

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

**Expression der Glutamattransporter GLT1 und GLAST im Hippocampus der Ratte
während der postnatalen Ontogenese**

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

vorgelegt von
Verena Schleyer
aus Königsberg

Würzburg, Dezember 2001

Referent: Professor Dr. med. P. Kugler

Korreferent: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2002

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Bau und Funktion des adulten Hippocampus	1
1.2. Entwicklung des Hippocampus.....	3
1.3. Entwicklung der glutamatergen Faserverbindungen.....	6
1.4. Entwicklung des Ependyms und Subependyms	7
1.5. Glutamat und Glutamattransporter im adulten Hippocampus	9
1.6. Fragestellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Tiere und Gewebepräparation	11
2.2. Sondenherstellung für die In-situ-Hybridisierung	11
2.3. In-situ-Hybridisierung.....	14
3. Ergebnisse	17
3.1. Neuropilschichten	17
3.2. Perikaryaschichten	27
3.3. Ependymale Zone	29
4. Diskussion.....	36
4.1. Bedeutung von Glutamat und Glutamattransportern während der Entwicklung des ZNS	36
4.2. Expression von Glutamattransportern während der Entwicklung des ZNS ..	39
4.3. Expression von Glutamattransportern und Entwicklung neuronaler Verbindungen im Hippocampus	43
5. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen	46
6. Literatur	48

1. Einleitung

1.1 Bau und Funktion des adulten Hippocampus

Aufgrund seiner einfachen Organisation ist der Hippocampus eine modellhafte Hirnregion für verschiedene neurobiologische Fragestellungen. Er besitzt Verbindungen zum Hypothalamus, zu den Septumkernen, zum Gyrus cinguli und zur Regio entorhinalis und ist ein zentraler Bestandteil des limbischen Systems. Zu seinen Funktionen zählen u.a. Beeinflussung des emotionalen Verhaltens (z.B. Aggressivität und Affekt) und Integration von vegetativen und somatischen Funktionen. Auch ist der Hippocampus beteiligt an mentalen Leistungen wie Aufmerksamkeit, Aktivität, Lernen, zeitlicher Einordnung von Bewußtseinsinhalten, Gedächtnis und Merkfähigkeit. Bei Fehlfunktionen des Hippocampus resultieren u.a. epileptische Krampfanfälle, Dämmerzustände und Gedächtnislücken (Übersicht bei Stephan 1975).

Der Hippocampus, der an die Seitenventrikel grenzt und zur Allocortex zählt, besteht aus 2 Abschnitten, dem Ammonshorn (Cornu ammonis) und der Fascia dentata (Übersicht bei Stephan 1975). Beide Gebiete weisen eine klare Schichtengliederung auf, wobei jeweils beiderseits eines neuronalen Bandes (Str. pyramidale im Ammonshorn und Str. granulosum in der Fascia dentata) Neuropilschichten angeordnet sind (Abb. 1). Das Ammonshorn läßt sich in 3 Sektoren gliedern, nämlich Cornu ammonis CA1-3. Unter dem Str. pyramidale (Perikarya der Pyramidenzellen) in Richtung Seitenventrikel befindet sich das Str. oriens mit den Axonen und Basaldendriten der Pyramidenzellen. Direkt an den Ventrikel grenzt der Alveus mit den Hippocampusefferenzen und einem kleinen Teil der Afferenzen. Der Alveus geht in die Fimbrie über. In Richtung Hippocampusfissur schließen sich über dem Str. pyramidale die Strata radiatum und lacunosum-moleculare an, die die Apikaldendriten der Pyramidenzellen enthalten. In CA3 läßt sich in der Tiefe des Str. radiatum eine zusätzliche Schicht, das Str. lucidum, abgrenzen. Es enthält die Axone (sog. Moosfasern) der Körnerzellen, die an den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen enden.

Die Körnerzellen der Fascia dentata sind im Str. granulosum lokalisiert, das das Hilum umfaßt. Ihre Dendriten ziehen ins Str. moleculare (Abb. 1). Das Hilum bildet den Übergang zum Ammonshorn und enthält als Neurone modifizierte Pyramidenzellen und polymorphe Zellen. In diesem Gebiet läßt sich als Fortsetzung von CA3

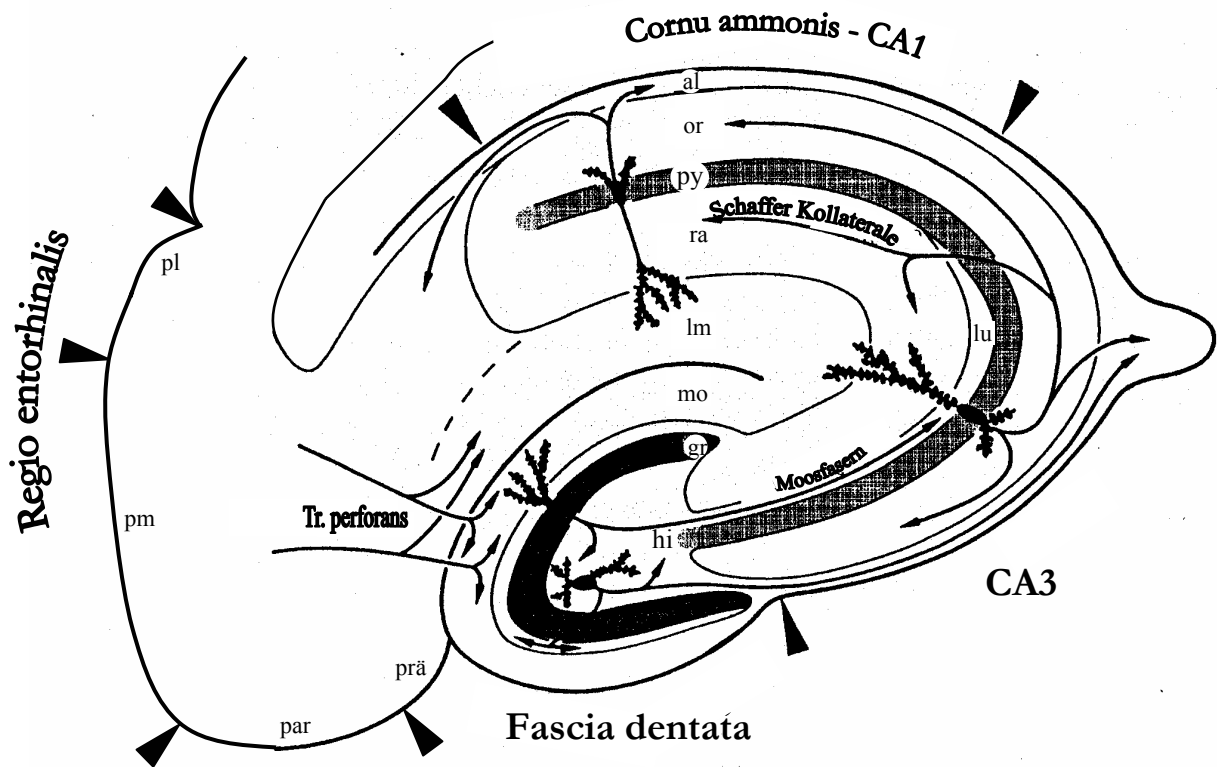


Abb. 1: Organisation (Schichtgliederung) des Hippocampus und der Regio entorhinalis mit Darstellung der wichtigsten glutamatergen Verbindungen (modifiziert nach Storm-Mathisen und Ottersen, 1989). Die wichtigsten intrinsischen glutamatergen Verbindungen des Hippocampus sind die Moosfasern und Schaffer-Kollateralen. Der Tractus perforans und die sich im Alveus (al) sammelnden und zum Subiculum ziehenden Axone der Pyramidenzellen sind die wichtigsten extrinsischen glutamatergen Verbindungen des Hippocampus.

al, Alveus; or, Str. oriens; py, Str. pyramidale; ra, Str. radiatum; lm, Str. lacunosum-moleculare; mo, Str. moleculare; gr, Str. granulosum; hi, Hilum; lu, Str. lucidum; CA, Cornu ammonis-Sektor; prä, Präsubiculum; par, Parasubiculum; pm, Pars medialis; pl, Pars lateralis. Die Pfeilspitzen kennzeichnen die Grenzen einzelner Cornu ammonis- und Regio entorhinalis-Sektoren.

das Segment CA4 abgrenzen, das als Einstülpung in das Hilum zu betrachten ist (Lorente de No 1934; Schlessinger et al. 1978). Im Neuropil des Hippocampus liegen zusätzlich verstreut Interneurone. Neben Neuronen kommen im Hippocampus, wie in anderen Hirnregionen, zahlreich Neurogliazellen, vor allem in Form von Astrozyten, vor. Besonders astrozytenreich sind das Str. lacunosum-moleculare des Ammonshorns und das Str. moleculare der Fascia dentata.

1.2 Entwicklung des Hippocampus

Die Entwicklung des Hippocampus der Ratte und auch anderer Spezies zeigt einige Besonderheiten. So entsteht er später als der Isocortex, differenziert jedoch schneller als dieser. Die Körnerzellen entstehen im Gegensatz zu den Pyramidenzellen vorwiegend postnatal und ordnen sich im Str. granulosum - entgegen der Entwicklungsrichtung im restlichen Cortex - von außen nach innen an (Stephan 1975).

Der Hippocampus entwickelt sich medial und unter den Seitenventrikeln. Die Wand der Seitenventrikel bildet die mitoseaktive Ventrikulärzone, die aus einem pseudostratifizierten Neuroepithel besteht. Von hier wandern Vorläuferzellen (Proneurone) in das Gebiet des sich entwickelnden Hippocampus aus und differenzieren dort zu Neuronen und Neurogliazellen. Das Neuroepithel der Ventrikulärzone, das für die Entwicklung des Hippocampus zuständig ist, läßt sich in 3 lateral aufeinanderfolgende Abschnitte gliedern (Altman und Bayer 1990a): 1. das ammonische Neuroepithel, aus dem u.a. die Pyramidenzellen und Astrozyten des Ammonshorns entstehen; 2. die primäre Keimschicht der Fascia dentata, lateral vom ammonischen Neuroepithel, aus dem sich u.a. Körnerzellen und Astrozyten der Fascia dentata entwickeln und 3. eine Keimzone lateral der primären Keimschicht der Fascia dentata, aus der Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) der Fimbrie hervorgehen.

Ammonshorn. Das Ammonische Neuroepithel ist ab Embryonaltag (E) 15 abgrenzbar. Zunächst bilden sich dort zwischen E15-17 große und mittelgroße Neurone, die in das Gebiet des Ammonshorn einwandern und durch Auswachsen von Fortsätzen ab E15 das Str. oriens und ab E16 die Strata radiatum und lacunosum-moleculare bilden. Die Pyramidenzellen werden vor allem zwischen E17-19 gebildet und lagern sich ab E20 zum Str. pyramidale zusammen. Das Str. pyramidale dehnt sich in Richtung Fascia dentata weiter aus, bis es - aufgrund der Größenzunahme der Fimbrie - bogenförmig in Richtung Hilum umgelenkt wird (Altman und Bayer 1990a). Während alle Pyramidenzellen des Cornu ammonis und die polymorphen Zellen des Hilum vorgeburtlich gebildet werden (Angevine 1965; Altman und Das 1965; Hine und Das 1974; Bayer und Altman 1974; Schlessinger et al. 1975), entsteht die Mehrheit der Interneurone und Gliazellen des Hippocampus erst postnatal (Bayer und Altman 1974).

Das Ammonshorn weist in der Entwicklung bestimmte Wachstumsrichtungen auf (Bayer 1980a; Abb. 2). So erfolgt z.B. die neuronale Besiedelung innerhalb einer Schicht, wie es typisch für den gesamten Cortex ist, von innen nach außen (Angevine 1965; Hine und Das 1974; Schlessinger et al. 1978). Das bedeutet, daß die Neurone, die später gebildet werden, unter die früher entstandenen wandern, so daß die älteren Neurone tiefer, innen und damit näher am Alveus liegen.

Fascia dentata. Die Entwicklung der Fascia dentata weicht vom Entwicklungsmuster des übrigen Cortex ab. Während die Schichten im Ammonshorn bereits differenziert sind, besteht die Anlage der Fascia dentata immer noch aus einer Ansammlung undifferenzierter Zellen. Im Neuroepithel ist ab E16 die primäre Keimschicht der Fascia dentata abgrenzbar. Die von dort auswandernden Vorläuferzellen bilden zunächst in einiger Entfernung zur primären Keimschicht eine sekundäre, von der die eigentliche Migration in die Fascia dentata ausgeht (Abb. 2). Mit der Ausbildung der sekundären Keimschicht ist die deutlich verzögerte Entwicklung der Fascia dentata verbunden (Altman und Bayer 1990a). Erst ab E18 entsteht das Hilum, ab E20 der laterale Schenkel des Str. granulosum und ab Postnataltag (P) 1 das Str. moleculare. Ein Teil der einwandernden Proneurone bildet in der Fascia dentata eine intradentatische Proliferationszone. Von dort aus lagern sich die Zellen bevorzugt zum medialen Schenkel des Str. granulosum zusammen, der an P3 deutlich abgrenzbar ist (erst am Ende der ersten postnatalen Woche besteht kein Unterschied mehr in Zelldichte und Schichtenbreite im Vergleich zum lateralen Schenkel) (Bayer 1980b). Diese intradentatische Proliferationszone ist postnatal der Ursprung von 85% aller Körnerzellen (Angevine 1965; Altman und Das 1965; Bayer und Altman 1974; Hine und Das 1974; Schlessinger et al. 1975). Die Proliferationszone verlagert sich im Laufe der Entwicklung. In der juvenilen Phase findet die Neurogenese vorübergehend in der basalen polymorphen Schicht (Hilum) statt. Nach dem ersten postnatalen Monat wird die subgranuläre Zone mit neuronalen Stammzellen an der Basis der Körnerzellschicht zur Quelle der Körnerzellen, die in der juvenilen und adulten Periode gebildet werden. Das postnatale Wachstum der Fascia dentata erfolgt also nicht durch Zelleinwanderung,

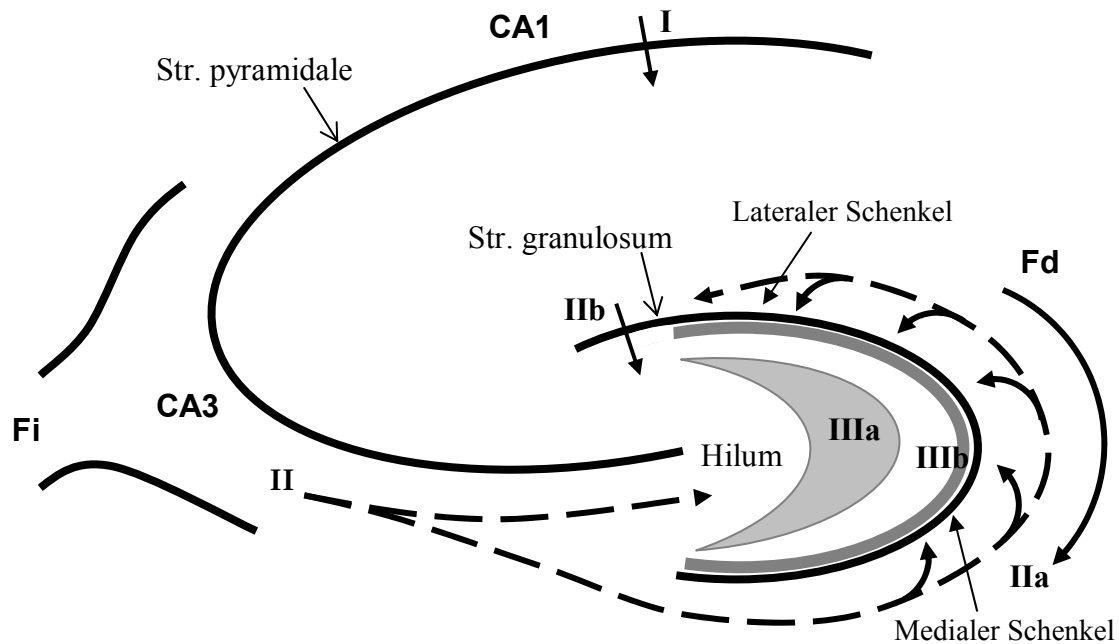


Abb. 2: Schematische Darstellung der Entwicklung der Perikaryaschichten im Hippocampus (modifiziert nach Zimmer 1975 und Altmann und Bayer 1990b). CA: Cornu ammonis Sektor, Fd: Fascia dentata, Fi: Fimbrie

Ammonshorn:

I: Ansiedlung der Proneurone innerhalb des Str. pyramidale von innen nach außen

Fascia dentata:

II: Pränatal Einwanderung der Proneurone aus der sekundären Keimschicht

IIa: Bildung des Str. granulosum vom lateralen zum medialen Schenkel

IIb: Anordnung der Proneurone von außen nach innen

III: Intradentatische Proliferationszone

IIIa: Früh postnatal Einwanderung der Proneurone aus der basalen polymorphen Schicht

IIIb: Später subgranuläre Zone an der Basis der Körnerzellschicht als Quelle der Körnerzellen

sondern durch Teilung bereits vorhandener Vorläuferzellen an Ort und Stelle, d.h. im hilumnahen Randbereich des Str. granulosum (Altman und Bayer 1990b).

Die Entwicklung der Fascia dentata findet damit in verschiedenen Wachstumsrichtungen statt (Abb. 2):

1. Die Bildung des Str. granulosum beginnt am lateralen Schenkel unter dem Sulcus hippocampi und schreitet über den Scheitel zum medialen Schenkel in Richtung Fimbrie fort (Stephan 1975).
2. Die Ansiedlung der Proneurone innerhalb des Str. granulosum erfolgt von außen nach innen. Dabei bilden die zuerst eingewanderten Proneurone eine oberflächliche Schicht (in der Nähe des späteren Str. moleculare) und die später eingewanderten Proneurone eine tiefe Schicht in Nachbarschaft zum Hilum (Angevine 1965; Altman und Das 1965,1966; Altman 1966; Bayer und Altman 1974). Die Besiedlung mit

Proneuronen erfolgt damit im Str. granulosum umgekehrt zur Pyramidenzellschicht und zu anderen corticalen Arealen (Altman und Das 1965).

1.3 Entwicklung der glutamatergen Faserverbindungen

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Transmitter im Hippocampus. Er wird von den Fasern des trisynaptischen hippocampalen Verbindungsweges benutzt (White et al. 1977; Storm-Mathisen 1981; Storm-Mathisen et al. 1983; Storm-Mathisen und Ottersen 1984), deren Terminationsgebiete bereits in der Entwicklung klar umschrieben sind und somit eine Untersuchung der glutamatergen Transmission in der Ontogenese zulassen. Der glutamaterge trisynaptische Verbindungsweg umfaßt folgende Stationen (Abb. 1):

Die wichtigste extrinsische Afferenz projiziert als Tractus perforans vom entorhinalen Cortex zum Str. moleculare der Fascia dentata und zum Str. lacunosum-moleculare von CA3 und endet an den Dendriten der Körner- und Pyramidenzellen (1. synaptische Station) (Hjorth-Simonsen 1972; Hjorth-Simonsen und Jeune 1972; Steward und Scoville 1976; Swanson et al. 1978). Dabei ziehen Fasern aus dem medialen Cortex als medialer Teil des Tractus perforans zum mittleren Drittel des Str. moleculare und terminieren an den proximalen Dendriten, während die aus dem lateralen Teil als lateraler Tractus perforans zum äußeren Drittel des Str. moleculare zu den distalen Dendriten projizieren. Vom entorhinalen Cortex zum Str. lacunosum-moleculare von CA1 ziehende Fasern werden dagegen als Tractus temporo-ammonis bezeichnet (Hjorth-Simonsen 1972; Hjorth-Simonsen und Jeune 1972; Steward und Scoville 1976; Swanson et al. 1978). Die Axone der Körnerzellen ziehen als Moosfasern zum Str. lucidum von CA3 und bilden dort Synapsen mit den Pyramidenzellen (2. synaptische Station) (Blackstad et al. 1970; Gaarskjaer 1978; Swanson et al. 1978). Die Axone der CA3-Pyramidenzellen enden ipsi- und contralateral in den Strata oriens und radiatum von CA3 und CA1 (3. synaptische Station) (Hjorth-Simonsen 1973; Swanson et al. 1978). Die ipsilateral zum Str. radiatum von CA1 ziehenden Fasern werden als Schaffer-Kollateralen bezeichnet und enden an den Dendriten der Pyramidenzellen.

Über die Entwicklung der extrinsischen (Tractus perforans) und intrinsischen (Moosfasern, Schaffer-Kollateralen) Verbindungen ist Folgendes bekannt:

Die Terminale des Tractus perforans sind bereits am Tag der Geburt im Str. lacunosum-moleculare von CA3 nachweisbar (Stanfield und Cowan 1988; Loy 1980). Die zum

lateralen Schenkel ziehenden Fasern des Tractus perforans sind im Str. moleculare ab P3 deutlich abgrenzbar. Im Bereich des medialen Schenkels sind im Str. moleculare die medialen Afferenzen ab P7 sichtbar. An P11 läßt sich dort auch der laterale Tractus perforans nachweisen (Tamamaki 1999). Die Tractus perforans - Afferenzen erzeugen ab P6 erste postsynaptische Potenziale (Bekenstein und Lothman 1991). Die am frühesten gebildeten Körnerzellen beginnen bereits pränatal mit der Ausbildung von Moosfasern, entweder bereits auf ihrem Weg zur Fascia dentata oder kurz nach ihrer Ankunft, so daß zum Zeitpunkt der Geburt einzelne Moosfasern im Hilum und in CA3 nachweisbar sind (Amaral und Dent 1981; Gaarskjaer 1986). Die Mehrzahl der Körnerzellen entsteht postnatal. Sie bilden erst einige Zeit nach ihrer Ankunft Axone. Die Ausbildung der Moosfasern erfolgt in derselben Reihenfolge wie die Anordnung der Körnerzellen im Str. granulosum, nämlich von lateral nach medial und von den oberflächlichen zu den tiefen Schichten (Gaarskjaer 1985). Erste Synapsen mit den Pyramidenzellen sind bereits an P1 ausgebildet (Amaral und Dent 1981). Ab P15 ist das Moosfasersystem ausgereift (Bliss et al. 1974; Gaarskjaer 1985; Cook und Crutcher 1988). Die Schaffer-Kollaterale sind bereits am Tag der Geburt im Str. radiatum nachzuweisen (Diabira et al. 1999; Loy 1980). Ab P2 sind sie funktionsfähig (Zimmer 1978).

1.4 Entwicklung des Ependyms und Subependyms

Das Ependym geht aus dem Neuroepithel der Ventrikulärzone hervor (Del Bigio 1995), die sich an P1 vollständig zurückgebildet hat (Bayer 1980b). Es bildet das Dach der Seitenventrikel, breitet sich nach medial aus und zieht nach lateral unten, um den Boden der Seitenventrikel zu bilden, der den Hippocampus bedeckt (Abb. 3). Am Ventrikeldach schließt sich der einzelligen Ependymschicht eine mehrschichtige subependymale Zone an (Smart 1961; McDermott und Llantos 1991). Sie ist ein Überrest der embryonalen subventrikulären Zone und besteht aus einer Mischung von Astrozytenzellkörpern und -fortsätzen, Mikroglia, ektopen Ependymzellen, Proneuronen und ihren Vorläuferzellen (Doetsch et al. 1997). Der Ventrikelboden (dem Hippocampus anliegend) besteht nur aus einer Schicht Ependymzellen mit einzelnen subependymalen Zellen. Am medialen Rand des Seitenventrikels befindet sich eine Ansammlung von vorwiegend subependymalen Zellen mit einer geringen Zahl

Ependymzellen. Diese Zellansammlung nimmt mit zunehmendem Alter ab und verschwindet am Ende der ersten postnatalen Woche. Der mediale Anteil des Seitenventrikels obliteriert schließlich vollständig und hinterläßt eine streifenförmige Ansammlung ependymaler und subependymaler Zellen, die in der postnatalen Entwicklung zunehmend weniger werden (Abb. 3). Auch im lateralen Teil des Seitenventrikels beginnt einige Tage nach der Geburt an mehreren Stellen eine Adhäsion der gegenüberliegenden Ependymschichten, die mit zunehmendem Alter fortschreitet. Die aneinanderliegenden zwei Ependymschichten verschmelzen zunächst zu einer einzigen und verschwinden teilweise ganz. So bildet sich über größere Strecken in der zweiten bis dritten postnatalen Woche das Ependym und das Subependym zunächst über dem Hippocampus, dann in der lateralen Region zurück. Dennoch können im adulten Gehirn noch vereinzelt Ependyminseln beobachtet werden (Kawamata et al. 1995) (Abb. 3).

Das Ependym bzw. Subependym enthält zeitlebens multipotente Stammzellen. Diese produzieren die Vorläuferzellen von Gliazellen und Neuronen (Chiasson et al. 1999).

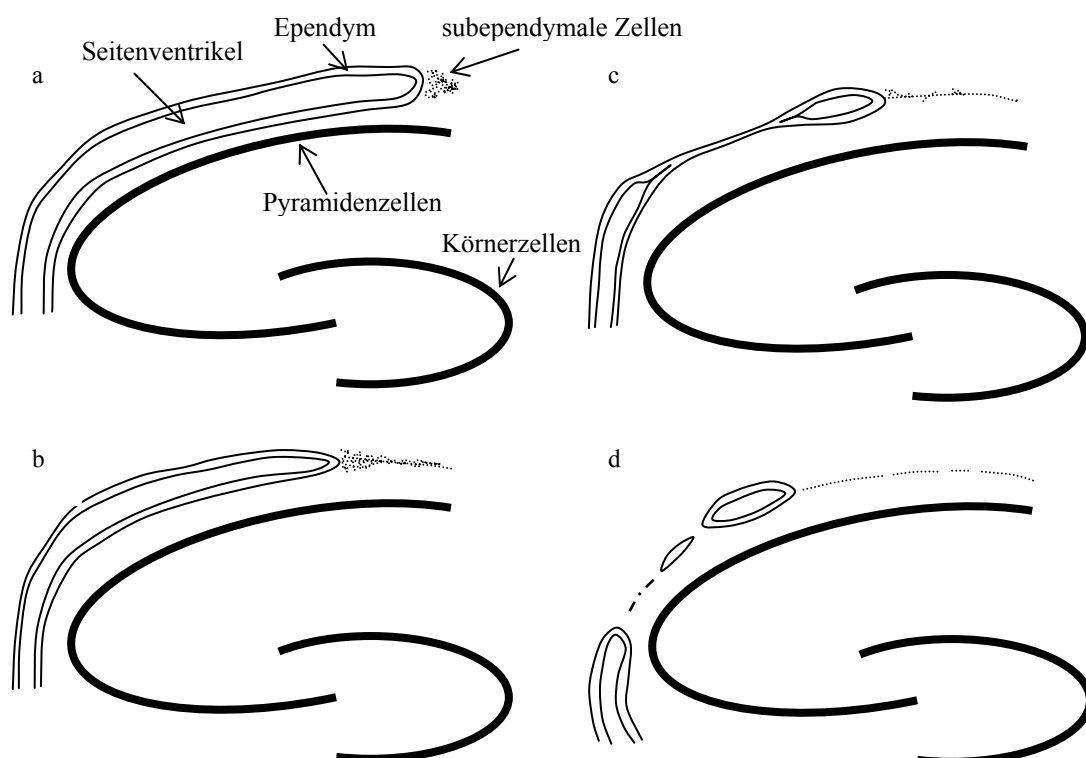


Abb. 3: Schematische Darstellung der postnatalen Entwicklung der ependymalen Zone (modifiziert nach Kawamata et al. 1995).

- a: Seitenventrikel mit einer Ansammlung ependymaler und subependymaler Zellen medial von diesen
- b: Obliteration des medialen Anteils des Seitenventrikels unter Hinterlassen einer streifenförmigen Ansammlung ependymaler und subependymaler Zellen
- c: Stellenweise Adhäsion und Verschmelzung gegenüberliegender Ependymschichten im lateralen Teil des Seitenventrikels
- d: Rückbildung von Ependym und Subependym mit dazwischenliegenden Ependyminseln

1.5 Glutamat und Glutamattransporter im adulten Hippocampus

Glutamat ist der wichtigste excitatorische Transmitter im ZNS im Allgemeinen und im Hippocampus im Besonderen (Fonnum et al. 1984; Levy et al. 1993). Glutamat wirkt jedoch in höheren Konzentrationen auch neurotoxisch (Choi et al. 1987; Manev et al. 1989; Kiryu et al. 1995). Glutamattransporter haben die Aufgabe, Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu entfernen und somit 1. das Transmittersignal zu beenden (Fonnum et al. 1984) und 2. eine toxische Anreicherung von Glutamat zu verhindern (Nicholls und Attwell 1990; Kanai et al. 1993). Die Transporter stellen dabei ein rasches, hochaffines Aufnahmesystem dar, wobei der Großteil des Glutamats in Gliazellen aufgenommen wird (Danbolt et al. 1990; Pines et al. 1992; Levy et al. 1993; Kanai et al. 1994a/b).

Von den bisher klonierten Glutamattransportern konnten im adulten Hippocampus drei (GLAST, GLT1 und EAAC1) mittels ISH und Immunocytochemie nachgewiesen werden. GLAST ist in Zellmembranen von Astrozyten (Storck et al. 1992; Rothstein et al. 1994; Torp et al. 1994; Chaudhry et al. 1995; Lehre et al. 1995; Schmitt et al. 1997) und Ependymzellen lokalisiert (Kugler und Schmitt 1999). GLT1-Protein konnte bisher nur in Zellmembranen von Astrozyten nachgewiesen werden (Danbolt et al. 1992; Levy et al. 1993; Rothstein et al. 1994; Torp et al. 1994,1997; Chaudhry et al. 1995; Lehre et al. 1995; Schmitt et al. 1996), wobei GLT1-mRNA jedoch zusätzlich auch in Pyramidenzellen von CA3 und 4 vorkommt (Torp et al. 1994; Lehre et al. 1995; Schmitt et al. 1996). Der Transporter EAAC1 ist nicht nur in Pyramiden- und Körnerzellen lokalisiert (Kanai und Hediger 1992; Rothstein et al. 1994; Kanai et al. 1995; Velaz-Faircloth et al. 1996; Bjoras et al. 1996; Torp et al. 1997), sondern auch in Oligodendrozyten und Ependymzellen (Kugler und Schmitt 1999).

Die Bedeutung der drei Glutamattransporter ist aus gentechnisch veränderten Mäusen ersichtlich. Während die Ausschaltung von GLAST- (Watase et al. 1998) und EAAC1- (Peghini et al. 1997) Genen keine offensichtlichen Folgen nach sich zieht, führt die Ausschaltung des GLT1-Gens zum Pyramidenzellverlust in CA1 des Hippocampus und zu tödlichen Krampfanfällen bei diesen Tieren (Tanaka et al. 1997). Das Fehlen von GLT1 scheint somit zu einer neurotoxischen Anreicherung von Glutamat im Nervengewebe zu führen.

1.6 Fragestellung

Glutamat scheint in der Entwicklung des ZNS für Differenzierung und Migration von Proneuronen von besonderer Bedeutung zu sein (Pearce et al. 1987, Mattson et al. 1988a, Owen und Bird 1997 und Shibata et al. 1997), wobei die lokale Glutamatkonzentration u.a. durch Glutamatttransporter geregelt wird (Kanai et al. 1993, Sutherland et al. 1996). Trotz dieser entwicklungsgeschichtlichen Bedeutung von Glutamatttransportern ist über die Expression von Glutamatttransportern in der postnatalen Ontogenese bisher wenig bekannt.

Ziel der Untersuchungen ist deshalb, mittels nichtradioaktiver In-situ-Hybridisierung (ISH) unter Verwendung Digoxigenin(DIG)-markierter cRNA-Sonden die zelluläre und regionale Expression der „glialen“ Glutamatttransporter GLAST und GLT1 im Hippocampus während der Ontogenese der Ratte (Postnataltage P1, P3, P6, P8, P10, P20, P30 und P60) nachzuweisen. Es sollte auch festgestellt werden, ob die Expression beider Transporter in denselben Zelltypen erfolgt wie bei adulten Tieren (GLAST: in Astrozyten und Ependymzellen; GLT1: neben Astrozyten auf m-RNA-Ebene auch in Pyramidenzellen von CA3 und 4). Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob Unterschiede in der Transporterexpression zwischen den einzelnen Schichten während der postnatalen Ontogenese bestehen und ob diese mit der Entwicklung glutamaterger Faserverbindungen korrelieren.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Gewebepräparation

Für die Untersuchungen wurden 40 männliche Wistarratten aus eigener Zucht verwendet, je 5 im Alter von P1 (Tag der Geburt), P3, P6, P8, P10, P20, P30 und P60. Nach Dekapitation der Tiere in Äthernarkose wurden die Gehirne (Großhirn) entfernt, mit in flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren, anschließend in Aluminiumfolie verpackt und bei -80°C gelagert.

2.2 Sondenherstellung für die In-situ-Hybridisierung

Die GLT1- und GLAST-Klone standen aus vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Verfügung (Schmitt et al. 1996,1997). Die cDNA umfaßte bei GLT1 1738 nt und bei GLAST 1706 nt. Die Herstellung der Sonden für die In-situ-Hybridisierung erfolgte nach den Methoden von Sambrook et al. 1989 und Schmitt et al. 1996.

Linearisierung der Plasmide

Als Ausgangsmaterial der In vitro-Transkription dienten pBluescript SK⁺-Vektoren (pB), in die cDNA-Fragmente inseriert waren. Die für die Glutamattransporter GLT1 und GLAST spezifischen cDNA-Fragmente befanden sich in einer Multiple Cloning Site, die von einem T3- und T7-Promotor flankiert waren. Jeweils 1 µg Plasmid-DNA wurde durch verschiedene Restriktionsendonukleasen bei 37°C (für 2 h) linearisiert. Dabei wurden folgende Ansätze verwendet:

GLT1 Anti-Sense (A.S.): 1,0 µl Plasmid (pB GLT1; 1000 µg/ml); 3,0 µl Puffer BamHI (10x; MBI-Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland); 23,0 µl A. bidest; 3,0 µl BamHI-Restriktionsendonuklease (Boehringer, Mannheim, Deutschland); Endvolumen: 30,0 µl.

GLAST A.S.: 1,0 µl Plasmid (pB GLAST; 1000 µg/ml); 3,0 µl Puffer Y (10x; MBI-Fermentas); 23,0 µl A. bidest; 3,0 µl ClaI-Restriktionsendonuklease (Boehringer); Endvolumen: 30,0 µl.

Die geschnittenen Plasmide wurden zur Enzymdenaturierung 10 min bei 68°C erhitzt und danach auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Das Ergebnis der Linearisierung

wurde anschließend durch eine Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden je 2 µl der linearisierten Plasmide mit 3 µl 1x TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; pH 8.0; Merck, Darmstadt, Deutschland)] und 1 µl 6x Probenpuffer (PP; 1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt. Dann wurden die Plasmid-Pufferlösungen 5 min bei 68°C auf einem Heizblock erhitzt und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle dienten ein DNA-Größenmarker und das nicht linearisierte Plasmid. Zum Ansetzen der Agarose sowie als Laufpuffer diente 1x TBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA). Die Laufzeit für die Gelelektrophorese betrug ca. 1,5 h bei 6 V pro cm Elektrodenabstand. In einer 0,5%igen Ethidiumbromidlösung wurde das Gel daraufhin 30 min unter Schütteln gefärbt, kurz mit Wasser abgespült und unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) fotografiert.

Reinigung der linearisierten Plasmid-DNA

Die Reinigung der linearisierten Plasmid-DNA erfolgte durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)-Extraktion. Das Volumen der Plasmid-Lösung (30,0 µl) wurde mit A. bidest [Diethylpyrocarbonat-behandelt (DEPC; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)] auf 220 µl aufgefüllt, das gleiche Volumen einer Roti-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (im Verhältnis 25:24:1; Verwendung von TE-gesättigtem Phenol; Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und gründlich gemischt. Das Gemisch wurde für 6 min bei 13000 U/min in einer Eppendorftischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (25:1) versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde die Lösung für 4 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde dann mit 30 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5.2) und 750 µl 100%igem Alkohol bei -20°C für 1-2 h gefällt. Nach anschließender 13minütiger Zentrifugation (13000 U/min) wurde das entstandene Sediment mit 80%igem Alkohol gespült. Das nach erneuter Zentrifugation getrocknete DNA-Pellet wurde in 20,5 µl A. bidest (DEPC) gelöst.

In vitro-Transkription

Die Transkriptions- und damit gleichzeitige Markierungsreaktion wurde für 2 h bei 37°C durchgeführt. Die T3- bzw. T7-RNA-Polymerasen binden spezifisch an die oben

erwähnten Promotoren und transkribieren je nach Orientierung des inserierten Fragmentes Sense- oder Antisense-Sonden (sog. run off-Transkripte).

Der Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 20,5 µl 1µg linearisiertes Plasmid gelöst in A. bidest (DEPC); 3,0 µl DIG-RNA-Labelingmix (Markierungsmix; 10x; 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-UTP in Tris-HCl; pH 7.5; Boehringer); 3,0 µl Transkriptionspuffer [10x; 400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM Cl₂, 100 mM Dithioerythritol (DTE); Boehringer]; 3,0 µl RNA-Polymerase [20 U/µl; Boehringer (bei GLT1 A.S.: T7-RNA-Polymerase; bei GLAST A.S. : T3-RNA-Polymerase)]; 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl; Boehringer); Endvolumen: 30,0 µl

Die Transkriptionsreaktion wurde durch DNase I-Verdau beendet. Dies erfolgte durch Inkubation mit 2 µl DNase I (RNase frei; 10 U/µl; Boehringer) für 15 min bei 37°C. Der DNase I-Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA (0,5 M; pH 8.0) beendet. Die Länge der entstandenen Transkripte (cRNA) wurde in einem Agarosegel (1%) überprüft. Dafür wurden 1,5 µl Markierungslösung und 3,5 µl A. bidest (DEPC) zusammenpipettiert und mit 1 µl Probenpuffer versetzt. Die Herstellung und Entwicklung des Kontrollgels erfolgte wie bereits oben beschrieben. Die jeweiligen RNA-Banden wurden fotografisch dokumentiert.

Extraktion und Fällung der cRNA

Die DIG-markierte cRNA wurde mittels PCI-Extraktion (s.o.) gereinigt. Zum Reinigen der RNA wurde Aqua-Roti-Phenol (wassergesättigtes Phenol) verwendet. Mit 30 µl 0,8 M Lithium-Chlorid und 900 µl 100%igem Ethanol wurde anschließend die cRNA über Nacht bei -20°C gefällt.

Sedimentation und Aliquotierung der cRNA-Sonde

Nach Sedimentation durch Zentrifugieren in einer Ultrazentrifuge (TL-100 Ultrazentrifuge, Beckman Instruments, München, Deutschland) für 60 min bei 4°C (12000 g) wurde das entstandene Pellet mit 80%igem Alkohol gespült und erneut für 30 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 40 µl A. bidest (DEPC) gelöst. Dann erfolgte eine fotometrische Konzentrationsbestimmung. Die cRNA-Sonden wurden mit A. bidest (DEPC) 1:250 verdünnt und ihre Extinktion bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Da Proteine und Nukleinsäuren

bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ ein gemeinsames Extinktionsmaximum aufweisen, kann die Proteinverunreinigung der cRNA-Sonden durch Bestimmung des folgenden Quotienten abgeschätzt werden:

$$\frac{\text{Extinktion (260 nm)}}{\text{Extinktion (280 nm)}}$$

Werte $> 1,8$ lassen auf eine nicht verunreinigte Sonde schließen.

Die Konzentration der produzierten cRNA wurde nach folgender Formel berechnet:

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) = gemessene $\text{OD}_{260} \times 250$ (Verdünnung) $\times 40 \mu\text{g/ml}$ (1 OD = 40 μg RNA). Durchschnittlich entstanden aus 1 μg der eingesetzten Plasmid-DNA 10-30 μg DIG-markierte cRNA, wobei jede Sonde durchschnittlich 1500 Nukleotide lang war. Die cRNA-Sonde wurde aliquotiert, eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.3 In-situ-Hybridisierung

Vorbehandlung der Schnitte

Im Kryostat wurden bei ca. -20°C 12 μm dicke Frontalschnitte der Großhirnhemisphären angefertigt und auf Superfrost-Plus-Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) montiert. Anschließend wurden die Schnitte aufgetaut und in frisch hergestelltem 4%igen Formaldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; pH 7.0; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4) 5 min bei RT fixiert. Die fixierten Schnitte wurden in absoluten Alkohol überführt und mehrere Tage bei 4°C gelagert. Nach Entnahme aus dem Alkohol wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert: je 1 min in 95%igem und 80%igem; 2 min in 70%igem Ethanol. Nach Spülen in 2x SSC [20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat; Verdünnung erfolgte mit A. bidest (DEPC)] für 2x10 min erfolgte eine schwache Deproteinierung mit 0,02 M HCl [in Ampuwa (DEPC)] für 5 min. Daraufhin wurden die Schnitte nochmals für 2x5 min mit 2x SSC gespült. Dann wurde für 20 min mit 0,25%igem Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8.0) acetyliert. Abschließend erfolgte ein nochmaliges Spülen in 2x SSC für 2x 5 min.

Hybridisierung

Für die Herstellung der Hybridisierungslösung wurden 950 µl 2x Hybridisierungspufferlösung (8x SSC, 20% Dextransulfat, 2x Denhardt's Lösung, RNase frei) mit 1000 µl Formamid gemischt und steril filtriert. 50 µl Lachssperma-DNA (ss-DNA Typ III, RNase frei; 10 mg/ml; Sigma) wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und dazupipettiert. Dann wurde die gewünschte Menge Antisense-(Sense)-cRNA-Sonde zugefügt und durch 5minütiges Erhitzen bei 84°C von Sekundärstrukturen befreit. Auf die vorbehandelten Schnitte wurden je 100 µl Hybridisierungslösung aufgetragen und die Schnitte, um Austrocknung zu verhindern, mit Parafilm bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16-18 h) bei 60°C in einer feuchten Kammer.

Posthybridisierung

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit 2x SSC, dann für dieselbe Zeit bei 58°C mit 1x SSC/50% Formamid und schließlich für 2x10 min wiederum bei RT mit 2x SSC gespült. Daraufhin erfolgte zur Entfernung nicht hybridisierter Einzelstrang-cRNA eine 30minütige Behandlung mit ca. 30 µg/ml RNase A (50 Kunitz-U/mg; Boehringer) in RNasepuffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA] bei 37°C. Die Einzelstrang-cRNA-Bruchstücke wurden durch 30minütiges Spülen mit RNasepuffer bei 60°C entfernt.

Sondennachweis

Vor dem Nachweis der DIG-markierten cRNA wurden die Schnitte bei RT zunächst 5 min mit DIG 1-Puffer [Trisgepufferte Kochsalzlösung, TBS; 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] gespült und zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen 30 min mit 1%igem Blocking Reagenz (Boehringer) in DIG 1-Puffer behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer für 15 min mit 0,3%igem Triton X-100 (Roth) in DIG 1-Puffer bedeckt. Dann wurden sie für 60 min mit Anti-DIG-Antikörpern, an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist (Anti-Digoxigenin-aP; Fab-Fragmente vom Schaf; 1,5 U/ml; Boehringer; 1:500 in DIG 1-Puffer mit Triton X-100 verdünnt), inkubiert. Die Schnitte wurden nochmals für 2x5 min in DIG 1-Puffer und 5 min in DIG 3-Puffer [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂] gespült. Bei 25°C wurden die Schnitte (bei GLAST für 18 - 70 und bei GLT1 für 6 - 23 h) im Dunkeln in einem gefilterten aP-Reaktionsmedium entwickelt. Das

Reaktionsmedium bestand aus DIG 3-Puffer sowie 0,4 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (BCIP; Boehringer) und 0,4 mM Tetranitroblau-Tetrazoliumchlorid (TNBT; Serva, Heidelberg, Deutschland) bestand. Anschließend wurde die Reaktion mit DIG 4-Puffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,1 mM EDTA] abgestoppt. Zuletzt wurden die Schnitte mit A. dest. gespült und schließlich mit Karyon F (Merck; mit A. bidest 2:1 verdünnt) eingedeckt.

Kontrolle

Zum Nachweis der Spezifität der ISH wurden statt der Antisense-Proben Sense-Proben verwendet.

Doppelmarkierung

Sie diente der zellulären Charakterisierung ISH-positiver Zellen. Ausgewählte Schnitte (P3, 6, 10, 20, 60) wurden nach dem Nachweis der GLAST-cRNA-Sonde für die immunocytochemische Detektion von saurem Gliafilamentprotein (GFAP) und Vimentin verwendet. Beide Proteine kommen in Astroblasten/Astrozyten vor, Vimentin auch in Gefäßen. Nach dem Nachweis der alkalischen Phosphatase (und Spülen mit A.dest., s.o.) wurden die Schnitte mit monoklonalen Antikörpern gegen GFAP (1:10000, Dako, Hamburg, Deutschland) und Vimentin (Chemicon, Hofheim/Taunus, Deutschland) inkubiert. Als Zweitantikörper diente Ziege-Anti-Maus Ig G (1:200, Dako). Der Zweitantikörpernachweis erfolgte mit Avidin-biotinyliertem Meerrettichperoxidasekomplex (Dako). Die histochemische Reaktion zum Nachweis von Meerrettichperoxidase wurde mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Chromogen und Glucoseoxidase (Sigma) und β -D-Glucose durchgeführt (Einzelheiten bei Asan 1998).

Auswertung

Die Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch unter Berücksichtigung verschiedener Parameter (s.u.) ausgewertet. Repräsentative Schnitte wurden mit einem Zeiß-Photomikroskop fotografiert. Die Veränderungen der Reaktionsstärke von Zellen während der postnatalen Entwicklung wurden subjektiv bewertet und in Form von Kurvendiagrammen dargestellt.

3. Ergebnisse

Die regionale und zelluläre Verteilung der mRNA der Glutamattransporter GLT1 und GLAST wurde während der postnatalen Ontogenese des Hippocampus (Altersstufen P1-P60) mittels ISH (unter Verwendung von cRNA-Sonden) untersucht. Dabei wurden folgende Parameter beurteilt: Veränderungen der zellulären ISH-Reaktion, der Dichte und der Reaktionsstärke positiver Zellen in den Neuropil- und Perikaryaschichten und in der ependymalen Zone.

3.1 Neuropilschichten

Folgende Neuropilschichten des Hippocampus wurden ausgewertet: die Strata oriens, radiatum und lacunosum-moleculare des Cornu ammonis (Abschnitte CA1-3); das Str. moleculare und das Hilum der Fascia dentata (vgl. Abb. 1). Sie enthalten u.a. Axone und Dendriten von Pyramiden- bzw. Körnerzellen, Afferenzen von Projektionsneuronen sowie die Zelleiber von Gliazellen (vor allem Astrozyten).

An P1 ist die typische Hippocampusformation noch nicht entwickelt (Abb. 5a). In den Abschnitten CA1 und CA3 des Ammonshorns sind die Strata radiatum und lacunosum-moleculare noch nicht voneinander abgrenzbar. In der Fascia dentata liegt der laterale Schenkel mit seiner Gliederung in Hilum, Str. granulosum und Str. moleculare bereits vor, während im Bereich des sich später entwickelnden medialen Schenkels noch keine Schichten differenzierbar sind. Statt dessen besteht hier eine diffuse Ansammlung von Zellen, die sogenannte Proliferationszone (Zimmer und Haug 1978).

An P3, P6, P8 und P10 ist die Schichtenarchitektur des Hippocampus noch immer unvollständig ausgebildet. Ab P3 läßt sich jetzt auch der mediale Schenkel der Fascia dentata deutlich abgrenzen. Es dauert jedoch bis zum Ende der ersten postnatalen Woche, bis beide Schenkel in Zelldichte und Schichtenbreite keine Unterschiede mehr zeigen. An P8 läßt sich das Str. lacunosum-moleculare aufgrund deutlich kleinerer Gliazellen vom Str. radiatum unterscheiden (Abb. 5c).

Die Altersstufen ab P20 zeigen das adulte Verteilungsmuster mit charakteristischer Schichtgliederung (Abb. 5d).

GLT1. An P1, P3 und P6 weisen die Gliazellen in den untersuchten Neuropilschichten des Ammonshorns eine überwiegend schwache ISH-Reaktion auf (Abb. 4, 5a, b). Die Zahl positiver Gliazellen ist im Bereich der Strata radiatum und lacunosum-moleculare größer als im Str. oriens und nimmt während dieser Entwicklungstage geringgradig zu. In der Fascia dentata gibt es anfänglich nur vereinzelt schwach positiv reagierende Zellen, ihre Zahl nimmt jedoch bis P6 deutlich zu. Im Str. moleculare befinden sich im Bereich des entstehenden medialen Schenkels insgesamt nur relativ wenige positive Zellen. Der im lateralen Schenkel liegende Abschnitt der Molekularschicht ist aufgrund eines ähnlichen zellulären Reaktionsmusters kaum von den Strata radiatum und lacunosum-moleculare des Ammonshorns zu unterscheiden. Das Hilum enthält zunächst nur relativ wenige positiv reagierende Gliazellen.

An P8 (Abb. 5c) und P10 ist die Zahl positiver Gliazellen in den einzelnen Schichten ähnlich wie an P6, ihre Reaktionsstärke hat im Ammonshorn und der Fascia dentata aber deutlich zugenommen (mittelstarke Reaktion; Abb. 4). Im Bereich von CA1 sind Reaktion, Anzahl und Verteilung der Gliazellen in den Strata oriens, radiatum und lacunosum-moleculare ähnlich. Das Str. lacunosum-moleculare ist aufgrund seiner

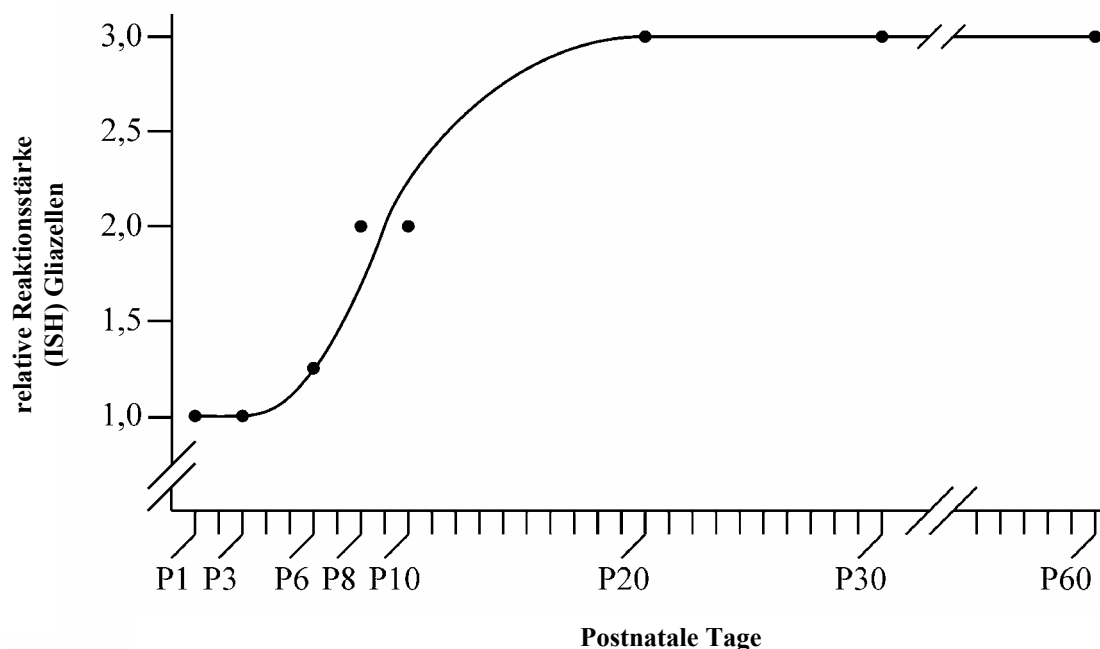


Abb. 4: Veränderungen der relativen Reaktionsstärke (GLT1-ISH-Reaktion) von Gliazellen im Hippocampus während der postnatalen Entwicklung.

Die im Lichtmikroskop ermittelte (subjektive) Reaktionsstärke der Gliazellen reicht von schwach (=1) bis sehr stark (=3).

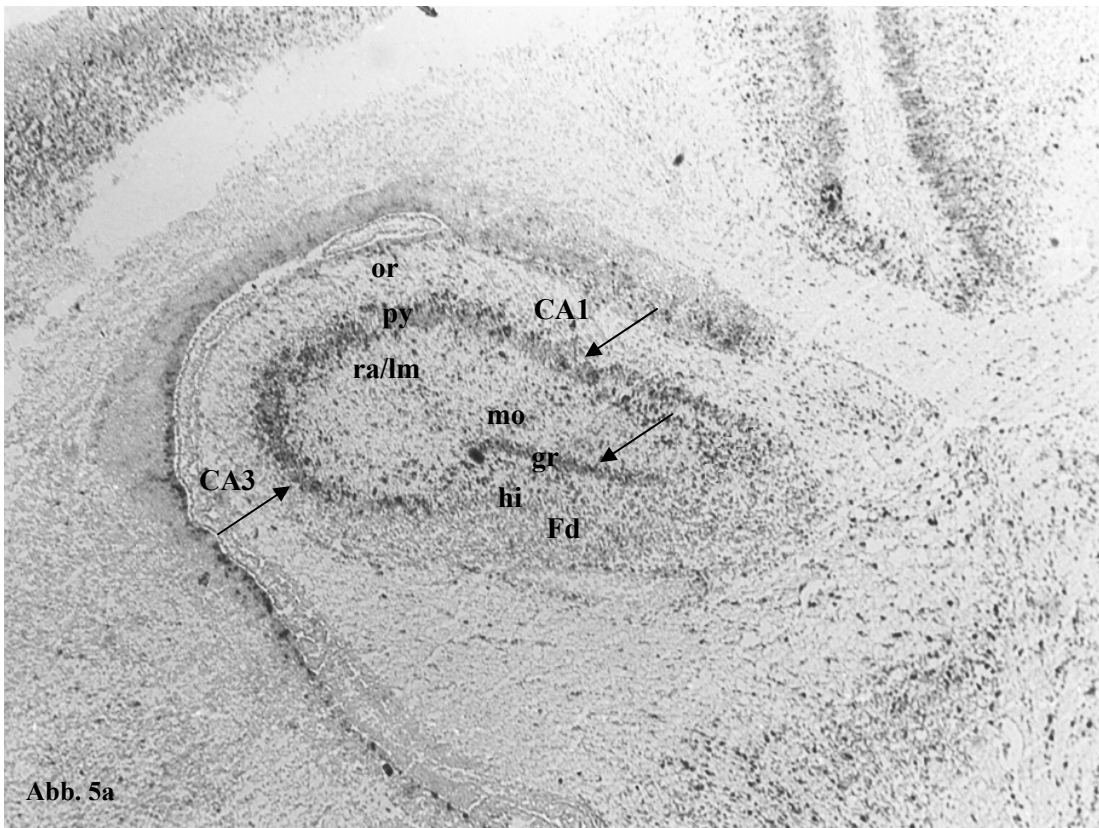


Abb. 5a

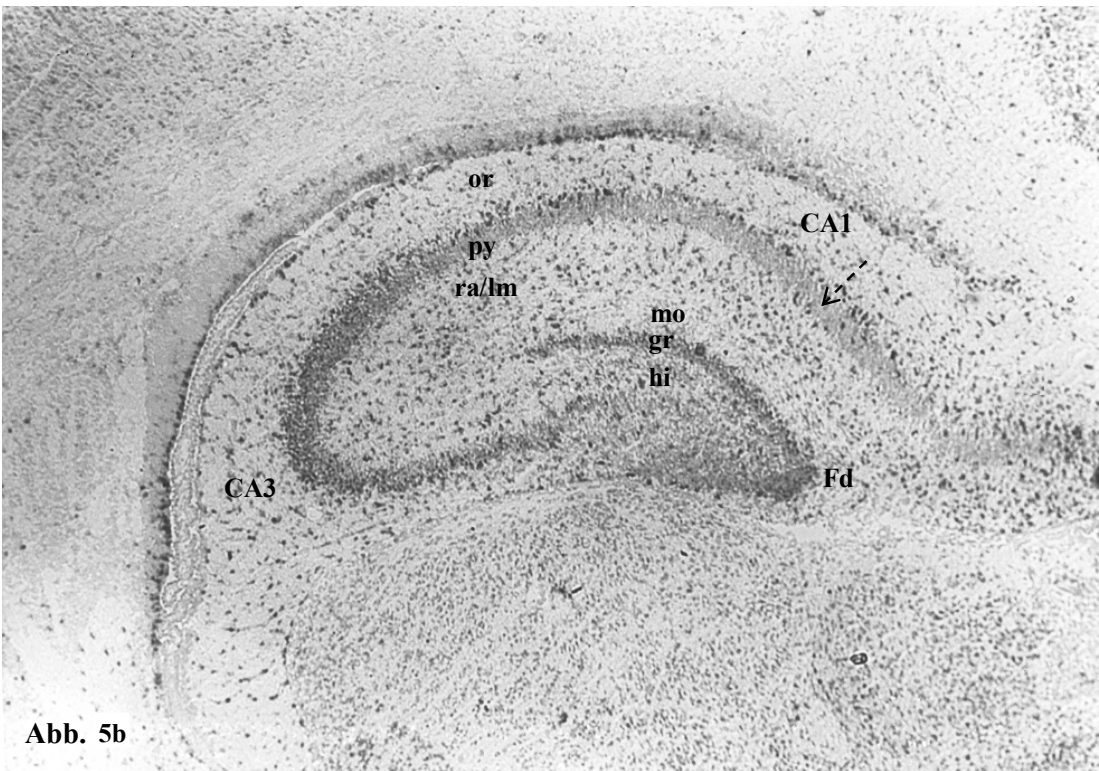


Abb. 5b

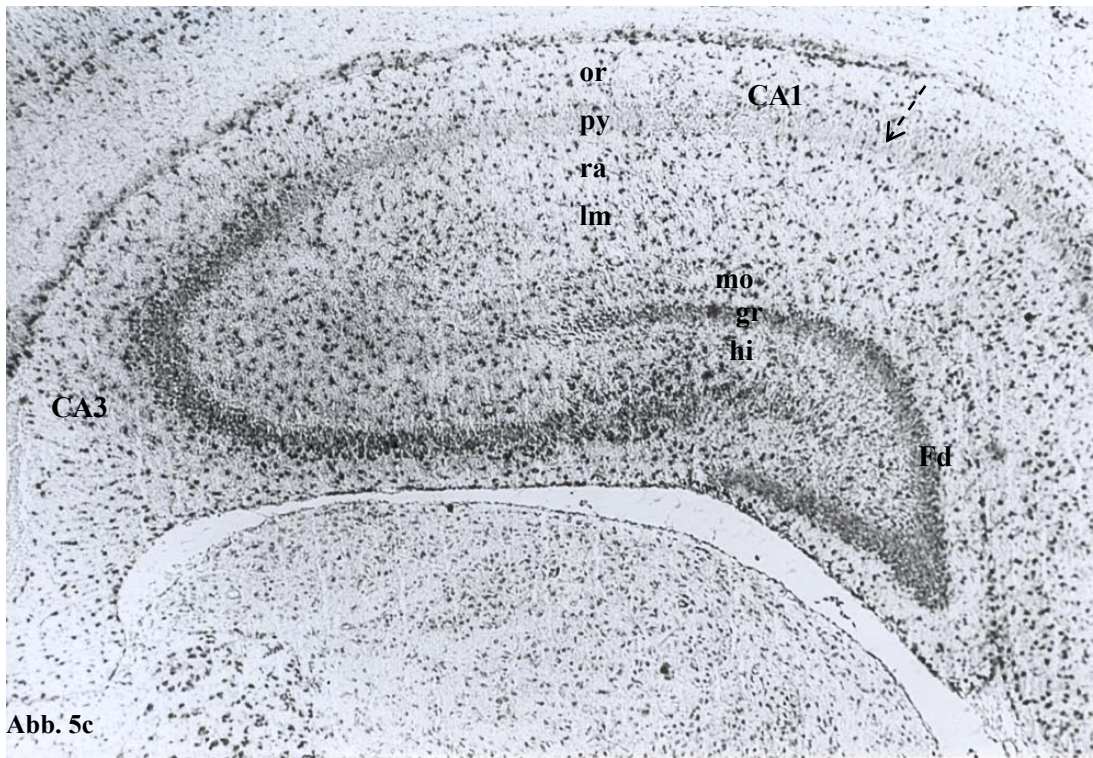


Abb. 5c

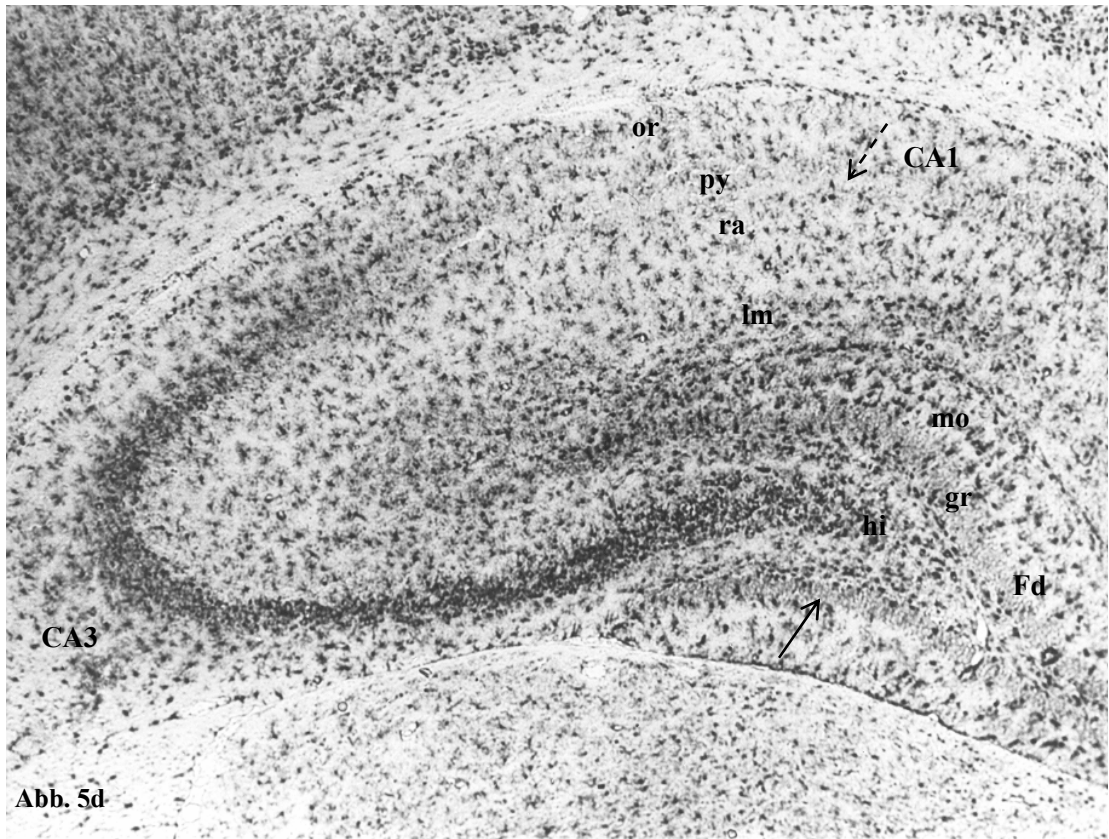


Abb. 5d

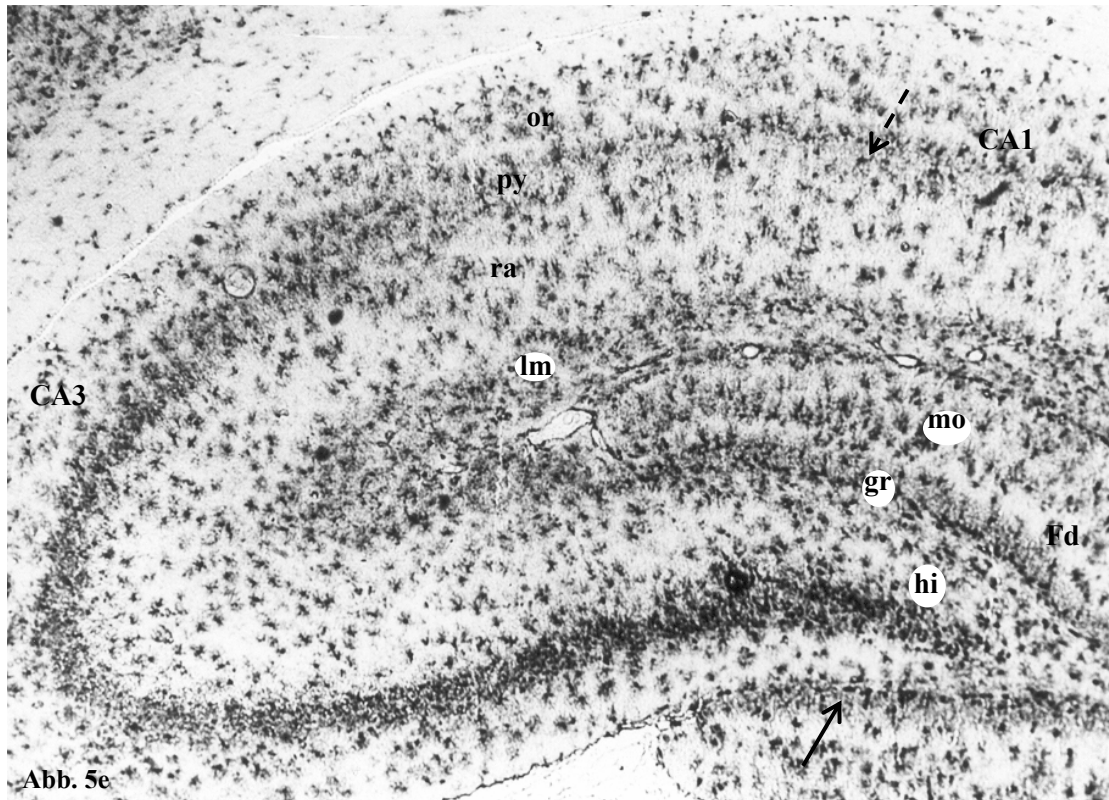


Abb. 5a-e: Nachweis von GLT1-mRNA im Hippocampus der Ratte an P1 (a), P3 (b), P8 (c), P20 (d) und P60 (e).

An P1 (a) und P3 (b) weisen die Gliazellen eine schwache ISH-Reaktion auf. Die Strata radiatum und lacunosum-moleculare des Ammonshorns und der innere Anteil des Str. moleculare (Fascia dentata) reagieren stärker als die übrigen Schichten. An P8 (c) hat die Reaktionsstärke der Gliazellen auf mittelstarke Werte zugenommen. An P20 (d) und P60 (e) zeigen die Gliazellen eine stark positive Reaktion. Das Str. moleculare und das Hilum der Fascia dentata reagieren am stärksten, die Strata radiatum und oriens des Ammonshorns am schwächsten.

An P1 (a) reagieren die Neurone von CA1 bis CA3 und im inneren Schenkel des Str. granulosum positiv (———>). Ab P3 (b-e) zeigen die Pyramidenzellen von CA1 keine positive Reaktion mehr (- - - ->). Die Körnerzellen weisen an P1, P3 und P8 (a-c) eine positive Reaktion auf und reagieren an P20 (d) und P60 (e) negativ (———>). Die Pyramidenzellen von CA3 und CA4 reagieren in allen Entwicklungsstadien positiv (a-e).

höheren Dichte an kleineren positiv reagierenden Gliazellen nun vom Str. radiatum unterscheidbar. Im Bereich von CA3 besitzen alle Schichten eine etwas höhere Dichte positiv reagierender Gliazellen als in CA1. In der Fascia dentata (Hilum und Str. moleculare) ist die Zahl positiv reagierender Gliazellen im Vergleich zu früheren Stadien relativ unverändert.

Bis P20 hat die Zahl und die Reaktionsstärke der positiv reagierenden Gliazellen (verglichen mit P10) deutlich zugenommen (Abb. 4) und bleibt dann bis P30 und P60 konstant (Abb. 5d, e). In diesen Altersstadien kommen im Ammonshorn in den Strata oriens und radiatum weniger und schwächer positiv reagierende Zellen vor als in den anderen Schichten. Das Str. lacunosum-moleculare enthält viele kleine stark positiv reagierende Gliazellen, so daß diese Schicht deutlich stärker reagiert als die anderen Schichten des Ammonshorns (Abb. 5e).

Im Str. moleculare der Fascia dentata sind die Zellen im Vergleich zum Str. lacunosum-moleculare größer und weniger zahlreich (Abb. 5d, e). Das Str. moleculare und das Hilum, das eine hohe Dichte kleinerer Zellen besitzt, weisen die stärkste Reaktion im gesamten Hippocampus auf.

GLAST. Im Gegensatz zu GLT1 reagieren die Gliazellen bei GLAST bereits an P1 mittelstark (Abb. 6, 7a). Diese Reaktionsstärke ändert sich in der weiteren Entwicklung nur noch unwesentlich (Abb. 6). In den Strata radiatum (Ammonshorn) und moleculare und im Hilum (Fascia dentata) reduziert sich die Zahl positiv reagierender Zellen kontinuierlich bis P20. Im Str. oriens nimmt die Zahl positiv reagierender Gliazellen demgegenüber zunächst zu, dann ab P8 bis P30 ab und ist ab P30 konstant. Im Str. lacunosum-moleculare nimmt die Zahl positiver reagierender Gliazellen bis P10 ab, dann bis P30 zu und bleibt danach unverändert.

An P1 (Abb. 7a) und P3 unterscheiden sich die Strata radiatum und lacunosum-moleculare vom Str. oriens durch ihre größere Anzahl positiver Gliazellen und wirken damit intensiver. Das Str. moleculare und das Hilum der Fascia dentata ähneln an P1 bezüglich Reaktionsstärke und Dichte der Zellen den Strata lacunosum-moleculare und radiatum. An P3 sind im Hilum viele kleine positiv reagierende Zellen zu beobachten, die besonders dicht an der Grenze zum Str. granulosum gelagert sind.

Bis P6 (Abb. 7b) und P8 hat die Zahl positiver Gliazellen im Str. oriens zu- und in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare etwas abgenommen. Die Zellen im Str. lacunosum-moleculare sind im Vergleich zum Str. radiatum kleiner und weisen eine schwächere ISH-Reaktion auf (Abb. 6). Das Str. moleculare der Fascia dentata ist jetzt vom Str. lacunosum-moleculare abgrenzbar; es besitzt bei einer ähnlichen Zahl positiv reagierender Gliazellen eine stärkere Reaktion der einzelnen Zelle (Abb. 6). Das Hilum enthält unverändert eine sehr große Anzahl kleiner Gliazellen, deren Reaktionsstärke mit der im Str. moleculare vergleichbar ist. Hilum und Str. moleculare reagieren im Hippocampus am stärksten.

An P10 (Abb. 7c) ist die Schichtgliederung des Hippocampus noch nicht vollständig ausgebildet. In den Strata oriens und radiatum hat die Anzahl positiver Gliazellen im Vergleich zu P8 geringfügig abgenommen. Das Str. lacunosum-moleculare von CA1 enthält eine geringere Anzahl kleinerer und schwächer reagierender Zellen und zeigt damit eine geringere Reaktionsstärke als die anderen Schichten. In CA3 ist die Dichte der positiv reagierenden Zellen jedoch höher. Das Str. moleculare der Fascia dentata unterscheidet sich aufgrund der deutlich stärkeren Reaktion der größeren Gliazellen vom Str. lacunosum-moleculare. Es ist die reaktionsstärkste Schicht im Hippocampus. Die Dichte kleiner positiv reagierender Zellen ist im Hilum weiterhin sehr hoch. Die zelluläre ISH-Reaktion ist schwächer als im Str. moleculare; damit stellt sich das Hilum als zweitstärkste Schicht des Hippocampus dar.

An P20 (Abb. 7d), P30 und P60 (Abb. 7e) ist die Dichte der Gliazellen im Vergleich zu P10 in den meisten Schichten geringer. Bei gleicher Gesamtintensität unterscheidet sich das Str. oriens vom Str. radiatum durch eine höhere Dichte etwas kleinerer, schwächer reagierender Zellen (Abb. 6). Im Str. lacunosum-moleculare nimmt die Zahl kleinerer, etwas weniger stark reagierender Zellen deutlich zu, die Schicht besitzt damit eine recht hohe Gesamtintensität. Das Str. moleculare der Fascia dentata enthält zwar weniger positive Zellen als das Str. lacunosum-moleculare, die Zellen sind aber deutlich größer und stärker positiv (Abb. 7e). Diese Schicht reagiert innerhalb des Hippocampus am stärksten. Das Hilum reagiert zwar schwächer als das Str. moleculare, aber stärker als die Strata radiatum und oriens. Es besitzt annähernd die gleiche Gesamtstärke wie das Str. lacunosum-moleculare.

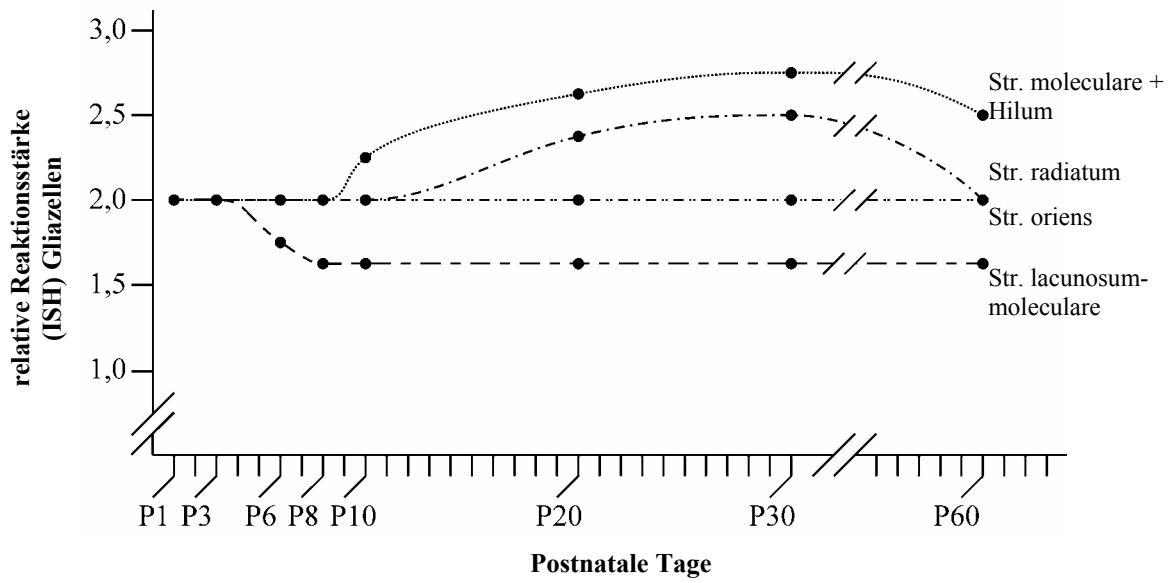
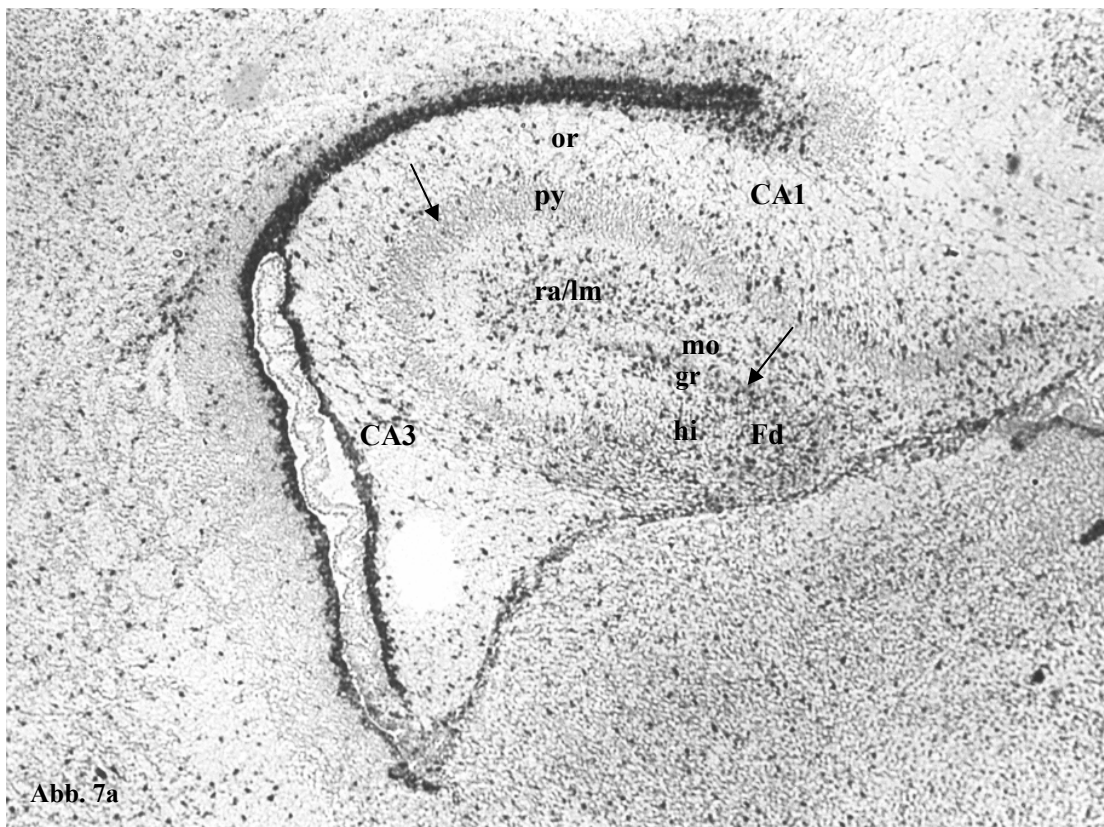


Abb. 6: Veränderungen der relativen Reaktionsstärke (GLAST-ISH-Reaktion) von Gliazellen im Hippocampus während der postnatalen Entwicklung.

Die im Lichtmikroskop ermittelte (subjektive) Reaktionsstärke der Gliazellen bleibt, mit schichtspezifischen Abweichungen, im Bereich mittelstarker Werte. 1 = schwache, 3 = sehr starke Reaktion.



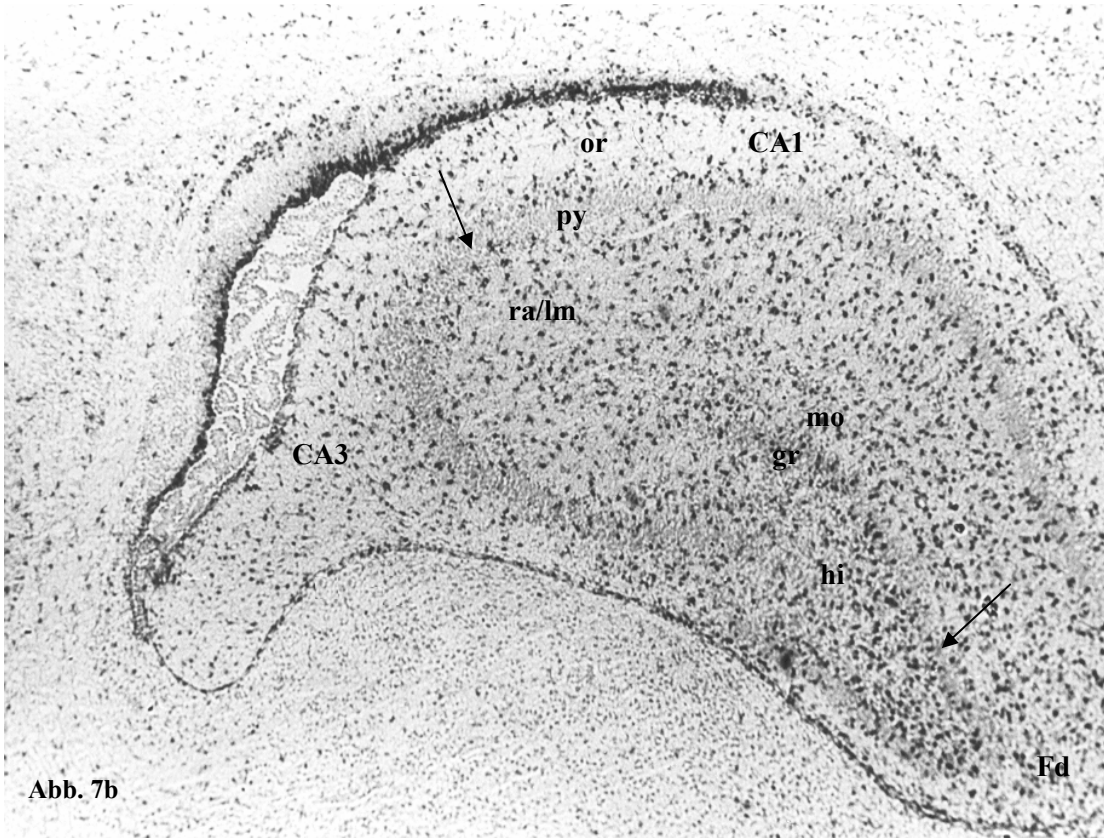


Abb. 7b

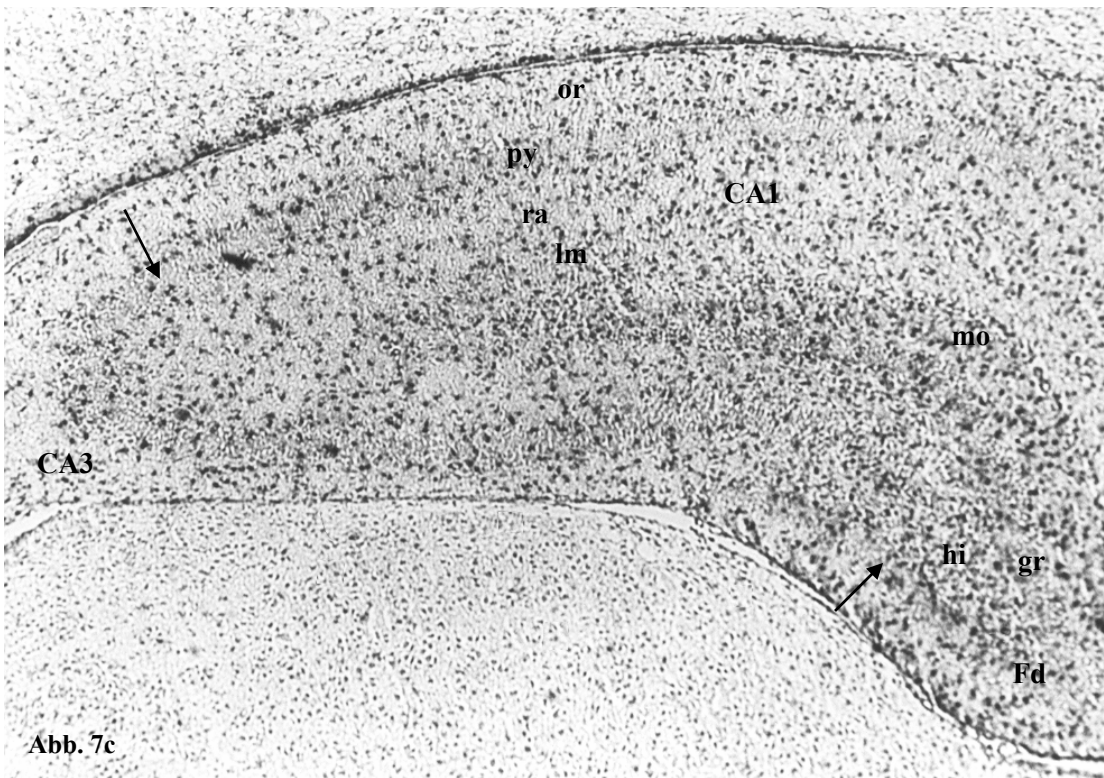


Abb. 7c

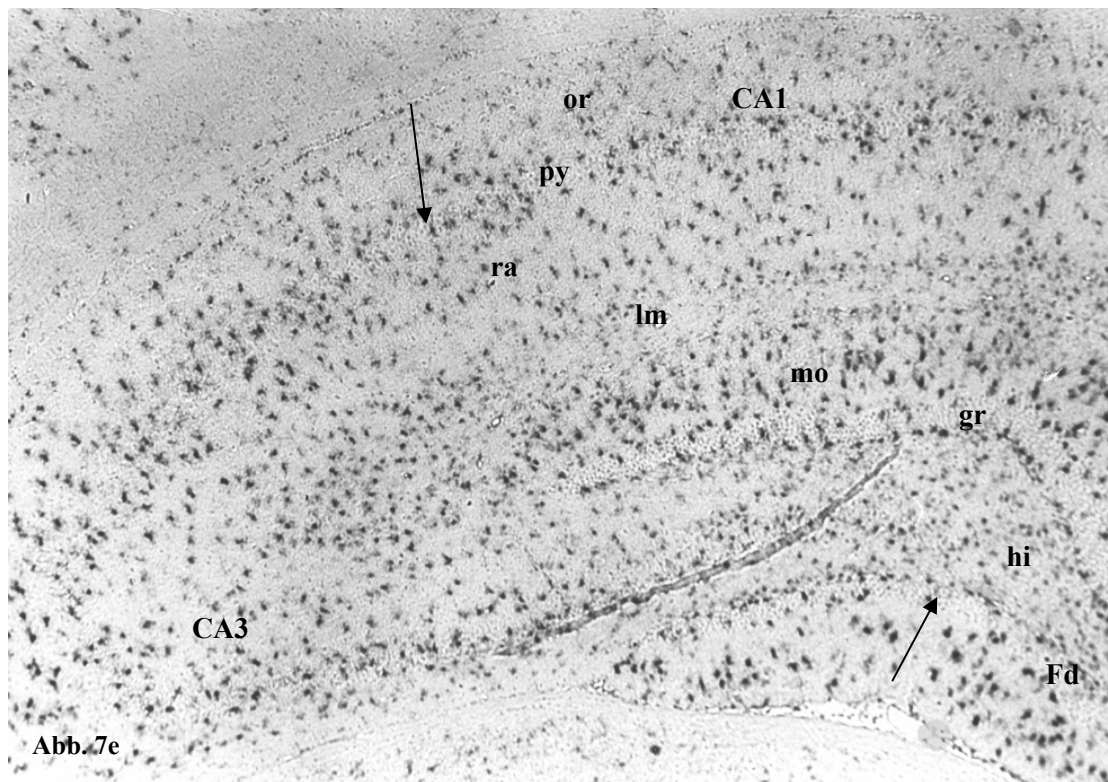
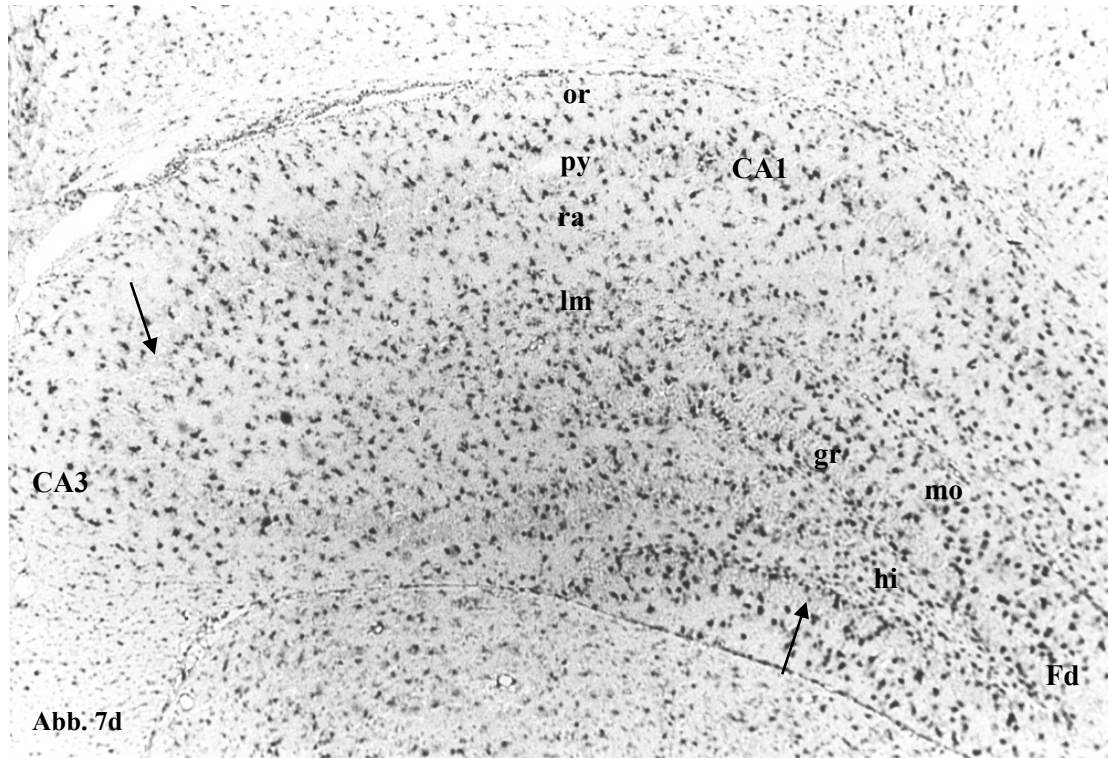


Abb. 7a-e: Nachweis von GLAST-mRNA im Hippocampus der Ratte an P1 (a), P6 (b), P10 (c), P20 (d) und P60 (e).

Die Gliazellen zeigen ab P1 (a) eine mittelstarke Reaktion. An P6 (b) reagieren das Hilum und die Strata radiatum, lacunosum-moleculare und moleculare stärker als das Str. oriens. An P10 (c) ist das Str. moleculare die reaktionsstärkste Schicht im Hippocampus. Zwischen P20 (d) und P60 (e) nimmt die Dichte der Gliazellen im Hippocampus ab. Die Strata radiatum und oriens reagieren am schwächsten, das Str. moleculare am stärksten.

Pyramiden- und Körnerzellen zeigen keine positive ISH-Reaktion (a-e; →).

3.2 Perikaryaschichten

Bei den neuronalen Perikaryaschichten des Hippocampus handelt es sich um das Str. pyramidale des Ammonshorns (mit Pyramidenzellen) und das Str. granulosum der Fascia dentata (mit Körnerzellen).

GLT1. An P1 reagieren die Pyramidenzellen insgesamt von CA1 bis CA3 positiv. Vom Str. granulosum ist nur der innere Schenkel differenziert. Hier reagieren die Körnerzellen unterschiedlich stark ISH-positiv. Besonders stark reagieren Körnerzellen an der Grenze zum Str. moleculare und zunehmend schwächer in Richtung Hilum. Eine positive Reaktion ergibt sich auch bei Neuronen im Hilum (Abb. 5a).

Ab P3 bis P60 zeigen die Pyramidenzellen von CA1 keine positive ISH-Reaktion mehr. Die Pyramidenzellen von CA3 reagieren bei allen weiteren Altersstufen positiv. Ab P20 wird diese Reaktion zunehmend intensiver, besonders in Richtung Fascia dentata, wo die Pyramidenzellschicht aufgelockert erscheint und breiter wird. Je älter die untersuchten Hippocampi sind, umso kleiner werden die Neurone. In der Fascia dentata weisen die Körnerzellen des Str. granulosum bis P10 eine positive Reaktion auf. Sie ist besonders stark am lateralen Schenkel (dem Str. moleculare zugewandte Seite). Ab P20 zeigen die Körnerzellen keine Reaktion mehr (Abb. 5a-e, 8a-c). Die Neurone im Hilum reagieren positiv.

In den frühen Entwicklungsstadien wird das Str. pyramidale in CA1, vor allem in Richtung Str. oriens, nur von wenigen Astrozyten begrenzt, die positiv reagieren. Selten sind positive Astrozyten innerhalb dieser Schicht selbst zu beobachten. Ab P20 werden die Pyramidenzellen zunehmend, meist an beiden Seiten, von stark positiv reagierenden Astrozyten flankiert und teilweise durchzogen (Abb. 5d, e). Mit fortschreitendem Alter wird das Str. granulosum teilweise beiderseits, vor allem aber in Richtung Hilum von stark positiv reagierenden Astrozyten begrenzt und im lateralen Schenkel auch von diesen durchsetzt (Abb. 5d, e, 8c).

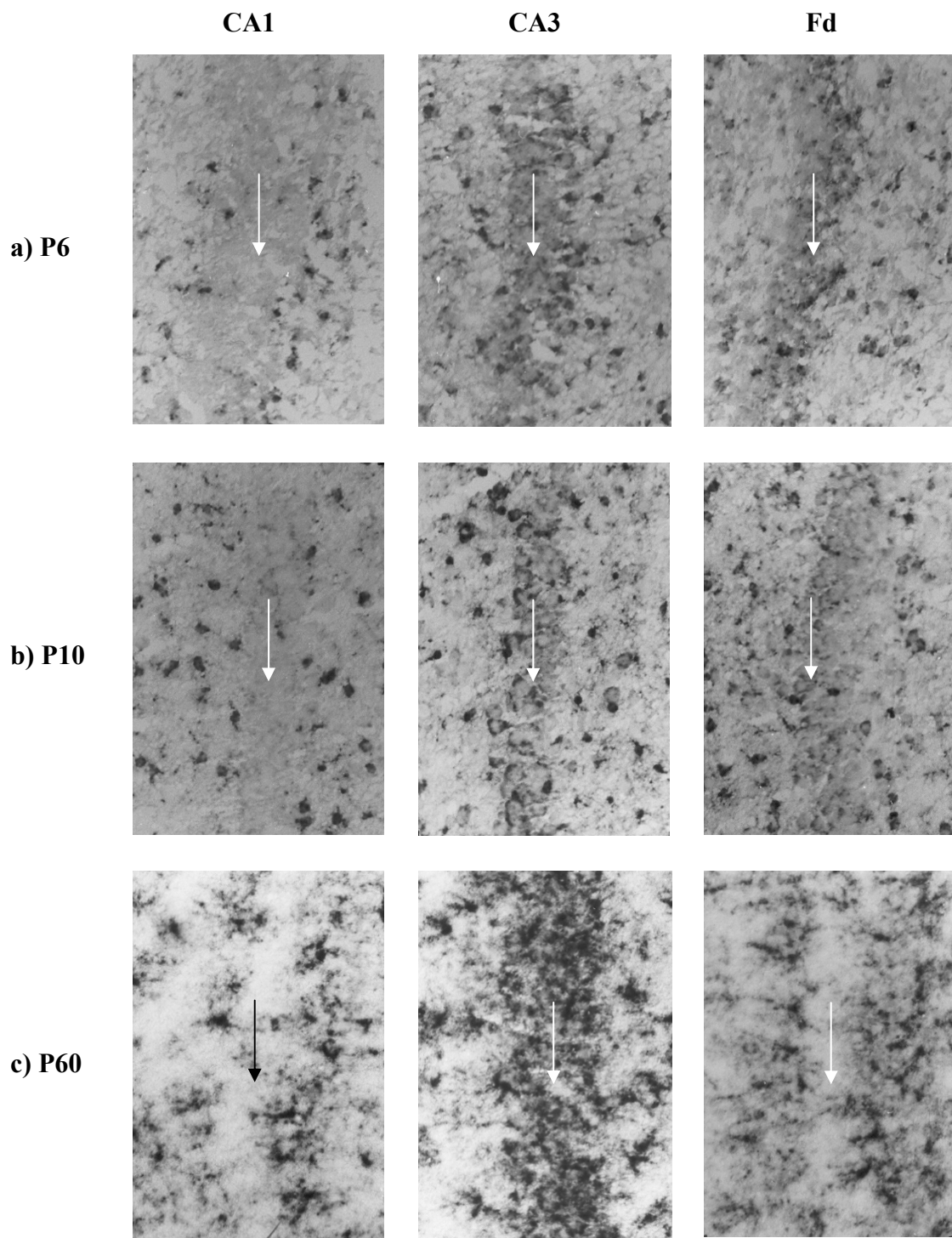


Abb. 8a-c: Nachweis von GLT1-mRNA in Hippocampusneuronen (Pfeile) der Ratte in CA1, CA3 und Fascia dentata an P6 (a), P10 (b) und P60 (c).

a und b: Die Neurone von CA3 und Fascia dentata reagieren positiv, die Pyramidenzellen von CA1 negativ.

c: Nur noch die Neurone von CA3 zeigen eine deutlich positive ISH-Reaktion, während die Neurone von CA1 und Fascia dentata nicht reagieren.

GLAST: Bei allen untersuchten Altersstadien ergeben weder Pyramiden- noch Körnerzellen eine positive ISH-Reaktion (Abb. 7a-e).

An P1 bis P10 (Abb. 7a-c) wird die Pyramidenzellschicht von CA1 von zunehmend deutlicher positiv reagierenden Astrozyten durchsetzt. Die Neurone von CA3 und die Körnerzellen vor allem an der Grenze zum Hilum werden mit zunehmendem Alter abschnittsweise von positiven Astrozyten flankiert.

Ab P20 bis P60 (Abb. 7d-e) wird das Pyramidenzellband von CA1 beiderseits von positiv reagierenden Astrozyten flankiert und teilweise von ihnen durchsetzt. In CA3 ist dies nicht so deutlich. Das Str. granulosum wird vor allem an der Grenze zum Hilum von dicht stehenden, stark positiv reagierenden Astrozyten gesäumt.

3.3 Ependymale Zone

Als ependymale Zone werden die an die Seitenventrikel grenzenden Ependymzellen und die subependymalen Zellen bezeichnet, die nicht weiter differenziert werden können.

An P1 erstreckt sich der Seitenventrikel bis zum medialen Ende des Hippocampus. Die ependymale Zone am Ventrikeldach besteht aus mehreren Zellagen, am Ventrikelfboden (den Hippocampus bedeckend) ist sie nur ein- bis zweischichtig. Die mediale ependymale Zone ist vielschichtig. Sie besteht aus den aneinanderliegenden Ependym- und Subependymzellen von Ventrikeldach und –boden. Bis P20 obliteriert der mediale Abschnitt der Seitenventrikel und es entsteht eine Verwachsungszone nach lateral, die auf wenige Zellschichten abnimmt. Ebenso nimmt kontinuierlich die Schichtenzahl in der ependymalen Zone des Ventrikeldachs ab.

Ab P20 werden Ventrikeldach und –boden nur noch von einer Schicht Ependymzellen gebildet. Die ependymale Zone ist im Verwachsungsbereich auf eine Zellschicht reduziert. In älteren Entwicklungsstadien ist sie medial ganz verschwunden.

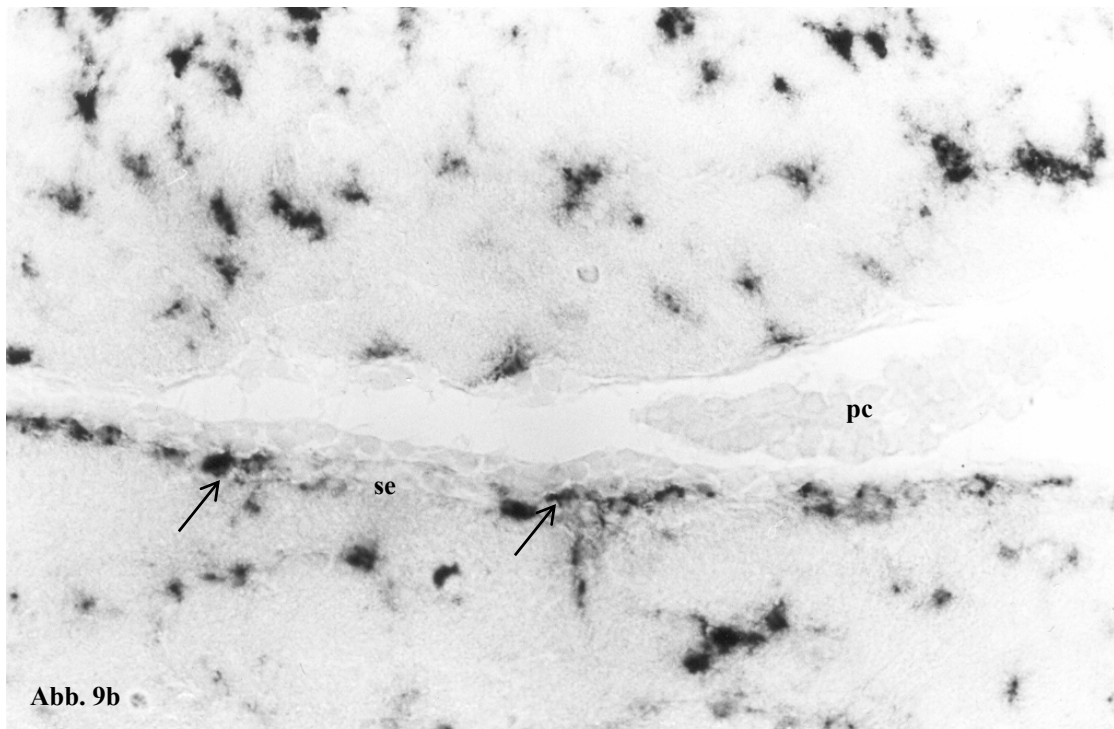
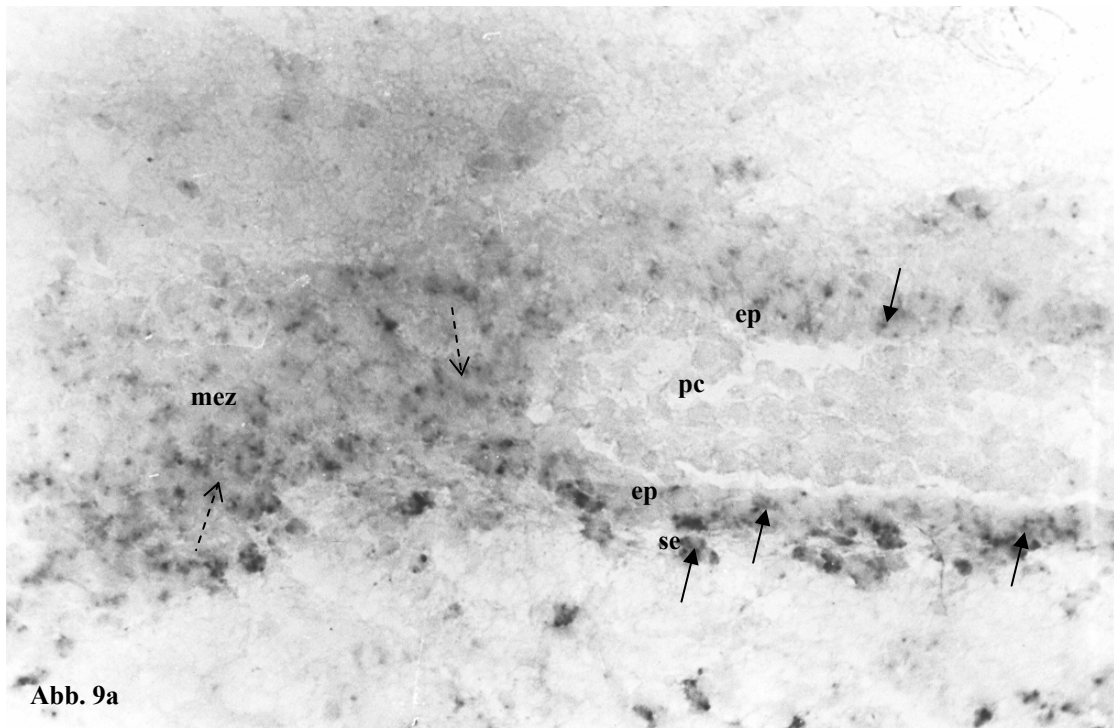


Abb. 9a-b: Nachweis von GLT1-mRNA in der ependymalen Zone der Seitenventrikel an P3 (a) und P60 (b).

An P3 (a) reagieren die Ependymzellen (ep; —→) und subependymalen Zellen (se; —→) von Ventrikeldach und -boden positiv, zusätzlich auch die Zellen der medialen ependymalen Zone (mez; ----→). Dagegen ist an P60 (b) eine positive Reaktion nur noch in einzelnen subependymalen Gliazellen (se; —→) nachweisbar. (pc; Plexus choroideus)

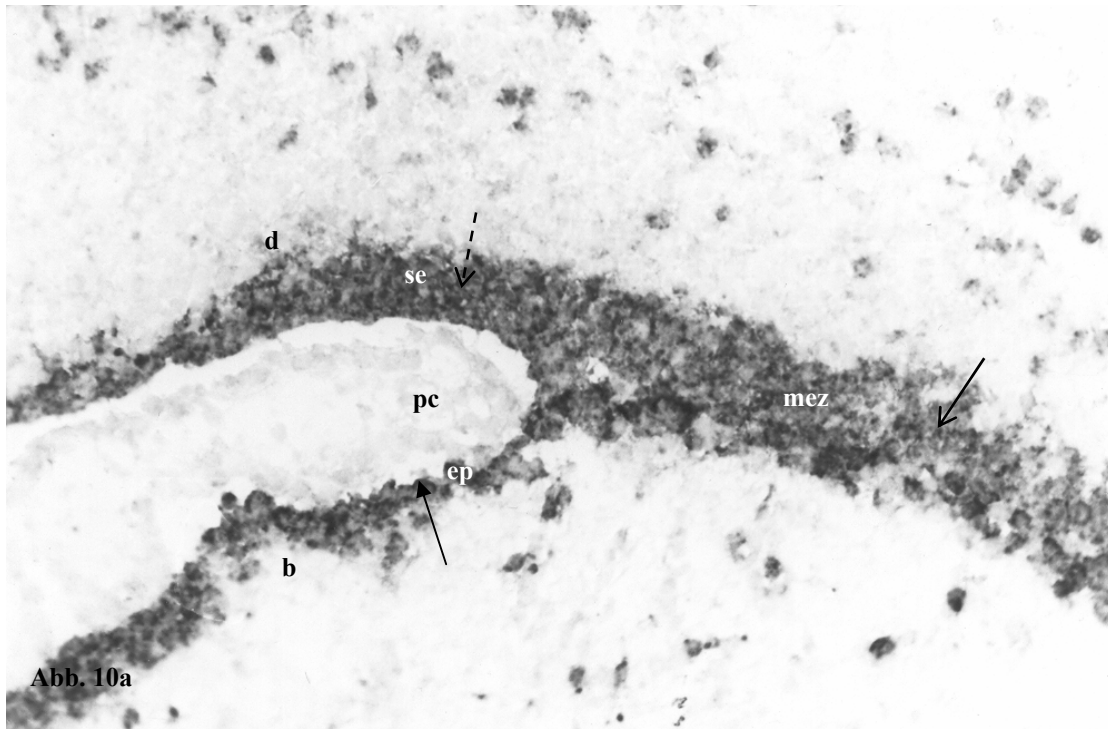


Abb. 10a

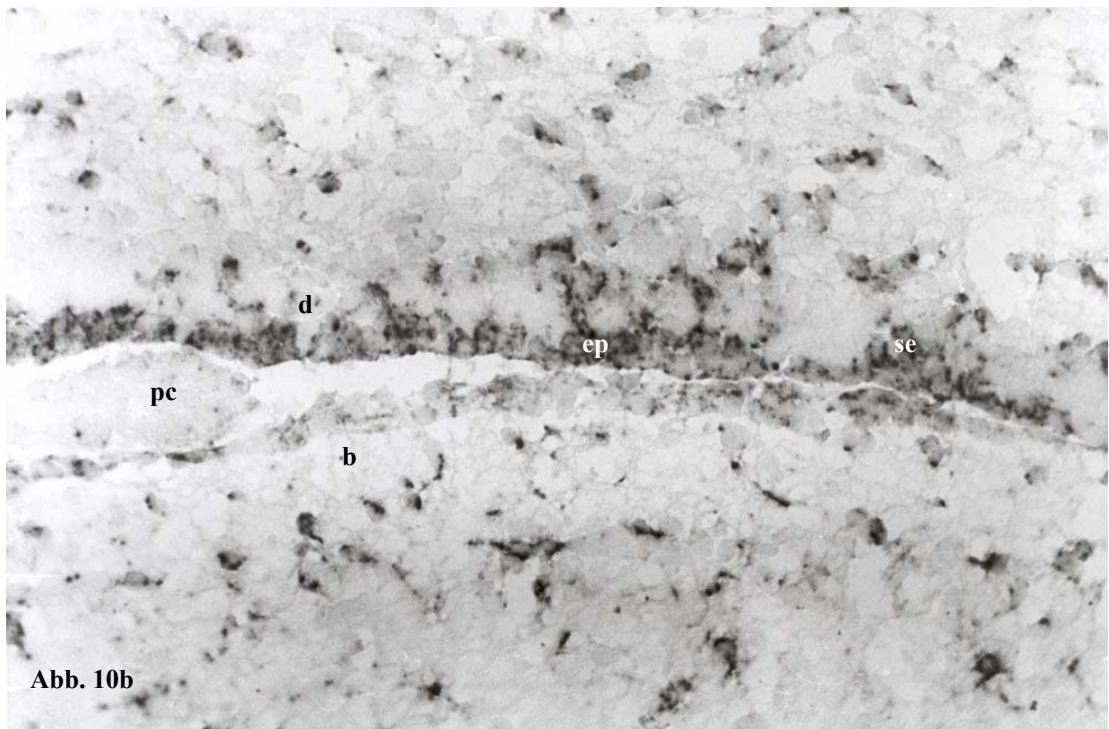


Abb. 10b

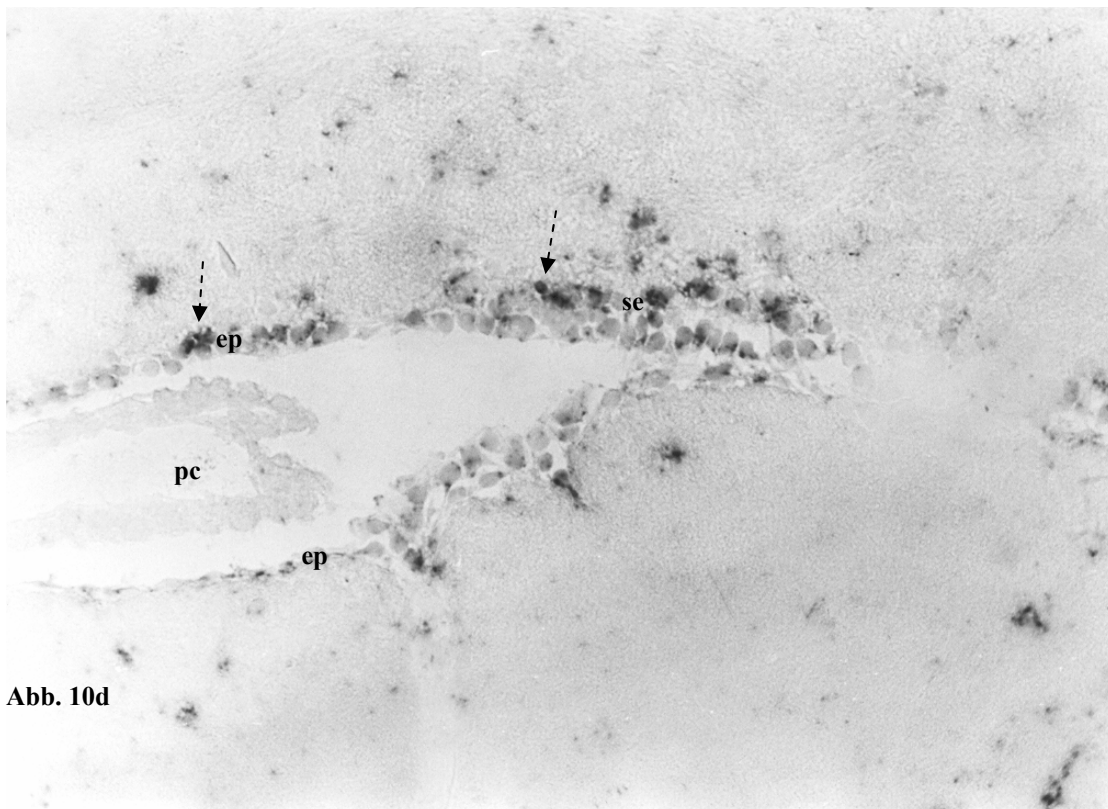
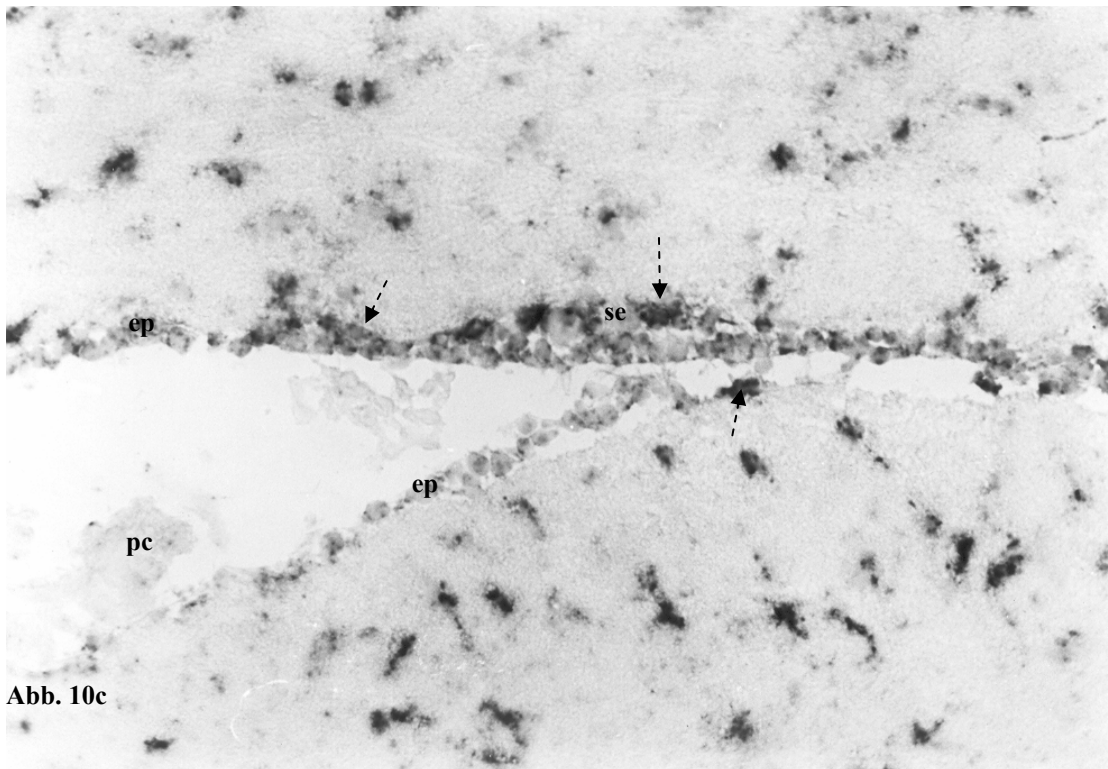


Abb. 10a-d: Nachweis von GLAST-mRNA in der ependymalen Zone der Seitenventrikel an P1 (a), P10 (b), P30 (c) und P60 (d).

An P1 (a) reagieren die Ependymzellen (ep; —>) und mehrere Zellagen subependymaler Zellen (se; --->) von Ventrikeldach (d) und -boden (b) stark positiv, ebenso die Zellen der medialen ependymalen Zone (mez; —>). In den weiteren Stadien nehmen Zahl und Intensität der reagierenden Zellen ab (b), so dass an P30 (c) und P60 (d) nur noch vereinzelt positive Zellen nachweisbar sind (----->). (pc; Plexus choroideus)

GLT1. An P1 und bei den untersuchten folgenden Altersstadien bis P10 reagieren in der ependymalen Zone des Ventrikeldachs die Zellen der an den Ventrikel grenzenden innersten Schicht (Ependymzellen) und die subependymalen Zellen positiv. Lateral ist diese Reaktion sehr stark und wird nach medial schwächer. Die Zellen der ependymalen Zone am Ventrikelboden weisen lateral keine ISH-Reaktion auf, ergeben aber medial eine mittelstarke Reaktion, die nach weiter medial noch mehr an Stärke zunimmt (Abb. 9a). In der medialen ependymalen Zone ergeben v.a. die ventrikelnahen Zellen eine positive Reaktion. Während sich der Seitenventrikel aufgrund der medialen Obliteration immer mehr nach lateral zurückzieht, ändert sich das Reaktionsmuster im Vergleich zu früheren Stadien nicht wesentlich.

Ab P20 ist eine zelluläre ISH-Reaktion fast nur noch lateral im Ventrikeldach und medial am Ventrikelboden in subependymalen Astrozyten nachzuweisen (Abb. 9b).

GLAST. An P1 ergeben die Ependymzellen und ein bis zwei Lagen subependymaler Zellen von Ventrikeldach und –boden eine sehr starke ISH-Reaktion (Abb. 10a). Daran schließen sich nach außen bis zu fünf Zellagen an, in denen vereinzelt schwächer reagierende Zellen enthalten sind. In der medialen ependymalen Zone sind bis zu fünf Lagen stark positiv reagierender Zellen zu beobachten, denen sich nach außen weitere Zellschichten anschließen, in denen nur einzelne positiv reagierende Zellen vorkommen.

In den nachfolgenden Altersstadien bis P10 zieht sich der Ventrikel weiter nach lateral zurück. Die Zahl der positiv reagierenden Zellagen am Ventrikeldach und in der medialen ependymalen Zone reduziert sich auf ein bis zwei und die Reaktion der Zellen wird, vor allem am Ventrikelboden, zunehmend schwächer (Abb. 10b). Ab P20 befinden sich in der ependymalen Zone am Ventrikeldach nur noch vereinzelt schwach positiv reagierende ependymale und subependymale Zellen. In der ependymalen Zone des Ventrikelbodens sind nur noch wenige positiv reagierende Ependymzellen nachweisbar (Abb. 10c-d). Die weiter nach lateral ziehende einschichtige Verwachsungszone ist z.T. schwer identifizierbar und enthält einzelne schwach positiv reagierende Zellen.

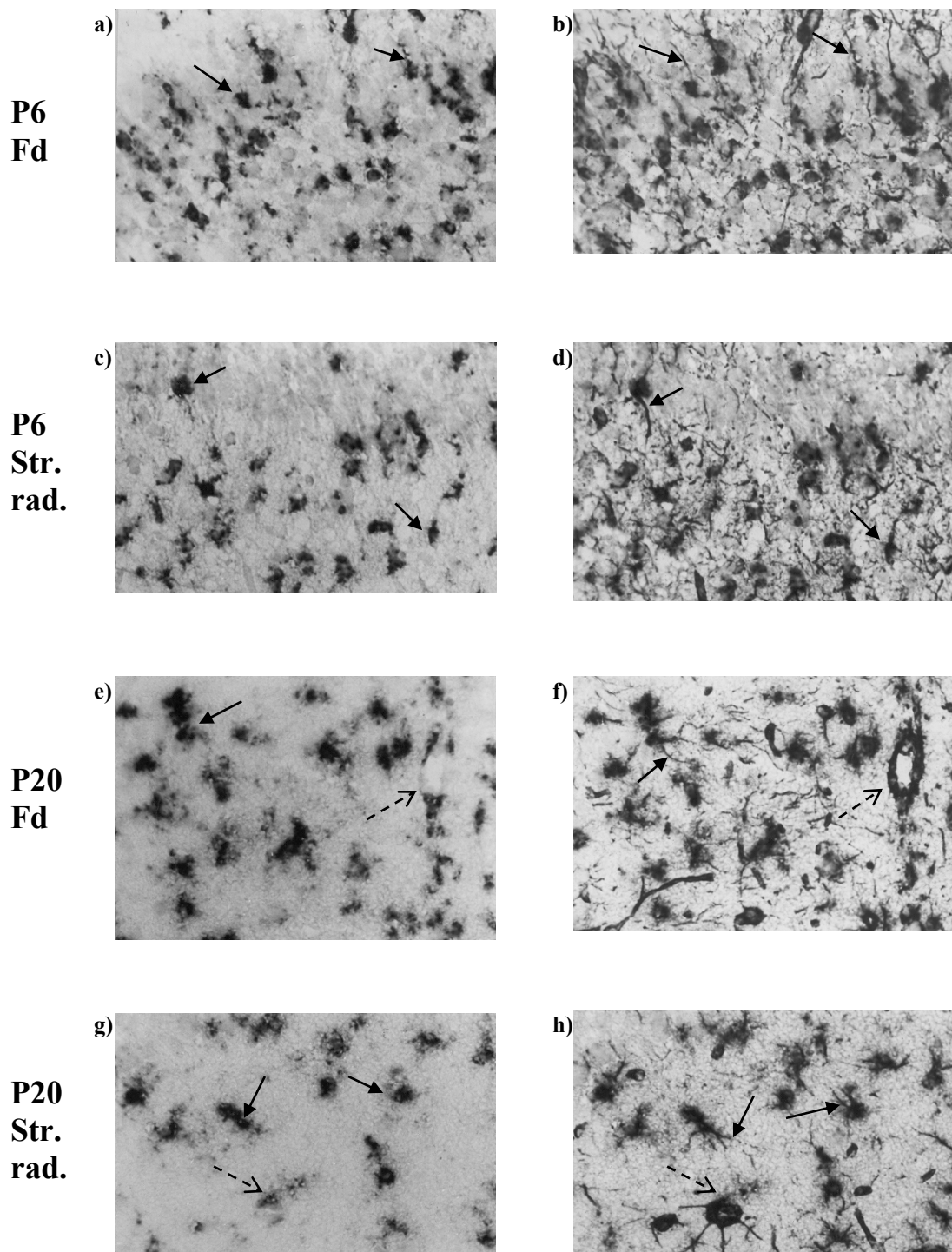


Abb. 11: Identifizierung von GLAST-ISH-positiven Zellen durch Doppelmarkierung

Die Abbildungspaare a/b (P6, Str. moleculare), c/d (P6, Str. radiatum), e/f (P20, Str. moleculare) und g/h (P20, Str. radiatum) zeigen Gewebeschnitte nach ISH mit c-RNA-Sonde im ersten Bild und nach zusätzlicher GFAP- und Vimentin-Immunreaktion im zweiten Bild. Die GFAP-Vimentin-positiven Zellfortsätze in den Strata radiatum und moleculare (b,d,f,h —>) zeigen, dass es sich bei den durch ISH markierten Zellen um Astroblasten/Astrozyten (a,c,e,g —>) handelt. Daneben sind Vimentin-positive Blutgefäßwände zu sehen (f,h - ->), die von Astroblasten/Astrozyten umgeben werden (e,g - ->).

Doppelmarkierung. Zur Identifizierung der beim GLAST-ISH-Nachweis positiven Zellen wurde nach der ISH an Schnitten der immunhistochemische Nachweis von GFAP/Vimentin durchgeführt. GFAP und Vimentin kommen in Astroblasten/Astrozyten vor und Vimentin ist zusätzlich in den Wänden der Blutgefäße enthalten. Die bei der ISH GLAST-positiven Zellen in Neuropil und Perikaryaschichten des Hippocampus besitzen mehr oder weniger deutlich GFAP/Vimentin-positive Fortsätze. Dies trifft für sämtliche untersuchte Entwicklungsstadien zu und wird in Abb. 11a-h exemplarisch für P6 und P20 dokumentiert. Damit dürfte es sich bei den GLAST-ISH-positiven Zellen um Astroblasten/Astrozyten handeln.

4. Diskussion

Unsere ISH-Untersuchungen haben ergeben, daß während der Hippocampusentwicklung der Ratte die Expression von GLT1 und GLAST unterschiedlich erfolgt. Bei GLT1 nimmt die Expression in Astrozyten der verschiedenen Hippocampusschichten ab der Geburt bis P20 zu, um dann gleich hoch zu bleiben. Auch exprimieren die Pyramidenzellen von CA1 bis P2/3 und die Körnerzellen der Fascia dentata bis P10 GLT1. Im Gegensatz dazu ergeben die Pyramidenzellen von CA3 und 4 ab P1 bis ins Erwachsenenalter eine positive ISH-Reaktion.

GLAST wird demgegenüber früh postnatal stärker in Astrozyten exprimiert als GLT1; die ISH-Reaktionsstärke ändert sich im Lauf der Entwicklung dann nicht mehr auffällig, so daß in adulten Stadien die ISH-Reaktion von GLT1 stärker ist als die von GLAST. In Hippocampusneuronen kann postnatal keine positive GLAST-ISH-Reaktion beobachtet werden.

Diese Befunde über Glutamattransporterexpression während der Hippocampusentwicklung werden im Folgenden in Zusammenhang mit der Bedeutung von Glutamat und Glutamattransportern in der Entwicklung des ZNS im Allgemeinen und der Glutamattransporterexpression und der Entwicklung neuronaler Verbindungen im Hippocampus im Besonderen diskutiert.

4.1 Bedeutung von Glutamat und Glutamattransportern während der Entwicklung des ZNS

Glutamat spielt nicht nur als exzitatorischer Transmitter im adulten Gehirn eine Rolle, ihm kommt auch Bedeutung bei der Entwicklung des ZNS und der Differenzierung von Neuronen zu. So wurde an kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte die Wirkung von Glutamat auf die Differenzierung dieser Zellen untersucht. Während der ersten Kulturtage sind die Zellen unempfindlich gegenüber Glutamat (Mattson und Kater 1988), danach führen niedrige Konzentrationen des Transmitters zu einer Hemmung des Dendritenwachstums (keine Wachstumskegel) und höhere Glutamatkonzentrationen zum Zelltod (Mattson et al. 1988a; Mattson und Kater 1989). In vivo konnte gezeigt werden, daß im Hippocampus glutamaterge Afferenzen zu den distalen Dendritenabschnitten der Pyramidenzellen einwachsen. Da in der frühen Entwicklung

Glutamatrezeptoren auf Dendriten beschränkt sind, wird vermutet, daß die Axone, die Glutamat freisetzen, die Differenzierung von Dendriten der Pyramidenzellen beeinflussen (Owen und Bird 1997), indem sie deren Wachstum einschränken. An kultivierten Rückenmarksneuronen der Maus konnten Owen und Bird (1997) zeigen, daß Glutamat auch das Axonenwachstum hemmt. Pearce et al. (1987) stellten allerdings eine stimulierende Wirkung von Glutamat auf das Neuritenwachstum bei Körnerzellen des Kleinhirns fest. Glutamat könnte also eine Rolle bei der Bildung und Modifizierung neuronaler Verbindungen spielen (Mattson et al. 1988a). Die Wirkung von Glutamat wird wahrscheinlich über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermittelt (Mattson et al. 1988a; Mattson und Kater 1989; Mattson et al. 1989a), wobei auch eine Aktivierung von Phospholipase C (Nicoletti et al. 1990) und Proteinkinase C (Mattson et al. 1988a) diskutiert wird. Die antiproliferative und in höheren Konzentrationen neurotoxische Wirkung von Glutamat auf Neurone ist durch den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF; Mattson et al. 1989b) antagonisierbar. FGF dürfte ebenfalls über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wirken und ist wirkungslos in Anwesenheit von RNA- und Proteinsynthesehemmern (Mattson et al. 1989b).

Bisher ist unklar, ob Glutamat über Nicht-NMDA- (Kainat, Quisqualat und AMPA) (Mattson und Kater 1988) oder NMDA-Rezeptoren wirkt (Pearce et al. 1987) und ob die beschriebenen widersprüchlichen Glutamatwirkungen (Pearce et al. 1987; Komuro und Rakic 1993, 1996: Wachstums- und Migrationsstimulierung über NMDA-Rezeptoren; Owen und Bird 1997; Mattson und Kater 1988: Wachstumshemmung über Nicht-NMDA-Rezeptoren) auf das Ansprechen unterschiedlicher Glutamatrezeptoren zurückgeführt werden kann. Bemerkenswert ist, daß NMDA-Rezeptoren bereits während der Embryogenese in postmitotischen Proneuronen des Neocortex nachzuweisen sind, noch bevor deren Axone ihre Zielregionen erreicht haben (Komuro und Rakic 1993; LoTurco et al. 1991). Neuronale Glutamatrezeptoren sind an der Ausbildung von Synapsen beteiligt (Mattson et al. 1988b) und ihre Aktivierung stimuliert die Neuronenmigration (Komuro und Rakic 1993, 1996). Jedoch nicht nur Proneurone und Neurone, sondern auch Gliazellen exprimieren Glutamatrezeptoren, die während neuronaler Aktivität stimuliert werden (Gallo und Russell 1995; Steinhauser und Gallo 1996). Die Aktivierung dieser Glutamatrezeptoren beeinflusst die

Proliferation und Differenzierung glialer Vorläuferzellen (Gallo und Russell 1995; Steinhauser und Gallo 1996). Ebenso spielt die Glutamatvermittelte Rezeptorstimulation eine Rolle bei der Modulation der Genexpression von Gliazellen (Steinhauser und Gallo 1996) sowie bei der Änderung ihres Phänotyps (Gallo und Russell 1995).

Die Konzentration von extrazellulärem Glutamat, das Glutamatrezeptoren aktiviert, wird durch Transportproteine in neuronalen und glialen Zellmembranen beeinflusst (Sutherland et al. 1996). Den Transportern kommen so außer der Gewährleistung physiologischer Konzentrationen an glutamatergen Synapsen in adulten Stadien zusätzlich Aufgaben bei der ZNS-Entwicklung zu. Aus Untersuchungen an Zellkulturen geht hervor, daß die Expression der Glutamattransporter GLT1 und GLAST unterschiedlich und unabhängig voneinander reguliert wird: Während in unbehandelten Astrozytenkulturen vor allem GLAST exprimiert wird und GLT1 kaum nachweisbar ist, wird in Neuronen-Astrozyten-Kokulturen die Expression von GLT1 in Astrozyten durch Neurone induziert (Schlag et al. 1998). Es wird angenommen, daß ein löslicher Faktor, der von Neuronen sezerniert wird, für Expressionsinduktion in Astrozyten verantwortlich ist (Gegelashvili et al. 1997, 2000). Bei diesem löslichen Faktor könnte es sich um PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) handeln (Figiel und Engele 2000). Es konnte nämlich gezeigt werden, daß PACAP die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) der Glutamataufnahme in Zellen dadurch erhöht, daß es die Expression von GLT1 steigert. Die Expressionszunahme wird über eine Aktivierung von PAC1-rezeptoren vermittelt, wodurch die Proteinkinasen A und C stimuliert werden (Figiel und Engele 2000). Als weitere neuronale Faktoren werden auch cAMP (Swanson et al. 1997; Gegelashvili et al. 1997; Schlag et al. 1998), EGF (epidermal growth factor) und GDNF (glial-derived neurotrophic factor) diskutiert (Sims und Robinson 1999).

Im Gegensatz zu GLT1 wird die Expression von GLAST und damit die Glutamataufnahmeaktivität durch Glutamat selbst geregelt. Und zwar führt Glutamat zur Hochregulation von GLAST (Gegelashvili et al. 1997; Duan et al. 1999). Möglicherweise wird die GLAST-Expression über die astroglialen metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR3 und 5 (Gegelashvili et al. 2000) oder über den Kainatrezeptor gesteuert (Gegelashvili et al. 1997; Swanson et al. 1997).

Glutamat scheint zwar für Differenzierung und Migration von Neuronen eine wichtige Rolle zu spielen, wobei es jedoch frühpostnatal bei der Transmission keine oder nur eine untergeordnete Bedeutung hat (Cherubini et al. 1991). Zu diesem Zeitpunkt ist die überwiegende Form synaptischer Aktivität die Erregung. Im Gegensatz zum adulten Gehirn, wo GABA der wichtigste inhibitorische Transmitter (über Cl⁻-Kanäle) ist und die Erregung von Neuronen vor allem über Glutamat vermittelt wird, übernimmt GABA in frühpostnatalen Hippocampusneuronen bis zum Ende der ersten postnatalen Woche die exzitatorische Funktion (durch Membrandepolarisierung über einen veränderten Cl⁻-gradienten und Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺). Inhibitorische postsynaptische Potenziale an GABAergen Synapsen werden erst gegen Ende der ersten postnatalen Woche gefunden, sobald erregende glutamaterge Verbindungen stärker entwickelt sind. In Übereinstimmung damit berichten Liu et al. (1996), daß Stimulation von Körnerzellen in der Fascia dentata über den Tractus perforans postsynaptische Potenziale hervorruft, die aus glutamatergen und GABAergen Komponenten bestehen. Während die GABAerge Neurotransmission in unreifen Körnerzellen vorherrscht, nimmt mit neuronaler Reifung die glutamaterge Komponente immer mehr zu. Auch für die GABAerge Transmission haben Glutamattransporter eine essentielle Bedeutung, da Glutamat der Vorläufer von GABA ist. Glutamat wird von Astrozyten durch Glutamatsynthetase zu Glutamin verstoffwechselt. Glutamin wird daraufhin von glutamatergen oder GABAergen Neuronen aufgenommen, die daraus Glutamat bzw. GABA herstellen (Kugler 1993).

4.2 Expression von Glutamattransportern während der Entwicklung des ZNS

Die regionale Verteilung von GLT1- und GLAST-mRNA und -Protein ist während der Entwicklung und im Erwachsenenalter bei Nagetieren ähnlich (Sutherland et al. 1996). Die Expressionsstärken verändern sich aber deutlich (Sutherland et al. 1996), wobei in Gliazellen die Ergebnisse auf mRNA- und Proteinebene im Allgemeinen übereinstimmen (Ullensvang et al. 1997). Während in der späten embryonalen und frühen postnatalen Periode der Glutamattransport vor allem von Neuronen über den Glutamattransporter EAAC1 gesteuert werden soll, dominiert in reiferen Gehirnen,

wenn die synaptischen Verbindungen vollständig entwickelt sind, der astrogliale Glutamattransport. Die Zunahme von GLT1- und GLAST-Protein korreliert dabei mit der Synaptogenese (Furuta et al. 1997). Nach unseren Befunden wird GLT1 im neonatalen Hippocampus zunächst geringer exprimiert als GLAST. Die Expression von GLT1 nimmt dann aber stark zu und ist bereits vor P20 stärker als die von GLAST. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen an Großhirn und Rückenmark, wo GLT1 der wichtigste Glutamattransporter ist, und am Kleinhirn, wo GLAST dominiert (Sutherland et al. 1996; Shibata et al. 1996; Furuta et al. 1997; Ullensvang et al. 1997; Yamada et al. 1998). Die postnatale Zunahme des GLT1-Proteins im Großhirn verläuft parallel zur Glutamataufnahmekapazität, was in Einklang damit steht, daß GLT1 in adulten Stadien der dominierende Transporter ist (Ullensvang et al. 1997).

Über die Expression von Glutamattransportern (mRNA-Ebene) im Hippocampus der Ratte während der Entwicklung ist bisher nichts bekannt. Es gibt wenige entwicklungsgeschichtliche Befunde über die Glutamattransporterverteilung im Hippocampus der Maus auf mRNA-Ebene (Sutherland et al. 1996) und im Hippocampus der Ratte auf Proteinebene (Furuta et al. 1997).

Diese stehen insofern in Einklang mit unseren Ergebnissen, als die Expression von GLT1 während der postnatalen Entwicklung in allen Schichten deutlich zunimmt. Nach Interpretationen von Ullensvang et al. (1997) genügt die frühpostnatale GLAST-Expression den Anforderungen an die Kontrolle von extrazellulärem Glutamat. Wenn das Entfernen von Glutamat aus dem synaptischen Spalt nach Ausbildung von Synapsen eine höhere Aufnahmekapazität erfordert, um die Neurone zu schützen, nimmt die GLAST-Expression geringgradig und die GLT1-Expression deutlich zu. Die starke Zunahme der GLT1-Expression parallel zur ZNS-Entwicklung (eigene Ergebnisse; s.a. Shibata et al. 1996; Ullensvang et al. 1997) legt außerdem eine essentielle Rolle des Transporters bei komplexen Entwicklungsvorgängen nahe.

Die Ergebnisse zur Lokalisation von GLT1 in Hippocampusneuronen sind widersprüchlich. Nach unseren Untersuchungen exprimieren die Pyramidenzellen von CA3 und 4 GLT1 bis ins Erwachsenenalter, die Neurone von CA1 und im Str. granulosum der Fascia dentata jedoch nur bis P2/3 bzw. bis P10. Dagegen ergeben Sutherlands ISH-Untersuchungen bei der Maus in allen Entwicklungsstadien eine positive Reaktion der Pyramiden- und Körnerzellen, wobei die Neurone von CA3 am

stärksten reagieren. Diese Unterschiede könnten auf speziesspezifischen Besonderheiten beruhen. Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen von Schmitt et al. (1996) bei adulten Ratten, die eine positive ISH-Reaktion ebenfalls nur in den Pyramidenzellen von CA3 und 4 feststellen konnten.

Die von uns beobachtete vorübergehende Expression von GLT1-mRNA in Körnerzellen bis P10 könnte in Zusammenhang mit dem außergewöhnlichen Entwicklungsmuster dieser Schicht stehen. Anders als im Ammonshorn, wo alle Neurone pränatal gebildet werden, entstehen 85% der Körnerzellen erst postnatal (Angevine 1965; Altman und Das 1965; Bayer und Altman 1974; Hine und Das 1974; Schlessinger et al. 1975). Damit ist die Neuronenschicht der Fascia dentata in dem Zeitraum, in dem die Körnerzellen positiv reagieren, als unreifes System anzusehen. Interessanterweise reagieren nach unseren Ergebnissen die Körnerzellen an der Grenze zum Str. moleculare und im lateralen Schenkel am intensivsten. Legt man die Wachstumsrichtungen des Str. granulosum zugrunde (Bildung vom lateralen zum medialen Schenkel und von außen nach innen; Stephan 1975; Angevine 1965; Altman und Das 1965, 1966; Altman 1966; Bayer und Altman 1974), könnte dieser Befund in Zusammenhang damit stehen, daß diese Zellen die „reiferen“ Zellen innerhalb der Körnerzellschicht sind.

In embryonalen Stadien verschiedener Tierspezies wird GLT1 ebenfalls in bestimmten Neuronensubpopulationen exprimiert (Sutherland et al. 1996; Shibata et al. 1996), während ab dem Tag der Geburt der Transporter auf Proteinebene dort nicht mehr nachweisbar ist (Shibata et al. 1996; Furuta et al. 1997; Ullensvang et al. 1997; Yamada et al. 1998). Auch ist GLT1-Protein embryonal vorübergehend in wachsenden Axonen von Hinterhornneuronen (Yamada et al. 1998) und in Bahnen der weißen Substanz in Gehirn und Rückenmark (Furuta et al. 1997) nachweisbar. Beim Schaf wurde in frühembryonalen Stadien GLT1-Protein in Neuronen und Axonen der sekundären Rindenplatte, der Purkinjzellschicht des Kleinhirns, Basalganglien und einigen motorischen Kernen von Hirnnerven nachgewiesen (Northington et al. 1998, 1999), sowie beim Menschen in den Pyramidenzellen von CA1 und den Körnerzellen des Hippocampus (Bar-Peled et al. 1997).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß in Neuronen während der Embryogenese eine Translation der GLT1-mRNA stattfindet, wobei eine neuroprotektive Funktion von

GLT1 diskutiert wird (Yamada et al. 1998). Die Fähigkeit der neuronalen GLT1-Translation verschwindet im weiteren Verlauf der Hirnreifung. Unter nicht physiologischen Bedingungen wie in Kulturen (Brooks-Kayal et al. 1998; Mennerick et al. 1998) oder nach Schädigungen (Sims und Robinson 1999) kann die Translation der mRNA aber wieder induziert werden. Zur Annahme einer neuroprotektiven Funktion von GLT1 paßt, daß in adulten Stadien der hochaffine GLT1-Transporter (Pines et al. 1992) der wichtigste Transporter für die Einstellung der extrazellulären Glutamatkonzentration ist (Rothstein et al. 1996; Gegelashvili et al. 1997; Tamamaki 1997) und sein Ausfall zu neurologischen Erkrankungen und neuronalen Schäden führen kann.

Das vorübergehende embryonale Vorkommen von GLT1-Protein (Furuta et al. 1997; Yamada et al. 1998) in den Bahnen der weißen Substanz von Rückenmark (Yamada et al. 1998) und Gehirn (Furuta et al. 1997) legt noch eine weitere Funktion von GLT1 nahe. Das Protein ist in den nichtsynaptischen axonalen Bereichen der Proneurone lokalisiert, die von der Periventriculärzone zum Cortex (Furuta et al. 1997) oder zur Mantelzone wandern (Yamada et al. 1998). GLT1 könnte so eine wichtige Rolle bei der neuronalen Wanderung durch Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration spielen. Dies steht in Einklang damit, daß Glutamat die Migration von Kleinhirnkörnerzellen stimuliert (Komuro und Rakic 1993, 1996). Früh postnatal während der Synaptogenese verschwindet GLT1-Protein von den Axonen. Gleichzeitig wird es in den Fortsätzen von Astrozyten nachweisbar, die die Neurone in der grauen Substanz umgeben. Dort kommt es postnatal zu einem deutlichen GLT1-Anstieg (Yamada et al. 1998).

Nach unseren ISH-Untersuchungen ist die GLAST-Expression in den verschiedenen Hippocampusschichten in allen Entwicklungsstadien nahezu gleich hoch. Dies steht in Einklang mit den immunocytochemischen Ergebnissen von Sutherland et al. (1996) an Mäusen, bei denen keine oder je nach Schicht kleine Intensitätszunahmen zu beobachten sind. Auf Proteinebene stellten jedoch Furuta et al. (1997) bei Ratten eine Zunahme der GLAST-Immunreaktivität fest. Andererseits stimmen unsere Untersuchungen mit denen von Furuta et al. (1997) überein und zwar insofern, als GLAST in Neuronen des Hippocampus nicht nachweisbar ist. Auch bei adulten Ratten ist GLAST in Neuronen nicht detektierbar (Schmitt et al. 1997). Lediglich Sutherland et

al. (1996) finden auf mRNA-Ebene bei der Maus während der Entwicklung stets eine schwach positive Reaktion in Körnerzellen und einmalig an P7 in den Pyramidenzellen, was auf speziesspezifische Unterschiede zurückgeführt werden könnte.

GLAST scheint im Gegensatz zu GLT1 unter physiologischen Bedingungen nicht unbedingt für den Schutz von Neuronen im Gehirn notwendig zu sein (Duan et al. 1999). Solange GLT1 die synaptische Glutamatkonzentration reguliert, übernimmt GLAST eher eine Transporterreservefunktion und kann durch erhöhte Glutamatkonzentrationen unter nichtphysiologischen Bedingungen schnell hochreguliert werden.

Hinweise auf die Rolle von GLAST während der Entwicklung des ZNS geben die Untersuchungen von Shibata et al. (1996; 1997) und Sutherland et al. (1996). Sie konnten während der Embryonalzeit die beiden Glutamattransporter GLT1 und GLAST in den Ventrikulärzonen von Tel- und Mesencephalon und Rückenmark nachweisen. Zu einer Zeit, wenn Synapsen noch nicht differenziert sind, ist GLAST (mRNA und Protein; Shibata et al. 1997) im Rückenmark vorübergehend in den Fortsätzen der Radiärglia, die zu Astrozyten differenzieren, lokalisiert. Die Fortsätze dieser Zellen dienen als Leitstruktur für die Migration von Proneuronen in die Mantelzone. Die Migration wird durch Aktivierung nicht-synaptischer NMDA-rezeptoren gesteuert und durch Glutamataufnahmehemmer beschleunigt (Komuro und Rakic 1993). Durch GLAST in den Fortsätzen der Radialglia könnte die lokale extrazelluläre Glutamatkonzentration und damit die Migration der Proneurone reguliert werden.

4.3 Expression von Glutamattransportern und Entwicklung neuronaler Verbindungen im Hippocampus

Anhand von Entorhinalis-Hippocampus-Kokulturen wurde die Bedeutung von Glutamat bei der Entwicklung des hippocampalen trisynaptischen Verbindungswegs untersucht (Mattson et al. 1988b). Afferenzen aus der Regio entorhinalis projizieren in den Hippocampus und setzen dort aktivitätsabhängig Glutamat frei. Über Nicht-NMDA-Rezeptoren der Zielpyramidenzellen im Hippocampus hemmt Glutamat deren übermäßiges Dendritenwachstum. Denkbar ist, daß andere Hippocampusafferenzen auch weitere Neurotransmitter freisetzen, die die Struktur von Dendritenästen der

Zielneurone beeinflussen. Zum Beispiel hemmt Acetylcholin das Wachstum von Hippocampusneuronen, während GABA, Norepinephrin und Serotonin kaum Einfluß auf das Wachstum haben (Mattson und Kater 1988; Mattson et al. 1988a und b). Glutamat ist auch für die Entstehung präsynaptischer Boutons notwendig. Unerläßlich dabei ist die räumliche Nähe der entorhinalen Afferenzen zu den Zielneuronen, was auf komplexe reziproke Interaktionen zwischen den prä- und postsynaptischen Neuronen hinweist.

Die Ankunft der Hippocampusafferenzen aus der Regio entorhinalis und die Entwicklung der hippocampalen neuronalen Verbindungen erfolgt nach einem genauen zeitlichen Muster. So sind die Terminale des Tractus perforans bereits am Tag der Geburt im Str. lacunosum-moleculare von CA3 nachweisbar (Loy 1980; Stanfield und Cowan 1988). Die zu den Dendriten der Körnerzellen ins laterale Str. moleculare ziehenden Fasern des lateralen und medialen Tractus perforans terminieren dort bereits an P3 (Tamamaki 1999). In der Fascia dentata ist der mediale Schenkel des Str. granulosum zwar ab P3 abgrenzbar, es dauert jedoch bis zum Ende der ersten postnatalen Woche, bis er sich nicht mehr vom lateralen Schenkel unterscheidet. Erst ab diesem Zeitpunkt (P7) zieht der mediale Tractus perforans zu den Dendriten der medialen Körnerzellen, während die Fasern des lateralen Anteils dort erst ab P11 auftreten (Tamamaki 1999). Die ersten Moosfasern sind bereits am Tag der Geburt im Str. lucidum von CA3 angekommen (Amaral und Dent 1981; Gaarskjaer 1985). Gleichzeitig sind die ipsilateral zum Str. radiatum von CA1 ziehenden Schaffer-Kollateralen nachweisbar (Loy 1980; Diabira et al. 1999). Zu diesem Zeitpunkt ist das Str. radiatum noch nicht vom Str. lacunosum-moleculare abgrenzbar.

Die Ausbildung all dieser hippocampalen Verbindungen findet hauptsächlich in der ersten postnatalen Woche statt. Während dieser Zeit verlagert sich die exzitatorische Funktion in Hippocampusneuronen von GABA auf Glutamat. Beide Ereignisse koinzidieren nach unseren Ergebnissen zeitlich mit einer deutlichen Zunahme der GLT1- Expression im Hippocampus. Dies legt die Vermutung nahe, daß GLT1 durch Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration bei der Bildung des trisynaptischen hippocampalen Verbindungsweges eine Rolle spielt. Ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der glutamatergen Verbindungen und der unverändert mittelstarken GLAST-ISH-Reaktion ist nicht offensichtlich. Während wir

beim ISH-Nachweis beider Transporter frühpostnatal kaum Unterschiede im schichtenspezifischen Reaktionsmuster beobachten konnten, ergeben die Terminationsgebiete des glutamatergen Tractus perforans (Str. moleculare der Fascia dentata, Str. lacunosum-moleculare des Ammonshorns) im Verlauf der postnatalen Entwicklung die stärksten ISH-Reaktionen.

5. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Glutamat spielt in der Entwicklung des ZNS eine besondere Rolle (z.B. Steuerung der Migration von Proneuronen, Einfluß auf Ausbildung von Synapsen und Differenzierung von Pyramidenzellendriten und Proliferation glialer Vorläuferzellen). Durch Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration kommt den Glutamattransportern dabei eine besondere Bedeutung zu. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die postnatale zelluläre und regionale Expression der Glutamattransporter GLUT1 und GLAST im Hippocampus der Ratte zu untersuchen, um Rückschlüsse auf ihre Funktion während der postnatalen Ontogenese (Postnataltag 1-60, P1-60) zu ziehen. Dabei wurde auch untersucht, ob die Expression beider Transporter in denselben Zelltypen erfolgt wie bei adulten Tieren und ob schichtenspezifische Unterschiede in der Transporterexpression während der Ontogenese mit der Entwicklung glutamaterger Faserverbindungen korrelieren.

Dazu wurde nichtradioaktive In-situ-Hybridisierung (ISH) mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden eingesetzt. Die Sonden wurden mit Hilfe der In-vitro-Transkription hergestellt, wobei vorher spezifische DNA-Sequenzen der einzelnen Glutamattransporter in einen pBluescript SK⁺-Vektor kloniert wurden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression von GLUT1 und GLAST während der Ontogenese der Ratte im Hippocampus unterschiedlich erfolgt und dass beide Transporter vor allem in Gliazellen (besonders Astroblasten/Astrozyten) nachweisbar sind. Bei **GLT1** nimmt ab P1 bis P20 die Expression in Astrozyten kontinuierlich zu und zeigt dann bis P60 unverändert starke ISH-Reaktionen. In Ependymzellen wird GLUT1-mRNA nur bis P10 gebildet, anschließend ist keine Expression mehr nachzuweisen. Die Pyramidenzellen von CA1 und die Körnerzellen der Fascia dentata bilden GLUT1-mRNA bis P2/3 bzw. P10, während die Pyramidenzellen von CA3 und 4 bis ins Erwachsenenalter eine positive ISH-Reaktion ergeben. **GLAST** wird früh postnatal in Astroglia stärker als GLUT1 exprimiert. Da sich die ISH-Reaktionsstärke im Lauf der Entwicklung nicht mehr bedeutend ändert, dominiert in adulten Stadien GLUT1. In Ependymzellen ist GLAST-mRNA bis ins Erwachsenenalter nachweisbar. Hippocampusneurone reagieren beim ISH-Nachweis von GLAST stets negativ.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass GLAST und GLT1 eine unterschiedliche Bedeutung während der Ausbildung der hippocampalen Verbindungen haben dürften. Der trisynaptische hippocampale Verbindungsweg entwickelt sich hauptsächlich in der ersten postnatalen Woche. Während dieser Zeit verlagert sich die exzitatorische Funktion in Hippocampusneuronen von GABA auf Glutamat. Diese Transmitterumstellung korreliert zeitlich mit der deutlichen Zunahme der GLT1-Expression im Hippocampus, was auf eine entscheidende Rolle von GLT1 bei der Bildung hippocampaler Verbindungen durch Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration hinweist. Demgegenüber ist kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen GLAST-Expression und Transmitterumstellung zu erkennen. Wie in adulten Stadien kommt dem Transporter unter physiologischen Bedingungen auch in der Ontogenese wohl vor allem eine Reservefunktion zu. Im Verlauf der postnatalen Entwicklung ergeben die Terminationsgebiete des Tractus perforans (Str. moleculare der Fascia dentata; Str. lacunosum-moleculare des Ammonshorns) bei beiden Transportern die stärksten ISH-Reaktionen.

6. Literatur

Altman, J. (1966): Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.*, 128: 431-474

Altman, J., Bayer, S.A. (1990a): Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.*, 301: 325-342

Altman, J., Bayer, S.A. (1990b): Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.*, 301: 365-381

Altman, J., Das, G.D. (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.*, 124: 319-336

Altman, J., Das, G.D. (1966): Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.*, 126: 337-390

Amaral, D.G., Dent, J.A. (1981): Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.*, 195 (1): 51-86

Angevine, J.B. (1965): Time of neuron origin in the hippocampal region: An autoradiographic study in the mouse. *Exp. Neurol., Suppl.*, 2: 1-70

Asan, E. (1998): The catecholamergic innervation of the rat amygdala. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 142: 1-121

Bar-Peled, O., Ben-Hur, A., Biegon, A., Groner, Y., Dewhurst, S., Furuta, A., Rothstein, J.D. (1997): Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. *J. Neurochem.*, 69 (6): 2571-2580

Bayer, S.A. (1980a): Development of the hippocampal region in the rat: I. Neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, 190: 87-114

Bayer, S.A. (1980b): Development of the hippocampal region in the rat: II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.*, 190: 115-134

Bayer, S.A., Altman, J. (1974): Hippocampal development in the rat: Cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J. Comp. Neurol.*, 158: 55-80

Bekenstein, J.W., Lothman, E.W. (1991): A comparison of the ontogeny of excitatory and inhibitory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus of the rat hippocampal formation. *Dev. Brain Res.*, 63: 237-243

Bjoras, M., Gjesdal, O., Erickson, J.D., Torp, R., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Degree, M., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Danbolt, N.C. (1996): Cloning and expression of a neuronal rat brain glutamate transporter. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 36 (1): 163-168

Blackstad, T.W., Brink, K., Hem, J., Jeune, B. (1970): Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 138: 433-450

Bliss, T.V.P., Chung, S.H., Stirling, R.V. (1974): Structural and functional development of the mossy fiber system in the hippocampus of the postnatal rat. *Proceedings of the Physiological Society*, 92P-94P

Brooks-Kayal, A.R., Munir, M., Jin, H., Robinson, M.B. (1998): The glutamate transporter, GLT1, is expressed in cultured hippocampal neurons. *Neurochem. Int.*, 33 (2): 95-100

Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J. (1995): Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localization revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*, 15 (3): 711-720

Cherubini, E., Gaiarsa, J.L., Ben-Ari, Y. (1991): GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. *TINS*, 14 (12): 515-519

Chiasson, B.J., Tropepe, V., Morshead, C.M., van der Kooy, D. (1999): Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J. Neurosci.*, 19 (11): 4462-4471

Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., Kriegstein, A.R. (1987): Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 7 (2): 357-368

Cook, T.M., Crutcher, K.A. (1988): Lesion-induced CA1 mossy fibers in the rat represent a neoinnervation. *Exp. Brain Res.*, 70: 433-436

Danbolt, N.C., Pines, G., Kanner, B.I. (1990): Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochemistry*, 29 (28): 6734-6740

Del Bigio, M.R. (1995): The ependyma: A protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14 (1): 1-13

Diabira, D., Hennou, S., Chevassus-au-Louis, N., Ben-Ari, Y., Gozlan, H. (1999): Late embryonic expression of AMPA receptor function in the CA1 region of the intact hippocampus in vitro. *Europ. J. Neurosci.* 11: 4015-4023

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1997): Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.*, 17 (13): 5046-5061

Duan, S., Anderson, C.M., Stein, B.A., Swanson, R.A. (1999): Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J. Neurosci.*, 19 (23): 10193-10200

Figiel, M., Engele, J. (2000): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J. Neurosci.*, 20 (10): 3596-3605

Fonnum, F. (1984): Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 42 (1): 1-11

Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J. (1997): Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.*, 17 (21): 8363-8375

Gaarskjaer, F.B. (1978): Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi: II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 178: 73-88

Gaarskjaer, F.B. (1985): The development of the dentate area and the hippocampus mossy fiber projection of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 241 (2): 154-170

Gaarskjaer, F.B. (1986): The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res. Rev.*, 11: 335-357

Gallo, V., Russell, J.T. (1995): Excitatory amino acid receptors in glia: Different subtypes for distinct functions? *J. Neurosci. Res.*, 42 (1): 1-8

Gegelashvili, G., Danbolt, N.C., Schousboe, A. (1997): Neuronal soluble factors differentially regulate expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. Rapid communication. *J. Neurochem.*, 69: 2612-2615

Gegelashvili, G., Dehnes, Y., Danbolt, N.C., Schousboe, A. (2000): The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem. Int.*, 37(2-3): 163-170

- Hine, R.J., Das, G.P. (1974):** Neuroembryogenesis in the hippocampal formation of the rat: An autoradiographic study. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 144: 173-186
- Hjorth-Simonsen, A. (1972):** Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.*, 146: 219-232
- Hjorth-Simonsen, A. (1973):** Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: An experimental analysis. *J. Comp. Neurol.*, 147: 145-162
- Hjorth-Simonsen, A., Jeune, B. (1972):** Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. Comp. Neurol.*, 144: 215-232
- Kanai, Y., Bhide, P.G., DiFiglia, M., Hediger, M.A. (1995):** Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *Neuroreport*, 6 (17): 2357-2362
- Kanai, Y., Hediger, M.A. (1992):** Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, 360: 467-471
- Kanai, Y., Smith, C.P., Hediger, M.A. (1993):** The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *TINS*, 16 (9): 365-370
- Kawamata, S., Stumpf, W.E., Bidmon, H.J. (1995):** Adhesion and fusion of ependyma in rat brain. *Acta Anat.*, 152: 205-214
- Kiryu, S., Yao, G.L., Morita, N., Kato, H., Kiyama, H. (1995):** Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: Identification by differential display PCR. *J. Neurosci.*, 15 (12): 7872-7878
- Komuro, H., Rakic, P. (1993):** Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260 (5104): 95-97
- Komuro, H., Rakic, P. (1996):** Intracellular Ca^{2+} -fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*, 17 (2): 275-285
- Kugler, P., Schmitt, A. (1999):** Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia*, 27 (2): 129-142

Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, C.N. (1995): Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: Quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.*, 15 (3): 1835-1853

Levy, L.M., Lehre, K.P., Rolstad, B., Danbolt, N.C. (1993): A monoclonal antibody raised against an $[Na^+ + K^+]$ coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Letters*, 317 (1.2.): 79-84

Liu, Y.B., Lio, P.A., Pasternak, J.F., Trommer, B.L. (1996): Developmental changes in membrane properties and postsynaptic currents of granule cells in rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.*, 76 (2): 1074-1088

Lorente de No, R. (1934): Studies on the structure of the cerebral cortex: II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol. (Lpz.)*, 46: 113-177

LoTurco, J.J., Blanton, M.G., Kriegstein, A.R. (1991): Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J. Neurosci.*, 11 (3): 792-799

Loy, R. (1980): Development of afferent lamination in ammon's horn of the rat. *Anat. Embryol.*, 159: 257-275

Mattson, M.P., Guthrie, P.B., Hayes, B.C., Kater, S.B. (1989a): Roles for mitotic history in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci.*, 9 (4): 1223-1232

Mattson, M.P., Guthrie, P.B., Kater S.B. (1988a): Intracellular messengers in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci.*, 21 (2-4): 447-464

Mattson, M.P., Kater, S.B. (1988): Isolated hippocampal neurons in cryopreserved long-term cultures: Development of neuroarchitecture and sensitivity to NMDA. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 6 (5): 439-452

Mattson, M.P., Kater, S.B. (1989): Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *Brain Res.*, 478 (2): 337-348

Mattson, M.P., Lee, R.E., Adams, M.E., Guthrie, P.B., Kater, S.B. (1988b): Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: A role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron*, 1 (9): 865-876

Mattson, M.P., Murrain, M., Guthrie, P.B., Kater, S.B. (1989b): Fibroblast growth factor and glutamate: Opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci.*, 9 (11): 3728-3740

McDermott, K.W., Llantos, P.I. (1991): Distribution and fine structural analysis of undifferentiated cells in the primate subependymal layer. *J. Anat.*, 178: 45-63

Mennerick, S., Dhond, R.P., Benz, A., Xu, W., Rothstein, J.D., Danbolt, N.C., Isenberg, K.E., Zorumski, C.F. (1998): Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *J. Neurosci.*, 18 (12): 4490-4499

Nicholls, D., Attwell, D. (1990): The release and uptake of excitatory amino acids. *TIPS*, 11: 462-468

Nicoletti, F., Magri, G., Ingrao, F., Bruno, V., Catania, M.V., Dell'Albani, P., Condorelli, D.F., Avola, R. (1990): Excitatory amino acids stimulate inositol phospholipid hydrolysis and reduce proliferation in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, 54 (3): 771-777

Northington, F.J., Traystman, R.J., Koehler, R.C., Martin, L.J. (1999): GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain. *J. Neurobiol.*, 39 (4): 515-526

Northington, F.J., Traystman, R.J., Koehler, R.C., Rothstein, J.D., Martin, L.J. (1998): Regional and cellular expression of glial (GLT1) and neuronal (EAAC1) glutamate transporter proteins in ovine fetal brain. *Neuroscience*, 85(4): 1183-1194

Owen, A.D., Bird, M. (1997): Role of glutamate in the regulation of the outgrowth and motility of neurites from mouse spinal cord neurons in culture. *J. Anat.*, 191: 301-317

Pearce, I.A., Cambray-Deakin, M.A., Burgoyne, R.D. (1987): Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Letters*, 223 (1): 143-147

Peghini, P., Janzen, J., Stoffel, W. (1997): Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO Journal*, 16 (13): 3822-3832

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I. (1992): Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 360: 464-467

Rauber-Kopsch (1987): Anatomie des Menschen; Lehrbuch und Atlas; Band III: Nervensystem und Sinnesorgane; Leonhardt, H., Töndury, G., Zilles, K. (Herausgeber); Thieme-Verlag: 401-410

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F. (1996): Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16: 675-686

Rothstein, J.D., Martin, L.J., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W. (1994): Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13: 713-725

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2nd Edition

Schlag, B.D., Vondrasek, J.R., Munir, M., Kalandadze, A., Zelenia, O.A., Rothstein, J.D., Robinson, M.B. (1998): Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol. Pharmacol.*, 53 (3): 355-369

Schlessinger, A.R., Cowan, W.M., Gottlieb, D.J. (1975): An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 159: 149-176

Schlessinger, A.R., Cowan, W.M., Swanson, L.W. (1978): The time of origin of neurons in ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anat. Embryol.*, 154: 153-173

Schmitt, A., Asan, E., Püschel, 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): 1-10

Schmitt, A., Asan, E., Püschel, B., Jöns, Th., Kugler, P. (1996): Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: Non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience*, 71 (4): 989-1004

Shibata, T., Watanabe, M., Tanaka, K., Wada, K., Inoue, Y. (1996): Dynamic changes in expression of glutamate transporter mRNAs in developing brain. *Neuro. Report*, 7 (3): 705-709

Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., Inoue, Y. (1997): Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J. Neurosci.*, 17 (23): 9212-9219

Sims, K.D., Robinson, M.B. (1999): Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Critical Reviews TM in Neurobiology*, 13 (2): 169-197

Smart, I. (1961): The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3-injection. *J. Comp. Neurol.*, 116: 325-347

Stanfield, B.B., Cowan, W.M. (1988): The development of the hippocampal region; In A. Peters und E.G. Jones (eds): *Cerebral Cortex. Vol VII; Development and maturation of cerebral cortex.* New York: Plenum Press: 91-122

Steinhauser, C., Gallo, V. (1996): News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.*, 19 (8): 339-345

Stephan, H. (1975): Allocortex – Ontogenetische Entwicklung Archicortex; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 128-201

Steward, O., Scoville, S.A. (1976): Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 169: 347-370

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

Storm-Mathisen, J. (1981): Autoradiographic and microchemical localization of high affinity glutamate uptake. In: Roberts, P.J., Storm-Mathisen, J., Johnston, G.A.R. (eds), *Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System*, Wiley, London: 89-116

Storm-Mathisen, J., Leknes, A.K., Bore, A.T., Vaaland, J.L., Edminson, P., Haug, F.M., Ottersen, O.P. (1983): First visualization of glutamate and GABA in neurons by immunocytochemistry. *Nature (Lond.)*, 301: 517-520

Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P. (1984): Neurotransmitters in the hippocampal formation. In: Reinoso-Suarez, F. and Ajmone-Marsan, C. (Eds.), *Cortical Integration*, Raven, New York, 105-130

Sutherland, M., Delaney, T.A., Noebels, J.L. (1996): Glutamate transporter mRNA expression in proliferative zones of the developing and adult murine CNS. *J. Neurosci.*, 16 (7): 2191-2207

Swanson, L.W., Wyss, J.M., Cowan, W.M. (1978): An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 181: 681-716

Swanson, R.A., Liu, J., Miller, J.W., Rothstein, J.D., Farrell, K., Stein, B.A., Longuemare, M.C. (1997): Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J. Neurosci.*, 17 (3): 932-940

Tamamaki, N. (1997): Organization of the entorhinal projection to the rat dentate gyrus revealed by DiI anterograde labeling. *Exp. Brain Res.*, 116: 250-258

Tamamaki, N. (1999): Development of afferent fiber lamination in the infrapyramidal blade of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 411: 257-266

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 GLT1. *Science*, 276: 1699-1702

Torp, R., Danbolt, N.C., Babaie, E., Bjoras, M., Seeberg, E., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P. (1994): Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: An in situ hybridization study. *Europ. J. Neurosci.*, 6: 936-942

Torp, R., Hoover, F., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P. (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 (4): 317-326

Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C. (1997): Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Europ. J. Neurosci.*, 9: 1646-1655

Velaz-Faircloth, M., McGraw, T.S., Malandro, M.S., Fremeau, R.T., Kilberg, M.S., Anderson, K.J. (1996): Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain. *Am. J. Physiol.*, 270 (Cell Physiol. 39): C67-C75

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. *Europ. J. Neurosci.*, 10: 976-988

White, W.F., Nadler, J.V., Hamberger, A., Cotman, C.W., Cummins, J.T. (1977): Glutamate as a transmitter of hippocampal perforant path. *Nature (London)*, 270: 356-357

Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Nagashima, M., Tanaka, K., Inoue, Y. (1998): Glutamate transporter GLT-1 is transiently localized on growing axons of the mouse spinal cord before establishing astrocytic expression. *J. Neurosci.*, 18 (15): 5706-5713

Zimmer, J. (1978): Development of the hippocampus and fascia dentata: Morphological and histochemical aspects. *Progress in Brain Research: Maturation of the Nervous System Vol. 48 (Proceedings of the 10th International Summer School of Brain Research)*; Elsevier Scientific Publishing Company

Zimmer, J., Haug, F.M. (1978): Laminar differentiation of the hippocampus, fascia dentata and subiculum in developing rats, observed with the timm sulphide silver method. *J. Comp. Neurol.*, 179: 581-618

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Anatomischen Institut 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 dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Angelika Schmitt für ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen im Labor und für ihre Erklärungen den wissenschaftlichen Hintergrund betreffend, sowie ihre Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Erna Kleinschroth und Frau Heike Fella für ihre Hilfe bedanken sowie für ihr Engagement, mich in die Geheimnisse der In-situ-Hybridisierung und der Kryoschnitte einzuweihen.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Detlev Drenckhahn möchte ich mich für die Überlassung der Laborräumlichkeiten und die Hilfestellung bei molekularbiologischen Fragen bedanken.

Ganz herzlicher Dank geht an meine Familie, allen voran an meinen Bruder Carsten für die ausdauernde Leistung bei computer- und layoutspezifischen Aufgaben und an meine Mutter für ihre Unterstützung bei kryostat- und mikroskopiespezifischen Fragestellungen. Danken möchte ich auch meinem Bruder Martin und meinem Vater für die Motivation.

Nicht zuletzt danke ich auch Christian Alvarez für die Erstellung von Graphiken und die Lösung von Computerproblemen.

Lebenslauf

- 12.03.1974 geboren in Schweinfurt / Unterfranken
als Tochter von
Dr. Dieter und Anneliese Schleyer, geb. Bedenk
- 1980-1983 Besuch der Grundschule Herlheim
- 1983-1984 Besuch der Regiomontanusgrundschule Königsberg
- 1984-1993 Besuch des Regiomontanusgymnasiums Haßfurt
- 09.07.1993 Allgemeine Hochschulreife
- 1994-2001 Medizinstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
- 1997-2001 Promotion am Institut für Anatomie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kugler
- 22.05.2001 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- seit
- 01.06.2001 Ärztin im Praktikum an der Universitätshautklinik in Regensburg,
Direktor Prof. Dr. M. Landthaler

(Verena Schleyer)