

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Anatomie II

Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

# **Lokalisation von hochaffinen Glutamattransportern in verschiedenen ZNS-Regionen der Maus**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Thorsten Smul**

aus Bayreuth

Würzburg, Februar 2005

Referent: Prof. Dr. med. P. Kugler

Korreferent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juni 2005

Der Promovend ist Arzt.

Gewidmet meinen Eltern.



## **I. Einleitung**

I.1 Allgemeine Bedeutung hochaffiner Glutamattransporter	1
I.2 Einteilung der hochaffinen Glutamattransporter	2
I.3 Transportzyklus und Stöchiometrie der hochaffinen Transporter	3
I.4 Struktur und Homologie der Transporterproteine	3
I.5 Gewebliche und zelluläre Verteilung hochaffiner Glutamattransporter	5
I.6 Fragestellung	6

## **II. Material und Methoden**

II.1 Tiere und Gewebepräparation	7
II.2 Antikörper	7
II.3 Western Blot-Analysen	8
II.4 Immunfluoreszenznachweise an Semidünnschnitten	9
II.5 Immun-alkalische Phosphatase- und Immunperoxidase-Nachweise an Kryostatschnitten	10

## **III. Ergebnisse**

III.1 Western Blot	11
III.2 Immunhistochemie	13
III.2.1 Immun-aP-Nachweise	13
III.2.2 Immunfluoreszenz-Nachweise	19

## **IV. Diskussion**

IV.1 Spezifität der Antikörper	28
IV.2 Regionale Verteilung der Glutamattransporter	28
IV.3 Zelluläre Verteilung der Glutamattransporter	30
IV.4 Klinische Bedeutung der Glutamattransporter	34

<b>V. Zusammenfassung</b>	37
---------------------------	----

<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	39
---------------------------------	----

## **I. Einleitung**

### **I.1 Allgemeine Bedeutung hochaffiner Glutamattransporter**

Die Aminosäure L-Glutamat ist der hauptsächliche exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS), der wahrscheinlich an den meisten Aspekten normaler Hirnfunktionen, einschließlich Kognition, Gedächtnis und Lernen, beteiligt ist. Darüberhinaus spielt Glutamat eine wichtige Rolle bei Synapseninduktion, Zellmigration und -differenzierung während der Entwicklung des ZNS (Fonnum, 1984; Ottersen und Storm-Matthisen, 1984; Collingridge und Lester, 1989; Headley und Griliner, 1990; Danbolt, 2001).

Hinsichtlich der Verteilung von Glutamat im ZNS ist festzustellen, dass der größte Teil intrazellulär vorliegt (Schousboe, 1981). Die extrazellulären Konzentrationen sind sehr niedrig und betragen etwa 1-4  $\mu\text{M}$ . Im Liquor cerebrospinalis sind etwa 10  $\mu\text{M}$  Glutamat enthalten (Lehmann et al., 1983; Hamberger und Nyström, 1984). Besonders hoch sind die Glutamatkonzentrationen in präsynaptischen glutamatergen Terminalen. Sie betragen im Zytoplasma ca. 10 mM und in synaptischen Vesikeln sogar bis zu 100 mM (Maycox et al., 1990; Südhof, 1995; Augustine et al., 1996; Ludger und Galli, 1998; Cousin und Robinson, 1999). Für die starke Glutamat-anreicherung in synaptischen Vesikeln sind niederaffine, vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT1 und 2) zuständig (Takamori et al., 2001; Kaneko et al., 2002). Bei glutamaterger Transmission erfolgt Exozytose von Glutamat in den synaptischen Spalt (Südhof, 1995; Augustine et al., 1996; Ludger und Galli, 1998; Cousin und Robinson, 1999). Dadurch steigt kurzfristig (d.h.  $< 100 \mu\text{sec}$ ) die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt von etwa 1  $\mu\text{M}$  bis auf 3 mM an (Almer und Tse, 1990).

Für die Beseitigung synaptisch freigesetzten Glutamats und damit für die Niedrighaltung der extrazellulären Glutamatkonzentration sind hochaffine Glutamattransporter zuständig, die in Neuronen (Kugler und Schmitt, 1999; Schmitt et al., 2002) und vor allem Gliazellen lokalisiert sind (Rothstein et al., 1994; Lehre et al., 1995; Danbolt, 2001).

Die neuronalen Transmissionsvorgänge erfordern eine rasche Beseitigung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt, die durch Diffusion bzw. zelluläre Wiederaufnahme mittels

hochaffiner Glutamattransporter erfolgt (Clements et al., 1996). Glutamattransporter sind vor allem im Nahbereich der Synapsen konzentriert und inaktivieren das synaptisch freigesetzte Glutamat im Bereich von Millisekunden, ohne den zeitaufwendigen Transportzyklus (ca. 60-80 ms; Wadiche et al., 1995) vollständig durchlaufen zu müssen (Tong und Jahr, 1994; Diamond und Jahr, 1997), da schon die Bindung des Transmitters an den Transporter weitere Rezeptorerregung verhindert (sog. schnelle Clearancephase). Dadurch werden die Transmission rasch beendet und eine neurotoxische Glutamatanreicherung im Extrazellularraum verhindert (Nicholls und Attwell, 1990; Lipton und Rosenberg, 1994).

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Konzentrationen von Glutamat um 100  $\mu\text{M}$  Degeneration oder Tod von Neuronen bewirken (Choi et al., 1987; Benveniste et al., 1984; McBean et al., 1985; Manev et al., 1989). Mögliche Ursachen für die neurotoxische Wirkung von Glutamat ist  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom durch spannungsabhängige Kanäle bzw. durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Sucher et al., 1991).

## **I.2 Einteilung der hochaffinen Glutamattransporter**

Hochaffine Glutamattransporter sind plasmamembranständig. Für sie hat sich der Begriff  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -abhängige Glutamattransporter oder "excitatory amino acid transporters" (=EAAT) etabliert. Weitere Glutamattransporter sind niederaffine und  $\text{Na}^+$ -unabhängige Transporter sowie Glutamat-Cystin-Austauscher, auf die hier nicht eingegangen werden soll (Erecinska und Silver, 1990; Balcar und Li, 1992).

Hochaffine  $\text{Na}^+$ -abhängige Transporter kommen in Zellmembranen vor allem von Neuronen und Gliazellen aber auch in vielen weiteren Zellen vor. Es konnten bisher die cDNAs von fünf unterschiedlichen Glutamattransporter-Subtypen kloniert werden: GLAST oder EAAT1 (Storck et al., 1992), GLT1 oder EAAT2 (Pines et al., 1992), EAAC1 oder EAAT3 (Kanai und Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995), EAAT5 (Arriza et al., 1997). Die Subtypen der hochaffinen Glutamattransporter zeigen Unterschiede in Struktur, Funktion, Zell- und Gewebeverteilung.

### **I.3 Transportzyklus und Stöchiometrie der hochaffinen Transporter**

Der Aufnahmeprozess wird von einem elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran getrieben (Billups et al., 1996; Zerangue und Kavanaugh, 1996; Levy et al., 1998). Natrium ist für die Glutamatbindung notwendig, während Kalium für den Transportvorgang an sich benötigt wird (Kanner und Sharon, 1978; Roskoski, 1979; Barbour et al., 1988; Sarantis und Attwell, 1990; Szatkowski et al., 1991). Untersuchungen über GLT1 und EAAC1 ergaben, dass drei Natriumionen und ein Proton mit einem Glutamatmolekül in die Zelle befördert werden, während ein Kaliumion die Zelle im Austausch verläßt (Wadiche et al., 1995; Zerangue und Kavanaugh, 1996; Eliasof und Jahr, 1996; Larsson et al., 1996). Der Transport ist in jedem Stadium reversibel und funktioniert in beiden Richtungen (Kanner und Marva, 1982). Untersuchungen von Klöckner legen die gleiche Stöchiometrie für GLAST nahe. (Klöckner et al., 1993)

Unter pathologischen Bedingungen, wenn der  $\text{Na}^+$ -Gehalt intrazellulär steigt (z. B. unter Ischämie), kann der Glutamattransport auch in umgekehrter Richtung ablaufen und toxische extrazelluläre Glutamatkonzentrationen zur Folge haben (Madl und Burgesser, 1993).

### **I.4 Struktur und Homologie der Transporterproteine**

Bei den Subtypen GLT1, GLAST und EAAC1 besteht zwischen 36 – 52 % Sequenzhomologie (Kanai et al., 1993; Arriza et al., 1997). Die verschiedenen Transporterproteine werden von unterschiedlichen Genen codiert, die auf verschiedenen Chromosomen bzw. Chromosomabschnitten liegen (GLAST: Stoffel et al., 1996; Takai et al., 1995; GLT1: Li und Francke, 1995; EAAC1: Smith et al., 1994).

Die Transporter weisen keine Verwandtschaft zu  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-Transporter (Guastella et al., 1990), Noradrenalin- (Pacholczyk et al., 1991), Dopamin-, 5-HT- (Kilty et al., 1991; Shimada et al., 1991), L-Glycin- (Smith et al., 1992), L-Prolin- (Freneau et al., 1992) und  $\text{Na}^+$ /Glukose-Transportern auf (Hediger et al., 1987; Wells et al., 1992).

Die Glutamattransporter besitzen mehrere Transmembrandomänen und intrazellulär liegende N- und C-Termini. Nach verschiedenen Modellvorstellungen besitzen die eukaryotischen Glutamattransporter zwischen sechs und zehn transmembranäre Domänen. Zwischen den Domänen drei und vier liegt eine Schleife im Extrazellularraum (Pines et al., 1992; Storck et al., 1992; Hediger und Kanai, 1994; Arriza et al., 1997). Die siebte Transmembrandomäne besitzt Bindungsstellen für Kalium- und Natriumionen (Zhang et al., 1998; Zerbiv et al., 1998). Grunewald et al. (1998) identifizierten eine von extrazellulär erreichbare, porenähnliche Region, die in der Nähe der noch unbekanntenen Bindungsstelle für Glutamat liegen soll (Grunewald et al., 2000, Zhang et al., 1999). Die Modellvorstellung nach Wahle und Stoffel (1996) beruht auf Untersuchungen an GLAST. Nach dieser Untersuchung besitzt GLAST insgesamt zehn Transmembrandomänen, die am Amino-Terminus  $\alpha$ -helikale Strukturen aufweisen. Die vier carboxyterminalen Membransegmente sind kürzer und besitzen eine  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die extrazelluläre Schleife liegt nach Wahle und Stoffel (1996) zwischen den Transmembranbereichen 9 und 10. Die Autoren schlagen diese Modellvorstellung für alle hochaffinen Glutamattransporter vor.

Die N- und C-Termini der Proteine weisen die stärksten Sequenzunterschiede und damit geringste Homologie auf. Deshalb wurden sie für die Herstellung von Peptid-Antikörpern verwendet (Storck et al., 1992; Tanaka et al., 1993a, b; Kirschner et al., 1994; Kanner et al., 1993; Bjørås et al., 1996).

Sechs bis acht mögliche Phosphorylierungsstellen sollen auf der Cytosolseite vorhanden sein. Darüberhinaus enthalten EAAC1, GLAST und GLT1 eine unterschiedliche Anzahl von potentiellen Glykosilierungsstellen. Dabei liegen zwei Glykosilierungsstellen bei allen hochaffinen Glutamattransportern in der extrazellulären Schleife in ähnlicher Position (Pines et al., 1992; Wahle und Stoffel, 1996). Die Transporterfunktion von EAAC1 scheint durch Glykosylierung beeinflusst zu werden (Ferrer-Martinez et al., 1995), während bei GLAST keine Unterschiede der Kinetik durch Glykosylierung gefunden wurden (Conradt et al., 1995).

Die Transportfunktion kann durch die reversible Bildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten verändert werden. Ohne Veränderung der Affinität bzw. bei konstanter

Michaeliskonstante ( $K_m$ ) wird die Transportgeschwindigkeit  $V_{max}$  erhöht. Umgekehrt vermindert sich die  $V_{max}$  bei Oxidation der Disulfidbrücken von EAAC1 (Trotti et al., 1997b). Auch wenn die verschiedenen Transporter eine unterschiedliche Anzahl von Cysteinresten enthalten, schließt dies eine Reaktionsmodulation durch Oxidation oder Reduktion nicht aus (Trotti et al., 1997a). Allerdings bleibt die Datenlage zur Regulierung der Funktion der drei Transportertypen zum Teil widersprüchlich und ist scheinbar auch abhängig vom untersuchten Zelltyp (Danbolt, 2001).

### **I.5 Gewebliche und zelluläre Verteilung hochaffiner Glutamattransporter**

Nach Northern Blot-Analysen, In situ-Hybridisierungs (ISH)- und immunocytochemischen Untersuchungen sind GLAST und GLT1 vor allem im ZNS aber auch im Knochengewebe (Mason et al., 1997; Huggett et al., 2002) nachweisbar. EAAC1 kommt sowohl im ZNS als auch in peripheren Geweben wie Darm, Niere, Leber, Skelett, Muskel und Herz vor (Kanai und Hediger, 1992; Velaz-Faircloth et al., 1996).

GLT1 gilt als glialer Transporter. Vor allem Astrozyten der grauen und weißen Substanz des gesamten ZNS enthalten GLT1. GLAST kommt im gesamten ZNS, vor allem jedoch in der Kleinhirnrinde vor (Rothstein et al., 1994; Schmitt et al., 1997; Takayasu et al., 2004) und wird nach bisherigen Untersuchungen in Astrozyten, Bergmann-Glia und Ependymzellen exprimiert (Rothstein et al., 1994; Lehre et al., 1995; Kugler und Schmitt, 1999).

EAAC1 ist in Neuronen (Kanai et al., 1995; Torp et al., 1997; Berger und Hediger, 1998), aber auch in Oligodendrozyten nachweisbar (Kugler und Schmitt, 1999). Die höchsten EAAC1-Konzentrationen, die jedoch bedeutend geringer als GLT1 und GLAST sind, wurden in der Hippocampusregion (CA1 bis CA4), in Cerebellum und Basalganglien gemessen (Haugeto et al., 1996; Danbolt, 2001). Die Pyramidenzellen des Ammonshorns, die Körnerzellen des Gyrus dentatus und Neurone der Schichten II-VI der Großhirnrinde enthalten EAAC1 (Kanai et al., 1995). Die zelluläre Verteilung von EAAC1 legt einen Zusammenhang mit glutamaterger Transmission nahe, wenngleich EAAC1 auch in den GABAergen Purkinjezellen des Kleinhirns gefunden wurde (Kanai et al., 1995). Die

subzelluläre Verteilung von EAAC1 ist nicht eindeutig geklärt (Kugler und Schmitt, 1999). Nach Rothstein (1994) und Furuta (1997) befindet sich EAAC1 in der Membran von Perikarya, Dendriten und im präsynaptischen Terminalbereich. Es wird aber auch postuliert, EAAC1 sei auf den somatodendritischen Bereich beschränkt (Shashidharan et al., 1997; Coco et al., 1997). Ferner sind auch vesikuläre Strukturen im Zytoplasma EAAC1-immunreaktiv (Conti et al., 1998; Kugler und Schmitt, 1999), was im Gegensatz zu den anderen ausschließlich membranständigen Glutamattransportern GLT1 und GLAST steht (Chaudhry et al., 1995).

Glutamattransporter sind über bestimmte Proteine am Cytoskelett verankert. Es wurden bereits bei verschiedenen Transportern wie GLAST und GLT1 proteinbindende Motive gefunden, die auf eine spezifische Positionierung an bestimmten Orten des Cytoskeletts und damit der Zellmembran hindeuten (Arriza et al., 1997; Marie und Attwell, 1999; Trotti et al., 1999).

## **I.6 Fragestellung**

In den vergangenen Jahren wurden genetisch modifizierte Mäuse erzeugt, bei denen jeweils das Gen für GLT1 (Tanaka et al., 1997), GLAST (Tsuru et al., 2002) und EAAC1 (Peghini et al., 1997) ausgeschaltet wurde. Das Studium dieser Knock-out-Mäuse dürfte neue Erkenntnisse über die Bedeutung einzelner Glutamattransporter liefern. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausschaltung von GLT-1 besonders schwerwiegende Folgen für diese Mäuse hat: die extrazelluläre Glutamatkonzentrationen sind erhöht, hippocampale Neurone degenerieren und die Tiere versterben frühzeitig an Krampfanfällen (Tanaka et al., 1997).

Da es bisher keine systematische Untersuchungen über die regionale und zelluläre Verteilung von Glutamattransportern im ZNS der Maus gibt, sollten entsprechende Untersuchungen über die Glutamattransporter GLT1, GLAST und EAAC1 im Vergleich zur Spezies Ratte, über die bisher die meisten Ergebnisse vorliegen, durchgeführt werden. Die Untersuchung erfolgte an Kleinhirn, Rückenmark und Hippocampus unter Einsatz von immunhistochemischen Methoden und Western Blot-Analysen.

## **II. Material und Methoden**

### **II.1 Tiere und Gewebepräparation**

Für die Untersuchung wurden 30 männliche Wildtyp-Mäuse (Stamm: C57BL/6, eigene Zucht) im Alter zwischen 6 und 8 Wochen und 30 männliche Wistar-Ratten im Alter von 8 bis 12 Wochen (Winkelmann GmbH, Borchon) verwendet. Die Tiere wurden mit Diethyläther narkotisiert und anschließend dekapitiert. Das Gehirn wurde rasch entnommen und bei 4° C präpariert. Nach Entfernung des Kleinhirns erfolgte die beidseitige Präparation des Hippocampus. Das cervikale Rückenmark wurde entnommen, nachdem die Wirbelbögen mit einer Federschere durchtrennt und entfernt worden waren. Die weitere Gewebepräparation wird in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

### **II.2 Antikörper**

Die Primärantikörper von Kaninchen waren Antikörper gegen C-terminale Peptide von GLT1, GLAST und EAAC1, deren Gewinnung und Charakterisierung in vorausgegangenen Untersuchungen beschrieben worden sind (Schmitt et al., 1996, 1997; Kugler und Schmitt, 1999). Zur Immunisierung wurden Peptide mit folgenden Aminosäuresequenzen verwendet: GLT1 554 – 573, GLAST 523-542, EAAC1 480-499. Diese Sequenzabschnitte der jeweiligen Transporter sind bei Ratte und Maus identisch (Storck et al., 1992; Tanaka et al., 1993; Kirschner et al., 1994; Kanner et al., 1993; Bjørås et al., 1996).

Vor Anwendung der Antikörper wurden diese zunächst folgendermaßen affinitätsgereinigt (Schmitt et al., 1997): Die synthetisch hergestellten Peptide wurden auf Nitrocellulosemembranen (Immobilon P von Millipore, Bedford) immobilisiert. Diese Membranen wurden dann in entsprechenden Seren von immunisierten Kaninchen inkubiert, um die spezifischen Antikörper an die Membran gebundenen Peptide binden zu lassen.

Die Ablösung der GLT1- und GLAST-spezifischen Antikörper von den Membranen erfolgte mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) durch Erwärmung auf 56°C (sog. Wärmeablösung). EAAC1-spezifische Antikörper wurden durch einen Citratpuffer mit pH 2,8 in Lösung gebracht (sog. Säureablösung) und dann sofort mit NaOH neutralisiert.

Durch photometrische Messungen (285 nm Wellenlänge) wurden die Antikörperkonzentrationen bestimmt (Drenckhahn et al., 1993) und nach Zusatz von 2% Ovalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 0,01 % Timerosal (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bei 4°C in PBS aufbewahrt.

### **II.3 Western Blot-Analysen**

100 mg frisch entnommenes Gewebe (Hippocampus, Kleinhirn, Rückenmark) wurde mit 1 ml Isolierpuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 5 µg/ml Aprotinin; 2 µg/ml Leupeptin; 2 µg/ml Pepstatin) versetzt und bei 4°C mit Hilfe eines Teflon-Pstill-Homogenisators nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert (1000 g; 10 min) und das Sediment verworfen. Um die Membran- und Zytosolfractionen zu trennen, wurde der 1000 g - Überstand bei 100.000 g zentrifugiert (4°C; 1 h). Anschließend wurde der Überstand und das in Isolierpuffer resuspendierte Pellet eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Der Proteingehalt in Überstand und Pellet wurde mit dem BioRad-Proteinassay (BioRad, München) bestimmt.

Zur Auftrennung der Proteingemische nach der relativen Molekülmasse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) mit einem 5%igen Sammelgel und 10%igen Trenngel durchgeführt. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden dann aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-C, Amersham) in einer mit Puffer gefüllten Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad, München) bei einer Spannung von 1,125 V/cm<sup>2</sup> über 3h transferriert (Towbin et al. 1979; Burnette, 1981). Nach Blocken der unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit 5% Magermilch erfolgte die Inkubation mit den affinitätsgereinigten Antikörpern (jeweils 1,8 µg/ml) bei 4°C für 12h. Die Membranen wurden dann mit PBS / Tween 0,05% gespült und mit HRP (horse-radish-peroxidase) konjugierten Antikaninchen-IgG vom Schwein (DAKO, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:3000 für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklung erfolgte nach weiteren Spülgängen mit Hilfe des „ECL detection reagents“ (Amersham, Braunschweig). Um die Spezifität der Antikörperreaktion nachzuweisen, wurden die affinitätsgereinigten Antikörper vor Inkubation mit einem

Überschuß der zur Immunisierung eingesetzten Peptide etwa 12 h bei 4°C vorinkubiert (sog. Präabsorption).

#### **II.4 Immunfluoreszenznachweise an Semidünnschnitten**

Für Immunfluoreszenznachweise wurden kleine Gewebestücke in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren, für 48 h gefriergetrocknet und in Quetol (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, USA) eingebettet (Kushida et al., 1982). Mit Hilfe eines Reichert Ultracuts E (Reichert-Jung, Wien, Österreich) wurden 1-2 µm dicke Semidünnschnitte hergestellt. Die Semidünnschnitte wurden auf Objektträger montiert und bei 70°C für 1-2 h getrocknet.

Um antigene Determinanten im Gewebeschnitt freizulegen, wurden die Plastikschnitte mit Natriummethanolat (Fluka, Taufkirchen) nach der von Maxwell (1978) beschriebenen Methode geätzt (Maxwell, 1978; Vidal et al., 1995). Nach Spülen der Schnitte mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 2% bovinem Serum-Albumin (BSA) und 10% normalem Ziegen Serum in PBS / Tween 0,05% (12 h; 4° C) abgesättigt.

Die Inkubation mit Primärantikörpern gegen GLT1, GLAST und EAAC1 erfolgte in einer feuchten Kammer (48 h; 4°C). Die affinitätsgereinigten Primärantikörper wurden an den Schnitten in einer Konzentration von 15 µg/ml eingesetzt. Nichtgebundene Antikörper wurden anschließend durch Spülung mit PBS entfernt. Als Zweitantikörper dienten Anti-Kaninchen-IgG-Cy3 von der Ziege (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:200 (Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur). Nach erneutem Spülen mit PBS wurde 1% n-Propylgallat (3,4,5-Trihydroxybenzolsäure n-Propylester) in 60%iger Glycerinlösung aufgetropft und die Schnitte mit Deckgläschen bedeckt. Nach Giloh und Sedat (1982) verzögert N-Propylgallat das Ausbleichen der Schnitte durch UV-Licht. Die Bewertung und Fotografie der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Olympus BH II-Fluoreszenzmikroskops (Olympus, New Hyde Park, NY, USA), ausgestattet mit einer Zeiss-Optik und geeigneten Filtern.

## **II.5 Immun-alkalische Phosphatase- und Immunperoxidase-Nachweise an Kryostat-schnitten**

Die Gewebe wurden in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren. In einem Kryostat der Firma Leitz (Nußloch) wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  2-10  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Plus-Objektträgern (Menzel, Braunschweig) montiert.

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 1 min mit 1% Formaldehyd (in PBS) und anschließend für 1 min mit Aceton behandelt. Sie wurden dann mit PBS / 0,05% Tween gespült. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer Blocklösung (s. oben) abgesättigt (12 h bei  $4^{\circ}\text{C}$ ).

Die Inkubation mit Primärantikörper gegen GLUT1, GLAST und EAAC1 fand in einer feuchten Kammer statt (48 h bei  $4^{\circ}\text{C}$ ). Nach Spülen der Schnitte mit PBS wurde der Primärantikörper mit zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen:

a) Bei der Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Methode (Sternberger et al., 1970) wurden die Schnitte zuerst mit dem Zweitantikörper (Anti-Kaninchen IgG vom Schwein; 1h bei Raumtemperatur) und nach kurzem Spülen der Schnitte in PBS mit dem PAP-Komplex (DAKO, Hamburg) (1h bei Raumtemperatur) inkubiert. Diamaminobezidin (DAB) (DAKO, Hamburg) in einer Konzentration von 0,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diente als Substrat der Peroxidasereaktion, die nach 30 - 40 min durch Spülen mit Aqua dest. gestoppt wurde.

b) Die Schnitte wurden mit alkalischer Phosphatase (aP)-markierten Zweitantikörpern (1:100, DAKO) inkubiert (1h bei Raumtemperatur) und mit Hilfe des aP-Detektionsmediums nachgewiesen. Das aP-Detektionsmedium (Asan und Kugler, 1995) bestand aus 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat, 0.4 mM Tetranitroblau-Tetrazoliumchlorid und 5 mM Tetramisol. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Chromogens erfolgte die Inkubation im Dunkeln.

15 bis 20 Schnitte verschiedener Tiere wurden verglichen und bewertet. Es wurde zwischen nicht-reaktiv, schwach, mittel und stark unterschieden. Die aP-Nachweise wurden zur Dokumentation der Ergebnisse verwendet.

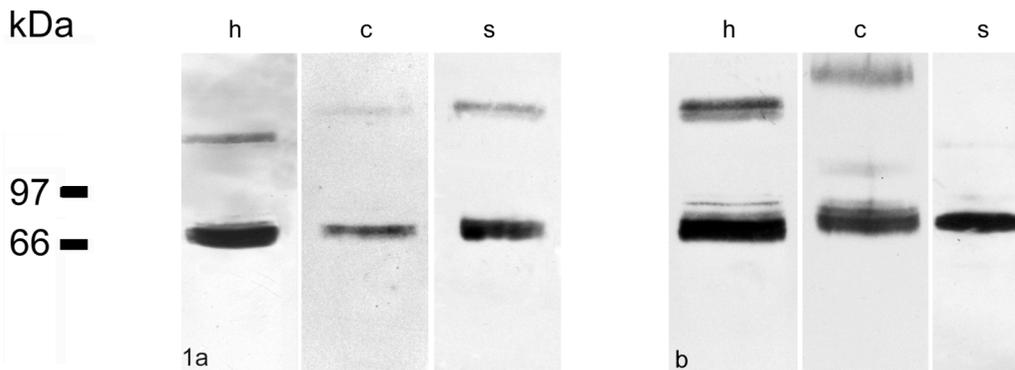
### III. Ergebnisse

#### III.1 Western Blot

Die Proteinfractionen von Hippocampus-, Kleinhirn- und Rückenmarkhomogenaten wurden mittels 10% SDS-PAGE getrennt. Nach Präabsorption der Primärantikörper mit den entsprechenden synthetischen Peptiden waren im Western Blot keine Proteinbanden darstellbar (nicht dokumentiert). Die drei untersuchten Glutamattransporter waren nur im 100.000g Pellet (Membranfraktion) nachweisbar. In der Cytosolfraction gelang kein Nachweis, so dass sich die folgenden Beschreibungen auf die Membranfraktion beziehen.

#### GLT1

Mit den affinitätsgereinigten Antikörpern war in allen untersuchten ZNS-Regionen in Höhe von etwa 70 kDa eine Bande bei Maus und Ratte nachweisbar (Abb. 1). Bei beiden Spezies ergab der Hippocampus die stärkste Immunreaktion, gefolgt von Kleinhirn und Rückenmark. Höhermolekulare Aggregate (>97 kDa) von GLT1 waren in unterschiedlicher Ausprägung nachweisbar.



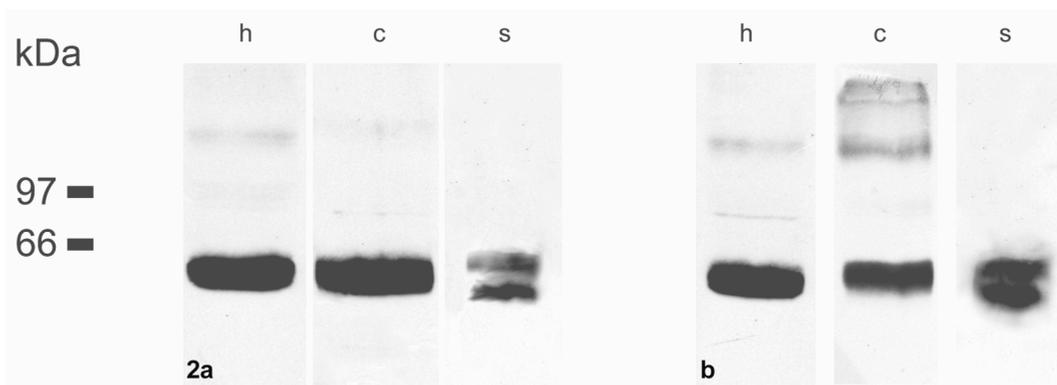
**Abb.1:** Western Blot-Analyse (10% SDS-PAGE) verschiedener ZNS-Regionen von Maus (a) und Ratte (b) mit affinitätsgereinigtem GLT1-Antikörper. Verwendet wurde die Membranfraktion (100.000g - Pellet) der Gewebemomogenate. Je Spur wurden folgende Proteinmengen in 15 µl Probenpuffer aufgetragen: Hippocampus (h) 50 µg, Kleinhirn (c) 75 µg, Rückenmark (s) 75 µg. Der GLT1-Antikörper markiert eine Bande bei ~70 kDa und höhermolekulare GLT1-Aggregate (> 97kDa).

## GLAST

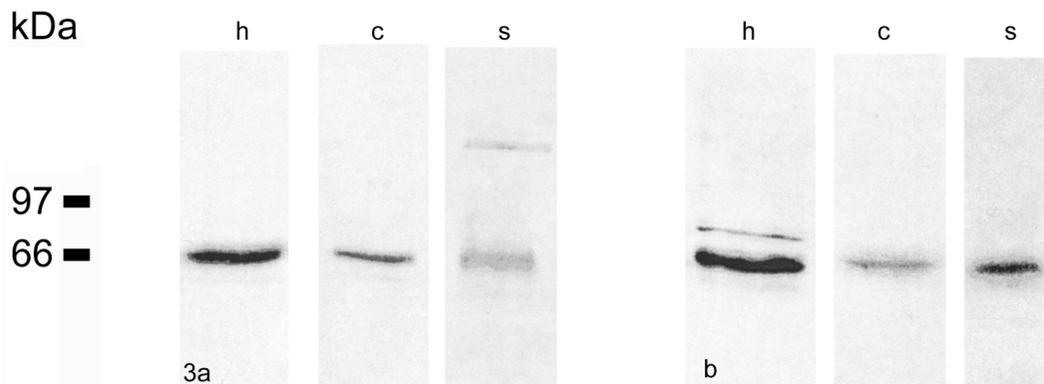
Mit dem affinitätsgereinigten Antikörper war in Höhe von etwa 65 kDa bei allen untersuchten ZNS-Regionen von Maus und Ratte eine Bande nachweisbar (Abb. 2). Kleinhirn und Hippocampus-Banden beider Spezies reagierten stärker als die des Rückenmarks.

## EAAC1

Mit dem affinitätsgereinigten Antikörper war in Höhe von etwa 64 kDa bei allen untersuchten ZNS-Regionen eine Bande nachweisbar (Abb. 3). Bei beiden Spezies reagierte die Hippocampus-Bande deutlich stärker als die Kleinhirn- und Rückenmark-Banden.



**Abb.2:** Western Blot-Analyse (10% SDS-PAGE) verschiedener ZNS-Regionen von Maus (a) und Ratte (b) mit affinitätsgereinigtem GLAST-Antikörper. Verwendet wurde die Membranfraktion (100.000g - Pellet) der Gewebemomogenate. Je Spur wurden folgende Proteinmengen in 15  $\mu$ l Probenpuffer aufgetragen: Hippocampus (h) 50  $\mu$ g Protein, Kleinhirn (c) 75  $\mu$ g, Rückenmark (s) 75  $\mu$ g. Der GLAST-Antikörper markiert eine Bande bei ~65 kDa.



**Abb.3:** Western Blot-Analyse (10% SDS-PAGE) verschiedener ZNS-Regionen von Maus (a) und Ratte (b) mit affinitätsgereinigtem EAAC1-Antikörper. Verwendet wurde die Membranfraktion (100.000g - Pellet) der Gewebemomogenate. Je Spur wurden folgende Proteinmengen in 15  $\mu$ l Probenpuffer aufgetragen: Hippocampus (h) 50  $\mu$ g Protein, Kleinhirn (c) 75  $\mu$ g, Rückenmark (s) 75  $\mu$ g. Der EAAC1-Antikörper bindet an eine Bande bei ~64 kDa.

## III.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Nachweise erfolgten mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen GLUT1, GLAST und EAAC1 an Schnitten von Hippocampus, Kleinhirn und Rückenmark. Die regionalen Verteilungsmuster wurden an etwa 10 µm dicken Kryostatschnitten mit Hilfe von Immun-aP- und PAP-Nachweisen ermittelt. Da beide Methoden zu identischen Ergebnissen führten, werden nur die Ergebnisse beim Immun-aP-Nachweis beschrieben und dokumentiert. Mit diesen Methoden ist eine zelluläre Zuordnung der Immunreaktion meist nicht eindeutig möglich. Die für eine zelluläre Untersuchung notwendige höhere Auflösung wurde durch Immunfluoreszenz an Plastik-Semidünnschnitten erzielt. Beim Vergleich der untersuchten ZNS-Regionen ergaben sich zwischen Maus und Ratte keine Unterschiede in der Verteilung von GLUT1, GLAST und EAAC1. Deshalb werden im Folgenden nur die Ergebnisse bei der Maus beschrieben und dokumentiert. Die Ergebnisse über die Verteilung von GLUT1, GLAST und EAAC1 sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

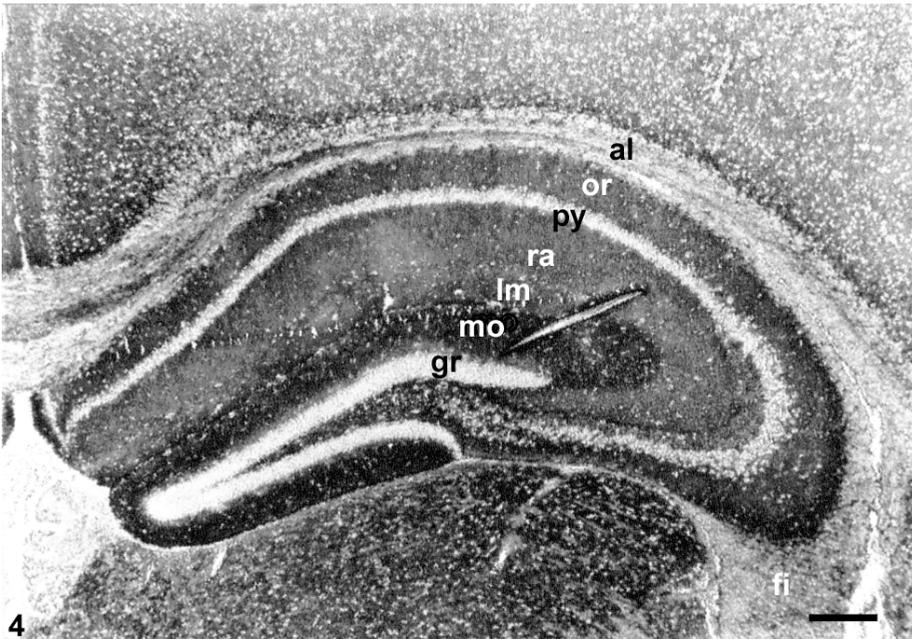
### III.2.1 Immun-aP-Nachweise

#### GLUT1

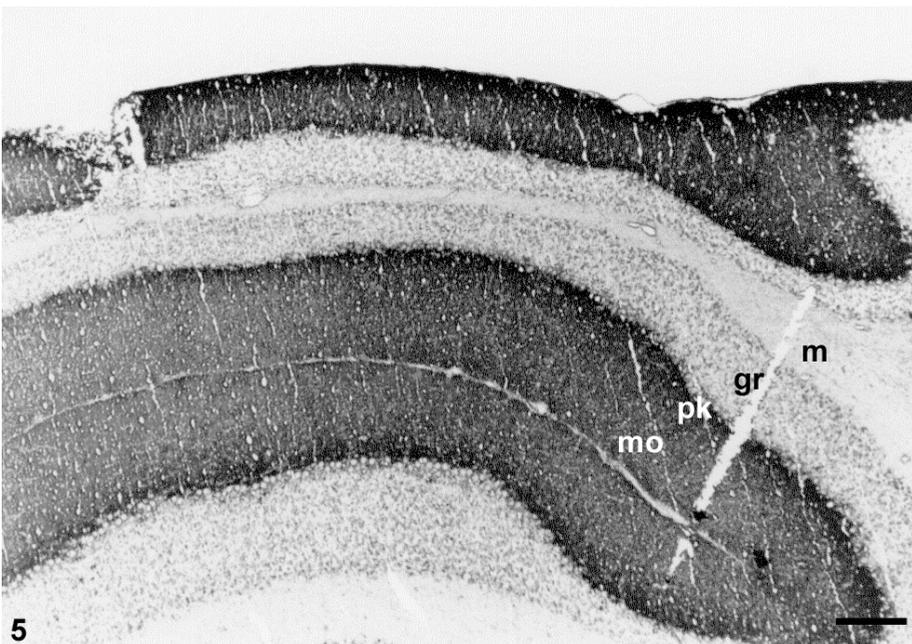
**Hippocampus.** Die einzelnen Schichten im Hippocampus waren unterschiedlich stark immunreaktiv (Abb. 4). Die äußeren zwei Drittel des Stratum moleculare und das Hilum des Gyrus dentatus, das Str. lacunosum-moleculare und Stratum oriens des Ammonshorns reagierten stark. Das Stratum radiatum des Ammonshorns und das innere Drittel des Stratum moleculare des Gyrus dentatus waren überwiegend mittelstark positiv. Alveus einschließlich Fimbrie (weiße Substanz) reagierten schwach, während das Stratum pyramidale des Ammonshorns sowie das Stratum granulosum des Gyrus dentatus nicht immunreaktiv waren (Abb. 4).

**Kleinhirn.** Das Str. moleculare reagierte sehr stark GLUT1-positiv, das Str. purkinjense mittelstark und das Str. granulosum schwach. Das Mark ergab keine Immunreaktion (Abb. 5).

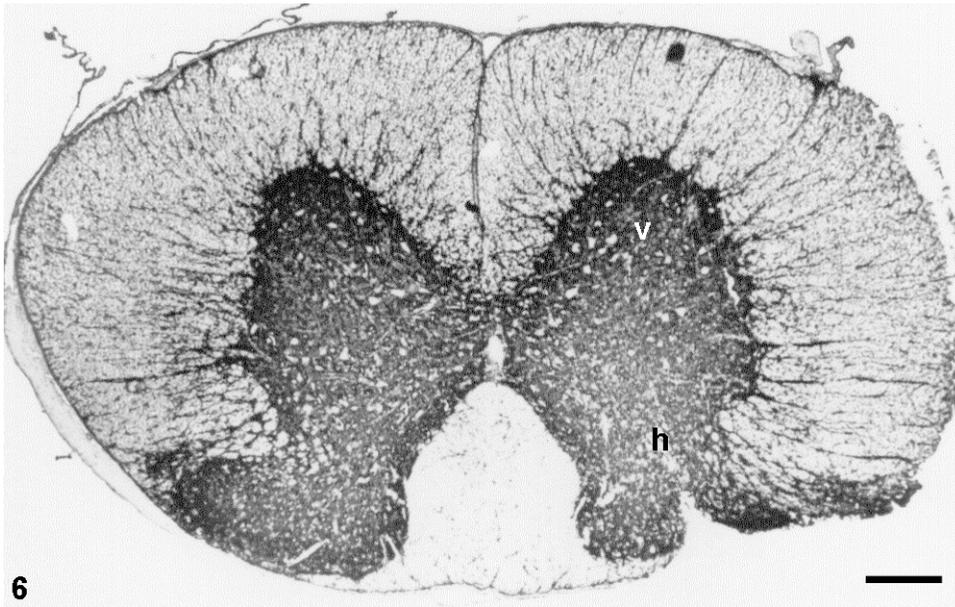
**Rückenmark.** Während die weiße Substanz nur schwach GLUT1-positiv reagierte, war die Immunreaktion im Bereich der grauen Substanz mittelstark bis stark (Abb. 6).



**Abb. 4:** Nachweis von GLT1 im Hippocampus der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 µm dicker Kryostatschnitt). Übersichtsaufnahme des Hippocampus. Stratum oriens (or) und Str. lacunosum-moleculare (lm) des Ammonshorns sowie die äußeren zwei Drittel des Str. moleculare (mo) und das Hilum des Gyrus dentatus weisen eine starke Immunreaktion auf. Str. pyramidale (py) und Str. granulosum (gr) reagieren negativ. Str. radiatum (ra), Alveus (al), Fimbrie (fi). Balken: 250 µm.



**Abb. 5:** Nachweis von GLT1 im Kleinhirn der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 µm dicker Kryostatschnitt). Übersichtsaufnahme des Kleinhirns. Str. moleculare (mo), Str. granulosum (gr), Str. purkinjense (pk), Mark (m). Balken: 250 µm



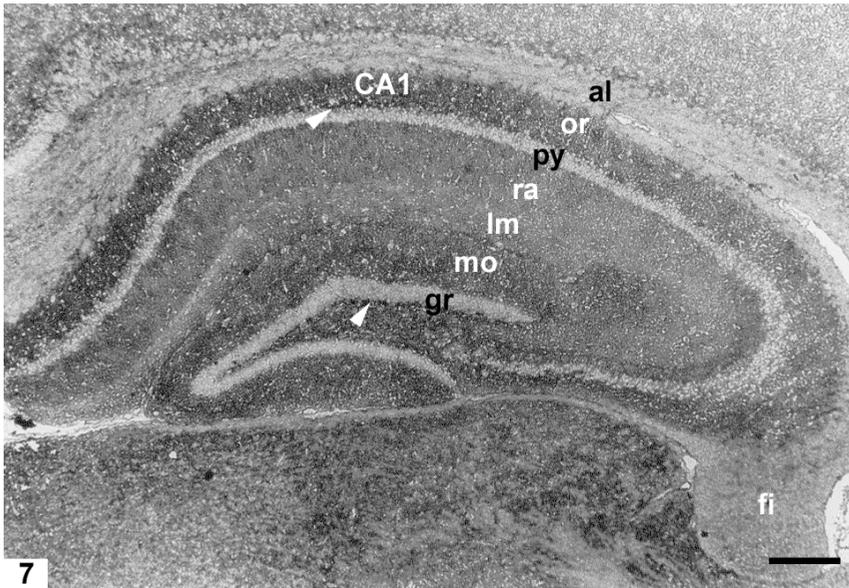
**Abb. 6:** Nachweis von GLT1 im Rückenmark der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 µm dicker Kryostatschnitt). Übersichtsaufnahme. Vorderhorn (v), Hinterhorn (h). Balken: 250 µm

## GLAST

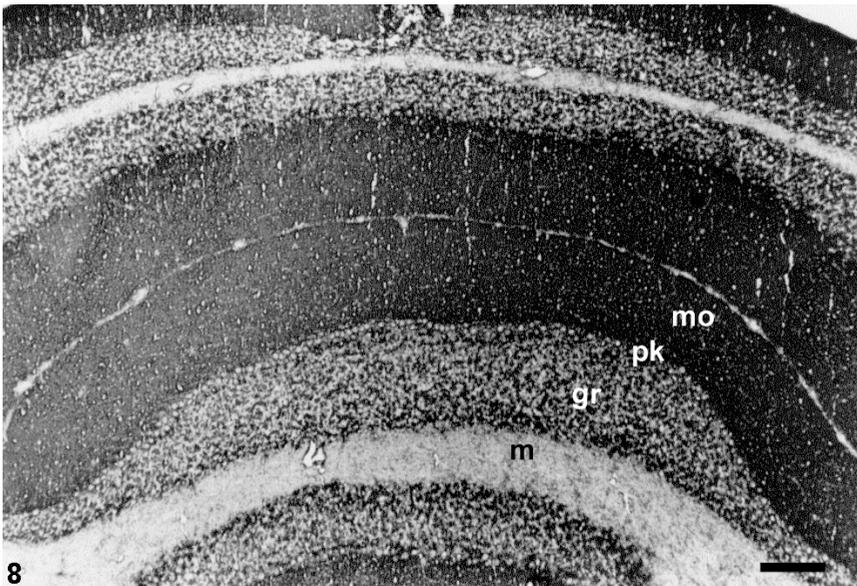
**Hippocampus.** Abbildung 7 zeigt das regionale Verteilungsmuster von GLAST im Hippocampus. Stratum moleculare, Str. lacunosum-moleculare und Str. oriens reagierten mittelstark, während das Str. radiatum im Vergleich dazu schwächer immun-positiv war. In Hilum des Gyrus dentatus und Str. pyramidale des Ammonshorns, insbesondere im Sektor CA1, reagierte das Neuropil in unmittelbarer Umgebung der Neurone stärker als die übrigen Schichtenabschnitte. Die schwächste Reaktion ergaben Alveus und Fimbrie.

**Kleinhirn.** Die GLAST-Immunreaktion war im Str. moleculare des Keinhirns sehr stark, im Str. purkinjense und Str. granulosum mittelstark. Das Mark ergab keine Immunreaktion (Abb. 8).

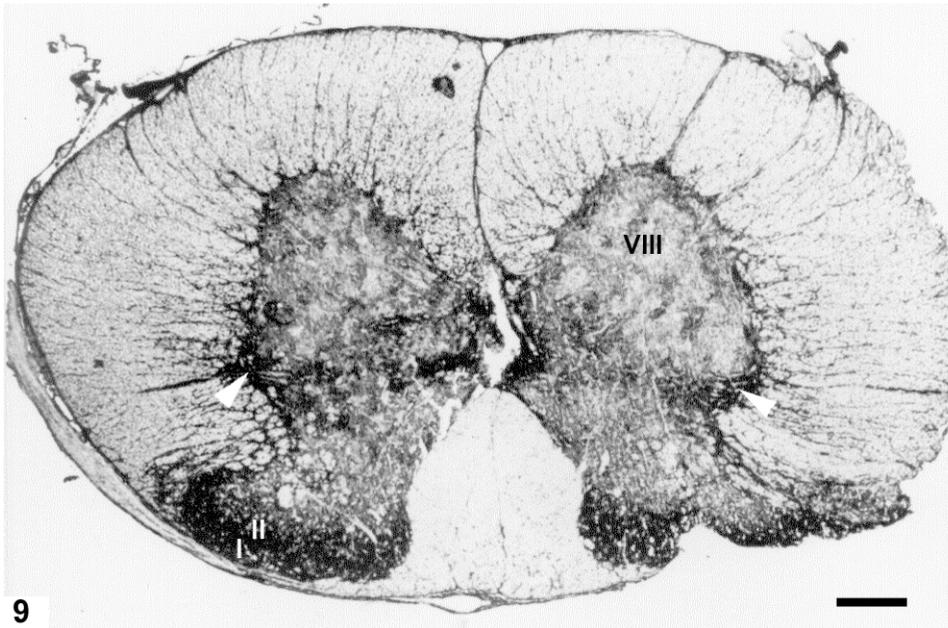
**Rückenmark.** Während die weiße Substanz nur schwach GLAST-positiv reagierte, war die Immunreaktion im Bereich der grauen Substanz im Bereich der Laminae I, II und der Intermediärzone (Nucleus intermediolateralis) stark. Die anderen Bereiche der grauen Substanz waren mittelstark immunreaktiv. Die motorischen Kerne in der Lamina VIII des Vorderhorns waren schwach reaktiv (Abb. 9).



**Abb. 7:** Nachweis von GLAST im Hippocampus der Maus mittels Immun-aP-Nachweises (10 µm dicker Kryostat-schnitt). Übersichtsaufnahme des Hippocampus. Das Neuropil in der Umgebung der Pyramidenzellschicht (py) im Sektor CA1 des Ammonshorns und direkt unter den Körnerzellen des Gyrus dentatus (Pfeilspitzen) zeigt eine starke Immunreaktion. Stratum moleculare (mo), Str. oriens (or), Str. lacunosum-moleculare (lm), Str. radiatum (ra), Alveus (al) und Fimbrie (fi). Balken: 250 µm



**Abb. 8:** Nachweis von GLAST im Kleinhirn der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 µm dicker Kryostat-schnitt). Übersichtsaufnahme des Kleinhirns. Str. moleculare (mo), Str. purkinjense (pk), Str. granulosum (gr). Das Mark (m) ist schwach reaktiv. Balken: 250 µm



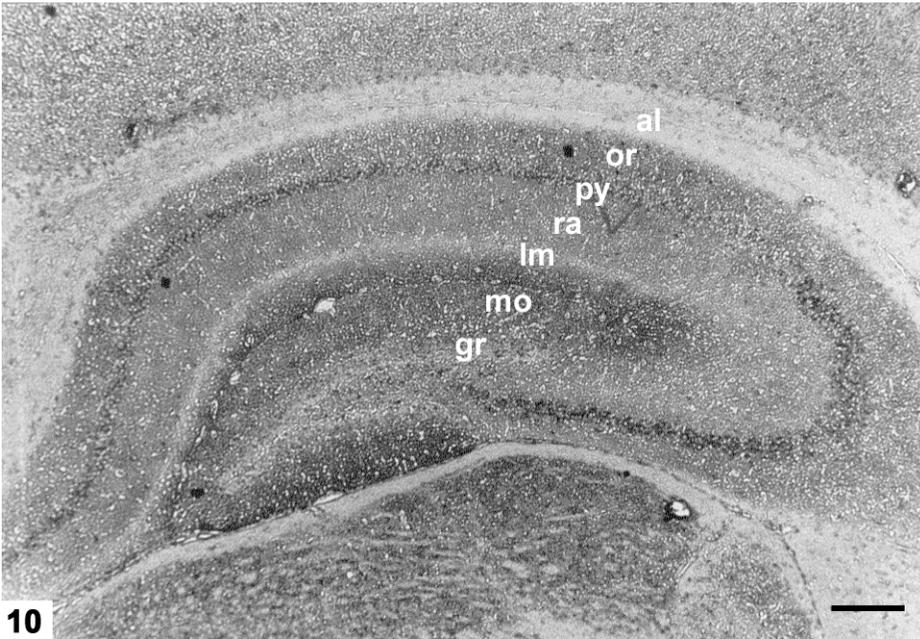
**Abb. 9:** Nachweis von GLAST im Rückenmark der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 µm dicker Kryostatschnitt). Übersichtsaufnahme des Rückenmarks. Lamina I und II des Hinterhorns zeigen eine starke Immunreaktion. Die motorischen Kerne in der Lamina VIII des Vorderhorns sind schwach reaktiv. Die Pfeile markieren die Intermediärzone (Nucleus intermediolateralis). Balken: 250 µm

## EAAC1

**Hippocampus.** Das neuronendichte Stratum pyramidale ergab eine starke Immunreaktion. Str. granulosum, Str. moleculare und Str. lacunosum-moleculare reagierten mittelstark, Str. oriens und Str. radiatum nur schwach. Alveus und Fimbrie ergaben keine Reaktion (Abb. 10).

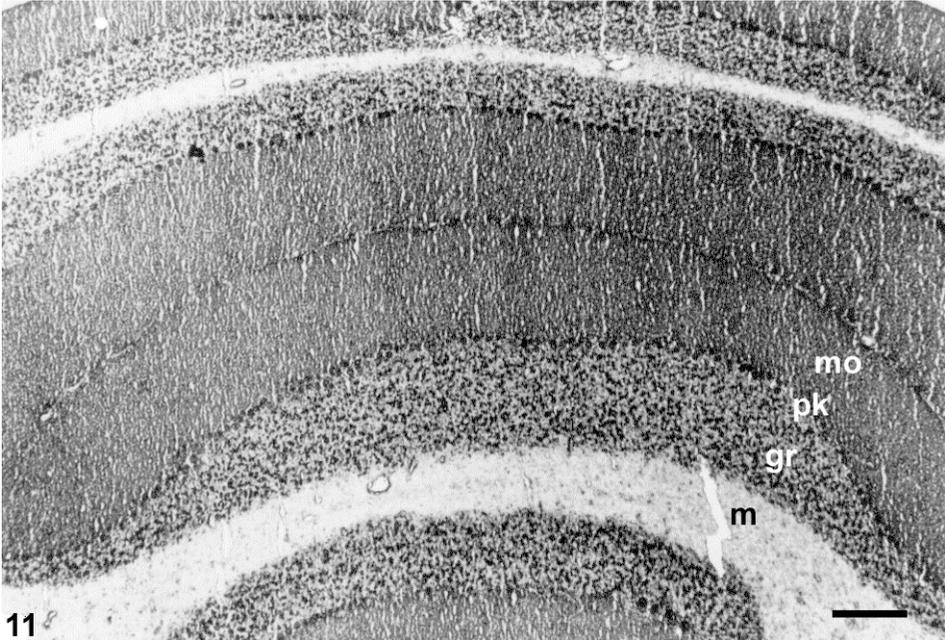
**Kleinhirn.** Im Str. purkinjense waren Purkinje-Zellen sehr stark EAAC1-positiv. Str. moleculare und Str. granulosum reagierten demgegenüber mittelstark positiv. Im Mark war keine Reaktion sichtbar (Abb. 11).

**Rückenmark.** In Kryostatschnitten des Rückenmarks zeigte die weiße Substanz nur eine schwache Immunreaktion. In Vorder- und Hinterhorn war diese mittelstark (Abb. 12), wobei in diesen stark immunreaktive Moto- bzw. Interneurone nachweisbar waren.



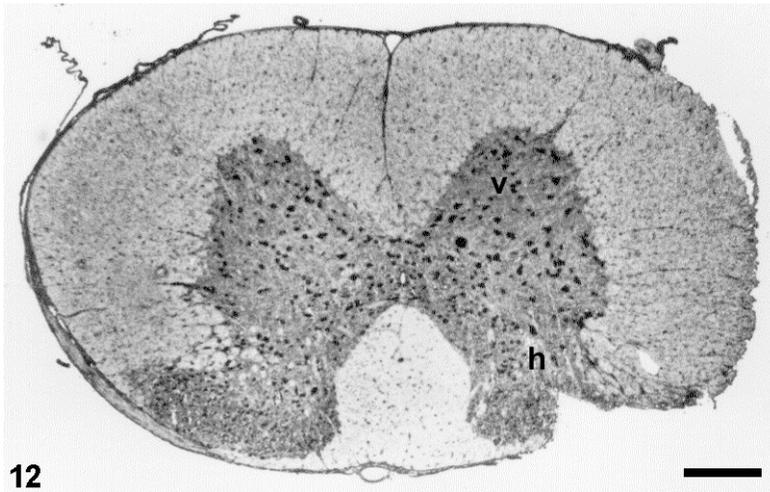
10

**Abb. 10:** Nachweis von EAAC1 im Hippocampus der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 μm dicker Kryostatschnitt). Übersichtsaufnahme des Hippocampus. Str. moleculare (mo) und Str. granulosum des Gyrus dentatus. Str. lacunosum-moleculare (lm), Str. radiatum (ra), Stratum oriens (or) und Alveus (al) des Ammonshorns. Balken: 250 μm



11

**Abb.11:** Nachweis von EAAC1 im Kleinhirn der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 μm dicker Kryostatschnitt). Übersichtsaufnahme des Kleinhirns. Str. moleculare (mo), Str. purkinjense (pk), Str. granulosum (gr), Mark (m). Balken: 250 μm



**Abb. 12:** Nachweis von EAAC1 im Rückenmark der Maus mittels Immun-aP-Nachweis (10 µm dicker Kryostatschnitt). Übersichtsaufnahme. Vorderhorn (v) und Hinterhorn (h) mit EAAC1-positiven Neuronen. Balken: 250 µm

### III.2.2 Immunfluoreszenz-Nachweise

Die einzelnen Schichten in Hippocampus, Kleinhirn und Rückenmark waren unterschiedlich stark immunreaktiv. Die regionalen Verteilungsmuster von GLUT1, GLAST und EAAC1 bei Immunfluoreszenz-Nachweisen entsprachen weitgehend den Ergebnissen der Immun-aP- und PAP-Nachweise. Das höhere Auflösungsvermögen bei den Immunfluoreszenznachweisen an Plastik-Semidünnschnitten ermöglichte jedoch eine Untersuchung der Präparate auf zellulärer Ebene.

#### GLT1

Astrozyten waren in allen untersuchten ZNS-Bereichen stark GLUT1-positiv. Neurone, u.a. Purkinje-, Pyramidenzellen und Motoneurone waren von stark immunpositiven Astrozytenfortsätzen umgeben, wobei weder die Zellmembran noch das Cytosol der Neurone eine Immunreaktion aufwies.

**Hippocampus.** Die äußeren zwei Drittel des Str. moleculare des Gyrus dentatus sowie das Str. lacunosum-moleculare und Str. oriens des Ammonshorns reagierten stark. Das Str. radiatum des Ammonshorns und das innere Drittel des Str. moleculare des Gyrus dentatus waren mittelstark positiv. Die weiße Substanz (Alveus und Fimbrie) reagierten schwach.

Str. pyramidale des Ammonshorns sowie das Str. granulosum des Gyrus dentatus waren nicht immunreaktiv.

Zwischen den negativ reagierenden Pyramidenzellen lagen fortsatzähnliche, immunpositive Profile, bei denen es sich vermutlich um astrozytäre Fortsätze handelte. Das Str. oriens wies ein dichtes Filzwerk von GLT1-positiven Zellfortsätzen mit einzelnen reaktionsfreien Zellen, vermutlich Neuronen, auf (Abb.13).

**Kleinhirn.** Im Mark waren vereinzelte GLT-1-positive Zellfortsätze nachweisbar. Dabei handelte es sich vermutlich um Astrozytenfortsätze. Auch das dichte Netzwerk immunreaktiver Fortsätze in der Körnerzellschicht wurde vermutlich von Astrozyten gebildet. Die Neurone waren reaktionsfrei (Abb. 14).

**Rückenmark.** Die weiße Substanz zeigte vereinzelte immunreaktive, vermutlich astrozytäre Zellfortsätze. Im Bereich der grauen Substanz konnten wir immunnegative Neurone, aufgrund der Größe wahrscheinlich Motoneurone, umgeben von einer Vielzahl GLT1-positiver Zellfortsätze nachweisen (Abb. 15 und 16).

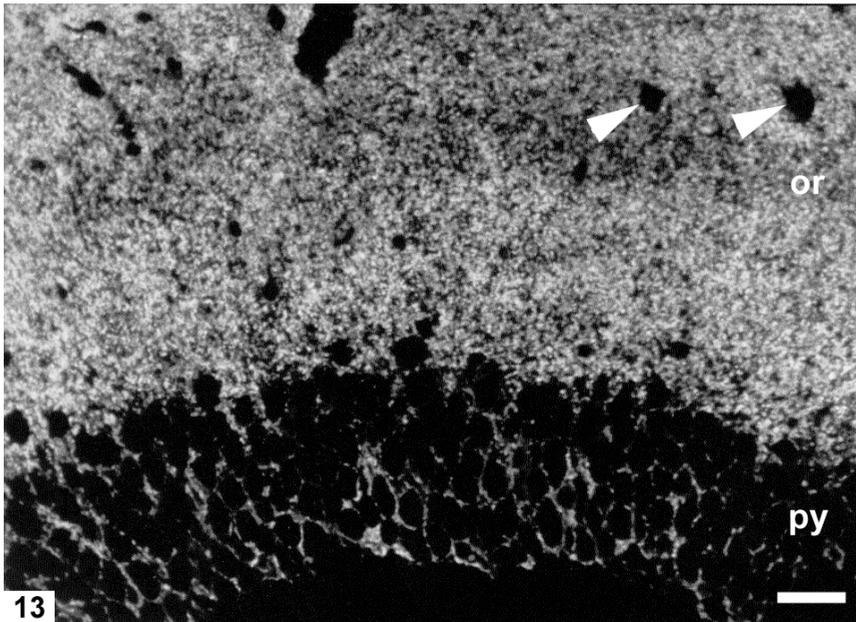
## **GLAST**

Die Zellmembranen von Astrozyten reagierten in allen untersuchten ZNS-Regionen GLAST-positiv, die von Neuronen insgesamt GLAST-negativ.

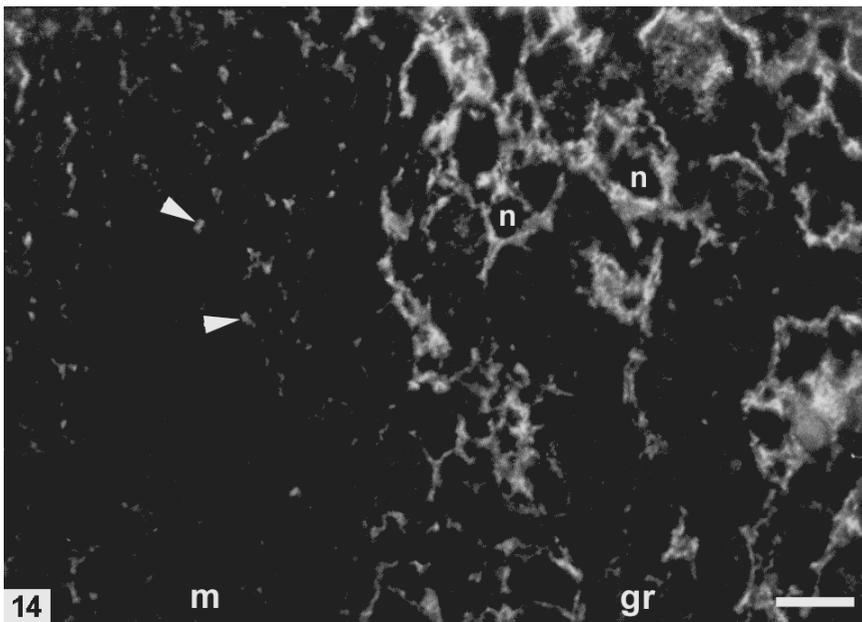
**Hippocampus.** In Hilum des Gyrus dentatus und Str. pyramidale des Ammonshorns, insbesondere im Sektor CA1, reagierte das Neuropil in unmittelbarer Umgebung der Pyramidenzellen deutlich stärker als in anderen Schichtabschnitten (Abb 17).

**Kleinhirn.** Die vermutlich glialen Fortsätze sowohl im Str. moleculare, als auch im Str. granulosum wiesen eine starke GLAST-Immunreaktion auf. Die Fortsätze bildeten im Str. moleculare ein dichtes Filzwerk. Im Str. granulosum umgaben die GLAST-positiven Fortsätze die immun-negativen Körnerzellen. Das Mark war bis auf vereinzelte immun-positiv reaktive Zellen reaktionsfrei.

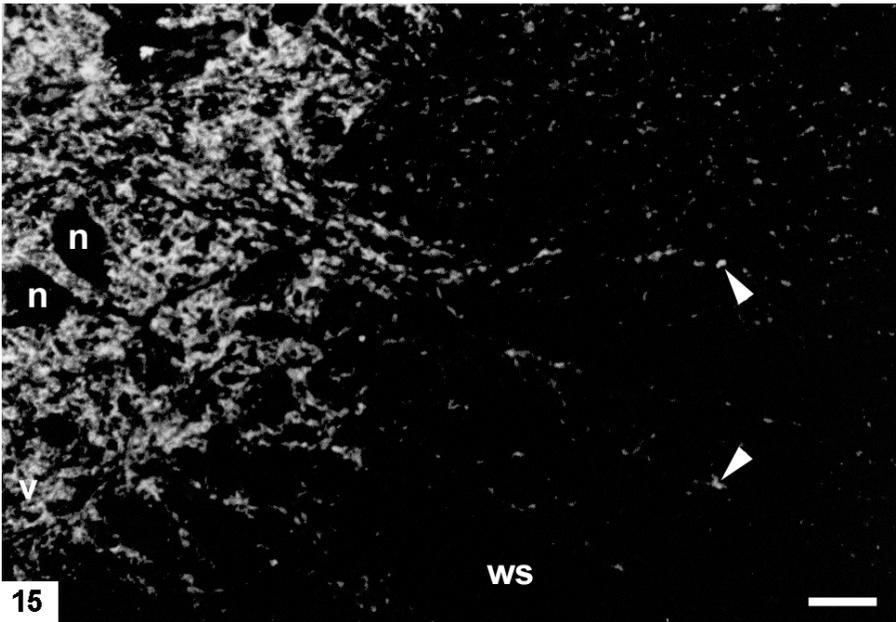
**Rückenmark.** Im Bereich der grauen Substanz lagen immunnegative  $\alpha$ -Motoneurone vor, die von GLAST-positiven Zellfortsätzen umgeben waren. Die weiße Substanz zeigte nur vereinzelte immunreaktive, vermutlich astrozytäre Zellfortsätze.



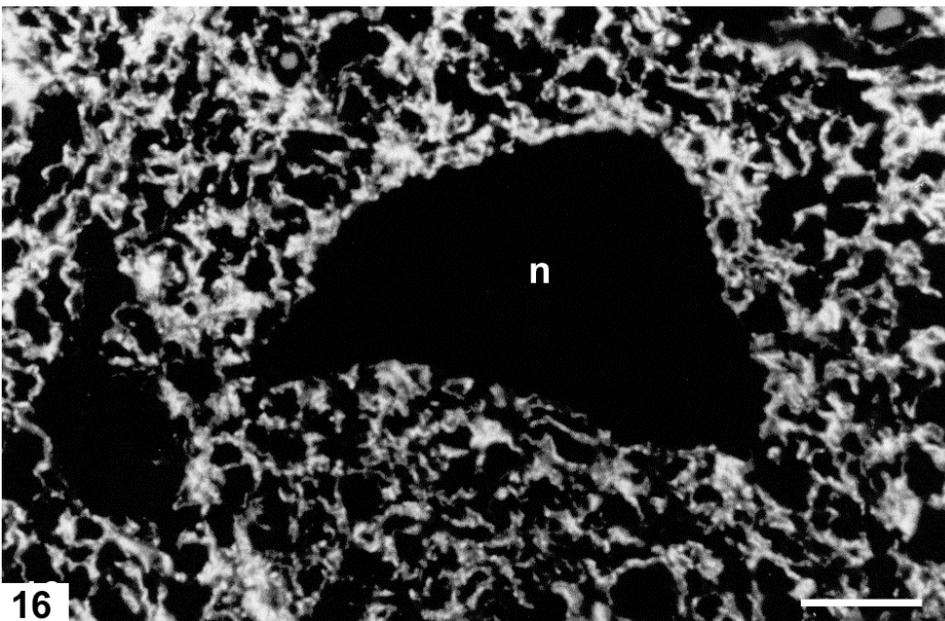
**Abb. 13:** Nachweis von GLT1 im Hippocampus der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitt). Stratum oriens (or) mit einem dichten Filzwerk von GLT1-positiven, vermutlich astrozytären, Fortsätzen. Im Stratum pyramidale (py) sind Neurone lokalisiert, die von GLT1-positiven Astrozytenfortsätzen umgeben werden. Einzelne reaktionsfreie Zellen sind im Str. oriens zu beobachten (Pfeilspitzen). Dabei handelt es sich vermutlich um Interneurone. Balken: 20  $\mu$ m



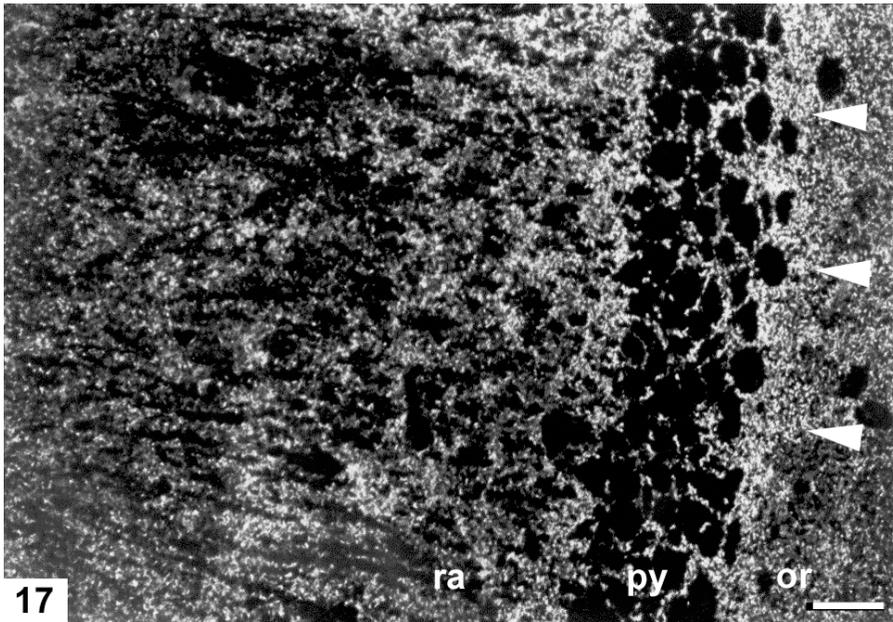
**Abb. 14:** Nachweis von GLT1 im Kleinhirn der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitt). Str. granulosum (gr) mit einem dichten Netzwerk von GLT1-positiven, vermutlich astrozytären Fortsätzen und immunnegativen Neuronen (n). Im Mark (m) sind vereinzelte GLT1-positiv Astrozytenfortsätze sichtbar (Pfeilspitzen). Balken: 20  $\mu$ m



**Abb. 15:** Nachweis von GLUT1 in Vorderhorn und anschließender weißen Substanz des Rückenmarks der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitt). Die GLUT1-positiven, vermutlich astrozytären Fortsätze umgeben die immunnegativen  $\alpha$ -Motoneurone (n) der grauen Substanz mit einem dichten Netzwerk. In der weissen Substanz (ws) reagieren vereinzelte Astrozytenfortsätze zwischen den Nervenbahnen GLUT1-positiv (Pfeilspitzen). Balken: 20  $\mu$ m



**Abb. 16:** Nachweis von GLUT1 im Vorderhorn (v) des Rückenmarks der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitt). Ein immunnegatives  $\alpha$ -Motoneurone (n) umgeben von einem immunpositiven, dichten Netzwerk vermutlich astrozytärer Zellfortsätze. Balken: 10  $\mu$ m

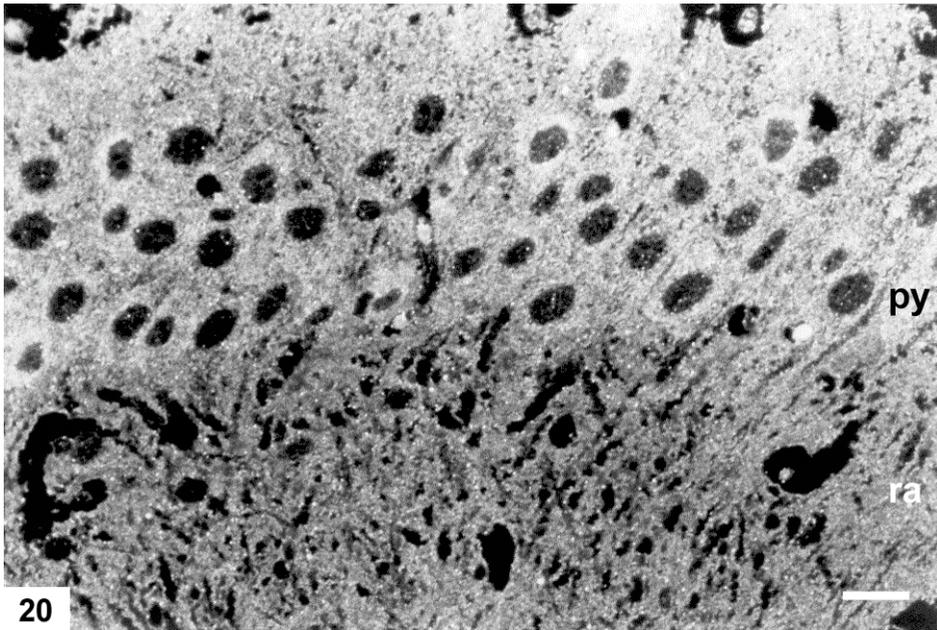
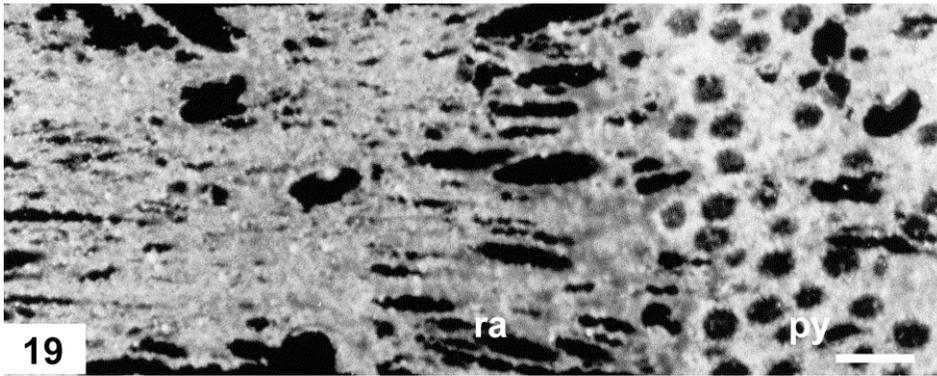


**Abb. 17:** Nachweis von GLAST im Hippocampus der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitt). Im Stratum oriens (or) und Stratum radiatum (ra) von Sektor CA1 bilden eine Vielzahl von GLAST-positiven astrozytären Fortsätzen ein dichtes Filzwerk. Die negativ reagierenden Neurone in Stratum pyramidale (py) werden von GLAST-positiven Astrozytenfortsätzen umgeben. Pfeilspitzen weisen auf die stärkere Immunreaktion des Neuropils in der Umgebung der Pyramidenzellen im Sektor CA1 hin. Balken: 20  $\mu$ m

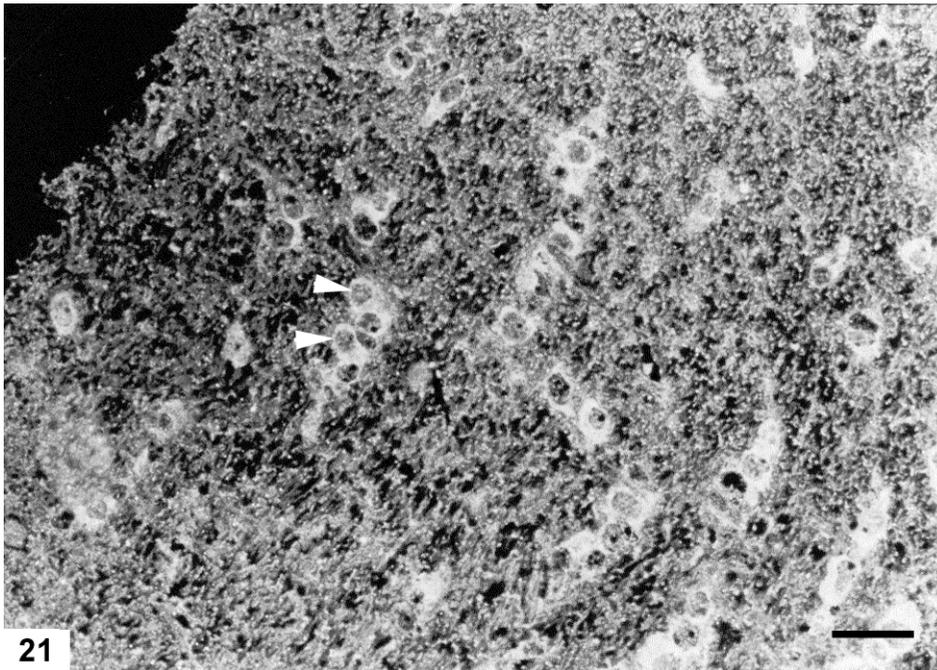
### **EAAC1**

EAAC1 wurde vor allem im Zytoplasma von Zellen nachgewiesen, bei denen es sich aufgrund von Form und Verteilung um Neurone handeln dürfte. Durch die überwiegend intrazellulär, granulär erscheinende Immunreaktion konnte eine Reaktion der Zellmembranen nicht abgegrenzt werden.

**Hippocampus.** Wir konnten EAAC1 in Pyramidenzellen (CA1 bis CA4) des Ammonshorns, in Körnerzellen (Str. granulosum) des Gyrus dentatus sowie in verstreut liegenden Interneuronen nachweisen (Abb. 19 und 20). Darüberhinaus konnten wir kleinere EAAC1-positive Zellen in Oligodendrozyten typischer Anordnung in der Fimbrie nachweisen (Abb. 21).



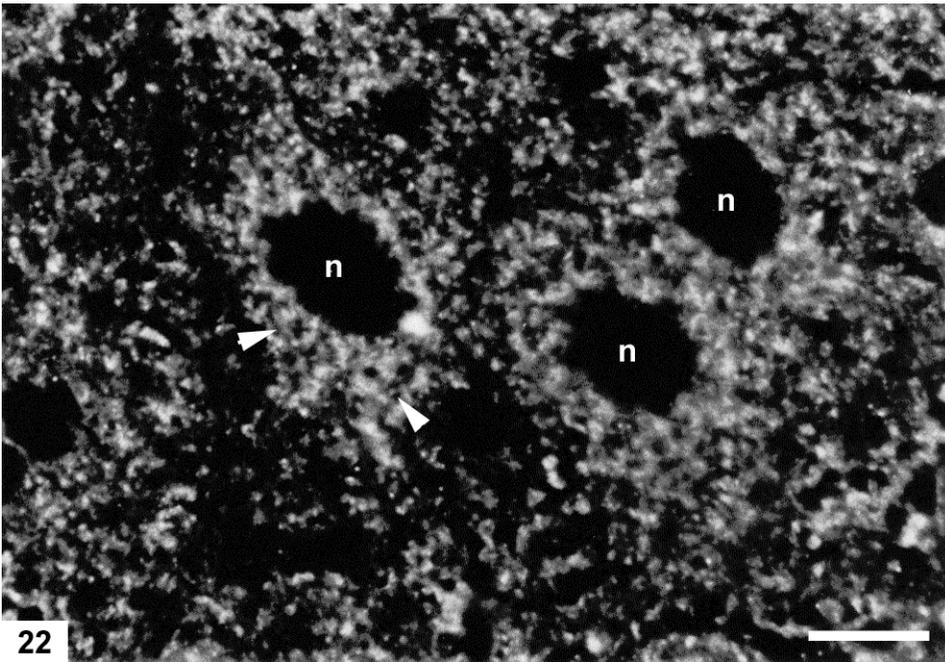
**Abb. 19 und 20:** Nachweis von EAAC1 im Hippocampus der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitten). Str. pyramidale (py) des Ammonshorn-Sektor CA1 (Abb. 19) und Str. pyramidale (py) des Ammonshorn-Sektor CA3 (Abb. 20) mit stark immunreaktiven Pyramidenzellen. Str. radiatum (ra). Balken: 20  $\mu$ m



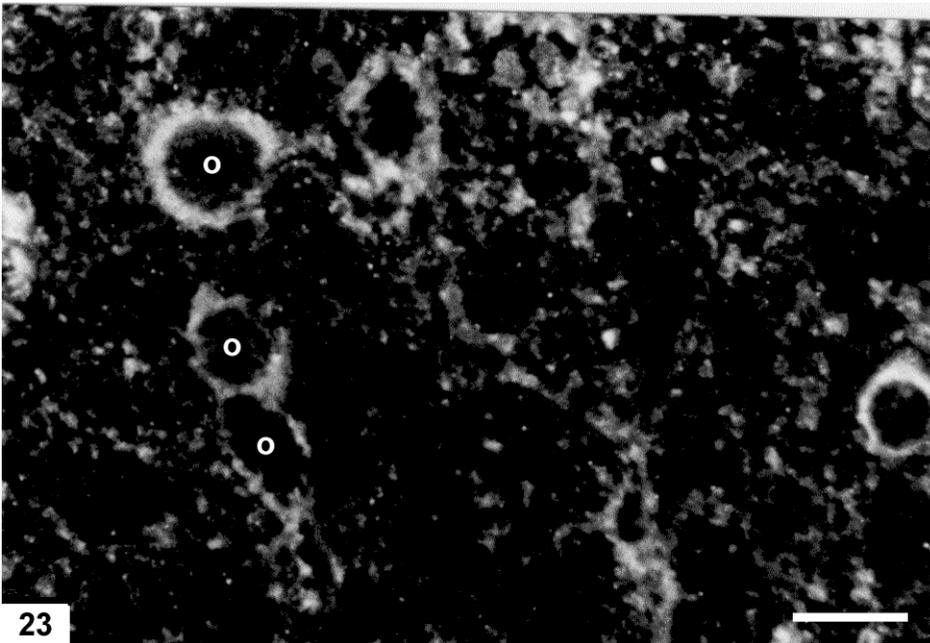
**Abb. 21:** Nachweis von EAAC1 im Hippocampus der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitten). EAAC1-positive Oligodendrozyten im Bereich der Fimbrie des Ammonshorns (Pfeilspitzen). Balken: 20  $\mu$ m

**Kleinhirn.** Im Kleinhirn konnten wir EAAC1 in Neuronen des Str. granulosum und in verstreut liegenden Interneuronen des Str. moleculare nachweisen.

**Rückenmark.** Die Neurone in der grauen Substanz zeigten eine deutliche, granuläre Immunreaktion (Abb. 22). Darüberhinaus konnten wir EAAC1-positive Zellen in der weissen Substanz nachweisen, die die für Oligodendrozyten typische Anordnung und Morphologie aufwiesen (Abb. 23).



**Abb. 22:** Nachweis von EAAC1 im Rückenmark der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitt). Neurone (n) des Hinterhorns zeigen im Zytoplasma granuläre Reaktionsprodukte (Pfeilspitzen). Balken: 10  $\mu$ m



**Abb. 23:** Nachweis von EAAC1 im Rückenmark der Maus mittels Immunfluoreszenz (Semidünnschnitt). Weiße Substanz: EAAC1-positive Zellen in für Oligodendrozyten (o) typischer Anordnung und Form. Balken: 10  $\mu$ m

**Tab. 1:** Immunreaktivität der Transporterproteine GLT1, GLAST und EAAC1 im ZNS von Maus und Ratte mittels Immun-aP-Nachweis

Hippocampus			GLT1	GLAST	EAAC1
Ammonshorn	Alveus		*	*	0
	Str. oriens		***	**	*
	Str. pyramidale		0	0	***
	Str. radiatum		**	**	*
	Str. lacunosum-moleculare		***	**	**
Gyrus dentatus	Str. moleculare	äußere 2/3	***	**	**
		inneres 1/3	**	**	**
	Str. granulosum		0	*	**

Kleinhirn			GLT1	GLAST	EAAC1
	Mark		0	0	0
	Str. granulosum		*	**	**
	Str. purkinjense		**	**	***
	Str. moleculare		***	***	**

Rückenmark			GLT1	GLAST	EAAC1
	Weisse Substanz		*	*	*
	Vorderhorn		***	**	**
	Hinterhorn		**	**	**

0 nicht-reaktiv    \* schwach    \*\* mittel    \*\*\* stark

## **IV. Diskussion**

### **IV.1 Spezifität der Antikörper**

Bei den Primärantikörpern gegen GLUT1, GLAST und EAAC1 handelte sich es um affinitätsgereinigte Peptidantikörper vom Kaninchen (Schmitt et al., 1996, 1997; Kugler und Schmitt, 1999), wobei die für die Immunisierung verwendeten Peptide bei Maus und Ratte sequenzidentisch sind (Storck et al., 1992; Tanaka, K., 1993; Kirschner et al., 1994; Kanner, B.I., 1993; Bjøras et al., 1996). Zum Nachweis der Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper, wurden die sog. Präabsorption und Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Präabsorptionen ergaben sowohl in Gewebeschnitten als auch bei Western Blot-Analysen keine Immunreaktionen. Die bei den Western Blot-Analysen nachgewiesenen Proteinbanden in den Membranfraktionen der Gewebekomponenten entsprechen den in der Literatur beschriebenen Molekulargrößen (Danbolt et al., 1992; Pines et al., 1992; Storck et al., 1992; Rothe et al., 1994; Bjøras et al., 1996; Conradt et al., 1995; Lehre et al., 1995; Rauen et al., 1996; Coco et al., 1997; Kugler und Schmitt, 1999).

### **IV.2 Regionale Verteilung der Glutamattransporter**

#### **GLT1 und GLAST**

Während im Großhirn GLUT1 überwiegt, ist GLAST im Kleinhirn der hauptsächliche Glutamattransporter (Danbolt et al., 1990; Pines et al., 1992). Auch unsere Western Blot-Analysen an den untersuchten ZNS-Regionen ergaben z.T. deutliche Unterschiede bezüglich des Gehalts an Transporterprotein. So ist GLUT1 im Hippocampus in höheren Konzentrationen vorhanden als im Kleinhirn, während GLAST im Kleinhirn dominiert. Diese Ergebnisse stimmen mit den quantitativen Immunoblot-Analysen verschiedener Arbeitsgruppen überein. Diese konnten zeigen, dass die Menge an GLUT1 im Hippocampus etwa 4-fach höher ist als die an GLAST. Im Kleinhirn liegt das Verhältnis GLUT1 zu GLAST dagegen bei etwa 1:5 (Lehre und Danbolt, 1998). Aus unseren vergleichenden Untersuchungen an Maus und Ratte ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Spezies hinsichtlich der Mengenverhältnisse der Glutamattransporter und deren molekularen Massen.

Die von uns erhobenen immunhistochemischen Befunde über die regionale Verteilung von GLT1 im ZNS der Maus stimmen mit den Ergebnissen von immunhistochemischen und in-situ-Hybridisierungs-Studien anderer Autoren überein (Torp et al., 1994; Berger und Hediger, 1998; Schmitt et al., 1996). Im Hippocampus konnten wir eine starke GLT1-Immunreaktion, vor allem im Str. lacunosum-moleculare des Ammonshorns und im äußeren Drittel des Str. moleculare des Gyrus dentatus nachweisen, während GLAST nahezu gleichmäßig mittelstark über alle Schichten des Hippocampus verteilt war. In diesen Schichten enden zahlreiche glutamaterge Afferenzen des Tractus perforans und sind somit glutamaterge Terminationsgebiete (Fagg und Foster, 1983; Fonnum, 1984; Schmitt et al., 1996).

Die große Bedeutung von GLAST im Kleinhirn demonstrierten Untersuchungen an GLAST-defizienten Mausstämmen. Diese Tiere litten unter Defiziten bei der motorischen Koordination und erhöhter Empfindlichkeit gegen Kleinhirntraumata (Watase et al., 1998). Unsere immunhistochemischen Nachweise an Maus und Ratte zeigten einen höheren Gehalt an GLAST als an GLT1 im Str. moleculare. GLT1 wies im Kleinhirn eine insgesamt schwächere Immunreaktion auf. Die Schichten Str. purkinjense und Str. granulosum waren nur schwach immunreaktiv beim Nachweis von GLT1 und GLAST. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von Lehre et al. (1995) und Schmitt et al. (1997) bei der Ratte und von Bernabe et al. (2003) bei der Maus überein.

Im Rückenmark schien weniger GLAST als GLT1 enthalten zu sein. Die Ergebnisse aus den Western Blot-Analysen deuten ebenfalls darauf hin, dass GLT1 eine größere Rolle beim Glutamattransport im Rückenmark spielen dürfte. Das Rückenmark zeigte eine deutliche GLAST-Immunreaktion im Bereich der Intermediärzone der grauen Substanz und der Lamina I und II des Hinterhorns. Die motorischen Kerne des Vorderhorns zeigten keine GLAST-Reaktivität. In der weißen Substanz reagierte GLT1 nur schwach positiv und die Immunreaktion im Bereich der grauen Substanz war mittelstark bis stark.

### **EAAC1**

Höchste Konzentrationen dieses Transporters kommen in Hippocampus, Kleinhirn und Basalganglien vor (Conti et al., 1998; Kugler und Schmitt, 1999), wobei jedoch die

absolute Menge deutlich geringer als die von GLT1 und GLAST ist (Haugeto et al., 1996). Unsere Westernblot-Analysen von Maus- und Rattengewebe zeigten ebenfalls den im Vergleich zu den anderen Glutamattransportern deutlich geringeren Gehalt an EAAC1 in der Membranfraktion der drei untersuchten ZNS-Regionen beider Spezies.

Die immunhistochemischen Nachweise von EAAC1 ergaben eine mittelstarke Immunreaktion in den Schichten des Hippocampus mit Ausnahme des Str. pyramidale. Diese neuronendichte Schicht zeigte in der vorliegenden Untersuchung eine starke Immunreaktion. Ähnliche Befunde erhoben Kugler und Schmitt (1999) bei der Ratte. Auch die neuronendichte graue Substanz des Rückenmarks der Maus, Str. granulosum und Str. purkinjense des Kleinhirns ergaben in unseren wie auch in anderen Untersuchungen (Tao et al. 2004, Kugler und Schmitt, 1999) eine starke Immunreaktion.

### **IV.3 Zelluläre Verteilung der Glutamattransporter**

#### **Zelluläre Verteilung von GLT1 und GLAST**

Unter normalen Bedingungen gilt GLT1 als ein glialer Transporter im ZNS der adulten Ratte (Danbolt et al., 1992; Hees et al., 1992; Levy et al., 1993b; Rothstein et al., 1994; Chaudhry et al., 1995; Lehre et al., 1995; Schmitt et al., 1996; Berger and Hediger, 2000) sowie des Menschen (Milton et al., 1997). GLT1 ist wohl in den meisten, wenn nicht sogar allen Astrozyten der grauen und der weißen Substanz lokalisiert (Lehre et al., 1995). Die Immunreaktion von GLT1 an Semidünnschnitten von Hippocampus, Kleinhirn und Rückenmark von Maus und Ratte deutet ebenfalls auf eine vor allem astrozytäre Lokalisation hin. Es kann davon ausgegangen werden, dass GLT1 und damit die Astrozyten von größter Bedeutung für die Beseitigung von Glutamat sind, da in anderen Zelltypen des adulten ZNS, z. B. Oligodendrozyten, Epithelialzellen des Plexus choroideus, Tanyzyten oder Neurone, eine Expression von GLT1 bisher nicht gezeigt werden konnte (Danbolt, 2001). Eine Ausnahme stellen die Zapfen- und Bipolar-Zellen der Retina dar (Rauen und Kanner, 1994; Euler und Wassle, 1995; Rauen et al., 1996, 1999; Rauen, 2000).

Im Gegensatz dazu konnten GLT1-positive Neurone in Zellkultur nachgewiesen werden

(Swanson et al., 1997; Lopez-Redondo et al., 2000, Yamada et al., 1997; Berger and Hediger, 2000). Martin et al. (1997) zeigten, dass Neurone von Schweinen nach einem Hypoxieschaden ebenfalls GLT1 exprimierten. Dies zeigt, dass von einer grundsätzlichen Fähigkeit der Neurone zur GLT1-Expression ausgegangen werden kann. Diese Fähigkeit wird durch den Nachweis von GLT1-mRNA im Großteil der Neurone des Neocortex, in Teilen des Bulbus olfactorius, Thalamus und der unteren Olive bei der adulten Ratten belegt (Schmitt et al., 1996; Berger und Hediger, 1998).

Astrozyten des gesamten ZNS enthalten GLAST (Chaudhry et al., 1995; Lehre et al., 1995; Schmitt et al., 1997) sowie GLAST mRNA (Torp et al., 1994; Schmitt et al., 1997; Berger und Hediger, 1998). In Astrozyten sind GLAST und GLT1 kolokalisiert (Lehre et al., 1995; Berger und Hediger, 1998; Haugeto et al., 1996), wobei das Mengenverhältnis zwischen den beiden Transportern von der untersuchten ZNS-Region abhängt (Lehre et al., 1995). Die funktionelle Bedeutung einer Kolokalisation könnte darin liegen, dass GLAST eine Transport-Reservefunktion bei hohen Glutamat-Konzentrationen erfüllt. Es besitzt einen höheren  $K_m$ -Wert, d.h. eine niedrigere Affinität als GLT1. Bei hoher extrazellulärer Glutamatkonzentration beseitigt GLAST zunächst die Hauptmenge an Glutamat, während GLT1 dann im Bereich niedrigerer extrazellulärer Konzentration den Transmitter auf  $1\mu\text{M}$  senkt (Kanai et al., 1993).

Unsere Untersuchungen zeigten im Kleinhirn eine vermehrte gliale Immunreaktion von GLAST, die vermutlich Bergmanngliazellen zugeordnet werden kann. Dafür spricht, dass es im Kleinhirn die Bergmann-Gliazellen sind, die die höchste Konzentration an GLAST enthalten (Lehre et al., 1995). Der Nachweis von GLAST in Oligodendrozyten (Choi und Chiu, 1997; Domercq et al., 1999; Lehre et al., 1995) und Ependymzellen (Berger und Hediger, 1998; Schmitt et al., 1997) wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen erbracht. GLAST-positive Neurone konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Mit Ausnahme einer embryonalen Subpopulation kultivierter Hippocampusneurone (Plachez et al., 2000) konnte GLAST bisher weder im adulten Stadium noch während der Entwicklung in Neuronen nachgewiesen werden (Danbolt, 2001).

### **Subzelluläre Verteilung von GLT1 und GLAST**

Nach bisherigen Untersuchungen an der adulten Ratte sind GLT1 und GLAST fast ausschließlich in der Plasmamembran von Astrozyten nachweisbar (Chaudhry et al., 1995; Lehre et al., 1995). In unseren Western Blot-Analysen waren die beiden Transporter ebenfalls nur in der Membranfraktion enthalten. Bei den immunhistochemischen Nachweisen an Semidünnschnitten reagierten die Antikörper gegen GLT1 und GLAST an der Zellmembran, während das Cytosol frei von Fluoreszenz war. Nach Chaudhry et al. (1995) zeigen Zellorganellen d.h. Mitochondrien, Zellkerne und endoplasmatisches Retikulum hippocampaler Astrozyten weniger als 5% der GLT1-Immunreaktivität verglichen mit der Plasmamembran. In Bergmann-Gliazellen liegt die GLAST-Antikörper-Bindung der Mitochondrien und Zellkerne bei etwa 6% im Vergleich zur Plasmamembran, das endoplasmatische Retikulum bei etwa 30%. Membranabschnitte von Astrozyten, die Kontakt zu Terminalen, Axonen oder Dendriten besitzen, haben eine erheblich höhere Transporterdichte, als Abschnitte, die anderen Astrozyten, Pia mater oder kapillärem Endothel benachbart sind (Lehre und Danbolt, 1998).

Die beschriebene zelluläre und regionale Verteilung von GLT1 und GLAST legt die bedeutende Rolle der hochaffinen Glutamattransporter bei der Entfernung des synaptisch freigesetzten Glutamats aus dem Extrazellulärraum nahe. Dies wird auch durch Läsionsuntersuchungen am Neostriatum (Levy et al., 1995) und Hippocampus (Hein et al., 2001) der Ratte bestätigt, bei denen eine Durchtrennung glutamaterger Afferenzen zu einer Reduktion der GLT1- und GLAST-Expression führte. Genetisch modifizierte Mäuse bei denen jeweils das Gen für GLT1 (Tanaka et al., 1997) und GLAST (Watase et al., 1998; Tsuru et al., 2002) ausgeschaltet wurde, zeigten deutliche Defizite. Die Ausschaltung von GLT1 hat besonders schwerwiegende Folgen, da die Tiere frühzeitig an Krampfanfällen versterben (Tanaka et al., 1997). GLAST-defiziente Tiere zeigen eine gestörte motorische Koordinationsfähigkeit und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Hirntraumata (Watase et al., 1998).

### **Zelluläre und subzelluläre Verteilung von EAAC1**

Während GLT1 und GLAST gliale Transporter sind, ist EAAC1 vorwiegend in Neuronen

lokalisiert (Kanai und Hediger, 1992; Rothstein et al., 1994; Kanai et al., 1995; Velaz-Faircloth et al., 1996; Torp et al., 1997; Kugler und Schmitt, 1999). EAAC1 liegt vor allem im Bereich der perisynaptischen Membran (He et al., 2000) und der somatodendritischen Kompartimente vor (Rothstein et al., 1994; Coco et al., 1997; Furuta et al., 1997; Shashidharan et al., 1997). Die synaptische Membran gilt als EAAC1-frei (Coco et al., 1997). Verschiedene In-Situ-Hybridisierungs-Untersuchungen belegen, dass EAAC1-mRNA sowohl in glutamatergen als auch in anderen Neuronen vorkommt, z.B. in den GABAergen Purkinje-Zellen und Interneuronen des Hippocampus, in den cholinergen Motoneuronen des Rückenmarks und in aminergen Neuronen (Meister et al., 1993; Kanai et al., 1995; Bjørås et al., 1996; Velaz-Faircloth et al., 1996; Torp et al., 1997; Berger und Hediger, 1998; Kugler und Schmitt, 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch Astrozyten des Cortex und der weißen Substanz EAAC1 bilden können (Conti et al., 1998). Die lange Zeit vermutete Expression von EAAC1 in Oligodendrozyten verschiedener Regionen wurde mittlerweile bei der Ratte belegt (Domercq et al., 1999; Kugler und Schmitt, 1999). Auch bei der Maus fanden wir EAAC1-positive Zellen in der weißen Substanz von Hippocampus, Rückenmark und Kleinhirn mit für Oligodendrozyten typischer Anordnung und Morphologie. Im Hippocampus ergab sich eine starke Immunreaktion in den Pyramidenzellen des Ammonshorns und den Körnerzellen des Gyrus dentatus.

EAAC1 war bei unseren Untersuchungen vor allem im Zytoplasma nachweisbar, wie bereits von anderen Untersuchern gezeigt wurde (Conti et al., 1998; Kugler und Schmitt, 1999). Das EAAC1-positive Zytoplasma der Neurone von Hippocampus und der  $\alpha$ -Motoneurone des Rückenmarks erschien, wie bereits von verschiedenen Autoren beschrieben, granulär (Rothstein et al., 1994; Shashidharan et al., 1997; Kugler und Schmitt, 1999). Da EAAC1 bei unseren Immunoblot-Analysen ausschließlich in der Membranfraktion nachweisbar war, kann man von einer vesikulären Lokalisation innerhalb der Zelle ausgehen. Die Vesikel könnten als Speicherkompartimente für EAAC1 dienen und das Protein zur raschen Präsentation an der Zelloberfläche zur Verfügung stellen. Davis et al. (1998) zeigten den verstärkten Einbau intrazellulär vorliegender EAAC1-Transporter in die Plasmamembran, der durch Phorbol ester, ein Stimulator der

Transporteraktivität von GLT1 (Casado et al., 1993) und EAAC1 (Dowd et al., 1996), induziert wird. Najimi et al. (2002) zeigten, dass die Präsentation von EAAC1 an der Zelloberfläche durch eine Blockade zytoskelettärer Mechanismen mit dem Zellgift Colchicin verhindert werden kann (Najimi et al., 2002). Derartige Regulationsmechanismen, die innerhalb von Minuten den Transportergehalt in der Zellmembran beeinflussen, wurden auch bei den Transportern für GABA (Corey et al., 1994; Quick et al., 1997; Bernstein und Quick, 1999; Deken et al., 2000), Dopamin (Daniels und Amara, 1999) und Serotonin beschrieben (Blakely et al., 1998).

Das Fehlen einer EAAC1-Immunreaktion in synaptischen Membranen und die Expression in u.a. nicht-glutamatergen Neuronen (z.B. Purkinje-Zellen der Kleinhirnrinde) läßt die Bedeutung von EAAC1 für die glutamaterge Transmission im Unklaren. Die extrasynaptische Lokalisation von EAAC1 läßt vermuten, dass die Funktion dieses Transporters nicht primär in der Beendigung des exzitatorischen Signals von Glutamat liegt. Trotzdem wird die Bedeutung von EAAC1 für den Organismus an Untersuchungen EAAC1-defizienter Mäuse klar. Sie leiden neben Aminoazidurie unter einer deutlich reduzierten spontanen motorischen Aktivität (Peghini et al., 1997).

#### **IV.4 Klinische Bedeutung der Glutamattransporter**

Die verschiedenen Subtypen der hochaffinen Glutamattransporter stehen im Interesse der klinischen Erforschung einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen (Maragakis und Rothstein, 2003). Falls die Transporterproteine aufgrund einer Modifikation ihrer Struktur oder Funktion den Transport einschränken oder umkehren, führt dies zu erhöhten extrazellulären Glutamat-Konzentrationen. Dies steigert über Glutamatrezeptoren den Natrium- und Calcium-Einstrom in Neurone, sowie den Energieverbrauch und die Produktion freier Radikale. Die neurotoxische Wirkung hoher extrazellulärer Konzentrationen von Glutamat wird als mögliche Ursache neurologischer Erkrankungen angesehen. Untersuchungen an Morbus Alzheimer (Palmer et al., 1986; Pomara et al., 1992; Masliah et al., 1996), an speziellen Formen der Chorea Huntington (Perry und Hansen, 1990), an der amyotrophen Lateralsklerose (Rothstein et al., 1995), der Epilepsie

(During und Spencer, 1993; Tanaka et al., 1997) und der Cerebralischämie (Choi und Rothman, 1990; Nicholls und Attwell, 1990) weisen auf die Bedeutung der Glutamattransporter in der Pathogenese dieser Erkrankungen hin.

Die Klärung der Pathogenese ist äußerst komplex, da selbst innerhalb eines Krankheitsbildes die möglichen Mechanismen vielfältig sind und sich die Erkrankungen in eine Vielzahl von Untergruppen unterteilen lassen. Beschränkt man sich auf die Untergruppen, die unmittelbar in Zusammenhang mit Glutamattransportern stehen, ergeben sich die folgenden Pathomechanismen, die zu neurologischen Erkrankungen führen können.

Die Oxidation der Transporterproteine durch freie Radikale ist oft eine irreversible Modifikation des Proteins und führt nicht selten zu Funktionseinbußen (Dean et al., 1997). Diese freien Radikale sind z. B. Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit und entstehen unter anderem während ischämischen Zuständen (Gabryel und Trzeciak, 2001). Freie Radikale können auch von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden (Hauptbestandteil der neuritischen Plaques bei Morbus Alzheimer) gebildet werden und dadurch den Glutamattransport beeinträchtigen. Dies könnte eine Ursache für die Neuropathologie des Morbus Alzheimer sein (Harris et al., 1995).

Dass freie Radikale die Aufnahme von Glutamat in kultivierten Astrozyten vermindern, zeigten verschiedene Untersuchungen (Piani et al., 1993; Volterra et al., 1994a, b; Sorg et al., 1997). Alle drei Transporter GLT1, GLAST und EAAC1 zeigen ähnliche Funktionsverluste, wenn man sie freien Radikalen aussetzt (Trotti et al., 1996). Im Rahmen einer Ischämie z. B. des Gehirns werden die Zellen zum einen durch das Anfallen freier Radikale, durch die Unterbrechung der Atmungskette und den damit verbundenen ATP-Abfall geschädigt. Der ATP-Mangel führt zu verminderter, teilweise sogar reverser Transportfunktion, wie es in hippocampalen Schnittpräparaten von Ratten beschrieben wurde (Madl und Burgesser, 1993). Hohe Glutamatkonzentrationen schädigen sowohl Neurone als auch Oligodendrozyten (Fern und Möller, 2000).

Neben diesem direkten Effekt auf die Transporterproteine nimmt der Sauerstoffmangel auch Einfluß auf deren Expression. Bereits sechs Stunden nach einer ischämischen Phase wurde in verschiedenen Untersuchungen eine verminderte Expression von Glutamattrans-

portern gezeigt (Torp et al., 1995).

Die verminderte Expression scheint die Ursache für bestimmte Formen der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) zu sein. Das histologische Korrelat dieser neurologischen Erkrankung liegt in der Degeneration von Motorneuronen des motorischen Cortex, des Hirnstamms und des Rückenmarks. Bei ALS-Patienten ist das GLT1-Protein in motorischem Cortex und Rückenmark stark reduziert (Verlust von 30-95%) und das extrazelluläre Glutamat erhöht (Bristol und Rothstein, 1996). Eine mögliche Ursache des Proteinverlustes ist, dass ALS-Patienten eine abnorme GLT1-mRNA besitzen, die zu instabilen GLT1-Proteinen führt (Lin et al., 1998).

Studien über Chorea Huntington lassen eine Beteiligung von GLT1 vermuten (Arzberger et al., 1997). Im Neostriatum dieser Patienten wurde im Frühstadium ein Verlust von Neuronen und eine kompensatorische Hochregulation des Glutamattransporters GLT1 bei gleichzeitiger Proliferation von Astrozyten festgestellt.

Bei der Schizophrenie soll hingegen eine Überexpression von Glutamattransportern die Ursache für die psychischen Störungen sein (Deakin et al., 1989; Aparicio-Legarza et al., 1997). Andere Autoren zeigten ein reduziertes Vorkommen von EAAC1-Protein und -mRNA bei Schizophrenie-Patienten (Murray et al., 1996; Bachus et al., 1996).

Die große funktionelle Bedeutung von GLT1, die sich aus der hohen Expressionrate im ZNS schliessen lässt, wird durch Untersuchungen an genmanipulierten Mäusen bestätigt. Wenn die Erbinformation für GLT1 fehlt, leiden die Tiere unter spontanen und letalen Krampfanfällen (Tanaka et al., 1997). Dadurch ist die Lebenserwartung dieser homozygoten Knock-out-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erheblich verkürzt.

Die Bedeutung der Glutamattransporter für das Nervensystem wird an den beschriebenen Krankheitsbildern und Defekten offensichtlich. Dies könnte mögliche Wege neuer Therapien aufzeigen. Große Hoffnung liegt dabei auf den Untersuchungen an genmanipulierten Mäusen, deren Wildtyp nach unseren Ergebnissen keinen wesentlichen Unterschied zur Ratte aufweist.

## **V. Zusammenfassung**

Um das Transmittersignal von Glutamat zu beenden und eine neurotoxische Anreicherung zu verhindern, muss Glutamat aus dem Extrazellularraum des ZNS entfernt werden. Dafür sind die hochaffinen Glutamattransporter in Gliazellen und Neuronen zuständig, die Glutamat aus dem Extrazellularraum aufnehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde die regionale und zelluläre Verteilung der Glutamattransporter GLUT1, GLAST und EAAC1 in Hippocampus, Kleinhirn und Rückenmark von Maus und Ratte untersucht. Als Nachweismethoden wurden Western Blot-Analysen und immunhistochemische Nachweise an fixierten Kryostatschnitten und Semidünnschnitten von gefriergetrockneten Geweben eingesetzt.

Die Western Blot-Analysen an den verschiedenen ZNS-Abschnitten ergaben keine eindeutigen Unterschiede zwischen Ratte und Maus hinsichtlich des Gehalts und der molekularen Massen der Glutamattransporter (GLT1: 70 kDa, GLAST: 65 kDa, EAAC1: 64 kDa). Auch bei den immunhistochemischen Analysen zeigte sich eine regionale und zelluläre Verteilung der Glutamattransporter, die bei Ratte und Maus übereinstimmten.

Die immunhistochemischen Analysen über die regionale Verteilung in verschiedenen Abschnitten des ZNS führten zu folgenden Ergebnissen. GLUT1 und GLAST zeigten in den Neuropilschichten von Hippocampus, Kleinhirn und Rückenmark eine unterschiedlich starke Immunreaktion, während im Bereich neuronaler Perikarya und der weißen Substanz beide Transporter kaum nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu war EAAC1 vor allem in neuronalen Perikarya immunhistochemisch darstellbar und ergab auch in der weißen Substanz eine z.T. deutliche Immunreaktion.

Immunfluoreszenzuntersuchungen zu zellulären Verteilung zeigten, dass GLUT1 und GLAST vor allem in Astrozyten und hier in deren Zellmembranen lokalisiert waren. Demgegenüber war EAAC1 vor allem in Neuronen und Oligodendrozyten darstellbar. Bei Neuronen reagierten weniger die Zellmembranen als vielmehr cytoplasmatische Granula bzw. Vesikel immunpositiv.

Aus den immunocytochemischen Ergebnissen lässt sich schliessen, dass extrazelluläres Glutamat vor allem über die Glutamattransporter GLUT1 und GLAST in Astrozyten

aufgenommen wird. Dies stimmt mit Ergebnissen aus der Literatur gut überein. Da EAAC1 vor allem intrazellulär in Neuronen vorkommt, dürfte dieser Transporter nur unter bestimmten Bedingungen in die Membran eingebaut werden und dann Bedeutung für die neuronale Aufnahme von Glutamat haben.

## VI. Literaturverzeichnis

- Almers W, Tse FW. 1990. Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* 4:813-818.
- Aparicio-Legarza MI, Cutts AJ, Davis B, Reynolds GP. 1997. Deficits of [3H]D-aspartate binding to glutamate uptake sites in striatal and accumbens tissue in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 232:13-16.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4155-4160.
- Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A. 1997. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:440-454.
- 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.
- Augustine GJ, Burns ME, DeBello WM, Pettit DL, Schweizer FE. 1996. Exocytosis: proteins and perturbations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:659-701.
- Bachus SE, Hyde TM, Weikert CS, Shashidaran P, Herman MM, Kleinman JE. 1996. Reduced level of excitatory amino acid transporter 3 mRNA in hippocampus of schizophrenics. *Soc Neurosci Abstr.* 22:1680.
- Balcar VJ, Li Y. 1992. Heterogeneity of high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate in the mammalian central nervous system. *Life Sci* 51:1467-1478.
- Barbour B, Brew H, Attwell D. 1988. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335:433-435.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-1374.
- Berger UV, Hediger MA. 1998. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat Embryol (Berl)* 198:13-30.

- Berger UV, Hediger MA. 2000. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 421:385-399.
- Bernabe A, Mendez JA, Hernandez-Kelly LC, Ortega A. 2003. Regulation of the Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter in rodent cerebellar astrocytes. *Neurochem Res* 28:1843-1849.
- Bernstein EM, Quick MW. 1999. Regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. *J Biol Chem* 274:889-895.
- Billups B, Attwell D. 1996. Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature* 379:171-174.
- Bjoras M, Gjesdal O, Erickson JD, Torp R, Levy LM, Ottersen OP, Degree M, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Danbolt NC. 1996. Cloning and expression of a neuronal rat brain glutamate transporter. *Brain Res Mol Brain Res* 36:163-168.
- Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ. 1998. Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol Psychiatry* 44:169-178.
- Bristol LA, Rothstein JD. 1996. Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann Neurol* 39:676-679.
- Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
- Casado M, Bendahan A, Zafra F, Danbolt NC, Aragon C, Gimenez C, Kanner BI. 1993. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J Biol Chem* 268:27313-27317.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15:711-720.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357-368.
- Choi DW, Rothman SM. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
- Choi I, Chiu SY. 1997. Expression of high-affinity neuronal and glial glutamate transporters in the rat optic nerve. *Glia* 20:184-192.

- Clements JD. 1996. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 19:163-171.
- Coco S, Verderio C, Trotti D, Rothstein JD, Volterra A, Matteoli M. 1997. Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 9:1902-1910.
- Collingridge GL, Lester RA. 1989. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.
- Conradt M, Storck T, Stoffel W. 1995. Localization of N-glycosylation sites and functional role of the carbohydrate units of GLAST-1, a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter. *Eur J Biochem* 229:682-687.
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M. 1998. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* 8:108-116.
- Corey JL, Davidson N, Lester HA, Brecha N, Quick MW. 1994. Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J Biol Chem* 269:14759-14767.
- Cousin MA, Robinson PJ. 1999. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J Neurochem* 73:2227-2239.
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danbolt NC, Pines G, Kanner BI. 1990. Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochemistry* 29:6734-6740.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI. 1992. An  $[Na^+ + K^+]$ -coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51:295-310.
- Daniels GM, Amara SG. 1999. Regulated trafficking of the human dopamine transporter. Clathrin-mediated internalization and lysosomal degradation in response to phorbol esters. *J Biol Chem* 274:35794-35801.
- Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB. 1998. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18:2475-2485.

- Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, Reynolds GP, Cross AJ. 1989. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *J Neurochem* 52:1781-1786.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 (Pt 1):1-18.
- Deken SL, Beckman ML, Boos L, Quick MW. 2000. Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nat Neurosci* 3:998-1003.
- Diamond JS, Jahr CE. 1997. Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. *J Neurosci* 17:4672-4687.
- Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Areso P, Matute C. 1999. Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *Eur J Neurosci* 11:2226-2236.
- Dowd LA, Coyle AJ, Rothstein JD, Pritchett DB, Robinson MB. 1996. Comparison of Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport activity in synaptosomes, C6 glioma, and *Xenopus* oocytes expressing excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Mol Pharmacol* 49:465-473.
- Drenckhahn D, Jons T, Schmitz F. 1993. Production of polyclonal antibodies against proteins and peptides. *Methods Cell Biol* 37:7-56.
- During MJ, Spencer DD. 1993. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 341:1607-1610.
- Eliasof S, Jahr CE. 1996. Retinal glial cell glutamate transporter is coupled to an anionic conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4153-4158.
- Erecinska M, Silver IA. 1990. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35:245-296.
- Euler T, Wassle H. 1995. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361:461-478.
- Fagg GE, Foster AC. 1983. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9:701-719.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- Fern R, Moller T. 2000. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci* 20:34-42.

- Ferrer-Martinez A, Felipe A, Nicholson B, Casado J, Pastor-Anglada M, McGivan J. 1995. Induction of the high-affinity Na(+)-dependent glutamate transport system XAG- by hypertonic stress in the renal epithelial cell line NBL-1. *Biochem J* 310 (Pt 2):689-692.
- Fonnum F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11.
- Freneau RT, Jr., Caron MG, Blakely RD. 1992. Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. *Neuron* 8:915-926.
- Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD. 1997. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* 81:1031-1042.
- Gabryel B, Trzeciak HI. 2001. Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotox Res* 3:205-221.
- Giloh H, Sedat JW. 1982. Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217:1252-1255.
- Grunewald M, Bendahan A, Kanner BI. 1998. Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron* 21:623-632.
- Grunewald M, Kanner BI. 2000. The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *J Biol Chem* 275:9684-9689.
- Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, Miedel MC, Davidson N, Lester HA, Kanner BI. 1990. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249:1303-1306.
- Hamberger A, Nystrom B. 1984. Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* 9:1181-1192.
- Harris ME, Carney JM, Cole PS, Hensley K, Howard BJ, Martin L, Bummer P, Wang Y, Pedigo NW, Jr., Butterfield DA. 1995. beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 6:1875-1879.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC. 1996. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.

- He Y, Janssen WG, Rothstein JD, Morrison JH. 2000. Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 418:255-269.
- Headley PM, Grillner S. 1990. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 11:205-211.
- Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature* 330:379-381.
- Hediger MA, Kanai Y. 1994. Expression cloning and characterization of the glutamate transporter in neurons. *Ren Physiol Biochem* 17:161-164.
- Hees B, Danbolt NC, Kanner BI, Haase W, Heitmann K, Koepsell H. 1992. A monoclonal antibody against a Na(+)-L-glutamate cotransporter from rat brain. *J Biol Chem* 267:23275-23281.
- Hein C, Horvath E, Kugler P. 2001. Glutamate transporter expression in astrocytes of the rat dentate gyrus following lesion of the entorhinal cortex. *Eur J Neurosci* 13:1839-1848.
- Huggett JF, Mustafa A, O'Neal L, Mason DJ. 2002. The glutamate transporter GLAST-1 (EAAT-1) is expressed in the plasma membrane of osteocytes and is responsive to extracellular glutamate concentration. *Biochem Soc Trans* 30:890-893.
- Johannes L, Galli T. 1998. Exocytosis: SNAREs drum up! *Eur J Neurosci* 10:415-422.
- Kanai Y, Bhide PG, DiFiglia M, Hediger MA. 1995. Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *Neuroreport* 6:2357-2362.
- Kanai Y, Hediger MA. 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:467-471.
- Kanai Y, Smith CP, Hediger MA. 1993. The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends Neurosci* 16:365-370.
- Kanner BI. 1993. Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family. *FEBS Lett* 325:95-99.
- Kanner BI, Marva E. 1982. Efflux of L-glutamate by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 21:3143-3147.
- Kanner BI, Sharon I. 1978. Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 17:3949-3953.

- Kilty JE, Lorang D, Amara SG. 1991. Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* 254:578-579.
- Kirschner MA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Amara SG. 1994. Mouse excitatory amino acid transporter EAAT2: isolation, characterization, and proximity to neuroexcitability loci on mouse chromosome 2. *Genomics* 24:218-224.
- Klockner U, Storck T, Conradt M, Stoffel W. 1993. Electrogenic L-glutamate uptake in *Xenopus laevis* oocytes expressing a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST-1). *J Biol Chem* 268:14594-14596.
- Kugler P, Schmitt A. 1999. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27:129-142.
- Kushida H, Kushida T. 1982. An improved method for both light and electron microscopy of identical sites in semi-thin tissue sections embedded in epoxy resin "Quetol 651". *J Electron Microscop* (Tokyo) 31:206-209.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larsson HP, Picaud SA, Werblin FS, Lecar H. 1996. Noise analysis of the glutamate-activated current in photoreceptors. *Biophys J* 70:733-742.
- Lehmann A, Isacson H, Hamberger A. 1983. Effects of in vivo administration of kainic acid on the extracellular amino acid pool in the rabbit hippocampus. *J Neurochem* 40:1314-1320.
- Lehre KP, Danbolt NC. 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18:8751-8757.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- Levy LM, Lehre KP, Rolstad B, Danbolt NC. 1993. A monoclonal antibody raised against an [Na(+)+K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Lett* 317:79-84.
- Levy LM, Lehre KP, Walaas SI, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. 1995. Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur J Neurosci* 7:2036-2041.

- Levy LM, Warr O, Attwell D. 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 18:9620-9628.
- Li X, Francke U. 1995. Assignment of the gene SLC1A2 coding for the human glutamate transporter EAAT2 to human chromosome 11 bands p13-p12. *Cytogenet Cell Genet* 71:212-213.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. 1998. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589-602.
- Lipton SA, Rosenberg PA. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- Lopez-Redondo F, Nakajima K, Honda S, Kohsaka S. 2000. Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* 76:429-435.
- Madl JE, Burgesser K. 1993. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13:4429-4444.
- Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E. 1989. Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36:106-112.
- Marie H, Attwell D. 1999. C-terminal interactions modulate the affinity of GLAST glutamate transporters in salamander retinal glial cells. *J Physiol* 520 Pt 2:393-397.
- Martin LJ, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ. 1997. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol* 42:335-348.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis* 15:461-473.
- Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. 1996. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 40:759-766.
- Mason DJ, Suva LJ, Genever PG, Patton AJ, Steuckle S, Hillam RA, Skerry TM. 1997. Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents? *Bone* 20:199-205.

- Maxwell MH. 1978. Two rapid and simple methods used for the removal of resins from 1.0 micron thick epoxy sections. *J Microsc* 112:253-255.
- Maycox PR, Hell JW, Jahn R. 1990. Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci* 13:83-87.
- McBean GJ, Roberts PJ. 1985. Neurotoxicity of L-glutamate and DL-threo-3-hydroxyaspartate in the rat striatum. *J Neurochem* 44:247-254.
- Meister B, Arvidsson U, Zhang X, Jacobsson G, Villar MJ, Hokfelt T. 1993. Glutamate transporter mRNA and glutamate-like immunoreactivity in spinal motoneurons. *Neuroreport* 5:337-340.
- Milton ID, Banner SJ, Ince PG, Piggott NH, Fray AE, Thatcher N, Horne CH, Shaw PJ. 1997. Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res* 52:17-31.
- Murray AM, Weikert CS, Shashidharan P, Hyde TM, Kleinman JE. (1996): Decreased neuron-specific excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) in schizophrenic hippocampus. *Soc Neurosci Abstr.* 22:1680.
- Najimi M, Maloteaux JM, Hermans E. 2002. Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1. *FEBS Lett* 523:224-228.
- Nicholls D, Attwell D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11:462-468.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1984. Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: Björklund, A, Hökfelt, T, Kuhar, MJ (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. In: Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS, Vol. 3, Part II.* Elsevier, Amsterdam, pp. 141–246.
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG. 1991. Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350:350-354.
- Palmer AM, Procter AW, Stratmann GC, Bowen DM. 1986. Excitatory amino acid-releasing and cholinergic neurones in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 66:199-204.
- Peghini P, Janzen J, Stoffel W. 1997. Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *Embo J* 16:3822-3832.
- Perry TL, Hansen S. 1990. What excitotoxin kills striatal neurons in Huntington's disease? Clues from neurochemical studies. *Neurology* 40:20-24.

- Piani D, Frei K, Pfister HW, Fontana A. 1993. Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. *J Neuroimmunol* 48:99-104.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-467.
- Plachez C, Danbolt NC, Recasens M. 2000. Transient expression of the glial glutamate transporters GLAST and GLT in hippocampal neurons in primary culture. *J Neurosci Res* 59:587-593.
- Pomara N, Singh R, Deptula D, Chou JC, Schwartz MB, LeWitt PA. 1992. Glutamate and other CSF amino acids in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 149:251-254.
- Quick MW, Corey JL, Davidson N, Lester HA. 1997. Second messengers, trafficking-related proteins, and amino acid residues that contribute to the functional regulation of the rat brain GABA transporter GAT1. *J Neurosci* 17:2967-2979.
- Rauen T. 2000. Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* 19:53-62.
- Rauen T, Fischer F, Wiessner M. 1999. Glia-neuron interaction by high-affinity glutamate transporters in neurotransmission. *Adv Exp Med Biol* 468:81-95.
- Rauen T, Rothstein JD, Wassle H. 1996. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res* 286:325-336.
- Rauen T, Taylor WR, 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* 291:19-31.
- Rauen T, Kanner BI. 1994. Localization of the glutamate transporter GLT1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett*. 169:137-140
- Roskoski R, Jr. 1979. Net uptake of aspartate by a high-affinity rat cortical synaptosomal transport system. *Brain Res* 160:85-93.
- Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. 1994. Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 62:1133-1146.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.

- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.
- Sarantis M, Attwell D. 1990. Glutamate uptake in mammalian retinal glia is voltage- and potassium-dependent. *Brain Res* 516:322-325.
- Schmitt A, Asan E, Lesch KP, Kugler P. 2002. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109:45-61.
- Schmitt A, Asan E, Puschel B, Jons 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* 71:989-1004.
- Schmitt A, Asan E, Puschel B, Kugler P. 1997. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci* 17:1-10.
- Schmitt A, Kugler P. 1999. Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 92:293-308.
- Schousboe A. 1981. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol* 22:1-45.
- Shashidharan P, Huntley GW, Murray JM, Buku A, Moran T, Walsh MJ, Morrison JH, Plaitakis A. 1997. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Res* 773:139-148.
- Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G. 1991. Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254:576-578.
- Smith CP, Weremowicz S, Kanai Y, Stelzner M, Morton CC, Hediger MA. 1994. Assignment of the gene coding for the human high-affinity glutamate transporter EAAC1 to 9p24: potential role in dicarboxylic aminoaciduria and neurodegenerative disorders. *Genomics* 20:335-336.
- Smith KE, Borden LA, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL. 1992. Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* 8:927-935.

- Sorg O, Horn TF, Yu N, Gruol DL, Bloom FE. 1997. Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. *Mol Med* 3:431-440.
- Sternberger LA, Hardy PH, Jr., Cuculis JJ, Meyer HG. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333.
- Stoffel W, Sasse J, Duker M, Muller R, Hofmann K, Fink T, Lichter P. 1996. Human high affinity, Na(+)-dependent L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 (EAAT-1): gene structure and localization to chromosome 5p11-p12. *FEBS Lett* 386:189-193.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10955-10959.
- Sucher NJ, Lei SZ, Lipton SA. 1991. Calcium channel antagonists attenuate NMDA receptor-mediated neurotoxicity of retinal ganglion cells in culture. *Brain Res* 551:297-302.
- Sudhof TC. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653.
- Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17:932-940.
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. 1991. The potassium-dependence of excitatory amino acid transport: resolution of a paradox. *Brain Res* 555:343-345.
- Takai S, Yamada K, Kawakami H, Tanaka K, Nakamura S. 1995. Localization of the gene (SLC1A3) encoding human glutamate transporter (GluT-1) to 5p13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 69:209-210.
- Takayasu Y, Iino M, Ozawa S. 2004. Roles of glutamate transporters in shaping excitatory synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 19:1285-1295.
- Tanaka K. 1993a. Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain. *Neurosci Lett* 159:183-186.
- Tanaka K. 1993b. Expression cloning of a rat glutamate transporter. *Neurosci Res* 16:149-153.

- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Tao F, Liaw WJ, Zhang B, Yaster M, Rothstein JD, Johns RA, Tao YX. 2004. Evidence of neuronal excitatory amino acid carrier 1 expression in rat dorsal root ganglion neurons and their central terminals. *Neuroscience* 123:1045-1051.
- Tong G, Jahr CE. 1994. Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* 13:1195-1203.
- Torp R, Danbolt NC, Babaie E, Bjoras M, Seeberg E, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. 1994. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 6:936-942.
- Torp R, Hoover F, Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. 1997. Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and EAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. *Anat Embryol (Berl)* 195:317-326.
- Torp R, Lekieffre D, Levy LM, Haug FM, Danbolt NC, Meldrum BS, Ottersen OP. 1995. Reduced postischemic expression of a glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 103:51-58.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Trotti D, Nussberger S, Volterra A, Hediger MA. 1997a. Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *Eur J Neurosci* 9:2207-2212.
- Trotti D, Rizzini BL, Rossi D, Haugeto O, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. 1997b. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci* 9:1236-1243.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA. 1999. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2:848.
- Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. 1996. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 271:5976-5979.
- Tsuru N, Ueda Y, Doi T. 2002. Amygdaloid kindling in glutamate transporter (GLAST) knockout mice. *Epilepsia* 43:805-811.

- Velaz-Faircloth M, McGraw TS, alandro MS, Fremeau RT, Jr., Kilberg MS, Anderson KJ. 1996. Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain. *Am J Physiol* 270:C67-75.
- Vidal S, Lombardero M, Sanchez P, Roman A, Moya L. 1995. An easy method for the removal of Epon resin from semi-thin sections. Application of the avidin-biotin technique. *Histochem J* 27:204-209.
- Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. 1994. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14:2924-2932.
- Wadiche JI, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP. 1995. Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* 14:1019-1027.
- Wahle S, Stoffel W. 1996. Membrane topology of the high-affinity L-glutamate transporter (GLAST-1) of the central nervous system. *J Cell Biol* 135:1867-1877.
- Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K. 1998. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10:976-988.
- Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, Turk E, Wright EM, Hediger MA. 1992. Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am J Physiol* 263:F459-465.
- Yamada H, Yatsushiro S, Yamamoto A, Hayashi M, Nishi T, Futai M, Yamaguchi A, Moriyama Y. 1997. Functional expression of a GLT-1 type Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter in rat pinealocytes. *J Neurochem* 69:1491-1498.
- Zarbiv R, Grunewald M, Kavanaugh MP, Kanner BI. 1998. Cysteine scanning of the surroundings of an alkali-ion binding site of the glutamate transporter GLT-1 reveals a conformationally sensitive residue. *J Biol Chem* 273:14231-14237.
- Zerangue N, Kavanaugh MP. 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383:634-637.
- Zhang Y, Bendahan A, Zarbiv R, Kavanaugh MP, Kanner BI. 1998. Molecular determinant of ion selectivity of a (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-coupled rat brain glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:751-755.
- Zhang Y, Kanner BI. 1999. Two serine residues of the glutamate transporter GLT-1 are crucial for coupling the fluxes of sodium and the neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1710-1715.



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Kugler angefertigt.

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Kugler für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Angelika Schmitt für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Heike Fella und Frau Erna Kleinschroth für die gründliche Einarbeitung, großartige Unterstützung im Laboralltag und nicht zuletzt ihre Freundschaft über die letzten Jahre bedanken.

Bei Frau Julia Medvedev und Frau Doris Dettelbacher-Weber möchte ich mich für ihre wertvolle Hilfe und Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Bauer danke ich für die gute Unterstützung in der Tierhaltung und -pflege.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Detlev Drenckhahn möchte ich mich für die Überlassung der Laborräumlichkeiten und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für ihr Verständnis und ihre unschätzbare Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären.



Thorsten Smul

Lindleinstr. 4, 97080 Würzburg

## **CURRICULUM VITAE**

### **Persönliche Daten**

Geboren am 22. März 1974 in Bayreuth

### **Schulbildung**

1980-1984	Grundschule in Himmelkron/Oberfranken
1984-1992	Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium in Kulmbach
1992-1994	Städtisches wirtschafts- und naturwissenschaftliches Gymnasium in Bayreuth

### **Hochschule**

1995-2002	Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1998-2002	Doktorand am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg, Prof. Dr. P. Kugler
1997	Ärztliche Vorprüfung
1998	U.S. Medical Licensing Examination Step 1
1999	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung U.S. Medical Licensing Examination Step 2
2004	Approbation als Arzt

Würzburg, 18. Februar 2005





