

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Anatomie II

Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

**Zelluläre und quantitative Verteilung von Glutamattransportern
im Kleinhirn der Maus während der postnatalen Ontogenese**

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

vorgelegt von

Maria Pamela Bergert

aus Hemer

Würzburg, September 2011

Referentenblatt

Referent: Professor Dr. med. P. Kugler

Korreferent: Professor Dr. med. M. Sendtner

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, den 04.03.2013

Die Promovendin ist Ärztin.

Widmung

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Referentenblatt.....	II
Widmung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Kleinhirnrinde: Bau und Histogenese	1
1.2 Glutamat und Glutamatttransporter im adulten Kleinhirn	4
1.3 Fragestellung	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Tiere.....	8
2.2 Antikörper für Westernblot und Immunhistochemie.....	8
2.3 Westernblot-Analysen	10
2.3.1 Lösungen.....	10
2.3.2 Gewebepräparation.....	11
2.3.3 Herstellung der Gewebehomogenate.....	12
2.3.4 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	12
2.3.5 Durchführung der Westernblots.....	14
2.3.6 Verdünnungen der verwendeten Antikörper	15
2.3.7 Chemolumineszenz-Nachweis	15
2.3.8 Semiquantitative Auswertung der Westernblots und statistische Analyse	16
2.4 Immunhistochemie an Semidünnschnitten.....	17
2.4.1 Gewebe- und Schnittpräparation.....	17
2.4.2 Verdünnungen der verwendeten Antikörper	17
2.4.3 Immunfluoreszenznachweis	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Westernblot-Analysen	19

3.1.1	GLAST	19
3.1.2	GLT1a	20
3.1.3	GLT1b	22
3.1.4	EAAC1	23
3.2	Immunhistochemie	24
3.2.1	GLAST (Abb. 3.5).....	24
3.2.2	GLT1a (Abb. 3.6).....	27
3.2.3	GLT1b (Abb. 3.7).....	29
3.2.4	EAAC1 (Abb. 3.8).....	31
4	Diskussion	33
4.1	Quantitative Veränderungen der Glutamattransporter im Verlauf der postnatalen Kleinhirnentwicklung	33
4.2	Zelluläre Verteilung der Glutamattransporter während der postnatalen Histogenese der Kleinhirnrinde.....	35
4.3	Bedeutung von Glutamat bei der Kleinhirnentwicklung	37
5	Zusammenfassung.....	40
6	Literaturverzeichnis	42

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Auswertungsprinzip der Westernblots am Beispiel von GLT1b.....	16
Abb. 3.1	Westernblot-Analyse des Glutamattransporters GLAST im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungstage P5 – P28).	20
Abb. 3.2	Westernblot-Analyse des Glutamattransporters GLT1a im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungstage P5 – P28).	21
Abb. 3.3	Westernblot-Analyse des Glutamattransporters GLT1b im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungstage P5 – P28).	22
Abb. 3.4	Westernblot-Analyse des Glutamattransporters EAAC1 im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungstage P5 – P28).	23
Abb. 3.5	Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLAST (rot) und Glutaminsynthetase (Gs; grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – E), P9 (F – H), P14 (I – N), P21 (O – Q) und P28 (R – T). Zusätzliche Zellkerndarstellung mit DAPI (C,E,M,N).	26
Abb. 3.6	Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLT1a (rot) und Glutaminsynthetase (Gs; grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – E), P9 (F – H), P14 (I – K), P21 (L – N) und P 28 (O – Q). Zusätzliche Zellkerndarstellung mit DAPI (D, E). 28	
Abb. 3.7	Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLT1b (rot) und β -III-Tubulin (grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – C), P9 (D – F), P14 (G – L), P21 (M – O) und P28 (P – R).....	30
Abb. 3.8	Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von EAAC1 (rot) und β -III-Tubulin (grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – C), P9 (D – F), P14 (G – L), P21 (M – O) und P28 (P – R).....	32

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A. bidest.	Aqua bidestilata
Abb.	Abbildung
Affi	affinitätsgereinigt
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithiolerythritol
EAAC1	Excitatory Amino Acid Carrier 1
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal Growth Factor
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acid protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT	Glutamatttransporter
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horse-radish-peroxidase
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere

mg	Milligramm
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGS	Normales Ziegenserum
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-aspartate
n-Propylgallat	3,4,5-Trihydroxybezolsäure n-propylester
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PHCCC	N-phenyl-7-(hydroxyimino)cyclopropa[b]chromen-1a-carboxamide
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Str.	Stratum
TEMED	Tetramethylethyldiamin
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolet
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Das Kleinhirn dient der Koordination und Feinabstimmung der Motorik, der Regulation des Muskeltonus, der Kopf- und Nackenkontrolle sowie der Aufrechterhaltung der Körperstatik (Morton und Bastian, 2004). Vermutlich spielt es jedoch auch eine Rolle bei höheren kognitiven Prozessen (Middleton und Strick, 1994). Während der Histogenese des Kleinhirns, insbesondere der Kleinhirnrinde, spielen vermutlich Glutamat, Glutamatrezeptoren (Pearce et al., 1987; Canudas et al., 2004; Mancini und Atchison, 2007) und Glutamattransporter (Sutherland et al., 1996; Ullensvang et al., 1997) eine wichtige Rolle.

1.1 Kleinhirnrinde: Bau und Histogenese

Die in Folien gegliederte Kleinhirnrinde weist im adulten Stadium eine dreischichtige Gliederung auf: Oberflächlich die Molekularschicht (Str. moleculare), darunter die Purkinjezellschicht (Str. purkinjense) und am weitesten innen die Körnerzellschicht (Str. granulosum). Die Kleinhirnrinde beherbergt v.a. folgende Neuronentypen: Glutamaterge Körnerzellen und GABAerge Golgi-Zellen in der Körnerzellschicht, GABAerge Purkinjezellen in der Purkinjezellschicht, sowie GABAerge Korbzellen und Sternzellen in der Molekularschicht. Wichtige Bestandteile der Körnerzellschicht sind die Glomeruli cerebellares, bei denen es sich um Körnerzell-freie Areale mit komplexen Synapsen handelt (Übersicht bei Altman und Bayer, 1997). Im Kleinhirn bilden die Körnerzellen ($10,9 \times 10^{10}$ Körnerzellen im Kleinhirn des Menschen) die größte Zellpopulation (Andersen et al., 2003). Ihre Zahl ist größer als die Zahl der Neurone in der Großhirnrinde (Pakkenberg und Gundersen, 1997).

Die Entwicklung des Kleinhirns erfolgt deutlich später als die des Großhirns und wird auch erst postnatal abgeschlossen (Übersicht bei Altman, 1972b; Altman, 1972c; Altman, 1972a). Der Großteil der Kleinhirnanlage entstammt dem Neuroepithel der Flügelplatte des Metencephalons und entwickelt sich im

dorsosuperioren Bereich des Rhombencephalons. Der metencephale Anteil des Neuralrohrs ist jedoch nicht das alleinige Ursprungsgewebe des Kleinhirns, da auch kaudale Anteile des Mesencephalons an der Bildung des Kleinhirns beteiligt sind (Martinez und Alvarado-Mallart, 1989; Hallonet und Alvarado-Mallart, 1997).

Die Kleinhirnrinde entsteht sowohl durch radiale Einwanderung von Proneuronen als auch durch tangentielle Einwanderung von Progenitorzellen. Proneurone, die aus der ventrikulären neuroepithelialen Zone der Kleinhirnanlage hervorgehen (innere generative Zone) sind die Proneurone der Kleinhirnkerne und der Purkinjezellen. Die nicht mehr mitoseaktiven Proneurone der Kleinhirnkerne verlassen die Ventrikulärzone an den Embryontagen (E) 10 – 12 (alle Angaben zu embryonalen und postnatalen Entwicklungstagen beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf Untersuchungen an der Maus). Zwischen E11 – 13 entstehen in der Ventrikulärzone die GABAergen Purkinjezellen (Pierce, 1975; Goldowitz und Hamre, 1998). Diese wandern etwa an E13 in radialer Richtung aus und bilden oberhalb der Kleinhirnkerne zunächst eine mehrlagige und schließlich eine einlagige Zellschicht.

Die neuroepithelialen Randzonen, die die Rautengrube des Rhombencephalons umgeben, werden als Rautenlippen bezeichnet. Aus den oberen Rautenlippen wandern die Progenitorzellen aus, die schließlich die äußere Körnerzellschicht (Str. granulosum externum) bilden (Sotelo, 2004). Diese mitoseaktiven Progenitorzellen der Körnerzellen beginnen an E10 noch in den Rautenlippen zu proliferieren und besiedeln ab E13 nach tangentialer Migration die Kleinhirnoberfläche direkt unterhalb der Pia mater. An E16 ist bereits die gesamte Kleinhirnoberfläche von Körnerzell-Progenitorzellen bedeckt. Sie bilden die äußere Körnerzellschicht, die auch als äußere generative Zone bezeichnet wird (Sotelo, 2004).

Im oberen Bereich dieser äußeren generativen Zone vermehren sich die Zellen zu mehreren Schichten (sog. proliferative Zone). Im unteren Bereich der äußeren generativen Zone entstehen perinatal schließlich die postmitotischen bipolaren Körnerzell-Proneurone (sog. prämigrationale Zone). Die äußere

Körnerzellschicht erreicht mit ca. 10 Zelllagen aus Progenitorzellen und Proneuronen an den postnatalen Tagen (P) 8 – 9 ihre maximale Dicke (Ratte; Altman, 1972c). Die Fortsätze der bipolaren Proneurone in der prä migratorischen Zone wachsen parallel zur Längsachse der Kleinhirnofolien und somit senkrecht auf die entstehenden Dendritenbäume der Purkinjezellen zu, mit denen sie im Laufe der Entwicklung exzitatorische Synapsen ausbilden. Haben die Fortsätze (die späteren Parallelfasern der Körnerzellen) ihre endgültige Position erreicht, beginnen die Perikarya der Körnerzell-Proneurone radiär durch die Molekularschicht an den Purkinjezellen vorbei unter diese zu wandern und bilden so die innere Körnerzellschicht (Altman, 1972c). Bei ihrer radialen Wanderung durch die Molekularschicht stehen die Körnerzellen in engem Kontakt mit den Fortsätzen der Bergmann-Gliazellen, die als gliale Leitschiene bei der Wanderung der Proneurone dienen (Rakic, 1971; Gregory et al., 1988; Hatten, 1990).

Die Bergmann-Gliazellen, die damit in der Entwicklung die Funktion von Radialglia haben, entsprechen nach Abschluss der Entwicklung zerebellären Astrozyten, die mit ihren Radialfortsätzen die Molekularschicht durchspannen. Ihre Perikarya liegen zwischen den Zelleibern der Purkinjezellen. Die Fortsätze der Bergmann-Gliazellen spielen nicht nur eine Rolle bei der radialen Migration von Vorläuferzellen und Proneuronen, sondern dienen auch dem gerichteten Wachstum der Purkinjezell-Dendriten (Lordkipanidze und Dunaevsky, 2005). Außerdem bilden sie Hüllen um verschiedene Strukturen der Purkinjezell- und Molekularschicht, vor allem um synaptische Kontakte (Grosche et al., 2002).

Durch die Abnahme der Proliferation der Körnerzell-Progenitorzellen und durch die Wanderung der Körnerzell-Proneurone aus der äußeren Körnerzellschicht, nimmt im Laufe der postnatalen Entwicklung die Dicke dieser Zone ab, so dass sie schließlich am Ende der dritten Woche völlig verschwunden ist (Goldowitz und Hamre, 1998). Das Kleinhirn der Maus weist damit ab der 4. postnatalen Entwicklungswoche seine endgültige dreischichtige Gliederung auf.

Die GABAergen Interneurone der Kleinhirnrinde (Korb-/Sternzellen und Golgi-Zellen) entstehen in den ersten postnatalen Tagen und erreichen nach Migration durch die sich entwickelnde weiße Substanz ihre Zielorte (Schilling et

al., 2008). Sternzellen bilden im oberen Abschnitt der Molekularschicht hemmende Synapsen mit den Dendriten der Purkinjezellen aus. Korbzellen verbleiben mit ihren Perikarya im unteren Bereich der Molekularschicht und umgeben mit ihren Axonen korb förmig die Perikarya und Axonursprünge der Purkinjezellen. Golgi-Zellen sind die GABAergen Interneurone des Str. granulosum, die mit ihren Axonen in den Glomeruli cerebellares an den Dendriten der Körnerzellen terminieren.

Zeitgleich mit dem Verschwinden der äußeren Körnerzellschicht am Ende der dritten postnatalen Woche werden bei der Maus die afferenten Fasersysteme für die Kleinhirnrinde ausgebildet (Goldowitz und Hamre, 1998). Afferente glutamaterge Kletterfasern, die aus dem unteren Olivenkomplex entspringen, bilden exzitatorische Synapsen mit den Dornen (Spines) der proximalen Dendriten der Purkinjezellen. Afferente Moosfasern (Ursprung u.a. in den Vestibulariskernen, dem Rückenmark und den Brückenkernen) bilden mit ihren Terminalen die Zentren der Glomeruli cerebellares. Dort bilden sie glutamaterge Synapsen mit Körnerzellendriten und z.T. mit Golgi-Zell-Dendriten aus.

1.2 Glutamat und Glutamattransporter im adulten Kleinhirn

Glutamat ist einer der bedeutendsten exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Wirbeltiere (Fonnum, 1984; Levy et al., 1993). Glutamat spielt als Neurotransmitter eine entscheidende Rolle bei vielen Aspekten normaler Hirnfunktionen wie beispielsweise Kognition, Gedächtnis und Lernvorgängen (Übersicht bei Danbolt, 2001). Während der Entwicklung des ZNS ist Glutamat u.a. für die Differenzierung und Migration von Proneuronen von Bedeutung und ist an der Synapseninduktion beteiligt (Ottersen und Storm-Mathisen, 1984; Pearce et al., 1987; Mattson et al., 1988). Glutamat wird bei der synaptischen Neurotransmission mittels Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an Glutamatrezeptoren vor allem von postsynaptischen Membranen (Übersicht bei Danbolt, 2001). Freies Glutamat wirkt jedoch in höheren Konzentrationen neurotoxisch (Choi et al., 1987; Manev et al., 1989). Um dies zu verhindern und die glutamaterge Signaltransduktion zu beenden, beseitigen Na^+ -abhängige hochaffine Glutamattransporter den

Neurotransmitter aus dem Interzellularraum (Danbolt, 2001). Dabei wird der Großteil des Glutamats von Gliazellen, speziell von Astrozyten, aufgenommen (Danbolt et al., 1990; Pines et al., 1992; Levy et al., 1993).

Im adulten Kleinhirn konnten bisher folgende Glutamattransporter nachgewiesen werden: Der Glutamat-Aspartat Transporter GLAST (Storck et al., 1992), die Glutamattransporter-Isoformen GLT1a (Pines et al., 1992) und GLT1b (Schmitt et al., 2002), der Glutamattransporter EAAC1 (Kanai und Hediger, 1992) und der Glutamattransporter EAAT4 (Fairman et al., 1995). Insgesamt ist jedoch wenig über die genaue zelluläre Verteilung verschiedener Glutamattransporter während der Kleinhirnentwicklung bekannt.

GLAST kommt zwar ubiquitär im gesamten ZNS vor, ist jedoch der wesentliche Glutamattransporter im Kleinhirn (Lehre und Danbolt, 1998). GLAST-Protein bzw. -mRNA wurde mittels Immunzytochemie bzw. in-situ Hybridisierung im Kleinhirn vor allem in Bergmann-Glia und Astrozyten nachgewiesen (Chaudhry et al., 1995; Schmitt et al., 1997). Bisher wurde GLAST-Protein nur in den Zellmembranen der Zellkörper und Fortsätze von Gliazellen lokalisiert (Danbolt, 2001). Bemerkenswert ist, dass GLAST-Protein vor allem in den glialen Zellmembranen angereichert ist, die Axonen und exzitatorischen Purkinjezell-Synapsen zugewandt sind (Chaudhry et al., 1995). Untersuchungen an GLAST-defizienten Knock-out Mäusen ergaben, dass diese Mäuse eine gestörte motorische Kontrolle und eine erhöhte Anfälligkeit für Kleinhirn-Schädigungen aufweisen (Watase et al., 1998).

Der Glutamattransporter GLT1 ist mit seinen Isoformen für den größten Teil der Glutamataufnahme (> 90 %) im Großhirn verantwortlich (Danbolt et al., 1992; Haugeto et al., 1996; Tanaka et al., 1997; Matsugami et al., 2006). Im Kleinhirn wurde jedoch nur eine relativ geringe Immunreaktivität für GLT1 nachgewiesen (Lehre et al., 1995) und die Menge an GLT1-Transportern beträgt dort nur 1/6 der Menge des Glutamattransporters GLAST (Lehre und Danbolt, 1998).

Die ursprünglich klonierte Variante (GLT1a) wurde hauptsächlich in Astrozyten, insbesondere in deren Zellmembranen, des gesamten Gehirns detektiert (Chaudhry et al., 1995; Holmseth et al., 2009). Neuere Untersuchungen weisen

jedoch auch auf eine neuronale Lokalisation von GLT1a (10 – 20 % der GLT1a-Gesamtmenge) hin (Chen et al., 2004; Furness et al., 2008).

In der Kleinhirnrinde reagieren alle drei Schichten GLT1a-immunpositiv, wobei diese Reaktion an Gliazellen gebunden zu sein scheint (Chaudhry et al., 1995; Holmseth et al., 2009). Bei diesen Gliazellen handelt es sich um Bergmann-Gliazellen in der Molekular- und Purkinjezellschicht und um Astrozyten in der Körnerzellschicht (Chaudhry et al., 1995).

Über die Verteilung der GLT1-Isoform GLT1b im Kleinhirn ist anhand von in-situ Hybridisierung und Immunzytochemie (Schmitt et al., 2002) bisher bekannt, dass GLT1b-mRNA und -Protein sowohl in glutamatergen Körnerzellen als auch in GABAergen Purkinjezellen vorhanden sind. Dies gilt auch für die GABAergen Interneurone der Molekularschicht. Schmitt et al. (2002) konnten zeigen, dass GLT1b-mRNA und -Protein auch in Oligodendrozyten der weißen Substanz des Zerebellums lokalisiert sind. Subzellulär scheint GLT1b hauptsächlich in vesikulären Strukturen des Zytoplasmas von Neuronen vorzukommen (Chen et al., 2002; Schmitt et al., 2002). Von Berger et al. (2005) wurde in der Kleinhirnrinde zusätzlich eine gliale Lokalisation von GLT1b-mRNA beschrieben, und zwar in Astrozyten der Körnerzellschicht und in Bergmann-Gliazellen der Purkinjezellschicht.

EAAC1 ist ein wichtiger Glutamattransporter in Neuronen (Kanai und Hediger, 1992; Rothstein et al., 1994). Die höchsten Konzentrationen von EAAC1 konnten in Hippocampus, Basalganglien und Kleinhirn nachgewiesen werden (Conti et al., 1998). Im Kleinhirn ist EAAC1-mRNA und -Protein sowohl in glutamatergen Körnerzellen als auch in GABAergen Purkinjezellen lokalisiert (Rothstein et al., 1994; Kanai et al., 1995; Kugler und Schmitt, 1999). Hierbei scheint der Transporter bei Purkinjezellen vor allem im somatodendritischen Kompartiment lokalisiert und dabei vor allem im postsynaptischen Bereich außerhalb der Synapse angereichert zu sein (Rothstein et al., 1994; Coco et al., 1997; Ottersen et al., 1997). Ebenso wie GLT1b wurde EAAC1 hauptsächlich zytoplasmatisch in fein granulären (vesikulären) Strukturen lokalisiert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei Bedarf die Vesikel und damit EAAC1 in die oberflächliche Zellmembran integriert werden (Kugler und Schmitt, 1999).

Die Lokalisation von EAAC1 in GABAergen Neuronen könnte so interpretiert werden, dass EAAC1 diesen Zellen Glutamat als Vorläufer für die GABA-Synthese zur Verfügung stellt (Rothstein et al., 1994; Sepkuty et al., 2002).

Da der Glutamattransporter EAAT4 in dieser Arbeit nicht untersucht wird, soll aus Vollständigkeitsgründen nur angemerkt werden, dass er im Kleinhirn bisher ausschließlich in Purkinjezellen gefunden wurde (Yamada et al., 1996; Massie et al., 2008).

1.3 Fragestellung

Glutamat ist nicht nur ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter im adulten ZNS, sondern scheint auch in der Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle zu spielen, insbesondere bei der Reifung und Migration von Progenitorzellen und Proneuronen in der Kleinhirnrinde (Pearce et al., 1987; Canudas et al., 2004). Dabei wird die extrazelluläre Glutamatkonzentration u.a. durch Glutamattransporter geregelt (Kanai et al., 1993; Sutherland et al., 1996). Über das Vorkommen von Glutamattransportern während der Kleinhirnentwicklung ist jedoch wenig bekannt (Sutherland et al., 1996; Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997). Insbesondere fehlen Untersuchungen über die Verteilung verschiedener Glutamattransporter, die auch eine mögliche Lokalisation von diesen in den Körnerzell-Progenitorzellen berücksichtigen.

Ziel vorliegender Untersuchungen ist deshalb, mittels Immunzytochemie die zelluläre Verteilung der Glutamattransporter GLAST, GLT1a, GLT1b und EAAC1 in der Kleinhirnrinde während der postnatalen Ontogenese der Maus (Postnataltage 5, 9, 14, 21 und 28) herauszufinden. Außerdem soll mittels Westernblot-Analysen festgestellt werden, ob quantitative Veränderungen der Glutamattransporter während der postnatalen Ontogenese mit wichtigen Entwicklungsschritten in der Histogenese des Kleinhirns korrelieren.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Für die Untersuchungen wurden fünf bis achtundzwanzig Tage alte C57BL/6 Mäuse (insgesamt 128 Tiere) aus eigener Zucht verwendet. Die Elterntiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (Ssniff, Soest, Deutschland). Sie wurden bei 21°C Raumtemperatur (R T), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 – 60 % und einem 12 stündigen Hell-Dunkel-Wechsel gehalten.

2.2 Antikörper für Westernblot und Immunhistochemie

Polyklonale Peptidantikörper gegen Glutamattransporter aus dem Kaninchen

Es wurden gut charakterisierte Peptidantikörper vom Kaninchen verwendet, die gegen C-terminale Peptidsequenzen von Glutamattransportern gerichtet sind und zur Verfügung gestellt wurden (Schmitt et al., 1996; Schmitt et al., 1997; Kugler und Schmitt, 1999; Schmitt et al., 2002).

anti-GLAST-Antikörper	Peptid für die Immunisierung: Q-L-I-A-Q-D-N-E-P-E-K-P-V-A-D-S-E-T-K (Storck et al., 1992; Lehre et al., 1995). Der Antikörper wurde durch Affinitätsreinigung des Immuserums gewonnen (siehe unten (s.u.); Schmitt et al., 1997)
anti-EAAC1-Immuserum	Peptid für die Immunisierung: I-V-N-P-F-A-L-E-P-T-I-L-D-N-E-D-S-D-T-K (Kanai und Hediger, 1992; Kanai et al., 1995)
anti-GLT1a-Immuserum	Peptid für die Immunisierung: A-A-N-G-K-S-A-D-C-S-V-E-E-E-P-W-K-R-E-K (Schmitt et al., 1996)

anti-GLT1b-Immuns serum Peptid für die Immunisierung: K-V-P-F-P-F-L-D-I-E-T-C-I (Schmitt et al., 2002)

Zur Herstellung des affinitätsgereinigten anti-GLAST-Antikörpers (GLAST affi) wurde das synthetisch hergestellte Peptid zunächst mit Hilfe eines Dot-Mikrofiltrationsgerätes (Kreutz, Reiskirchen, Deutschland) auf einer Nitrocellulosemembran (Immobilon P von Millipore, Bedford, USA) immobilisiert. Es folgte das Spülen der Membranen mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) und das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit PBS/ 5% Magermilch (1 Stunde (h), RT). Anschließend wurden die Membranen mit dem Serum des immunisierten Kaninchens (Verdünnung 1:50 in PBS + NaN₃) für mehrere Tage bei 4°C inkubiert. Die spezifischen Antikörper des Serums wurden dabei an die membranfixierten Peptide gebunden. Die Ablösung der GLAST-spezifischen Antikörper von der Membran erfolgte mit PBS durch Erwärmung auf 56°C. Die Antikörperkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 285 nm bestimmt (Drenckhahn et al., 1993). Der Antikörper wurde in einer Endkonzentration bis zu 15 µg/ml verwendet.

Monoklonale Antikörper aus der Maus:

- anti-Glutamin-Synthetase Antikörper (Boehringer Bioproducts, Heidelberg, Deutschland)

Glutamin-Synthetase (Gs) ist hauptsächlich im Zytosol von Astrozyten (Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979; Tansey et al., 1991) und z.T. auch von Oligodendrozyten lokalisiert (D'Amelio et al., 1990)

- anti-β-III-Tubulin Antikörper (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

β-III-Tubulin kommt im ZNS v.a. in Neuronen und Oligodendrozyten vor (Schaeren-Wiemers et al., 1995)

Sekundärantikörper

- Horse-radish-peroxidase (HRP) konjugierte anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus der Ziege (Bio-Rad, München, Deutschland) für Westernblot-Analysen
- Indocarbocyanin (Cy 3, rot) gekoppelte anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus der Ziege (Dianova, Hamburg, Deutschland)
- Carbocyanin (Cy 2, grün) gekoppelte anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege (Dianova)

2.3 Westernblot-Analysen

Die Glutamatttransporter GLAST, GLT1a, GLT1b und EAAC1 wurden in Kleinhirnhomogenaten mittels Westernblot-Analysen nachgewiesen und semiquantitativ analysiert.

2.3.1 Lösungen

Lösungen zur Herstellung der Homogenate:

PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4
Isolierpuffer	10 mM NaH ₂ PO ₄
	2 mM MgCl ₂
	1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
	5 µg/ml Aprotinin (Applichem, Darmstadt Deutschland)
	2 µg/ml Leupeptin (Applichem)
	2 µg/ml Pepstatin (Applichem)

Laemmli Probenpuffer 1,5x	0,094 M Tris pH 6,8 3 % Natriumdodecylsulfat (SDS; Roth) 5 % Glycerin (Applichem) 4,85 mM Dithioerythritol (DTE) 0,01 % Bromphenolblau (Roth)
---------------------------	---

Lösungen zur Durchführung der Westernblots

Sammelgel	5 % (w/v) Acrylamid (Roth) 125 mM Tris pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS (Roth) 1 mg/ml Ammoniumpersulfat (APS; Roth) 3 µl/ml Tetramethylethyldiamin (TEMED; Roth)
Trenngel	10 % (w/v) Acrylamid (Roth) 375 mM Tris pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS (Roth) 1 mg/ml APS (Roth) 1,5 µl/ml TEMED (Roth)
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycin (Serva, Heidelberg, Deutschland) 0,1 % (w/v) SDS (Roth)
Transblotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin (Serva) 20 % (v/v) Methanol

2.3.2 Gewebepreparation

Für die Herstellung der Homogenate wurden Mäuse im Alter von 5, 9, 14, 21 und 28 Tagen dekapitiert (Tiere im Alter von 21 und 28 Tagen unter Äthernarkose). Pro Entwicklungstag wurden 9 – 16 Tiere verwendet. Nach Entfernen der Schädelkalotte mit einer feinen Schere wurde das Kleinhirn mit einer gebogenen Pinzette entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden

die Kleinhirne in Aluminiumfolie verpackt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.3 Herstellung der Gewebehomogenate

Jeweils ein Gewichtsanteil Kleinhirn wurde mit zehn Gewichtsteilen Isolierpuffer versetzt und anschließend bei 4°C mit einem Teflon- Pstill-Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert (20 Hübe bei 1500 U/min). Nach Zentrifugation des Homogenates mit einer Tischzentrifuge (Zentrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für zehn min bei 1000g wurde das Sediment verworfen. Der Überstand wurde bei 100.000g erneut zentrifugiert (4°C; 1h; Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge, Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland), um Zellmembranen zu gewinnen. Der Überstand wurde verworfen und das 100.000g Pellet in 1,5x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Zum weiteren Aufschluss des Zellmaterials wurde das resuspendierte Pellet mit Hilfe einer 5 ml Spritze durch eine dünne Kanüle (0,45 x 25 mm) gezogen und anschließend bei 95°C für eine Minute erhitzt. Bis zum weiteren Gebrauch wurde das Homogenat portioniert eingefroren und bei -40°C gelagert.

2.3.4 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde die photometrische Proteinbestimmung mit Amidoschwarz nach Dieckmann-Schuppert und Schnittler (1997) verwendet. Der Azofarbstoff Amidoschwarz bindet an Polypeptidketten und lässt sich durch Ausfällung der Proteine mit einer Methanol-Essig-Lösung nicht von diesen entfernen. Somit ergeben sich, je nach Proteingehalt, unterschiedlich stark angefärbte Proben (s.u.).

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Färbelösung:

Amidoschwarz (Merck, Darmstadt, Deutschland)	2,5 g
Methanol	225 ml
Aqua bidest.	225 ml

100 % (v/v) Essigsäure	50 ml
Entfärbelösung:	
Methanol	237,5 ml
Aqua bidest.	237,5 ml
100 % (v/v) Essigsäure	25 ml
Auflöselösung:	
Trichloressigsäure	10 g
100 % (v/v) Ameisensäure	80 ml
100 % (v/v) Essigsäure	10 ml

Cellulose-Acetat-Folien (Sartorius, Göttingen, Deutschland) wurden in 1 cm² große Felder eingeteilt, auf die jeweils 10 µl Proben (100.000g Pellet in Probenpuffer, s.o.) mittels einer Pipette aufgetragen wurden. Zur photometrischen Nullwertbestimmung dienten Felder, auf die lediglich 1,5x Laemmli-Probenpuffer aufgetragen wurde. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde bovines Serumalbumin (BSA; in Laemmli-Probenpuffer gelöst) mit bekanntem Proteingehalt (0,625 – 20 µg) aufgetragen.

Nach Trocknung der beschichteten Folien wurden sie in eine mit Färbelösung gefüllte Schale gegeben (Färbedauer 10 Minuten; zur gleichmäßigen Färbung unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler). Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und die Folien 5x mit je 100 ml Entfärbelösung für insgesamt 4 Minuten gespült. Farbstoff, der unspezifisch am Hintergrund gebunden hatte, wurde dadurch entfernt. Nach Trocknung der Folien wurden die 1 cm² großen Felder ausgeschnitten und einzeln in 1,5 ml Eppendorf Gefäße gegeben. Nach Zugabe von 1 ml Auflöselösung inkubierten die Reaktionsgefäße für 30 Minuten im 50°C warmen Wasserbad. Nach dieser Inkubation hatten sich die Folienfelder vollständig aufgelöst. Die Extinktionen der unterschiedlich stark blau gefärbten Lösungen wurden mit einem Spektralphotometer (Wellenlänge 620 nm; Ultrospec III, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) gegen den Nullwert gemessen. Die Berechnung des Proteingehalts der Proben erfolgte entsprechend der BSA-Standard-Eichkurve.

2.3.5 Durchführung der Westernblots

Zur Auftrennung des Proteingemisches wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) verwendet. Dazu wurden ein 10 %iges Trenngel und ein 5 %iges Sammelgel gegossen (Dicke der Gele 0,75 mm). Die Proben wurden im Heizblock denaturiert (95°C; 1 min) und anschließend mit einer Hamilton Spritze in die Geltaschen gefüllt. Zum Nachweis von GLAST, GLT1b und EAAC1 wurden 5 µg Protein und zum Nachweis von GLT1a 10 µg Protein aufgetragen. Auf jedem Westernblot-Gel waren jeweils alle untersuchten Entwicklungsstadien (P5, P9, P14, P21, P28) in aufsteigender Reihenfolge repräsentiert (s. Abb. 2.1).

Zur Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde mit vertikalen Elektrophorese-Gelsystemen gearbeitet (Bio-Rad). Im elektrischen Feld erfolgte zunächst eine Sammlung der Proteine bei 80 V, die anschließende Trennung fand bei 200 V statt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (HybondTM-c extra, Amersham, Braunschweig, Deutschland) übertragen (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur in einer mit Puffer gefüllten Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad) über 3 Stunden bei 1,125 V/cm². Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend für 1½ Stunden in PBS/ 5 % Magermilch gegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Schließlich erfolgte die Inkubation mit den Erstantikörpern bei 4°C für 12 Stunden (Verdünnung der Antikörper in PBS/ 5 % Magermilch, s. 2.3.6). Dazu wurden die Nitrocellulosefolien zusammen mit den Antikörperlösungen in Plastikfolie (PE-Schlauchfolie, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) eingeschweißt und zur gleichmäßigen Inkubation an einem Drehrad befestigt.

Am folgenden Tag wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen der Nitrocellulosefolien in PBS/ 0.05% Tween (Sigma) beseitigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper bei RT für 1½ Stunden (Verdünnung, s. 2.3.6). Nach mehrmaligem Spülen der Membranen in PBS (3x 10 min) wurden diese zur Darstellung der Proteinbanden mittels Chemolumineszenz-Nachweis verwendet (s.u.; Whitehead et al., 1979).

2.3.6 Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Primärantikörper:

anti-GLAST-Antikörper affinitätsgereinigt in einer Konzentration bis zu 15 µg/ml	1:50
anti-EAAC1-Immunsrum	1:1000
anti-GLT1a-Immunsrum	1:1000
ant-GLT1b-Immunsrum	1:1500

Sekundärantikörper:

HRP-konjugierter anti-Kaninchen IgG-Antikörper	1:3000
--	--------

2.3.7 Chemoluminiszenz-Nachweis

Verwendete Lösungen:

Enhanced chemoluminescence (ECL)-Lösung 1:

- 2,5 mM Luminol (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) in Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 0,4 mM p-Coumaric-Acid (Sigma) in DMSO
- 100 mM Tris-HCL (pH 8,5)

ECL-Lösung 2: 0,02 % (v/v) H₂O₂
100 mM Tris-HCL (pH 8,5)

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

Röntgenentwickler: LX 24 (Kodak, Hartenstein)

Röntgenfixierbad: A L4 (Kodak)

Bei der ECL-Methode handelt es sich um eine Licht-emittierende Reaktion. Die an Sekundärantikörper gebundene HRP katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol, wodurch Elektronen angeregt werden. Kehren diese Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurück,

emittieren sie Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm. Dies führt zu einer lokalen Schwärzung photographischer Filme.

Die Nitrocellulosefolien (s.o.) wurden in einer Dunkelkammer für 1 Minute in die ECL-Lösung gelegt und anschließend zusammen mit den Röntgenfilmen (Hyperfilm™ ECL, Amersham) in eine geschlossene Filmkassette verbracht.

Die Röntgenfilme wurden jeweils zwischen 15 Sekunden und 2 Minuten belichtet, danach entwickelt, fixiert und getrocknet.

2.3.8 Semiquantitative Auswertung der Westernblots und statistische Analyse

Die entwickelten Röntgenfilme wurden digital eingescannt (Scanner: AGFA Arcus II) und mit Hilfe des Grauwert-Analyse-Programms „nih image analysis software“ (Image J, Version 1.62) quantifiziert.

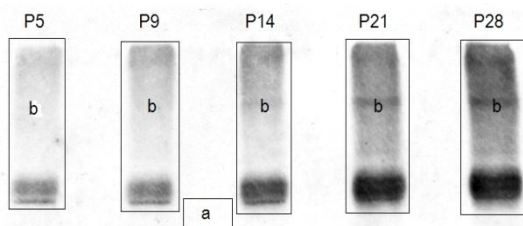


Abb. 2.1 Auswertungsprinzip der Westernblots am Beispiel von GLT1b.

(a) Messfeld für den Hintergrund

(b) Messfeld für die Blotstreifen von P5 – P28

P5 – P28: Alter der Tiere in Postnataltagen

Hierzu wurde zunächst der Grauwert des Röntgenfilmhintergrundes gemessen (s. Abb. 2.1). Dann wurde die auszuwertende Proteinbanden-Fläche mit einem rechteckigen Messfeld-Werkzeug umrahmt und der Grauwert in diesem Bereich ermittelt. Der Grauwert des Röntgenfilmhintergrundes wurde schließlich vom Grauwert des Messfelds subtrahiert. Die so ermittelten Ergebnisse wurden auf die pro Spur aufgetragene Proteinmenge bezogen.

Die Messergebnisse wurden mit dem Mann-Whitney U-Test analysiert (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Anzahl der statistisch ausgewerteten Westernblots:

GLAST:	n=7	GLT1a:	n=6
EAC1:	n=6	GLT1b:	n=7

2.4 Immunhistochemie an Semidünnschnitten

Die Glutamattransporter GLAST, GLT1a, GLT1b und EAAC1 wurden mittels Immunzytochemie an Kleinhirn-Semidünnschnitten von Mäusen im Alter von 5, 9, 14, 21 und 28 Tagen nachgewiesen. Pro Entwicklungstag wurden 3 – 5 Tiere verwendet.

2.4.1 Gewebe- und Schnittpräparation

Nach der Präparation der Kleinhirne (s. 2.3.2) wurden diese in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren. Es folgte eine Gefriertrocknung (Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 1-4, Christ GmbH, Osterode, Deutschland) von Kleinhirnstücken für 24 Stunden und die Einbettung in Quetol (Electron Microscopy Science, Ft. Washington, USA; Kushida und Kushida, 1982). 1 µm dicke Semidünnschnitte wurden mit Hilfe eines Reichert Ultracuts E (Reichert-Jung, Wien, Österreich) hergestellt, auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) montiert und bei 70°C für 1 – 2 Stunden auf dem Wärmetisch getrocknet.

2.4.2 Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Primärantikörper:

anti-GLAST-Antikörper affinitätsgereinigt in einer Konzentration bis zu 15 µg/ml

anti-GLT1a-Immunsereum	1:100
anti-GLT1b-Immunsereum	1:100
anti-EAAC1-Immunsereum	1:100
anti-Glutamin-Synthetase Antikörper	1:100
anti-β-III-Tubulin Antikörper	1:200

Sekundärantikörper:

Cy2 gekoppelter anti-Maus IgG-Antikörper	1:200
Cy3 gekoppelter anti-Kaninchen IgG-Antikörper	1:600

Kernfarbstoff

4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) 1:20.000

DAPI bindet an AT-reiche Regionen der DNA und dient der Zellkernfärbung in der Immunfluoreszenzmikroskopie (Kapuscinski, 1995)

2.4.3 Immunfluoreszenznachweis

Da Doppelimmunfluoreszenzen durchgeführt wurden, wurden sowohl die Primär- als auch die zwei Sekundärantikörper in jeweils einer Lösung zusammenpipettiert.

Die Semidünnschnitte wurden mit Natriummethanolat (Fluka) nach der Methode von Major et al. (1961) geätzt, um antigene Bindungsstellen freizulegen. Nach Spülen der Schnitte mit PBS erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 2 % bovinem Serum-Albumin und 10 % normalem Ziegen Serum in PBS/ 0,05% Tween (2 h, RT). Die Primärantikörperinkubation wurde in den angegebenen Verdünnungen (s. 2.4.2) in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Inkubation mit GLT1a-, GLT1b- und EAAC1-Antiseren und den monoklonalen Antikörpern gegen Glutamin-Synthetase oder β -III-Tubulin erfolgte für jeweils 24 Stunden, die mit GLAST-Antikörper für 48 Stunden bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch Spülen der Schnitte mit PBS entfernt (3x 5 min).

Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern bzw. DAPI fand für 45 – 60 Minuten bei RT lichtgeschützt in der feuchten Kammer statt. Nach erneutem Spülen der Schnitte mit PBS (3x 5 min) wurden diese mit 1 % (w/v) n-Propylgallat (3,4,5-Trihydroxybenzolsäure n-Propylester; Fluka) in 60 % Glycerinlösung bedeckt und mit Deckgläschen eingedeckt. N-Propylgallat soll das „Ausbleichen“ der Schnitte bei UV-Licht verhindern (Giloh und Sedat, 1982). Untersucht und fotografiert wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe eines Zeiss Axioskop 2 mot plus Fluoreszenzmikroskops mit geeigneten Filtern für die Visualisierung von Cy2, Cy3 und DAPI. Die Bilder wurden mittels des Software Programms SPOT Advanced Version 4.6 dargestellt und gespeichert. Die Bearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0.

3 Ergebnisse

3.1 Westernblot-Analysen

Die mengenmäßigen Veränderungen der Glutamattransporter GLAST, GLT1a, GLT1b und EAAC1 in Kleinhirnhomogenaten von Mäusen im Alter von P5, P9, P14, P21 und P28 wurden durch Westernblot-Analysen (10 % SDS-PAGE) und anschließende Grauwertanalysen (s. 2.3.8) ermittelt. Die Grauwerte wurden jeweils in Beziehung zu den Grauwerten der 5 Tage alten Tiere (= 100 %) gesetzt. Das Signifikanzniveau im U-Test wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Die in den Westernblots ermittelten Molekulargewichte der vier Glutamattransporter stimmen mit den Angaben in der Literatur überein (Danbolt et al., 1992; Storck et al., 1992; Rothstein et al., 1994; Schmitt et al., 2002).

Folgende Molekulargewichte (Abb. 3.1-3.4) wurden ermittelt:

GLAST	~65 kiloDalton (kDa)
GLT1a	~70 kDa
GLT1b	~65 kDa
EAAC1	~63 kDa

Beim Nachweis von GLT1a ergaben sich neben der Hauptbande bei ~70 kDa auch höhermolekulare Banden, die mehrfach in der Literatur berichtet wurden und vermutlich Aggregate des stark glykosylierten GLT1a darstellen (Rothstein et al., 1994).

3.1.1 GLAST

Die statistische Auswertung ergibt eine signifikante Zunahme der GLAST-Immunreaktivität von P5 (100 ± 45 %, $n=7$) bis P21 (750 ± 46 %, $n=7$) um ~650 %, wobei die größte Zunahme zwischen P14 und P21 (um ~360 %) zu beobachten ist (s. Abb. 3.1). Zwischen P21 und P28 ergeben sich keine

signifikanten Unterschiede mehr, so dass vermutlich in dieser Zeitphase das adulte Stadium erreicht wird.

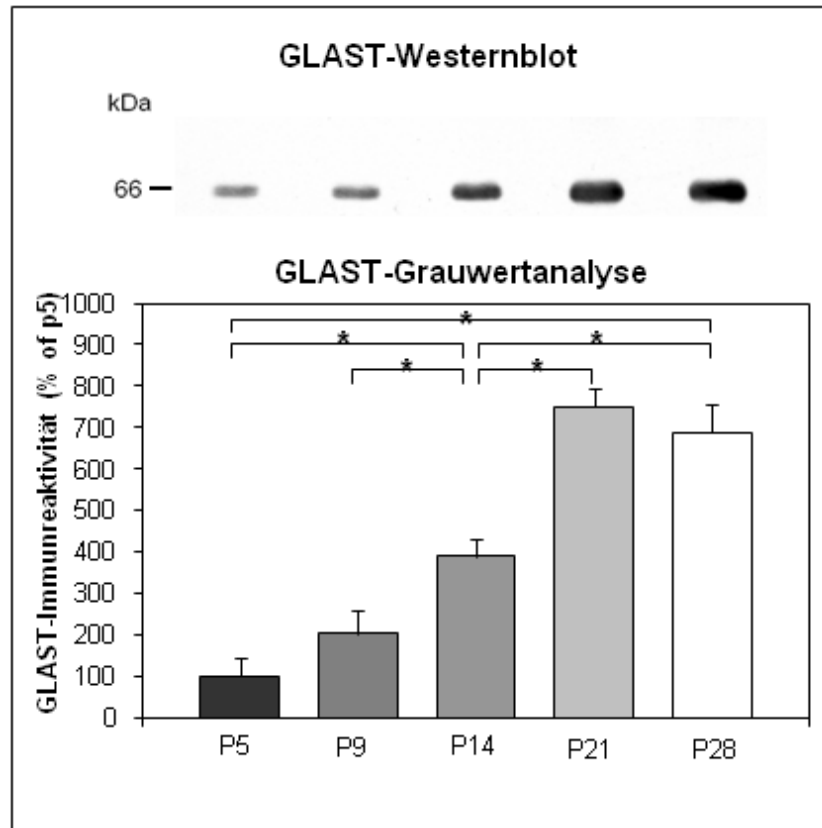


Abb. 3.1 Westernblot-Analyse des Glutamattransporters GLAST im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungstage P5 – P28).

Verwendet wurde das 100.000g Pellet von Kleinhirnhomogenaten. Die Proteine wurden mittels 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Pro Spur wurde 5 µg Protein aufgetragen. Der affinitätsgereinigte anti-GLAST-Antikörper bindet an ein Protein in Höhe von ~65 kDa. In der Abbildung oben ist ein repräsentativer Westernblot dargestellt. In der Abbildung unten sind die mittels Grauwertanalyse ermittelten mengenmäßigen Veränderungen von GLAST als Säulendiagramm aufgetragen. Diese ergaben sich aus 7 voneinander unabhängig durchgeführten Westernblots. Die Grauwerte (Mittelwert ± Standardfehler) wurden auf P5 (=100 %) bezogen.

* $p < 0,05$ (U-Test). P = Postnataltag

3.1.2 GLT1a

Die GLT1a-Immunreaktivität nimmt zwischen P5 (100 ± 63 %, $n=6$) und P21 (1500 ± 200 %, $n=6$) signifikant auf das 15fache zu. Die größte Zunahme

(~1000 %) ist zwischen den Entwicklungstagen P14 und P21 festzustellen. Zwischen P21 und P28 besteht kein signifikanter Unterschied. In dieser Entwicklungsphase scheint bei GLT1a das adulte Stadium erreicht zu sein (s. Abb. 3.2).

Von allen untersuchten Glutamattransportern wird somit bei GLT1a die größte Zunahme im Laufe der Entwicklung beobachtet.

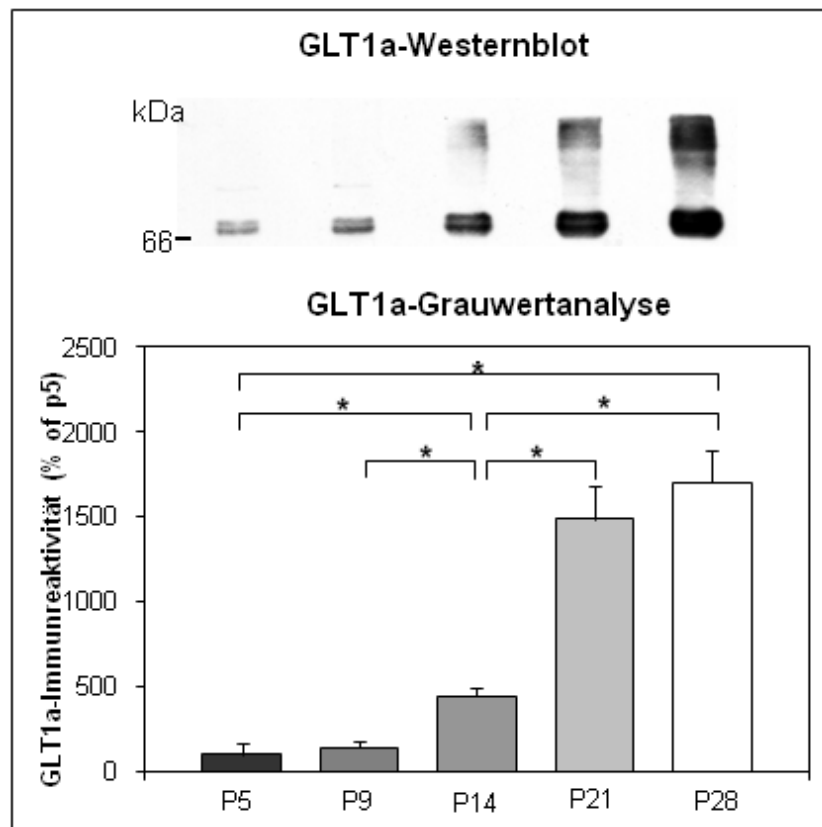


Abb. 3.2 Westernblot-Analyse des Glutamattransporters GLT1a im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungstage P5 – P28).

Die Aufarbeitung der Proben und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie unter Abb. 3.1 beschrieben. Zum Nachweis von GLT1a wurden im Westernblot pro Spur 10 µg Protein aufgetragen. Das anti-GLT1a Immuserum bindet hauptsächlich an ein Protein in Höhe von ~70 kDa. Es wurden 6 voneinander unabhängige Westernblots ausgewertet.

Die Grauwerte (Mittelwert ± Standardfehler) wurden auf P5 (=100 %) bezogen.

* $p < 0,05$ (U-Test). P = Postnataltag

3.1.3 GLT1b

Die GLT1b-Immunreaktivität ist an P5, 9 und 14 niedrig (kein signifikanter Unterschied), nimmt jedoch von P14 (160 ± 30 %, $n=7$) bis P21 (310 ± 48 %, $n=7$) signifikant um ~ 150 % zu. Keine Unterschiede bestehen zwischen P21 und P28. Damit besteht die einzige und starke Zunahme der Immunreaktivität in der dritten Entwicklungswoche, wobei gleichzeitig das adulte Stadium erreicht wird (s. Abb.3.3).

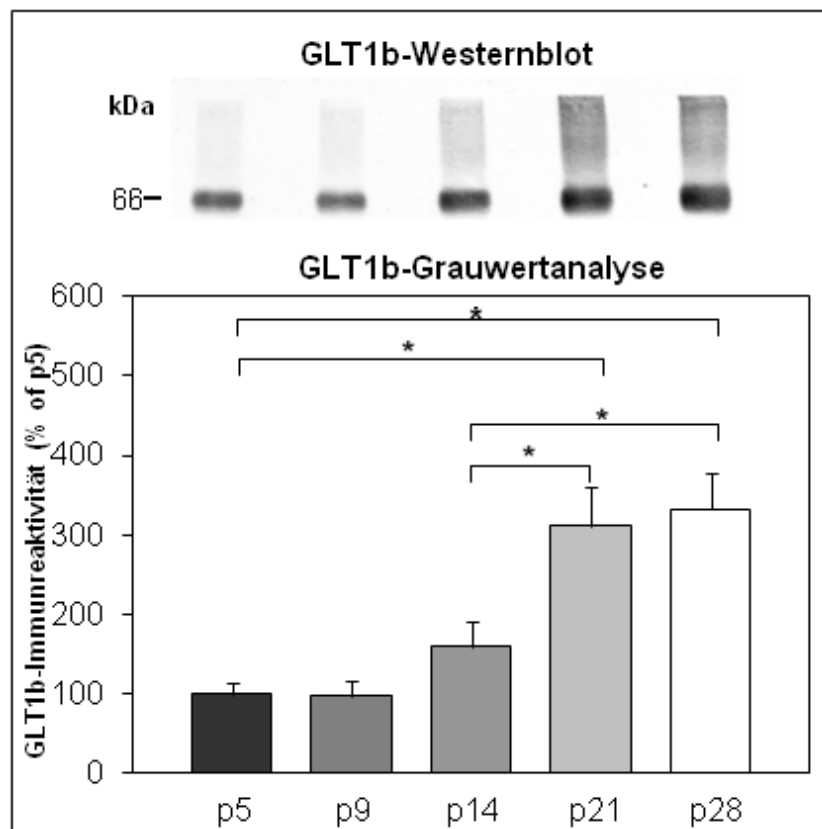


Abb. 3.3 Westernblot-Analyse des Glutamattransporters GLT1b im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungsstage P5 – P28).

Die Aufarbeitung der Proben und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie unter Abb. 3.1 beschrieben. Zum Nachweis von GLT1b wurden im Westernblot pro Spur 5 μ g Protein aufgetragen. Das anti-GLT1b Immenserum bindet an ein Protein in Höhe von ~ 65 kDa. Es wurden 7 voneinander unabhängige Westernblots ausgewertet.

Die Grauwerte (Mittelwert \pm Standardfehler) wurden auf P5 (=100 %) bezogen.

* $p < 0,05$ (U-Test). P = Postnataltag

3.1.4 EAAC1

Die höchsten EAAC1-Immunreaktivitäten sind früh postnatal an P5 und P9 nachweisbar (s. Abb. 3.4). Sie nehmen dann zwischen P14 ($70 \pm 18 \%$, $n=6$) und P28 ($35 \pm 10 \%$, $n=6$) signifikant um 35 % ab, so dass sie an P28 am niedrigsten sind. Damit ergibt EAAC1 als einziger der untersuchten Glutamattransporter eine postnatale Abnahme der nachweisbaren Immunreaktivität.

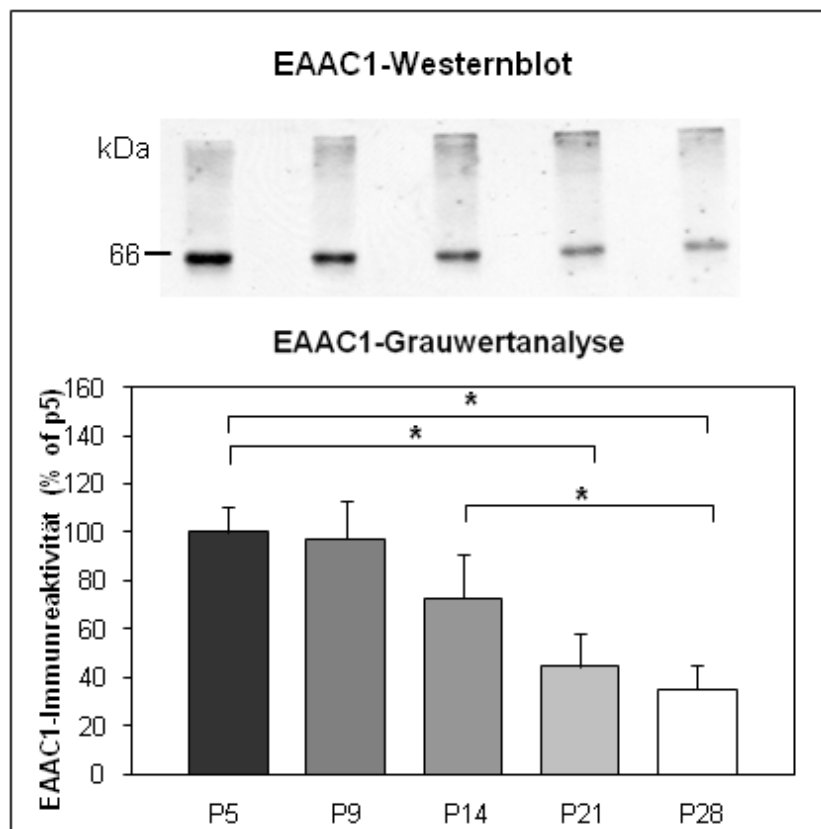


Abb. 3.4 Westernblot-Analyse des Glutamattransporters EAAC1 im Kleinhirn der Maus während der Entwicklung (postnatale Entwicklungsstage P5 – P28).

Die Aufarbeitung der Proben und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie unter Abb. 3.1 beschrieben. Zum Nachweis von EAAC1 wurden im Westernblot pro Spur 5 μg Protein aufgetragen. Das anti-EAAC1 Immenserum bindet an ein Protein in Höhe von ~ 63 kDa. Es wurden 6 voneinander unabhängige Westernblots ausgewertet.

Die Grauwerte (Mittelwert \pm Standardfehler) wurden auf P5 (=100 %) bezogen.

* $p < 0,05$ (U-Test). P = Postnataltag

3.2 Immunhistochemie

Die regionale und zelluläre Verteilung der Glutamattransporter GLAST, GLT1a, GLT1b und EAAC1 wurde während der postnatalen Ontogenese des Kleinhirns (Altersstufen: P5, P9, P14, P21, P28) mittels Immunhistochemie an Plastik-Semidünnschnitten untersucht. Für einen zellspezifischen Nachweis der Transporter wurden Doppelimmunfluoreszenzen durchgeführt. Beim Nachweis von GLAST oder GLT1a wurde gleichzeitig Glutamin-Synthetase (Gs) dargestellt. Gs gilt im ZNS vor allem als Markerprotein für astrozytäre Gliazellen, einschließlich Bergmann-Gliazellen (Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979; Tansey et al., 1991). Allerdings wurde Gs auch in Oligodendrozyten nachgewiesen (D'Amelio et al., 1990). Beim Nachweis von GLT1b oder EAAC1 wurde gleichzeitig β -III-Tubulin zur Darstellung gebracht. β -III-Tubulin gilt als Markerprotein von Neuronen und Oligodendrozyten im ZNS (Schaeren-Wiemers et al., 1995). Um eine bessere Zuordnung der immunzytochemisch markierten Zellen zu den einzelnen Schichten der Kleinhirnrinde zu ermöglichen, wurde eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt.

Die Befunderhebung erfolgte an folgenden Schichten der Kleinhirnrinde: Äußere Körnerzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht und innere Körnerzellschicht. Das Kleinhirnmark wurde nicht berücksichtigt.

3.2.1 GLAST (Abb. 3.5)

In Übereinstimmung mit den Westernblot-Analysen ist zwischen P5 und P21 eine Zunahme der GLAST-Immunreaktivität in der Kleinhirnrinde festzustellen. Bei sämtlichen untersuchten Entwicklungsstadien scheint GLAST ausschließlich in Astrozyten der inneren Körnerzellschicht und in Bergmann-Gliazellen der Molekularschicht und äußeren Körnerschicht lokalisiert zu sein (Abb. 3.5). Dies ergibt sich aus der Kolo-kalisation von GLAST und Gs. Dies entspricht der im adulten Kleinhirn nachgewiesenen Lokalisation (Lehre et al., 1995; Schmitt et al., 1997).

In abgrenzbaren Neuronen, z.B. Purkinjezellen und Körnerzellen, sowie in proliferierenden Progenitorzellen und Proneuronen der Körnerzellen der äußeren Körnerzellschicht ist GLAST nicht nachweisbar (Abb. 3.5 A). Die in der äußeren Körnerzellschicht lokalisierten GLAST-positiven Zellfortsätze sind auch Gs-positiv und damit eindeutig den Bergmann-Gliazellen zuzuordnen (Abb. 3.5 D). Die Fortsätze der Bergmann-Gliazellen sind an P5 und P9 noch wenig verzweigt (Abb. 3.5 A, F), während ihre Verzweigungen an P14 und P21 stark zunehmen und diese Verästelungen die Molekularschicht erfüllen (Abb. 3.5 O). Die äußere Körnerzellschicht besteht an P14 nur noch aus ein bis zwei Zellreihen (Abb. 3.5 N) und sie ist an P21 gar nicht mehr nachweisbar. An P28 ergibt sich dasselbe Reaktionsmuster für GLAST wie an P21 (Abb. 3.5 R).

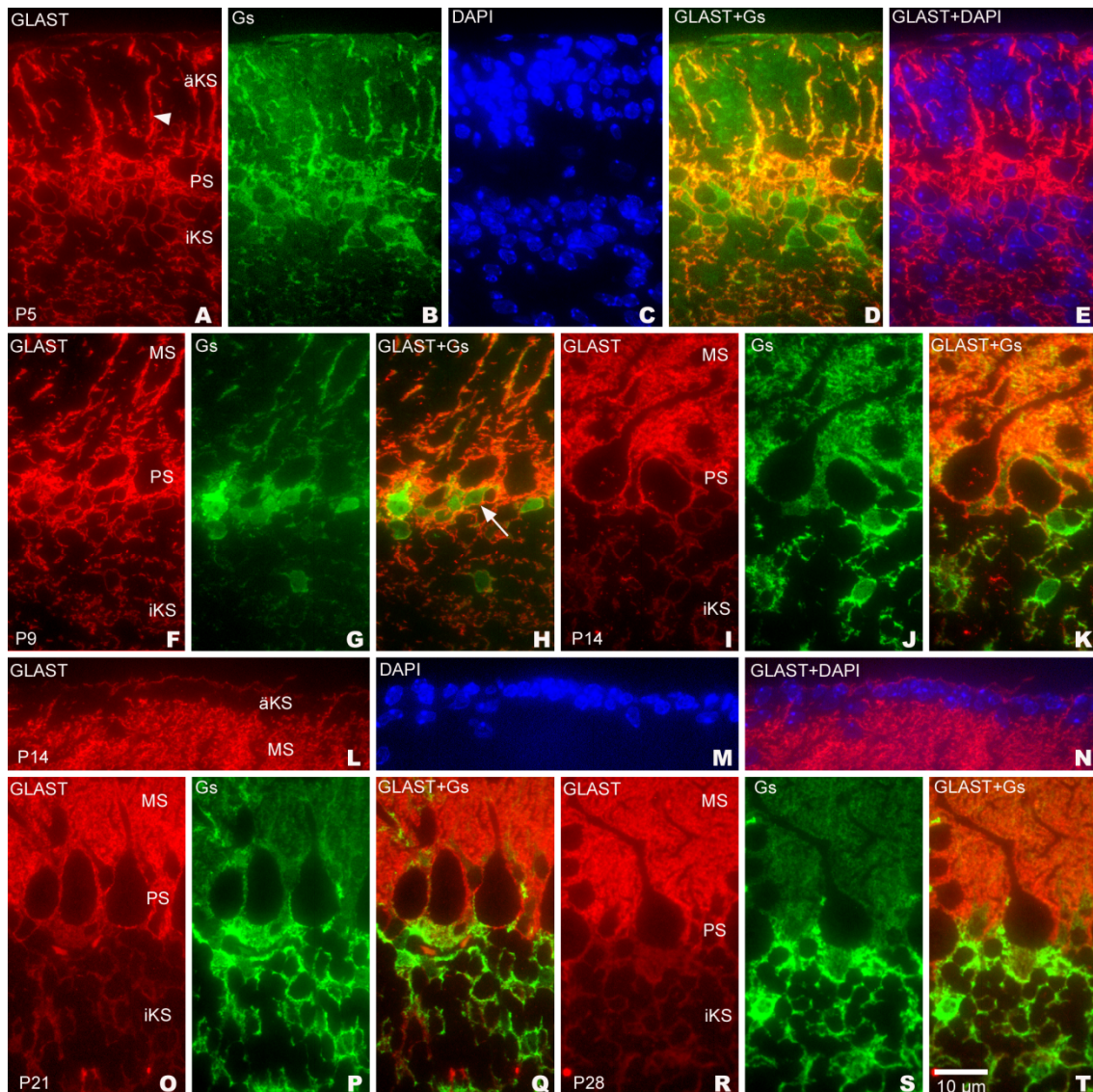


Abb. 3.5 Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLAST (rot) und Glutaminsynthetase (Gs; grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – E), P9 (F – H), P14 (I – N), P21 (O – Q) und P28 (R – T). Zusätzliche Zellkerndarstellung mit DAPI (C,E,M,N).

Eine Lokalisation von GLAST in den Astrozyten der inneren Körnerzellschicht, in den Bergmann-Gliazellen der Purkinjezellschicht und äußeren Molekularschicht ergibt sich aus der Kolo-kalisation von GLAST und Gs (H; Pfeil). Alle anderen Zelltypen sind GLAST-negativ. Bereits an P5 durchziehen die GLAST-positiven Fortsätze der Bergmann-Gliazellen die äußere Körnerzellschicht (A; Pfeilspitze). An P14 (I) und P21 (O) hat die GLAST-Immunreaktion in der Molekularschicht - bedingt durch die zunehmenden Verästelungen der Bergmann-Gliazellen - stark zugenommen. An P14 wird die äußere Körnerzellschicht nur noch von ein bis zwei Zellreihen gebildet (L, M, N).

äKS, äußere Körnerzellschicht; MS, Molekularschicht; PS, Purkinjezellschicht; iKS, innere Körnerzellschicht; P, Postnataltag; Maßstabsbalken = 10µm.

3.2.2 GLT1a (Abb. 3.6)

In Übereinstimmung mit den Westernblot-Analysen ist die GLT1a-Immunreaktivität an P5 und P9 schwach und nimmt vor allem zwischen P14 und P21 stark zu, um dann an P28 keine Veränderungen gegenüber P21 zu zeigen (Abb. 3.6). Ähnlich wie bei GLAST scheint auch GLT1a hauptsächlich in Astrozyten und Bergmann-Gliazellen lokalisiert zu sein, was sich aus der Kolo-kalisation mit Gs schließen lässt. Dabei nimmt die Immunreaktivität in den Fortsätzen der Bergmann-Gliazellen (Molekular- und Purkinjezellschicht) ab P14 und in den Astrozyten der inneren Körnerzellschicht vor allem ab P21 stark zu (Abb. 3.6 I, L). Abgrenzbare Neurone, insbesondere Purkinjezellen und Körnerzellen, sind GLT1a-negativ.

Einer besonderen Erwähnung bedarf die äußere Körnerzellschicht. Die hier lokalisierten Progenitorzellen und Proneurone der Körnerzellen sind an P5 und P9 zumindest z.T. GLT1a-positiv (Abb. 3.6 A, F). Vor allem an P5 fällt eine relativ starke Immunreaktion bei einem Teil dieser Zellen auf (Abb. 3.5 A), wobei auch eine unspezifische Kernfärbung in diesen Zellen zu beobachten ist (diese ist an P5 auch bei anderen Zellen der Kleinhirnrinde vorhanden). An P9 ist die Immunreaktivität in der äußeren Körnerzellschicht relativ schwach (Abb. 3.6 F) und an P14 nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.6 I).

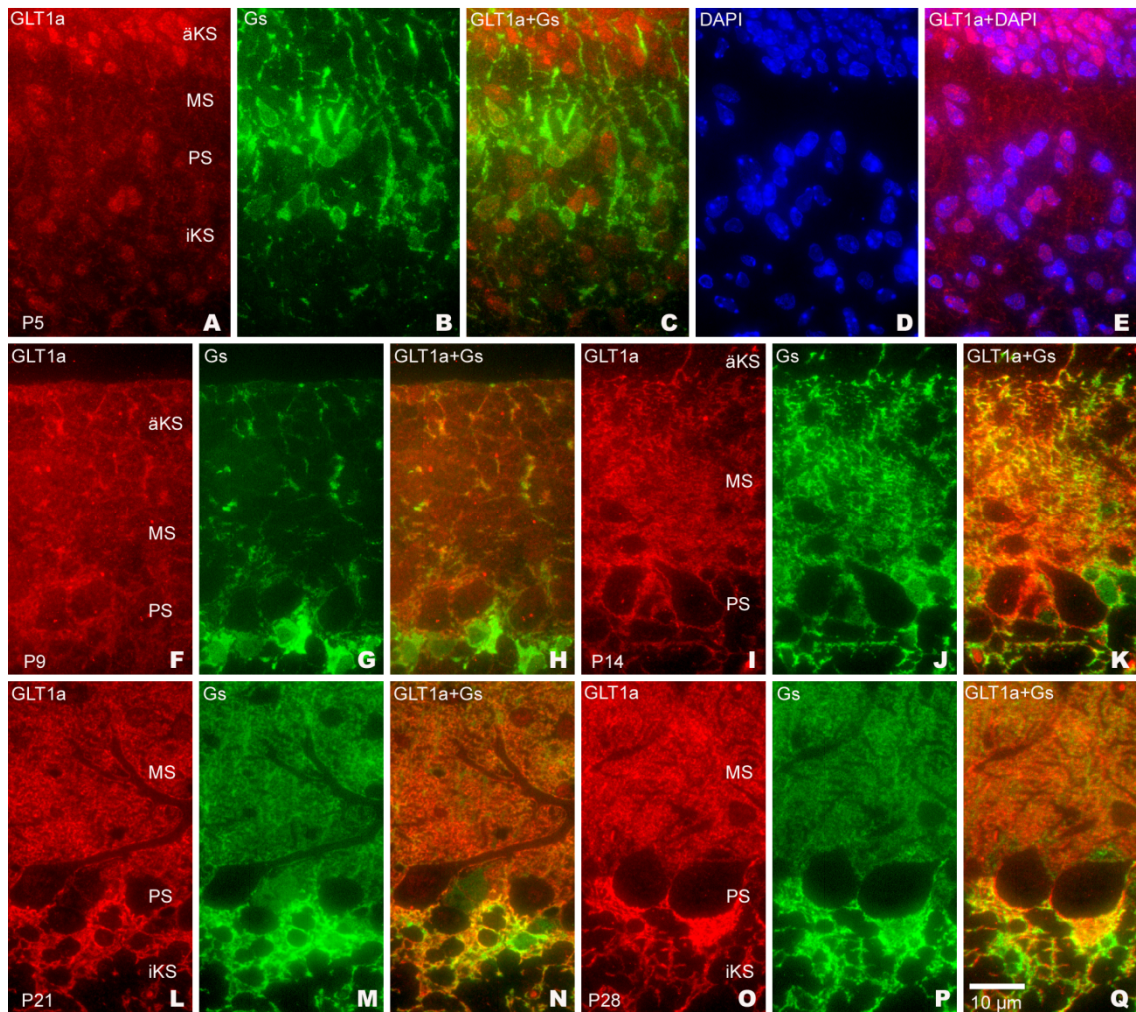


Abb. 3.6 Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLUT1a (rot) und Glutaminsynthetase (Gs; grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – E), P9 (F – H), P14 (I – K), P21 (L – N) und P 28 (O – Q). Zusätzliche Zellkerndarstellung mit DAPI (D, E).

GLT1a scheint hauptsächlich in astrozytären Gliazellen lokalisiert zu sein, was sich aus der Kolokalisation mit Gs schließen lässt (C, H, K, N, Q). Vor allem an P5 (A) fällt bei einem Teil der äußeren Körnerzellen eine GLUT1a-positive Immunreaktion auf.

äKS, äußere Körnerzellschicht; iKS, innere Körnerzellschicht; PS, Purkinjezellschicht; MS, Molekularschicht; P, Postnataltag; Maßstabsbalken = 10µm.

3.2.3 GLT1b (Abb. 3.7)

Im Gegensatz zu den Westernblot-Analysen scheint die GLT1b-Immunreaktivität zwischen P5 und P21/28 kontinuierlich in der Kleinhirnrinde zuzunehmen (Abb. 3.7). Hinsichtlich einer zellulären Lokalisation lässt sich zu keinem postnatalen Entwicklungszeitpunkt eine eindeutige gliale Zuordnung von GLT1b treffen. Eine neuronale GLT1b-Immunreaktivität lässt sich jedoch durch gleichzeitige Darstellung von neuronalem β -III-Tubulin mit Sicherheit feststellen (Abb. 3.7 R).

Die GLT1b-Immunreaktivität in Purkinjezellen ist an P5 gering (Abb. 3.7 A) und nimmt dann ab P9 und P14 stark zu, um schließlich an P21 und P28 gleich hoch zu bleiben. Die Immunreaktion erfolgt dabei vor allem im Zytoplasma der Perikarya und deutlich weniger in dem von Dendriten. Die Körnerzellen der inneren Körnerzellschicht sind an P5 schwach GLT1b-immunpositiv (Abb. 3.7 A). Ab P9 sind diese Körnerzellen deutlich stärker positiv (Abb. 3.7 D). Ab P21 können GABAerge Interneurone (Korb- und Sternzellen) in der Molekularschicht durch eine deutliche Immunreaktion abgegrenzt werden (Abb. 3.7 M; Pfeilspitzen).

Auffallend ist die GLT1b-Immunreaktion in der äußeren Körnerzellschicht. Von P5 (Abb. 3.7 A) bis P14 (Abb. 3.7 J) enthalten die äußeren Körnerzellen im Zytoplasma GLT1b-Immunprodukt. Dabei besteht an P9 und P14 ein Gradient bei der Immunreaktivität: oberflächliche Körnerzellen sind deutlich stärker immun-positiv als die nach innen folgenden (Abb. 3.7 A). Umgekehrtes gilt für die β -III-Tubulin-Immunreaktivität, die nur in den nach innen gelegenen Körnerzellen nachweisbar ist.

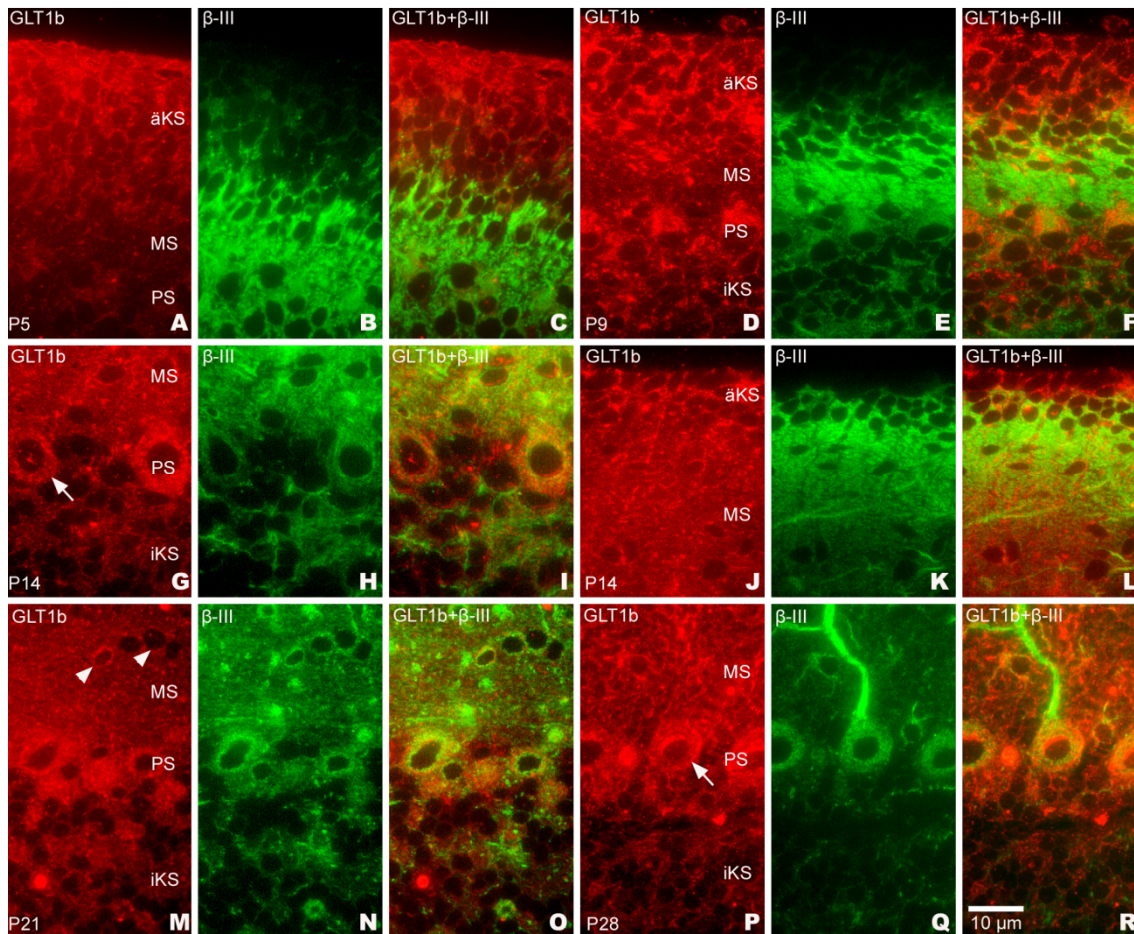


Abb. 3.7 Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLT1b (rot) und β -III-Tubulin (grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – C), P9 (D – F), P14 (G – L), P21 (M – O) und P28 (P – R).

Für GLT1b lässt sich durch die Kolo­kalisierung mit β -III-Tubulin eine neuronale Lokalisation feststellen (C, F, I, O, R). Die GLT1b-Immunreaktion erfolgt dabei vor allem im Zytoplasma der Perikarya von Purkinje- (G, P; Pfeile) und Körnerzellen. Ab P21 können GLT1b-positive Interneurone (Korb- und Sternzellen) in der Molekularschicht abgegrenzt werden (M; Pfeilspitzen). Von P5 bis P14 sind die äußeren Körnerzellen GLT1b-positiv (A, D, J), wobei vor allem an P5 zu erkennen ist, dass oberflächliche Körnerzellen stärker immun-positiv sind als die nach innen folgenden (A). Diese oberflächlichen Körnerzellen weisen keine β -III-Immunreaktivität auf (B).

äKS, äußere Körnerzellschicht; MS, Molekularschicht; PS, Purkinjezellschicht; iKS, innere Körnerzellschicht; P, Postnataltag; β -III, β -III-Tubulin; Maßstabsbalken = 10 μ m.

3.2.4 EAAC1 (Abb. 3.8)

Die zelluläre Verteilung von EAAC1 stimmt weitgehend mit der von GLT1b überein, d.h. eine neuronale Lokalisation (nachgewiesen durch die gleichzeitige Darstellung von β -III-Tubulin) ist eindeutig nachweisbar. Eine gliale Reaktion ist nicht differenzierbar.

Im Gegensatz zu GLT1b sind Purkinjezellen bereits an P5 deutlich immunpositiv für EAAC1 (Abb. 3.8 A; Pfeil). Ähnliches trifft für P9 zu (Abb. 3.8 D; Pfeil). In den folgenden Entwicklungstagen scheint die Immunreaktivität von Purkinjezellen abzunehmen (Abb. 3.8 G, M, P). EAAC1 ist wie GLT1b vor allem im Zytoplasma enthalten, was besonders an P5 und P9 auffällt (Abb. 3.8 A, D; Pfeil).

Die Immunreaktivität von Interneuronen und inneren Körnerzellen in Abhängigkeit von der Entwicklung stimmen weitgehend mit den Beobachtungen bei GLT1b überein.

Besonders bemerkenswert ist die starke Immunreaktion aller äußeren Körnerzellen an P5 und P9 (Abb. 3.8 A, D), die auch noch an P14 zu beobachten ist (Abb. 3.8 J). Die oberflächlichen Körnerzell-Progenitorzellen reagieren negativ beim Nachweis von β -III-Tubulin (Abb. 3.8 B, E). Hinsichtlich der EAAC1-Immunreaktivität dominiert an P5 und P9 die äußere Körnerzellschicht im Vergleich zur übrigen Kleinhirnrinde.

Die zahlenmäßige Abnahme der stark immunpositiven äußeren Körnerzellen könnte auch die ab P14 im Westernblot nachgewiesene Abnahme der EAAC1-Immunreaktivität erklären.

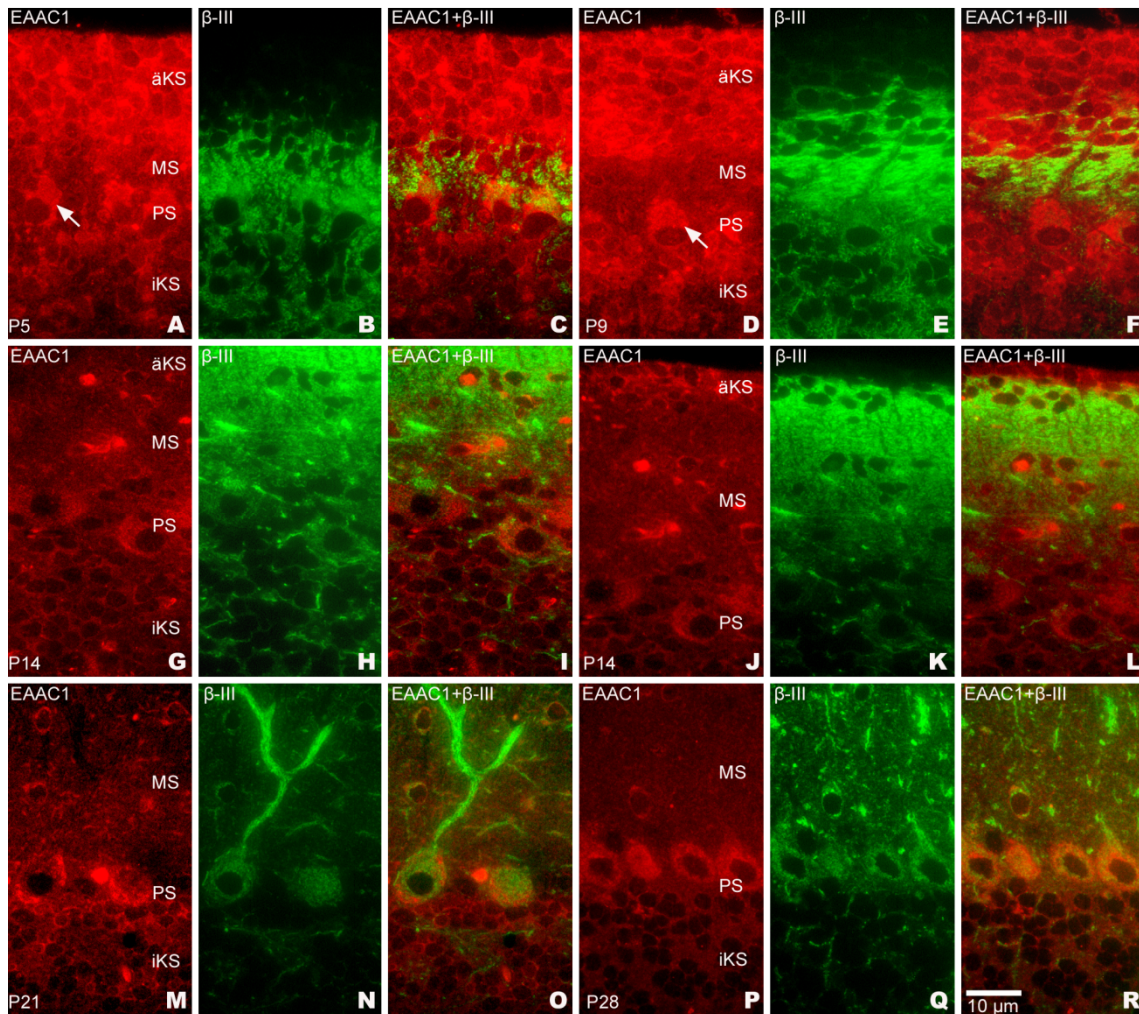


Abb. 3.8 Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von EAAC1 (rot) und β -III-Tubulin (grün) an Semidünnschnitten der Kleinhirnrinde an P5 (A – C), P9 (D – F), P14 (G – L), P21 (M – O) und P28 (P – R).

Die Kolo­kalisierung mit β -III-Tubulin zeigt, dass EAAC1 in Neuronen der Kleinhirnrinde lokalisiert ist (C, F, I, L, O, R). Bereits an P5 reagieren Purkinjezellen deutlich EAAC1-positiv (A, Pfeil). Bemerkenswert ist die starke EAAC1-Immunreaktion der äußeren Körnerzellen an P5 (A) und P9 (D), die auch noch an P14 (J) zu beobachten ist. An P5 und P9 dominiert die äußere Körnerzellschicht im Vergleich zur übrigen Kleinhirnrinde hinsichtlich der EAAC1-Immunreaktivität.

äKS, äußere Körnerzellschicht; MS, Molekularschicht; PS, Purkinjezellschicht; iKS, innere Körnerzellschicht; P, Postnataltag; β -III, β -III-Tubulin; Maßstabsbalken = 10 μ m.

4 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung hat vor allem ergeben, dass (1) im Laufe der postnatalen Kleinhirnentwicklung die Glutamattransporter GLAST, GLT1a und GLT1b mengenmäßig zunehmen und die Menge an EAAC1 demgegenüber abnimmt, (2) die stärkste mengenmäßige Zunahme von GLAST, GLT1a und GLT1b in der Phase der Synaptogenese stattfindet, (3) die zelluläre Verteilung der Glutamattransporter in der Molekular-, Purkinjezell- und inneren Körnerzellschicht während der postnatalen Entwicklung der adulten Verteilung entspricht und (4) die Glutamattransporter GLT1a, GLT1b und insbesondere EAAC1 in den Progenitorzellen und Proneuronen der äußeren Körnerzellschicht unterschiedlich stark nachweisbar sind.

4.1 Quantitative Veränderungen der Glutamattransporter im Verlauf der postnatalen Kleinhirnentwicklung

Während der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns der Maus zeigen unsere Westernblot- und Grauwertanalysen eine Zunahme der Immunreaktivität für GLAST, GLT1a und GLT1b im Laufe der untersuchten Entwicklungsspanne von P5 bis P21. Die Immunreaktivität von EAAC1 nimmt demgegenüber in diesem Untersuchungszeitraum ab. Nach P21 kommt es bei diesen Transportern zu keinen signifikanten Veränderungen mehr, so dass davon auszugehen ist, dass bis P21 das adulte Niveau erreicht wird. Diese Befunde zu GLAST, GLT1a und EAAC1 stehen weitgehend in Einklang mit solchen, die vor allem an Ratten (Sutherland et al., 1996; Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997) erhoben wurden. Zu der mengenmäßigen Veränderung des Glutamattransporters GLT1b in der Kleinhirnentwicklung gibt es bisher noch keine vergleichbaren Literaturdaten.

Korrelation der quantitativen Veränderungen der Glutamatttransporter mit wichtigen Schritten in der Reifung der Kleinhirnrinde

Während der Kleinhirnentwicklung beginnen sich die Parallelfaser-Purkinjellsynapsen an P12 zu formieren (Altman, 1972b). Zeitgleich findet eine Veränderung der Zytoarchitektur der Bergmann-Gliazellen von einem palisadenähnlichen Gerüst zu einem retikulären Netzwerk statt, welches die reifenden Purkinjellsynapsen umgibt (Altman, 1972b; Yamada und Watanabe, 2002). Folglich korreliert die stärkste Zunahme von GLAST-, GLT1a- und GLT1b-Protein zwischen P14 und P21 (unsere Untersuchungen) mit der beginnenden Synaptogenese und der Transformation der Bergmann-Gliazellen in der Kleinhirnrinde. Eine Korrelation zwischen der Zunahme von GLAST- und GLT1a-Protein und der beginnenden Synaptogenese wurde bereits von Furuta et al. (1997) diskutiert. Yamada et al. (2000) konnten außerdem eine Hochregulation von GLAST in den Bergmann-Gliazellen zum Zeitpunkt ihrer Transformation nachweisen.

Bemerkenswerterweise führt Glutamat selbst zu einer Hochregulation von GLAST und damit verbunden der Glutamataufnahme (Gegelashvili und Schousboe, 1997). Dies ist möglicherweise auf die Aktivierung glialer metabotroper Glutamatrezeptoren (Gegelashvili et al., 2000) oder die des ionotropen Kainatrezeptors zurückzuführen (Gegelashvili et al., 1996). Daher könnte die Hochregulation von GLAST in den Bergmann-Gliazellen auf die reifenden Parallelfaser-Purkinjell-Synapsen zurückzuführen sein, da die exzitatorischen Parallelfasern Glutamat bei der Neurotransmission freisetzen.

Die Bedeutung von EAAC1 in der Entwicklung wird daraus ersichtlich, dass dieser neuronale Transporter die extrazelluläre Glutamatkonzentration in Zellkulturen bereits in den Stadien niedrig halten kann, in denen gliale Glutamatttransporter noch nicht in ausreichender Menge vorhanden sind (Guillet et al., 2002). Dies lässt sich mit dem Befund in Einklang bringen, dass im Gegensatz zu den drei Glutamatttransportern GLAST, GLT1a und GLT1b die höchsten Konzentrationen von EAAC1-Protein früh postnatal erreicht werden (Furuta et al., 1997). Unsere Westernblot-Analysen bestätigen eine Abnahme der EAAC1-Immunreaktivität im Kleinhirn der Maus Ende der zweiten

Entwicklungswoche. Diese Abnahme könnte nach unseren Befunden durch die zeitgleich stattfindende Differenzierung bzw. Wanderung der Körnerzell-Progenitorzellen bzw. -Proneurone und der damit verbundenen Verschmälerung der stark EAAC1-immunpositiven äußeren Körnerzellschicht bedingt sein. Ob jedoch im Laufe der Entwicklung das Maximum der EAAC1-Menge im Kleinhirn der Maus erst postnatal vorliegt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Am Schaf konnte nämlich eine Abnahme von EAAC1-Protein bereits im Laufe der embryonalen Kleinhirnentogenese nachgewiesen werden (Northington et al., 1998).

4.2 Zelluläre Verteilung der Glutamattransporter während der postnatalen Histogenese der Kleinhirnrinde

Astrozytäre Gliazellen

In astrozytären Gliazellen, d.h. in Bergmann-Gliazellen und Astrozyten, konnten wir ab P5 GLAST- und GLT1a-Protein in deren Zellkörpern und Fortsätzen nachweisen. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit Untersuchungen an der Ratte überein (Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997). GLT1b- und EAAC1-Protein konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt der postnatalen Ontogenese der Kleinhirnrinde glialen Strukturen zugeordnet werden (unsere Untersuchungen). Damit können in zerebellären astrozytären Gliazellen während der postnatalen Entwicklung die gleichen Transporter nachgewiesen werden wie im adulten Tier (zur Transporterverteilung im adulten Tier siehe Rothstein et al., 1994; Chaudhry et al., 1995). Auch in Radialgliazellen des Rückenmarks (die analoge Funktionen wie die Bergmann-Gliazellen haben) konnte GLAST auf mRNA- und Protein-Ebene während der Entwicklung der Maus nachgewiesen werden (Shibata et al., 1997).

Von Berger et al. (2005) wurde zusätzlich eine Expression von GLT1b-mRNA in den Astrozyten der Kleinhirnrinde beschrieben. Eine sichere gliale Zuordnung von GLT1b-Protein während der Entwicklung und im adulten Tier war in unseren Untersuchungen nicht möglich. Unterstützt wird unser Befund durch Untersuchungen von Schmitt et al. (2002), die eine GLT1b-Expression lediglich

in Neuronen und nicht-astrozytären Gliazellen des Kleinhirns feststellen konnten.

Neurone

Nach unseren Untersuchungen an der Kleinhirnrinde der Maus sind Purkinjezellen und reife Körnerzellen der inneren Körnerschicht ab P5 und GABAerge Interneurone der Molekularschicht ab P21 GLT1b- und EAAC1-positiv. Während für EAAC1 bereits eine rein neuronale Verteilung in der embryonalen Ontogenese des Kleinhirns des Schafs beschrieben wurde (Northington et al., 1998), liegen für die Lokalisation von GLT1b während der Entwicklung bisher keine vergleichbaren Daten vor. Die von uns beobachtete rein neuronale Lokalisation von GLT1b- und EAAC1-Protein in der Kleinhirnrinde der Maus wurde allerdings bereits für die adulte Ratte beschrieben (Rothstein et al., 1994; Schmitt et al., 2002).

Demgegenüber konnten von uns GLAST- und GLT1a-Protein nicht in reifen Neuronen der postnatalen Kleinhirnrinde nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit Befunden, die während der postnatalen Entwicklung der Ratte und beim adulten Tier erhoben wurden (Schmitt et al., 1996; Ullensvang et al., 1997).

Progenitorzellen und Proneurone

Bisher ist nur wenig über das Vorkommen von Glutamattransportern in Progenitorzellen und Proneuronen der äußeren Körnerzellschicht während der postnatalen Kleinhirntonogenese bekannt. Unsere Untersuchungen zeigen nun, dass GLT1a, GLT1b und insbesondere EAAC1 in Körnerzell-Progenitorzellen und -Proneuronen *in vivo* nachweisbar sind. Im Gegensatz dazu konnten Furuta et al. (1997) zu keinem Zeitpunkt der postnatalen Ontogenese der Ratte GLT1a-Protein in der äußeren Körnerzellschicht nachweisen, was möglicherweise mit dem unterschiedlichen methodischen Vorgehen zu erklären ist (Verwendung von perfusionsfixiertem Gewebe bei Furuta et al. im Gegensatz zu gefriergetrocknetem Gewebe in vorliegender Untersuchung).

Demgegenüber konnte bereits für andere ZNS-Regionen während der Entwicklung ein transientes Auftreten von GLT1a in Proneuronen und Neuronen nachgewiesen werden. So konnten Kugler und Schleyer (2004) zeigen, dass die Körnerzellen des Gyrus dentatus bis zu P10 GLT1a-mRNA exprimieren. Auch während der embryonalen Entwicklung des Schafs kommt GLT1a-Protein vorübergehend in Neuronen und Axonen der sekundären Rindenplatte, einiger motorischer Hirnnervenkerne, den Basalganglien und im Kleinhirn vor (Northington et al., 1998). Im Kleinhirn ist GLT1a transient von Embryonaltag 71 bis 110 in Purkinjezellen und Neuronen der Kleinhirnerne nachweisbar (Northington et al., 1998; Northington et al., 1999). Darüber hinaus ist GLT1a-Protein embryonal vorübergehend in wachsenden Axonen der Proneurone von Hinterhornneuronen nachweisbar, die von der Periventriculärzone zur Mantelzone wandern (Yamada et al., 1998). In reifen Neuronen der postnatalen Kleinhirnrinde ist GLT1a-Protein nicht nachweisbar (unsere Untersuchungen und Schmitt et al., 1996; Ullensvang et al., 1997).

4.3 Bedeutung von Glutamat bei der Kleinhirnentwicklung

Glutamat ist nicht nur ein entscheidender exzitatorischer Neurotransmitter im adulten Kleinhirn, er spielt auch in der Histogenese der Kleinhirnrinde eine zentrale Rolle. Es konnte eine Beteiligung sowohl von metabotropen als auch von ionotropen Glutamatrezeptoren an Proliferation, Differenzierung und Migration von Körnerzell-Progenitorzellen und -Proneuronen gezeigt werden (s.u.).

Die Gruppe der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) reguliert in der Entwicklung Proliferation, Differenzierung und Überleben von Stamm- und Progenitorzellen unterschiedlichen Ursprungs, so auch das von neuronalen Stammzellen (Melchiorri et al., 2007). Di Giorgi-Gerevini et al. (2004) konnten den mGlu5 Rezeptor in der äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns und in anderen Zonen der aktiven Neurogenese postnatal bei der Ratte nachweisen. Nach Aktivierung des mGlu5 Rezeptors kommt es zu einer erhöhten Proliferation neuronaler Progenitorzellen sowohl in Kultur als auch *in vivo* (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005). Eine mGlu5 Rezeptorblockade führt

erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Proliferation von Progenitorzellen (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005). Zusätzlich ist auch für verschiedene weitere Substanzen (IGF-1, EGF und das von Purkinjezellen sezernierte Sonic hedgehog) eine unterstützende Wirkung auf die Proliferation von Körnerzell-Progenitorzellen gezeigt worden (Ye et al., 1996; Wallace, 1999; Wechsler-Reya und Scott, 1999).

Ein spezifisches Signal, das zum Stopp der Proliferation von Körnerzell-Progenitorzellen und zum Beginn ihrer Differenzierung führt, wurde bisher noch nicht mit Sicherheit identifiziert (Tanaka et al., 2009). Lösliche Faktoren wie beispielsweise das Neuropeptid PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) und das Extrazellulärmatrix-Protein Vitronectin könnten Einfluss auf diesen Vorgang haben (Pons et al., 2001; Wechsler-Reya, 2001; Nicot et al., 2002). Zusätzlich konnte eine modulierende Wirkung des mGlu4 Rezeptors auf die Differenzierung zu Körnerzell-Proneuronen gezeigt werden (Canudas et al., 2004). Der mGlu4 Rezeptor ist neben dem mGlu5 Rezeptor in kultivierten Körnerzell-Progenitorzellen nachweisbar. Eine spezifische Aktivierung des mGlu4 Rezeptors mittels PHCCC (N-phenyl-7-(hydroxyimino)cyclopropa[b]chromen-1a-carboxamide) führt zu einer reduzierten Proliferation der Körnerzell-Progenitorzellen und fördert die frühe Neuritogenese und damit die Reifung der Körnerzellen *in vitro* (Canudas et al., 2004).

Darüber hinaus wurde ein Einfluss von Glutamat durch Rezeptoraktivierung auf die radiale Körnerzellmigration aus der äußeren Körnerzellschicht durch die Molekularschicht in die innere Körnerzellschicht bereits in mehreren Arbeiten beschrieben (Komuro und Rakic, 1993; Tarnok et al., 2008). Die Körnerzellmigration ist ein saltatorischer Prozess, wobei die vorwärts gerichtete Bewegung der Körnerzellen mit einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration korreliert (Komuro und Yacubova, 2003). Für die Migration sind intrazellulär jedoch keine konstant hohen, sondern oszillierende Ca^{2+} Konzentrationen notwendig, die durch die Aktivierung ionotroper NMDA (N-methyl-D-aspartat) -Rezeptoren hervorgerufen werden (Komuro und Yacubova, 2003; Kumada und Komuro, 2004).

Diese NMDA-Rezeptoren konnten auf prä migratorischen und migrierenden Körnerzellen nachgewiesen werden, die die äußere Körnerzellschicht verlassen und an ihre endgültige Position wandern (Rossi und Slater, 1993; Farrant et al., 1994). Insbesondere der NR2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors wird hierbei eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben (Mancini und Atchison, 2007). *In vitro*- und *in vivo*- Untersuchungen von Tarnok (2008) zeigen, dass eine Überexpression der NR2B Untereinheit eine Zunahme der migratorischen Aktivität von Körnerzellen zur Folge hat.

Die NMDA-Rezeptor-abhängige Zellmigration kann außerdem durch die Blockade glialer Glutamattransporter beeinflusst werden, wobei diese Blockade zu einer verstärkten NMDA-abhängigen Körnerzellmigration führt (Komuro und Rakic, 1993). Sutherland et al. (1996), die die mRNA von GLAST und GLT1 in proximalen Bergmann-Gliazell-Fortsätzen der Kleinhirnrinde nachweisen konnten, folgerten daraus, dass diese glialen Glutamattransporter die NMDA-Rezeptor vermittelte Körnerzellmigration über die Kontrolle der extrazellulären Glutamatkonzentration beeinflussen könnten. Unterstützt wird diese Hypothese von einer Untersuchung, in der gezeigt wurde, dass der Glutamattransporter GLAST auch in Radialgliazellen des Rückenmarks vorkommt, und zwar zum Zeitpunkt der Migration von Proneuronen (Shibata et al., 1997).

Da nach unseren Untersuchungen die Glutamattransporter GLT1a, GLT1b und EAAC1 in den Progenitorzellen und Proneuronen der äußeren Körnerzellschicht nachweisbar sind, und außerdem GLAST und GLT1a in den Radialfortsätzen der Bergmann-Gliazellen lokalisiert sind, ist anzunehmen, dass diese durch die Regulation der lokalen Glutamatkonzentration Einfluss auf die Aktivität von Glutamatrezeptoren haben. Sie könnten somit Proliferation, Differenzierung und Migration von zerebellären Körnerzellen regulieren.

5 Zusammenfassung

Glutamat wird während der ZNS Entwicklung eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Migration von Progenitorzellen und Proneuronen sowie eine wichtige Rolle bei der Synapseninduktion zugeschrieben. Da hochaffine Na^+ -abhängige Glutamattransporter die extrazelluläre Glutamatkonzentration durch die Aufnahme des Neurotransmitters in den Intrazellularraum regulieren können, kommt ihnen eine besondere Bedeutung zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die zelluläre Lokalisation der Glutamattransporter GLAST, GLT1a, GLT1b und EAAC1 während der postnatalen Kleinhirnentogenese (P5 – 28) der Maus zu untersuchen. Dabei wurde vor allem eine mögliche Lokalisation der Glutamattransporter in den Progenitorzellen und Proneuronen der äußeren Körnerzellschicht berücksichtigt. Außerdem sollte untersucht werden, ob quantitative Veränderungen von Glutamattransporter-Protein mit wichtigen Schritten in der postnatalen Histogenese der Kleinhirnrinde korrelieren.

Durchgeführt wurden Westernblot- und Grauwertanalysen an Kleinhirnhomogenaten von Mäusen im Alter von P5, P9, P14, P21 und P28. Um Aussagen über die zelluläre Verteilung der Glutamattransporter während der Entwicklung machen zu können, wurden außerdem Doppelimmunfluoreszenz-Nachweise an Semidünnschnitten von gefriergetrockneten Kleinhirnen (P5 – P28) durchgeführt. Dabei wurden GLAST oder GLT1a zusammen mit dem astrozytären Markerprotein Glutaminsynthetase dargestellt. Beim Nachweis von GLT1b oder EAAC1 wurde gleichzeitig β -III-Tubulin zur Darstellung gebracht. β -III-Tubulin gilt als Markerprotein von Neuronen und Oligodendrozyten im ZNS.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass im Laufe der untersuchten Entwicklungsspanne die Menge an GLAST, GLT1a und GLT1b zu- und die an EAAC1 abnimmt. Die stärksten mengenmäßigen Zunahmen finden zwischen P14 und P21 und somit in der Phase der Synaptogenese statt.

GLAST und GLT1a ließen sich während der postnatalen Kleinhirnentwicklung hauptsächlich in Bergmann-Gliazellen und Astrozyten nachweisen. Für GLT1b und EAAC1 hingegen war keine sichere gliale Zuordnung möglich, vielmehr konnten sie in Neuronen (Purkinjezellen, Körnerzellen und GABAerge Interneurone) detektiert werden. Damit entspricht die Transporterlokalisierung während der postnatalen Histogenese der Kleinhirnrinde weitgehend der adulten Verteilung.

Zusätzlich konnten wir GLT1a, GLT1b und insbesondere EAAC1 in Progenitorzellen und Proneuronen der äußeren Körnerzellschicht nachweisen. Dieser Nachweis legt eine Beteiligung der Glutamattransporter an wichtigen Entwicklungsvorgängen (Proliferation, Reifung und Migration) durch die Kontrolle der extrazellulären Glutamatkonzentration nahe.

6 Literaturverzeichnis

- Altman J (1972a) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J Comp Neurol* 145(4): 465-513.
- Altman J (1972b) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol* 145(4): 399-463.
- Altman J (1972c) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol* 145(3): 353-397.
- Altman J, Bayer (1997). *Development of the Cerebellar System*. Boca Raton. CRC Press.
- Andersen BB, Gundersen HJ, Pakkenberg B (2003) Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J Comp Neurol* 466(3): 356-365.
- Berger UV, DeSilva TM, Chen W, Rosenberg PA (2005) Cellular and subcellular mRNA localization of glutamate transporter isoforms GLT1a and GLT1b in rat brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 492(1): 78-89.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Canudas AM, Di Giorgi-Gerevini V, Iacovelli L, Nano G, D'Onofrio M, Arcella A, Giangaspero F, Busceti C, Ricci-Vitiani L, Battaglia G, Nicoletti F, Melchiorri D (2004) PHCCC, a specific enhancer of type 4 metabotropic glutamate receptors, reduces proliferation and promotes differentiation of cerebellar granule cell neuroprecursors. *J Neurosci* 24(46): 10343-10352.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15(3): 711-720.
- Chen W, Aoki C, Mahadomrongkul V, Gruber CE, Wang GJ, Blitzblau R, Irwin N, Rosenberg PA (2002) Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci* 22(6): 2142-2152.
- Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV, Bassan M, DeSilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg PA (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* 24(5): 1136-1148.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7(2): 357-368.
- Coco S, Verderio C, Trotti D, Rothstein JD, Volterra A, Matteoli M (1997) Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 9(9): 1902-1910.

- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M (1998) EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* 8(2): 108-116.
- D'Amelio F, Eng LF, Gibbs MA (1990) Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia* 3(5): 335-341.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65(1): 1-105.
- Danbolt NC, Pines G, Kanner BI (1990) Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochemistry* 29(28): 6734-6740.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An [Na⁺ + K⁺]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51(2): 295-310.
- Di Giorgi-Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, Ricci-Vitiani L, Ciceroni C, Busceti CL, Biagioni F, Iacovelli L, Canudas AM, Parati E, De Maria R, Nicoletti F (2005) Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ* 12(8): 1124-1133.
- Di Giorgi Gerevini VD, Caruso A, Cappuccio I, Ricci Vitiani L, Romeo S, Della Rocca C, Gradini R, Melchiorri D, Nicoletti F (2004) The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 150(1): 17-22.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375(6532): 599-603.
- Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG (1994) NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368(6469): 335-339.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42(1): 1-11.
- Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, Grutle NJ, Gundersen V, Holmseth S, Lehre KP, Ullensvang K, Wojewodzic M, Zhou Y, Attwell D, Danbolt NC (2008) A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* 157(1): 80-94.
- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17(21): 8363-8375.
- Gegelashvili G, Schousboe A (1997) High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52(1): 6-15.
- Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, 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.

- Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I, Schousboe A (1996) Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 8(1): 261-265.
- Giloh H, Sedat JW (1982) Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217(4566): 1252-1255.
- Goldowitz D, Hamre K (1998) The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci* 21(9): 375-382.
- Gregory WA, Edmondson JC, Hatten ME, Mason CA (1988) Cytology and neuron-glial apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *J Neurosci* 8(5): 1728-1738.
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68(2): 138-149.
- Guillet B, Lortet S, Masméjean F, Samuel D, Nieoullon A, Pisano P (2002) Developmental expression and activity of high affinity glutamate transporters in rat cortical primary cultures. *Neurochem Int* 40(7): 661-671.
- Hallonet M, Alvarado-Mallart RM (1997) The chick/quail chimeric system: a model for early cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol* 5(1): 17-31.
- Hatten ME (1990) Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 13(5): 179-184.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271(44): 27715-27722.
- Holmseth S, Scott HA, Real K, Lehre KP, Leergaard TB, Bjaalie JG, Danbolt NC (2009) The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation. *Neuroscience* 162(4): 1055-1071.
- Kanai Y, Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360(6403): 467-471.
- Kanai Y, Smith CP, Hediger MA (1993) The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends Neurosci* 16(9): 365-370.
- Kanai Y, Bhide PG, DiFiglia M, Hediger MA (1995) Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *Neuroreport* 6(17): 2357-2362.
- Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70(5): 220-233.
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260(5104): 95-97.
- Komuro H, Yacubova E (2003) Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cell Mol Life Sci* 60(6): 1084-1098.
- Kugler P, Schmitt A (1999) Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27(2): 129-142.

- Kugler P, Schleyer V (2004) Developmental expression of glutamate transporters and glutamate dehydrogenase in astrocytes of the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 14(8): 975-985.
- Kumada T, Komuro H (2004) Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca(2+) transients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22): 8479-8484.
- Kushida H, Kushida T (1982) An improved method for both light and electron microscopy of identical sites in semi-thin tissue sections embedded in epoxy resin "Quetol 651". *J Electron Microsc (Tokyo)* 31(2): 206-209.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18(21): 8751-8757.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15(3 Pt 1): 1835-1853.
- Levy LM, Lehre KP, Rolstad B, Danbolt NC (1993) A monoclonal antibody raised against an [Na(+)+K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Lett* 317(1-2): 79-84.
- Lordkipanidze T, Dunaevsky A (2005) Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. *Glia* 51(3): 229-234.
- Major HD, Hampton JC, Rosario B (1961) A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 909-910.
- Mancini JD, Atchison WD (2007) The NR2B subunit in NMDA receptors is functionally important during cerebellar granule cell migration. *Neurosci Lett* 429(2-3): 87-90.
- Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E (1989) Delayed increase of Ca2+ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36(1): 106-112.
- Martinez S, Alvarado-Mallart RM (1989) Rostral Cerebellum Originates from the Caudal Portion of the So-Called 'Mesencephalic' Vesicle: A Study Using Chick/Quail Chimeras. *Eur J Neurosci* 1(6): 549-560.
- Massie A, Cnops L, Smolders I, McCullumsmith R, Kooijman R, Kwak S, Arckens L, Michotte Y (2008) High-affinity Na+/K+-dependent glutamate transporter EAAT4 is expressed throughout the rat fore- and midbrain. *J Comp Neurol* 511(2): 155-172.
- Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, Ogawa M, Obata K, Watanabe M, Hashikawa T, Tanaka K (2006) From the Cover: Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12161-12166.
- Mattson MP, Lee RE, Adams ME, Guthrie PB, Kater SB (1988) Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: a role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron* 1(9): 865-876.

- Melchiorri D, Cappuccio I, Ciceroni C, Spinsanti P, Mosillo P, Sarichelou I, Sale P, Nicoletti F (2007) Metabotropic glutamate receptors in stem/progenitor cells. *Neuropharmacology* 53(4): 473-480.
- Middleton FA, Strick PL (1994) Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. *Science* 266(5184): 458-461.
- Morton SM, Bastian AJ (2004) Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist* 10(3): 247-259.
- Nicot A, Lelievre V, Tam J, Waschek JA, DiCicco-Bloom E (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J Neurosci* 22(21): 9244-9254.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161(2): 303-310.
- Northington FJ, Traystman RJ, Koehler RC, Martin LJ (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 FJ, Traystman RJ, Koehler RC, Rothstein JD, Martin LJ (1998) Regional and cellular expression of glial (GLT1) and neuronal (EAAC1) glutamate transporter proteins in ovine fetal brain. *Neuroscience* 85(4): 1183-1194.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229(3): 374-392.
- Ottersen OP, Chaudhry FA, Danbolt NC, Laake JH, Nagelhus EA, Storm-Mathisen J, Torp R (1997) Molecular organization of cerebellar glutamate synapses. *Prog Brain Res* 114: 97-107.
- Pakkenberg B, Gundersen HJ (1997) Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* 384(2): 312-320.
- Pearce IA, Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 223(1): 143-147.
- Pierce ET (1975) Histogenesis of the deep cerebellar nuclei in the mouse: an autoradiographic study. *Brain Res* 95(2-3): 503-518.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360(6403): 464-467.
- Pons S, Trejo JL, Martinez-Morales JR, Marti E (2001) Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* 128(9): 1481-1492.
- Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol* 141(3): 283-312.
- Rossi DJ, Slater NT (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology* 32(11): 1239-1248.

- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13(3): 713-725.
- Schaeren-Wiemers N, Schaefer C, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Schwab ME (1995) Identification of oligodendrocyte- and myelin-specific glues by a differential screening approach. *J. Neurochem.* 65: 10-22.
- Schilling K, Oberdick J, Rossi F, Baader SL (2008) Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol* 130(4): 601-615.
- Schmitt A, Asan E, Puschel B, Kugler P (1997) Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci* 17(1): 1-10.
- Schmitt A, Asan E, Lesch KP, Kugler P (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109(1): 45-61.
- Schmitt A, Asan E, Puschel B, Jons T, Kugler P (1996) Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71(4): 989-1004.
- Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, Ganel R, Coulter DA, Rothstein JD (2002) A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J Neurosci* 22(15): 6372-6379.
- 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.
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* 72(5): 295-339.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10955-10959.
- Sutherland ML, Delaney TA, Noebels JL (1996) Glutamate transporter mRNA expression in proliferative zones of the developing and adult murine CNS. *J Neurosci* 16(7): 2191-2207.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276(5319): 1699-1702.
- Tanaka S, Shaikh IM, Chiocca EA, Saeki Y (2009) The Gs-linked receptor GPR3 inhibits the proliferation of cerebellar granule cells during postnatal development. *PLoS One* 4(6): e5922.
- Tansey FA, Farooq M, Cammer W (1991) Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *J Neurochem* 56(1): 266-272.

- Tarnok K, Czondor K, Jelitai M, Czirok A, Schlett K (2008) NMDA receptor NR2B subunit over-expression increases cerebellar granule cell migratory activity. *J Neurochem* 104(3): 818-829.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1997) Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur J Neurosci* 9(8): 1646-1655.
- Wallace VA (1999) Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9(8): 445-448.
- Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10(3): 976-988.
- Wechsler-Reya RJ (2001) Caught in the matrix: how vitronectin controls neuronal differentiation. *Trends Neurosci* 24(12): 680-682.
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP (1999) Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22(1): 103-114.
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 25(9): 1531-1546.
- Yamada K, Watanabe M (2002) Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int* 77(2): 94-108.
- Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Tanaka K, Wada K, Inoue Y (1996) EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport* 7(12): 2013-2017.
- 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.
- Yamada K, Fukaya M, Shibata T, Kurihara H, Tanaka K, Inoue Y, Watanabe M (2000) Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *J Comp Neurol* 418(1): 106-120.
- Ye P, Xing Y, Dai Z, D'Ercole AJ (1996) In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* 95(1): 44-54.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Anatomischen Institut der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Peter Kugler angefertigt.

Ich bedanke mich zunächst bei Herrn Professor Kugler. Sein Engagement vom Beginn der experimentellen Phase bis zur Fertigstellung der Dissertation und seine freundliche und gute Betreuung haben zu ihrem Gelingen entscheidend beigetragen.

Herrn Professor Dr. Michael Sendtner danke ich für die Übernahme des Koreferats und das Interesse an dieser Arbeit.

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

Besonderer Dank gilt Frau Erna Kleinschroth für die gründliche Einarbeitung, ihre großartige Hilfe im Laboralltag sowie für die menschlich bereichernde Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich auch bei Frau Karin Reinfurt-Gehm und Frau Sieglinde Schenk für die wertvolle Mitwirkung bei der Herstellung der Semidünnschnitte.

Danken möchte ich ganz herzlich meinen Eltern und Großeltern, die mich bei allen Entscheidungen auf meinem Weg unterstützen und mir immer zur Seite stehen.

Besonders danke ich Stephan für seine großartige Aufmunterung, Geduld und Unterstützung.