten antisense (sense) cRNA-Sonde in einer Konzentration von 0,5-9 ng/ μ l und 550 μ g/ml Lachssperma-DNA (Sigma, Deisenhofen) in 4 x SSC, 1 x Denhardt's Lösung (Sambrook *et al.*, 1989), 10% Dextransulfat und 50% deionisiertem Formamid zusammen. Die Hybridisierungslösung wurde bei einer Temperatur von 60°C für 16-18 h auf den Schnitten belassen. Die Posthybridisierungsspülungen wurden schrittweise bei Raumtemperatur mit 2 x SSC, 1 x SSC, 50% Formamid und schließlich wiederum mit 2 x SSC durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit 40 μ g/ml Ribonuklease A (50 Kunitz-units/mg; Boehringer, Mannheim) in einer Lösung von 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA für 30 min bei 37°C behandelt, um nicht hybridisierte Einzelstrang-RNA zu beseitigen. Dann folgte eine Inkubation mit demselben Puffer ohne RNase A bei 60°C für 30 min.

Anschließend wurden die Schnitte für fünf Minuten in mit Tris gepufferter Kochsalzlösung (TBS; 100 mM Tris und 150 mM NaCl, pH 7.5) gespült, 30 min mit 0,5% Blocking Reagenz (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Boehringer) in TBS und schließlich 20 min mit 0,3% Triton X-100 in TBS inkubiert. Es folgte die Inkubation mit Anti-DIG-aP-Antikörpern vom Schaf (1,5 U/ml in TBS und 0,3% Triton X-100) für 60 Minuten, dann Spülung mit TBS und schließlich Spülung mit 0,1 M Tris-Puffer mit 100 mM NaCl und 50 mM MgCl₂ (pH 9.5) für zwei Minuten, bevor der aP-Nachweis durchgeführt wurde (siehe unten).

An einigen Schnitten wurde im Anschluss an den aP-Nachweis ein immunzytochemischer Nachweis des sauren Gliafilamentproteins (GFAP) durchgeführt. Dafür wurden ein monoklonaler Mausantikörper gegen GFAP (1:10 000; Dako, Hamburg), ein biotinylierter Zweitantikörper gegen Maus-IgG aus Ziegen Serum (1:200; Dako) und Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (Dako, Hamburg) verwendet. Die histochemische Reaktion für den HRP-Nachweis wurde mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Sigma, Deisenhofen) als Chromogen und Glukoseoxidase (Sigma, Deisenhofen) und β -D-Glucose (Sigma, Deisenhofen) durchgeführt (Asan, 1998).

b) Oligonukleotidsonden

Es wurden direkt mit alkalischer Phosphatase (aP) am 5'-Ende markierte 30mer Oligodesoxynukleotidsonden verwendet, welche komplementär zu folgenden Abschnitten der entsprechenden mRNA waren:

GLT1: 5'-CGTTCCATTGAGACCGCCGGTTACCTTTCA-3'
(antisense zu GLT1-Nukleotiden 1646-1675)

GLAST: 5'-CAACATCTCGGTTCTTCAGTTCATGTCGGG-3'
(antisense zu GLAST-Nukleotiden 1681-1710)

Die Sonden wurden von DNA Technology (Aarhus, Dänemark) synthetisiert.

Der ISH-Nachweis erfolgte nach Dägerlind *et al.* (1992). Die Gehirnschnitte (siehe oben) wurden aufgetaut und mit der Hybridisierungslösung (siehe oben) bedeckt und bei 37°C für 18-22 h hybridisiert. Die Sondenkonzentration betrug 6 (GLT1) bzw. 8 (GLAST) fmol/ μ l. Nach der Hybridisierung wurde für 4 x 15 min mit 1 x SSC bei 55°C gespült. Die Schnitte wurden nach Abkühlung auf Raumtemperatur für 30 min mit TBS gespült und anschließend für 10 min in 100 mM Tris-HCl mit 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ (pH 9.5) eingestellt. Nun folgte der aP-Nachweis (siehe unten).

Nachweis der alkalischen Phosphatase

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte nach Asan & Kugler (1995). Das Inkubationsmedium enthielt 0,4 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP, Boehringer), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,4 mM Tetranitroblau Tetrazoliumchlorid (TNBT; Serva, Heidelberg) in 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 9.5). Die Schnitte wurden für 24 h bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurden sie mit 0,1 mM EDTA enthaltendem 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) gespült und dann eingedeckt. Die mit Oligonukleotidsonden hybridisierten Schnitte wurden für die mikrophotometrischen Messungen des ISH-Reaktionsproduktes (Formazan von TNBT) verwendet (siehe unten).

Kontrollen für die *in situ* Hybridisierung

Der Ersatz von antisense cRNA-Sonden durch eine entsprechende Menge an identisch synthetisierten und markierten sense cRNA-Sonden ergab keine Reaktion. Es wurde ebenso keine Reaktion beobachtet, wenn ein 100-facher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotidsonden zusammen mit aP-markierten Sonden verwendet wurde. Dies bedeutet eine komplette kompetitive Hemmung der spezifischen Bindung der markierten Sonden in diesen Schnitten. Unabhängig von der angewandten Methode führte ein

Weglassen von markierten Sonden im jeweiligen Hybridisierungs-Gemisch zu komplett ungefärbten Schnitten.

Daraus ergibt sich, dass a) die antisense-Sonden spezifisch binden, b) beim Nachweis von Digoxigenin keine Färbeartefakte entstehen und c) keine endogene aP-Aktivität in den Schnitten vorhanden ist.

Quantitative *in situ* Hybridisierung

Die Quantifizierung der GLT1- und GLAST-ISH mit aP-markierten Oligonukleotidsonden (siehe oben) wurde nach einer Methode von Asan & Kugler (1995) durchgeführt. Für die quantitative Analyse wurden mikrospektrophotometrische Messungen des aP-Reaktionsproduktes (Formazan von TNBT) als sogenannte Endpunkt-Messungen (Kugler, 1988) durchgeführt. Da ein Oligonukleotidmolekül mit einem aP-Molekül markiert ist, besteht eine direkte Korrelation zwischen der jeweiligen mRNA-Konzentration und dem gebildeten Formazan - vorausgesetzt, es werden geeignete Inkubations- und Messbedingungen verwendet (Asan & Kugler, 1995).

a) Durchführung der Messungen

Für die Messungen wurde ein Computer-gesteuertes Leitz MPV-3 Scanning-Mikroskopphotometer benutzt, das an anderer Stelle genau beschrieben wurde (Kugler, 1988; Kugler *et al.*, 1988). Die mittlere optische Dichte (MOD) des Reaktionsprodukts wurde bei einer Wellenlänge von 557 nm gemessen, entsprechend dem molaren Extinktionskoeffizienten des Formazan von TNBT (Van Noorden *et al.*, 1983; Asan & Kugler, 1995). Folgende Mikrophotometereinstellungen wurden verwendet: Die Objektiv-Vergrößerung betrug x16, die Größe der Messblende war 3 µm. Bei jedem einzelnen Messvorgang wurde in einem quadratischen Messfeld (100 µm x 100 µm) an 60 Punkten entlang der x-Achse und 60 Punkten entlang der y-Achse die Dichte bestimmt, so dass das Messfeld in insgesamt 3600 Messpunkte aufgelöst wurde. Die

Messungen wurden im äußeren Anteil des Stratum moleculare des inneren Blattes des Gyrus dentatus (siehe Abb. 3c) vorgenommen. Es wurden mindestens 14 Messfelder nebeneinander gemessen, so dass das innere Blatt der Molekularschicht komplett vermessen wurde. Als Referenzwert diente ein Messfeld außerhalb des Schnittes. Dieser wurde bei der Berechnung der MOD berücksichtigt.

Insgesamt wurden sechs bis acht Schnitte pro Tier vermessen. Es wurde jeweils der Gyrus dentatus sowohl ipsi- als auch kontralateral zur Läsionsseite analysiert. Die MOD-Werte der ipsi- und kontralateralen Gyri dentati der lädierten Tiere wurden zu den entsprechenden Messungen an den scheinlädierten Tieren (Kontrollen) in Beziehung gesetzt.

b) Messung der Dicke des Stratum moleculare

Mehrere vorausgegangene Studien zeigen, dass nach der Läsion der Regio entorhinalis das Stratum moleculare des Gyrus dentatus schrumpft (Kugler *et al.*, 1995; Übersicht bei Scheff, 1989). Aus diesem Grund wurde das Ausmaß der Schrumpfung auch in vorliegender Untersuchung bestimmt und bei der Berechnung der mikrophotometrischen Daten (siehe oben) berücksichtigt.

Die Höhe des Stratum moleculare aller mikrophotometrisch vermessenen Schnitte wurde mit Hilfe eines Messobjektivs bestimmt. Es wurde der Quotient aus der Höhe der ipsilateralen (Läsionsseite) und kontralateralen Molekularschicht berechnet. Dieser Wert wurde bei der Auswertung der mikrophotometrischen Daten berücksichtigt.

c) Statistik

Für die statistische Auswertung wurde der "Wilcoxon matched pairs signed rank test" (Signifikanzniveau $p \leq 0.5$) verwendet. Verglichen wurden die mikrophotometrischen Messdaten von Kontrolltieren mit denen von lädierten Tieren, jeweils drei, 14 und 60 Tage nach Läsion.

Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Nachweise von GLT1 und GLAST wurden die Hirnschnitte (siehe oben) für drei Stunden bei Raumtemperatur mit 2% BSA (Bovines Serum-Albumin), 10% normalem Ziegenserum (Sigma, Deisenhofen) und 0,05% Tween 20 (Ferrak, Berlin) in PBS, pH 7.4, präinkubiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für jeweils 24-48 h bei 4°C mit affinitätsgereinigten Primärantikörpern vom Kaninchen (anti-GLT1 und anti-GLAST, 15 µg/ml) in der Präinkubationslösung inkubiert. Als Primärantikörper gegen GLT1 und GLAST wurden Peptidantikörper (Peptide aus dem Bereich des C-Terminus des jeweiligen Transporterproteins) verwendet (Beschreibung der Peptidantikörper und deren Affinitätsreinigung bei Schmitt *et al.*, 1996, 1997). Um die bekannten Veränderungen von Astrozyten nach Läsion festzustellen, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen GFAP (1:20.000) verwendet (Dako, Hamburg). Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurden die Schnitte für 90 min bei Raumtemperatur mit aP-markierten Zweitantikörpern (Antiserum von der Ziege gegen Kaninchen- oder Maus-IgG-aP, Verdünnung 1:100; Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Zum Nachweis des aP-markierten-Zweitantikörpers wurde das aP-Reaktionsmedium (siehe oben) verwendet. Zur Kontrolle wurden Schnitte mit Primärantikörpern inkubiert, die zuvor mit einem Überschuss an GLT1- bzw. GLAST-Peptid präinkubiert worden waren.

Ergebnisse

Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch war zu erkennen, dass der linke entorhinale Cortex vollständig durch die stereotaktische Läsion zerstört worden war, wobei der Hippocampus unbeschädigt blieb. In Bezug auf die Schrumpfung kann drei Tage nach der Läsion praktisch kein Unterschied festgestellt werden. 14 und 60 Tage nach der Läsion ist eine Abnahme der Höhe der Molekularschicht ipsilateral zur Läsion von ca. 30% bzw. 34% zu messen. Ähnliche Werte wurden bereits von Kugler *et al.* (1995) veröffentlicht. Kontralateral zur Läsionsseite können keine Veränderungen in der Höhe des Stratum moleculare im Vergleich zu den scheinladierten Tieren festgestellt werden.

***In situ* Hybridisierung**

Die Verwendung von cRNA- und Oligonukleotidsonden zeigt ein identisches zelluläres Verteilungsmuster von GLT1- und GLAST-mRNA im Hippocampus (Abb. 3). Jedoch ergeben die DIG-markierten cRNA-Sonden eine höhere Signalintensität (Abb. 3f-i) als die aP-markierten Oligonukleotidsonden (Abb. 3a-e), welche für die mikrophotometrischen Messungen eingesetzt wurden. Im Stratum moleculare des Gyrus dentatus wird mit den ISH-Sonden zum Nachweis von GLT1- und GLAST-mRNA dieselbe Zellpopulation markiert. In vorherigen Studien wurden diese Zellen eindeutig als Astrozyten identifiziert (Schmitt *et al.*, 1996, 1997). In vorliegender Arbeit wird durch Doppelmarkierung der Molekularschicht mit GFAP-Immunzytochemie gezeigt, dass auch postläsional nur Astrozyten GLT1 und GLAST exprimieren (Abb. 2). Bezüglich der intrazellulären Verteilung der mRNA ist die GLAST-mRNA vorwiegend im Bereich der Zellkörper konzentriert, während sich die GLT1-mRNA zusätzlich in den proximalen Zellfortsätzen nachweisen lässt (Abb. 2, Abb. 3f-i). Wenn man die ISH-Reaktion der scheinladierten Tiere (Kontrollen) mit der des kontralateralen Hippocampus der ladierten Tiere vergleicht, kann kein Unterschied festgestellt werden.

Abb. 2: Zelluläre Verteilung von GLT1-mRNA (a und b) und GLAST-mRNA (c und d) in der Molekularschicht des Gyrus dentatus ipsilateral zur Läsion (ipl) 14 Tage nach Läsion (pl). Die Paare a/b und c/d zeigen Schnitte nach *in situ* Hybridisierung (ISH) mit cRNA-Sonden im jeweils linken Bild und nach zusätzlicher immunhistochemischer GFAP-Markierung im rechten Bild. Durch die GFAP-immunpositiven Fortsätze sind die ISH-reaktiven Zellen als Astrozyten (Pfeilspitzen) identifiziert. Balken in a für a bis d: 30µm.

Bestätigt werden diese Beobachtungen auch durch die quantitativen mikrophotometrischen Messungen (siehe unten; Abb. 4).

Ipsilateral zu der Läsionsseite nehmen Anzahl und Intensität markierter Astrozyten ab (Abb. 3). Diese Veränderung ist bei der GLT1-ISH bereits drei Tage (Abb. 3a,b) nach der Läsion zu beobachten und schließlich mit etwas zeitlicher Verzögerung auch bei der GLAST-ISH (Abb. 3d,e).

Abb. 3: Regionale und zelluläre Verteilung von GLT1-mRNA (a, b, f, g) und GLAST-mRNA (c-e, h, i) im Hippocampus. Die ISH wurde mit Oligonukleotidsonden (a-e) oder antisense cRNA-Sonden (f-i) durchgeführt. Astrozyten in der Molekularschicht des Gyrus dentatus reagieren positiv (Pfeilspitzen). Zusätzlich sind die Pyramidenzellen (py in a) von CA3 GLT1-mRNA positiv, wie dies bereits beschrieben wurde (Schmitt *et al.*, 1996). Drei (b), 14 (e) und 60 Tage (f-i) nach Läsion (pl) beobachtet man in der Molekularschicht des Gyrus dentatus ipsilateral zur Läsionsseite (ipl) eine Abnahme des ISH-Signals im Vergleich zur kontralateralen Seite (cl) (a, d, f, h). Man beachte die Schrumpfung der Molekularschicht des ipsilateralen Gyrus dentatus 60 Tage nach Läsion (g und i) im Vergleich zur kontralateralen Seite (f und h). Die quadratischen Felder in (c) entsprechen den mikrophotometrischen Messfeldern in der Molekularschicht des Gyrus dentatus für die quantitative ISH. gr, Stratum granulosum; py, Stratum pyramidale; mu, Stratum multiforme; mo, Stratum moleculare. Balken in a für a bis e: 300 μ m; Balken in f für f bis i: 60 μ m.

Die quantitativen mikrophotometrischen Messungen des ISH-Reaktionsproduktes ergeben, dass es kontralateral zur Läsionsseite keine Veränderungen in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus im Vergleich zu den Kontrolltieren gibt (Abb. 4b,d). Ipsilateral zu der Läsionsseite kann zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Abnahme der ISH-Messwerte im Vergleich zu den Kontrolltieren sowohl bei GLT1 als auch bei GLAST festgestellt werden. Die Abnahme der Markierungsintensität ist bei GLT1 eindeutiger (bis zu 45%) als bei GLAST und statistisch signifikant drei, 14 und 60 Tage nach Läsion (Abb. 4a). Die Abnahme der GLAST-ISH-Reaktion ist nach drei Tagen noch nicht signifikant (\square 16%), jedoch 14 und 60 Tage nach Läsion (\square 35%) (Abb. 4c).

Abb. 4: Relative Menge (Prozent MOD, mittlere optische Dichte) an GLT1-mRNA (a und b) und GLAST-mRNA (c und d) in der äußeren Zone der Molekularschicht des Gyrus dentatus drei, 14 und 60 Tage nach Läsion (vgl. Abb. 3c). Die mikrophotometrisch ermittelten Werte der GLT1- und GLAST-ISH von lädierten Tieren (ipsi- und kontralateraler Gyrus dentatus) wurden mit denen der Kontrolltiere (Scheinläsion) (co, 100%) in Beziehung gesetzt. *P \square 0,05 im Vergleich zu Kontrolltieren.

Immunzytochemie

Die Inkubation von Kryostatschnitten mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen GLT1- und GLAST-Peptide ergibt eine relativ homogene Färbung des Neuropils der grauen Substanz. Dies ist wahrscheinlich auf die hohe Dichte von markierten astrozytären Membranen (vgl. Schmitt *et al.*, 1996, 1997) zurückzuführen. Der Nachweis der GLT1- und GLAST-Proteine mittels Immunzytochemie zeigt eine laminäre Anfärbung des Hippocampus (Abb. 5a,c), wie sie schon von Schmitt *et al.* (1996, 1997) beschrieben wurde. Insgesamt ist die Intensität der Reaktion mit GLT1-Antikörpern stärker als mit GLAST-Antikörpern (Abb. 5a,c). Im Gyrus dentatus von Kontrolltieren und kontralateral zur Läsionsseite, ist das Terminationsgebiet des Tractus perforans (äußere Zone des Stratum moleculare) intensiver angefärbt als die innere Zone des Stratum moleculare (Abb. 5a). Bei lädierten Tieren ist die Reaktionsintensität in der äußeren Schicht des Stratum moleculare auf der Läsionsseite geringer als in der inneren Schicht (Abb. 5b,d). Diese Beobachtungen stimmen mit den ISH-Ergebnissen überein. Bei der Immunzytochemie mit affinitätsgereinigten GLT1- und GLAST-Antikörpern, die vorher mit einem Überschuss an den entsprechenden synthetischen Peptiden präinkubiert wurden, kann keine Reaktion beobachtet werden.

Hinsichtlich der GFAP-Immunhistochemie ist im Vergleich zu den Kontrollen eine Zunahme stark reagierender Astrozyten im deafferentierten Terminationsfeld festzustellen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein (Poirier *et al.*, 1991; Steward *et al.*, 1993; Jucker *et al.*, 1995) und soll deshalb hier nicht weiter beschrieben oder dokumentiert werden.

Abb. 5: Verteilung von GLT1- (a und b) und GLAST-Protein (c und d) im Hippocampus. Immunzytochemischer Nachweis an Kryostat-Schnitten. 60 Tage nach Läsion (pl) ist eine mäßige bis starke Abnahme an Reaktionsintensität in der äußeren Zone (oz) der Molekularschicht des Gyrus dentatus ipsilateral (ipl) zur Läsion im Vergleich zu den Kontrolltieren (co, Scheinläsion) zu beobachten. gr, Stratum granulosum; py, Stratum pyramidale; mo, Stratum moleculare; mu, Stratum multiforme. Balken in a für a bis d: 300 μ m.

Diskussion

Mittels quantitativer ISH und Immunhistochemie konnten wir zeigen, dass eine unilaterale Läsion des entorhinalen Cortex zu einer signifikanten Abnahme der Expression der Glutamattransporter GLT1 und GLAST in Astrozyten des Terminationsfeldes des glutamatergen Tractus perforans (äußere Zone der Molekularschicht des Gyrus dentatus) ipsilateral zur Läsionsseite führt. In der entsprechenden Schicht der Gegenseite (kontralateral zur Läsion) konnte kein Unterschied im Expressionsmuster im Vergleich zu den scheinladierten Tieren (Kontrollen) beobachtet werden.

Für die ISH-Quantifizierung verwendeten wir eine aP-gekoppelte Oligonukleotidsonde (Asan & Kugler, 1995). Das Produkt der aP-Reaktion (Formazan von TNBT) wurde mikrophotometrisch bestimmt. Unter Beachtung identischer Hybridisierungsbedingungen besteht eine direkte Korrelation zwischen der Menge an alkalischer Phosphatase (und der von ihr gebildeten Menge an Reaktionsprodukt), die an die Ziel-mRNA über die spezifischen Oligonukleotidsonden gebunden wird, und der Menge an vorhandener Ziel-mRNA (Asan & Kugler, 1995). Aus diesem Grund ist diese Methode geeignet, relative Veränderungen in der Menge an GLT1- und GLAST-mRNA in definierten Gewebeabschnitten, wie z.B. die äußere Schicht des Stratum moleculare des Gyrus dentatus, zu messen.

Ultrastrukturelle Untersuchungen am Stratum moleculare des Gyrus dentatus haben ergeben, dass zwei bis drei Tage nach Läsion der Regio entorhinalis die Dichte an intakten Boutons im ipsilateralen Terminationsfeld um 74-87% (Steward & Vinsant, 1983) oder sogar um bis zu 95% (Lee *et al.*, 1977) abnimmt. Mit dieser starken Abnahme von glutamatergen Boutons (Übersicht bei Ottersen & Storm-Mathisen, 1989) stimmt der Befund überein, dass der Glutamatgehalt in den Synaptosomen des Gyrus dentatus nach Läsion der Regio entorhinalis um \square 40 % reduziert ist (Nadler & Smith,

1981). Dadurch nimmt die Menge an freigesetztem Glutamat an den Synapsen während der anfänglichen Degeneration der Terminalen des Tractus perforans sehr stark ab. Schon drei Tage nach Läsion des entorhinalen Cortex ist eine starke Abnahme der GLUT1-ISH-Reaktion $\square 45\%$ (signifikant) zu beobachten, sowie eine etwas geringere Abnahme um $\square 20\%$ (nicht signifikant) von GLAST. Diese Beobachtungen sprechen für eine starke Herunterregulierung von GLUT1 und in geringerem Ausmaß auch von GLAST bereits zu diesem frühen Zeitpunkt nach Läsion. 14 und 60 Tage nach Läsion ist dasselbe niedrige Expressionsniveau bei GLUT1 zu beobachten, während die GLAST-Expression noch weiter abnimmt, bis schließlich eine Abnahme von $\square 35\%$ 14 und 60 Tage nach Läsion im Vergleich zu Kontrollen erreicht ist. Somit ist die Abnahme der Expression von GLUT1 schneller und auch stärker als die Abnahme der Expression von GLAST.

GLUT1 und GLAST sind Glutamattransporter von Astrozyten (siehe Einleitung). Durch Kombination von ISH und immunzytochemischem Nachweis von GFAP (Markerprotein für Astrozyten) konnten wir zeigen, dass auch in der deafferentierten Molekularschicht des Gyrus dentatus beide Transporter ausschließlich in Astrozyten exprimiert werden. In der Mikroglia konnten wir weder GLUT1 noch GLAST nachweisen, obwohl berichtet wurde, dass GLUT1 in aktivierter Mikroglia immunzytochemisch detektierbar ist (Lopez-Redondo *et al.*, 2000). Dass der Nachweis von GLUT1-mRNA in Mikroglia mit unserem ISH-Protokoll nicht gelingt, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Konzentration an mRNA in diesen Zellen unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Es ist anzunehmen, dass GLUT1 und GLAST eine wichtige Rolle bei der Entfernung von synaptisch freigesetztem Glutamat spielen (Rothstein *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Stimulation von glutamatergen Schaffer-Kollateralen in Schnitten des Hippocampus Glutamattransporter in den Astrozyten von CA1 aktiviert (Bergles & Jahr, 1997). In Bezug auf die Morphologie der Astrozyten ist die Beobachtung wichtig, dass es ein bis zwei Tage nach Läsion des entorhinalen Cortex zu einer reaktiven Hypertrophie (Rose *et al.*, 1976; Lee *et al.*, 1977; Gage *et al.*, 1988; Scheff, 1989; Schmidbauer *et al.*, 1990) und

Proliferation (Hailer *et al.*, 1999) der Astrozyten im deafferentierten Terminationsfeld kommt. Die numerische Dichte der Astrozyten nimmt in der deafferentierten äußeren Schicht des Stratum moleculare des Gyrus dentatus um $\approx 27\%$ zu (Vijayan & Cotman, 1987). Zusätzlich wurde gezeigt, dass in reaktiven Astrozyten Proteinsynthese (z.B. von GFAP: Bigami & Dahl, 1976; Nathaniel & Nathaniel, 1981; Tetzlaff *et al.*, 1988; Laping *et al.*, 1991; Poirier *et al.*, 1991; Steward *et al.*, 1993; Jucker *et al.*, 1995) und Gen-Expression zunehmen (Steward *et al.*, 1990; Laping *et al.*, 1991).

Obwohl die Syntheseaktivität der Astrozyten zunimmt, beobachteten wir eine signifikante Abnahme der GLT1- und der GLAST-Expression im deafferentierten Terminationsfeld des Tractus perforans. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die Abnahme der Expression der Glutamattransporter in Astrozyten durch einen Verlust an glutamatergen Synapsen und damit durch eine Abnahme synaptisch freigesetzten Glutamats zu erklären ist. Diese These wird von neueren Studien unterstützt, die die unterschiedliche Regulation von GLT1 und GLAST an kultivierten Astrozyten zeigen. Die Expression von GLAST, aber nicht die von GLT1, scheint über Glutamatrezeptoraktivierung reguliert zu werden (Gegelashvili *et al.*, 1997). Glutamat kann eine rasche Hochregulation der astrozytären Glutamataufnahme bewirken. Diese glutamatinduzierte Stimulation der glutamatergen Aufnahme ist auf GLAST zurückzuführen, da die Hemmung von GLT1 einen vernachlässigbaren Effekt zeigt, und da in der Zellmembran nur GLAST unter diesen Bedingungen höher konzentriert zu sein scheint (Duan *et al.*, 1999). Andererseits zeigen Zellkulturstudien, dass die astrozytäre GLT1-Expression (aber nicht die GLAST-Expression) durch zusätzliche lösliche neuronale Faktoren unbekannter Struktur reguliert werden (Gegelashvili *et al.*, 1997). Auch wenn unterschiedliche neuronale Faktoren die Expressionsstärke der beiden astrozytären Transporter beeinflussen, dürfte insgesamt der Verlust an glutamaterger Innervation die Ursache für die Herunterregulierung von beiden Glutamattransportern in Astrozyten sein.

Levy *et al.* (1995) zeigten, dass sowohl GLT1 als auch GLAST nach Verlust von glutamatergen kortikalen Afferenzen im Striatum herunterreguliert werden, während

Lievens *et al.* (2000) einen vorübergehenden Anstieg der GLT1-Expression im Striatum als Folge der kortikalen Läsion beschrieben. In ipsilateralem Septum, Hippocampus und Striatum führen unilaterale Fimbria-Fornix-Läsionen und cortico-striatale Läsionen sieben bzw. 14 Tage nach Läsion zu einer Abnahme der GLT1- und GLAST-Immunreaktivität (Ginsberg *et al.*, 1995, 1996). Jedoch scheint die Herunterregulation der Glutamattransporter in Astrozyten vorübergehend zu sein, da die Glutamattransporter 30 Tage nach Läsion zu ihrem ursprünglichen Ausgangswert zurückkehren. Diese auf die Läsion folgende vorübergehende Abnahme der glialen Glutamattransporter-Expression im Hippocampus wird von den Autoren als Folge einer retrograden Reorganisation von glutamatergen Schaltkreisen im Hippocampus oder von anterograden Veränderungen als Reaktion auf cholinerge/GABAerge Deafferentierung interpretiert (Ginsberg *et al.*, 1995).

In dem Läsionsmodell, das in unseren Untersuchungen verwendet wird, finden zwar Proliferations- und Umbauprozesse im deafferentierten entorhinalen Terminationsfeld des Hippocampus statt (Übersicht bei Kugler *et al.*, 1995), aber sogar nach langen Überlebenszeiten (bis zu sieben Monate nach Läsion der Regio entorhinalis) erreicht die Boutondichte im denervierten Terminationsfeld nur \square 40% der von Kontrolltieren (Steward & Vinsant, 1983). Bei den Überlebenszeiten, die in vorliegender Studie verwendet wurden (bis zu 60 Tage), wurde kein messbarer Wiederanstieg der Glutamattransporter-Expression in Astrozyten beobachtet. Aus diesem Grund scheint die Reinnervation in dieser Zeitspanne nicht hoch genug zu sein, um zu einer Hoch-Regulation der Glutamattransporter-Expression zu führen.

Wie bereits in einer anderen Studie gezeigt wurde (Kugler *et al.*, 1995), nimmt die Aktivität der Glutamatdehydrogenase im deafferentierten entorhinalen Terminationsfeld ebenfalls ab. Auch hier wurde kein Wiederanstieg der Enzymaktivitäten in bis zu 90 Tagen nach Läsion beobachtet. Glutamatdehydrogenase ist auf Protein- und Aktivitätsebene vorwiegend in Astrozyten nachzuweisen. Das Enzym spielt eine wesentliche Rolle im Metabolismus von Glutamat in Astrozyten (Übersicht bei Kugler, 1993; Schmitt & Kugler, 1999).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergänzen somit früher durchgeführte Untersuchungen und belegen eindeutig, dass *in vivo* Glutamattransporter-Expression und glutamatmetabolisierende Aktivitäten in Astrozyten nach Verlust der glutamatergen Afferenzen signifikant abnehmen. Dies zeigt, dass der astrozytäre Glutamatmetabolismus und die glutamaterge Transmission eng miteinander verknüpft sind.

Zusammenfassung

Die in Astrozyten lokalisierten Glutamattransporter GLT1 und GLAST sind essentiell für die Beendigung des Transmittersignals und zur Verhinderung einer neurotoxischen Glutamatanreicherung im Extrazellularraum. Um Veränderungen in der Expression von beiden Transportern nach Läsion der Regio entorhinalis (und Degeneration des glutamatergen Tractus perforans) zu zeigen, wurde an der äußeren Schicht des Stratum moleculare des Gyrus dentatus des Hippocampus von Ratten (Terminationsfeld des Tractus perforans) eine quantitative mikrophotometrische *in situ* Hybridisierung (ISH) mit Oligonukleotidsonden, welche mit alkalischer Phosphatase gekoppelt waren, durchgeführt. Es wurden vier Gruppen von Ratten untersucht: scheinladierte Kontrolltiere und Tiere jeweils drei, 14 und 60 Tage nach elektrolytischer unilateraler Läsion des entorhinalen Cortex. Die postläsionale Schrumpfung des Terminationsfeldes des Tractus perforans ipsilateral zur Läsion wurde bestimmt und in die Auswertung der Ergebnisse der quantitativen ISH einbezogen. Die statistischen Analysen ergaben ipsilateral zur Läsion eine signifikante Abnahme der GLT1-mRNA zu jedem untersuchten Zeitpunkt und eine signifikante Abnahme der GLAST-mRNA 14 und 60 Tage nach Läsion. Die maximale Abnahme betrug bei GLT1 $\approx 45\%$ und bei GLAST $\approx 35\%$. Im Terminationsfeld des Tractus perforans kontralateral zur Läsion wurde keine signifikante Veränderung des ISH-Signals beobachtet. Die Untersuchungen wurden durch immunhistochemische Nachweise mit Antikörpern gegen synthetische GLT1- und GLAST-Peptide ergänzt. In Übereinstimmung mit den ISH-Ergebnissen wurde eine deutliche Abnahme der immunzytochemischen GLT1- und GLAST-Markierung im Terminationsfeld des Tractus perforans ipsilateral zur Läsion nachgewiesen. Aus diesen Untersuchungen ist zu schließen, dass der nach Läsion des entorhinalen Cortex folgende Verlust an glutamatergen Synapsen im Terminationsfeld des Tractus perforans zu einer signifikanten Herunterregulation der Glutamattransporter in Astrozyten führt. Die Abnahme an synaptisch freigesetztem Glutamat oder anderen neuronalen Faktoren dürfte ursächlich an dieser Herunterregulation beteiligt sein.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Ammonshorn
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
DIG	Digoxigenin
EAAT	Transporter für excitatorische Aminosäure
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	Saures Gliafibrillen protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT1	Glutamatttransporter 1
i.m.	intramuskulär
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
MOD	mittlere optische Dichte
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
SSC	Standard-Salz-Zitratlösung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TNBT	Tetranitroblau Tetrazoliumsalz
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ZNS	Zentralnervensystem