

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Anatomie II

Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

**Proteinkinase C-abhängige Oberflächenexpression des  
Glutamattransporters 1a (GLT1a) in kultivierten zerebellären  
Körnerzellen der Maus**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Stephan Sönnekes**

aus Vreden

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

Der Promovend ist Arzt.



## **Widmung**

*Gewidmet meinen Eltern*

---

## Inhaltsverzeichnis

Referentenblatt.....	II
Widmung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Bedeutung von Glutamat im zentralen Nervensystem .....	1
1.2 Die Familie der hochaffinen Glutamattransporter.....	2
1.3 Zerebelläre Körnerzellkulturen .....	5
1.4 Zielsetzung.....	6
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>8</b>
2.1 Tiere.....	8
2.2 Primäre Körnerzellkulturen.....	8
2.2.1 Lösungen .....	8
2.2.2 Herstellung der Kulturdeckgläschen und Kulturgefäße .....	9
2.2.3 Präparation der Kleinhirne .....	10
2.2.4 Kultivierung der Körnerzellen .....	10
2.2.5 Kulturexperimente.....	11
2.3 Biotinylierung .....	12
2.3.1 Lösungen .....	12
2.3.2 Durchführung der Biotinylierung und Zellfraktionierung .....	14
2.4 Proteinbestimmung mit der Amidoschwarzmethode .....	15
2.4.1 Lösungen .....	15
2.4.2 Durchführung der Proteinbestimmung .....	16
2.5 SDS-Page, Western Blot und statistische Auswertung .....	17
2.5.1 Lösungen .....	17
2.5.2 Antikörper .....	18
2.5.3 Durchführung .....	18

---

2.5.4	Nachweis der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase .....	21
2.6	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	22
2.6.1	Antikörper .....	22
2.6.2	Durchführung .....	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
3.1	Biochemie an zerebellären Primärkulturen .....	24
3.2	Immunzytochemie an zerebellären Primärkulturen .....	28
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>30</b>
4.1	Vorkommen von GLUT1a in kultivierten Körnerzellen .....	30
4.2	Größenzunahme von Varikositäten bei polarisierten Körnerzellen nach PKC-Aktivierung .....	31
4.3	Internalisierung von GLUT1a nach PKC-Aktivierung in polarisierten Körnerzellen .....	32
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>36</b>

## Danksagung

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Auswertungsprinzip der Westernblots.....	20
Abb. 3.1	Nachweis der G6PD in Lysat-, Zytosol- und Membranfraktion.....	25
Abb. 3.2	Effekte von PMA und STP auf die GLT1a Oberflächenexpression in polarisierten zerebellären Körnerzellen.....	26
Abb. 3.3	Effekte von PMA und STP auf die GLT1a Oberflächenexpression in chronisch-depolarisierten zerebellären Körnerzellen.....	27
Abb. 3.4	Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLT1a und GAP43 in polarisierten Körnerzellen nach Inkubation mit PMA, STP oder DMSO.....	29

---

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A. bidest.	Aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
cm	Zentimeter
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAAC1	Excitatory Amino Acid Carrier 1
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter
ECL	Enhanced Chemiluminescence
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAP43	Growth-Associated Protein 43
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT1	Glutamattransporter 1
h	Stunden
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish-Peroxidase
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	KiloDalton

---

kg	Kilogramm
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NGS	Normales Ziegenserum
nm	Nanometer
n-Propylgallat	3,4,5-Trihydroxybenzolsäure n-Propylester
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PBS	Phosphate buffered saline
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationsprobenpuffer mit Protease-Inhibitoren
RT	Raumtemperatur
SDS – Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
STP	Staurosporin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

### 1.1 Bedeutung von Glutamat im zentralen Nervensystem

Die Aminosäure Glutamat ist einer der bedeutendsten exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Wirbeltiere und ist wahrscheinlich an den meisten Aufgaben des Gehirns (einschließlich Kognition, Gedächtnis und Lernen) beteiligt (Fonnum, 1984; Ottersen und Storm-Mathisen, 1984; Collingridge und Lester, 1989; Headley und Grillner, 1990). Außerdem hat Glutamat für die Entwicklung des ZNS (unter anderem Zelldifferenzierung und -migration, Auswachsen von neuronalen Fortsätzen und Synapseninduktion) eine entscheidende Bedeutung (Pearce et al., 1987; Mattson et al., 1988; McDonald und Johnston, 1990; Komuro und Rakic, 1993; Johnston, 1995). Das Gehirn enthält große Mengen an Glutamat (5 – 15 mmol pro Kilogramm (kg) Nassgewicht abhängig von der untersuchten Region), welches vor allem intrazellulär vorkommt (Schousboe, 1981). Extrazellulär ist hingegen die Glutamatkonzentration sehr niedrig und liegt unter Ruhebedingungen bei lediglich 1 – 4  $\mu\text{M}$ , im Liquor cerebrospinalis bei 10  $\mu\text{M}$  (Fonnum, 1984; Shaw et al., 1995; Danbolt, 2001). Die höchsten Glutamatkonzentrationen liegen in exzitatorischen Nervenendigungen vor (Ottersen et al., 1992). Im Zytoplasma beträgt dort die Glutamatkonzentration 10 mM und in synaptischen Vesikeln (dem Speicherort von Glutamat) werden Konzentrationen von mindestens 60 mM erreicht (Maycox et al., 1990; Ottersen et al., 1992; Shupliakov et al., 1992).

Bei der Neurotransmission wird aus diesen Vesikeln Glutamat mittels Exozytose in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und bindet an postsynaptische Rezeptoren (zusätzlich gibt es aber auch eine kontinuierliche nicht-exozytotische Freisetzung; Übersicht bei Danbolt, 2001). Dabei steigt die extrazelluläre Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt auf Werte  $> 1 \text{ mM}$  (Clements et al., 1992). Die Familie der hochaffinen, Natrium-abhängigen Glutamattransporter („excitatory amino acid transporter“ (EAAT) 1 – 5) spielt eine entscheidende Rolle bei der schnellen Beseitigung des Glutamats aus dem

Extrazellulärraum (Nicholls und Attwell, 1990; Lipton und Rosenberg, 1994). Dadurch wird die Glutamatwirkung am Rezeptor beendet und die Neurone werden vor exzitotoxischen Schäden durch zu hohe extrazelluläre Glutamatkonzentrationen geschützt (Übersicht bei Danbolt, 2001).

## **1.2 Die Familie der hochaffinen Glutamattransporter**

Bisher konnten fünf Subtypen der Familie der hochaffinen, Natrium-abhängigen Glutamattransporter kloniert werden, die zum Teil in unterschiedlichen Isoformen vorliegen: GLAST oder EAAT1 (Storck et al., 1992); GLT1 oder EAAT2 mit seinen drei Isoformen GLT1a (Pines et al., 1992), GLT1b (Chen et al., 2002; Schmitt et al., 2002) und GLT1c (Rauen et al., 2004); EAAC1 oder EAAT3 (Kanai und Hediger, 1992); EAAT4 (Fairman et al., 1995); sowie EAAT5 (Arriza et al., 1997). Bei den Subtypen der Familie der hochaffinen Glutamattransporter besteht eine Sequenzhomologie zwischen 38 und 65 % (Gegelashvili und Schousboe, 1997), sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Regulation sowie Zell- und Gewebeverteilung.

GLAST kommt ubiquitär im gesamten Gehirn vor (Lehre et al., 1995; Schmitt et al., 1997) und ist der wichtigste Glutamattransporter im Kleinhirn (Lehre und Danbolt, 1998). Er ist hauptsächlich in astrozytären Plasmamembranen lokalisiert (Chaudhry et al., 1995). EAAC1 ist demgegenüber in Neuronen lokalisiert (Kanai und Hediger, 1992; Rothstein et al., 1994) und scheint im Gehirn nur in geringeren Konzentrationen vorhanden zu sein (verglichen mit den Konzentrationen der beiden glialen Transportern GLT1a und GLAST; Haugeto et al., 1996). EAAC1 weist in der Immunfluoreszenzmikroskopie ein fein-granuläres Verteilungsmuster in Neuronen auf und wird vermutlich in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichert (Kugler und Schmitt, 1999). EAAT4 wird hauptsächlich von Purkinjezellen des Kleinhirns exprimiert (Massie et al., 2008) und die Lokalisation von EAAT5 ist auf die Retina beschränkt (Arriza et al., 1997).



Da in der vorliegenden Arbeit der Glutamattransporter GLT1a im Mittelpunkt der Untersuchungen steht, sollen im Folgenden die GLT1-Isoformen, insbesondere GLT1a, genauer beschrieben werden.

### **Regionale, zelluläre und subzelluläre Verteilung der GLT1-Isoformen**

GLT1a kann ubiquitär im gesamten Gehirn nachgewiesen werden (Rothstein et al., 1994; Lehre et al., 1995; Holmseth et al., 2009) und kommt hauptsächlich in astrozytären Plasmamembranen vor (Chaudhry et al., 1995; Holmseth et al., 2009). Im Hippocampus konnte für einen geringen Teil von GLT1a (10 – 20 % der GLT1a Gesamtmenge) jedoch auch eine neuronale Lokalisation gezeigt werden (Chen et al., 2004; Furness et al., 2008).

GLT1b ist vor allem in Neuronen und nicht-astrozytären Gliazellen im zentralen und peripheren Nervensystem lokalisiert (Chen et al., 2002; Schmitt et al., 2002). Zusätzlich kann GLT1b-mRNA auch in Astrozyten nachgewiesen werden (Berger et al., 2005). GLT1b ist (ebenso wie EAAC1) hauptsächlich in zytoplasmatischen Speichervesikeln lokalisiert (Chen et al., 2002; Schmitt et al., 2002).

Im Gegensatz zum ubiquitären Vorkommen von GLT1a und b kommt GLT1c fast nur in Photorezeptorzellen der Retina vor. Im übrigen ZNS ist GLT1c kaum nachweisbar (Rauen et al., 2004; Holmseth et al., 2009).

### **Bedeutung der GLT1-Isoformen**

Die GLT1-Isoformen sind für den größten Teil der Glutamataufnahme (> 90 %) im Großhirn verantwortlich (Danbolt et al., 1992; Haugeto et al., 1996; Matsugami et al., 2006). In Knockout-Studien wurde gezeigt, dass Mäuse, denen GLT1 fehlt, an tödlich verlaufenden Krampfanfällen leiden und sie anfälliger gegenüber glutamaterger Exzitotoxizität sind (Tanaka et al., 1997). Somit kann der Verlust der GLT1-Transportkapazität nicht vollständig durch die anderen Glutamattransporter kompensiert werden.

Ihre klinische Bedeutung wird auch daraus ersichtlich, dass zahlreiche Untersuchungen auf eine Beteiligung der GLT1-Isoformen an der Pathogenese zahlreicher neurologischer Erkrankungen hinweisen (Übersicht bei Lauriat und

McInnes, 2007; Sheldon und Robinson, 2007). So konnte gezeigt werden, dass die Menge an GLT1 bei Patienten, die an Amyotropher Lateralsklerose (ALS) leiden, um bis zu 90 % reduziert ist (Rothstein et al., 1995). Dies konnte in ALS-Tiermodellen bestätigt werden, so dass eine ursächliche Beteiligung von GLT1 an der neuronalen Degeneration im Laufe der Erkrankung diskutiert wird (Howland et al., 2002). Außerdem wird eine GLT1-Dysfunktion unter anderem in Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz (Masliah et al., 2000; Dabir et al., 2006), der Chorea Huntington (Shin et al., 2005) und Epilepsie (Wong et al., 2003; Hoogland et al., 2004) gebracht.

### **Molekulare Struktur und Transporteigenschaften von GLT1a**

Der Glutamattransporter GLT1a ist aus einer 573 Aminosäuren langen Polypeptidkette aufgebaut (Pines et al., 1992) und seine molekulare Masse beträgt ~73 kDa (kiloDalton; Danbolt et al., 1992; Rothstein et al., 1994). GLT1a besitzt 8 Transmembrandomänen, wobei N- und C-Terminus intrazellulär liegen (Grunewald et al., 1998).

Der Glutamattransport von extra- nach intrazellulär mittels GLT1a erfolgt aktiv und wird von dem elektrochemischen Gradienten für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{H}^+$  getrieben (Billups und Attwell, 1996). Der Transport eines Glutamatmoleküls ist an den Cotransport von drei  $\text{Na}^+$ -Ionen und einem  $\text{H}^+$  sowie an den Antiport von einem  $\text{K}^+$ -Ion gebunden (Levy et al., 1998). Unter pathologischen Bedingungen, die zum Beispiel bei einer Ischämie vorliegen, kann der Glutamattransport auch in umgekehrter Richtung ablaufen (Madl und Burgesser, 1993) und führt so zu einer Schädigung von Neuronen durch die exzitotoxische Wirkung erhöhter extrazellulärer Glutamatkonzentrationen (Rossi et al., 2000).

### **Regulation von GLT1a**

GLT1a scheint durch verschiedene Effektoren und Enzyme reguliert zu werden. Dazu zählen beispielsweise Arachidonsäure (Trotti et al., 1995; Zerangue et al., 1995), freie Radikale (Trotti et al., 1998), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide; Figiel und Engele, 2000) und die Proteinkinasen PKA, PKB, PKC, PI3K sowie SGK 1 – 3 (Kalandadze et al.,

2002; Guillet et al., 2005; Boehmer et al., 2006). Ein wichtiger Regulationsmechanismus der GLT1a-Aktivität scheint dabei eine Veränderung seiner Expression in der oberflächlichen Zellmembran zu sein, die über die Proteinkinase C (PKC) vermittelt wird (Gonzalez und Robinson, 2004).

Neuere Untersuchungen an immortalisierten Zelllinien und Neuron-Glia-Cokulturen führen zu dem Ergebnis, dass es nach einer PKC-Aktivierung zur Verminderung der GLT1a-Oberflächenexpression kommt (Kalandadze et al., 2002; Zhou und Sutherland, 2004; Guillet et al., 2005). Es fehlen jedoch Untersuchungen an einem gut charakterisierten primären Zellkultursystem. Dies ist insbesondere daher wichtig, da PKC-vermittelte Effekte auf GLT1a möglicherweise zelltypspezifisch sind. Untersuchungen zu den Effekten der PKC auf die GLT1-vermittelte Glutamataufnahme führten nämlich zu widersprüchlichen Ergebnissen (Übersicht bei Robinson, 1998). Zu beachten ist dabei, dass sich primäre Zellkulturen wahrscheinlich näher an der Situation *in vivo* befinden als immortalisierte Zelllinien (Gonzalez und Robinson, 2004).

### **1.3 Zerebelläre Körnerzellkulturen**

Körnerzellkulturen sind ein etabliertes und gut charakterisiertes Kultursystem, das bereits zur Untersuchung unterschiedlicher Nervenzellfunktionen verwendet wurde. Unter anderem wurden an ihnen metabolische Prozesse in Neuronen und Gliazellen (Waagepetersen et al., 2000), Synaptogenese und synaptische Mechanismen (Virginio et al., 1995; Barberis et al., 2005), intrazelluläre Signaltransduktion (Tanabe et al., 1998) sowie Auswirkungen von Neurotoxizität untersucht (Marini et al., 1989; Dargent et al., 1996).

Zerebelläre Primärkulturen bestehen zu mehr als 90 % aus glutamatergen Körnerzellen (Thangnipon et al., 1983; Kingsbury et al., 1985). Zusätzlich kommt in diesen Primärkulturen eine kleine Population von inhibitorischen, GABAergen Interneuronen (Schousboe et al., 1989; Sonnewald et al., 2004) und eine geringe Anzahl von Gliazellen vor (Thangnipon et al., 1983).

Die kultivierten Körnerzellen besitzen zahlreiche schlanke, sich verzweigende Fortsätze, die insgesamt als Neuriten bezeichnet werden. Am 4.

– 6. Kulturtag nehmen die Körnerzellen die Morphologie von multipolaren Neuronen an, die denen *in vivo* ähnelt (Powell et al., 1997; Zmuda und Rivas, 1998). Entlang den Neuriten sind Erweiterungen (sogenannte Varikositäten) zu beobachten, die Anhäufungen von Vesikeln enthalten. Der Vesikelinhalt kann durch Exozytose freigesetzt werden. Insgesamt ähneln die meisten dieser Vesikel den synaptischen Vesikeln (Antonov et al., 1999; Marxen et al., 1999; Urakubo et al., 2003).

Überleben und Reifung von zahlreichen Neuronenkulturen werden durch eine hohe Kaliumkonzentration im Kulturmedium unterstützt (Übersicht bei Franklin und Johnson, 1992). Unter solchen Kulturbedingungen befinden sich die Neurone in einem chronisch-depolarisierten Zustand. Dies konnte für zerebelläre Primärkulturen aus Ratte und Maus (25 mM KCl im Kulturmedium) gezeigt werden (Lasher und Zagon, 1972; Daniels und Brown, 2002). Körnerzellen, die hingegen in einem polarisierten Zustand mit einer physiologischen Kaliumkonzentration (5 mM KCl) kultiviert werden, überleben bei stetig sinkender Zellzahl lediglich 5 – 6 Tage. Das verlängerte Überleben bei 25 mM KCl wird auf eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zurückgeführt. Die chronische Depolarisation bedingt einen erhöhten Calciumeinstrom in die Zellen (Connor et al., 1987; Becherer et al., 1997). Bestätigt wurde diese Annahme dadurch, dass dieser trophische Effekt durch eine gleichzeitige Inhibition von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen aufgehoben werden kann (Gallo et al., 1987; Kingsbury und Balazs, 1987). Die für das Überleben wichtige Dauerdepolarisation soll die exzitatorischen Impulse der glutamatergen Moosfasern auf Körnerzellen im Kleinhirn *in vivo* imitieren (Hack et al., 1993).

In Zusammenhang mit unseren Untersuchungen ist es wichtig zu erwähnen, dass in kultivierten Körnerzellen die meisten PKC-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\theta$  und  $\lambda$ ) nachgewiesen werden konnten (Popp et al., 2006).

#### 1.4 Zielsetzung

Ziel vorliegender Untersuchungen ist es, den Einfluss der PKC auf die GLT1a-Oberflächenexpression an primären Körnerzellkulturen des Kleinhirns

der Maus zu untersuchen, da es sich bei diesen um gut charakterisierte primäre Neuronenkulturen handelt. Um mengenmäßige Veränderungen in der Oberflächenexpression von GLUT1a erfassen zu können, sollen nach Aktivierung bzw. Inhibition der PKC Biotinylierung und Isolation der neuronalen Zellmembranen durchgeführt und anschließend mittels Westernblot-Analysen aufgearbeitet werden. Der Effekt einer PKC-Aktivierung und -Inhibition auf die Morphologie von Körnerzellen soll mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Darüber hinaus soll festgestellt werden, ob der elektrophysiologische Status der Zellen einen Einfluss auf die PKC-vermittelte Oberflächenexpression von GLUT1a hat. Hierzu werden polarisierte Körnerzellen in einem Kulturmedium mit 5 mM K<sup>+</sup> und chronisch-depolarisierte Körnerzellen in einem Kulturmedium mit 27 mM K<sup>+</sup> kultiviert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Insgesamt wurden 229 Mäuse vom Stamm C57BL/6 aus eigener Zucht für die Untersuchungen verwendet. Die Elterntiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (Ssniff, Soest, Deutschland). Sie wurden bei 21°C Raumtemperatur (RT), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 – 60 % und bei zwölfstündigem Hell-Dunkel-Wechsel gehalten.

### 2.2 Primäre Körnerzellkulturen

Die Körnerzellkulturen wurden im Wesentlichen nach der von Wilkin et al. (1976) und Dutton et al. (1981) beschriebenen Methodik aus Kleinhirnen von fünf bis sieben Tage alten Wildtypmäusen hergestellt und auf Deckgläschen kultiviert (s. u.).

#### 2.2.1 Lösungen

Zur Durchführung der Körnerzellkulturen wurden folgende, sterile Lösungen verwendet:

Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
pH 7,4	

Lösung 1

NaCl	120 mM
KCl	5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM

---

D-Glukose	14 mM
MgSO <sub>4</sub> (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)	1,2 mM
Rinderserumalbumin (BSA; Sigma)	3 mg/ml
Phenolrot (Sigma)	Spatelspitze
Lösung 2	
Trypsin (Typ I, Sigma) in Lösung 1	0,25 mg/ml
Lösung 3	
DNase I (Sigma)	2,8 µg/ml
soybean Trypsin Inhibitor (Sigma) in Lösung 1	83 µg/ml
Lösung 4	
DNase I (Sigma)	80 µg/ml
soybean Trypsin Inhibitor (Sigma)	0,52 mg/ml
MgSO <sub>4</sub> (Sigma) in Lösung 1	1,5 mM
Lösung 5	
MgSO <sub>4</sub> (Sigma)	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub> (Sigma) in Lösung 1	0,1 mM
Kulturmedium	
Basal modified Eagle's medium (BME; Biochrom, Berlin, Deutschland)	
Fetales Kälberserum (FCS; Biochrom)	10% (v/v)
Gentamycin (Sigma)	100 µg/ml
L-Glutamin (Sigma)	2 mM

### 2.2.2 Herstellung der Kulturdeckgläschen und Kulturgefäße

Die Deckgläschen wurden für je 2 Stunden (h) mit Aceton und Ethanol (absolut) behandelt, anschließend luftgetrocknet und für 2 h bei 180° C sterilisiert. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden quadratische Deckgläschen (Kantenlänge 22 mm) verwendet und diese in Petrischalen (Durchmesser 35 mm; Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gelegt. Die

Deckgläschen für die Biotinylierungsversuche waren rund (Durchmesser 32 mm) und als Kulturgefäße wurden 6-Well-Platten (Greiner) verwendet.

Zur besseren Haftung der Zellen auf den Deckgläschen wurden diese in den Kulturgefäßen liegend mit 2 ml Poly-L-Lysin-Lösung (10µg/ml in A. bidest.; Sigma) bedeckt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde die Poly-L-Lysin-Lösung entfernt und die Deckgläschen zwei Mal mit jeweils 2 ml sterilem PBS gespült.

### **2.2.3 Präparation der Kleinhirne**

Die Tiere wurden dekapitiert und die Köpfe kurzfristig in 70 % Ethanol eingetaucht. Nach Entfernen der Kopfhaut und der Schädelkalotte wurde das freiliegende Kleinhirn mit einer gebogenen Pinzette entnommen und in eine Petrischale mit Lösung 1 gelegt. Mittels Uhrmacherpinzetten erfolgte unter einem Stereomikroskop die Entfernung sichtbarer Gefäße und der das Kleinhirn bedeckenden Hirnhäute.

### **2.2.4 Kultivierung der Körnerzellen**

Unter der Sterilbank wurden die Kleinhirne mit einem sterilen Skalpell in kleine Gewebestücke zerhackt, mit 10 ml Lösung 1 in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 900 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 7 ml Lösung 2 (plus Trypsin) aufgeschwemmt und bei 37° C für 13 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 7 ml Lösung 3 (plus Trypsin-Inhibitor, DNase I) hinzugefügt und erneut für 3 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert.

Nach Absaugen und Verwerfen des Überstands erfolgte die Zugabe von 2 ml Lösung 4 und die Dissoziation der Zellen mittels Trituration durch eine rund geschmolzene Pasteur-Pipette (20x Aufsaugen und Ausblasen). Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurden die sich im Überstand befindenden, dissoziierten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Lösung 5 (plus Calcium) überführt. Das verbliebene Pellet mit den restlichen Zellaggregaten wurde nach



Zugabe von 2 ml Lösung 4 zum zweiten Mal mittels Trituration vereinzelt und anschließend die komplett dissoziierte Zellsuspension in das Röhrchen mit Lösung 5 überführt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 900 U/min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 – 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Nach Auszählung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Aussaat der Zellen in den unter Absatz 2.2.2 beschriebenen Kulturgefäßen. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden 90.000 Zellen/cm<sup>2</sup> und für die Biotinylierungsexperimente 170.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in jeweils 3 ml Kulturmedium ausgesät. Um Körnerzellen in einem polarisierten Ruhezustand zu kultivieren, wurden diese in einem Medium mit 5 mM Kalium (K<sup>+</sup>) ausgesät. Um chronisch-depolarisierte Körnerzellen zu kultivieren, wurde ein Kulturmedium mit 27 mM K<sup>+</sup> verwendet.

Die Zellkulturen wurden in Brutschränken bei 37° C mit einem Gemisch aus 95% Luft / 5% CO<sub>2</sub> begast (100 % Luftfeuchtigkeit). 24 Stunden nach Aussaat erfolgte die Zugabe von 10 µM Cytosine-Arabinofuranoside/HCl (Sigma) zum Kulturmedium, um vor allem eine Proliferation der in der Kultur enthaltenen Gliazellen zu verhindern. Es erfolgte bis zum Kulturende kein weiterer Mediumwechsel.

### **2.2.5 Kulturexperimente**

Für die Experimente wurden ruhende und chronisch-depolarisierte Kulturen in einem Alter von 4 – 6 Tagen verwendet. An ihnen erfolgte entweder eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) mit 100 nM Phorbol-Myristat-Acetat (PMA; Sigma) oder eine PKC-Inhibition mit 1 µM Staurosporin (STP; Calbiochem, Darmstadt, Deutschland). Beide Substanzen waren in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma) gelöst, die Endkonzentration von DMSO im Kulturmedium betrug 0,1 %. Als Kontrolle wurden Zellkulturen nur mit DMSO (Konzentration 0,1 %) inkubiert.

Es wurden 9 Experimente (jeweils PMA, STP und DMSO) an Kulturen mit 5 mM K<sup>+</sup> und 6 Experimente an Kulturen mit 27 mM K<sup>+</sup> durchgeführt.

Die Gesamtzahl der an einem Tag angelegten Zellkulturschalen wurde gedrittelt und jedes Drittel mit PMA, STP oder DMSO für je 30 Minuten bei 37°

C im Brutschrank inkubiert. Die Aufarbeitung dieser Kulturen erfolgte entweder mittels Biotinylierung mit anschließender Zellfraktionierung und Westernblot-Analyse oder für die Immunfluoreszenzmikroskopie.

### 2.3 Biotinylierung

Um nach Inkubation mit den PKC-wirksamen Substanzen PMA und STP eine mengenmäßige Änderung der in der oberflächlichen Zellmembran enthaltenen GLUT1a-Fraktion feststellen zu können, wurde eine modifizierte Biotinylierungsmethode nach Davis et al. (1998) und Fournier et al. (2004) durchgeführt (Karatas-Wulf et al., 2009; s.u.).

#### 2.3.1 Lösungen

Für die Biotinylierung wurden folgende Lösungen verwendet:

PBS

siehe Absatz 2.2.1

PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>

CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM

MgCl<sub>2</sub> 1 mM

in PBS

Biotin-Lösung

Sulfo-NHS-SS-Biotin (membranimpermeabel)

(Perbio Science, Bonn, Deutschland) 1 mg/ml

in PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>

Glycin-Lösung

Glycin (Serva, Heidelberg, Deutschland) 100 mM

in PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>

Radioimmunpräzipitationsprobenpuffer mit Protease-Inhibitoren (RIPA-Puffer)

NaCl 150 mM

EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 1 mM

Tris-HCl 100 mM

Zum Auflösen der Substanzen in Tris-HCl erfolgten Erwärmung auf 60° C, dann Abkühlung auf RT und pH-Einstellung auf pH 7,4. Anschließend wurden folgende Bestandteile zugegeben:

Triton-X-100 (Serva)	1 % (w/v)
Natriumdeoxycholate (Sigma)	1 % (w/v)
SDS (Roth)	0,1 % (w/v)
Leupeptin (Applichem, Darmstadt, Deutschland)	1 µg/ml
Aprotinin (Applichem)	1 µg/ml
Pepstatin (Applichem)	1 µg/ml
Trypsin-Inhibitor (Fluka, Taufkirchen, Deutschland)	1 mg/ml
Jodacetamid (Sigma)	1 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (Roth)	250 µM
<b>4x SDS-Probenpuffer</b>	
SDS (Roth)	8 % (w/v)
Tris pH 6,8	240 mM
Bromphenolblau (Roth)	0,08 % (w/v)
Glycerin (Applichem)	40 % (v/v)
β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	4 % (w/v)
<b>PBS – Tween</b>	
Tween 20 (Sigma)	0,05 % (v/v)
in PBS	
<b>High-Salt-Waschpuffer</b>	
Triton-X-100 (Serva)	0,1 % (w/v)
NaCl	500 mM
EDTA (Roth)	5 mM
Tris	50 mM
pH 7,5	
<b>No-Salt-Waschpuffer</b>	
Tris	50 mM
pH 7,5	
<b>2x SDS-Probenpuffer</b>	
SDS (Roth)	4 % (w/v)

---

Tris pH 6,8	120 mM
Bromphenolblau (Roth)	0,04 % (w/v)
Glycerin (Applichem)	20 % (v/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	2 % (w/v)

### 2.3.2 Durchführung der Biotinylierung und Zellfraktionierung

Nach den Kulturexperimenten (siehe Abschnitt 2.2.5) wurden die Kulturschalen aus dem Brutschrank entnommen, direkt auf Eis gestellt und nach Abziehen des Kulturmediums mittels Pasteurpipette 2x mit eiskaltem PBS/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  gespült. Nach Verwerfen von PBS/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  wurden pro Well 750  $\mu\text{l}$  Biotin-Lösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler bei 4° C für 30 Minuten. Der Biotinylierungsvorgang wurde durch zweimaliges Spülen mit Glycin-Lösung und anschließender Inkubation mit derselben Lösung für 25 min bei 4° C gestoppt. Anschließend wurden die Zellen erneut 2x mit PBS/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  gespült und durch Zugabe von 170  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer pro Well für 60 min bei 4° C lysiert.

Die Zellysate wurden unter Verwendung eines Zellschabers in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zentrifugation (4° C, 30 min und 16.300 g) wurden die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt, um sie von den nicht-lysierten Zellbestandteilen, die als Pellet zurückblieben, zu trennen. Jeweils 300  $\mu\text{l}$  des Überstands wurden als Lysatfraktion mit 300  $\mu\text{l}$  4x SDS-Probenpuffer versetzt, eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -40 °C gelagert.

Um eine weitere Auftrennung in eine Zytosol- und Membran-Fraktion zu erreichen, wurde zunächst eine definierte Menge Avidin-Beads vorbereitet. Dazu wurden 3x 300  $\mu\text{l}$  der UltraLink Immobilized Monomerix Avidin-Beads Suspension (Perbio Science) in jeweils ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben, bei 16.300 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den verbleibenden Avidin-Beads – Pellets wurden jeweils 300  $\mu\text{l}$  der Lysatfraktionen gegeben. Diese Suspensionen wurden anschließend bei 4° C über Nacht inkubiert (unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Drehscheibe).

Am folgenden Tag wurden die Suspensionen zentrifugiert (4°C, 16.300 g, 15 min) und anschließend die Überstände als Zytosolfraktion in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Diese Zytosolfractionen wurden mit jeweils 200 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt, eingefroren und bei -40°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Die Pellets, welche die an Avidin-Beads gebundenen, biotinylierten Plasmamembranproteine enthielten, wurden in 1 ml PBS-Tween resuspendiert und für 5 min zentrifugiert (4°C, 16.300 g). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet 2x mit High-Salt-Puffer und 1x mit No-Salt-Puffer gespült. Nach den Spülschritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation (5 min, 4°C, 16.300 g). Um die Plasmamembranproteine wieder von den Biotin-Avidin-Beads zu lösen, wurden 300 µl 2x SDS-Probenpuffer dem Pellet zugegeben. Die Inkubation erfolgte zuerst für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 30 min bei 37°C (unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Drehscheibe). Abschließend wurden die Proben für 5 min bei 16.300 g zentrifugiert, die sich im Überstand befindenden Membranproteine in neue Eppendorf-Gefäße überführt, eingefroren und bei -40°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

## **2.4 Proteinbestimmung mit der Amidoschwarzmethode**

Um die Proteinkonzentration in den verschiedenen Proben zu ermitteln, wurde die Amidoschwarzmethode verwendet, die auch in Gegenwart von hohen Salz- und Detergentienkonzentrationen eine exakte Proteinbestimmung mittels Photometrie erlaubt (Dieckmann-Schuppert und Schnittler, 1997). Der Azofarbstoff Amidoschwarz bindet an Polypeptidketten und lässt sich auch durch Ausfällung der Proteine mit einer Methanol-Essig-Lösung nicht von diesen entfernen.

### **2.4.1 Lösungen**

Folgende Lösungen wurden zur Proteinbestimmung mittels Amidoschwarzmethode verwendet:

Färbelösung

Amidoschwarz (Merck, Darmstadt, Deutschland) 2,5 g

---

Methanol	225 ml
A. bidest.	225 ml
100 % (v/v) Essigsäure	50 ml
Entfärbelösung	
Methanol	237,5 ml
A. 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

#### 2.4.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Auf Cellulose-Acetat-Folien (Sartorius, Göttingen, Deutschland) wurden 1 cm<sup>2</sup> große Felder markiert, auf die jeweils 10 µl Proben aufgetragen wurden. Zur Ermittlung des photometrischen Nullwerts dienten Felder, auf die nur 2x SDS-Probenpuffer aufgetragen wurde. Zur Erstellung einer Eichkurve dienten BSA-Proben mit bekanntem Proteingehalt (0,625 – 20 µg, in SDS-Probenpuffer gelöst).

Nach Trocknung der beschichteten Folien wurden diese in eine Schale mit Färbelösung gelegt, die unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler für 10 min einwirken konnte. Nach Abgießen der Färbelösung wurden die Folien 5x für insgesamt 4 min mit 100 ml Entfärbelösung gespült, so dass unspezifisch am Hintergrund gebundener Farbstoff vollständig entfernt wurde. Nach erneutem Trocknen wurden die markierten Felder der Cellulose-Acetat-Folien ausgeschnitten. Jedes Feld wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, mit 1 ml Auflöselösung vollständig überdeckt und in einem Wasserbad bei 50°C für 30 min inkubiert. Nach dieser Inkubation waren die Folienfelder vollständig gelöst, so dass die Extinktionen der resultierenden (unterschiedlich blauen) Lösungen mit einem Spektralphotometer (Ultrospec III; Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) bei 620 nm gegen den entsprechenden Nullwert bestimmt

werden konnten. Die Berechnung des Proteingehalts der Proben erfolgte entsprechend der BSA-Standard-Eichkurve.

## 2.5 SDS-Page, Western Blot und statistische Auswertung

Um den GLT1a-Gehalt in den Proben zu ermitteln, wurden die Proteine zuerst nach ihrer Größe mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970) aufgetrennt und diese im Anschluss auf eine Nitrocellulosemembran überführt (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). Nach Inkubationen mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgte die Schwärzung eines Röntgenfilms mit Hilfe der ECL-Methode (enhanced chemiluminescence; Whitehead et al., 1979). Nach digitalem Scan der Filme wurden nur die geschwärzten Proteinbanden der Membranfraktionen mittels Grauwertanalyse und Mann-Whitney U-Test statistisch ausgewertet.

Zur ausführlichen Darstellung der Durchführung siehe Absatz 2.5.3.

### 2.5.1 Lösungen

Sammelgel:

Acrylamid (Roth)	5 % (w/v)
Tris pH 6,8	125 mM
Natriumdodecylsulfat (SDS; Roth)	0,1 % (w/v)
Ammoniumpersulfat (APS; Roth)	1 mg/ml
Tetramethylethyldiamin (TEMED; Roth)	3 µl/ml

Trenngel:

Acrylamid (Roth)	10 % (w/v)
Tris pH 8,8	375 mM
SDS (Roth)	0,1 % (w/v)
APS (Roth)	1 mg/ml
TEMED (Roth)	1,5 µl/ml

Elektrophorese-Puffer:

Tris-HCl pH 8,3	25 mM
-----------------	-------

Glycin (Serva)	192 mM
SDS (Roth)	0,1 % (w/v)
Transblotpuffer:	
Tris	25 mM
Glycin (Serva)	192 mM
Methanol	20 % (v/v)
ECI-Lösung 1	
2,5 mM Luminol (Fluka) in DMSO gelöst	
0,4 mM p-Coumaric-Acid (Sigma) in DMSO gelöst	
100 mM Tris-HCl pH 8,5	
ECI-Lösung 2	
0,02 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
100 mM Tris-HCl pH 8,5	

### 2.5.2 Antikörper

#### Primärantikörper:

Es handelt sich um ein gut charakterisiertes Immuneserum aus dem Kaninchen, das gegen die C-terminale Peptidsequenz des GLUT1a-Transporters gerichtet ist und zur Verfügung gestellt wurde (Schmitt et al., 1996). Verdünnung 1:1500 in PBS / 5 % (w/v) Magermilch. Die zur Immunisierung verwendete Sequenz lautet A-A-N-G-K-S-A-D-C-S-V-E-E-E-P-W-K-R-E-K.

#### Sekundärantikörper:

Verwendet wurde ein Anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus der Ziege, der mit Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert war (Bio-Rad, München, Deutschland). Verdünnung 1:3000 in PBS / 5 % (w/v) Magermilch

### 2.5.3 Durchführung

Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden zur Denaturierung der Proteine für 1 min bei 95° C erhitzt. Pro Experiment wurden drei Acrylamidgele hergestellt (jeweils ein Gel für PMA, STP und DMSO; Dicke 1



mm, Länge Sammelgel ca. 8 mm, Länge Trenngel 7 cm). Pro Gel wurde jede der drei Fraktionen (Lysat, Zytosol und Membran) 2x aufgetragen (Durchführung von Doppelbestimmungen). Auf jede Spur wurde die gleiche Proteinmenge aufgetragen (2,5 – 3 µg Protein). Die Sammlung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 80 V und deren Auftrennung im Trenngel bei 200 V.

Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-C extra; Amersham, Braunschweig, Deutschland) transferiert. Dies erfolgte in einer mit Transblotpuffer gefüllten Mini Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad) im elektrischen Feld bei 100 mA (3 h, RT).

Unspezifische Bindungsstellen auf den Nitrocellulosemembranen wurden anschließend für 90 min mit PBS / 5 % (w/v) Magermilch bei RT geblockt. Zur Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranen und das Anti-GLT1a Immuneserum (Verdünnung 1:1500) in Folien (PE-Schlauchfolie Dicke 0,1 mm; Hartenstein, Würzburg, Deutschland) eingeschweißt und unter ständiger Bewegung auf einem Drehrad über Nacht bei 4°C inkubiert.

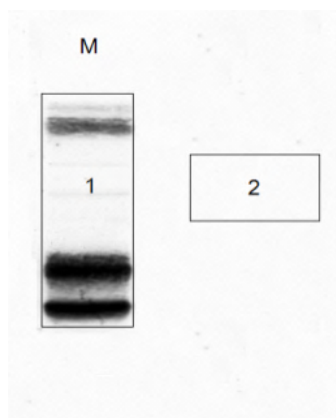
Nach dreimaligem Spülen mit PBS-Tween (siehe Absatz 2.3.1) wurden die Membranen mit dem HRP-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörper für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert (Durchführung entsprechend der Inkubation mit dem Primärantikörper, s. o.). Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden die Nitrocellulosemembranen anschließend 3x für je 10 min mit PBS-Tween gespült.

Dann folgte die Entwicklung der Röntgenfilme (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL, Amersham) mit Hilfe der ECL-Methode. Das Prinzip ist, dass die mittels Antikörper selektiv an GLT1a-Protein gebundene HRP in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die lokale Oxidation von Luminol katalysiert. Dabei angeregte Elektronen führen bei der Rückkehr in ihren Grundzustand zur Emission von Licht (Wellenlänge 428 nm), welches zu einer Schwärzung der photographischen Filme führt.

Die drei Nitrocellulosemembranen wurden zuerst für 1 min in ECL-Lösung (Mischung von ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1 : 1) inkubiert und anschließend nebeneinander in eine Filmkassette gelegt. Nach Belichtung des Röntgenfilms (Dauer 30 sec – 3 min) folgten Entwicklung, Fixierung und

Trocknung. Dadurch dass die drei Membranen gleichzeitig auf einem Film belichtet wurden, waren die unterschiedlich starken Schwärzungen der einzelnen Membranbanden bei den PMA-, STP- und DMSO-Proben vergleichbar und konnten statistisch ausgewertet werden.

Nach digitalem Scan (Agfa Arcus II) des Röntgenfilms wurden die Proteinbanden mit dem Grauwert-Analyse-Programm „nih image analysis software“ (Image J, Version 1.62) quantifiziert.



**Abb. 2.1** Auswertungsprinzip der Westernblots.

(1) Messfeld für die Bestimmung des Grauwerts der GLT1a-Proteinbanden, (2) Messfeld (außerhalb des Bandenbereichs) für die Bestimmung des Grauwerts des Hintergrunds.

M= Membranfraktion

Hierzu wurde zuerst der Grauwert der GLT1a-Proteinbanden bestimmt, der dann um den Grauwert des Röntgenfilmhintergrundes bereinigt wurde (Abb. 2.1). Da für jede Probe auf dem gleichen Westernblot eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, wurde aus beiden Grauwerten der Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert wurde auf die pro Spur aufgetragene Proteinmenge bezogen. Abschließend wurde der so ermittelte Absolutwert in Relation zum Grauwert der DMSO-Spur gesetzt (= 100 %; entspricht der Kontrollbande). Eine semiquantitative Auswertung mittels Grauwertanalyse erfolgte nur bei den Membranfraktionen der Kulturexperimente, da Veränderungen in der Oberflächenexpression von GLT1a im Zentrum der Untersuchungen stehen.

Es wurden 9 Kulturversuche ausgewertet, bei denen das Kulturmedium eine  $K^+$ -Konzentration von 5 mM hatte, und 6 Kulturversuche, bei denen die Zellen sich in einem chronisch-depolarisierten Zustand befanden (27 mM  $K^+$  im Kulturmedium).

Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet (Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ ).

#### **2.5.4 Nachweis der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase**

Um sicherzustellen, dass nur Proteine der oberflächlichen Zellmembran biotinyliert und affinitätsgereinigt wurden (und nicht zytosolische Proteine aufgrund von Zellzerstörung), erfolgte in den drei Fraktionen (Lysat, Zytosol, Membran) ein Nachweis von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) mittels Westernblot-Analyse. Das Enzym ist Bestandteil des Pentosephosphat-Wegs. Cho und Joshi (1990) zeigten, dass es vor allem in Zytosol und Mitochondrien lokalisiert ist und nicht in der Zellmembran vorkommt.

#### **Antikörper**

##### Primärantikörper

Verwendet wurde ein gut charakterisierter, affinitätsgereinigter Antikörper aus dem Kaninchen, der zur Verfügung gestellt wurde (Kugler, 1994). Die Aminosäuresequenz des zur Immunisierung verwendeten Enzyms aus der Hefe (Boehringer, Mannheim, Deutschland) entspricht weitgehend den G6PD-Aminosäuresequenzen von anderen Spezies (Nogae und Johnston, 1990).

##### Sekundärantikörper

Verwendet wurde ein mit HRP konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (Bio-Rad). Verdünnung 1:3000 in PBS / 5 % (w/v) Magermilch.

#### **Durchführung**

Es wurde eine Westernblot-Analyse (siehe Absatz 2.5.3) an Lysat-, Zytosol-, und Membranfraktionen von mit 5 mM K<sup>+</sup> kultivierten, zerebellären Primärkulturen durchgeführt, die mit DMSO für 30 min inkubiert worden waren. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page, wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Es folgten Inkubationen mit Primär- und Sekundärantikörper und anschließend die Schwärzung eines Röntgenfilms mit Hilfe der ECL-Methode, der digital eingescannt wurde.

## 2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

### 2.6.1 Antikörper

#### Primärantikörper

Anti-GLT1a Immuns serum

siehe Absatz 2.5.2, Verdünnung 1:100 in Block-Lösung (s. u.).

Anti-GAP43 Antikörper (Sigma)

Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das Growth-Associated Protein 43 (GAP43). Verdünnung 1:400 in Block-Lösung. GAP43 ist neuronenspezifisch (Burry et al., 1991).

#### Sekundärantikörper

Cy3 konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland)

Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege konjugiert mit Indocarbocyanin (Cy3, rot). Verdünnung 1:600 in PBS.

Cy2 konjugierter Anti-Maus Antikörper (Dianova)

Anti-Maus Antikörper aus der Ziege konjugiert mit Carbocyanin (Cy2, grün). Verdünnung 1:200 in PBS.

### 2.6.2 Durchführung

Zur Herstellung der Deckgläschen und Kulturgefäße sowie zur Durchführung der Zellkultur siehe Abschnitt 2.2. Die 4 – 6 Tage alten Kulturen wurden für 5 min bei -20° C mit Methanol fixiert. Nach anschließendem dreimaligen Spülen mit PBS und kurzem Eintauchen in PBS-Tween wurden die Deckgläschen für 2 h in einer feuchten Kammer zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit je 50 µl Block-Lösung (0,1 % BSA, 10 % Ziegenserum (NGS; Sigma) und 0,05 % Tween 20 in PBS) bedeckt. Nach Entfernung der Block-Lösung erfolgte die Inkubation mit 50 µl Erstantikörper-Lösung. Zum gleichzeitigen Nachweis zweier Antigene in einem Kulturpräparat wurden beide Primärantikörper auf den Deckgläschen zusammenpipettiert (Doppelimmunfluoreszenz gegen GLT1a und GAP43) und diese bei 4° C über zwei Nächte in der feuchten Kammer inkubiert.

Vor Auftragen des Zweitantikörpers wurden die Deckgläschenkulturen 3x in PBS gespült und kurz in PBS-Tween eingetaucht, um sie dann mit je 20 µl Zweitantikörper-Lösung (mit Cy3 konjugiertem Anti-Kaninchen Antikörper und mit Cy2 konjugiertem Anti-Maus Antikörper in PBS, siehe Absatz 2.6.1) für 45 min bei RT zu inkubieren. Danach erfolgte ein dreimaliger Spülvorgang mit PBS und ein kurzes Eintauchen in Aqua bidest. Die Deckgläschen wurden mit 1 % (w/v) n-Propylgallat (3,4,5-Trihydroxybenzolsäure n-propylester; Fluka) in 60 % (v/v) Glycerinlösung auf Objektträgern montiert.

Die Auswertung und Photographie der Präparate erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 2 mot plus Fluoreszenzmikroskop ausgerüstet mit geeigneter Filterkombination für die selektive Visualisierung von Cy2 und Cy3. Die Darstellung und Speicherung der Bilder wurden mit der Software „Spot Advanced Version 4.6“ durchgeführt. Zur abschließenden digitalen Bearbeitung wurde Adobe Photoshop 7.0 benutzt.

### 3 Ergebnisse

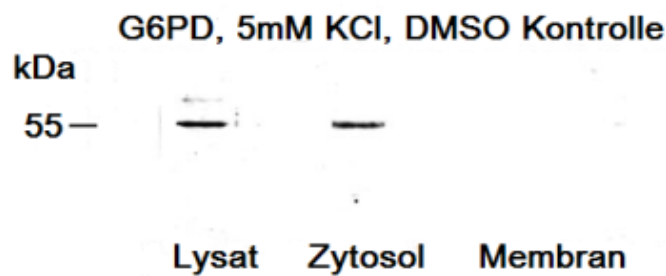
#### 3.1 Biochemie an zerebellären Primärkulturen

Zerebelläre Primärkulturen bestehen zu mehr als 90 % aus glutamatergen Körnerzellen (Thangnipon et al., 1983; Kingsbury et al., 1985). Um eine mögliche Abhängigkeit von PKC-Effekten auf Körnerzellen in unterschiedlichen Polarisierungszuständen zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit Primärkulturen 4 – 6 Tage mit 5 mM K<sup>+</sup> (polarisierte Körnerzellen) oder mit 27 mM K<sup>+</sup> (chronisch-depolarisierte Körnerzellen) im Kulturmedium kultiviert. Nach dieser Kulturzeit erfolgte für 30 min eine Aktivierung der PKC mit 100 nM PMA oder eine Inhibition mit 1 µM STP. Zur Kontrolle wurden die Kulturen nur mit DMSO (Lösungsmittel für PMA und STP) behandelt.

Um Veränderungen bei der Oberflächenexpression von GLUT1a nach PKC-Aktivierung oder Inhibition untersuchen zu können, wurden Körnerzellen mit Membran-impermeablem Biotin markiert, anschließend fraktioniert und die biotinylierten Membranproteine mit Avidin-Beads affinitätsgereinigt. Die daraus resultierenden Fraktionen (Lysat, Zytosol, Membran) wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und mit der Westernblot-Analyse untersucht. In allen drei Fraktionen konnte der Glutamattransporter GLUT1a nachgewiesen werden (nicht dokumentiert für die Lysat- und Zytosolfraktion). Aufgrund unterschiedlich starker Glykosylierung waren Proteinbanden vor allem mit Molekulargewichten um ~70 kiloDalton (kDa) darstellbar (Abb. 3.2; Danbolt et al., 1992; Rothstein et al., 1994). Die stärkste GLUT1a-Immunreaktivität war in der Membranfraktion zu beobachten. Eine semiquantitative Auswertung mittels Grauwertanalyse erfolgte nur bei den Membranfraktionen der Kulturexperimente, da Veränderungen in der Oberflächenexpression von GLUT1a im Zentrum der Untersuchungen stehen.

Um sicherzustellen, dass in unseren biotinylierten und affinitätsgereinigten Membranfraktionen keine zytoplasmatischen Proteine aufgrund von Zellzerstörungen biotinyliert vorliegen, wurde als zytoplasmatisches Markerprotein die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) durch

Westernblot-Analyse nachgewiesen. G6PD kann in der Lysat- und Zytosolfraktion, aber nicht in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Damit ist sichergestellt, dass die Biotinylierung an unbeschädigten Zellen erfolgte.



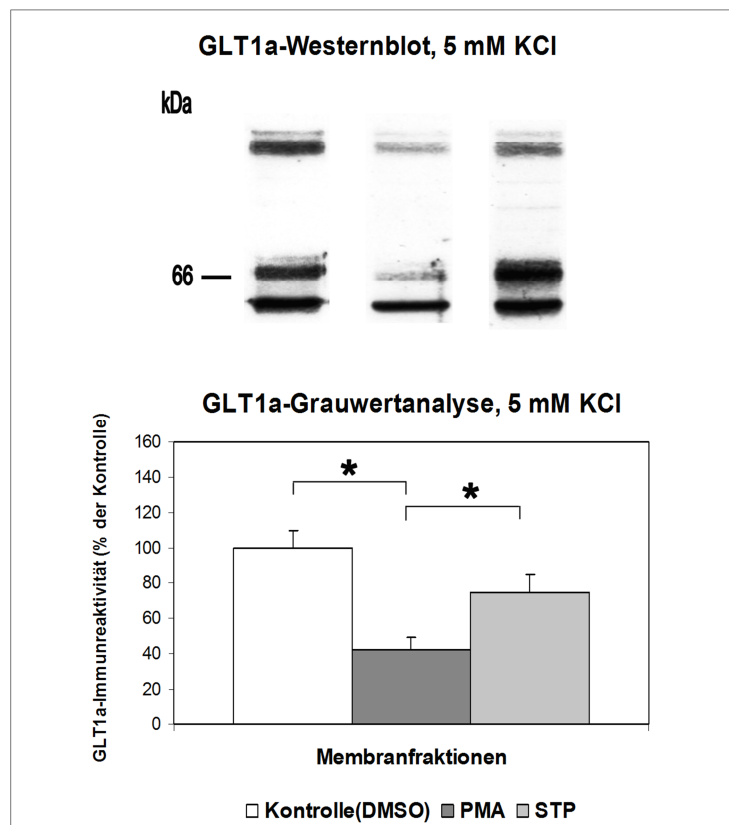
**Abb. 3.1 Nachweis der G6PD in Lysat-, Zytosol- und Membranfraktion.**

Es handelt sich um Westernblots an Lysat-, Zytosol- und Membranfraktionen von mit 5 mM K<sup>+</sup> kultivierten, zerebellären Primärkulturen, die mit DMSO für 30 min inkubiert worden waren. G6PD ist in der Lysat- und Zytosolfraktion, aber nicht in der Membranfraktion nachweisbar.

### **Polarisierte Körnerzellen**

Insgesamt wurden 9 zerebelläre Primärkulturen untersucht, die in einem Kulturmedium mit 5 mM K<sup>+</sup> kultiviert wurden. Nach PKC-Aktivierung (100 nM PMA für 30 min) kommt es zu einer signifikanten Abnahme von biotinyliertem (in der Oberflächenmembran lokalisierten) GLT1a-Protein verglichen mit DMSO (-58 %) und STP (-32 %) behandelten Kulturen.

Nach PKC-Inhibition (1 μM STP für 30 min) ist zwar eine Abnahme der GLT1a-Oberflächenexpression im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) zu beobachten (-26 %), die jedoch statistisch nicht signifikant ist.



**Abb. 3.2** Effekte von PMA und STP auf die GLT1a Oberflächenexpression in polarisierten zerebellären Körnerzellen.

Es handelt sich um Kulturen, die mit 5 mM  $K^+$  kultiviert wurden und für 30 min bei 37° C entweder mit 100 nM PMA oder 1  $\mu$ M STP oder dem Lösungsmittel (DMSO) behandelt worden waren. Die kultivierten Zellen wurden mit Membran-impermeablem Biotin markiert und fraktioniert. Anschließend wurden die biotinylierten Oberflächenmembranproteine mittels Avidin-Beads affinitätsgereinigt. Die resultierenden Membranfraktionen wurden mittels SDS-Page, Westernblot und Grauwertanalyse aufgearbeitet (2,5 – 3  $\mu$ g Protein pro Spur). Die ermittelten Grauwerte wurden auf die pro Spur aufgetragene Proteinmenge bezogen.

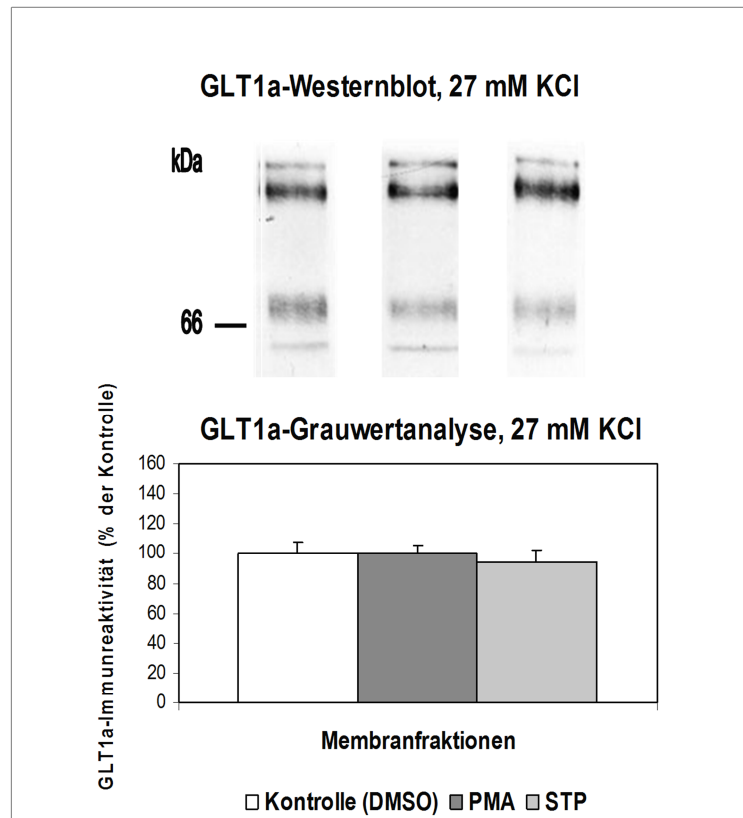
Im oberen Teil der Abbildung handelt es sich um die Membranproteinbanden eines repräsentativen Westernblots. Im unteren Abschnitt der Abbildung sind die Ergebnisse der Grauwertanalyse von 9 unabhängigen Experimenten (pro Experiment erfolgte eine Doppelbestimmung) als Säulendiagramm aufgetragen. Die Grauwerte (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) wurden in Beziehung zur DMSO-Kontrolle (=100 %) gesetzt. \*  $p < 0,05$ .

### Chronisch-depolarisierte Körnerzellen

Insgesamt wurden 6 zerebelläre Primärkulturen, die in einem Kulturmedium mit 27 mM  $K^+$  kultiviert wurden, untersucht. Zwischen den verschiedenen Kulturexperimenten ergaben sich keine signifikanten



Unterschiede in der Oberflächenexpression von GLUT1a: DMSO =  $100 \pm 8,2$  %; PMA =  $100,6 \pm 5,0$  %; STP =  $94,4 \pm 8,3$  %.



**Abb. 3.3** Effekte von PMA und STP auf die GLUT1a Oberflächenexpression in chronisch-depolarisierten zerebellären Körnerzellen.

Die Experimente an chronisch-depolarisierten Körnerzellen (KCl-Konzentration des Kulturmediums 27 mM) sowie deren Aufarbeitung erfolgten wie in Abbildungslegende 3.2 beschrieben.

Im oberen Teil der Abbildung handelt es sich um die Membranproteinbanden eines repräsentativen Westernblots. Im unteren Abschnitt der Abbildung sind die Ergebnisse der Grauwertanalyse von 6 unabhängigen Experimenten (pro Experiment erfolgte eine Doppelbestimmung) als Säulendiagramm aufgetragen. Die Grauwerte (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) wurden in Beziehung zur DMSO-Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die statistische Auswertung der Grauwerte der verschiedenen Experimente ergab keine Unterschiede zwischen PMA, STP und DMSO.

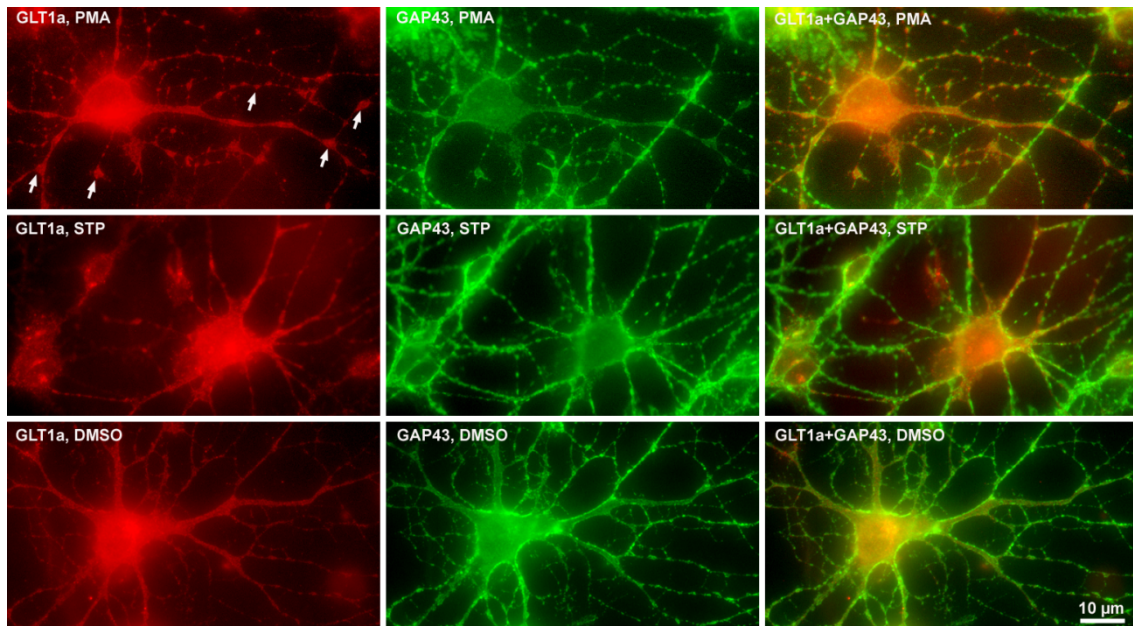
### 3.2 Immunzytochemie an zerebellären Primärkulturen

Nach Kultivierung der Körnerzellen für 4 – 6 Tage in einem Kulturmedium mit 5 mM K<sup>+</sup> (polarisierte Körnerzellen) oder mit 27 mM K<sup>+</sup> (chronisch-depolarisierte Körnerzellen), wurden die Primärkulturen mit 100 nM PMA oder 1 µM STP oder dem Lösungsmittel der beiden Substanzen (DMSO) für 30 min inkubiert. Am 4. – 6. Kulturtag besitzen diese Neurone zahlreiche schlanke, sich verzweigende Fortsätze (Neuriten) mit unterschiedlich großen Varikositäten und ähneln multipolaren Körnerzellen *in situ* (Powell et al., 1997; Zmuda und Rivas, 1998).

Es erfolgte ein Doppelimmunfluoreszenznachweis mit Anti-GLT1a Immuns Serum und Anti-GAP43 Antikörper (GAP43 ist ein Markerprotein für Neurone; Burry et al., 1991). GLT1a und GAP43 sind in Perikarya, Neuriten und Varikositäten nachweisbar. Durch die Doppelmarkierung kann GLT1a eindeutig den Körnerzellen und ihren Neuriten zugeordnet werden. Aufgrund des eingeschränkten Auflösungsvermögens der Lichtmikroskopie kann nicht zwischen einer zytoplasmatischen oder membranösen Lokalisation unterschieden werden (Abb. 3.4).

#### Polarisierte Körnerzellen

An Körnerzellen im polarisierten Zustand (Kulturmedium mit 5 mM K<sup>+</sup>) führt die Inkubation mit STP und DMSO zu ähnlichen Ergebnissen. Die Neuriten der Körnerzellen sind dünn und weisen unterschiedlich viele, kleine Varikositäten auf. Im Vergleich hierzu ist nach Inkubation mit PMA eine Größenzunahme zahlreicher Varikositäten zu beobachten (Abb. 3.4). Die Größenzunahme von Varikositäten nach PKC-Aktivierung steht im Einklang mit vorausgegangenen Untersuchungen an zerebellären Körnerzellen (Karatas-Wulf et al., 2009).



**Abb. 3.4** Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis von GLUT1a und GAP43 in polarisierten Körnerzellen nach Inkubation mit PMA, STP oder DMSO.

Nach 4 – 6 tägiger Kultivierung der Körnerzellen in einem Medium mit 5 mM  $K^+$  wurden diese mit PMA (100 nM) oder STP (1  $\mu$ M) oder dem Lösungsmittel DMSO (Kontrolle) für jeweils 30 min behandelt. Nachgewiesen wurden GLUT1a (rot) und das neuronenspezifische GAP43 (grün; Burry et al., 1991) mittels Doppelimmunfluoreszenz. Nach Behandlung mit DMSO oder STP sind Perikarya, dünne Neuriten und kleine Varikositäten immunpositiv für GLUT1a und GAP43. Nach PKC-Aktivierung mit PMA sind Körnerzellen mit zahlreichen großen Varikositäten (Pfeile) zu beobachten. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

### Chronisch-depolarisierte Körnerzellen

An chronisch-depolarisierten Körnerzellen (Kulturmedium mit 27 mM  $K^+$ ) führt die Inkubation mit PKC-wirksamen Substanzen oder mit DMSO zu keiner Veränderung der Varikositätengröße und Immunreaktivität. Auch gleichen die Fortsätze der Körnerzellen denen von polarisierten Zellen, die mit DMSO oder STP inkubiert wurden (nicht dokumentiert).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass (1) GLT1a in Körnerzellen von zerebellären Primärkulturen nachweisbar ist, (2) die Aktivierung der PKC bei polarisierten Körnerzellen zur Bildung von zahlreichen, großen Varikositäten und zu einer Abnahme der GLT1a-Oberflächenexpression führt und (3) der elektrophysiologische Status der Körnerzellen Einfluss auf die Ausbildung von Varikositäten und die Oberflächenexpression von GLT1a hat.

### 4.1 Vorkommen von GLT1a in kultivierten Körnerzellen

Vorausgehende Untersuchungen zeigten, dass der Glutamattransporter GLT1a auf Proteinebene im adulten Gehirn nahezu ausschließlich in astrozytären Gliazellen vorkommt (Übersicht bei Danbolt, 2001). GLT1a-Protein konnte darüber hinaus auch in Neuronen der Retina (Untersuchungen an Ratte und Affe; Rauen und Kanner, 1994; Euler und Wassle, 1995; Übersicht bei Danbolt, 2001) und des fetalen Gehirns nachgewiesen werden (Untersuchungen an Ratte und Schaf; Furuta et al., 1997; Northington et al., 1998; Northington et al., 1999). Dies stellte einen gewissen Widerspruch zu Ergebnissen auf mRNA-Ebene dar. Es konnte nämlich mittels in-situ-Hybridisierung nachgewiesen werden, dass GLT1a-mRNA in zahlreichen Neuronentypen des adulten Gehirns vorkommt (Schmitt et al., 1996; Torp et al., 1997; Berger et al., 2005), und dass nach ischämischen Insulten Neurone GLT1a auf mRNA- und Proteinebene exprimieren (Torp et al., 1995; Martin et al., 1997).

Neuere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass GLT1a-Protein auch in Neuronen des adulten Gehirns (Untersuchungen am Hippocampus) vorkommt (Chen et al., 2004). Quantitative Auswertungen von Furness et al. (2008) ergaben, dass im Hippocampus 10 – 20 % des GLT1a-Proteins in Neuronen lokalisiert ist. Hinsichtlich des adulten Kleinhirns konnte GLT1a-Protein bisher in Astrozyten und Bergmann-Gliazellen (jedoch nicht in

Körnerzellen und Purkinjezellen) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt werden (Schmitt et al., 1996).

In unseren Untersuchungen konnten wir nun zeigen (s. Absatz 3.2), dass im Gegensatz zur Situation *in vivo* kultivierte Körnerzellen GLUT1a-Protein in Perikarya, Neuriten und Varikositäten enthalten. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass unter Kulturbedingungen verschiedene neuronale Zelltypen GLUT1a exprimieren. Dies konnte bisher für hippocampale Neurone (Brooks-Kayal et al., 1998; Mennerick et al., 1998; Plachez et al., 2000) sowie für kultivierte Purkinjezellen gezeigt werden (Meaney et al., 1998).

Somit sind mindestens drei Glutamatttransporter, nämlich GLUT1a, GLUT1b und EAAC1, nicht jedoch GLAST, in kultivierten Körnerzellen nachweisbar (Karatas-Wulf et al., 2009).

#### **4.2 Größenzunahme von Varikositäten bei polarisierten Körnerzellen nach PKC-Aktivierung**

Körnerzellen, die mit wenig Kalium im Kulturmedium kultiviert werden, befinden sich in einem polarisierten Zustand, während solche, die mit viel Kalium kultiviert werden, chronisch depolarisiert sind (Gallo et al., 1987; Balazs et al., 1988). Bemerkenswert ist, dass nach PKC-Aktivierung morphologische Veränderungen an den Varikositäten von Körnerzell-Neuriten auftreten und zwar nur dann, wenn Körnerzellen mit wenig Kalium (polarisierte Körnerzellen) kultiviert werden. Die Varikositäten nehmen an Größe zu verglichen mit Kontrollen (DMSO) oder PKC-Inhibition (STP). Entsprechende Veränderungen sind nicht zu beobachten, wenn die Körnerzellen chronisch-depolarisiert vorliegen (Kulturmedium mit viel Kalium).

Dies steht in Einklang mit Befunden in der Literatur bzw. lässt sich mit diesen möglicherweise erklären. Bei *Aplysia* führt die PKC-Aktivierung zu einer vorübergehenden, starken Zunahme der Zahl von Varikositäten sensorischer Neurone (Wu et al., 1995). Diese Zunahme ist 2 h nach PKC-Aktivierung offensichtlich, während entsprechende Veränderungen bei den Wachstumskegeln bereits 15 – 30 min nach Aktivierung auftreten. Letzteres entspricht unserem experimentellen Zeitfenster.

Unsere Hypothese ist, dass die Vergrößerung der Varikositäten von Körnerzellneuriten durch eine PKC-abhängige Integration unterschiedlicher Vesikelpopulationen in die Zellmembran der vorbestehenden, kleinen Varikositäten bedingt ist. Es ist anzunehmen, dass vor allem Transmitter enthaltende, präsynaptische Vesikel zu diesen Vesikeln gehören, die in die Varikositäten inkorporiert werden. Für diese Annahme spricht, dass eine PKC-Aktivierung von Calyx Heldsynapsen (Lou et al., 2005; Lou et al., 2008) und von PC12-Zellen (Shoji-Kasai et al., 2002) die spontane Freisetzung von Transmittern verstärkt. Weitere Vesikelpopulationen, die nach PKC-Aktivierung in die Varikositäten integriert werden, könnten solche sein, die die Glutamattransporter EAAC1 und GLT1b enthalten (Karatas-Wulf et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass es nach PKC-Aktivierung zu einer signifikanten Zunahme der Oberflächenexpression von EAAC1 und GLT1b kommt, die normalerweise in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichert vorliegen.

Dass PKC-abhängige Veränderungen der Varikositäten nicht bei chronisch-depolarisierten Körnerzellen zu beobachten sind, kann gegenwärtig nicht erklärt werden, zumal keine Literaturdaten zu dieser Thematik vorliegen.

#### **4.3 Internalisierung von GLT1a nach PKC-Aktivierung in polarisierten Körnerzellen**

Nach unseren Biotinylierungsexperimenten führt die PKC-Aktivierung durch PMA bei polarisierten Körnerzellen (Kulturmedium mit 5 mM KCl) zu einer signifikanten Abnahme der Oberflächenexpression von GLT1a. Diese Befunde stehen im Einklang mit solchen, die an C6 Glioblastomzellen, primären Astrozytenkulturen und an Neuron-Glia-Cokulturen erhoben wurden (Kalandadze et al., 2002; Zhou und Sutherland, 2004; Guillet et al., 2005). Somit führt die PKC-Aktivierung bei verschiedenen kultivierten Zelltypen (einschließlich der glutamatergen Körnerzellen) zu einer Abnahme von GLT1a in der oberflächlichen Zellmembran.

Möglicherweise sind PKC-vermittelte Effekte auf GLT1a jedoch zelltypspezifisch. So wurde mitgeteilt, dass die PKC-Aktivierung bei GLT1 transfizierten Hela-Zellen zu einer Zunahme der GLT1-Aktivität führt (Casado et

al., 1993). Hingegen wurde in humanen Y-79 Retinoblastomzellen eine Abnahme der GLUT1a-Aktivität nach PKC-Aktivierung beobachtet (Ganel und Crosson, 1998). In anderen Zelllinien (L-M (TK -) und MCB) hatte eine PKC-Aktivierung keine Effekt auf die GLUT1a-Aktivität (Tan et al., 1999). Diese widersprüchlichen Ergebnisse können derzeit nicht abschließend beurteilt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass primäre Zellkulturen sich näher an der *in vivo* Situation befinden als immortalisierte Zelllinien (Gonzalez und Robinson, 2004).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass es nach PKC-Aktivierung bei C6 Glioblastomzellen zu einer Clathrin-abhängigen Internalisierung und anschließender lysosomaler Degradation von GLUT1a kommt (Susarla und Robinson, 2008). Diese PKC-abhängige Internalisierung wird auf eine Ubiquitylierung C-terminaler Lysinresten von GLUT1a zurückgeführt (Gonzalez-Gonzalez et al., 2008).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PKC nicht nur die Oberflächenexpression von GLUT1a beeinflusst, sondern auch direkt zu einer Phosphorylierung führt (Gonzalez et al., 2005). Ob Phosphorylierung und Ubiquitylierung von GLUT1a in Zusammenhang stehen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

## 5 Zusammenfassung

Der Glutamatransporter GLT1a ist ubiquitär im gesamten ZNS nachweisbar und kommt dabei hauptsächlich in den Plasmamembranen von astrozytären Gliazellen und zum geringeren Teil auch in denen von Neuronen vor. GLT1a hat entscheidende Bedeutung für eine schnelle Beseitigung von synaptisch freigesetztem Glutamat aus dem Interzellularraum und damit für die Beendigung glutamaterger Transmission sowie für den Schutz von Neuronen vor einer neurotoxischen Wirkung von Glutamat. Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass GLT1a vor allem durch die Proteinkinase C (PKC) reguliert werden dürfte. Es fehlen jedoch Untersuchungen an einem gut charakterisierten primären Zellkultursystem über den Einfluss der PKC auf die GLT1a-Oberflächenexpression.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss einer PKC-Aktivierung und -Inhibition auf die Oberflächenexpression von GLT1a an primären Körnerzellkulturen des Kleinhirns der Maus zu untersuchen. Dieses Kultursystem ist gut charakterisiert und besteht überwiegend aus glutamatergen Körnerzellen. Als Untersuchungsmethoden wurden Immunzytochemie sowie Westernblot-Analysen nach Biotinylierung und Zellfraktionierung eingesetzt. Zusätzlich sollte nachgewiesen werden, ob der elektrophysiologische Status der Körnerzellen Einfluss auf die PKC-vermittelte Oberflächenexpression von GLT1a hat. Die zerebellären Körnerzellkulturen wurden aus Kleinhirnen von 5 – 6 Tage alten Mäusen hergestellt. Polarisierte Zellen wurden in einem Kulturmedium mit 5 mM K<sup>+</sup> und chronisch-depolarisierte Körnerzellen in einem Kulturmedium mit 27 mM K<sup>+</sup> für 4 – 6 Tage kultiviert.

Mittels Doppelimmunfluoreszenz zum Nachweis von GLT1a und GAP43 konnte gezeigt werden, dass kultivierte Körnerzellen GLT1a-Protein in Perikarya, Neuriten und Varikositäten enthalten. Nach Aktivierung der PKC mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA; 100 nM für 30 min bei 37°C) wurden zahlreiche vergrößerte Varikositäten entlang der Neuriten von polarisierten Körnerzellen beobachtet. Demgegenüber ähnelten die Neuriten von chronisch-



depolarisierten Körnerzellen nach PKC-Aktivierung denen von mit Staurosporin (STP, PKC-Inhibitor; 1  $\mu$ M, 30 min, 37° C) oder DMSO (Kontrolle) behandelten Kulturen (schlanke Fortsätze und kleine Varikositäten).

Mittels Biotinylierung, Zellfraktionierung und anschließenden Westernblot-Analysen konnte nach PKC-Aktivierung an polarisierten Körnerzellen eine signifikante Abnahme von biotinyliertem (in der Oberflächenmembran lokalisierten) GLT1a-Protein im Vergleich zu Kulturen gezeigt werden, die mit DMSO (-58 %) und STP (-32 %) behandelt worden waren. An chronisch-depolarisierten Zellen konnten demgegenüber keine Veränderungen in der GLT1a-Oberflächenexpression nach PKC-Aktivierung oder -Inhibition im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es an polarisierten, glutamatergen Körnerzellen des Kleinhirns *in vitro* nach PKC-Aktivierung zu einer Abnahme der Oberflächenexpression von GLT1a kommt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Antonov I, Chang S, Zakharenko S, Popov SV (1999) Distribution of neurotransmitter secretion in growing axons. *Neuroscience* 90(3): 975-984.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 4155-4160.
- Balazs R, Gallo V, Kingsbury A (1988) Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res* 468(2): 269-276.
- Barberis A, Lu C, Vicini S, Mozrzymas JW (2005) Developmental changes of GABA synaptic transient in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 67(4): 1221-1228.
- Becherer U, Rodeau JL, Feltz A (1997) Resting potential of rat cerebellar granule cells during early maturation in vitro. *J Neurobiol* 32(1): 11-21.
- 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.
- Billups B, Attwell D (1996) Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature* 379(6561): 171-174.
- Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S, Lang F (2006) Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* 97(4): 911-921.
- Brooks-Kayal AR, Munir M, Jin H, Robinson MB (1998) The glutamate transporter, GLT-1, is expressed in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int* 33(2): 95-100.
- 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.
- Burry RW, Lah JJ, Hayes DM (1991) Redistribution of GAP-43 during growth cone development in vitro; immunocytochemical studies. *J Neurocytol* 20(2): 133-144.
- Casado M, Bendahan A, Zafra F, Danbolt NC, Aragon C, Gimenez C, Kanner BI (1993) Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J Biol Chem* 268(36): 27313-27317.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15(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.
- Cho SW, Joshi JG (1990) Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain. *Neuroscience* 38(3): 819-828.
- Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258(5087): 1498-1501.
- Collingridge GL, Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41(2): 143-210.
- Connor JA, Tseng HY, Hockberger PE (1987) Depolarization- and transmitter-induced changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J Neurosci* 7(5): 1384-1400.
- Dabir DV, Robinson MB, Swanson E, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM, Forman MS (2006) Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J Neurosci* 26(2): 644-654.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65(1): 1-105.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An [Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51(2): 295-310.
- Daniels M, Brown DR (2002) High extracellular potassium protects against the toxicity of cytosine arabinoside but is not required for the survival of cerebellar granule cells in vitro. *Mol Cell Neurosci* 19(2): 281-291.
- Dargent B, Arsac C, Tricaud N, Couraud F (1996) Activation of voltage-dependent sodium channels in cultured cerebellar Purkinje cells induces neurotoxicity that is not mediated by glutamate release. *Neuroscience* 73(1): 209-216.
- Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18(7): 2475-2485.
- Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ (1997) A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res* 288(1): 119-126.
- Dutton GR, Currie DN, Tear K (1981) An improved method for the bulk isolation of viable perikarya from postnatal cerebellum. *J Neurosci Methods* 3(4): 421-427.
- Euler T, Wassle H (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361(3): 461-478.
- 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.

- 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.
- Fournier KM, Gonzalez MI, Robinson MB (2004) Rapid trafficking of the neuronal glutamate transporter, EAAC1: evidence for distinct trafficking pathways differentially regulated by protein kinase C and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 279(33): 34505-34513.
- Franklin JL, Johnson EM, Jr. (1992) Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci* 15(12): 501-508.
- Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, Grutle NJ, Gundersen V, Holmseth S, Lehre KP, Ullensvang K, Wojewodzc 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.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7(7): 2203-2213.
- Ganel R, Crosson CE (1998) Modulation of human glutamate transporter activity by phorbol ester. *J Neurochem* 70(3): 993-1000.
- Gegelashvili G, Schousboe A (1997) High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52(1): 6-15.
- Gonzalez-Gonzalez IM, Garcia-Tardon N, Gimenez C, Zafra F (2008) PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. *Glia* 56(9): 963-974.
- Gonzalez MI, Robinson MB (2004) Protein kinase C-dependent remodeling of glutamate transporter function. *Mol Interv* 4(1): 48-58.
- Gonzalez MI, Susarla BT, Robinson MB (2005) Evidence that protein kinase Calpha interacts with and regulates the glial glutamate transporter GLT-1. *J Neurochem* 94(5): 1180-1188.
- Grunewald M, Bendahan A, Kanner BI (1998) Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron* 21(3): 623-632.
- Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL, Pisano P (2005) Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46(4): 337-346.
- Hack N, Hidaka H, Wakefield MJ, Balazs R (1993) Promotion of granule cell survival by high K<sup>+</sup> or excitatory amino acid treatment and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase activity. *Neuroscience* 57(1): 9-20.

- 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.
- Headley PM, Grillner S (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 11(5): 205-211.
- 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.
- Hoogland G, van Oort RJ, Proper EA, Jansen GH, van Rijen PC, van Veelen CW, van Nieuwenhuizen O, Troost D, de Graan PN (2004) Alternative splicing of glutamate transporter EAAT2 RNA in neocortex and hippocampus of temporal lobe epilepsy patients. *Epilepsy Res* 59(2-3): 75-82.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1604-1609.
- Johnston MV (1995) Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. *Brain Dev* 17(5): 301-306.
- Kalandadze A, Wu Y, Robinson MB (2002) Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J Biol Chem* 277(48): 45741-45750.
- Kanai Y, Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360(6403): 467-471.
- Karatas-Wulf U, Koepsell H, Bergert M, Sonnekens S, Kugler P (2009) Protein kinase C-dependent trafficking of glutamate transporters excitatory amino acid carrier 1 and glutamate transporter 1b in cultured cerebellar granule cells. *Neuroscience* 161(3): 794-805.
- Kingsbury A, Balazs R (1987) Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol* 140(3): 275-283.
- Kingsbury AE, Gallo V, Woodhams PL, Balazs R (1985) Survival, morphology and adhesion properties of cerebellar interneurons cultured in chemically defined and serum-supplemented medium. *Brain Res* 349(1-2): 17-25.
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260(5104): 95-97.
- Kugler P (1994) Glucose-6-phosphate dehydrogenase is enriched in oligodendrocytes of the rat spinal cord. Enzyme histochemical and immunocytochemical studies. *Histochemistry* 101(2): 143-153.
- 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.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

- Lasher RS, Zagon IS (1972) The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res* 41(2): 482-488.
- Lauriat TL, McInnes LA (2007) EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. *Mol Psychiatry* 12(12): 1065-1078.
- 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, Warr O, Attwell D (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 18(23): 9620-9628.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330(9): 613-622.
- Lou X, Scheuss V, Schneggenburger R (2005) Allosteric modulation of the presynaptic Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion. *Nature* 435(7041): 497-501.
- Lou X, Korogod N, Brose N, Schneggenburger R (2008) Phorbol esters modulate spontaneous and Ca<sup>2+</sup>-evoked transmitter release via acting on both Munc13 and protein kinase C. *J Neurosci* 28(33): 8257-8267.
- Madl JE, Burgesser K (1993) Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13(10): 4429-4444.
- Marini AM, Schwartz JP, Kopin IJ (1989) The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 9(10): 3665-3672.
- Martin LJ, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ (1997) Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol* 42(3): 335-348.
- Marxen M, Volkandt W, Zimmermann H (1999) Endocytic vacuoles formed following a short pulse of K<sup>+</sup> -stimulation contain a plethora of presynaptic membrane proteins. *Neuroscience* 94(3): 985-996.
- Masliah E, Alford M, Mallory M, Rockenstein E, Moechars D, Van Leuven F (2000) Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Experimental Neurology* 163(2): 381-387.
- Massie A, Cnops L, Smolders I, McCullumsmith R, Kooijman R, Kwak S, Arckens L, Michotte Y (2008) High-affinity Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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.
- Maycox PR, Hell JW, Jahn R (1990) Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci* 13(3): 83-87.
- McDonald JW, Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 15(1): 41-70.
- Meaney JA, Balcar VJ, Rothstein JD, Jeffrey PL (1998) Glutamate transport in cultures from developing avian cerebellum: presence of GLT-1 immunoreactivity in Purkinje neurons. *J Neurosci Res* 54(5): 595-603.
- Mennerick S, Dhond RP, Benz A, Xu W, Rothstein JD, Danbolt NC, Isenberg KE, Zorumski CF (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. *Trends Pharmacol Sci* 11(11): 462-468.
- Nogae I, Johnston M (1990) Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene* 96(2): 161-169.
- 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, Zhang N, Walberg F (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46(3): 519-534.
- 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.
- 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.
- Plachez C, Danbolt NC, Recasens M (2000) Transient expression of the glial glutamate transporters GLAST and GLT in hippocampal neurons in primary culture. *J Neurosci Res* 59(5): 587-593.

- Popp RL, Velasquez O, Bland J, Hughes P (2006) Characterization of protein kinase C isoforms in primary cultured cerebellar granule cells. *Brain Res* 1083(1): 70-84.
- Powell SK, Rivas RJ, Rodriguez-Boulan E, Hatten ME (1997) Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J Neurobiol* 32(2): 223-236.
- Rauen T, Kanner BI (1994) Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett* 169(1-2): 137-140.
- Rauen T, Wiessner M, Sullivan R, Lee A, Pow DV (2004) A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT1c in the mammalian retina and brain. *Neurochem Int* 45(7): 1095-1106.
- Robinson MB (1998) The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int* 33(6): 479-491.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403(6767): 316-321.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38(1): 73-84.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13(3): 713-725.
- 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.
- Schousboe A (1981) Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol* 22: 1-45.
- Schousboe I, Larsson OM, Schousboe A (1989) Development of homospesific activity of GABA-transaminase in the mouse cerebral cortex and cerebellum and in neurons cultured from these brain areas. *Int J Dev Neurosci* 7(1): 115-121.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ (1995) CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4(2): 209-216.
- Sheldon AL, Robinson MB (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51(6-7): 333-355.
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ (2005) Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 171(6): 1001-1012.
- Shoji-Kasai Y, Itakura M, Kataoka M, Yamamori S, Takahashi M (2002) Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma



- membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. *Eur J Neurosci* 15(8): 1390-1394.
- Shupliakov O, Brodin L, Cullheim S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1992) Immunogold quantification of glutamate in two types of excitatory synapse with different firing patterns. *J Neurosci* 12(10): 3789-3803.
- Sonnewald U, Olstad E, Qu H, Babot Z, Cristofol R, Sunol C, Schousboe A, Waagepetersen H (2004) First direct demonstration of extensive GABA synthesis in mouse cerebellar neuronal cultures. *J Neurochem* 91(4): 796-803.
- 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.
- Susarla BT, Robinson MB (2008) Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochem Int* 52(4-5): 709-722.
- Tan J, Zeleniaia O, Correale D, Rothstein JD, Robinson MB (1999) Expression of the GLT-1 subtype of Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter: pharmacological characterization and lack of regulation by protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 289(3): 1600-1610.
- Tanabe H, Eguchi Y, Shimizu S, Martinou JC, Tsujimoto Y (1998) Death-signalling cascade in mouse cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* 10(4): 1403-1411.
- 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.
- Thangnipon W, Kingsbury A, Webb M, Balazs R (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Brain Res* 313(2): 177-189.
- Torp R, Hoover F, Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1997) Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and rEAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. *Anat Embryol (Berl)* 195(4): 317-326.
- Torp R, Lekieffre D, Levy LM, Haug FM, Danbolt NC, Meldrum BS, Ottersen OP (1995) Reduced postischemic expression of a glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 103(1): 51-58.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19(8): 328-334.
- Trotti D, Volterra A, Lehre KP, Rossi D, Gjesdal O, Racagni G, Danbolt NC (1995) Arachidonic acid inhibits a purified and reconstituted glutamate transporter directly from the water phase and not via the phospholipid membrane. *J Biol Chem* 270(17): 9890-9895.

- 
- Urakubo T, Tominaga-Yoshino K, Ogura A (2003) Non-synaptic exocytosis enhanced in rat cerebellar granule neurons cultured under survival-promoting conditions. *Neurosci Res* 45(4): 429-436.
- Virginio C, Martina M, Cherubini E (1995) Spontaneous GABA-mediated synaptic currents in cerebellar granule cells in culture. *Neuroreport* 6(9): 1285-1289.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Larsson OM, Schousboe A (2000) A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J Neurochem* 75(2): 471-479.
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 25(9): 1531-1546.
- Wilkin GP, Balazs R, Wilson JE, Cohen J, Dutton GR (1976) Preparation of cell bodies from the developing cerebellum: structural and metabolic integrity of the isolated cells. *Brain Res* 115(2): 181-199.
- Wong M, Ess KC, Uhlmann EJ, Jansen LA, Li W, Crino PB, Mennerick S, Yamada KA, Gutmann DH (2003) Impaired glial glutamate transport in a mouse tuberous sclerosis epilepsy model. *Ann Neurol* 54(2): 251-256.
- Wu F, Friedman L, Schacher S (1995) Transient versus persistent functional and structural changes associated with facilitation of Aplysia sensorimotor synapses are second messenger dependent. *J Neurosci* 15(11): 7517-7527.
- Zerangue N, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP (1995) Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J Biol Chem* 270(12): 6433-6435.
- Zhou J, Sutherland ML (2004) Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J Neurosci* 24(28): 6301-6306.
- Zmuda JF, Rivas RJ (1998) The Golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* 41(1): 18-38.

## Danksagung

Diese Arbeit entstand im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Peter Kugler. Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Peter Kugler für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine unermüdliche Unterstützung. Sowohl während der experimentellen Phase als auch während des Verfassens dieser Dissertation hat er durch seine intensive und gute Betreuung entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

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

Bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Detlev Drenckhahn und Prof. Dr. Hermann Koepsell bedanke ich mich für die Überlassung der Laborräumlichkeiten und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt Frau Erna Kleinschroth für ihre Geduld in der Phase der Einarbeitung und ihre großartige Unterstützung im Laboralltag.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für ihre unschätzbare Unterstützung, ohne die ich jetzt nicht Arzt sein könnte und ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Maria, die mich immer begleitet.