

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Anatomie II  
Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

**Expression von Glutamattransportern  
in der Retina des Menschen und der Ratte  
und im Nervus opticus der Ratte**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
**Astrid Beyer**  
aus Altenburg

Würzburg, Juli 2004

**Referent:** Prof. Dr. med. P. Kugler

**Koreferent:** Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

**Dekan:** Prof. Dr. med. S. Silbernagl

**Tag der mündlichen Prüfung:** 16. Juli 2004

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
Bau der Retina (Abb. I) .....	1
Glutamattransporter .....	4
<b>Ziele</b> .....	<b>6</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>7</b>
Tiere und Gewebepreparation .....	7
<i>In situ</i> Hybridisierung.....	7
a) cRNA-Sonden.....	7
b) Oligonucleotid-Sonden.....	9
Nachweis der alkalischen Phosphatase .....	10
Kontrollen für die <i>in situ</i> Hybridisierung .....	10
Antikörper, Western-Blot-Analyse und Immunocytochemie.....	10
Antikörper .....	10
Western-Blot-Analyse .....	11
Immunocytochemie .....	12
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>13</b>
Western-Blot.....	13
Zelluläre Expression von Glutamattransportern in der Retina der Ratte.....	14
a) GLT1 und GLT1v.....	14
b) EAAC1 .....	17
c) GLAST .....	19
Immunocytochemischer Nachweis von Glutamattransportern in der menschlichen Retina .....	21
Expression von Glutamattransportern im N. opticus der Ratte.....	23
<b>Diskussion</b> .....	<b>27</b>
Retina.....	28
N. opticus.....	30
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>33</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>35</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>37</b>

## Einleitung

L-Glutamat ist der wichtigste excitatorische Transmitter in der Retina von Vertebraten und spielt eine entscheidende Rolle bei der Transmission von Photorezeptorzellen, Bipolar-Zellen und Ganglienzellen (Massey 1990; Barnstable 1993; Thoreson und Witkovsky 1999). Dieser Neurotransmitter wird von Photorezeptorzellen (Zapfenzellen und Stäbchenzellen) in der äusseren plexiformen Schicht an deren Terminalen ausgeschüttet (Ayoub und Copenhagen 1990) und dient der Erregungsübertragung auf Dendriten von Horizontal- und Bipolar-Zellen. Andererseits wird Glutamat von Bipolar-Zellen in der inneren plexiformen Schicht synaptisch freigesetzt (Tachibana et al. 1993), wo es an die in Dendriten lokalisierten Glutamatrezeptoren von Amakrinzellen und Ganglienzellen bindet. Schliesslich erfolgt die Ausschüttung von Glutamat auch durch Ganglienzellen ausserhalb der Retina im Diencephalon. Dies bedeutet, dass der Informationsfluss ausgehend von der Photorezeptorzellen bis ins Diencephalon hauptsächlich durch Glutamat vermittelt wird.

## Bau der Retina (Abb. I)

Die Retina ist ca. 200 µm dick und besteht aus Neuronen (und ihren Fortsätzen), Pigmentepithelzellen und speziellen astrozytenähnlichen Gliazellen, den Müller-Zellen. Diese Zellen setzen mit unterschiedlicher Verteilung zwei Gewebeblätter zusammen, ein inneres Gewebeblatt (Stratum nervosum, sensorische Retina) und ein äusseres Gewebeblatt (Stratum pigmentosum, eine pigmentierte Epithelschicht der Retina) (Rodieck 1973; Benninghoff 1994).

Das Stratum pigmentosum besteht aus einem einfachen Säulenepithel (Pigmentepithel) und ist mit der Choroidea (Aderhaut) verwachsen. Es hat wichtige Funktionen zum Schutz und zur Erhaltung des Stratum nervosum. So phagozytiert das Pigmentepithel abgeschnürte Partikel der Aussensegmente der Photorezeptorzellen und absorbiert durch seinen hohen Melaningehalt Licht (Rodieck 1973; Dowling 1987). Darüber hinaus regenerieren Pigmentepithelzellen den Sehfärbstoff Retinol und dienen dem Vitamin A Stoffwechsel und dem Wärmeausgleich zur Aderhaut. Die Schicht der Photorezeptoren

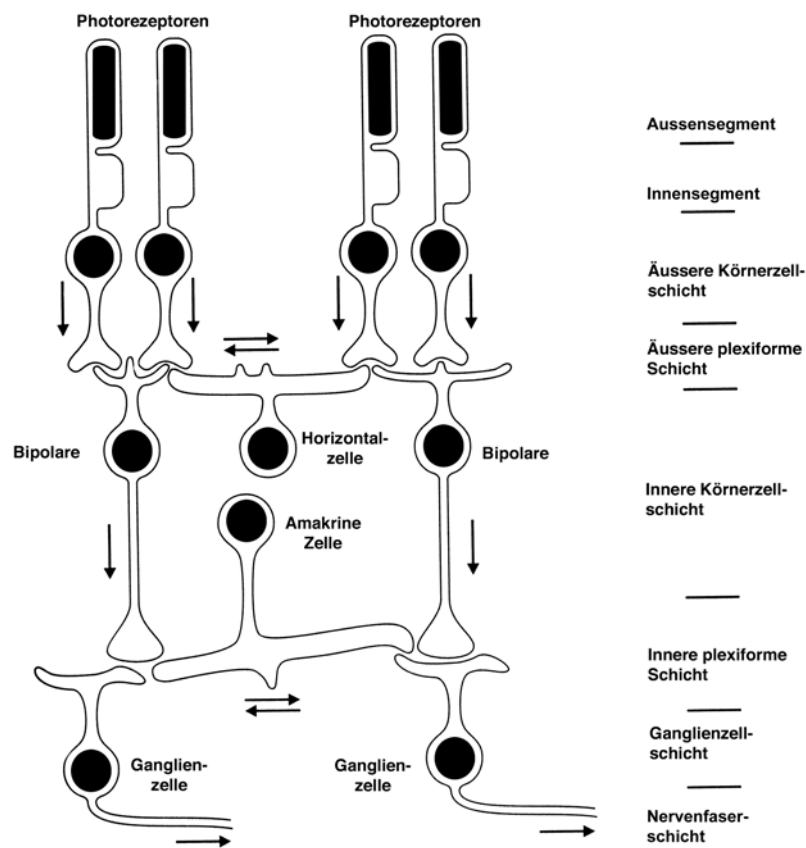
enthält keine Blutgefäße und wird über die Aderhaut versorgt. Dabei müssen die Nährstoffe vom Blut über die Blut-Retina Schranke zu den Photorezeptoren gelangen. Das Pigmentepithel bildet zusammen mit den Choroidea-Kapillaren und der Bruch-Membran diese Blut-Retina-Schranke, die dafür sorgt, dass nur kleinste Moleküle von der Aderhaut in die Netzhaut gelangen können (Rodieck 1973).

Das Stratum nervosum besteht aus neun Schichten. Die Photorezeptorzellen und ihre Fortsätze dehnen sich dabei über drei Schichten aus: Str. segmentorum externorum und internorum, Str. limitans externum und Str. nucleare externum. Photorezeptoren sind primäre Sinnesepithelzellen, das heisst, sie besitzen einen Rezeptorpol (Aussensegment) und einen die Erregung weiterleitenden Fortsatz (Axon). Zu unterscheiden sind zwei Typen von Photorezeptorzellen, Zapfen- und Stäbchenzellen, die u.a. unterschiedlich geformte Axonterminale aufweisen. Die Axonterminale von Zapfenzellen sind kegelförmig (Pedikel) und die von Stäbchenzellen bläschenförmig. In der menschlichen Retina gibt es etwa 5-7 Millionen Zapfenzellen und 110-125 Millionen Stäbchenzellen. Die Zapfenzellen dienen dem Tages- und Farbsehen, die Stäbchenzellen können nur hell und dunkel unterscheiden und dienen dem Dämmerungssehen (Dowling 1987; Benninghoff 1994). In der Retina der Ratte gibt es fast ausschliesslich Stäbchenzellen.

Der Bau von Zapfenzellen und Stäbchenzellen ist ähnlich. Bei beiden Zellarten kommt im Aussensegment der Sehfärbstoff vor. Im Innensegment sind Mitochondrien, glattes und raues endoplasmatisches Retikulum und der Golgi-Apparat enthalten. Im Anschluss an den Rezeptorfortsatz (mit Aussen- und Innengliedern) folgt das kernhaltige Perikaryon (im Str. granulosum externum). Zwischen der Schicht der Rezeptorfortsätze und der Schicht der Perikarya befindet sich das Str. limitans externum (Gliagrenzmembran), das durch Müller-Zell-Fortsätze gebildet wird, die in diesem Bereich mit den Innensegmenten der Photorezeptorzellen oder miteinander über Zonulae adhaerentes verbunden sind (Rodieck 1973; Dowling 1987; Benninghoff 1994). Müller-Zellen sind die hauptsächlichen Gliazellen der Retina und ihre Fortsätze sind radiär angeordnet (Dowling 1987). Sie besitzen astrozytenähnliche Funktionen und lassen sich spezifisch durch den immunocytochemischen Nachweis von Glutaminsynthetase darstellen (Riepe und Norenburg 1977). Nach dem Str. nucleare externum schliesst sich nach innen das Str. plexiforme externum an. Es enthält Fortsätze

von Bipolar-Zellen, Horizontalzellen und Photorezeptorzellen sowie die Synapsen zwischen Photorezeptorzellen und Bipolar- bzw. Horizontalzellen. Anschliessend folgt das Str. nucleare internum mit den Perikarya von Horizontal-, Bipolar-, Müller- und Amakrinzellen. Dabei sind die Perikarya der Horizontalzellen und Bipolar-Zellen nahe der äusseren plexiformen Schicht lokalisiert, während die Perikarya der Amakrinzellen im mittleren Bereich dieser Schicht vorkommen. Horizontalzellen stellen mit ihren Fortsätzen Querverbindungen zwischen Photorezeptorzellen her, während Amakrinzellen solche Querverbindungen zwischen Bipolar-Zellen bilden (Rodieck 1973; Dowling 1987; Benninghoff 1994). Bipolar-Zellen sind das 2. Neuron der Sehbahn. Man unterscheidet Zapfen- und Stäbchenbipolare. Bipolar-Zellen können ausserdem noch funktionell in ON-, OFF- und ON/OFF-Zellen untergliedert werden. Dabei reagieren die ON-Zellen auf Lichtreiz mit Depolarisation und die OFF-Zellen mit Hyperpolarisation (Benninghoff 1994). Über die Axone der Bipolar-Zellen wird die Erregung in die innere plexiforme Schicht weitergeleitet, wo die synaptische Übertragung auf das 3. Neuron der Sehbahn erfolgt. Das 3. Neuron der Sehbahn sind grosskernige multipolare Ganglienzellen, die das Str. ganglionicum bilden. Ihre Dendriten liegen in der inneren plexiformen Schicht und die Axone ziehen in der Nervenfaserschicht (Str. neurofibrarum) zum Discus nervi optici (Beginn des N. opticus) (Rodieck 1973; Dowling 1987; Benninghoff 1994). Der N. opticus ist entsprechend seiner Herkunft wie die weisse Substanz des ZNS aufgebaut und verbindet die Retina mit dem Diencephalon. Neben myelinisierten Nervenfasern enthält er als Gliazellen vor allem Astrozyten und Oligodendrozyten. Da der N. opticus neuronenfremd ist, dient er als modellhafte Struktur für das Studium von Astrozyten und Oligodendrozyten.

Die innerste Schicht der Retina, das Str. limitans internum, schliesst die Retina zum Glaskörper hin ab und ist völlig glatt. Sie wird durch die Endfüsschen der Müller-Zellen und wenigen Astrozyten gebildet (Rodieck 1973; Benninghoff 1994).



**Abb. I:** Vereinfachter schematischer Aufbau der Vertebraten-Retina (modifiziert nach Barnstable, 1993). Die Schichten der Retina sind auf der rechten Seite bezeichnet. Die Phototransduktion erfolgt in den Photorezeptoren. Die Signale gelangen von dort via Bipolar-Zellen zu den Ganglienzellen. Deren Axone bilden zunächst die Nervenfaserschicht und dann den N. opticus, über welchen die Signale der Retina zum Zwischenhirn geleitet werden. Der radiäre Signalweg innerhalb der Retina kann über laterale Interaktionen moduliert werden, in der äusseren plexiformen Schicht durch Horizontalzellen, in der inneren plexiformen Schicht durch Amakrinzellen (siehe Pfeile).

## Glutamattransporter

Die Glutamatfreisetzung aus Photorezeptor- und Bipolar-Zellen ist kontinuierlich und wird durch visuelle Reize moduliert. Beide Neuronentypen zeigen keine typischen Aktionspotenziale und reagieren auf Lichtreize mit abgestuften Potenzialen (Ehringer und Dowling 1987). In diesem Transmissionsystem ist eine rasche Beseitigung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt besonders kritisch, um einerseits das Transmittersignal zu beenden und andererseits die extrazelluläre Glutamatkonzentration

unterhalb neurotoxischer Konzentrationen zu halten (Danbolt 2001). Da im Interzellularraum keine Glutamat-abbauenden Enzyme vorhanden sind, muss Glutamat entweder durch hochaffine Glutamattransporter wieder in präsynaptische Terminale aufgenommen werden, oder aus dem synaptischen Spalt diffundieren. Nach Diffusion aus dem synaptischen Spalt erfolgt dann die Glutamataufnahme durch umgebende Gliazellen. In der Säugerretina kommen als Gliazellen vor allem Müller-Zellen und in sehr geringer Zahl Astrozyten (vor allem im Str. ganglionicum) vor (Schnitzer 1987).

Vor allem in der Retina der Ratte wurden mit immunocytochemischen Methoden bisher 5 verschiedene Glutamattransporter (excitatory amino acid transporters, EAAT) auf lichtmikroskopischer Ebene identifiziert. GLAST (oder EAAT1) wurde in Müller-Zellen und Astrozyten (Derouiche und Rauen 1995; Rauen *et al.* 1996, 1998; Lehre *et al.* 1997), GLT1 (oder EAAT2) in Zapfenzellen und deren Bipolar-Zellen (Rauen und Kanner 1994), GLT1v (eine splice Variante von GLT 1) in verschiedenen Neuronen (Reye *et al.* 2002) und in Müller-Zellen (Schmitt *et al.* 2002) und EAAT 5 in Photorezeptorzellen (Stäbchenzellen) und Bipolar-Zellen (Pow und Barnett 2000) nachgewiesen. EAAC1 (EAAT3) scheint in verschiedenen Zelltypen der Retina vorzukommen, wie zum Beispiel in Horizontalzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen (Schultz und Stell 1996; Rauen *et al.* 1996). Bisher liegen nur begrenzte Daten über die zelluläre Expression (ermittelt mittels *in situ* Hybridisierung, ISH) von EAAC1 (Kanai *et al.* 1995), GLT1v (Schmitt *et al.* 2002) und GLAST (Otorio *et al.* 1994) vor.



## Ziele

Mit der sensitiven Methode der nicht-radioaktiven ISH sollte unter Verwendung von cRNA-Sonden die genaue zelluläre Expression von GLT1, GLAST, EAAC1 und GLT1v in der Retina der Ratte ermittelt werden. Die Ergebnisse der ISH sollten mit der Verteilung der EAAT-Proteine verglichen werden. Dazu wurde Immuncytochemie unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern gegen synthetische C-terminale Peptide entsprechender Glutamattransporter eingesetzt. In die immuncytochemischen Untersuchungen wurde auch die menschliche Retina einbezogen.

Zusätzlich sollte die zelluläre Verteilung von EAAT-Proteinen (Immuncytochemie) und m-RNA's (ISH) im N. opticus (intraorbitaler Abschnitt) der Ratte bestimmt werden. Hierüber ist noch sehr wenig bekannt, obwohl der N. opticus als modellhafte Struktur zum Studium der Expression von Glutamattransportern in synapsenfreiem Nervengewebe gilt (Domercq *et al.* 1999).

## **Material und Methoden**

### **Tiere und Gewebepräparation**

Für die Untersuchungen wurden die Augen, einschliesslich des intraorbitalen Anteiles des N. opticus, von 30 erwachsenen männlichen Albino-Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere wurden unter Äther-Narkose decapitiert, die Augen rasch entnommen und für die verschiedenen Verfahren (ISH, Immunblot und Immuncytochemie) weiterverarbeitet. Ausserdem wurden drei menschliche Retinae (von Patienten mit ocularem Melanom) verwendet, die von der Augenklinik der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Sie wurden für immuncytochemische Untersuchungen verwendet.

### ***In situ* Hybridisierung**

#### **a) cRNA-Sonden**

Von den Rattenaugen wurden nach Einfrieren in stickstoffgekühlten Isopentan 12 µm dicke Kryostat-Schnitte in Höhe der Durchtrittsstelle des N. opticus angefertigt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur auf beschichtete Glasobjektträger (Superfrost Plus; Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgetragen und aufgetaut. Für die ISH mit cRNA-Proben wurden die Schnitte für 5 min in frisch angesetztem 4% igen Formaldehyd in 0,1 m PBS (pH 7.4) fixiert und anschliessend für 1-2 Tage in 100 %-iges Äthanol eingestellt.

Es wurden mit Digoxigenin (DIG) markierte cRNA-Sonden (antisense und sense) hergestellt und ISH-Methoden verwendet, die in früheren Untersuchungen (Schmitt *et al.* 1996, 1997, 2002; Schmitt und Kugler 1999) genau beschrieben wurden. Die Gewebeschnitte wurden aus dem Äthanol (siehe oben) entnommen und in der absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Anschliessend wurden die Schnitte in 2 x Standard-Salz-Zitratlösung (SSC) gespült und mit 0.05 N HCL für 30 min deproteiniert. Nach erneutem Spülen mit 2 x SSC erfolgte die Inkubation mit einem 0.25 %-igem Acetylierungspuffer zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, dann wurde nochmals gespült. Nun wurde jeder Schnitt mit ca. 100 µl Hybridisierungspuffer

bedeckt. Dieser enthielt die DIG-markierte antisense-cRNA-Sonde in gewünschter Konzentration (3-6 ng/ $\mu$ l) sowie 550  $\mu$ g/ml Lachssperma-DNA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 4 x SSC, 1 x Denhardt's Lösung (Sambrook *et al.* 1989), 10% Dextransulfat und 50 % deionisiertes Formamid. Die Hybridisierung erfolgte bei 60 °C für 16-18 Stunden in einer feuchten Kammer.

Nach der Hybridisierung wurden wieder verschiedene Spülschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst Spülen der Schnitte in 2 x SSC, dann in 1 x SSC, 50% Formamid und schliesslich wieder in 2 x SSC. Als nächstes wurden nicht-hybridisierte cRNA-Sonden entfernt. Dazu wurden die Schnitte mit 40  $\mu$ g/ml Ribonuklease A (50 Kunitz-units/mg; Boehringer, Mannheim, Deutschland), gelöst in 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, bei 37 °C für 30 min behandelt. Anschliessend wurden die Schnitte mit demselben Puffer, jedoch ohne RNase A, bei 60 °C für 30 min gespült.

Die Schnitte wurden für 5 min mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS; 100mM Tris und 150 mM NaCl, pH 7.5) gespült, mit 0.5 % Blockierungsreagenz in TBS (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Boehringer) für 30 min und schliesslich mit 0.3 % Triton X-100 in TBS für 20 min inkubiert. Diese Behandlung diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen.

Nach Inkubation der Schnitte mit alkalischer Phosphatase (aP) markierten Schaf-anti-DIG, (Boehringer) in TBS (mit 0.3% Triton X-100) für 60 min, wurden die Schnitte in TBS gespült und für 2 min in 0.1 M Tris-Puffer (pH 9.5) mit 100 mM NaCl und 50 mM MgCl<sub>2</sub> überführt. Anschliessend erfolgte der aP-Nachweis nach der unten beschriebenen Methode.

Die verwendeten DIG gekoppelten anti-sense (sense) cRNA-Proben wurden exakt so hergestellt, wie in bereits veröffentlichten Arbeiten beschrieben (Schmitt *et al.* 1996, 2002; Schmitt and Kugler 1999). Die GLAST-cRNA-Sonde war komplementär zu den Nukleotiden 5-1710 der GLAST Sequenz (GLAST cRNA; Schmitt *et al.* 1997), veröffentlicht von Stork *et al.* (1992), die GLT1-Sonde zu den Nukleotiden 1683-1907 der GLT-1 Sequenz (GLT 1 cRNA), veröffentlicht von Kugler und Schmitt (2003), die GLT1v-Sonde zu den Nukleotiden 1654-2043 der GLT1v Sequenz (GLT 1v cRNA), veröffentlicht von Schmitt *et al.* (2002) und die EAAC1-Sonde zu den Nukleotiden

247-1706 der EAAC1 Sequenz (EAAC1 cRNA; Schmitt und Kugler 1999), veröffentlicht von Kiryu *et al.* (1995).

In einigen Versuchen wurde im Anschluss an diesen Nachweis noch immunocytochemisch saures Gliafibrillen-Protein (GFAP) oder Vimentin mittels Peroxidase-Antiperoxidase Reaktion (PAP Komplex 1:100; monoklonaler Maus-Antikörper gegen GFAP 1:2000, DAKO, Hamburg, Deutschland; monoklonaler Maus-Antikörper gegen Vimentin 1:100, Boehringer) nachgewiesen (Sternberger *et al.* 1990). Zur Kontrolle der Verlässlichkeit der ISH-Methode dienten Gehirnschnitte, die in gleicher Art und Weise wie die Augenschnitte bearbeitet wurden (Schmitt *et al.* 1996, 1997, 2002; Schmitt und Kugler 1999).

#### **b) Oligonucleotid-Sonden**

Die ISH mit Oligonucleotid-Sonden erfolgte nach der Methode von Dägerlind *et al.* (1992). 12 µm dicke Kryostat-Schnitte von schockgefrorenen Augen wurden auf Superfrost Objektträger montiert und mit Hybridisierungslösung bedeckt. Diese enthielt aP-(alkalische Phosphatase) markierte antisense Oligonucleotid-Sonden in einer Konzentration von 6 bis 8 fmol/µl. Die Hybridisierung erfolgte für 20-40 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

Nach der Hybridisierung erfolgten 4 Spülschritte in 1x SSC für je 15 min bei 55°C zur Entfernung unspezifisch oder nicht gebundener Sonden. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte für 30 min in TBS [100 mM Tris-HCL mit 100 mM NaCl und 50 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9.5)] gespült. Anschliessend erfolgte der aP Nachweis (siehe unten).

Für die ISH wurden aP- gekoppelte Oligonucleotid-Sonden verwendet, welche komplementär zu Abschnitten der codierenden Region von Glutamatdecarboxylase (GAD) waren:

GAD 65 antisense Probe: 5'-GAGGCGGCTCATTCTCTCTTCATTGTCTTCCAG- 3'

GAD 67 antisense Probe: 5'-AGGTGACTGAATTGGCCCTTTCTATGCCGCTGA- 3'

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

## **Nachweis der alkalischen Phosphatase**

Diese Nachweismethode wurde von Asan und Kugler (1995) beschrieben. Das Inkubationsmedium enthielt 0.4 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP, Boehringer), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> und 0.4 mM Tetranitroblau-Tetrazoliumchlorid (TNBT, Serva, Heidelberg, Deutschland) in 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 9.5). Die Inkubation erfolgte für 24 – 48 h bei 25°C im Dunkeln.

## **Kontrollen für die *in situ* Hybridisierung**

Zur Spezifitätskontrolle wurde die antisense cRNA durch eine entsprechende Menge sense RNA ersetzt, was zu keiner Reaktion mit markierten Oligonucleotidsonden führte. Eine ebenfalls fehlende Reaktion ergab sich, wenn den Hybridisierungsansätzen entsprechende unmarkierte Oligonucleotide in 100-fachem Überschuss zugesetzt wurden (kompetitive Hemmung).

Des Weiteren führte das Weglassen von markierten cRNA- und Oligonucleotid-Proben im Hybridisierungsgemisch zu komplett ungefärbten Schnitten. Daraus ergibt sich, dass:

1. Antisense-Sonden spezifisch binden;
2. beim Nachweis von Digoxigenin keine Färbeartefakte entstehen;
3. in den Schnitten keine endogene aP-Aktivität vorhanden ist.

## **Antikörper, Western-Blot-Analyse und Immuncytochemie**

### **Antikörper**

Es wurden affinitätsgereinigte polyklonale Peptidantikörper von Kaninchen gegen die entsprechenden Glutamat-Transporter verwendet. Die Herstellung und Charakterisierung dieser Antikörper wurde in früheren Untersuchungen beschrieben:

Anti GLUT1- Antikörper (gegen ein Peptid mit den Aminosäuren 554-573 der GLUT1-Sequenz; Schmitt *et al.* 1996); Anti GLUT1v- Antikörper (gegen ein Peptid mit den Aminosäuren 523-542 der GLUT1v-Sequenz; Schmitt *et al.* 1997);

Anti EAAC1- Antikörper (gegen ein Peptid mit den Aminosäuren 480-499 der EAAC1-Sequenz; Schmitt und Kugler 1999).

Als Marker für Müller-Zellen in der Retina gilt Glutaminsynthetase. Zur immunocytochemischen Darstellung von Müller-Zellen wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Glutaminsynthetase von Sigma verwendet.

### **Western-Blot-Analyse**

Für Immunblotanalysen wurden Retina und Hippocampus (zum Vergleich) von Ratten entnommen und homogenisiert. Die Homogenisation erfolgte bei 4°C in einem Puffer aus 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2) mit 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Apoprotinin ( 5µg/ml), Leupeptin (2 µg/ml), Pepstatin (2 µg/ml) und Phenylmethylsulfanyl Fluorid (PMSF; 100 µg/ml) und Verwendung eines Pstill-Teflon- Homogenisators. Das Homogenat wurde zunächst bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde dann nochmals für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Die anschließende Proteinbestimmung am Pellet (Membranfraktion) erfolgte nach Bradford unter Verwendung des Bio-Rad Proteinassay (Bio-Rad, München, Deutschland).

Die Proteine (5-50 µg/Spur) in Pellet und Überstand wurden elektrophoretisch mit einem 10% igen Trenngel mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Anschliessend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran nach der Methode von Burnette (1981) in einer Transblot-Kammer bei einer Spannung von 50 Volt für 3 h elektrophoretisch transferiert.

Die Nitrozellulose-Membranen mit den aufgetrennten Proteinen wurden zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in Magermilch inkubiert und dann in Streifen geschnitten. Es folgte die Inkubation mit affinitätsgereinigten Antikörpern (ca. 1.8 µg/ml) für 24 h bei 4°C.

Die gebundenen Immunglobuline wurden mittels Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (von der Ziege) (1:3000; Bio- Rad; Richmand, Kanada; blotting grade) und der ECL-Entwicklung (enhanced luminol chemiluminescence Technik; Amersham, Braunschweig, Deutschland) sichtbar gemacht.

Als Kontrolle dienen Immunblots, bei denen die affinitätsgereinigten Antikörper vorher mit einem Überschuss des zur Immunisierung verwendeten Peptids inkubiert wurden (Präabsorbtion). Diese Immunoblots zeigten keine Reaktion.

## **Immuncytochemie**

Kleine Stücke von menschlicher Retina und Rattenretina sowie des N. opticus wurden in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Isopentan schockgefroren, anschliessend gefriergetrocknet und in Epoxyharz Quetol 651 (Science Services München, Deutschland) eingebettet. Von diesen Präparaten wurden Semidünnschnitte (1 µm) angefertigt und auf Glasobjektträger aufgetragen. Um die Schnitte für die Immunfluoreszenz verwenden zu können, musste zunächst das Harz geätzt werden. Dazu wurden die Schnitte für 5 min in Natriummethanolatlösung (Fluka, Neu Ulm, Deutschland) nach der Methode von Mayor *et al.* (1961) eingestellt.

Die Schnitte wurden nun für 3 h bei Raumtemperatur mit 2% igem BSA (Bovin-Serum Albumin), 10% igem NGS (normal goat serum) und 0.05 % igem Tween 20 (Ferrak, Berlin, Deutschland) in PBS, pH 7.4, präinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Dann erfolgte die Inkubation mit den Erstantikörpern. Es wurden Einfach- und Doppelmarkierungen durchgeführt. Die Schnitte wurden für 24-48 h bei 4°C mit Erstantikörpern in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Erstantikörper (Anti-Glutamat-Transporter, 15 µg/ml; anti-Glutaminsynthetase, 1:200) wurde in der Präinkubationslösung gelöst. Nach einigen Spülschritten mit PBS erfolgte die Inkubation mit den Zweitantikörpern bei Raumtemperatur für 90 min. Bei den Zweitantikörpern handelte es sich um Carboocyanin-(Cy2) markiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:300; Dianova, Hamburg, Deutschland) zum Nachweis von Glutamtransportern und um Indocarbocyanin-(Cy3) markiertes Ziege-anti-Maus IgG (1:600, Dianova) zum Nachweis von Glutaminsynthetase.

Zur Spezifitätskontrolle wurden die Schnitte mit Primärantikörpern inkubiert, welche zuvor mit einem Überschuss von korrespondierenden Glutamat-Transporter- Peptiden präinkubiert wurden (Präabsorption). Als weitere Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit Zweitantikörpern inkubiert wurden. In beiden Fällen ergab sich ein negativer Immunnachweis.

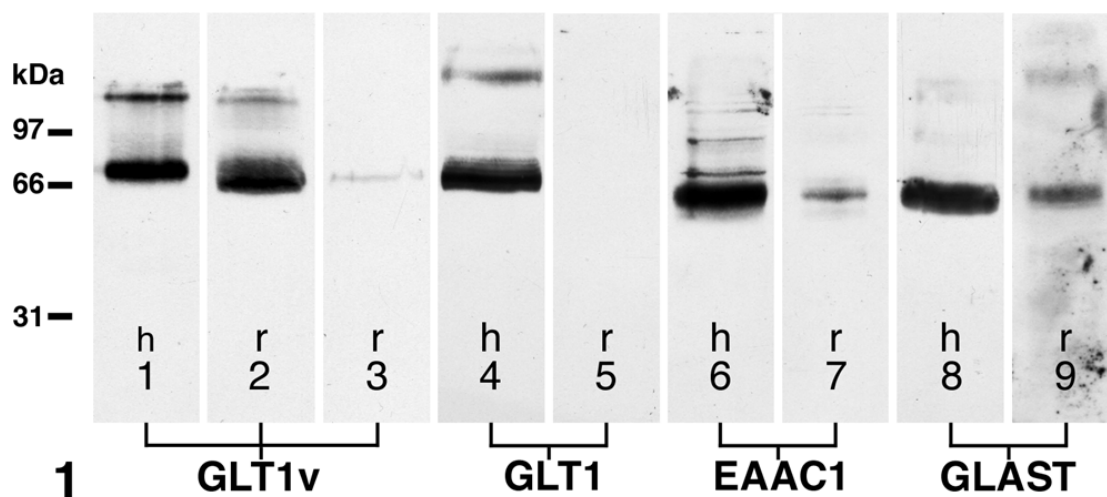
Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit einem Olympus BH2-Fluoreszenzmikroskop (Olympus, New Hyde Park, NY, USA), das mit einer Zeiss Optik und geeigneten Filter- Kombinationen zur Darstellung von Cy2- und Cy3-Fluoreszenz (BH II DFC 6; Olympus) ausgestattet war.

## Ergebnisse

### Western-Blot

In Western-Blots von 100.000 g Pellets (Membranfraktion) wurden mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die verschiedenen Glutamattransporter folgende Protein-Banden nachgewiesen: bei ca. 70 kDa eine Bande für GLT1v und bei ca. 60 kDa eine Bande für GLAST und EAAC1 (Abb. 1). Wie in früheren Arbeiten für verschiedene Hirnregionen bereits beschrieben, wurden bei GLT1v zusätzlich Banden mit einer geringeren elektrophoretischen Mobilität beobachtet (Danbolt 2001). Dabei handelt es sich vermutlich um Aggregate der Transporter-Proteine. Eine ähnliche Bandenmarkierung wurde auch im Hippocampus (als Kontrolle) nachgewiesen, was aus früheren Studien bereits bekannt ist (Schmitt *et al.* 1996, 1997, 2002; Kugler und Schmidt 1999). Bei der Verwendung des GLT1 Antikörpers zeigte sich im Western-Blot von Retina-Gewebe keine Bande, während es beim zur Kontrolle untersuchten Hippocampus-Pellet (Abb. 1) zu einer deutlich markierten Bande bei ca. 70 kDa kam (Schmidt *et al.* 1996). Im 100.000 g Überstand konnte nahezu keine Markierung beobachtet werden (dokumentiert für GLT1v; Abb. 1, Spur 3). Wurden die verwendeten Antikörper vorher mit einem Überschuss an korrespondierendem Peptid präabsorbiert, erfolgte keine Immunreaktion der Pellet-Proteine (nicht dokumentiert).





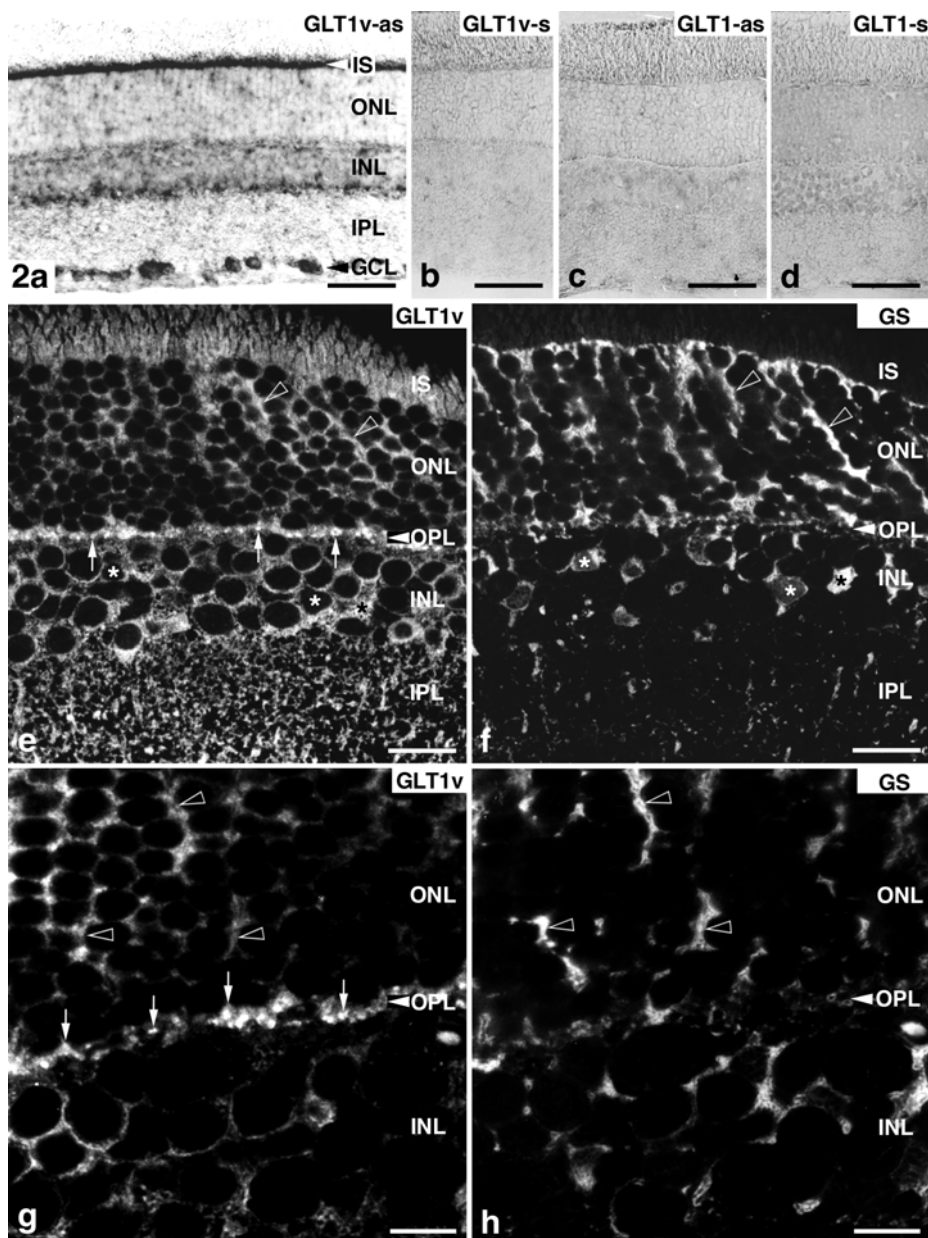
**Abb. 1:** Western- Blots (10% SDS-PAGE) von Rattenretina (r) und Hippocampus (h; als Positivkontrolle), unter Verwendung von affinitätsgereinigten Antikörpern gegen GLUT1v- Peptid (Spur 1-3), GLUT1- Peptid (Spur 4 und 5), EAAC1- Peptid (Spur 6, 7) und GLAST- Peptid (Spur 8, 9). Aufgetrennt wurden Proben des 100.000 x g Pellets (Spur 1, 2, 4-9) oder des 100.000 x g Überstands (Spur 3). Die aufgetragene Proteinmenge pro Spur betrug 50 µg. In den Pellets von Retina und Hippocampus markiert der GLUT1v Antikörper eine deutliche Bande bei 70 kDa sowie Banden mit höherer Molekularmasse, die Aggregaten des GLUT1v Polypeptids entsprechen (Spuren 1, 2). Die gleiche Banden-Markierung ergibt sich im Hippocampus- Pellet bei der Verwendung des GLUT1 Antikörpers (Spur 4), während im Retina- Pellet mit diesem Antikörper keine Banden dargestellt werden (Spur 5). Im 100.000 x g Überstand des Retina- Homogenats kann mit GLUT1v- Antikörper nahezu keine Markierung nachgewiesen werden (Spur 3). Die Antikörper gegen EAAC1 und GLAST markieren im Pellet von Retina und Hippocampus eine Bande bei etwa 60 kDa (Spuren 6-9).

## Zelluläre Expression von Glutamattransportern in der Retina der Ratte

### a) GLUT1 und GLUT1v

GLT1 konnte weder mit der ISH (Abb. 2c) noch mit immunocytochemischen Methoden (nicht dokumentiert) nachgewiesen werden. Demgegenüber scheint die mRNA von GLUT1v in fast allen Zelltypen der Retina vorzukommen. Ein starkes Signal war in Innensegmenten der Photorezeptorzellen (Abb. 2a) und in Zellen der Ganglienzellschicht zu beobachten (Abb. 2a). In dieser Schicht sind neben Ganglienzellen verlagerte Amakrinzellen lokalisiert. Eine überwiegend schwache zelluläre ISH- Reaktion (vermutlich Bipolar- und Müller-Zellen) konnte im zentralen Bereich der inneren Körnerschicht nachgewiesen werden. Eine starke Reaktion ergab sich in Zellen, die an der inneren bzw. äusseren Grenze dieser Schicht lokalisiert sind.

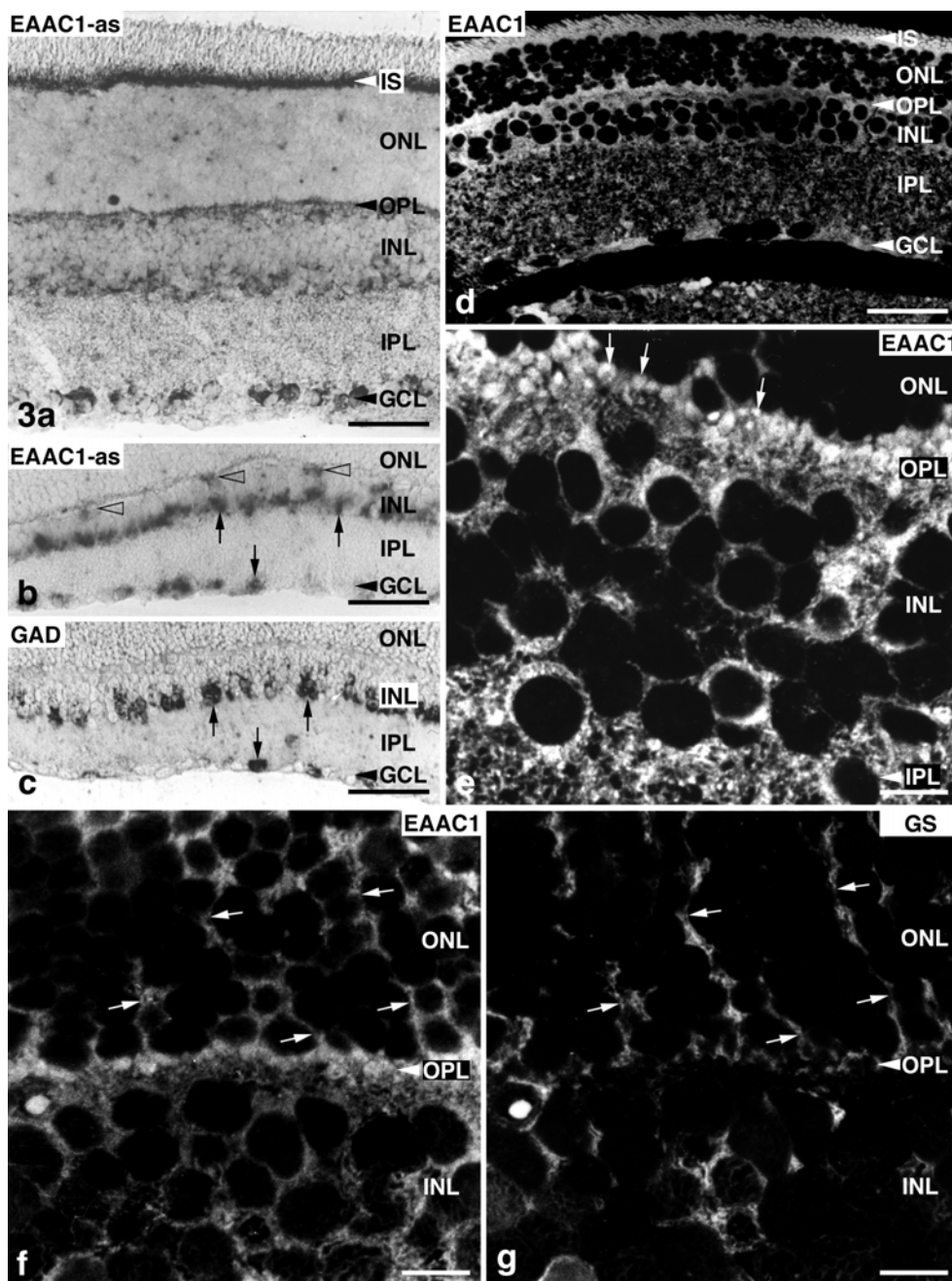
Es handelt sich dabei vermutlich um Horizontalzellen (äussere Grenze) beziehungsweise Amakrinzellen (innere Grenze). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der ISH konnten wir GTL1v Protein im Innensegment von Photorezeptorzellen nachweisen (Abb. 2e). Da es in der Retina der Ratte fast ausschliesslich Stäbchenzellen gibt, kann man davon ausgehen, dass es sich bei den immunreaktiven Zellen um Stäbchenzellen handelt. In der äusseren Körnerschicht fand sich die Immunfärbung vor allem in Zellfortsätzen, welche die Perikarya der Photorezeptorzellen umgeben. Bei Anwendung von Doppelmarkierungen, bei denen neben GTL1v Antikörpern zusätzlich Antikörper gegen Glutaminsynthetase (Glutaminsynthetase als Marker für Müller-Zellen in der Rattenretina) verwendet wurden (Abb. 2e, f, g, h), konnten in diesen Zellfortsätzen GTL1v und Glutaminsynthetase gleichzeitig nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schliessen, dass GTL1v auch in Müller-Zellen lokalisiert ist. Subzellulär war GTL1v in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen und in den Zellfortsätzen der Müller-Zellen zytoplasmatisch und / oder in Zellmembranen lokalisiert. In der äusseren plexiformen Schicht ergab sich eine starke feinfleckige bis punktförmige Immunfärbung (Abb. 2e, g). Wir vermuten, dass es sich bei diesen Strukturen um Terminale der Stäbchenzellen handelt. Bei den verschiedenen Zelltypen der inneren Körnerschicht erfolgte die Immunreaktion in zytoplasmatischen Granula sowie in Zellmembranen. (Abb. 2e). Die Perikarya der Müller-Zellen, welche mittels Glutaminsynthetase-Antikörper identifiziert wurden, waren gelegentlich ebenfalls GTL1v positiv (Abb. 2e, g). Eine starke Reaktion lag im Neuropil der inneren plexiformen Schicht (Abb. 2e) und in den Zellen der Ganglienzellenschicht vor.



**Abb. 2:** Nachweis von GLUT1v und GLUT1 in der Ratten-Retina. a) ISH mit GLUT1v- antisense (as) cRNA- Sonden. Zu erkennen ist eine Reaktion im Bereich der Innensegmente der Photorezeptorzellen und in den Zellen der Ganglienzellschicht. Weniger stark reagierende Zellen sind an der inneren und äusseren Grenze der inneren nukleären Schicht lokalisiert. b) ISH mit GLUT1v- sense (s) cRNA- Sonde (Kontrolle). In der Retina ist kein Reaktionsprodukt zu beobachten. c, d) ISH mit GLUT1- antisense- (as) (c) oder -sense (s) - Sonde (d). In der Retina ist kein Reaktionsprodukt zu beobachten. e-h) Zelluläre Verteilung von GLUT1v Protein in der Retina. Immunfluoreszenznachweise an Semidünn-Plastikschnitten von gefriergetrockneter Retina. e/f und g/h zeigen Abbildungspaare von Schnitten, die mit Antikörpern gegen GLUT1v und Glutaminsynthetase (GS als Markerprotein für Müller-Zellen) doppelmarkiert wurden. GLUT1v- Protein ist in folgenden Strukturen nachweisbar: in Innensegmenten der Photorezeptorzellen (e); in Zellfortsätzen, welche die Perikarya der Photorezeptorzellen umgeben (äussere Körnerschicht) und die gelegentlich Glutaminsynthetase enthalten (offene Pfeilspitzen, Abb. e-h); in feinfleckigen Strukturen der äusseren plexiformen Schicht (Pfeile in e und g), die den präsynaptischen Terminalen der Photorezeptorzellen entsprechen dürften; in verschiedenen Zelltypen der inneren Körnerschicht einschliesslich der Müller-Zell-Perikarya (Sternchen in e und f); im Neuropil der inneren plexiformen Schicht. IS, Innensegmente; ONL, äussere Körnerschicht; OPL, äussere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht. Massstäbe in a-d = 50  $\mu$ m, in e und f = 20 $\mu$ m, in h = 10  $\mu$ m.

**b) EAAC1**

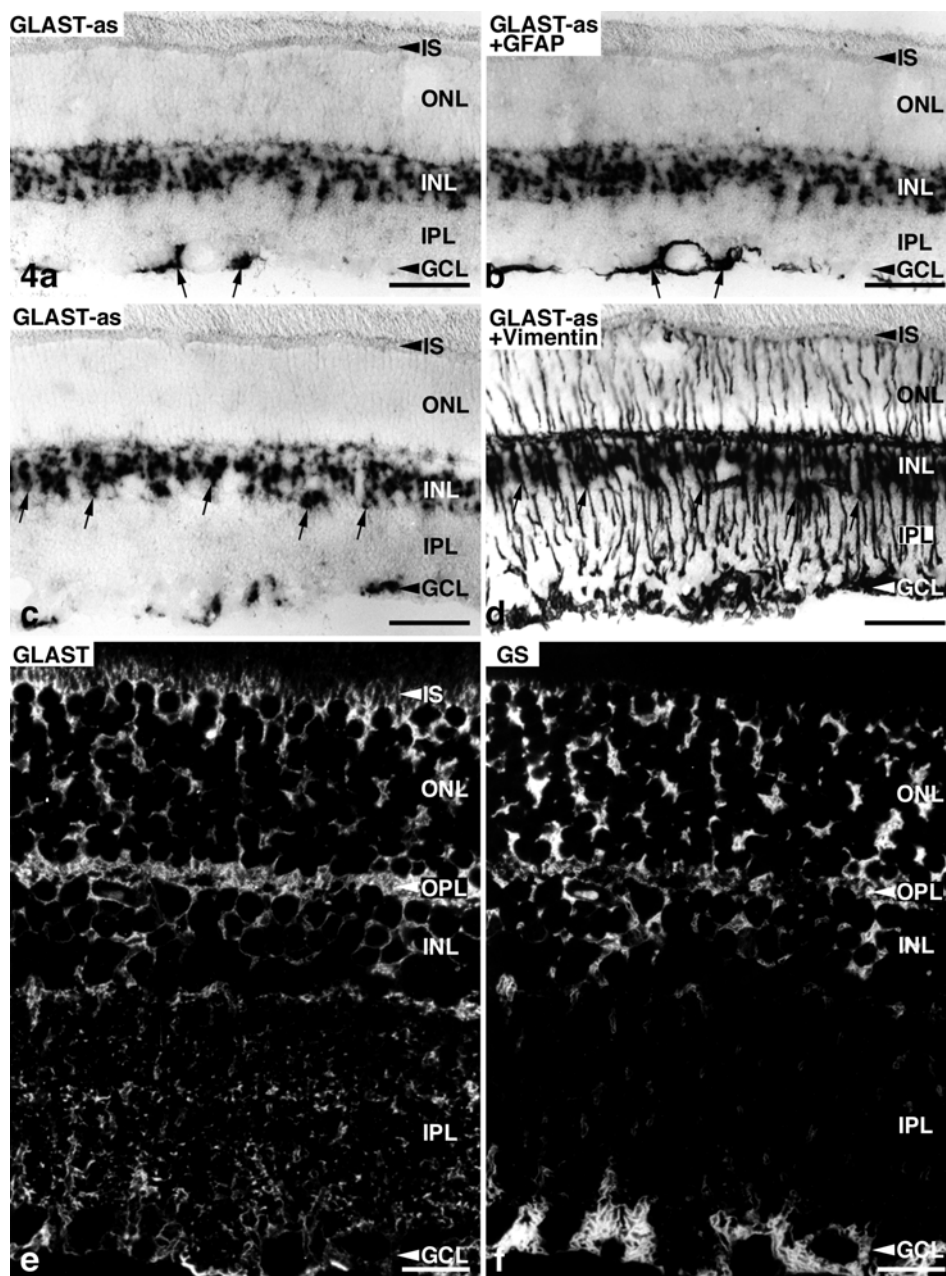
Unter Anwendung von ISH und Immunocytochemie ergab sich für EAAC1 eine nahezu identische Verteilung wie für GTL1v. Eine starke ISH-Reaktion lag in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen (Stäbchenzellen), in Horizontal- und Amakrinzellen und in Zellen der Ganglienzellschicht vor (Abb. 3a, b). Unter Verwendung von Folgeschnitten, bei denen an einem Schnitt EAAC1 mittels ISH und am Folgeschnitt GAD (GAD 65 und GAD 67) mittels ISH durchgeführt wurden, konnten wir nachweisen, dass GAD- und EAAC1-mRNAs in denselben Zellen, nämlich den Amakrinzellen, lokalisiert sind (Abb. 3b, c). In der Ganglienzellschicht war die Anzahl der gefärbten Zellen mit der EAAC1-ISH grösser als bei der GAD-ISH, so dass man annehmen kann, dass neben Amakrinzellen auch Ganglienzellen EAAC1 exprimieren (Abb. 3b, c). Im mittleren Abschnitt der inneren Körnerschicht lag eine schwache ISH-Reaktion vor (vermutlich von Bipolar-Zellen und Müller-Zellen) (Abb. 3a). Mittels Immunfärbung konnte EAAC1 in Photorezeptorzellen (Innensegment von Stäbchenzellen) (Abb. 3d), in fleckchenförmigen Strukturen der äusseren plexiformen Schicht (wahrscheinlich Terminale der Stäbchenzellen) (Abb. 3e), in verschiedenen Zelltypen der inneren Körnerschicht (hier vor allem in cytoplasmatischen Granula), im Neuropil der inneren plexiformen Schicht (Abb. 3e) und im Zytoplasma von Zellen der Ganglienzellschicht (Abb. 3d) nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Doppelmarkierungen, bei denen Antikörper gegen EAAC1 und gegen Glutaminsynthetase verwendet wurden, konnten gelegentlich beide Proteine gleichzeitig in Zellstrukturen der äusseren und inneren Körnerschicht nachgewiesen werden, was darauf schliessen lässt, dass EAAC1 auch in Müller-Zellen vorkommt.



**Abb. 3:** Nachweis von EAAC1 in der Rattenretina. (a-c) Zelluläre Verteilung von EAAC1- mRNA (ISH): (a) Eine starke ISH- Reaktion ist in den Innensegmenten der Photorezeptoren, an der inneren und äusseren Grenze der inneren Körnerschicht und in der Ganglienzellschicht zu beobachten. b und c sind Folgeschnitte, an denen jeweils eine ISH zum Nachweis von EAAC1 (as, Antisense-Sonde) bzw. GAD (zur Darstellung von Amakrinzellen) durchgeführt wurden. Die offenen Pfeilspitzen (b) weisen auf positive Horizontalzellen. Die Pfeile (in b und c) weisen auf Amakrinzellen, die EAAC1 und GAD mRNA enthalten. (d-g) Zelluläre Verteilung von EAAC1 Protein nachgewiesen mittels Immunfluoreszenz an Semidünn-Plastikschnitten: EAAC1 ist in den Innensegmenten der Photorezeptoren (d), in fleckförmigen Strukturen der äusseren Körnerschicht (wahrscheinlich Terminale der Stäbchenzellen) (Pfeile in e), in verschiedenen Zellen der inneren Körnerschicht (meist in cytoplasmatischen Granula, e), im Neuropil der inneren plexiformen Schicht (d) und in Zellen der Ganglienzellschicht (d) nachweisbar. f und g sind ein Abbildungspaar eines Schnittes, an dem gleichzeitig EAAC1 und Glutaminsynthetase (GS, als Marker für Müller-Zellen) nachgewiesen wurden. EAAC1 ist häufig in Zellfortsätzen vorhanden, die auch immunpositiv für Glutaminsynthetase sind (Pfeile in f und g). Bedeutung der Abkürzungen siehe Legende bei Abb. 2. Massstäbe: in a = 45  $\mu\text{m}$ , in b und c = 55  $\mu\text{m}$ , in d = 75  $\mu\text{m}$ , in e, f, und g 10  $\mu\text{m}$ .

**c) GLAST**

Ein ISH-Reaktionsprodukt war in Zellkörpern der inneren Körnerschicht (hauptsächlich im mittleren Bereich dieser Schicht) sowie in verstreut liegenden flachen Zellen der Ganglienzellschicht lokalisiert. Die GLAST-mRNA positiven Zellen der inneren Körnerschicht wurden mit Hilfe einer Vimentin-Immunreaktion (Vimentin als ein Markerprotein für Müller-Zellen) als Müller-Zellen (Abb. 4a, b) und diejenigen in der Ganglienzellschicht mittels GFAP-Immunreaktion (GFAP als ein Markerprotein für Astrozyten) als Astrozyten identifiziert (Abb. 4c, d). Andere Zelltypen der Retina einschliesslich der Pigmentepithelzellen zeigten keine ISH-Reaktion. Entsprechend den Ergebnissen der ISH konnten wir auch mittels Immunreaktion GLAST- Protein in Müller-Zellen nachweisen, die mittels Doppelimmunfluoreszenz gegen Glutaminsynthetase (Abb. 4e, f) identifiziert wurden. Die GLAST- Immunreaktion war auf die Zellmembranen der Müller-Zellen beschränkt. Ebenfalls durch Doppelimmunfluoreszenz mit anti-GFAP- und anti-GLAST-Antikörpern wurde die Lokalisation von GLAST-Protein in Astrozyten (siehe ISH) nachgewiesen (nicht dokumentiert).

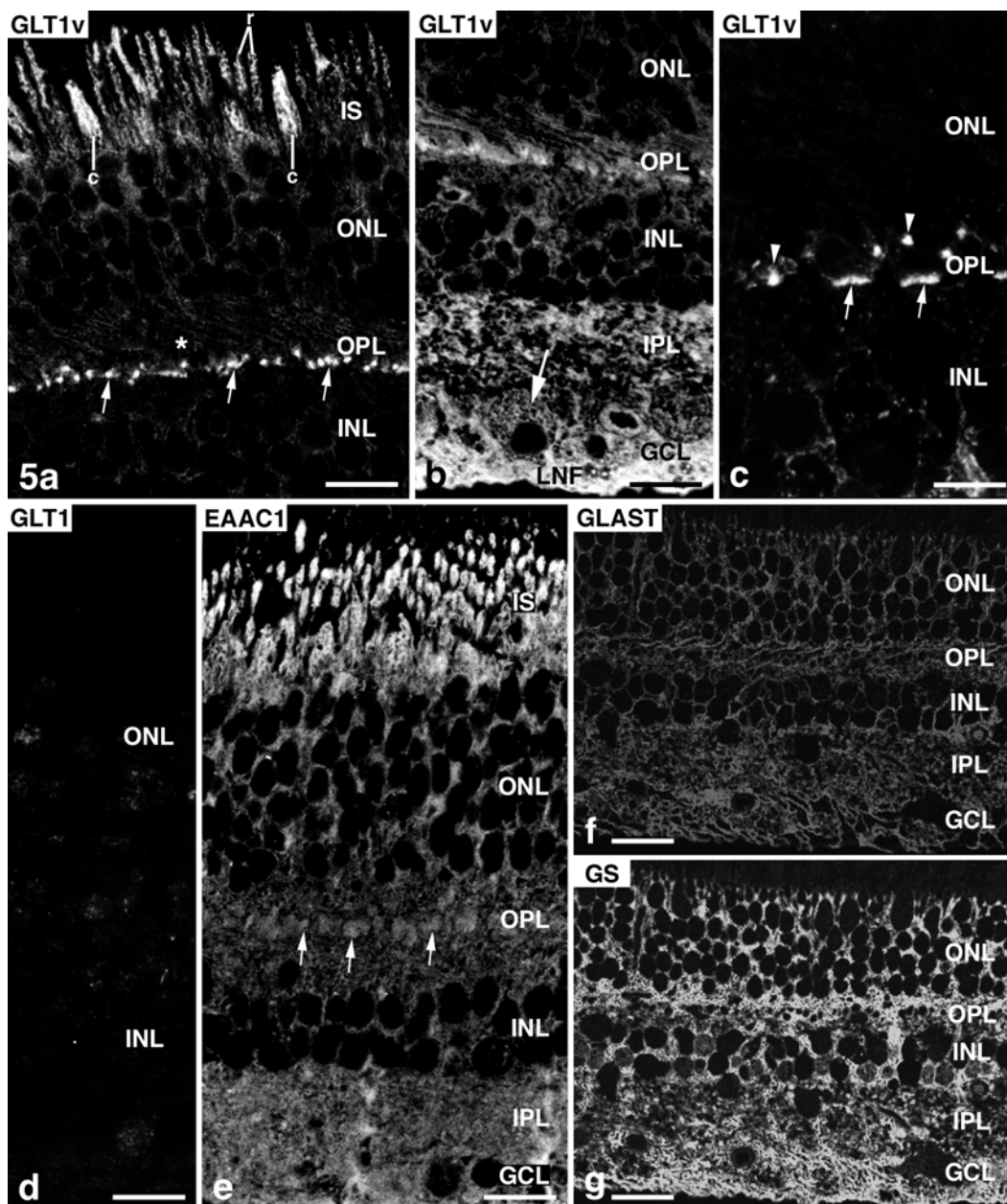


**Abb. 4:** Nachweis von GLAST in der Rattenretina. (a-d) Zelluläre Verteilung von GLAST mRNA nachgewiesen mittels ISH: (a/b und c/d) zeigen Abbildungspaare von Schnitten, bei denen nach der ISH mit cRNA-Sonde ein Immunnachweis von GFAP (b) oder Vimentin (d) durchgeführt wurde. Das ISH-Reaktionsprodukt ist in Zellkörpern der inneren Körnerschicht und in verstreut liegenden flachen Zellen der Ganglienzellschicht (Pfeile in a) lokalisiert (a, c). Die GFAP immunpositiven Fortsätze (Pfeile in b) erlauben eine Identifikation der ISH positiven Zellen (Pfeile in a) als Astrozyten der Ganglienzellschicht, während die Vimentin immunpositiven Zellfortsätze (Pfeile in d) der stark ISH positiven Zellen der inneren Körnerschicht (Pfeile in c) diese als Müller-Zellen charakterisieren. (e, f) Zelluläre Verteilung von GLAST-Protein nachgewiesen mittels Immunfluoreszenz an Semidünn-Plastikschnitten: e und f zeigen ein Abbildungspaar eines Gewebeschnittes nach Doppelmarkierung zur gleichzeitigen Darstellung von GLAST und Glutaminsynthetase (GS), die in Müller-Zellen angereichert ist (GS kommt ausserdem in Astrozyten der Ganglienzellschicht vor). Eine übereinstimmende zelluläre Verteilung von GLAST-Protein und GS besteht vor allem in der äusseren und inneren Körnerschicht, der Ganglienzellschicht und der äusseren plexiformen Schicht. Aus technischen Gründen ist die Immunfärbung von GS in der inneren plexiformen Schicht nur schwach (f) und die Übereinstimmung mit der GLAST-Immunfärbung nur zum Teil nachweisbar. Bemerkenswert ist die GLAST-Immunfärbung von Müller-Zell-Mikrovilli in der Schicht der Innensegmente der Photorezeptoren. Bedeutung der Abkürzungen siehe Abb. 2. Massstäbe in a-d = 60  $\mu\text{m}$ , in e und f = 20  $\mu\text{m}$ .

## **Immuncytochemischer Nachweis von Glutamattransportern in der menschlichen Retina**

Für die Immuncytochemie wurden Peptidantikörper gegen GLT1, GLT1v, EAAC1 und GLAST verwendet. Die zellulären Immunreaktionen in der menschlichen Retina entsprachen im wesentlichen denen in der Rattenretina. GLT1v-immunpositiv waren die Innensegmente und Terminalen der Zapfenzellen und Stäbchenzellen (identifiziert anhand ihrer typischen Morphologie) (Abb. 5a, c). Ausser in Photorezeptorzellen schien GLT1v-Protein auch noch in verschiedenen anderen Zelltypen der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht vorhanden zu sein. Erwähnenswert ist auch, dass die Ganglienzellen selbst im Zytoplasma eine feingranuläre Immunfärbung zeigten (Abb. 5b). Eine starke Immunreaktion war in der inneren plexiformen Schicht sowie in der Nervenfaserschicht zu beobachten (Abb. 5b). Ähnlich wie in der Retina der Ratte konnte auch in der menschlichen Retina GLT1 nicht nachgewiesen werden (Abb. 5d). EAAC1 war in fast allen Schichten der menschlichen Retina nachweisbar, von der Schicht der Innensegmente der Photorezeptorzellen bis zur Ganglienzellschicht (Abb. 5e). Dabei war in den verschiedenen Zelltypen eine überwiegend starke Immunreaktion zu beobachten. In der äusseren plexiformen Schicht ergab sich eine feinfleckige Immunreaktion. Diese dürfte immunpositiven Terminalen der Photorezeptorzellen entsprechen (Abb. 5e). Beim Immunnachweis von GLAST ergaben sich positiv reagierende Zellmembranen innerhalb aller retinalen Schichten. Dieses Markierungsmuster ähnelt in vieler Hinsicht dem der Rattenretina, was uns ein Vorkommen von GLAST in Müller-Zellen und einzelnen verstreut liegenden Astrozyten (Ganglienzellschicht) vermuten liess. Diese Vermutung konnte mittels Doppelmarkierung mit Glutaminsynthetase-Antikörpern bestätigt werden (Abb. 5f, g).



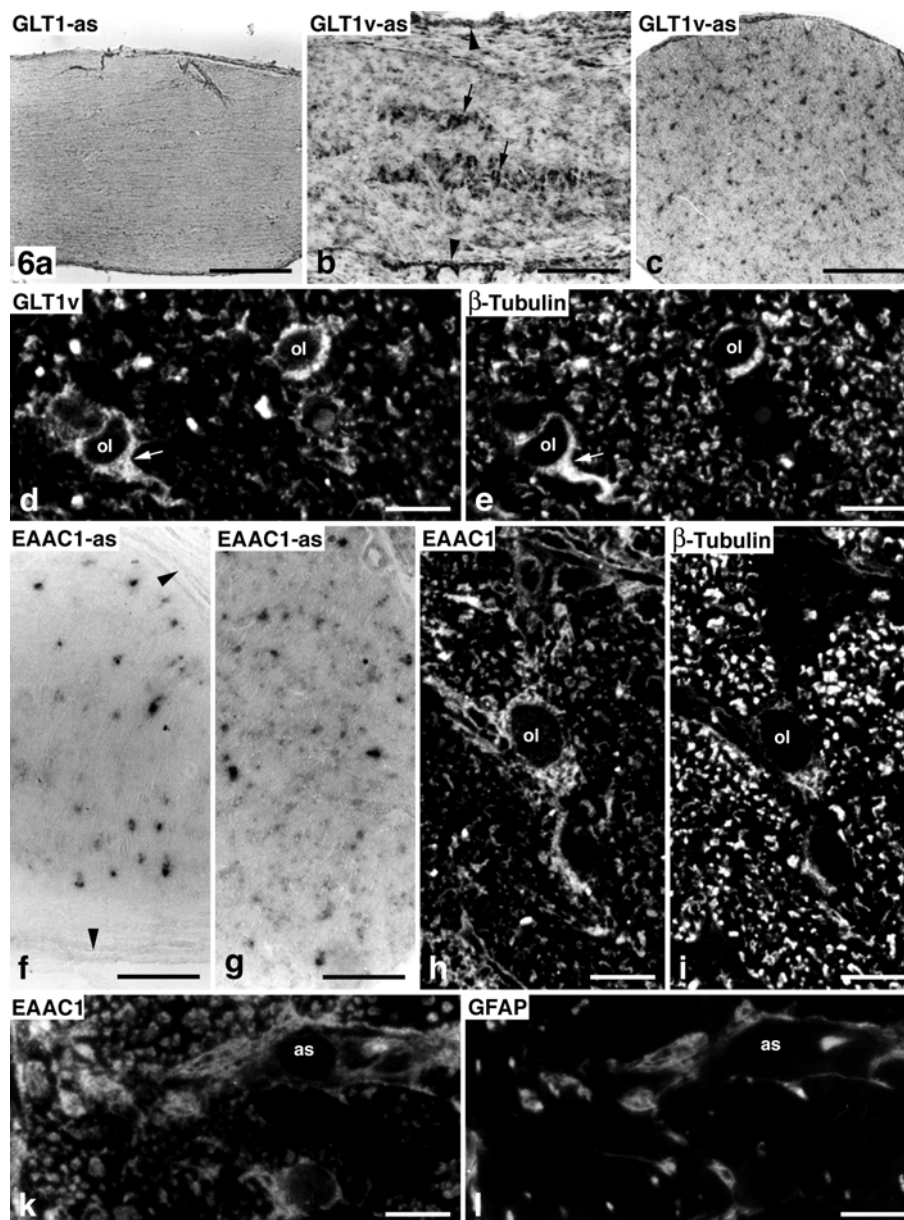


**Abb. 5:** Verteilung von Glutamattransportern in der menschlichen Retina nachgewiesen mittels Immunfluoreszenz an Semidünn-Plastikschnitten. (a-c) GLT1v: In a ist eine starke Immunreaktion der Innensegmente von Zapfen (c) - und Stäbchen (r) -Zellen und in den Terminalen der Photorezeptorzellen (Pfeile) zu erkennen. Axone der Photorezeptorzellen (siehe Umgebung des Sternchens) sind nur schwach gefärbt. Eine mittelstarke Immunreaktion ergibt sich in der inneren und äusseren Körnerschicht. In (b) ist eine starke Immunreaktion im Bereich der inneren plexiformen Schicht und besonders in der Schicht der Nervenfasern (LNF) zu beobachten. In einer Ganglienzelle (Pfeil) liegt eine feingranuläre Färbung im Cytoplasma vor. In (c) ist die kräftige Immunreaktion der Terminalen der Stäbchen (Pfeilspitzen) - und Zapfenzellen (Pfeile; endkolbenartige Terminale) dokumentiert. (d) GLT1: Eine spezifisch Immunreaktion ist nicht nachweisbar. In der inneren und äusseren Körnerschicht zeigen einige Zellkerne eine unspezifische, schwache Färbung. (e) EAAC1: Eine relativ starke Immunreaktion ist in allen Schichten der menschlichen Retina zu beobachten, von der Schicht der Innensegmente bis zur Ganglienzellschicht. Die feinfleckige Immunfärbung in der äusseren plexiformen Schicht (Pfeile) dürfte den Terminalen der Photorezeptorzellen entsprechen. (f, g) Abbildungspaar eines Schnittes nach Doppel- Immunfluoreszenz zum gleichzeitigen Nachweis von GLAST und Glutaminsynthetase (Markerprotein für Müller-Zellen): Die Verteilung von GLAST und Glutaminsynthetase stimmt in allen Schichten der menschlichen Retina miteinander überein. Bedeutung der Abkürzungen siehe Abb. 2. Massstäbe: in a, b, d und e = 20  $\mu$ m, in f und g = 35  $\mu$ m

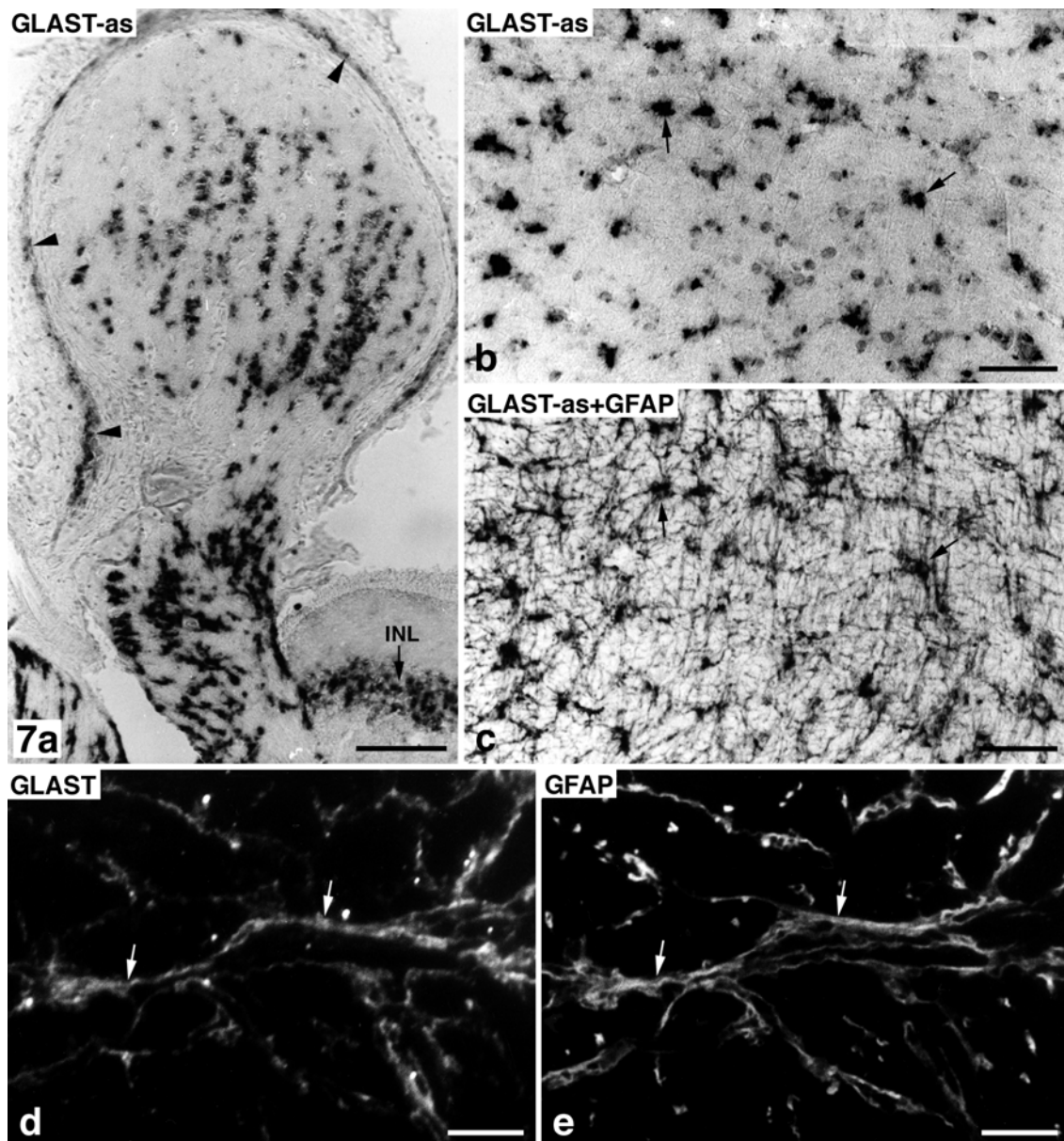
---

## Expression von Glutamattransportern im N. opticus der Ratte

Nur der intraorbital liegende Anteil des N. opticus wurde untersucht. GLT1 konnte weder mittels ISH noch durch Immuncytochemie nachgewiesen werden (Abb. 6a). Dagegen konnten wir mit der ISH GLT1v- mRNA und EAAC1- mRNA in Gliazellen nachweisen, welche entweder in Reihen angeordnet oder verstreut lokalisiert in der weissen Substanz waren. (Abb. 6b, c, f, g). Wir identifizierten diese Zellen mittels immuncytochemischer Doppelmarkierungs-Verfahren. Nahezu alle GLT1v- und EAAC1- positiven Zellen wurden auch durch einen Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin gefärbt (Abb. 6d, e, h, i). Bekanntlich wird  $\beta$ -Tubulin in Oligodendrozyten und Neuronen exprimiert (Schaeren-Wiemers *et al.* 1995). Da der N. opticus frei von Neuronen ist, handelt es sich bei den  $\beta$ -Tubulin positiven Zellen mit grösster Wahrscheinlichkeit um Oligodendrozyten. Das Axoplasma (bzw. Axolemm) von Nervenfasern war ebenfalls immunpositiv für GLT1v und EAAC1 sowie für  $\beta$ -Tubulin. Vor allem beim immuncytochemischen Nachweis von EAAC1 zeigte eine kleine Anzahl von Gliazellen und ihre Fortsätze eine positive Reaktion. Diese Gliazellen wurden mittels Doppelmarkierung mit GFAP- Antikörpern als Astrozyten identifiziert (Abb. 6 k, l). Beim Nachweis von GLAST- mRNA und GLAST- Protein (unter Verwendung von ISH bzw. Immuncytochemie) kam eine grosse Anzahl von Gliazellen (vor allem im Inneren des N. opticus) zur Darstellung (Abb. 7a). Auch diese Zellen wurden mittels GFAP- Doppelmarkierung als Astrozyten identifiziert (Abb. 7b, c, d, e). Eine Expression von GLAST und GLT1v konnte auch in Meningen (Meningealzellen) nachgewiesen werden (Abb. 6b, 7a).



**Abb. 6:** Verteilung der Transporter GLT1, GLT1v und EAAC1 im N. opticus der Ratte: (a) ISH mit GLT1 antisense (as) cRNA- Sonde. GLT1 RNA ist nicht nachweisbar. (b, c) ISH mit GLT1v antisense (as) cRNA- Sonde. (b) Im Längsschnitt sieht man in Reihe angeordnete positiv reagierende Zellen (Pfeile). Die Pfeilspitzen markieren positiv reagierende Meningen. (c) Im Querschnitt durch den N. opticus sind positiv reagierende Zellen über die gesamte weisse Substanz verteilt. (d, e) Abbildungspaar eines Semidünn-Plastikschnittes nach Doppelimmunfluoreszenz zum gleichzeitigen Nachweis von GLT1v und  $\beta$ -Tubulin (Marker für Neurone und Oligodendrozyten): GLT1v- immunpositive Gliazellen sind auch  $\beta$ -Tubulin immunpositiv und entsprechen daher Oligodendrozyten (ol). Erwähnenswert ist der stark reagierende Fortsatz eines Oligodendrozyten (Pfeil). Auch das Axoplasma der quergeschnittenen Nervenfasern ist immunpositiv für GLT1v (d) und  $\beta$ -Tubulin (e). (f, g) ISH mit EAAC1- antisense (as) cRNA- Sonde: Die im Schräg (f) -und Querschnitt (g) sichtbaren positiv reagierenden Zellen sind über die gesamte weisse Substanz verteilt. Die Meningen (Pfeilspitzen) sind nicht gefärbt. (h, i) Abbildungspaar eines Semidünn-Plastikschnittes nach Doppelimmunfluoreszenz zur gleichzeitigen Darstellung von EAAC1 und  $\beta$ -Tubulin: Die Gliazelle ist immunpositiv für EAAC 1 und  $\beta$ -Tubulin und scheint daher ein Oligodendrozyt zu sein (ol). Deutlich gefärbt ist auch das Axoplasma von quergeschnittenen Nervenfasern (h und i). (k, l) Abbildungspaar eines Semidünn-Plastikschnittes nach Doppelimmunfluoreszenz zum gleichzeitigen Nachweis von EAAC 1 und GFAP (Markerprotein für Astrozyten): Zu sehen ist eine Gliazelle, in der EAAC1 und GFAP nachweisbar sind und die daher ein Astrozyt zu sein scheint (as). Massstäbe in a und c = 120  $\mu$ m, in b = 100 $\mu$ m, in d, e, h und i = 10  $\mu$ m, in f und g = 60  $\mu$ m



**Abb. 7:** Zelluläre Verteilung von GLAST mRNA (a, b, c) und GLAST Protein (d) im N. opticus der Ratte. (a) ISH zum Nachweis von GLAST mRNA mit der Antisense (as) cRNA- Sonde: Der Anfangsteil des Nerven (beachte die angrenzende Retina mit gefärbten Müller-Zellen in der inneren Körnerschicht = INL) zeigt eine hohe Dichte von stark reagierenden Gliazellen. Im nachfolgenden Teil des Nervus opticus (schräg geschnitten) sind die stark reagierenden Gliazellen hauptsächlich in Reihen angeordnet. Die Pfeilspitzen markieren die positiv reagierenden Meningen des Nerven. (b, c) Abbildungspaar eines Schnittes, an dem zuerst eine ISH mit der GLAST cRNA- Sonde (b) und anschließend zusätzlich ein Immunnachweis von GFAP durchgeführt wurde (c): GFAP-immunreaktive Fortsätze (c) erlauben die Identifikation der ISH- positiven Zellen (b) als Astrozyten (Pfeile). (d, e) Abbildungspaar eines Semidünn-Plastikschnittes nach Doppelimmunfluoreszenz zum gleichzeitigen Nachweis von GLAST (d) und GFAP (e): Die glialen Zellstrukturen sind sowohl beim Immunnachweis von GLAST als auch von GFAP positiv (Pfeile) und scheinen daher Astrozytenfortsätzen zu sein. Massstäbe: in a = 375  $\mu\text{m}$ , in b und c = 50  $\mu\text{m}$ , in d und e = 10  $\mu\text{m}$

In Tabelle 1 ist die Verteilung der Glutamattransporter in der verschiedenen Zellen der Retina der Ratte zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Zelluläre Expression von Glutamattransportern in der Retina der Ratte unter Verwendung von ISH und Immunocytochemie

		GLT1	GLT1v	EAAC1	GLAST
<b>Retina</b>	Photorezeptorzellen	-	+	+	-
	Bipolar-Zellen	-	+	+	-
	Horizontalzellen	-	+	+	-
	Amakrinzellen	-	+	+	-
	Ganglienzellen	-	+	+	-
	Müller-Zellen	-	+	+	+
<b>N. opticus</b>	Astrozyten	-	+/-	+/-	+
	Oligodendrozyten	-	+	+	-
	Meningeal-Zellen	-	+	-	+

- + nachweisbar
- +/- gelegentlich nachweisbar
- nicht nachweisbar

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir mit Hilfe nicht-radioaktiver ISH und immunocytochemischer Methoden die zellspezifische Expression verschiedener Glutamatttransporter in der Retina und dem N. opticus der Ratte zeigen. In Übereinstimmung mit bereits vorliegenden immunocytochemischen Studien an der Retina der Ratte konnten wir nachweisen, dass der Glutamatttransporter GLAST (EAAT1) in Müller-Zellen und verstreut liegenden Astrozyten vorkommt (Derouiche und Rauen 1995; Derouiche 1996; Rauen *et al.* 1996, 1998; Lehre *et al.* 1997; Harada *et al.* 1998; Pow und Barnett 1999). Eine entsprechende Lokalisation von GLAST konnten wir auch für die menschliche Retina nachweisen.

Das Vorkommen von GLAST im Pigmentepithel, wie in vorherigen Arbeiten beschrieben (Derouiche und Rauen 1995) konnten wir allerdings nicht bestätigen.

Die Bedeutung von GLAST bei der Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellularraum wurde bereits ausführlich in früheren Studien beschrieben und soll daher hier nicht weiter erörtert werden.

Entgegen der publizierten Literatur, in der das Vorkommen von GLT1-Protein in Zapfenzellen und verschiedenen Bipolar-Zellen beschrieben wurde (Rauen und Kanner 1994; Grünert *et al.* 1994; Euler und Wässle 1995; Brandstätter *et al.* 1995; Harada *et al.* 1998), konnten wir diesen Transporter weder mit der ISH noch mit immunocytochemischen Methoden in der Retina oder im N. opticus nachweisen. Eine Ursache für dieses widersprüchliche Ergebnis könnte darin bestehen, dass, zumindest was die immunocytochemischen Methoden anbetrifft, unterschiedliche GLT1-Antikörper verwendet wurden. In den oben zitierten Studien wurden jeweils Antikörper eingesetzt, die gegen das ganze GLT1 Protein gerichtet waren, während wir in der hier vorliegenden Arbeit nur einen GLT1 spezifischen Peptidantikörper (gegen die spezifische C-terminale Peptidsequenz gerichtet; Schmitt *et al.* 1996, 2002) verwendet haben. Es ist anzunehmen, dass bei der Verwendung von Antiseren gegen das ganze GLT1 Protein auch GLT1v Protein (siehe unten) oder bisher noch nicht bekannte Splicevarianten detektiert werden. Es gibt allerdings auch Untersuchungen, bei denen ein unserem Peptidantikörper ähnlicher Antikörper benutzt wurde. Mit diesem wurden

Bipolar-Zellen, Amakrinzellen (Rauen *et al.* 1996) und zusätzlich Terminale von Stäbchenzellen (Reye *et al.* 2002) nachgewiesen. Für diese unterschiedlichen Ergebnisse gibt es bisher keine befriedigende Erklärung.

## **Retina**

Unsere immunocytochemischen Ergebnisse stimmen mit denen von Rauen *et al.* (1996) und Schultz und Stell (1996) insofern überein, als auch wir EAAC1 Protein in Horizontalzellen, Bipolar-Zellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen nachweisen konnten. Zusätzlich konnten wir mittels ISH und Immunocytochemie EAAC1 auch in Photorezeptorzellen und Müller-Zellen detektieren. In Untersuchungen von Zhao und Yang (2001) wurde gezeigt, dass auch bei niederen Vertebraten EAAC1 in Müller-Zellen vorkommt. Immunocytochemisch konnten wir die Lokalisation von EAAC1 im Innensegment und in synaptischen Terminalen der Photorezeptorzellen (Retina von Ratte und Mensch) zeigen.

Nach unseren Untersuchungen ergibt sich die gleiche zelluläre Lokalisation von GLT1v und EAAC1. Die offenbar identische neuronale Verteilung von GLT1v und EAAC1 wurde bereits in früheren Arbeiten für andere ZNS Regionen beschrieben (Schmitt *et al.* 2002). Bemerkenswert ist, dass wir GLT1v-Protein in präsynaptischen Terminalen von sowohl Stäbchen- (Ratte und menschliche Retina) als auch Zapfenzellen (menschliche Retina) nachweisen konnten. In einer vor kurzem publizierten Arbeit konnte GLT1v immunocytochemisch nur in präsynaptischen Terminalen von Zapfenzellen (Reye *et al.* 2002) nachgewiesen werden. Ein anderer Glutamattransporter, nämlich EAAT5 (Arriza *et al.* 1997), wurde demgegenüber bisher nur in präsynaptischen Terminalen von Stäbchenzellen gefunden. Das Vorkommen von GLT1v in den präsynaptischen Terminalen beider Typen von Photorezeptoren konnten wir auch in Vorversuchen mit Hilfe einer Doppelmarkierung für GLT 1v und Synaptophysin zeigen (nicht publizierte Ergebnisse).

All diese immunocytochemischen Befunde lassen vermuten, dass EAAC1, GLT1v und EAAT5 als präsynaptische Glutamattransporter bei der Wiederaufnahme von Glutamat

aus dem Extrazellulärraum eine wichtige Rolle spielen. Die Lokalisation von Glutamattransportern wie GLT 1v (und vermutlich EAAC1) im Bereich von präsynaptischen Terminalen der Zapfen stimmt mit elektrophysiologischen Studien überein. Diese Studien haben gezeigt, dass die Glutamatkonzentration an grossen präsynaptischen Terminalen der Zapfenzellen hauptsächlich von spannungsabhängigen Glutamattransportern kontrolliert wird, und dass die Diffusion nur eine untergeordnete Rolle spielt (Roska *et al.* 1998). Der präsynaptische Nachweis von Glutamattransportern in der Retina ist insofern bemerkenswert, als im übrigen ZNS Glutamattransporter bisher überwiegend nur postsynaptisch detektiert wurden (siehe Danbolt 2001).

Subzellulär sind GLT1v- und EAAC1-Protein vor allem im Zytoplasma von Neuronen und Gliazellen lokalisiert. Im Gegensatz dazu ist die Lokalisation von GLAST-Protein (in Müller-Zellen) auf die Zellmembranen beschränkt. Eine cytoplasmatische Lokalisation in Neuronen und Gliazellen anderer ZNS-Regionen wurde bereits in früheren Arbeiten für EAAC1 (Kugler und Schmitt 1999) und GLT1v (Schmitt *et al.* 2002) beschrieben.

Bei immunocytochemischen Nachweisen von GLT1v und EAAC1 ergibt sich häufig im Zytoplasma ein granuläres Reaktionsmuster. Unter Einbeziehung der Immunblot-Analysen, bei denen GLT1v und EAAC1 nur in den Membranfraktionen der Retina nachweisbar sind, deutet dieses granuläre Reaktionsmuster darauf hin, dass GLT1v und EAAC1 in Membranen von Vesikeln lokalisiert sind. Ein gleiches vesikuläres Vorkommen ist bereits für GLT1v (Schmitt *et al.* 2002), EAAC1 (Davis *et al.* 1998; Kugler und Schmitt 1999) und für andere Transportermoleküle beschrieben worden. Diese transporterhaltigen Vesikel haben wahrscheinlich Speicherfunktionen. Für EAAC1 konnte bereits gezeigt werden, dass die Verlagerung der Glutamattransporter von Speichervesikeln in die Zellmembran sehr schnell erfolgt (Dowd und Robinson 1996; Davis *et al.* 1998). Vesikulär gebundenes GLT1v und EAAC1 stellt möglicherweise einen endogenen Mechanismus zur Regulation der Glutamatkonzentration in den Synapsen der Photorezeptorzellen dar. Erwähnenswert ist, dass in der Retina eine Coexpression von GLT1v und EAAC1 nicht nur in



Neuronen, sondern auch in Müller-Zellen vorliegt. Die Expression von GLT1v und EAAC1 in den Müller-Zellen ist allerdings deutlich geringer als die von GLAST. Die Bedeutung des gleichzeitigen Vorkommens von unterschiedlichen Glutamattransportern in ein und derselben Zelle ist bisher nicht geklärt. Eine Colokalisation von unterschiedlichen Glutamattransportern in verschiedenen Zelltypen ist allerdings auch schon in anderen ZNS Regionen beschrieben worden (Lehre *et al.* 1995; Schmitt *et al.* 2002).

## **N. opticus**

In vorausgegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im Bereich der weissen Substanz von verschiedenen ZNS-Regionen GLT1v und EAAC1 in Oligodendrozyten und GLAST und GLT1 in Astrozyten exprimiert werden (Schmitt *et al.* 1996, 1997, 2002).

Die Glutamattransporter reduzieren die extrazelluläre Glutamatkonzentration, gewährleisten damit die Funktionen von Oligodendrozyten und Astrozyten und schützen darüber hinaus Oligodendrozyten vor den toxischen Schäden durch Glutamat. In verschiedenen physiologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Oligodendrozyten Glutamatrezeptoren vom AMPA/ Kainat / Typ besitzen (Steinhäuser 1993; Pende *et al.* 1994; Gallo *et al.* 1994; Garcia-Barcina und Matute 1996; McDonald *et al.* 1998). Diese Rezeptoren können durch Glutamat aktiviert werden, welches von Astrozyten (Martin 1992; Levi und Gallo 1995) und von Axonen nach Auslösung von Aktionspotenzialen (Weinreich und Hammerschlag 1975) durch umgekehrte Glutamattransporteraktivität an Ranvierschen Schnürringen (Kriegler und Chiu 1993) freigesetzt wird. Die Applikation von Glutamat an kultivierten Oligodendrozyten führt zu einer Depolarisation (Kettermann *et al.* 19984; Butt und Tutton 1992) und reguliert mittels AMPA Rezeptoren die unmittelbare frühzeitige Genexpression durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Pende *et al.* 1994; Gallo *et al.* 1994). Es konnte gezeigt werden, dass neuronale Aktivitäten zur Aufrechterhaltung von funktionellen transmittervermittelten Signalwegen beitragen, die an eine Mobilisierung von intrazellulärem Calcium in Oligodendrozyten gekoppelt sind (He *et al.* 1996).

Andererseits haben neuere Studien (Matute *et al.* 1997; McDonald *et al.* 1998 ) auch gezeigt, dass Oligodendrozyten eine ähnlich hohe Empfindlichkeit gegenüber AMPA/Kainat Rezeptor-vermitteltem Zelltod aufweisen wie Neurone.

Unsere Untersuchungen ergeben, dass im N. opticus die zelluläre Expression von Glutamatttransportern grosse Übereinstimmung mit der weissen Substanz in anderen Abschnitten des ZNS zeigt. GLT1v und EAAC1 werden hauptsächlich in Oligodendrozyten exprimiert und können zusätzlich immunocytochemisch im Axoplasma von Nervenfasern nachgewiesen werden. GLAST wird stark in Astrozyten exprimiert.

Eine Ausnahme bildet GLT1, der - anders als in anderen ZNS-Regionen - im N. opticus nicht nachweisbar ist. Unsere Befunde weichen damit deutlich von bereits vorliegenden Ergebnissen anderer Autoren ab. Domerq *et al.* (1999) beschrieben eine Lokalisation von GLAST in interfazikulären Oligodendrozyten, von EAAC1 in unreifen Oligodendrozyten und von GLT1 in Astrozyten. Diese Ergebnisse wurden von den Autoren immunocytochemisch erzielt. Das Vorkommen entsprechender Transporterproteine im N. opticus wurde zusätzlich mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Mit Hilfe der RT-PCR konnten Choi und Chiu (1997) das Vorkommen von GLT1- und GLAST- mRNA im N. opticus zeigen, ein Nachweis von EAAC1- mRNA gelang nicht. In Western-Blot-Analysen konnte allerdings von diesen Autoren EAAC1-Protein nachgewiesen werden.

Es gibt bisher keine befriedigende Erklärung für die unterschiedlichen bzw. widersprüchlichen Ergebnisse zwischen der vorliegenden Untersuchung und den bereits vorliegenden Veröffentlichungen bezüglich der zellulären Verteilung und dem Vorkommen von GLT1 im N. opticus. Unsere Ergebnisse erscheinen uns durch die Verwendung von komplementären Methoden (nicht-radioaktive ISH und Immunocytochemie) und Doppel-Markierungen zur Identifikation der verschiedenen Gliazelltypen im N. opticus gut fundiert.

Mit der RT-PCR konnten Choi und Chiu (1997) eine ungewöhnlich hohe Expression von GLAST im N. opticus zeigen. In anderen vorliegenden Studien wurde bereits

vermutet, dass GLAST mRNA in Astrozyten des N. opticus lokalisiert ist (Otorio *et al.* 1994). Unsere Doppel-Markierungs- Experimente konnten nun eindeutig zeigen, dass GLAST nur in Astrozyten des N. opticus vorkommt. Man kann daher davon ausgehen, dass GLAST in den Astrozyten des N. opticus die gleiche Bedeutung bezüglich der Vermeidung extremer extrazellulärer Glutamatkonzentrationen hat wie in den Müller-Zellen der Retina (Harada *et al.* 1998; Barnett *et al.* 2001).

Was die Expression von Glutamattransportern in Astrogliazellen betrifft, gibt es deutliche Unterschiede in den verschiedenen Regionen des ZNS: In den Astrozyten der meisten ZNS-Regionen zeigt sich eine deutlich stärkere Expression von GLT1 als von GLAST, während in den Bergmann-Gliazellen der Kleinhirnrinde GLAST gegenüber GLT1 eindeutig stärker exprimiert wird (siehe Danbolt 2001). In den Astrozyten des N. opticus scheint demgegenüber GLAST der einzige exprimierte Transporter zu sein.

## Zusammenfassung

L-Glutamat ist der hauptsächliche exzitatorische Transmitter in der Vertebratenretina und spielt eine zentrale Rolle bei der Transmission wesentlicher Neurone in der Retina (z.B. Photorezeptor-, Bipolar- und Ganglienzellen). Das bei der Transmission freigesetzte Glutamat wird aus dem Extrazellularraum durch mindestens fünf verschiedene Glutamattransporter entfernt (zur Beendigung des Transmittersignals und zur Vermeidung einer neurotoxischen Anreicherung von Glutamat), die unterschiedlich verteilt in Neuronen und Gliazellen (vor allem Müller-Zellen) vorkommen. Die zelluläre Verteilung dieser Transporter wurde bisher hauptsächlich nur mit immunocytochemischen Methoden untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung (ISH) unter Verwendung komplementärer RNA-Sonden eingesetzt, um die Zelltypen in der Retina und zusätzlich im N. opticus der Ratte zu identifizieren, welche die Glutamattransporter GLT1, GLT1-Variante (GLT1v), GLAST und EAAC1 exprimieren. Die Ergebnisse der ISH wurden mit immunocytochemischen Daten verglichen, wobei affinitätsgereinigte Antikörper gegen Transporterpeptide verwendet wurden. Bei den immunocytochemischen Untersuchungen wurde aus Vergleichsgründen die menschliche Retina einbezogen.

Die Untersuchungen haben ergeben, dass in der Retina der Ratte GLT1v und EAAC1 in verschiedenen Zelltypen (Photorezeptor-, Bipolar-, Horizontal-, Amakrin-, Ganglien- und Müller-Zellen) gleichzeitig exprimiert werden, während GLAST nur in Müller-Zellen und Astrozyten vorkommt. Im N. opticus der Ratte werden GLT1v und EAAC1 vor allem in Oligodendrozyten und GLAST hauptsächlich in Astrozyten exprimiert. GLT1 konnte weder in der Retina, noch im N. opticus nachgewiesen werden. Die Untersuchungen an der menschlichen Retina ergaben eine der Rattenretina ähnliche zelluläre Verteilung der Glutamattransporter.

Insgesamt sind folgende Ergebnisse an der Retina besonders hervorzuheben: 1. GLT1 ist weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachweisbar. 2. GLT1v und EAAC1 werden von den meisten Zelltypen exprimiert. Dabei gelang auch der Nachweis dieser Transporter in präsynaptischen Terminalen von Photorezeptorzellen.

---

## Abkürzungen

as	antisense
aP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
Cy2	Carbocyanid
Cy3	Indocarbocyanid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIG	Digoxigenin
EAAC1	Exzitatorischer Aminosäuretransporter 3 (EAAT3)
EAAT	Exzitatorischer Aminosäuretransporter
ECL	Enhanced luminol chemiluminescence Technik
GCL	Ganglienzellschicht
GFAP	Saures Gliafibrillen Protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT1	Glutamatttransporter 1
GLT1v	GLT1-Variante
GS	Glutaminsynthetase
INL	innere Körnerschicht
IPL	innere plexiforme Schicht
IS	Innensegment
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NGS	normales Ziegenserum
ONL	äussere Körnerschicht
OPL	äussere plexiforme Schicht
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAP	Peroxidase Antiperoxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid

RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s	sense
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SSC	Standard-Salz-Zitratlösung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TNBT	Tetranitroblau Tetrazoliumchlorid
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ZNS	Zentralnervensystem

## Literaturverzeichnis

- Arriza, J.L., Eliasof, S. Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (8): 4155-4160.
- Asan, E., Kugler, P. (1995) Qualitative and quantitative detection of alkaline phosphatase coupled to an oligonucleotide probe for somatostatin mRNA after in situ hybridization using unfixed rat brain tissue. *Histochem. Cell. Biol.* **103**: 463-471.
- Ayouob, G.S., Copenhagen, D.R. (1990) Application of a fluorometric method to measure glutamate release from single retinal photoreceptors. *J. Neurosci. Methods* **37**: 7-14.
- Barnett, N.L., Pow, D.V., Bull, N.D. (2001) Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem. Int.* **39** (4): 292-299.
- Barnstable, C.J. (1993) Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3** (4): 520-525.
- Brandstätter, J.H., Grefrath, U., Euler, T., Wässle, H. (1995) Co-staification of GABA A receptors with the directionally selective circuitry of rat retina. *Vis. Neurosci* **12** (2): 345-358.
- Burnette, W.N. (1981) Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.
- Butt, A.M., Tutton, M. (1992) Response of oligodendrocytes to glutamate and gammaaminobutyric acid in the intact mouse optic nerve. *Neurosci. Lett.* **146**: 108-110.
- Choi, I., Chiu, S.Y. (1997) Expression of high-affinity neuronal and glial glutamate transporters in the rat optic nerve. *Glia* **20** (3): 184-192.
- Dagerlind, A., Friberg, K., Bean, A.J., Hökfelt, T. (1992) Sensitive mRNA detection using unfixed tissue: combined radioactive and non-radioactive in situ hybridisation histochemistry. *Histochemistry* **98**: 39-49.
- Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **65**: 1-105.



- Davis, K.E., Straff, D.J., Weinstein, E.A., Bannermann, P.G., Correale, D.M., Rothstein, J.D., Robinson, M.B. (1998) Multiple signalling pathways regulate cell surface expression and activity of excitatory amino acid carrier 1 subtype of glu transporter in C6 glioma. *J. Neurosci.* **18**: 2475-2485.
- Derouiche, A. (1996) Possible role of Müller cell in uptake and metabolism of glutamate in the mammalian outer retina. *Vision Res.* **36** (24): 3875-3878.
- Derouiche, A., Rauen, T. (1995) Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreaction in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J. Neurosci. Res.* **42** (1): 131-143.
- Domercq, M., Sanchez-Gomez, M.V., Areso, P., Matute, C. (1999) Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **11** (7): 2226-2236.
- Dowd, L.A. Robinson, M.B. (1996) Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na-dependent L-glutamate transport activity in C6 glioma by phorbol ester. *J. Neurochem.* **67**: 508-516.
- Dowling, J.E. (1987) The retina: An approachable part of the brain. *Belknap Press Cambridge MA*, London.
- Ehinger, B., Dowling, J.E. (1987) Retinal neurocircuitry and transmission. In: Björklund, A., Hökfelt, T., Swanson (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy*, Vol.5, Elsevier, Amsterdam, pp. 389-446.
- Euler, T., Wässle, H. (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* **361** (3): 461-478.
- Gallo, V., Patneau, D.K., Mayer, M.L., Vaccarino, F.M. (1994) Excitatory amino acid receptors in glial progenitor cells: molecular and functional properties. *Glia* **11**: 94-101.
- Garcia-Barcina, J.M., Matute, C. (1996) Expression of kainate-selective glutamate receptor subunits in glial cells of the adult bovine white matter. *Eur. J. Neurosci.* **8**: 2379-2387.
- Grünert, U., Martin, P.R., Wässle, H. (1994) Immunocytochemical analysis of bipolar cells in the macaque monkey retina. *J. Comp. Neurol.* **348** (4): 607-627.

- Harada, T., Harada, C. Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., Tanaka, K. (1998) Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (8): 4663-4666.
- He, M., Howe, D.G., McCarty, K.D. (1996) Oligodendroglial signal transduction systems are regulated by neuronal contact. *J. Neurochem.* **67**: 1491-1499.
- Kanai, Y., Bhide, P.G., DiFiglia, M., Hediger, M.A. (1995) Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *Neuroreport* **6**: 2357-2362.
- Kettenmann, H., Gilbert, P., Schachner, M. (1984) Depolarization of cultured oligodendrocytes by glutamate and GABA. *Neurosci. Lett.* **29**: 271-276.
- Kiryu, S., Yao, G.L., Morita, N., Kato, H., Kiyama, H. (1995) Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. *J. Neurosci.* **15**: 7872-7878.
- Kriegler, S., Chiu, S.Y. (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J. Neurosci.* **13**: 4229-4245.
- Kugler, P., Schmitt, A. (1999) Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* **27** (2): 129-142.
- Kugler, P., Schmitt, A. (2002) Complementary neuronal and glial expression of two high-affinity glutamate transporter GLT1/EAAT2 forms in rat cerebral cortex. *J. Neurosci.* (submitted)
- Lehre, K.P., Davanger, S., Danbolt, N.C. (1997) Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res.* **744** (1): 129-137.
- Lehre, K.P., Levy, L.M. Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* **15**: 1835-1853.
- Levi, G., Gallo, V. (1995) Release of neuroactive amino acids from glia, In: Kettermann, H., Ransom, B.R. (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, pp. 815-826.
- Mayor, H.D., Hampton, J.C., Rosario, B. (1961) A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. *J. Biophys. Cytol.* **9**: 909-910.
- Martin, D.L. (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* **5**: 81-94.

- Matute, C., Sanchez-Gomez, M.V., Martinez-Millan, L., Miledi, R. (1997) Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8830-8835.
- Massey S.C. (1990) Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In: Osborne, N., Chader, G. (eds) *Progress in Retinal Research*, Vol. 9, Pergamon, Oxford, pp. 399-426.
- McDonald, J.W., Althomsons, S.P., Hyrc, K.L., Choi, D.W., Goldber, M.P. (1998) Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainite receptor-mediated excitotoxicity. *Nat. Med.* **4**: 291-297.
- Otorio, Y., Shimada, S., Tanaka, K., Ishimoto, I., Tohyama, M. (1994) Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **27** (2) 310-314.
- Pende, M., Holtzclaw, L.A., Curtis, J.L. Russel, J.T., Gallo, V. (1994) Glutamate regulates intracellular calcium and gene expression in oligodendrocyte progenitors through the activation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3215-3219.
- Pow, D.V., Barnett, N.L. (1999) Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinal are mediated by Müller cell glutamate transporter GLAST. *Cell Tissue Res.* **297** (1): 57-66.
- Pow, D.V., Barnett, N.L. (2000) Development expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci. Lett.* **280** (1): 21-24.
- Rager R. und Van Der Zypen E.: Auge. In: *Benninghoff Anatomie*. Bd. 2. Hrsg. D. Drenckhahn und W. Zenker. Urban & Schwarzenberg. 15. Aufl. München-Wien-Baltimore 1994
- Rauen, T., Kanner, B.I. (1994) Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci. Lett.* **169** (1-2): 137-140.
- Rauen, T., Rothstein, J.D., Wässle, H. (1996) Differential expression of the three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res.* **286** (3): 325-336
- Rauen, T., Taylor, W.R., Kuhlbrodt, K., Wiessner, M. (1998) High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res.* **291** (1): 19-31.

- Reye, P., Sullivan, R., Fletcher, E.L., Pow, D.V. (2002) Distribution of two splice variants of the glutamate transporter GLT1 in the retina of humans, monkeys, rabbits, rats, cats and chickens. *J. Comp. Neurol.* **445**: 1-12.
- Riepe, R.E., Norenburg, M.D. (1977) Müller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature (London)* **268**, 654-655.
- Rodieck, R.W. (1973) The vertebrate retina: Principles of structure and function. *W.H. Freeman*, San Francisco.
- Roska, B., Gaal, L., Werblin, F.S. (1998) Voltage-dependent uptake is a major determinant of glutamate concentration at the cone synapse: an analytical study. *J. Neurophysiol.* **80** (4): 1951-1960.
- Schaeren-Wiemers, N., Schaefer, C., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Schwab, M.E. (1995) Identification of oligodendrocyte- and myelin-specific glues by a differential screening approach. *J. Neurochem.* **65**: 10-22.
- Schmitt, A., Kugler, P. (1999) Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: non-radioactive in situ hybridisation and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience.* **92** (1): 293-308.
- Schmitt, A., Asan, E., Püschel, B., Kugler, P. (1997) Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J. Neurosci.* **17** (1): 1-10.
- Schmitt, A., Asan, E., Püschel, B., Jöns, T., Kugler, P. (1996) Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience.* **71** (4): 989-1004.
- Schmitt, A., Asan, E., Lesch, K.P., Kugler, P. (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience.* **109** (1): 45-61.
- Schnitzer, J. (1987) Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci. Lett.* **78**: 29-34.
- Schultz, K., Stell, W.K. (1996) Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci. Lett.* **211** (3): 191-194.

- Steinhäuser, C. (1993) Electrophysiologic characteristics of glial cells. *Hippocampus* **3**: 113-124.
- Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J., Meyer, H.G. (1990) The unlabelled antibody method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochaetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 315-333.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W. (1992) Structures, expression and functional analysis of a Na- dependent glutamate/ aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10955-10959.
- Tachibana, M., Okada, T., Arimura, K., Kobayashi, K., Piccolino, M. (1993) Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina. *J. Neurosci.* **13**: 2898-2909.
- Thoreson, W.B., Witkovsky, P. (1999) Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Progr. Ret. Eye Res.* **18**: 765-810.
- Weinrich, D., Hammerschlag, R. (1975) Nerve impulse-enhanced release of amino acids from non-synaptic regions of peripheral and central nerve trunks of bullfrog. *Brain Res.* **84**: 137-142.
- Zhao, J.W., Yang, X.L. (2001) Glutamate transporter EAAC1 is expressed on Müller cells of lower vertebrate retinas. *J. Neurosci. Res.* **66** (1): 89-95.

---

## Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. Kugler. Seiner fortwährenden geistigen wie auch praktischen Unterstützung, seinen manchmal kritischen und doch immer motivierenden Anregungen, seiner immensen Geduld und nicht zuletzt seinem eigenen Engagement und Beitrag ist es hauptsächlich zu verdanken, dass diese Arbeit in der hier vorliegenden Fassung möglich wurde.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. D. Drenckhahn.

Ein grosser Dank geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Anatomischen Institutes, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders danken möchte ich dabei Erna Kleinschroth, die mir während und auch nach meiner Labortätigkeit immer eine äusserst wertvolle und treue Unterstützung und Ansprechpartnerin war und mit welcher ich mich freundschaftlich verbunden fühle.

Ich danke meinem Freund Andreas Stäubli und meinem Bruder Thomas Beyer, die beide wesentlichen Anteil an der optischen Gestaltung dieser Arbeit haben und mir bei allen Herausforderungen mit dem Computer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herzlich danken möchte ich meiner Freundin Charlotte Hein, die mir mit Ihren Erfahrungen und praktischen Unterstützungen stets eine grosse Hilfe war und mit freundschaftlichem Nachhaken dazu beigetragen hat, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

*Zürich, im Juli 2004*  
*Astrid Beyer*

Astrid Beyer  
Lindenbachstrasse 52  
CH - 8006 Zürich

---

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Astrid Beyer
Wohnort	Lindenschachenstrasse 52, CH-8006 Zürich
geboren	01.09.1970 in Altenburg
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

01.09.1977 - 01.07.1987	Allgemeinbildende Oberschule Abschluß: Mittlere Reife
01.09.1987 - 01.07.1989	Erweiterte Oberschule Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## Berufsausbildung

01.09.1989 - 30.04.1993	Berufsfachschule für Krankenpflege Würzburg Ausbildung zur Krankenschwester
-------------------------	--

## Hochschulausbildung

01.11.1992	Beginn des Studiums der Medizin
13.09.1994	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung, Note gut (2,33)
29.08.1995	Bestehen des ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung, Note gut (2,0)
26.03.1998	Bestehen des zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung, Note gut (1,66)
28.04.1999	Bestehen des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung, Note gut (2,0) Gesamtnote gut (1,83)

---

---

## **Famulaturen**

März 1995	Pädiatrie, Kreiskrankenhaus Rudolf Virchow, Glauchau
Oktober 1995	Gynäkologie/Geburtshilfe, Vinzenz-Pallotti-Hospital Bensberg
August 1996	Innere Medizin, Fachklinik Lindenberg (Allgäu)
April 1997	Chirurgie, Juliusspital Würzburg
September 1997	Pädiatrie, Kinderarztpraxis Dr. med. H. Zoepffel, Würzburg

## **Praktisches Jahr**

20.04.1998 - 09.08.1998	PJ in der Inneren Medizin (Juliusspital Würzburg)
10.08.1998 - 30.09.1998	PJ in der Chirurgie (Chirurgische Universitätsklinik Würzburg)
01.10.1998 - 29.11.1998	PJ in der Chirurgie (Schweiz)
30.11.1998 - 21.03.1999	PJ in der Gynäkologie/Geburtshilfe (Universitäts-Frauenklinik Würzburg)

## **Studienbegleitende Tätigkeiten**

1992 – 1999	regelmässige Dienste als Krankenschwester in der medizinischen und chirurgischen Klinik des Juliusspital Würzburg
Wintersemester 1996	Assistentin für den Präparierkurs des Anatomischen Institutes der Universität Würzburg

## **Berufserfahrung**

01.06.1999 – 30.11.2000	Ärztin im Praktikum, Chirurgische Klinik, Kreiskrankenhaus Lindau
01.12.2000 – 30.11.2001	Assistenzärztin, Kinderchirurgische Klinik, Kantonsspital Luzern
Seit 01.12.2001	Assistenzärztin, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Spital Wetzikon

---



---

## **Dissertation**

November 1995

Beginn der Doktorarbeit bei Herrn  
Prof. Dr. med. P. Kugler am Institut für Anatomie  
und Zellbiologie der Universität Würzburg

Februar 2004

Abschluss und Einreichen der Dissertation

Juli 2004

Rigorosum

## **Freizeitaktivitäten**

Klassischer Gesang im Chor

lesen (zeitgenössische Literatur)

Sport treiben

Reisen

Zürich, im Juli 2004



Astrid Beyer