

Der Glutamatransporter GLT-1 des zentralen Nervensystems

Zellbiologische und elektrophysiologische Untersuchungen

zur Transportfunktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Robert Heinz Günter

aus Orsoy / Rheinberg

Köln 2007

Die vorliegende Arbeit wurde
an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
im Laboratorium für molekulare Neurowissenschaften
unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel angefertigt

Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W Stoffel

Prof. Dr. P. Kloppenburg

Vorsitz:

Prof. Dr. S. Korsching

Tag der mündlichen Prüfung:

25.04.2007

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel danke ich für die interessante Themenstellung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn Professor Dr. P. Kloppenburg danke ich für die Übernahme des Coreferats

Besonderer Dank gilt Dr. Dirk Feldmeyer (PD, Forschungszentrum Jülich) für die Unterstützung und Bereitstellung eines *patch-clamp* Meßstandes und Herrn Dr. med. Christoph Biskup (Universität Jena) für die ersten Einblicke in die Elektrophysiologie

Bedanken möchte ich mich bei

Frau Barbara Holz für die Unterstützung in der Zellkultur, Frau Dipl. chem. Christine Kiss für die unterstützende Mitarbeit an GLT-1 und den geführten Diskussionen. Frau Erika Binczek, Frau Dipl. Biol. Ina Hammels, Frau Barbara Holz, Frau Britta Jenke und Frau Dipl. Chem Christine Kiss für das wunderbare Arbeitsklima.

Herrn Werner Hucko, Frau Dipl. Biol Gina Haack, Herrn Dr. Achim Heinz, für das Arbeitsklima am Forschungszentrum Jülich.

Prof. Dr. Kloppenburg und Herrn Dipl. Biol Andreas Pippow für die Ermöglichung der Fura-2-Messung.

Meiner Familie und besonders meiner Schwester Frau Dipl. Biol. Eva-Maria Grimm-Günter für die Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Glutamat – Stoffwechselintermediat und Neurotransmitter.....	1
1.1.1	Die glutamaterge Synapse.....	2
1.2	Glutamatttransporter im Gehirn.....	3
1.1.2	Die Glutamatttransporterfamilie.....	5
1.1.3	Lokalisation der Glutamatttransporter.....	10
1.1.4	Regulation der Glutamatttransporter.....	11
1.1.5	Topologie der Glutamatttransporter.....	12
1.2	Glutamat und seine Funktion bei Lernprozessen und Gedächtnisbildung.....	18
1.3	Glutamat und Neurodegeneration.....	19
2	Aufgabenstellung.....	21
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Etablierung der GLT-1-Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	23
3.1.1	Erstellung von Konstrukten für die <i>in vitro</i> Transkription.....	23
3.1.2	<i>In vitro</i> Transkription.....	26
3.1.3	Translation von GLT-1 und EGFP-GLT-1 und Charakterisierung der Expressionsprodukte.....	27
3.1.3.1	Nachweis der Expression injizierter cRNA.....	27
3.1.4	Funktioneller Nachweis der Proteine in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	31
3.1.4.1	Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[¹⁴ C]-Glutamat.....	31
3.1.4.2	Untersuchungen mit Hilfe der <i>voltage-clamp</i> Technik.....	36
3.2	Etablierung einer stabilen Transporterexpression in HEK293 Zellen.....	39
3.2.1	Erstellung von Konstrukten für die Transfektion von stabil exprimierenden HEK293 Zellen.....	39
3.2.2	Nachweis der Expression transfizierter HEK293 Zellen.....	40
3.2.3	Funktioneller Nachweis der Proteine in HEK293 Zellen.....	43
3.2.3.1	Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[¹⁴ C]-Glutamat.....	44
3.2.3.2	Natrium-Abhängigkeit des Transports.....	46
3.2.3.3	Einfluß der Ca ²⁺ -Konzentration auf den Transport.....	48
3.2.3.4	Inhibitoren des GLT-1 vermittelten Glutamatttransports.....	49
3.2.4	Elektrophysiologische Untersuchungen an HEK293 Zellen.....	50
3.2.4.1	Transport der Liganden L-Glutamat und L-Aspartat.....	52
3.2.4.2	Einfluß der Ca ²⁺ -Konzentration auf den Transport.....	54
3.2.4.3	Inhibition des GLT-1 vermittelten Glutamatttransports.....	58
4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	61
5	Diskussion und Ausblick.....	63
5.1	Funktionelle Eigenschaften von GLT-1 und EGFP-GLT-1 im Vergleich.....	64
5.2	Substrateigenschaften für den Transport durch EGFP-GLT-1 und GLT-1.....	66
5.3	Ionenabhängigkeit des Transports.....	69
5.4	Methoden und Abweichungen.....	72
6	Methoden.....	75
6.1	Molekularbiologische Methoden.....	75
6.1.1	Plasmid-DNA-Präparation.....	75
6.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	75
6.1.3	Reverse-Transkription (RT).....	76
6.1.4	Quantitative RT-PCR.....	76
6.1.5	<i>In vitro</i> Transkription.....	77
6.1.6	Gelelektrophoretische Analyse der <i>in vitro</i> Transkriptions Produkte.....	77
6.1.7	Expression in HEK293 Zellen.....	78
6.1.8	Isolierung genomischer DNA aus HEK293 Zellen.....	78

6.1.9 Isolierung von RNA aus HEK293 Zellen.....	78
6.2 <i>Xenopus laevis</i> Oozyten Methoden.....	79
6.2.1 Froschhaltung.....	79
6.2.2 Oozytenentnahme.....	79
6.2.3 Injektion der cRNA in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	79
6.2.4 L-[¹⁴ C]-Glutamat-Aufnahme Messungen.....	80
6.3 Proteinbiochemische Methoden.....	81
6.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	81
6.3.2 <i>In vitro</i> Translation.....	81
6.3.3 Isolierung von Membranproteinen aus HEK293 Zellen.....	82
6.3.4 Isolierung der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten-Translationsprodukte.....	82
6.3.5 <i>Western-Blot</i>	82
6.3.6 Immunfärbungen an GLT-1 exprimierenden Zellen.....	83
6.3.7 Fluoreszenzmikroskopie von EGFP-GLT-1 Klonen.....	83
6.3.8 Immunzytochemische Untersuchungen von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten Gefrierschnitten.....	84
6.4 Elektrophysiologische Methoden.....	85
6.4.1 Elektrophysiologische Messungen an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	85
6.4.2 Elektrophysiologische Messungen an HEK293 Zellen.....	85
6.4.3 Ca ²⁺ Fluoreszenz Messungen.....	86
7 Materialien.....	88
8 Abkürzungen.....	94
9 Literaturverzeichnis.....	96
Zusammenfassung.....	107
Abstract.....	109

1 Einleitung

1.1 Glutamat – Stoffwechselintermediat und Neurotransmitter

Glutamat ist eine nicht essentielle Aminosäure, die als Proteinbaustein und Vorstufe für das Glutamin dient. Darüber hinaus ist sie der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Ihre Decarboxylierung führt zu einem weiteren Neurotransmitter, der γ -Aminobuttersäure (GABA). Im Gehirn dient Glutamat der Ammoniakbindung. Es ist außerdem die Vorstufe für die Aminosäure Ornithin und ein Baustein der Folsäure. Glutamat wird aus α -Ketoglutarat, das aus dem Zitratzyklus entstammt, in einer Transaminasereaktion gebildet. Als Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugern wurde es relativ spät entdeckt (Fonnum, 1984). Die Ursache liegt in der mannigfaltigen Aufgabe des Glutamats begründet, aufgrund derer es im Gehirn in einer Konzentration vorliegt, die deutlich über der anderer Aminosäuren liegt (Krebs 1935). Es ist die einzige Aminosäure, die im Gehirn oxidiert, transaminiert, aminiert und decarboxyliert wird.

Glutamat ist, anders als die reinen neuronalen Botenstoffe (Neurotransmitter), wie z.B. Adrenalin, Noradrenalin oder γ -Aminobuttersäure, aufgrund seiner zentralen Stellung überall im Gehirn anzutreffen und sein Vorkommen ist nicht, wie das anderer Transmitter, auf bestimmte Bereiche beschränkt. Es erfüllt sämtliche zur Klassifizierung eines Neurotransmitters notwendigen Kriterien. Präsynaptisch ist es in spezifischen Neuronen lokalisiert und wird bei entsprechenden Stimuli von der Ruhezustandskonzentration (etwa 1 μ M) auf etwa 1 mM in den synaptischen Spalt freigesetzt, um somit eine postsynaptische Antwort hervorzurufen. (Campbell, G.L., Shank, R.P., 1983)

Hochaffine Transportersysteme sorgen für seine rasche und effiziente Entfernung aus dem synaptischen Spalt. Glutamat ist unter allen im ZNS vorkommenden Aminosäuren der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter und ist in allen Regionen des Gehirns in sehr hohen Konzentrationen (10 mM/kg Naßgewicht) nachzuweisen. Das Nervensystem weist dabei eine 100-fach höhere Glutamatkonzentration als andere Neurotransmitter, wie z.B. Dopamin, Serotonin, Taurin oder Noradrenalin auf. (Danbolt, 1994)

1.1.1 Die glutamaterge Synapse

Im Ruhezustand weisen die Nervenendigungen an den glutamatergen Synapsen einen mehrtausendfachen Glutamatkonzentrationsgradienten über der Plasmamembran auf. Während die Glutamatkonzentration intrazellulär in synaptischen Vesikeln 60 – 120 mM (Clements, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E. & Westbrook, G.L., 1992; Nicholls & Attwell, 1990) beträgt, wird sie extrazellulär auf 2 - 5 μ M reguliert (Erecinska, M. & Silver, I.A., 1990). Durch ein Aktionspotential wird die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran ausgelöst. Die darauffolgende Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt bewirkt einen extrazellulären Anstieg der Glutamatkonzentration auf 0,1 - 1 mM. An der nachgeschalteten Postsynapse löst das freigesetzte Glutamat ein Generatorpotential über unterschiedliche Typen von Rezeptoren aus. Diese Rezeptoren werden aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften in ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren unterteilt. Ionotrope Rezeptoren sind benannt nach ihren spezifischen Agonisten, N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isazolpropinat (AMPA) und Kainat. Durch Öffnung kationenspezifischer Kanäle rufen sie eine Depolarisation hervor. AMPA- und Kainat-Rezeptoren aktivieren mit hoher Kinetik Ionenkanäle. Sie sind für eine schnelle erregende Signalweiterleitung verantwortlich. Der NMDA-Rezeptor ist an einen Kationenkanal gekoppelt und unterliegt einer spannungsabhängigen Mg^{2+} -Hemmung (Ascher, P. & Nowak, L., 1988). Er weist eine hohe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen auf und zeichnet

sich durch eine langsame exzitatorische Transmission aus (Seeburg, 1993). Die Klasse der metabotropen Rezeptoren (Aramori, I. & Nakanishi, S., 1992; Okamoto, K. & Sekiguchi, M., 1991) interagieren mit GTP-bindenden Proteinen und lösen dabei eine Signaltransduktion aus. Je nach Rezeptor wird dabei einerseits über die Phospholipase C die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mobilisiert und andererseits die Aktivität der Adenylatcyclase gehemmt.

Glutamatrezeptoren liegen durch homologe und heterologe Oligomerisierung der Untereinheiten, differentielles Spleißen und mRNA-*editing* als Repertoire funktionell unterschiedlicher Rezeptoren vor (Nicoll, R.A., Malenka, R.C. & Kauer, J.A., 1990; Sommer, B. & Seeburg, P.H., 1992). Die Expression ist dabei entwicklungs- und gewebespezifisch und verleiht jeder Synapse in Bezug auf die Wirkung von Glutamat ganz unterschiedliche Eigenschaften. Zur Beendigung der Signalwirkung von Glutamat auf die Rezeptoren muß Glutamat nach der Freisetzung schnell und effektiv aus dem synaptischen Spalt und extrazellulären Raum beseitigt werden, um seine neurotoxischen Eigenschaften zu verhindern und durch seine Inaktivierung eine präzise Weiterleitung der Erregung zu ermöglichen.

1.2 Glutamattransporter im Gehirn

Im Gegensatz zum extrazellulären Abbau, wie z.B. des Acetylcholins durch die Acetylcholinesterase, wird Glutamat für eine getreue Signalweiterleitung und zur Vermeidung exzitatorischer Schädigung schnell aus dem synaptischen Spalt entfernt. Diese Aufnahme des Glutamats aus dem synaptischen Spalt erfolgt durch hochaffine Transportsysteme. Lokalisiert sind sie in den Astrozyten und den Neuronen. Astrozyten nehmen nicht direkt an der Erregungsleitung teil und bilden keine Aktionspotentiale und Synapsen aus. Sie sind postnatal vermehrungsfähig. Der hauptsächliche Transport bei der Rückgewinnung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt in präsynaptische Vesikel erfolgt über die in Astrozyten lokalisierten Transporter. Glutamat wird hier zu Glutamin durch katalytische

Amidierung durch die Glutaminsynthetase gebildet oder in α -Ketoglutarat durch die Glutamatdehydrogenase bzw. die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase überführt. Glutamin kann, da es kein Ligand der Glutamatrezeptoren ist, in den synaptischen Spalt entlassen und von dort durch ein Na^+ -unabhängiges Transportsystem wieder in die glutamatergen Neuronen aufgenommen werden. Die mitochondriale Glutaminase dient im nächsten Schritt der Rückgewinnung für die Regeneration des Glutamats aus Glutamin. Das α -Ketoglutarat aus der Metabolisierung kann einerseits als Substrat in den Zitratzyklus der Gliazellen eingehen oder durch einen Na^+ -abhängigen Transporter wieder in die Nervenendigungen gelangen. Dort dient es als Vorstufe für Glutamat oder γ -Aminobutyrat (GABA) (Erecinska, M. & Silver, I.A., 1990) (Abbildung 1). Die Aufgabe der Glutamattransporter ist somit, den Konzentrationsgradienten im Nervensystem aufrecht zu erhalten, den Schutz der Neuronen vor einer schädigenden Glutamatkonzentration zu gewährleisten und eine präzise Erregungsweiterleitung sicherzustellen (Danbolt, 1994; Kanai *et al.*, 1993; Kanner, 1993a). Die Glutamattransporter beziehen ihre Energie zur Glutamat-Akkumulation aus dem elektrochemischen Na^+/K^+ -Ionengradienten (Nicholls & Attwell, 1990). Sie sind in der Lage, extrazelluläre Glutamatkonzentrationen aufrecht zu erhalten, die unterhalb der Glutamatrezeptoraktivierung liegen. Neben der Familie der Glutamattransporter (GluT) (vgl. 1.2.1 Die Glutamattransporterfamilie) existieren im Gehirn vesikuläre Glutamattransporter (vGluT) für den Glutamattransport in die präsynaptischen Vesikel (Johnson, 1988; Kanner, B.I. & Schuldiner, S., 1987). Der Transport ist von extravesikulärem Cl^- -Ionen (Hartinger, J. & Jahn, R., 1993), elektrochemischen Protonengradienten über die Vesikelmembran (Burger, P.M., Mehl, E., Cameron, P.L., Maycox, P.R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P. & Jahn, R., 1989; Hartinger, J. & Jahn, R., 1993; Naito, S. & Ueda, T., 1983) und von der Temperatur (Naito, S. & Ueda, T., 1983) abhängig. Im Gegensatz zur GluT-Familie sind vesikuläre Glutamattransporter Na^+ -unabhängig und weisen bei niedriger Substrataffinität ($K_m = 1,6 \text{ mM}$) eine hohe Glutamatspezifität auf (Naito, S. & Ueda, T., 1985).

al., 1996) und EAAT5 (Arriza *et al.*, 1997) zwei weitere. Die Glutamattransporterfamilie weist auf der Ebene der Aminosäuresequenz eine Identität von 40 - 65 % auf (Abbildung 2 und Tabelle 1).

	<i>GLAST-1</i> (<i>EAAT1</i>) ^a	<i>GLT-1</i> (<i>EAAT2</i>) ^d	<i>EAAC1</i> (<i>EAAT3</i>) ^g	<i>EAAT4</i> ⁱ	<i>EAAT5</i> ^j
Aminosäuren-Sequenz	543	572 558 (GLT-1b)	524	561	560
Molekulargewicht	66 kDa 60 kDa*	73 kDa/62 kDa* 61 kDa* (GLT-1b) ? kDa (GLT-1c) ^e	69 kDa ^h 57 kDa*	61 kDa*	61 kDa*
Transmembran Helices	6 ^b + 4 β-Faltblätter	8+2 β-Faltblätter	10	?	?
Gewebe	Gehirn	Gehirn Retina ^e	Dünndarm, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Muskel, Niere, Placenta	Gehirn	Gehirn
Zellebene	Bergmann-Glia-Zellen, Neuronen	Astrozyten, Neuronen,	Astrogliazellen, Neuronen	cerebrale Purkinje Dendriten	Müllerzellen der Retina
K _M für L-Glut	77 μM/ 11 μM** ^c	36-97 μM ^f	12 μM	?	?

Tabelle 1: Übersicht über die Genfamilie der Transmembran Glutamattransporter.

Angegeben sind bekannte Größen, Strukturen und Vorkommen der Transporter sowie bislang ermittelte Affinitätswerte für L-Glutamat (L-Glut). * Masse von der Aminosäuresequenz abgeleitet ** Radioisotopenmeßmethode/voltage-clamp Technik.

a (Storck, 1994; Storck *et al.*, 1992), **b** (Slotboom *et al.*, 1996; Wahle & Stoffel, 1996), **c** (Arriza *et al.*, 1994; Gegelashvili *et al.*, 1997; Klockner *et al.*, 1994; Storck *et al.*, 1992), **d** (Danbolt *et al.*, 1990; Pines *et al.*, 1992), **e** auch GLT1-1v genannt (Rauen *et al.*, 2004), **f** (Arriza *et al.*, 1994; Kirschner *et al.*, 1994; Pines *et al.*, 1992; Zerangue *et al.*, 1995) **g** (Kanai & Hediger, 1992), **h** (Velaz-Faircloth *et al.*, 1996), **i** (Dehnes *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1996), **j** (Arriza *et al.*, 1997)

Sequenzvergleiche mit Protonen/Glutamat-Aspartatsymporter GltP im Bakterium *Pyrococcus horikoshii* und dem Dicarboxylat-Transporter DctA von *E. coli* zeigen einen hohen Verwandtschaftsgrad (Abbildung 3). Unterschiede der GluT bestehen in der Gewebeverteilung, der Kinetik und teilweise in der Membrantopologie (Danbolt *et al.*, 1990; Kanai & Hediger, 1992; Storck *et al.*, 1992). Der Transport ist funktionell abhängig von extrazellulären Na⁺- und intrazellulären K⁺-Ionen, deren Ionengradient über die Membran den Transport - in der Bilanz eine positive Ladung ins Zellinnere - ermöglicht. Die genaue Stöchiometrie ist bislang unbekannt, elektrophysiologische Messungen legen jedoch nahe, daß Glutamat im Symport entweder mit drei Na⁺-Ionen im Austausch mit einem K⁺-Ion in die Zelle transportiert wird oder nur zwei Na⁺-Ionen gegen ein K⁺-Ion und ein Hydroxyl-Ion dies bewirkt (Barbour *et al.*, 1988; Dehnes *et al.*, 1998; Kanner, 1993b; Storck, 1994; Zerangue & Kavanaugh, 1996). Die Aktivierung der Transporter erfolgt über Glutamat, abhängig von Na⁺-Ionen. Im Gegensatz zu GLAST-1, GLT-1 und EAAC1 weisen EAAT4 und EAAT5 eine hohe Chloridionen-Abhängigkeit auf (Fairman *et al.*, 1995).

Abbildung 2: Verwandtschaftsgrad der Glutamattransporterfamilie in der Maus auf Proteinsequenzebene.

Aminosäuren, die in wenigstens drei der Transporter übereinstimmen, sind farblich hinterlegt. Unpolare Aminosäuren sind in blauen, ungeladene polare in gelben und geladene, polare Aminosäuren in roten Farben dargestellt. Der Sequenzvergleich wurde mit GLT-1 (ENSMUSP00000079100), GLAST-1 (ENSMUSP00000005493), EAAC1 (ENSMUSP00000025875); EAAT4 (ENSMUSP00000005490) und EAAT5 (ENSMUSP00000009076) mit *clustalx* erstellt. Die Sequenzen wurden ensembl.org entnommen und die Datenbankeinträge angegeben. Die Abbildung zeigt eine Homologie von 40 - 65 % auf Aminosäureebene.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
GLT-1  MASTEGANNMFRQVEVRMHDSHSSDEPRHRNIGMR-----MCDKCGNMLLISLTFGHTLGAACGGLDLRLASEPTH
GLAST  MTKSNG-----EPRMGGRMERQQGRRRTLLAKKVKQSLTKEDKSSYFESNAEYLLTATAIYGTLLIGTALR-PYIAMS
EAAC1  -----VGGPTSSGCD-----VSRCPNRRLLLSLTAASLGIHLGVVAFGHSELS
EAAT4  MSSHGNSLFLRISGAGGGCLQGQDSQQRAIRTLRLPQMTREHFRFLPENAEILLIYSAVILIGVSLATAFLR-PYGLIS
EAAT5  -----VLDRAVLAG-----STVGRHNGLLIISVLSYVIGCLLGLFLR-TQRLS

      90      100     110     120     130     140     150     160
GLT-1  PDVVMLLPAPFDITLQMLKMLIIPLISSLITGCSGLFARASGRDGTPTANRYMSTTIIIPAVGCEIILDAIRFGNPKLKS
GLAST  YPEMKYFSPFCELLMFMICMLIFLISSLTCYAAALDSASGTHGRAYVYVYVTTIIPAVVIGIITITLIRFGKGTQK
EAAC1  NLLKRYEAFDFCEILMFMICMLIFLISSNITGVAALDSNVSGNIGLRAYVYVYVTTIIPAVVIGIITITLIRFGKGTQK
EAAT4  YSOTKYFSPFCEILMFMICMLIFLISSNITGVAALDSNVSGNIGLRAYVYVYVTTIIPAVVIGIITITLIRFGKGTQK
EAAT5  POFITSYQPFCEILMFMICMLIFLISSNITGVAALDSNVSGNIGLRAYVYVYVTTIIPAVVIGIITITLIRFGKGTQK

      170     180     190     200     210     220     230     240
GLT-1  QVGGPKRNDKYSLLAVDILINNIIPENLYQACVQGIQTITKSVLQAPPSEEAATTKAIIISME-----
GLAST  NMYRERGRIVQVTAFAFDLLIMNMFPERLYEACFKQENTSYEKRSFKVPIQ--SNETLIGAVLN-----NVS
EAAC1  DEMRTEGTFPSTMLAMLLIMNMFPERLYEACFKQENTSYEKRSFKVPIQ--SNETLIGAVLN-----NVS
EAAT4  GILHREGGIETPTAFAPRLIMNMFPERLYEACFKQENTSYSTRVTRTIVRTDNGSEKASMSPTSSVENETSILENVT
EAAT5  ETTEQSGKPVSSAALLLVNNMPEANLAEATFRQYSTITTP--IKSPRGAEEAPPRIKVGVQEQ-----DNQS

      250     260     270     280     290     300     310     320
GLT-1  ---ETMNFAPPEETKTIWIKKGLFKQGNNTGLTGFTAFSTAMCFMCFQKICQFFFNINFLIDAKIMDKTWAYSPICGA
GLAST  EAMETLFRIR--EEMYP--VGGSVNGNALGLVFSMCFEYICGNMKECCQALRDFEESNENAIMRLAVLIMWYAPLQIL
EAAC1  ---TMSBNTKEYKING---LYSGINYLGLIIFSLVEGECVGGKQKQILDFENALSDATDITICIMCYPGIL
EAAT4  RALGTLQDYISFEETP--VEGSSANGINALGLVFSAFGLVCGMKHCQVYRDFEESNENAIMRLAGCIWYAFYQIL
EAAT5  RVQNFALDITPPPEIYKSEKGTSDGNNLGLIIFSATMCIMLRMDGSDTFLMSEFCQCNESRERAVAGAYFFFCIV

      330     340     350     360     370     380     390     400
GLT-1  CILCCSTAIKTRFVVARCICRYMCEHTVCEITHGGETLPEITGFYTPANFSPFSACTICAWTITATGASSAGTIPITPS
GLAST  FLTAGKTRFRDMGTEGGCLAHYTPATFGLIHFVITELPMIYFEMTRKMPVSTGGGLCALITAGTSSSSSATLPTIFQ
EAAC1  FLTAGKTRFRDMGTEGGCLAHYTPATFGLIHFVITELPMIYFEMTRKMPVSTGGGLCALITAGTSSSSSATLPTIFQ
EAAT4  FLTAGKTRFRDMGTEGGCLAHYTPATFGLIHFVITELPMIYFEMTRKMPVSTGGGLCALITAGTSSSSSATLPTIFQ
EAAT5  FLTAGKTRFRDMGTEGGCLAHYTPATFGLIHFVITELPMIYFEMTRKMPVSTGGGLCALITAGTSSSSSATLPTIFQ

      410     420     430     440     450     460     470     480
GLT-1  CLEENLDRKLRTRVLEYGATINMDGTALYEAAALFPAQNMNVLNFGCITISITATAASIGAAGLFOAGLVTMIV
GLAST  CLEENNGDKRITRIVLEYGATINMDGTALYEAAALFPAQNMNVLNFGCITISITATAASIGAAGLFOAGLVTMIV
EAAC1  CAELKNDKRLTRVLEYGATINMDGTALYEAAALFPAQLNGLLSIGCITISITATAASIGAAGLFOAGLVTMIV
EAAT4  CLEEGLEDRKLRTRVLEYGATINMDGTALYEAAALFPAQNNYELNLQGITISITATAASIGAAGLFOAGLVTMIV
EAAT5  CLEENHLDKRLTRVLEYGATINMDGTALYEAAALFPAQNNYELNFGCITISITATAASIGAAGLFOAGLVTMIV

      490     500     510     520     530     540     550     560
GLT-1  ITAVGIPTEFDSIAAVTALIDRMRTSAYVGFSPGAGVYHLSSEFIDITISQHRMQEDTFRMTKTQSYDDKNHFENS
GLAST  LTSVGLTIDCETLITAVIWFLLDRIRATTTNVLGTSFGAGVEHLSEHLENRD--VEMGNSVIEENEMKKFYQ-LTACQNEP
EAAC1  ISAVGLPATEITLITAVIWFLLDRIRATTTNVLGTSFGAGVEHLSEHLENRD--VSEENIVNPFALPTTIDNEISD
EAAT4  LTVSGLTIDCETLITAVIWFLLDRIRATTTNVLGTSFGAANIEHLISQRELELQZ-AELTLPSLG----KPYNSLQAQERGA
EAAT5  LTVSGLTIDCENIITAVIWFLLDRIRATTTNVLGTLAAGVRAICRKLFAQDM-GTEKLLPCETKPVVITQELIHAQDNGC

      570     580     590     600
GLT-1  NUCYYAAHNSVVIDEC---KTLAANGKSDACSVEEPPWKREK-----
GLAST  ESNFADSETK-----
EAAC1  TKKSYVNGGFADKSD----TISFTQTSQF-----
EAAT4  SFGRRGNEVSE-----
EAAT5  VESYAEASELTIIGPTCPHHIPQVEQDEDPAAASLDHCTIEISELETNV

```

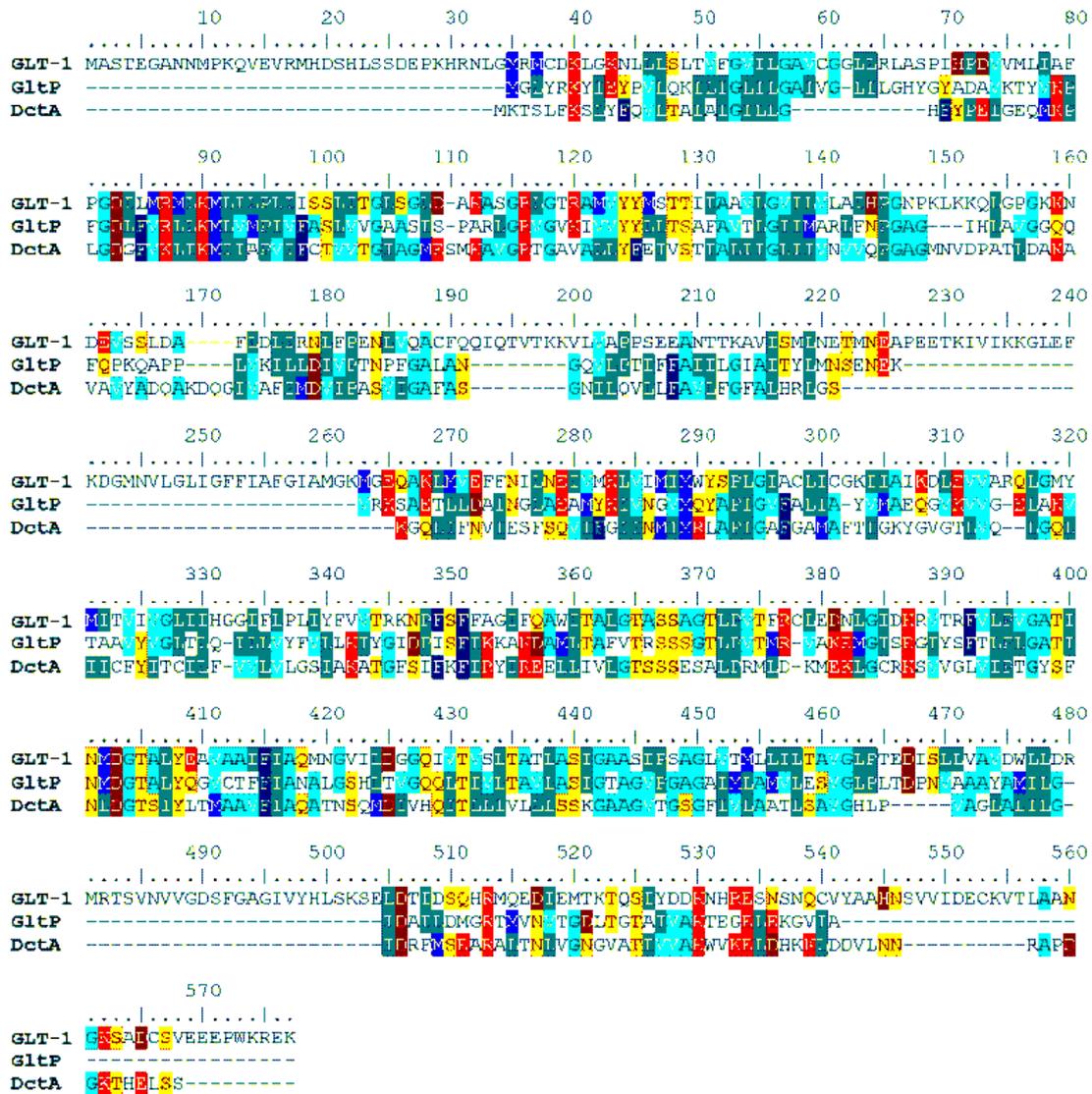


Abbildung 3: Sequenzvergleich von Glutamat- bzw. Na⁺ Dicarboxylat (Symport) Transportern aus der Maus und Bakterien.

In dem für den Transport wichtigen Bereich ab Aminosäure 270 ist, trotz der geringen Verwandtschaft der Organismen, eine höhere Identität zu beobachten. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Aminosäuresequenz für die Transportfunktion. Dargestellt ist der Sequenzvergleich (clustalx) von GLUT-1 (ENSMUSP00000079100, ensembl.org) aus der Maus, GltP (NP_14318, NCBI) aus *Pyrococcus horikoshii* und DctA (ABE09489, NCBI) aus *E. coli*. Unpolare Aminosäuren sind in blauen, ungeladene polare in gelben und geladene, polare Aminosäuren in roten Farben dargestellt.

1.1.3 Lokalisation der Glutamatransporter

Die einzelnen Mitglieder der GluT-Familie unterscheiden sich in der Gewebeverteilung. GLAST-1 und GLT-1 sind hauptsächlich auf die Astrozyten des ZNS begrenzt (Lehre *et al.*, 1995; Rothstein *et al.*, 1994; Schultz & Stell, 1996; Wadiche *et al.*, 1995), aber auch in den Müller-Zellen der Retina (Rauen *et al.*, 2004) und in Neuronen (Mennerick *et al.*, 1998) zu finden. Antikörper gegen sowohl C-terminale wie auch N-terminale Domänen von GLT-1 weisen die höchsten Konzentrationen von GLT-1 in Astrozyten des ZNS, Hippocampus und Cerebralem Cortex nach. Antikörper gegen den C-Terminus und das Gesamtprotein GLAST-1 zeigen dies für GLAST-1 in den Bergmann Gliazellen des Cerebellums (Lehre *et al.*, 1995; Rothstein *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1997; Storck, 1994).

In Gewebekulturen von Neuronen konnte eine GLT-1 Expression beobachtet werden (Mennerick *et al.*, 1998), wie auch eine Transkription in Pyramidenzellen des Hippocampus (Schmitt *et al.*, 1997; Torp *et al.*, 1997) und einer transienten Expression in den Neuronen des sich entwickelnden Gehirns (Northington *et al.*, 1999). GLT-1 und GLAST-1 werden in variierendem Verhältnis, abhängig von der Region und der benachbarten glutamatergen Synapse in Astrozyten koexprimiert (Chaudhry *et al.*, 1995; Haugeto *et al.*, 1996; Lehre *et al.*, 1995). EAAC1 erfährt eine globalere Expression. So ist es im Gehirn prä- (Bliss & Collingridge, 1993; Kanai & Hediger, 1992) und postsynaptisch (Rothstein *et al.*, 1994), aber auch außerhalb des Nervensystems in der Niere (Arriza *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1994; Kanai & Hediger, 1992), Herz (Arriza *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1994; Kanai & Hediger, 1992), Muskel (Mukainaka *et al.*, 1995), Lunge (Arriza *et al.*, 1994; Mukainaka *et al.*, 1995), Placenta (Arriza *et al.*, 1994), Darm (Kanai *et al.*, 1994) und Leber (Kanai *et al.*, 1994; Kanai & Hediger, 1992) nachzuweisen (Torp *et al.*, 1994). *Northern-Blot* Analysen zeigten für EAAC1 stärkste Expression in peripheren Geweben (Nakayama *et al.*, 1996). Neben glutamatergen Neuronen ist EAAC1 auch in GABAergen Neuronen wie Purkinjezellen und Vorderzellen des Rückenmarks

(Rothstein *et al.*, 1994; Velaz-Faircloth *et al.*, 1996), in Astrozyten (Conti *et al.*, 1998) und in der Retina (Rauen & Kanner, 1994; Schultz & Stell, 1996) nachzuweisen. EAAT4 ist hauptsächlich auf die cerebralen Purkinje Dendriten (Dehnes *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1996) beschränkt, EAAT5 wird selektiv in der Retina, überwiegend in den Müller Zellen sowie in Muskel und Leber (Arriza *et al.*, 1997) exprimiert.

1.1.4 Regulation der Glutamattransporter

Zur Expression von GLT-1 in kultivierten Astrozyten müssen Neuronen kokultiviert werden (Schlag *et al.*, 1998; Swanson, R.A., Farrell, K. & Stein, B.A., 1997), da ohne Neuronen nur GLAST-1 exprimiert wird (Drejer *et al.*, 1983; Gegelashvili *et al.*, 1997; Voisin *et al.*, 1993). Gegelashvili zeigte, daß dazu nicht der Kontakt mit Neuronen nötig ist, sondern die Expression von GLT-1 über bislang unbekannte, neuronale und lösliche Faktoren stimuliert wird. Die Expression von GLAST-1 ist davon nicht beeinflusst, aber die neuronalen Faktoren differenzieren dessen Aktivität über astrogliale, metabotrope Glutamatrezeptoren mGluR3 und mGluR5. (Gegelashvili *et al.*, 2000)

PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) wirkt über PAC1 Rezeptoren stimulierend auf die GLAST-1 Expression und über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und eines PKC Signalweges auf GLT-1 ein (Figiel & Engele, 2000). Lösliche Faktoren regulieren die Expression von GLT-1 in kortikalen Astrozyten über die Aktivierung von p42/44 MAPK (*mitogen activated protein kinase*), CREM (*cyclic adenosine monophosphate responsive element modulator*) und ATF-1 (*activating transcription factor-1*) (Gegelashvili *et al.*, 2000). Demnach wird die Expression von GLAST-1 und GLT-1 vermutlich unabhängig durch diffusionsfähige neuronale Moleküle reguliert.

Casado *et al.* konnte 1993 auf der Basis der vorkommenden Erkennungssequenzen (Kanai & Hediger, 1992; Storck *et al.*, 1992) beweisen, daß PKC und PKA an der Regulation beteiligt sind. Eine Aktivierung von PKC hat einen Aktivitätsanstieg von

GLT-1 zur Folge (Casado *et al.*, 1993). Arachidonsäure weist einen inhibitorischen Effekt auf Transporter von Glutamat, Glycin und GABA auf (Barbour *et al.*, 1989; Rhoads *et al.*, 1983; Zafra *et al.*, 1990). Daraus geht hervor, daß die unterschiedlichen Transportersubtypen durch klar abgetrennte, zellspezifische Mechanismen reguliert werden.

1.1.5 Topologie der Glutamattransporter

GluT sind Glykoproteine, die aus bis zu 600 Aminosäuren aufgebaut sind und ein Molekulargewicht von 60 bis 85 kDa besitzen. Bis zu 12 α -Helices sind in der Membran verankert. Aufgrund der fehlenden Signalsequenz am N-Terminus liegen vermutlich beide, C- wie N-Terminus intrazellulär vor (Abbildung 4). Der intrazelluläre Teil könnte sowohl für die Lokalisation als auch für die Aktivität über Interaktionen mit anderen cytosolischen Proteinen von Bedeutung sein. Die intrazelluläre Stimulierung von Kinasen zeigt eine verstärkte Aktivität. GluT treten dabei als Monomere und/oder Homomultimere auf. (Haugeto *et al.*, 1996)

Gegelashvili und Schousboe schlugen 1998 eine mögliche Beteiligung der Glutamattransporter an Signaltransduktionsketten vor. Dies basiert auf Beobachtungen über die dritten intrazellulären Domänen von GLAST-1, GLT-1 und EAAC1. Sie besitzen ein zu IGF-II und α -adrenergen Rezeptoren ähnliches Motiv, das mit der α -Untereinheit von G-Proteinen interagiert (Gegelashvili & Schousboe, 1998). Der Histidinrest H326 (GLT-1) ist für die Transporterfähigkeit von Bedeutung, nicht aber für die Stabilität (Zhang *et al.*, 1994), ähnlich den positiv geladenen Aminosäureresten Tyrosin Y405 und Arginin R479 bei GLAST-1 (Conradt & Stoffel, 1995). Der Tyrosinrest ist dabei sowohl von außen, wie auch aus dem Zellinneren erreichbar (Kavanaugh *et al.*, 1997; Marcus Conradt, 1996). Zudem ist er auch in die K^+ -Bindung involviert und liegt zusammen mit dem Glutamatrest E404 nahe des Transportmotivs NMDGT (Zarbiv *et al.*, 1998).

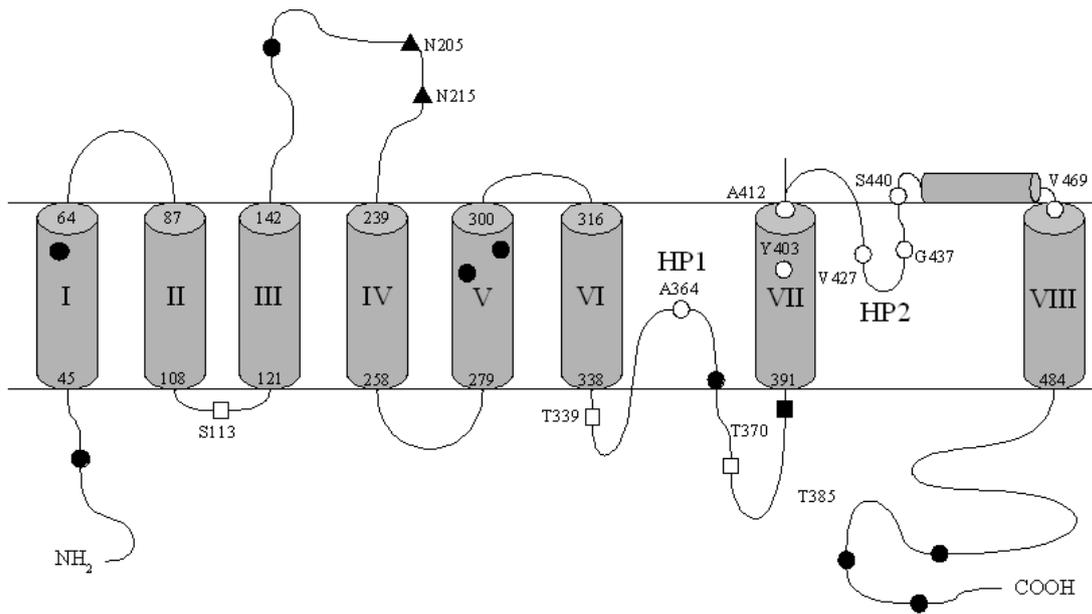


Abbildung 4: Topologie des GLT-1 Transporters

Die Markierungen zeigen einige Bindestellen für * γ -Carboxy Bindestelle, ■ PKA-Phosphorylierung, ● endogene Cysteine, ○ MTSET-sensitige Aminosäuren wenn zu Cystein mutiert. ▲ N-Glykolisierung □ PKC-Phosphorylierung. Die Abbildung basiert auf Brocke *et al.*, 2002).

Weitere bedeutende Aminosäuren für den Glutamattransport sind das Motiv NMDGTxxYE 396-404 (Seal *et al.*, 2000; Zarbiv *et al.*, 1998), S440 (Verbindung zu A364 (Yernool *et al.*, 2004) und S443. S440 liegt dabei nahe der Glutamatbindestelle (Zhang & Kanner, 1999). Nach der Bindung von Glutamat durchläuft GLT-1 eine Konformationsänderung, die entweder den Transport begründet oder zumindest eng mit diesem gekoppelt ist (Grunewald & Kanner, 1995). Arginin spielt eine besondere Bedeutung bei der Bindung von Glutamat. R447 in EAAC1 entspricht R479 bei GLAST-1 und R477 in GLT-1. EAAC1 kann auch Cystein aufnehmen, dessen Transport aber nicht vom R447 abhängt (Bendahan *et al.*, 2000). In einem Serin Transporter (Ogawa, W., Kim, Y.M., Mizushima, T. & Tsuchiya, T., 1998) ist an dieser Stelle ein Glutamat zu finden. R447 ist auch für die Substratspezifität wichtig. Für die Chlorid Permeabilität sind bei GLAST-1 der Transmembranbereich 2 und der

Aspartatrest D112 sowie der Lysinrest K114 von funktioneller Bedeutung (Ryan *et al.*, 2004). Für die Interaktion von K⁺-Ionen mit GLAST-1 ist der Tyrosinrest Y403 zusammen mit dem Glutamatrest D404 wichtig. (Zarbiv *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Der Natriumtransport benötigt die Serinreste S440 und S443 (Zhang & Kanner, 1999).

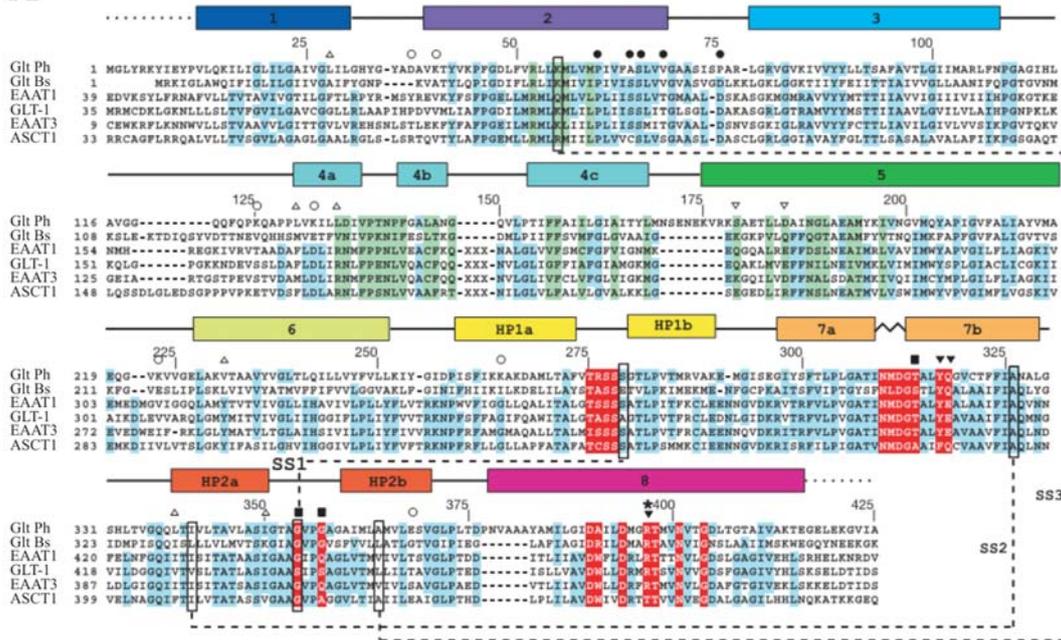
N-Glykosylierungsstellen sind zwischen Transmembranhelices III und IV zu finden (Grunewald & Kanner, 1995). Conradt *et al.* konnten zeigen, daß die N-Glykosylierungsstellen allerdings nicht für die Funktion des Transports von Bedeutung sind. Punktmutationen an diesen Positionen verändern weder den Transport, noch die Affinität zum Liganden, bei fehlender N-Glykosylierung bleibt die *in vitro* zu beobachtende Dimerisierung aus. (Marcus Conradt, 1996). GLT-1 wie auch die beiden anderen GluT GLAST-1 und EAAC1 weisen eine Konservierung des Serinrestes S113 im zytosolisch orientierten *loop* zwischen den Transmembranhelices II und III auf. Hierbei handelt es sich um eine Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase C. Der Serinrest reguliert die Aktivität des Neurotransmitters, wie mit einer Punktmutation zu Aspartat gezeigt werden konnte (Casado *et al.*, 1993). Weitere Studien zeigen, daß, neben diesen Phosphorylierungsstellen eine weitere, nicht in einer Konsensussequenz liegende Phosphorylierungsstelle existieren muß (Marcus Conradt, 1996). Weiter sind die Threoninreste T339 und T370, zwischen Transmembranhelices VI und VII, jeweils Teil einer PKC-Konsensussequenz. Ebenfalls zwischen diesen beiden Transmembranhelices liegt eine Proteinkinase A Phosphorylierungsstelle (Threoninrest T385) (Marcus Conradt, 1996). Punktmutationsuntersuchungen an den Positionen Phenylalanin F389 und Leucin L390 (GLAST-1) konnten die funktionelle Bedeutung, durch Verankerung der Transmembrandomäne in der Membran, für diesen Bereich nachweisen (Wahle & Stoffel, 1996). Beide Studien unterstützen die Annahme von Kavanaugh *et al.*, die für diese Regionen die Porenbildung und somit die transportierende Domäne vorschlägt (Kavanaugh *et al.*, 1997).

Hydrophobizitätsanalysen ließen auf 6-12 Transmembranhelices schließen. Während am N-Terminus deutlich 6 Transmembranhelices erkennbar sind, konnten erst genauere Studien für den C-Terminus von GLAST-1 zeigen, daß dieser aus vier weiteren transmembranalen Domänen besteht (Wahle & Stoffel, 1996). Genfusions-Techniken bestätigten diese Annahme auch für GLT-1 und lieferten ein Faltungsmodell, daß in Übereinstimmung mit den Trypsinstudien zur Konformationsänderung von Grunewald steht (Slotboom *et al.*, 1996). Die Transmembranregionen 9 und 10 sind von Bedeutung für die Chloridionen Permeabilität. Diese Region mit 57 AS zeigt zwischen EAAT1 (humanes GLAST-1) und EAAT2 (humanes GLT-1) 17 nicht konservierte Aminosäuren auf, von denen 10 Aminosäuren in der Membran und vier intrazellulär liegen. In diesem Bereich weisen EAAT1 und EAAT2 lediglich 68 % Identität auf, während EAAT1 zu EAAT3 (humanes EAAC1) 78 %, zu EAAT4 92 % und zu EAAT5 81 % Identität hat (Mitrovic *et al.*, 1998). Die Unterschiede dieser Region könnten eine Erklärung für die funktionellen Unterschiede zwischen EAAT1 und EAAT2 sein. Durch Neubildung oder Reorganisation der Membran, gesteuert durch Aktin Dynamik, werden Cluster von GLT-1 gebildet. Eine einfache Umverteilung zur benachbarten Membran konnte ausgeschlossen werden. Diese neu formierten Cluster sind vermutlich auf die Internalisierung von GLT-1 zurückzuführen. (Zhou & Sutherland, 2004)

Die erste Kristallstruktur eines Glutamattransporters gelang Yernool *et al.* 2004 an dem Bakterienhomolog von *Pyrococcus horikishii* und konnte somit zur weiteren Aufklärung im C-terminalen Bereich beitragen. Der C-Terminus ist bei Eukaryoten wie Prokaryoten wichtig für die Substratbindung, dem Transport und die Ionenkopplung. Dagegen steht der N-Terminus mit dem thermodynamisch entkoppelten Chloridionenfluß in Verbindung (Ryan *et al.*, 2004). Seal *et al.* beschrieben 2000 für GLAST-1 ein Modell, bei dem die ersten sieben Domänen transmembranal sind, während Domäne 8 die Membran nicht vollständig durchspannt (*reentrant loop*). Die Domänen 9 und 10 sind membranständig und

Domäne 11 erneut durchgängig. (Seal *et al.*, 2000) Ein anderes Ergebnis, mit größerer Übereinstimmung des von Wahle *et al.* postulierten Strukturmodells (Wahle & Stoffel, 1996), lieferte die Strukturanalyse von Yernool beim bakteriellen GLT-1 Homolog mit zehn Domänen, bei denen Domänen HP1 (*helical hairpin*) und HP2 *reentrant loops* sind, während 7 bzw. 8 Transmembrandomänen sind (Abbildung 5B) (Yernool *et al.*, 2004). Die beiden *reentrant loops* sind im GLT-1 Transporter entgegengesetzt orientiert (Brocke *et al.*, 2002). Nach Yernool ergibt sich für das GLT-1 Homolog (37 % Identität zur menschlichen Variante) eine Struktur aus acht primären α -helicalen Segmenten (Transmembrandomäne TM1-8) und zwei *helicalen hairpins* (HP1 und 2) die zwischen TM 6/7 bzw. TM 7/8 liegen. Sie entsprechen den *reentrant loops* und werden im weiteren als HP1 und 2 geführt. Auch konnte festgestellt werden, daß das Bakterienhomolog als Trimer vorkommt. Der C-Terminus eines GLT-1 Proteins bildet eine eigene Tasche mit dem NMDGT Motiv, so daß im Trimer jedes Protomer einen eigenen, unabhängigen Transport ausübt. Asparagin- und Aspartatreste stabilisieren die Tasche und Brücke zwischen den beiden HP Domänen. Schlüsselemente sind dabei HP1, TM7 und HP2. TM7 weist dabei eine außergewöhnliche Struktur auf: Zwei parallele helicale Elemente, verbunden durch konservierte Reste über eine β -Brücke zu HP1, das mit dem polaren TM8 in Kontakt steht (Abbildung 5). Die in Eukaryoten bedeutsamen Serinreste S440 und S443 liegen in der Spitze von HP2. Die helicalen Haarnadelschleifen liegen in Übereinstimmung mit Mutationsuntersuchungen von Ratten GLT-1 (Brocke *et al.*, 2002), die zur Interpretation der *reentrant loops* führten.

A



B

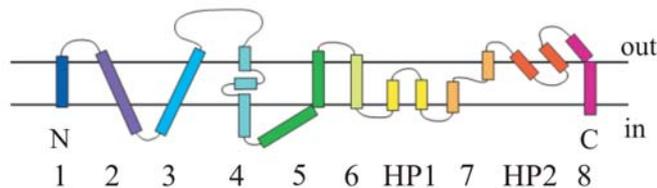


Abbildung 5: Topologische Untersuchungen an bakteriellem GLT-1 Homolog GltP

(A) Sequenzvergleich von Aminosäuretransportern aus *P. hirkoshii* (Glt_{Ph} NP_143181), *B. stearothermophilus* (Glt_{Bs} P24943), Ratte (GLT-1 P31596 und dem Menschen (EAAT1 P43003, EAAT3 AAH37310 und ASCT1 NP_003029). Punkte zeigen ungeordnete Bereiche in der Kristallstruktur. α -Helices sind durch Rahmen über der Sequenz hervorgehoben. Bereiche hoher Homologie sind blau, Bereiche mit Kontaktstellen in der Kristallstruktur grün hinterlegt. Essentielle Aminosäuren für den Transport sind rot eingefärbt. Weitere Markierungen zeigen Bindestellen für * γ -Carboxy Bindestelle, ■ Na⁺, ▼ K⁺ und ● für Chlorid. Histidin Punktmutanten sind ○ markiert, Methioninmutanten mit Δ und doppelten Cysteinmutanten mit ▽. Aminosäurereste, die in eukaryotischen Transportern bei Mutation zu Cystein Disulfidbrücken ausbilden, sind mit einem Rahmen umgeben und die Bindung durch eine punktierte Linie verdeutlicht. xxx bei den eukaryotischen Transportern ist der in der Darstellung nicht dargestellte Bereich zwischen α -Helices 4b und c, wie auch der N- als auch der C-Terminus nicht abgebildet sind. (B) Schematische Darstellung der Struktur von Glt_{Ph} auf Basis der Kristallstrukturanalyse und Farbcodierung aus A. (Bildquelle: (Yernool et al., 2004))

1.2 Glutamat und seine Funktion bei Lernprozessen und Gedächtnisbildung

Grundlage für die Gedächtnisbildung und den Lernprozeß ist die hohe Plastizität, die Fähigkeit durch Änderung der synaptischen Muster die Effizienz zu ändern. Die Aktivitätsmodulierung, also eine aktivitätsgesteuerte Plastizität, bildet im gängigen Modell die Erklärung für die Informationsspeicherung. Hochfrequente Impulse bewirken einen anhaltenden Anstieg der synaptischen Effizienz (Bliss & Collingridge, 1993), den man als Langzeitverstärkung (*long-term potentiation* LTP) bezeichnet. Eine besondere Rolle kommt dabei den NMDA-Rezeptoren zu. Bei vergleichsweise niedrigen Aktivierungsenergien wird bereits eine anhaltende postsynaptische Depolarisierung durch hochfrequente Stimuli ausgelöst, zeitgleich mit einer Aufhebung des spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blocks am Rezeptor. Weitere Glutamatausschüttung durch Ligandenbindung führt zum Influx von Ca^{2+} in die Zelle und somit zur Aktivierung von postsynaptischen Enzymen, wie Kinasen (Malinow *et al.*, 1989), Phospholipasen und Synthesen (Meldrum & Garthwaite, 1990) und in der Folge zu einer Erhöhung der Übertragungseffizienz.

Proteinkinase C scheint an allen Phasen der LTP beteiligt zu sein (Muller *et al.*, 1991). Die autophosphorylierte Calmodulin-Kinase II erhöht die Empfindlichkeit gegenüber Glutamat durch Phosphorylierung von AMPA-Rezeptorkanälen (Soderling *et al.*, 1994) und verbindet somit NMDA- und nicht NMDA-Rezeptoren. Calciuminduzierte Stickstoffmonoxid-Synthase löst in kultivierten pyramidalen Zellen über Stickstoffmonoxidbildung eine präsynaptische Transmitterausschüttung aus (Bruhwyler *et al.*, 1993). Phospholipase A_2 sorgt für eine Arachidonsäure-Freisetzung, die die Präsynapse zur erhöhten Glutamatfreisetzung anregt (Williams, J.H., Errington, M.L., Lynch, M.A. & Bliss, T.V., 1989) und die Aufnahme von Glutamat in Gliazellen hemmt (Barbour *et al.*, 1989).

Weitere Bedeutung der LTP kommen den metabotropen Glutamatrezeptoren zu. Werden sie aktiviert, wird sowohl eine NMDA-abhängige wie unabhängige Form des LTP's ausgelöst (Bashir *et al.*, 1993). Auch Gliazellen können zur Glutamatausschüttung angeregt werden (Szatkowski *et al.*, 1990). Nach Bradykin induzierter Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration setzen Astrozyten in Co-Kultur mit Nervenzellen Glutamat frei, was zu einer Erhöhung der Konzentration an Calcium in der Postsynapse führt (Parpura *et al.*, 1994). Auf diese Weise könnte eine Beteiligung an der Vermittlung von Information und am Aufbau der synaptischen Plastizität durch Gliazellen vorliegen.

1.3 Glutamat und Neurodegeneration

Glutamat ist auf der einen Seite der zentrale exzitatorische Neurotransmitter und an der Ausbildung zellulärer Hirnarchitektur und somit an der neuronalen Plastizität beteiligt, auf der anderen Seite ist er die Ursache verschiedener akuter und chronischer Hirnerkrankungen (Sahai, 1990). Die Glutamat-Exzitotoxizität verläuft in zwei Phasen (Choi, 1988).

- 1.) Nach der Depolarisation erfolgt ein Einstrom von Na^+ , Cl^- und H_2O und somit ein Anschwellen der Zelle. Der folgende übermäßige Einstrom von Ca^{2+} bewirkt eine Aktivierung von Proteinkinasen, Phospholipasen und Synthasen (Choi, 1988; Meldrum & Garthwaite, 1990), die direkt oder indirekt durch z.B. Radikalbildung die Zelle schädigen. Die akute Exzitotoxizität beeinträchtigt den zellulären Stoffwechsel. Als Folge wird
- 2.) der Energiezustand der betroffenen Nervenzelle beeinflusst. Dadurch kann die Na^+ - K^+ -ATPase Aktivität gestört werden. Das Membranpotential wird verschoben, der spannungsabhängige Mg^{2+} -Block aufgehoben und bei niedrigen, normalerweise nicht erregenden, endogenen Glutamatkonzentrationen wird der NMDA-Rezeptor übererregt. Die dabei

ausgelösten Prozesse führen zu einem verzögerten exzitotoxischen Tod des Neurons. (Beal, 1992)

Eine Anzahl akuter und chronischer Hirnerkrankungen hat als eine mögliche Ursache das toxische Potential von Glutamat. Eindeutig ist die Rolle des Glutamats bei akuter Sauerstoffmangelversorgung beim Hirnschlag. Der Verlust des Membranpotentials hat eine abnehmende, gradientenabhängige Glutamataufnahme (O'Neill *et al.*, 1994) oder einen umkehrenden Effekt (Nicholls & Attwell, 1990) zur Folge.

Beim Calcium vermittelten Zelltod von Neuronen ist die verstärkte Glutamat-Freisetzung ein frühes und kritisches Ereignis und mit neurodegenerativen Ereignissen wie Epilepsie (Chapman, 2000; Tanaka *et al.*, 1997), Multipler Sklerose (Nicoletti *et al.*, 1999), amyotropher Lateral Sklerose (ALS) (Shaw, 1999) und anderen neuropathologischen Umständen verbunden (Greene, 1999; Matute *et al.*, 1999). Bei ALS (Shaw, 1994), einer fortschreitend chronischen Degeneration der Motoneurone des Rückenmarks mit aufsteigender Lähmung bis zum Erstickungstod, wie auch bei der Alzheimerschen Erkrankung (Masliah *et al.*, 1996) ist eine glutamaterge Beteiligung nachgewiesen. Eine verminderte Glutamattransportfähigkeit wurde als eine mögliche Ursache für den neuronalen Zelltod bei ALS festgestellt (Rothstein *et al.*, 1992; Rothstein *et al.*, 1993). Die familiäre Form von ALS korreliert mit einem Defekt in der zytosolischen Superoxid-Dismutase (SOD-1) (Rosen *et al.*, 1993). Eine Beeinträchtigung des Glutamattransports in Motoneuronen kann auch zu einem ALS-ähnlichen klinischen Bild führen (Collard *et al.*, 1995). Die Expression in ALS Patienten ist allerdings unverändert, jedoch könnte die Stabilität des Proteins beeinflusst sein. Nicht nur eine Beeinträchtigung der Neurotransmitteraufnahme in die Zelle könnte eine Ursache sein. Zusätzlich besitzt zumindest GLT-1 das Potential der Glutamataufnahmeumkehr (Levy, L.M., Warr, O. & Attwell, D., 1998).

2 Aufgabenstellung

Na⁺-abhängige Glutamattransporter des zentralen Nervensystems sind für die Aufnahme des Neurotransmitters Glutamat in der exzitatorischen Synapse verantwortlich. Sie beenden das Neurotransmittersignal und steuern eine präzise Weiterleitung der axonalen Erregung. Eine weitere Funktion ist der Schutz vor der exzitotoxischen Wirkung des Glutamats auf Neurone. Exzitotoxische Wirkungen sind Ursache für unterschiedliche akute und chronische Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems.

Für ein besseres Verständnis sowohl der Signaltransduktion als auch der Exzitotoxizität ist die Kenntnis der durch einzelne Glutamattransporter katalysierten Transportprozesse erforderlich.

1. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Erstellung geeigneter Konstrukte des Glutamattransporters GLT-1 (EAAT2, *excitatory amino acid transporter 2*) und des Fusionsprodukts mit dem fluoreszierenden Polypeptid EGFP (EGFP-GLT-1).
2. Diese Konstrukte sollen der Gewinnung von stabil die beiden Transporter exprimierenden HEK293 Zell-Linien dienen. Nach Selektion EGFP-GLT-1 und GLT-1 exprimierender Klone und deren molekularbiologischer und genetischer Charakterisierung sollen Glutamat- Aufnahmestudien und die elektrophysiologische Charakterisierung durch Ganzzell-Ableitungen erfolgen.
3. Die beiden Transporterkonstrukte sollen weiterhin nach *in vitro* Transkription der Gewinnung von GLT-1 spezifischer RNA für die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und der Analyse ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften verwendet werden.

4. An *Xenopus laevis* Oozyten sollen Vergleiche der Neurotransmitter Aufnahme zwischen GLT-1 und dem fusionierten EGFP-GLT-1 durchgeführt werden, um den Einfluß der N-terminalen Fusion der für die Zellbiologie sehr hilfreichen EGFP Derivatisierung zu ermitteln.
5. Stabil den Glutamattransporter GLT-1 exprimierende HEK293 Zellen sollen analog zu den Oozyten-Experimenten für Aufnahmestudien und zur Charakterisierung der Transporterfunktion durch elektrophysiologische Untersuchungen verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der GLT-1-Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Grundvoraussetzung für Aufnahmestudien des Neurotransmitters Glutamat und elektrophysiologischen Untersuchungen war es, die Expression von GLT-1 in Zellsystemen zu etablieren. Das System der Wahl bildete das *Xenopus laevis* Oozyten System, in dem der verwandte Glutamattransporter GLAST-1 bereits untersucht wurde (Storck *et al.*, 1992). Die Expression des Glutamattransporters GLT-1 in *Xenopus laevis* Oozyten ermöglichte eine funktionelle Untersuchung zum Neurotransmitter-Transportprozess.

Xenopus laevis Oozyten translatieren mRNA verschiedenster Herkunft, prozessieren die synthetisierten Proteine korrekt und transportieren sie in die entsprechenden Zellkompartimente (Colman, 1984). Weiterhin zeigten experimentelle Versuche zur Expressionsklonierung des verwandten Neurotransmitters GLAST-1 (Blakely *et al.*, 1988), sowie die funktionelle Expression eines Transporters für kationische Aminosäuren in *Xenopus laevis* Oozyten (Kim *et al.*, 1991) die Eignung dieses Expressionssystems für die in der vorliegenden Arbeit gestellten Fragestellungen.

3.1.1 Erstellung von Konstrukten für die *in vitro* Transkription

Ausgehend von der cDNA Bank neun Wochen alter Mäuse wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) die spezifische cDNA von *glt-1* mit den Primern „5'GLT1 rek NheI“ und „3'GLT1 rek BamHI“ amplifiziert, mittels TA-Überhang in den pCR2.1 Vektor ligiert und kloniert.

Die *glt-1*-cDNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI im pCR 2.1 Vektor geschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pEGFP-C1 Vektors ligiert (Abbildung 6A und B). Die Sequenzierung des Konstrukts wies keine Leserasterverschiebung im Übergang von *egfp* zu *glt-1* sowie in der *glt-1*-Sequenz (Abbildung 6C) auf. Für die *in vitro* Transkription wurde die cDNA Sequenz von *glt-1* (5' XbaI und 3' BamHI) in das Plasmid pSP64-PA subkloniert. Im Fusionskonstrukt *egfp-glt-1* (Abbildung 7B) wurde die stromaufwärts der EGFP-Sequenz liegende AgeI-Restriktionsschnittstelle durch SalI ausgetauscht. Die aus dem pCR2.1 Vektor mit übertragene EcoRI-Restriktionsschnittstelle wurde deletiert und das gesamte Konstrukt nach Behandlung mit den Restriktionsenzymen SalI und BamHI in die jeweiligen Restriktionsschnittstellen des Plasmids pSP64-PA

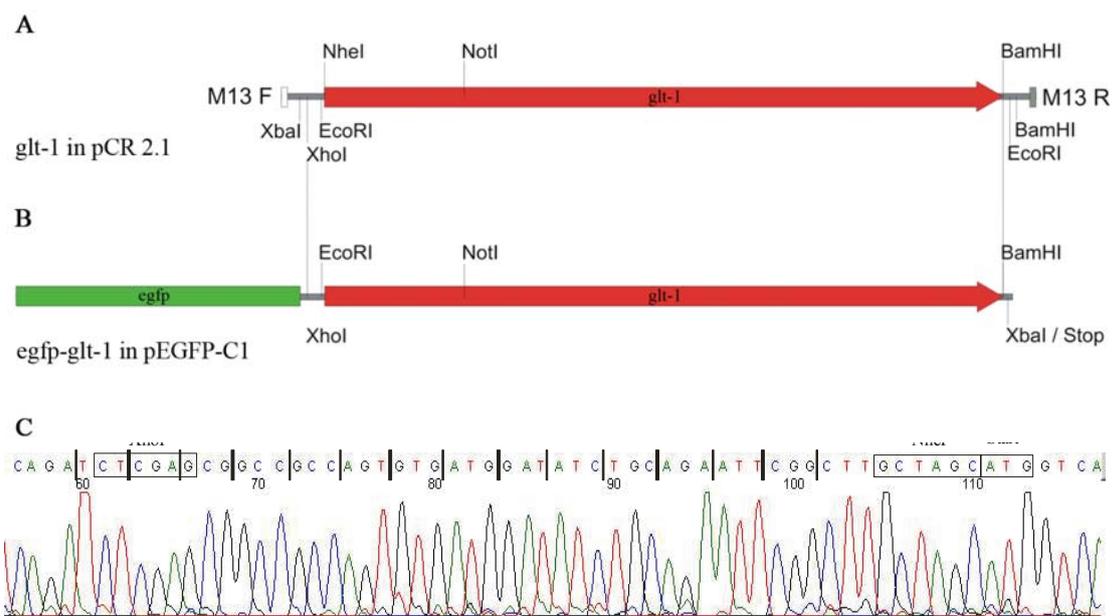


Abbildung 6: Konstrukterstellung *glt-1* und *egfp-glt-1*

(A) Klonierung des *glt-1* Konstrukts in den pCR2.1 Vektor nach PCR-Synthese aus Maushirn cDNA. (B) Klonierung des Fusionskonstrukts unter Kontrolle des CMV-Promoters im pEGFP-C1 Plasmid. Der Einbau der *glt-1* Sequenz (rot) erfolgte nach Schneiden des *glt-1* Konstrukts im pCR2.1 Vektor mit XhoI und BamHI und Ligation in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen im pEGFP-C1 Vektor. (C) Sequenzierung des *egfp-glt-1* Konstrukts. Die Restriktionsendonukleaseschnittstelle XhoI liegt im EGFP-C1 Vektor. NheI wurde durch PCR-Synthese von *glt-1* eingefügt. Die Leseraster-Markierung bezieht sich auf das Startcodon von EGFP, „Start“ markiert das Startcodon von GLT-1.

subkloniert. Das Konstrukt verfügt über eine Bindestelle für die SP6-RNA-Polymerase, eine Poly-Adenylierungssequenz stromabwärts der kodierenden Region und eine EcoRI Restriktionsschnittstelle zur Linearisierung. Dieses Konstrukt im Plasmid pSP64-PA wurde zur Erstellung eines analogen Transkriptionskonstrukts für *glt-1* verwendet. Dazu wurde es mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnitten und das Fragment nach Aufreinigung in die entsprechenden Schnittstellen im pSP73-Vektor ligiert (vgl. Abbildung 7).

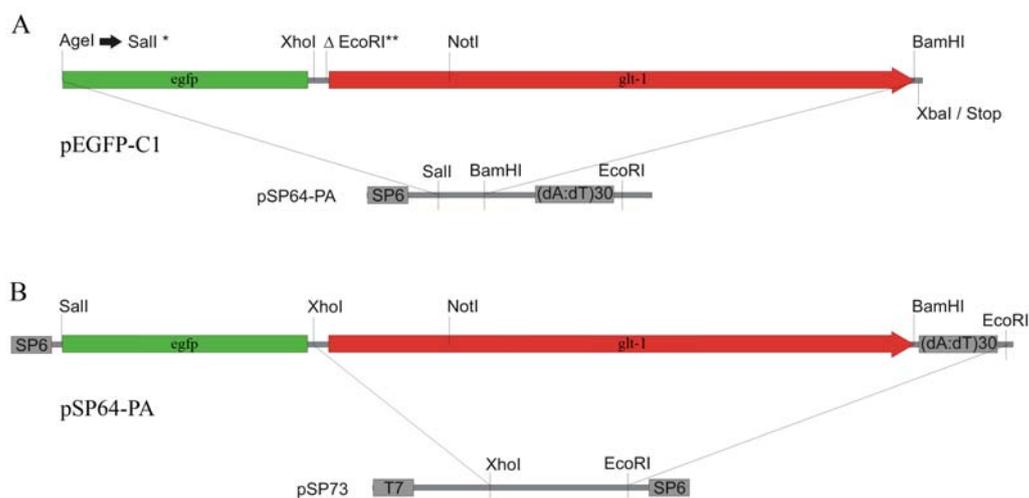


Abbildung 7: Erstellung der Transkriptionsvektoren.

Ausgehend von den Konstrukten aus Abbildung 6 wurden Konstrukte für die *in vitro* Synthese der RNA erstellt. **(A)** Austausch der Restriktionsschnittstelle AgeI mit Sall (Sall-Linker) und Eliminierung der Schnittstelle EcoRI. Anschließend erfolgte die Klonierung in den Transkriptionsvektor pSP64-PA über die Schnittstellen SallI und BamHI. Die Linearisierung erfolgte durch EcoRI an der Restriktionsschnittstelle von pSP64-PA stromabwärts der Poly(A)-Sequenz. **(B)** Modifiziertes Konstrukt aus A zur Erstellung eines *glt-1*-Transkriptionskonstrukts in pSP73. Die Subklonierung erfolgte unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen XhoI und EcoRI in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pSP73.

3.1.2 *In vitro* Transkription

Nach erfolgreicher Erstellung der Konstrukte wurde RNA für die Injektion der *Xenopus laevis* Oozyten durch *in vitro* Transkription gewonnen. Für die effiziente Expression in Oozyten sollte die *in vitro* synthetisierte RNA neben dem kodierenden Bereich am 5'-Ende eine Cap-Struktur ($m^7G(5')ppp(5')G$) und am 3'-Ende eine Poly(A)-Region enthalten. Für die Synthese der cRNA wurden die Konstrukte pSP73-GLT1-Poly-A und pSP64-EGFP-GLT1-Poly-A verwendet (vgl. 3.1.1).

Der pSP64-Vektor wurde in der Poly(A)-Sequenz liegenden EcoRI Restriktionsschnittstelle linearisiert. Die *in vitro* Transkription wurde mit der SP6-RNA-Polymerase in Gegenwart des *Capping*-Reagenzes $m^7G(5')ppp(5')G$ durchgeführt. Die *Capping*-Struktur am 5'-Ende erhöht die Stabilität der cRNA gegenüber Phosphatasen und Nukleasen und ist zudem Bindestelle für die 40S-Untereinheit eukaryotischer Ribosomen bei der Initiation der Translation. Anschließend wurde ein Aliquot gelelektrophoretisch analysiert. Die Transkripte hatten die erwarteten Größen von ungefähr 1,8 kb für *glt-1* und 2,6 kb für das Fusionskonstrukt von *egfp-glt-1* (Abbildung 8). Als Kontrolle wurde eine *in vitro* Transkription des *glast-1*-Konstrukts von Storck (Storck *et al.*, 1992), sowie ein *egfp-glast-1* und *eaac1* Fusionskonstrukt verwendet.

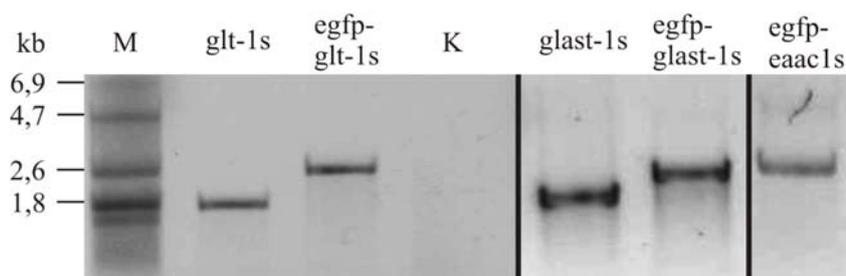


Abbildung 8: RNA-Gel nach *in vitro* RNA-Synthese

Die Signale zeigen für *glt-1* sense RNA mit 1,8 kb und für *egfp-glt-1* sense RNA mit 2,6 kb die erwarteten Größen. Als Negativkontrolle (K) wurde eine Synthese ohne Plasmid durchgeführt. Zusätzlich in Oozyten injizierte RNA von *glast-1*, *egfp-glast-1* und *eaac1* weisen ebenfalls eine Größe im erwarteten Bereich auf. Es wurde ein RNA-Größenstandard (M) aufgetragen.

3.1.3 Translation von GLT-1 und EGFP-GLT-1 und Charakterisierung der Expressionsprodukte

Die zuvor synthetisierte RNA wies einen hohen Reinheitsgrad und keine signifikanten Syntheseabbrüche oder Degradationsprodukte auf. Im nächsten Schritt wurden daher Oozyten für die Injektion der *in vitro* transkribierten RNA ausgewachsenen *Xenopus laevis* Weibchen unter Narkose entnommen. Das Bindegewebe und die Follikelzellen wurden mit Hilfe von Kollagenase entfernt und zur Injektion unversehrte Oozyten mit einem Durchmesser von 1 - 1,2 mm verwendet (Dumont-Stadien V-VI (Dumont, 1972)). Die Injektion erfolgte mit 20 - 50 nl (Mikroinjektor FemtoJet) cRNA je Oozyt in einer Konzentration von 0,2 - 0,5 mg/ml.

3.1.3.1 Nachweis der Expression injizierter cRNA

Die Expression von GLT-1 und EGFP-GLT-1 in injizierten Oozyten wurde durch Immunpräzipitation, Immunfärbung und bei den Fusionskonstrukten von EGFP-GLT-1 und EGFP-GLAST-1 durch konfokale Lasermikroskopie nachgewiesen. Radioaktive Expressionsstudien wurden nach Injektion der *glt-1* cRNA in Oozyten in L-[³⁵S]-Methionin-enthaltendem Medium durchgeführt. Nach 20 Stunden Inkubation wurden die Oozyten homogenisiert und der synthetisierte Transporter durch Immunpräzipitation mit GLT-1 Antikörpern isoliert. Die erhaltene Proteinlösung wurde auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. In der Autoradiographie wurde nur eine einzelne Bande von ungefähr 62 kDa für GLT-1 und etwa 90 kDa für EGFP-GLT-1 beobachtet. Die Molmassen der Reaktionsprodukte entsprechen dem *in vitro* Translationsprodukt und deuten auf ein nicht oder unvollständig glykosyliertes Transporterprotein hin, ähnlich der Expression von GLAST-1 in *Xenopus laevis* Oozyten (Storck, 1994). Mit Wasser injizierte Oozyten wiesen als Kontrolle kein radioaktiv markiertes Protein in der Immunpräzipitation auf. (Abbildung 9).



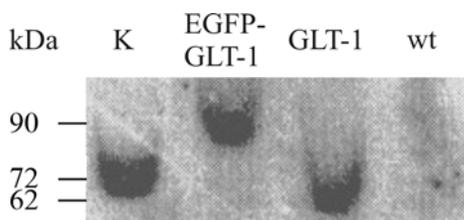
Abbildung 9: Autoradiographie der Immunpräzipitation

Nachweis der Proteine von *glt-1*, *egfp-glt-1* bzw. Wasser injizierten (*wt*) Oozyten. Bei *GLT-1* ist ein Signal in Höhe von 62 kDa und bei *EGFP-GLT-1* ist ein deutliches Signal in Höhe von etwa 90 kDa sichtbar. Mit Wasser injizierte Oozyten (*wt*) weisen erwartungsgemäß kein radioaktiv markiertes Protein auf.

In *Western-Blot* Analysen wurden vergleichbare Signale mit dem nicht fusionierten, einfachen *glt-1* Konstrukt erzielt. Dazu wurden Proteinextrakte aus injizierten Oozyten nach 20-stündiger Inkubation in *Barth modified saline* Medium (BS) gewonnen, über ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Western-Blot* Analyse mit *GLT-1*-Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 10).

Nach erfolgreicher Translation von *GLT-1* und *EGFP-GLT-1* in injizierten Oozyten, wurde die Lokalisation des Membranproteins bestimmt. Hierzu wurden jeweils fünf injizierte Oozyten nach 20-stündiger Inkubation in Tissue-Tektm eingefroren und weitere fünf Oozyten mit den Fusionsproteinen *EGFP-GLT-1* und *EGFP-GLAST-1* mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. Im Unterschied zur nicht konfokalen Fluoreszenzmikroskopie entfällt hier die Oozyten-typische

Abbildung 10: Western-Blot von extrahierten Oozyten-Proteinen



Nach Injektion mit *glt-1*, *egfp-glt-1* bzw. mit Wasser (*wt*) wurden Membranproteine gereinigt, über PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen *GLT-1* inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde *anti rabbit* Peroxidase verwendet. Als Kontrolle (K) diente ein Maushirnproteinextrakt, das für *GLT-1* ein erwartetes Signal von ungefähr 72 kDa aufweist. Wasser injizierte Oozyten zeigen erwartungsgemäß kein Signal (*wt*), während bei injizierten Oozyten Signale bei etwa 90 kDa (*EGFP-GLT-1*) bzw. 62 kDa (*GLT-1*) erkennbar sind.

Eigenfluoreszenz, die eine intensive Hintergrundfärbung bewirkt. Von den Tissue-Tek™ eingebetteten Oozyten wurden Kryoschnitte angefertigt und immunhistochemisch untersucht. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3 markierter *anti rabbit* IgG Antikörper verwendet, da im Cy3-Wellenlängen-Bereich (552 – 565 nm) die Eigenfluoreszenz geringer ausfiel als im EGFP-Wellenlängenbereich (488 – 507 nm). Beide Proteine, GLT-1 (Abbildung 11 A-C) und EGFP-GLT-1 (Abbildung 11 D-F) lokalisierten in der Membran.

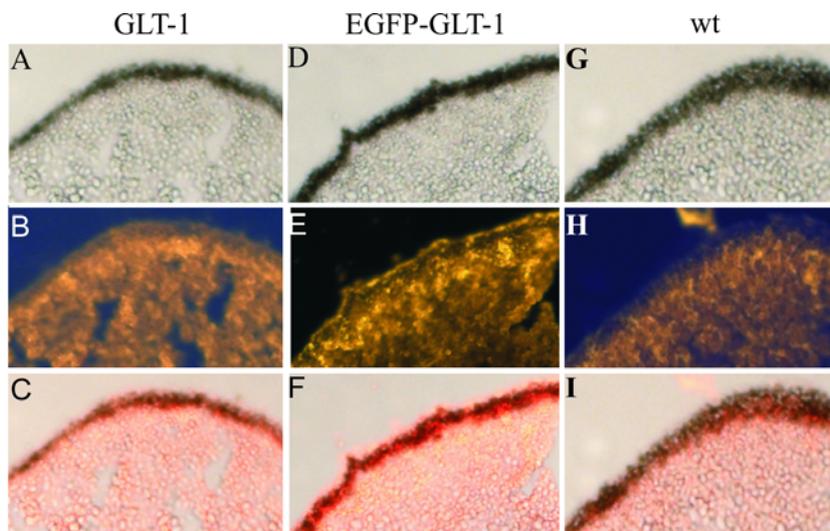


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von translatierenden Oozyten

Zu erkennen ist die Lokalisation der Transporter in der Membran und die Eigenfluoreszenz der Oozyten. (A-C) GLT-1, (D-F) EGFP-GLT-1 und (G-I) Wasser injizierter Oozyt. A, D und G zeigen jeweils Durchlichtaufnahmen bei 40x Vergrößerung, B, E und H Fluoreszenzaufnahmen (anti-GLT-1/Cy3) 40x und C, F und I Überlagerungen der jeweiligen Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen. Durch die Eigenfluoreszenz der Oozyten ist die Membranlokalisierung des Proteins nur bedingt zu erkennen.

Die Lokalisation der Transporter in der Membran konnte in konfokalen Lasermikroskopieaufnahmen (LSM) bestätigt werden. Auch hier zeigte sich die Eigenfluoreszenz von Wildtyp Oozyten (Abbildung 12A), jedoch unterschieden sich EGFP-GLAST-1 (Abbildung 12B) und EGFP-GLT-1 (Abbildung 12C) injizierte Oozyten signifikant von den mit Wasser injizierten Oozyten (Abbildung 12A). Die bei Oozyten typische asymmetrische Verteilung, resultierend aus der Injektionsstelle, war auch hier zu erkennen. Die für die Funktion des Transporters essentielle Voraussetzung, die Lokalisation in der Plasmamembran, ist somit gegeben.

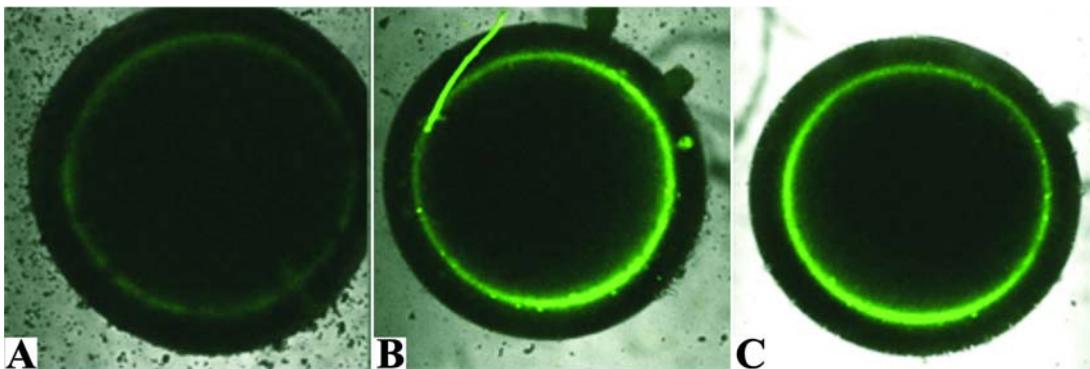


Abbildung 12: EGFP-fluoreszierende LSM Aufnahmen

(A) Wasser injizierter Oozyt (B) egfp-glast-1 injizierter Oozyt (C) egfp-glt-1 injizierter Oozyt. Deutlich ist die Lokalisation des Transportproteins in der Membran zu erkennen.

3.1.4 Funktioneller Nachweis der Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten

Beide Transporterproteine zeigten in dem Expressionssystem eine Lokalisation in der Membran. Der nächste Schritt bestand in der Überprüfung der Funktionalität der Transporterproteine. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob das am N-Terminus des GLT-1 und von GLAST-1 angefügte EGFP-Protein einen Einfluß auf die Transportfähigkeit von Glutamat ausübt. Zur Analyse wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Mit Aufnahmestudien von radioaktiv markierten L-[¹⁴C]-Glutamat wurde der Transport direkt nachgewiesen. Die genauere, elektrophysiologische Methode belegt den Nettoladungsfluß durch den GLT-1 und EGFP-GLT-1 vermittelten Transport. Die Nettoladungsverschiebung beruht auf dem Transport von Na⁺, und Glutamat mit einer negativen Ladung durch die beiden Carboxylgruppen (Brønsted Base) und der Aminogruppe (Brønsted Säure) in die Zelle bzw. K⁺ aus der Zelle hinaus.

3.1.4.1 Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[¹⁴C]-Glutamat

Zur Überprüfung und zum Vergleich der Funktion der beiden Transporterproteine wurden Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[¹⁴C]-Glutamat durchgeführt. Dazu wurden jeweils fünf Oozyten mit Wasser bzw. der RNA von *glt-1*, *egfp-glt-1* oder *glast-1* injiziert. 20 Stunden nach der Injektion der cRNA wurden die Oozyten in BS-Medium mit L-[¹⁴C]-Glutamat (100 µM L-Glutamat, spezifische Aktivität 246 mCi/mmol) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten gewaschen und die aufgenommene Radioaktivität in einem Flüssig-Szintillationszähler bestimmt. Anhand der gemessenen, aufgenommenen Radioaktivität konnten Rückschlüsse auf die Effizienz der Transporterfunktion bzw. Veränderungen des Transports durch die N-Terminale Kopplung von EGFP an GLT-1 gezogen werden. Hill-Koeffizienten wurden computergestützt nach

$$I = \frac{(I_{max}) * [Ligand]^h}{(K_M^h + [Ligand]^h)}$$

I_{max} : maximal gemessener Einwärtsstrom
 [Ligand]: Konzentration des untersuchten Liganden
 K_M : Michaelis-Menten-Konstante
 h: Hill-Koeffizient (Kooperativitätskoeffizient)

ermittelt.

Die Messungen zeigten, daß die Aufnahme bei allen drei Transportervarianten unter Sättigungsbedingungen ähnlich ausgeprägt ist (Abbildung 13). Der geringe Unterschied zwischen nicht und Wasser injizierten Oozyten zeigte, daß sich die Eihülle nahezu vollständig nach der Injektion wieder geschlossen hatte. Im nächsten Teilschritt wurden Aufnahmestudien bei verschiedenen Konzentrationen von Glutamat vergleichend bei GLT-1 und EGFP-GLT-1 exprimierenden Oozyten durchgeführt. Wie zuvor wurde dazu L-¹⁴C]-Glutamat verwendet. Der Transport

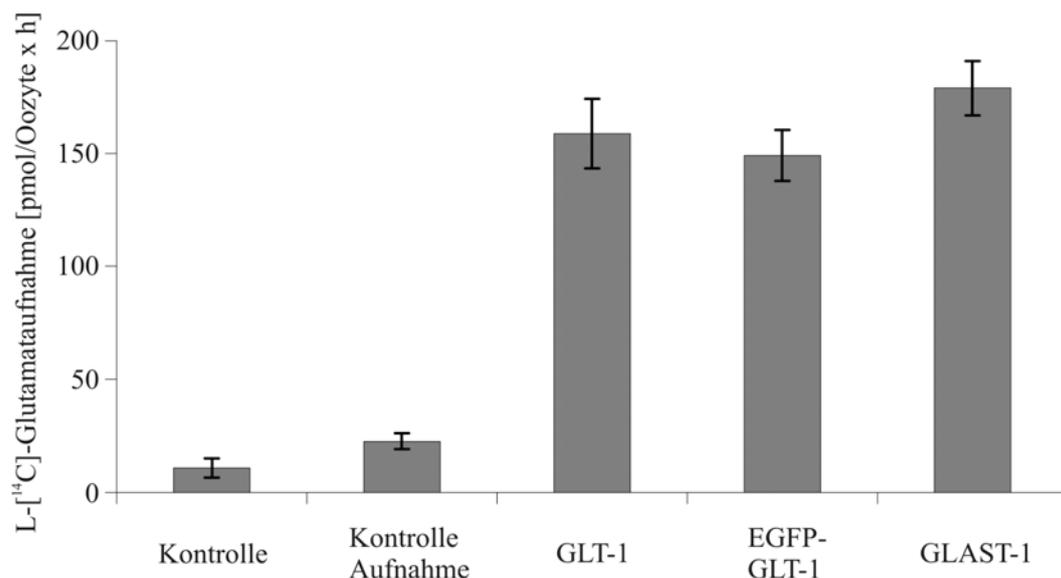


Abbildung 13: Glutamataufnahme injizierter Oozyten

Nicht injizierte Oozyten (Kontrolle) und mit Wasser injizierte Oozyten (Kontrolle Aufnahme) zeigen eine sehr geringe Aufnahme. Der Vergleich der drei Transporterproteine zeigt keinen signifikanten Unterschied bei der Transportfunktion. Die Aufnahme erfolgte für 15 Minuten. Gemessen wurde die aufgenommene Radioaktivität. Die Gesamtkonzentration von Glutamat betrug 100 µM. (n = 20)

zeigte dabei eine typische Sättigungskinetik auf (Abbildung 14A). Aus diesen Werten wurde die Maximalgeschwindigkeit (v_{\max}) sowie die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) $65 \mu\text{M}$ ($\pm 10 \mu\text{M}$) für GLT-1 und $67 \mu\text{M}$ ($\pm 9 \mu\text{M}$) für EGFP-GLT-1 bestimmt (Abbildung 14B). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Transportfähigkeit zwischen GLT-1 und dem Fusionsprodukt EGFP-GLT-1 festgestellt werden. Das Maß der Kooperativität zu Glutamat wurde mit 1,3 für beide Transporter ermittelt.

Es ist gewährleistet, daß zwischen den beiden Transporterproteinen keine Veränderung in Bezug auf die Kinetik der Glutamataufnahme besteht. Da GLT-1 zu den hochaffinen, Natrium-abhängigen Transportern gehört, wurde in einer weiteren Analyse die Ionenabhängigkeit der beiden Proteine untersucht. Hierzu wurde der Transport von L-Glutamat bei unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Abwesenheit von Na^+ -Ionen gemessen. Der Austausch von Na^+ -Ionen erfolgte gegen Cholinchlorid im Inkubationsmedium. Zu erkennen war eine Abnahme des Transports bei fallender Na^+ -Ionenkonzentration bis hin zum kompletten Ausfall des Transports. Dieser Effekt wurde für GLT-1 und EGFP-GLT-1 (Abbildung 15A) gleichermaßen beobachtet. Die K_M -Werte konnten aus den Messungen mit 71 mM ($\pm 11 \text{ mM}$) für GLT-1 und 63 mM ($\pm 23 \text{ mM}$) für EGFP-GLT-1 bestimmt werden (Abbildung 15B). Für beide Transporter wurde der Hill-Koeffizient von 2,9 für Na^+ ermittelt.

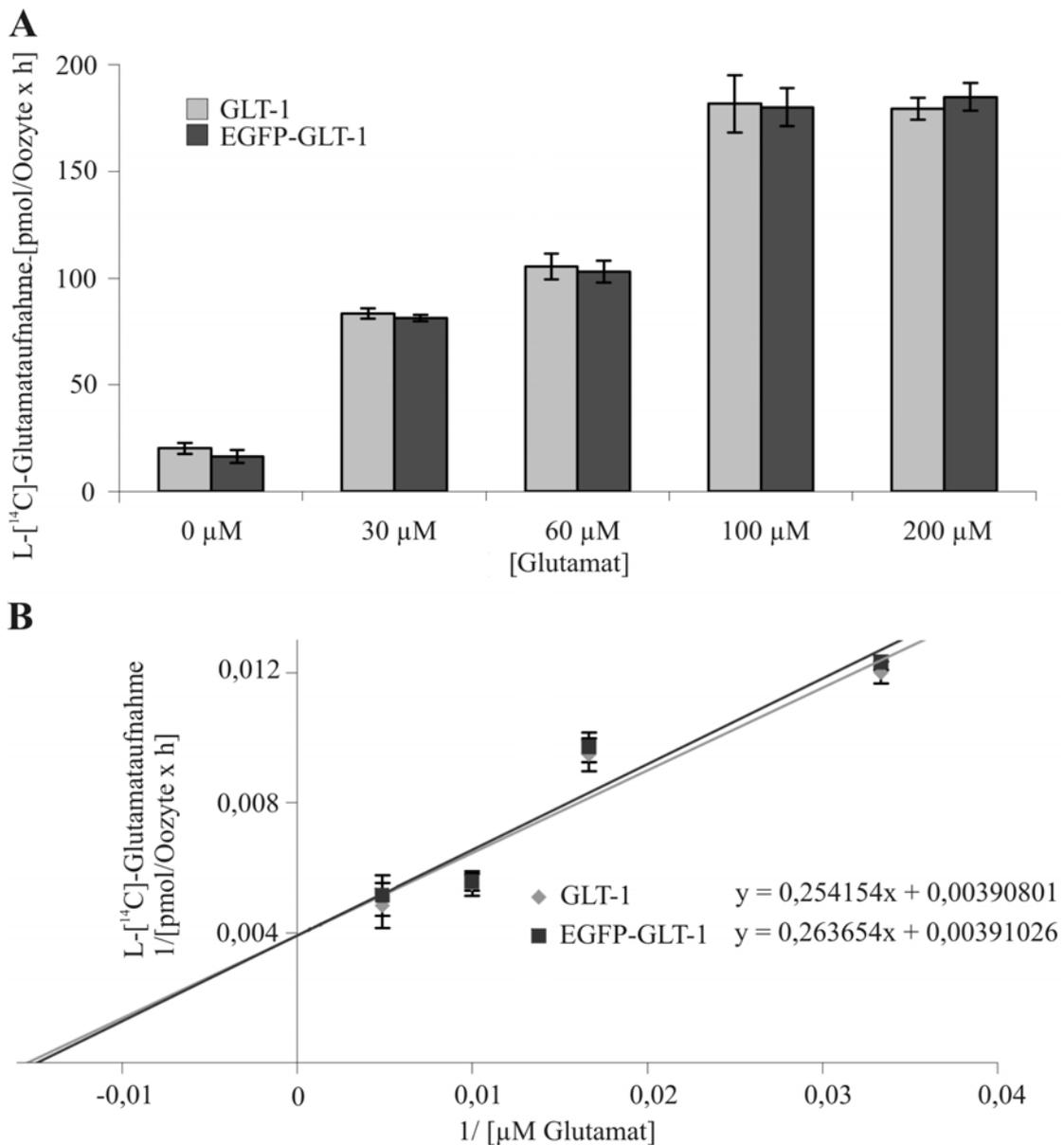


Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Glutamataufnahme durch GLT-1 bzw EGFP-GLT-1 exprimierenden Oozyten.

(A) Darstellung der Glutamataufnahme der gemessenen Aktivität nach einer Aufnahmezeit von 15 Minuten in variierenden Gesamtkonzentrationen bei gleichbleibender, spezifischer Aktivität der Lösung. Lösungen mit höheren Konzentrationen als 100 μM Glutamat zeigen keine erhöhte Aufnahme. In Abwesenheit des Substrats ist kein Transport nachzuweisen. (n = 20) (B) Lineweaver-Burk-Plot der Messungen zur Bestimmung der K_M -Werte. Aus dem Plot ergeben sich die Affinitätswerte der beiden Transporterproteine für Glutamat.

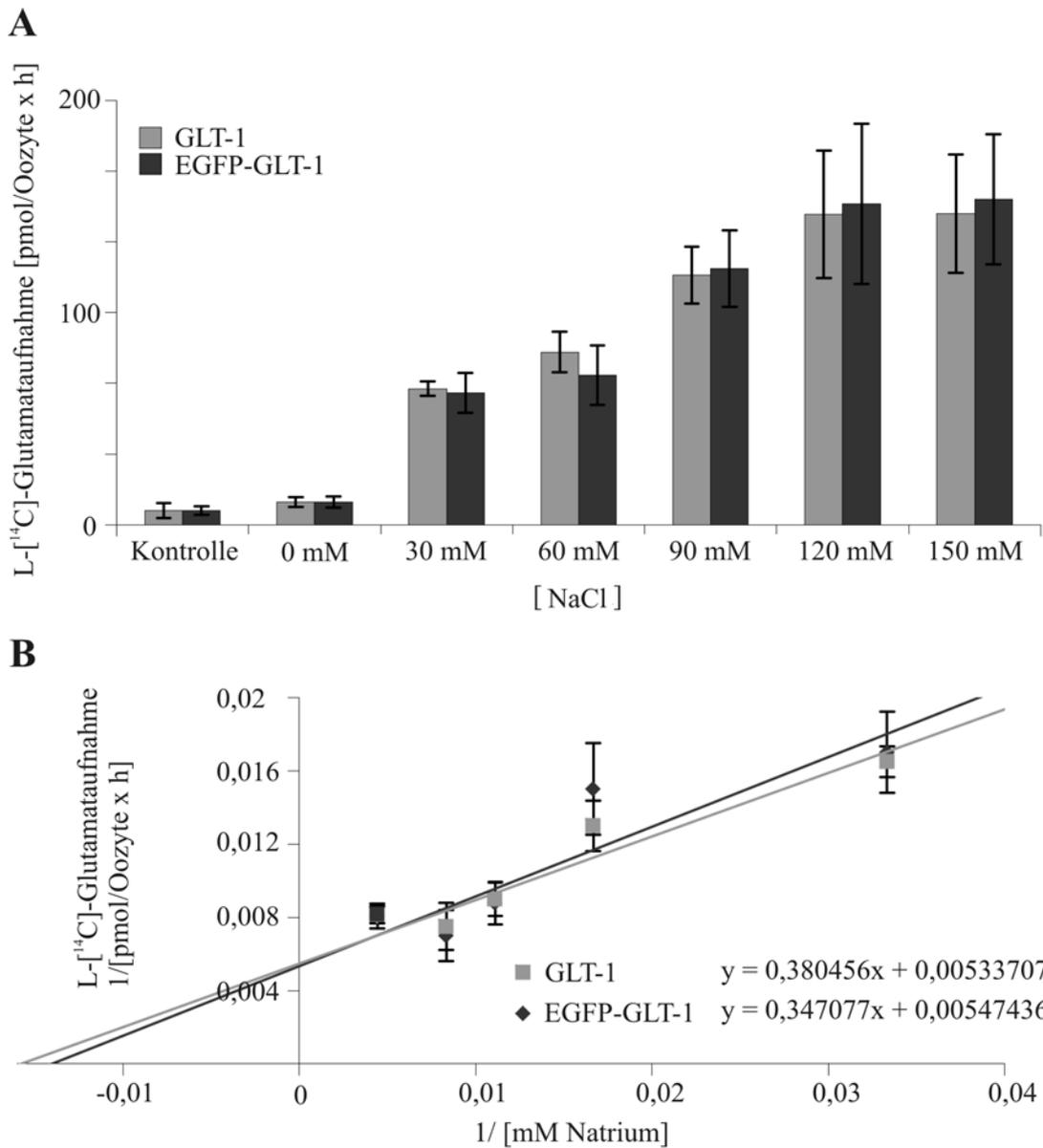


Abbildung 15: Glutamataufnahme bei variierenden Konzentrationen von Na^+ -Ionen

(A) Die Glutamataufnahme (15 Minuten) von *glt-1* und *egfp-glt-1* injizierten Oozyten wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen von Na^+ und $100 \mu\text{M}$ Glutamat ermittelt. Die Cl^- -Ionen Konzentration wurde durch entsprechende Zugabe von Cholinchlorid konstant gehalten. Zu erkennen ist eine Sättigung bei Konzentrationen höher als 120 mM Na^+ und ein vollständiger Ausfall des Transports in Abwesenheit von Na^+ . ($n = 10$) (B) Lineweaver-Burk-Plot der Messungen zur Bestimmung der K_M -Werte

3.1.4.2 Untersuchungen mit Hilfe der voltage-clamp Technik

Die Aufnahmestudien an *Xenopus laevis* Oozyten zeigten, daß durch die Kopplung von EGFP an GLT-1 die Funktion des Transports nicht beeinflusst wird. Zur genaueren Bestimmung der Aufnahme von Glutamat wurde auf das *voltage-clamp* System zurückgegriffen, da es die Bestimmung des Transports an einzelnen Oozyten ermöglicht und dadurch Abweichungen besser kompensiert werden.

Glutamat weist bei physiologischem pH-Wert eine negative Ladung auf. Der zelleinwärts gerichtete Transport von Glutamat erfolgt über einen Co- und/oder Gegentransport von Ionen. Der daraus resultierende Nettotransmembranstrom kann mittels *voltage-clamp* Technik in Oozyten gemessen werden. Intakte Oozyten weisen ein Membranpotential von 40 bis 60 mV auf. Für die Messungen wurde es auf -90 mV eingestellt. Der *voltage-clamp* Verstärker injizierte hierbei die Strommenge, die zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials benötigt wird. Durch Ionenfluß auftretende Veränderungen des Membranpotentials werden durch den Verstärker abgeglichen. Diese ausgleichenden Strominjektionen wurden gemessen und dienen

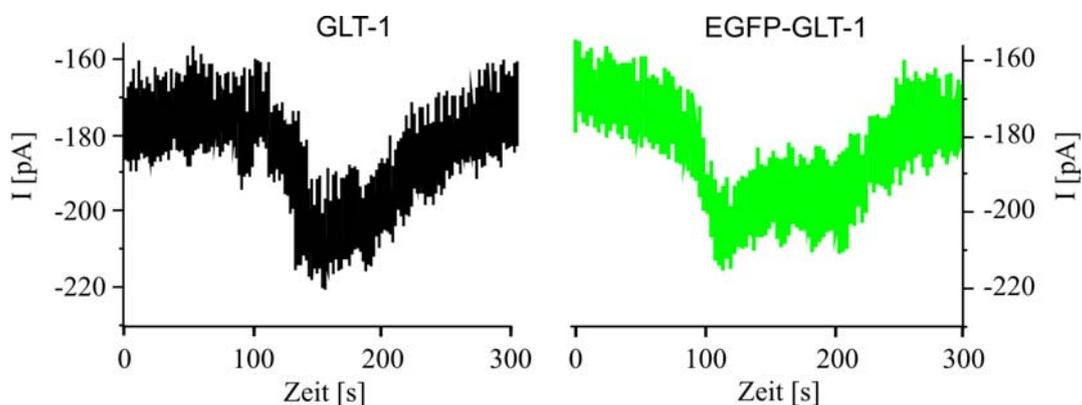


Abbildung 16: Voltage-clamp an GLT-1 und EGFP-GLT-1 exprimierenden Oozyten

Die Amplituden zeigen die Aufnahme von Glutamat. Nach Applikation von 100 μ M Glutamatlösung ist ein Abfall des Signals zu beobachten, der die Aufnahme der Nettoladung wiedergibt. Ein Umspülen mit Glutamat-freier Lösung hat einen erneuten Anstieg des Signals zur Folge. Sowohl die Amplitude von GLT-1 exprimierenden Oozyten als auch die von EGFP-GLT-1 exprimierenden Oozyten zeigen die gleiche Differenz und somit die gleiche Aufnahme.

der Quantifizierung des Transports. Die Messungen erfolgten in BS-Medium 20 - 30 Stunden nach der Injektion der cRNA (glt-1, glast-1, eaac1 und der jeweiligen Fusionstransporter) in die Oozyten. Applikation von 100 μM Glutamat in BS-Medium löste durch einströmende positive Ladungen (Co-Transport von Glutamat und Na^+ -Ionen) einen depolarisierenden Strom aus (Abfall der Kurve, Abbildung 16). Die Reduzierung der Glutamatkonzentration durch Auswaschen mit BS-Medium reduzierte den zur Potentialaufrechterhaltung benötigten Strom (Anstieg der Kurve, Abbildung 17).

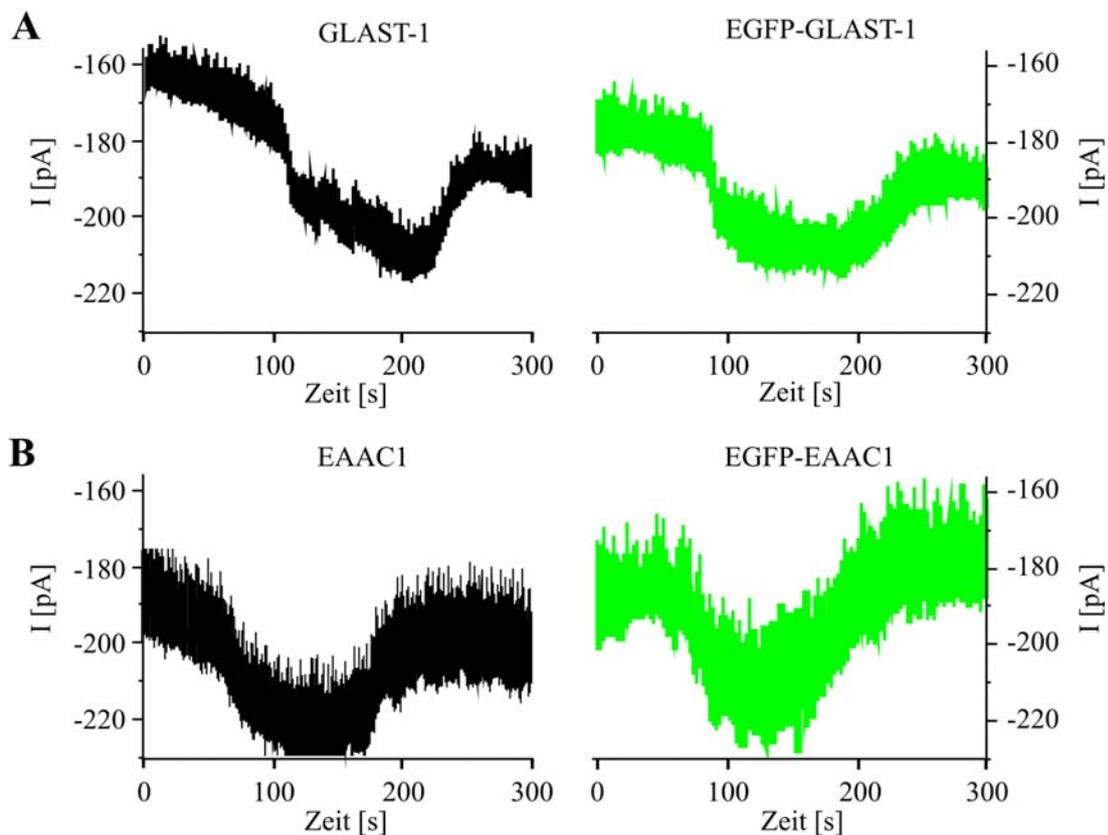


Abbildung 17: Voltage-clamp Messungen an injizierten *Xenopus laevis* Oozyten

Vergleichende Messungen von (A) GLAST-1 und EGFP-GLAST-1 exprimierenden Oozyten und (B) EAAC1 und EGFP-EAAC1 exprimierenden Oozyten. Der einwärtsfließende Strom unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Transportern und dem jeweiligen Fusionskonstrukt. Nach Umspülen mit Glutamat-haltiger Lösung (100 μM) fällt der benötigte Strom zur Potential-Aufrechterhaltung und steigt nach Umspülen mit Glutamat-freier Lösung wieder an.

der Kurve, Abbildung 16). Wasser- oder nicht injizierte Oozyten wiesen bei Applikation von Glutamat keine Änderung auf. Der gemessene Einwärtsstrom ($I_{\text{GLT-1}}$) wird folglich durch den vermittelten Transport von Glutamat hervorgerufen.

Vergleichende Messungen von drei Glutamattransportern EAAT1-3 (GLT-1 (Abbildung 16), GLAST-1 und EAAC1 (Abbildung 17)) und dem jeweiligen N-terminal des Transporters liegenden fusionierten EGFP zeigten, daß die Fusion mit dem Fluoreszenzprotein EGFP keine Auswirkung auf den Transport von Glutamat hat. Die gemessenen Amplituden variierten stark von einem Oozyt zum anderen und wiesen ein relativ großes Rauschen auf. Dies beruht zum Teil auf der variierenden Expression der Oozyten (Tate *et al.*, 1989). Zur quantitativen Analyse wurde daher auf ein stabil exprimierendes System zurückgegriffen (vgl. 3.2).

3.2 Etablierung einer stabilen Transporterexpression in HEK293 Zellen

Studien an Oozyten haben den Nachteil, daß eine Varianz bei der Injektion der cRNA nicht zu vermeiden ist und die Expression, zusätzlich zur Varianz im Entwicklungsstadium der Oozyten, variiert. Dieser Nachteil liegt bei einer den Transporter stabil exprimierenden Zell-Linie nicht vor. Daher wurden Zell-Linien etabliert, die die beiden Transporterproteine GLT-1 und EGFP-GLT-1 stabil exprimieren.

3.2.1 Erstellung von Konstrukten für die Transfektion von stabil exprimierenden HEK293 Zellen

Zur Erstellung der Konstrukte für die Transfektion von HEK293 Zellen wurde auf die vorliegenden Konstrukte der Oozyten Expression zurückgegriffen. Das Fusionskonstrukt mit EGFP im pEGFP-C1 Vektor konnte direkt verwendet werden, da es einen CMV-Promotor (Cytomegalovirus Promoter) besitzt. Für die Expression von GLT-1 unter der Kontrolle des CMV-Promoters wurde die cDNA aus dem pCR2.1 Vektor (Abbildung 6A) in den pcDNA3.1(+) Vektor umkloniert. Dazu wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pcDNA3.1(+) ligiert. Beide Vektoren tragen als Selektionsmarker das Neomycinresistenzgen, das für die bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase kodiert. Das Substrat des Enzyms, ein Struktur analogon von Neomycin (G418), wurde zur Selektion der Zellen dem Kulturmedium zugefügt.

Etablierte, selektionierte Zellklone wurden dauerhaft unter Selektionsbedingungen gehalten. Für die Elektroporation der HEK293 Zellen wurden die Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen PvuI (pcDNA3.1-GLT1) bzw. DraIII (pEGFP-C1-GLT1) linearisiert.

3.2.2 Nachweis der Expression transfizierter HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden mit linearisiertem Vektor elektroporiert, etwa 14 Tage unter Selektionsbedingungen gehalten und anschließend einzelne Klone isoliert. Die RNA der isolierten Klone wurde nach der TRIZOL™ Methode gewonnen und mit quantitativer RT-PCR auf die Transkription der gewünschten Proteine analysiert. Verwendet wurden dazu Primer in Exon I in *sense* (GLT I s) und Exon IV in *antisense* (GLT IV as) Orientierung. Zur Normalisierung und Vergleich der Transkriptionsraten wurde das ubiquitäre Transkript der Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) auf RNA Ebene mit entsprechenden Primern (m-HGPRT s und m-HGPRT as) amplifiziert. Da HGPRT gleichmäßig exprimiert wird, diente es als innerer Standard. Desweiteren konnte die Transkription von *glt-1* und *egfp-glt-1* auf die Transkriptionsprodukte von *hgprt* bezogen und in der Folge miteinander verglichen werden.

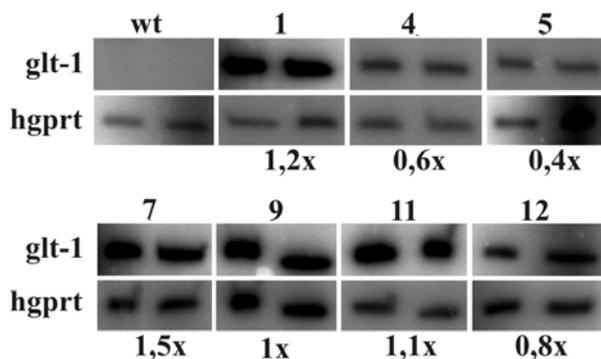


Abbildung 18: Quantitative RT-PCR von GLT-1 HEK293 Klonen

Der Wildtyp von HEK293 Zellen zeigt keine Transkription von *glt-1*. Die *glt-1* transfizierten Klone (1, 4, 5, 7, 9, 11 und 12) zeigen unterschiedliche Transkriptionsraten. Die Quantifizierung erfolgte mittels Image Quant. Die Raten wurden ins Verhältnis mit der jeweiligen Transkription des Zellstandards *hgprt* gesetzt und sind als Faktoren dargestellt. Es wurden Doppelkontrollen durchgeführt. Das Signal für *glt-1* liegt bei ca. 400 bp und für *hgprt* bei ca. 300 bp.

Die analysierten Klone transkribierten *glt-1* bzw. *egfp-glt-1* unterschiedlich stark. Obwohl GLT-1 Klon 1 (Abbildung 18) und EGFP-GLT-1 Klon E3 (Abbildung 19) nicht die stärkste Expression aufwiesen, wurden sie zur weiteren Analyse verwendet, da stärker exprimierende Klone morphologische, unter dem Mikroskop sichtbare

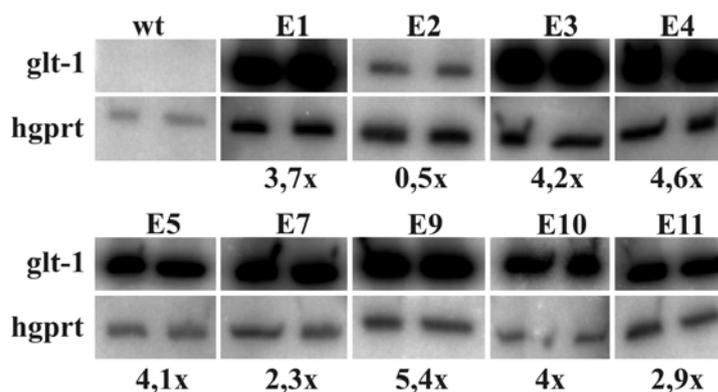


Abbildung 19: Quantitative RT-PCR von stabil exprimierenden EGFP-GLT-1 HEK293 Zellklonen.

Die RT-PCR wurde mit *glt-1* spezifischen Primern durchgeführt. Im Wildtyp von HEK293 ist keine Transkription von *egfp-glt-1* zu erkennen. Die *egfp-glt-1* transfizierten Klone (E1 - E5, E7 und E9 - E11) zeigen unterschiedliche Transkriptionsraten. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe von Image Quant. Die Raten wurden ins Verhältnis mit der jeweiligen Transkription des Zellstandards *hprt* gesetzt und sind als Faktoren dargestellt. Es wurden Doppelkontrollen durchgeführt. Das Signal für *glt-1* liegt bei ca. 400 bp und für *hprt* bei ca. 300 bp

Veränderungen aufwiesen. Zusätzlich wurden die EGFP-GLT-1 Zellklone auf den Einbau des vollständigen Fusionskonstrukts in das Genom der HEK293 Zellen überprüft. Hierzu wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die in *sense* Orientierung am Ende der *egfp*-Sequenz (EGFP 3' *sense*) bzw. in *antisense* Orientierung innerhalb der *glt-1* Sequenz (GLT IV *as*) lagen. Alle untersuchten Klone wiesen den Einbau des vollständigen Fusionskonstrukts auf (Abbildung 20)

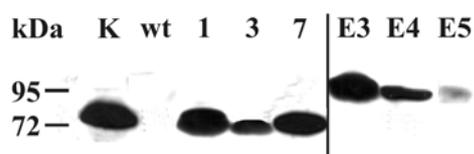


Abbildung 20: PCR-Nachweis von egfp-glt-1

Nachweis der heterologen Rekombination von glt-1 und egfp-glt-1 Sequenz in das Genom von HEK293 Zellklonen (E1 - E5, E7 und E9 - E11) durch PCR mit egfp und glt-1 Primern. Zur Kontrolle (k) wurde ein glt-1 transfizierter HEK293 Zellklon verwendet. Als Positivkontrolle wurde in allen Zellklonen analog zur quantitativen RT-PCR ein glt-1 Fragment (ca 450 bp) amplifiziert. Signale für egfp-glt-1 sind bei etwa 1,3 kb in allen transfizierten HEK293 Zellklonen erkennbar.

Auf den Nachweis der Transkription folgte die Translation der Konstrukte. Hierzu wurden die Membrantransporterproteine extrahiert und nach elektrophoretischer Trennung durch *Western-Blot* Analyse immunologisch analysiert. Die Translation erfolgte in den Zellen in Relation zu den quantitativen RT-PCR Analysen (Abbildung 18 für GLT-1 und Abbildung 19 für EGFP-GLT-1). Als Positivkontrolle diente ein Hirnproteinextrakt neun Wochen alter Wildtyp-Mäuse (CD1-Mäuse).

Abbildung 21: Western-Blot von Membranproteinextrakten mit GLT-1 Antikörpern



Nachweis der Expression auf Proteinextraktebene. Nach Auftrennung mittels PAGE und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte der Nachweis mit GLT-1 Antikörpern. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase gekoppelter Antikörper. Kontrolle (K) ist ein Proteinextrakt aus Maushirn. Als Negativkontrolle (wt) wurden Wildtyp HEK293 Zellen verwendet. GLT-1 exprimierende HEK293 Zellklone 1, 3, 7 und 10 sind mit einem Signal entsprechend der Molmasse von 72 kDa erkennbar. EGFP-GLT-1 (E3-E5) exprimierende Klone zeigen die erwartete Molmasse von etwa 95 kDa.

GLT-1 HEK293 Zellklone zeigten in der *Western-Blot* Analyse das Signal für GLT-1, das der Molmasse der Wildtyp Kontrolle entspricht (72 kDa). Bei den das Fusionsprotein exprimierenden Zellen lag das Signal entsprechend der Molmasse des EGFP-Protein Fragments um etwa 30 kDa höher als beim Wildtyp von GLT-1. (Abbildung 21)

Neben der biochemischen Analyse wurden die EGFP-GLT-1 transfizierten Zellen auf die Lokalisation des Proteins fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Deutlich zu erkennen ist, daß EGFP-GLT-1 unter dem Fluoreszenzmikroskop membranständig erscheint (Abbildung 22B). Somit erwies sich dieser Zellklon als geeignet für eine funktionelle Analyse.

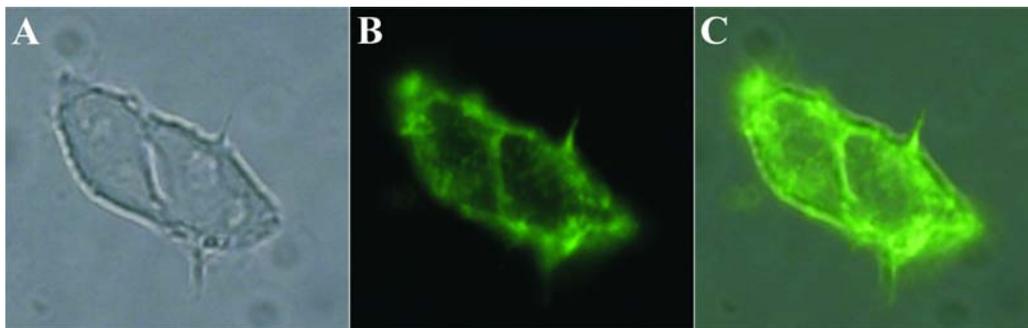


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopie von transfizierten HEK293 Zellklonen

Aufnahme von zwei egfp-glt-1 transfizierten HEK293 Zellen. Deutlich ist das in der Membran lokalisierte Protein zu erkennen (A) Durchlicht, (B) EGFP-Fluoreszenz, (C) Überlagerung von A und B.

3.2.3 Funktioneller Nachweis der Proteine in HEK293 Zellen

Die exprimierten Transporterproteine sind in der Membran als integrale Membranproteine lokalisiert. Analog zur Oozyten Analyse wurde die Funktion der Proteine in den heterolog exprimierenden HEK293 Zellen nachgewiesen. Wie bereits an Oozytenversuchen gezeigt, verändert die Fusion mit EGFP nicht die Funktion von GLT-1. Für genauere Aussagen sollten vergleichbare Untersuchungen an stabil den

Transporter exprimierenden HEK293 Zellen durchgeführt werden. Für Aufnahmestudien wurde ECS Medium (*extracellular solution*) mit radioaktiv markiertem L-[¹⁴C]-Glutamat verwendet. Die Aufnahme erfolgte für 15 Minuten in ECS Medium. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in einem Flüssig-Szintillationszähler die aufgenommene Radioaktivität bestimmt. Die Kooperativitäts-Koeffizienten wurden analog zu 3,1,4,1 ermittelt.

3.2.3.1 Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[¹⁴C]-Glutamat

Der Transport von Glutamat wurde in Abhängigkeit von den Konzentrationen von Glutamat, Na⁺- und Ca²⁺-Ionen untersucht. Aus der Aufnahme des L-[¹⁴C]-Glutamats wurde mittels Sättigungskinetik das Optimum im Bereich von 100 µM Glutamat ermittelt (Abbildung 23A). Aus dem Lineweaver-Burk-Plot ergaben sich K_M-Werte von 57 µM (± 15 µM) für GLT-1 und 55 µM (± 13 µM) für EGFP-GLT-1 (Abbildung 23B). Somit lagen auch bei den vergleichenden Messungen der beiden Transporter in HEK293 Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Affinität zu Glutamat vor. Dies galt auch für das Maß der Kooperativität für Glutamat mit 1,1 in beiden Fällen.

Aufnahmestudien bei Konzentrationen von Glutamat zwischen 100 µM bis 1 mM Glutamat zeigten weiterhin keine Veränderung bei der Aufnahme. 1 mM Glutamat bewirkte einen deutlichen Rückgang, der auf die zytotoxische Wirkung des Glutamats zurückzuführen sein könnte. (Abbildung 23)

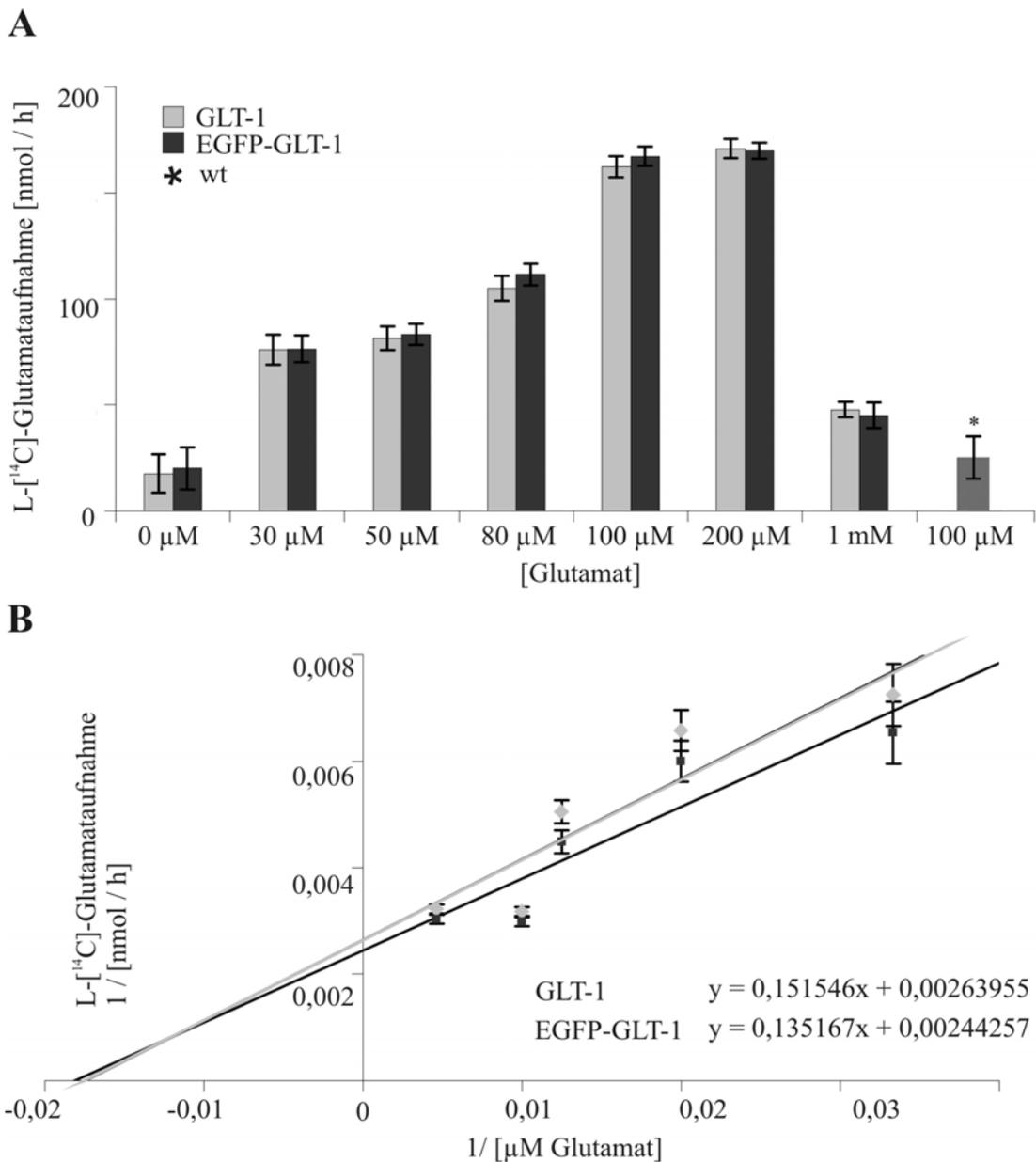


Abbildung 23: Aufnahme von Glutamat in HEK293 Zellen

Glutamataufnahme während 15 Minuten Inkubation in Glutamat-haltiger Lösung mit angegebener Gesamtkonzentration bei gleicher spezifischer Aktivität. Es zeigt sich eine Abhängigkeit des Transports von der Glutamatkonzentration mit einer Sättigung bei 100 μ M. (A) Aufnahme von L-[¹⁴C]-Glutamat. Die gemessene Aktivität wurde nach Proteinbestimmung auf nmol/h umgerechnet. Als Kontrolle (*) dienen Wildtyp HEK293 Zellen in 100 μ M Glutamatlösung. (B) Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung der Affinitätskonstante K_M

3.2.3.2 Natrium-Abhängigkeit des Transports

Wie in den Oozyten sollte die Natriumabhängigkeit des Glutamattransports auch in HEK293 Zellen, die GLT-1 und EGFP-GLT-1 exprimierten, untersucht werden. Für EGFP-GLT-1 konnte eine unveränderte Natriumabhängigkeit des Transports, verglichen mit GLT-1, beobachtet werden. Die Sättigung für Na⁺-Ionen war bei 120 mM Natrium erreicht. In Natrium-freier Lösung war der Transport von L-Glutamat vollständig auf das Niveau von Wildtyp Zellen reduziert. Die Konzentration an Cl⁻-Ionen wurde durch entsprechende Zugabe von Cholinchlorid konstant gehalten. (Abbildung 24A) Aus dem Lineweaver-Burk-Plot ergibt sich für Na⁺ ein K_M von 71 mM (± 5 mM) für GLT-1 und 72 mM (± 7 mM) für EGFP-GLT-1 sowie nach computerunterstützter Kurvenanpassung ein Hill-Koeffizient von jeweils 3,4.

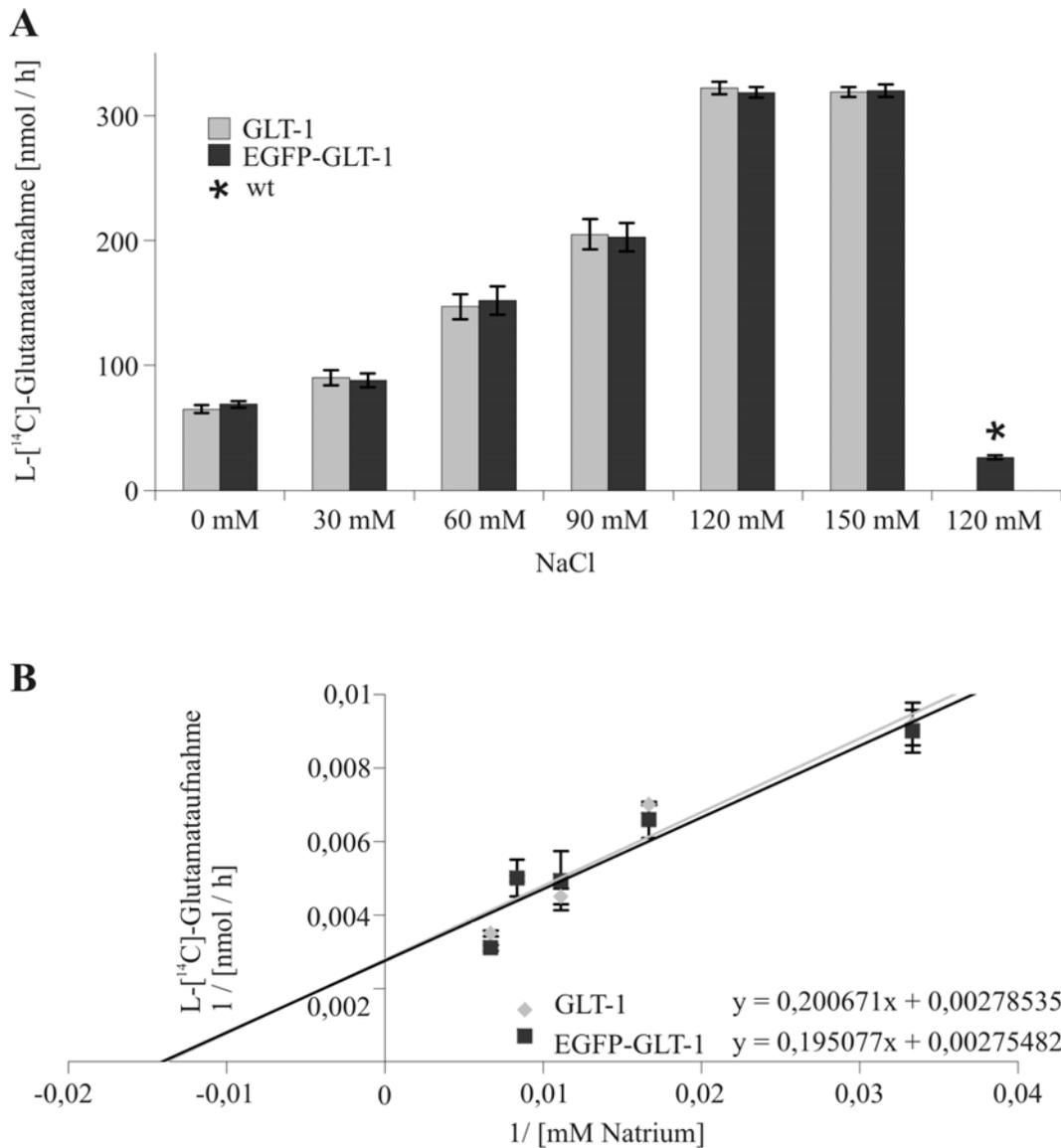


Abbildung 24: Glutamataufnahme in Abhängigkeit von der Natrium-Konzentration

(A) Eine steigende Konzentration an Na^+ erhöht den Transport von Glutamat. In Abwesenheit von Na^+ ist keine Aufnahme zu erkennen. Als Kontrolle dienten nicht transfizierten HEK293 Zellen. Die Meßwerte sind auf den maximalen Transport bei 120 mM Natrium normiert dargestellt. Höhere Konzentrationen weisen keinen erhöhten Transport auf. (B) Lineweaver-Burk-Plot

3.2.3.3 Einfluß der Ca^{2+} -Konzentration auf den Transport

Intrazelluläres Ca^{2+} zeigte einen Einfluß auf den Transport. Für extrazelluläres Ca^{2+} war bislang nur ein indirekter Effekt über Docosahexaensäure bekannt. Hier sollte nun ein möglicher direkter Einfluß von extrazellulärem Ca^{2+} auf den Transport untersucht werden. Im physiologischen Bereich, zwischen 1 mM und 2 mM extrazellulärem Ca^{2+} , konnten nur geringe Unterschiede in der Aufnahmefähigkeit von Glutamat beobachtet werden (bei 1 mM Ca^{2+} ein Transport von 87 % (± 9 %)). Die Meßergebnisse wurden auf die Werte bei 2 mM Ca^{2+} normiert. Wird der Ca^{2+} -Gehalt auf 0,5 mM reduziert, verringert sich der Transport von L-Glutamat auf 54 % (± 8 %). In Abwesenheit von Ca^{2+} wurde der Transport weiter auf 39 % (± 5 %) reduziert. Die Abweichungen in den Meßergebnissen, bei dem auf 100 % gesetzten Transport von L-Glutamat in 2 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung, betragen ± 9 % (Abbildung 25).

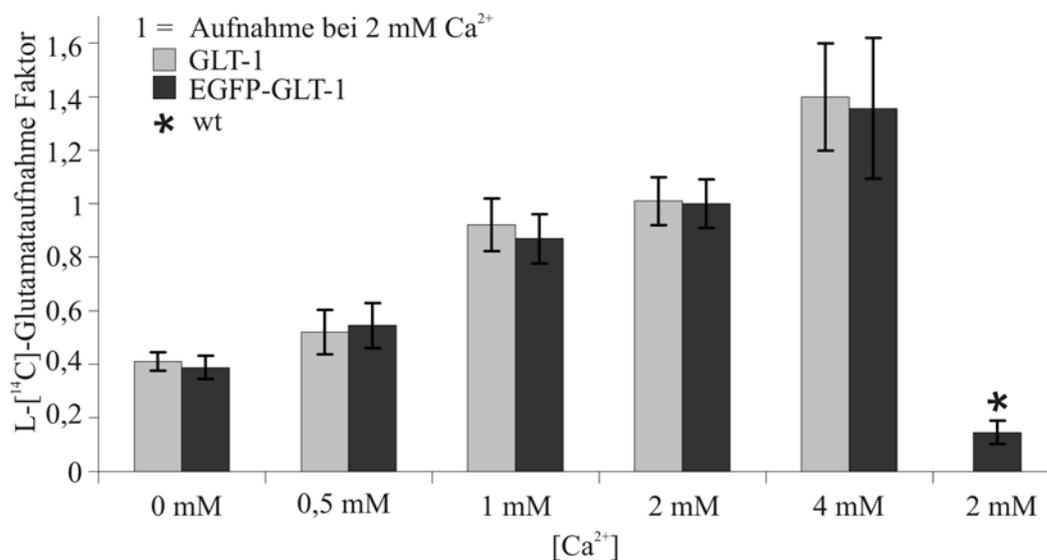


Abbildung 25: Calcium-Einfluß auf die Aufnahme von Glutamat

Steigende Ca^{2+} -Konzentrationen führen zu einem Anstieg der Glutamataufnahme. Auch in Abwesenheit von Ca^{2+} wurde Glutamat weiterhin transportiert. Die gemessenen Werte wurden normiert auf die Aufnahme von Glutamat in 2 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung. Als Kontrolle dienten Wildtyp HEK293 Zellen. Die Aufnahmen wurden in Anwesenheit von 100 μM Glutamat bestimmt.

3.2.3.4 Inhibitoren des GLT-1 vermittelten Glutamattransports

Bisherige Erkenntnisse über Liganden-Eigenschaften, die für einen Transport notwendig sind, sollten erweitert werden. Hierzu wurden verschiedene Substanzen mit homologer Struktur zu Glutamat auf Ihre Auswirkungen auf den GLT-1 bzw. EGFP-GLT-1 vermittelten Transport untersucht. Beide Konstrukte zeigten keinen Unterschied im Transport von L-Glutamat. Als Negativkontrolle diente der spezifische GLT-1-Blocker Dihydrokainat (DHK) (Arriza *et al.*, 1994). Für die Positivkontrolle wurde 100 μM Glutamatlösung verwendet, auf die die ermittelten Meßwerte normiert wurden. Dihydrokainat blockierte den Transport von L-Glutamat fast vollständig. Die aus früheren Studien an GLAST-1 bekannte Glutamattransporter blockierende Substanz DL-threo-3-Hydroxyaspartat (THA, (Storck, 1994)) reduzierte den Transport auf 43 % (± 8 %).

Die α -Aminoform von L-Aminoadipat (LAA) verringerte den Transport auf 75 % (± 7 %), während L-Aminoadipat mit der Aminogruppe in β -Position (LBA) keine Veränderung hervorrief (95 ± 5 %). In Anwesenheit von L-Aspartat konnte nur noch ein L-Glutamat Transport von 55 % (± 10 %) beobachtet werden. (Abbildung 26)

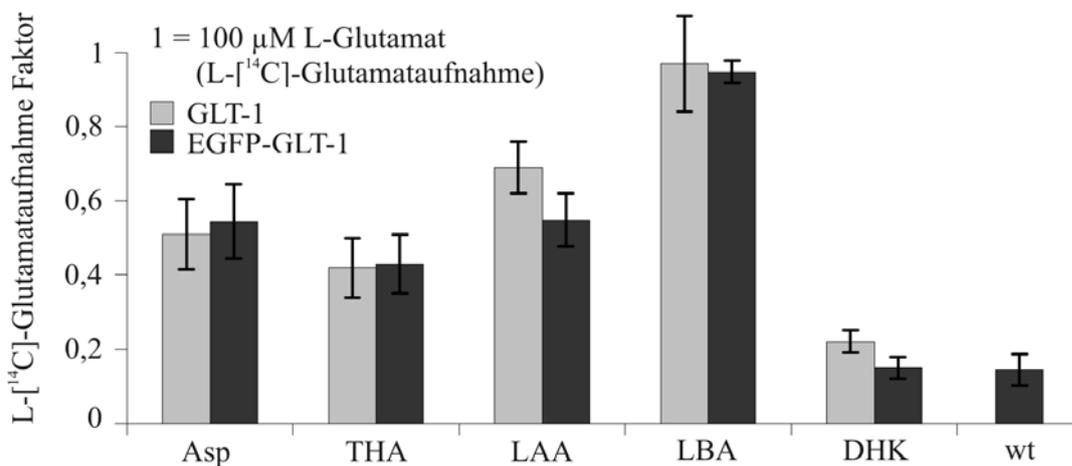


Abbildung 26: Transport von radioaktiv markiertem Glutamat in Anwesenheit von strukturhomologen Substanzen

Normiert wurde der Transport auf 100 μM Glutamat-haltige Lösung. Die DHK-Konzentration lag bei 10 μM , die aller anderen Substanzen bei 100 μM in Gegenwart von 100 μM Glutamat. Dihydrokainat (DHK) reduziert die Aufnahme auf das Niveau von Zellen, die in Abwesenheit von Glutamat inkubiert wurden. L-Aspartat (Asp), DL-threo-3-Hydroxyaspartat (THA) und L- α -Aminoadipat (LAA) reduzieren den Transport von Glutamat auf etwa die Hälfte. L- β -Aminoadipat (LBA) zeigt keine Auswirkungen auf den Transport. In nicht transfizierten Kontrollzellen (wt) findet kein Transport statt.

3.2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen an HEK293 Zellen

Die Methode der Wahl zur Analyse des Transporters stellt die *patch-clamp* Technik dar. Die Zellen sollten vereinzelt vorliegen, um Auswirkungen von *gap junctions* auszuschließen. Dies bedeutet zugleich ein nahezu vollständiges Umspülen der Zelle mit der extrazellulären Lösung. Vorteile der *whole-cell patch-clamp* Methode sind keine „Leckströme“, die durch das Einstechen der Elektrode bei der intrazellulären Ableitung in der *voltage-clamp* Methode entstehen und ein geringeres Rauschen durch den hohen Abdichtwiderstand. Die Kooperativitäts-Koeffizienten wurden analog zu 3.1.4.1 ermittelt. Je nach Meßbedingungen in *patch-clamp* Experimenten wurden meist Ströme von 5-20 pA erzielt (Markus Numberger, 1996).

Eine mit intrazellulärer Lösung beladene Kapillare (R_{Pipette} 6-8 MOhm) wird an die Zelle geführt. Ein leichter Überdruck sorgt für einen schwachen Ausstrom intrazellulärer Lösung aus der Kapillare. An der Zelloberfläche wird der Überdruck in einen kurzen anhaltenden Unterdruck gewandelt und die Zellmembran an die Kapillarenöffnung gesogen bis sich ein *seal* im Gigaohm-Bereich ausgebildet hat. Diese *cell-attached* Konfiguration (Abbildung 27) erlaubt die *inside-out*, *outside-out* und *whole-cell patch-clamp*. Für die hier verwendete *whole-cell* Methode wird ein kurzzeitiger, frequenzartig wiederholender Unterdruck angelegt, der den Membranbereich an der Kapillarenöffnung durchbricht und für den Zugang der Zelle sorgt. Die Messungen der Zellen kann nur erfolgen, wenn der Zugang stabil ist, die Kapazitätswerte der Zelle zwischen 5 und 20 pF liegen, bzw. der Serienwiderstand kleiner als 20 MOhm beträgt. Um einen Einfluß möglicher spannungsgesteuerter



Abbildung 27: Aufnahme eines *whole-cell* Patch einer HEK293 Zelle.

Darstellung einer Zelle im *cell-attached* Modus vor dem Durchbrechen der Membran für die Ableitung

Ionenkanäle auszuschließen, wurde das Membranpotential nach Ausbildung des Zugangs schrittweise auf -70 mV gebracht und gehalten. Im Gegensatz zu früheren Studien an GLAST-1 exprimierenden Zellen erwies sich dieses Membranpotential gegenüber einem von -90 mV für das Überleben der Zellen als vorteilhaft.

Für die statistischen Auswertungen der Messungen wurde generell die Differenz zwischen der Amplitude während der Applikation der zu untersuchenden Substanz mit der durchschnittlichen Amplitude vor und nach der Applikation gebildet. Dies erwies sich als notwendig, da im Verlauf der Messungen ein generelles Absinken der Amplitude zu beobachten war. Eine vergleichende Analyse der Glutamatkonzentrationsabhängigkeit zwischen GLT-1 und EGFP-GLT-1 exprimierenden Zellen zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Proteinen auf (Abbildung 28), wie zuvor die Untersuchungen an Oozyten und die Aufnahmestudien schon angedeutet hatten. Das größte Signal zeigte sich bei Applikation von 100 μM Glutamat und lag bei 20 pA, wenn die Ca^{2+} -Konzentration des ECS-Mediums 1 mM betrug (vgl. 3.2.3.3). Eine Erhöhung auf 2 mM Ca^{2+} zur Stabilisierung der Messungen veränderte das

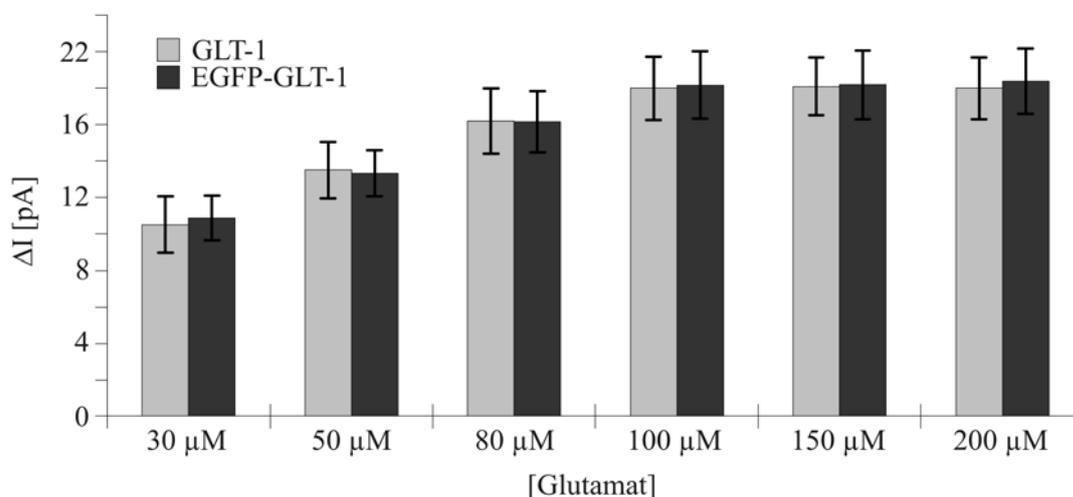


Abbildung 28: Patch-clamp Ableitung der Glutamatabhängigkeit

Darstellung der Differenz der Amplitude zum Nullwert der Messung (ECS-Medium ohne Glutamat) zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials von -70 mV zwischen Glutamat-haltiger und Glutamat-freier Lösung bei GLT-1 (Klon 1) und EGFP-GLT-1 (Klon 3) exprimierenden Zellen. *glt-1* transfizierten Zelle $n = 5$, *egfp-glt-1* transfizierte Zellen $n = 14$ (100 μM Glutamat), $n = 10$ (80 und 50 μM Glutamat) und $n = 8$ (30 μM Glutamat).

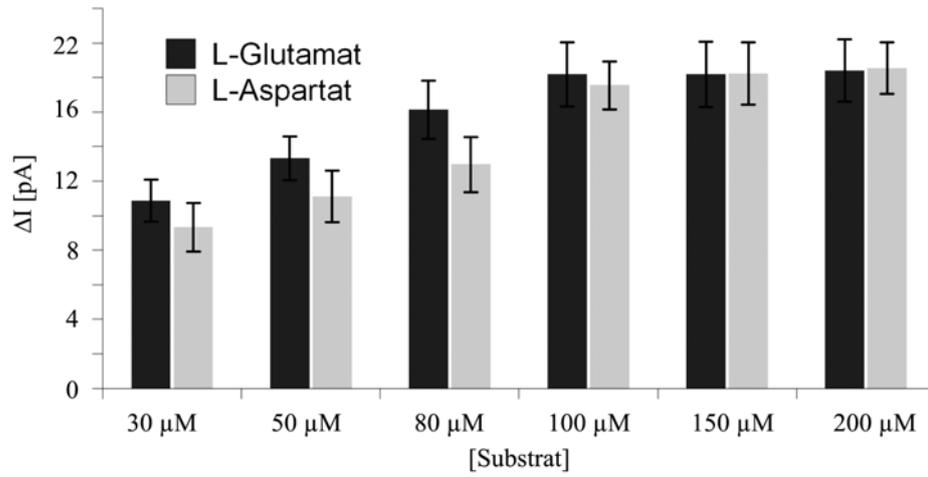
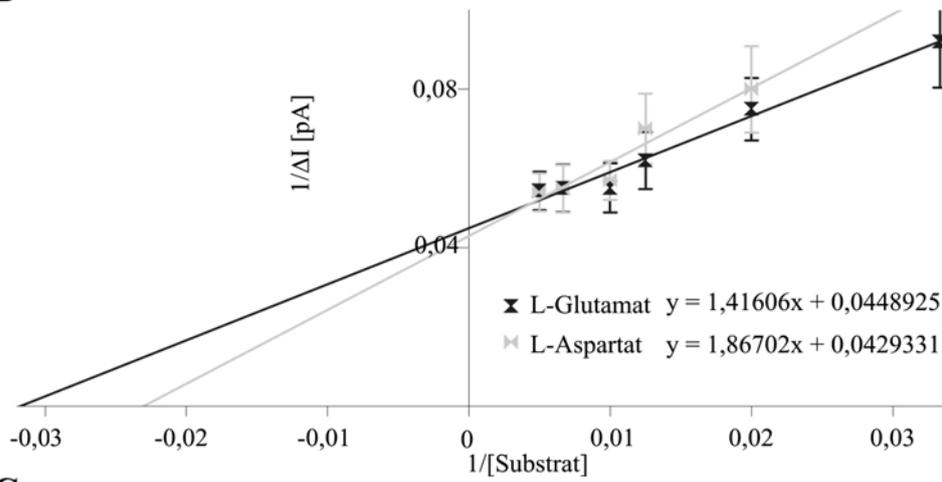
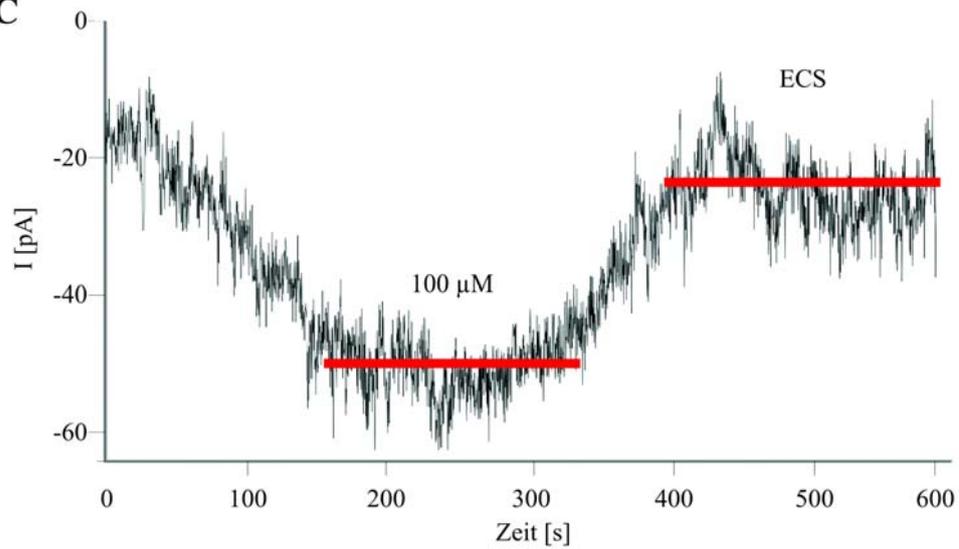
Signal teilweise auf 50 pA (Abbildung 29C). Als Folge dessen wurde ein möglicher Einfluß von Ca^{2+} untersucht (3.2.3.3 und 3.2.3.4). Generell konnte wie zuvor bei den Aufnahmestudien kein Unterschied zwischen den beiden Transporterproteinen EGFP-GLT-1 und GLT-1 beobachtet werden. Daher wurden die weiteren Ergebnisse zur besseren Übersicht zusammengefaßt.

3.2.4.1 Transport der Liganden L-Glutamat und L-Aspartat

Neben dem bereits bekannten Transport von Glutamat zeigte sich ein Transport von L-Aspartat (vgl. Inhibition des Glutamattransports in Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem ^{14}C -L-Glutamat (3.2.3.4) und Inhibition in *patch-clamp* Messungen (3.2.4.3)) und damit ein ähnliches Transportverhalten wie bei GLAST-1, der ebenfalls L-Glutamat und L-Aspartat transportieren kann. Zur Bestimmung der Affinität wurden die erhaltenen Meßwerte der Messungen an einzelnen Zellen auf die Kontroll-Lösung mit 100 μM Glutamat normiert, um Unterschiede zwischen den Zellen auszugleichen. In *patch-clamp* Versuchen wurde zudem die Fähigkeit von GLT-1 zum Transport von L-Aspartat gezeigt (Abbildung 29C). Der Transport verlief mit geringerer Affinität, aber mit ähnlicher Sättigungskinetik wie bei L-Glutamat (Abbildung 29A). Es ergab sich ein K_M -Wert für L-Glutamat von 32 μM ($\pm 5 \mu\text{M}$) und für L-Aspartat von 43 μM ($\pm 10 \mu\text{M}$) (Abbildung 29B). Der ermittelte Hill-Koeffizient lag mit 1,4 bei L-Glutamat und 1,3 bei L-Aspartat ähnlich wie in den Aufnahmestudien mit radioaktiv markierten L- ^{14}C -Glutamat.

Abbildung 29: Patch-clamp Analyse des Transports in Abhängigkeit der Ligand-Konzentration

Gemessen wurde die Veränderung des Stromflusses in Abhängigkeit der Glutamatkonzentration. Bei steigender Konzentration konnte eine leichte Zunahme des Signals mit einer Sättigung bei 100 μM L-Glutamat bzw. 100 μM L-Aspartat beobachtet werden. **(A)** Darstellung der durchschnittlichen Amplitudendifferenzen für L-Glutamat und L-Aspartat. **(B)** Lineweaver-Burk-Plot des konzentrationsabhängigen Transports von L-Glutamat und L-Aspartat durch GLT-1. **(C)** Messung einer 100 μM Glutamatlösung mit Sättigung (100 μM) und steigender Amplitude bei Umspülen mit Glutamat-freier Lösung (ECS).

A**B****C**

3.2.4.2 Einfluß der Ca^{2+} -Konzentration auf den Transport

Patch-Clamp Messungen an EGFP-GLT-1 und GLT-1 exprimierenden HEK293 Zellen zeigten ein ähnliches Bild wie zuvor in den Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L- ^{14}C -Glutamat (vgl. 3.2.3.3). In einem Bereich von 1 - 3 mM der physiologischen Konzentration von Ca^{2+} (1,5 mM) wurden, bis auf Einzelfälle wie in Abbildung 31, keine signifikanten Abweichungen im Transport beobachtet. In Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen betrug der Transport von L-Glutamat 80 % ($\pm 7\%$) des Transports unter physiologischen Bedingungen. Auch bei einer höheren Konzentration wurde nur eine geringe Zunahme des Transports beobachtet (13 % $\pm 8\%$) (Abbildung 30). Zu erkennen ist ein möglicher Einfluß von Calcium auf den Transport, nicht jedoch eine Abhängigkeit wie dies bei Natrium der Fall ist (vgl. 3.2.3.2).

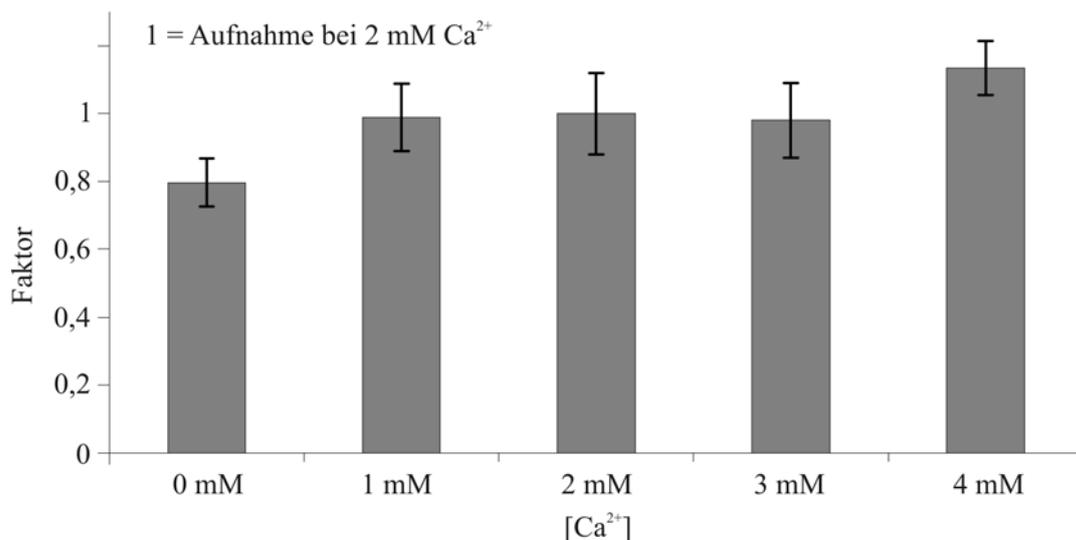


Abbildung 30: Patch-clamp Aufnahmestudie bei unterschiedlichen Calcium-Konzentrationen

Normiert wurde auf den durchschnittlichen Wert von 2 mM Calcium und 100 μM Glutamat. Bei der 0 mM Calcium Messung wurde zuerst der Patch bei 2 mM Calcium ausgebildet und anschließend die externe Lösung vor der Messung durch Calcium-freie Lösung ausgetauscht.

Abbildung 31 zeigt beispielhaft das Verhalten einer Zelle während der *patch-clamp* Messung bei wechselndem Umspülen unterschiedlicher Ca^{2+} -Konzentrationen. Der einwärts gerichtete Glutamattransport bewirkt eine geringere Menge an Strom, verdeutlicht durch den Abfall der Amplitude. Eine erhöhte Konzentration von CaCl_2 verstärkt diesen Effekt, wie in Abbildung 31 von 2 mM nach 3mM bzw. 4mM CaCl_2 zu erkennen ist. Desweiteren erhöht sich die Amplitude wieder auf das jeweilige Ursprungsniveau, wenn mit geringer konzentrierter CaCl_2 Lösung umspült wird. Im Verlauf der Messung ist ein Absinken der Gesamtamplitude zu erkennen. Daher wurden bei den Messungen als Kontrolle 100 μM Glutamatlösung mit 2 mM CaCl_2 verwendet und die erhaltenen Meßwerte als Normwerte genutzt, um einen Vergleich der Messungen an unterschiedlichen Zellen durchführen zu können. Im Gegensatz zu den Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[^{14}C]-Glutamat an HEK293 Zellen (3.2.3.3) zeigte sich in den *patch-clamp* Messungen, außer in einzelnen Fällen (Abbildung 31), keine signifikante Veränderung der Aufnahme.

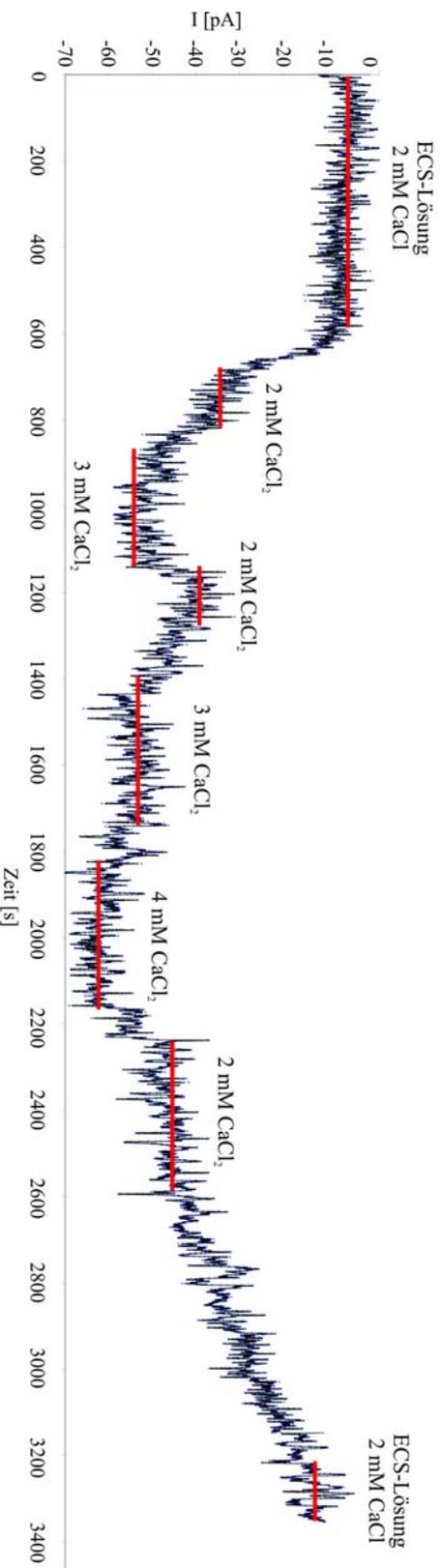


Abbildung 31: Gesamtverlauf einer patch-clamp Messung an einer stabil EGFP-GLT-1 exprimierenden HEK293 Zelle.

Der Graph zeigt die benötigte, induzierte Stromstärke zur Aufrechterhaltung des eingestellten Membranpotential von -70 mV bei Applikation von Glutamat (100 μM) mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen. Bei der hier gezeigten Messung ist ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Ca^{2+} -Konzentrationen zu erkennen. Ausgehend von Glutamat-freier Lösung (ECS-Lösung) fällt die Amplitude bei Zugabe Glutamat-haltiger Lösung (2 mM Ca^{2+}). Das Signal verstärkt sich nach Zugabe von 3 mM Ca^{2+} -haltiger Glutamatlösung. Dieser Effekt tritt auch bei einem Wechsel zu 4 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung auf. Eine Reduzierung der Ca^{2+} -Konzentration führt erneut zu einem Anstieg der Amplitude.

Zur Unterscheidung, ob Ca^{2+} einen Einfluß auf den Transport ausübt oder ein möglicher Co-Transport vorliegt, wurden *patch-clamp* Ableitungen analog zu den vorhergehenden Messungen bei gleichzeitiger Bestimmung einer Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts durchgeführt. Für die extrazellulären Lösungen wurde ECS bzw. 100 μM Glutamat in ECS bei einer Ca^{2+} Konzentration von 2 mM verwendet. Die intrazelluläre Lösung wurde um die Ca^{2+} -bindende Substanz Fura-2 in einer Konzentration von 200 μM erweitert. Die reversible Bindung von Ca^{2+} an Fura-2 konnte fluoreszenzmikroskopisch im Verlauf der Messung beobachtet werden.

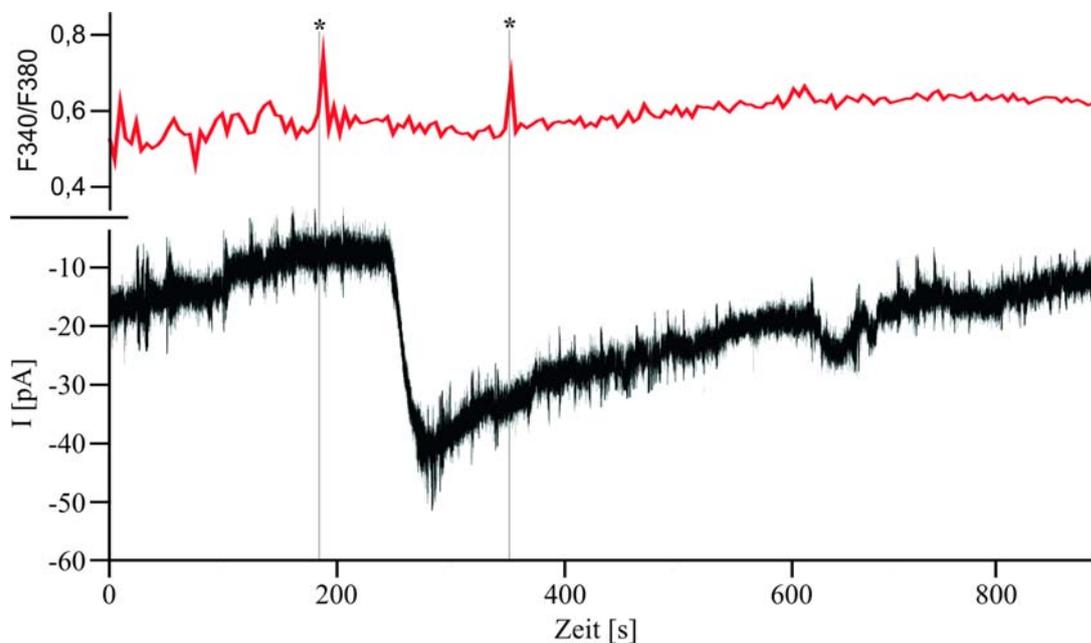


Abbildung 32: Calciumaufnahme mit Fura-2

Fura-2 Messungen wurden an HEK293 Zellen durchgeführt. Zu erkennen ist, daß keine Aufnahme von Calcium (rot) während der Applikation von L-Glutamat erfolgt. Die gleichzeitig durchgeführte *patch-clamp* Messung zeigt den bekannten Transport als Kontrolle. Die Darstellung der Fura-2 Messung erfolgt durch das Verhältnis der Messungen bei Wellenlängen von 340 und 380 nm. Übliche Calciumaufnahmen zeigen, bei der angewendeten Methode, eine Änderung des Verhältnis $\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$ von ca 0,5 auf 0,9. * markiert den Beginn und das Ende der L-Glutamat Applikation. Die hier aufgetretenen Signale in der Fura-2 Messung sind technisch durch den Lösungswechsel bedingt.

Ausgehend von Glutamat-freier Lösung wurde bei Applikation von 100 μM Glutamat keine Veränderung im Fura-2 Signal beobachtet (Abbildung 32). Auftretende Änderungen des Signals beruhten, technisch bedingt, auf den Lösungswechsel. Somit konnte eine Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts und damit ein Co-Transport ausgeschlossen werden.

3.2.4.3 Inhibition des GLT-1 vermittelten Glutamattransports

Analog zu den Aufnahmestudien wurden Messungen des L-Glutamattransports in Anwesenheit potentieller Inhibitoren durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zuerst mit ECS-Medium umspült und dann mit 100 μM Glutamat in ECS zum Transport angeregt. Anschließend wurde zusätzlich zu der 100 μM Glutamat-haltigen Lösung der potentielle Inhibitor in gleicher Konzentration hinzugefügt. Veränderungen des injizierten Stroms zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials wurden so lange aufgezeichnet, bis ein stabiler Wert für wenigstens 60 Sekunden vorlag. Die Signale wurden auf den Transport von 100 μM Glutamat normiert.

In Anwesenheit von Dihydrokainat (DHK, $n = 7$) erfolgte kein Transport von Glutamat. DL-threo-3-Hydroxyaspartat (THA, $n = 10$) reduzierte das Signal und damit die Glutamataufnahme auf 53 % (± 16 %). L- α -Aminoadipat (LAA, $n = 11$) verringerte den Transport auf 49 % (± 16 %). L- β -Aminoadipat (LBA, $n = 12$) und L-Aspartat (Asp, $n = 15$) hingegen bewirkten keine Veränderung. Für L- β -Aminodadipat betrug der Transport von L-Glutamat 92 % (± 17 %) in Bezug auf die Inhibitor-freie Lösung. (Abbildung 33)

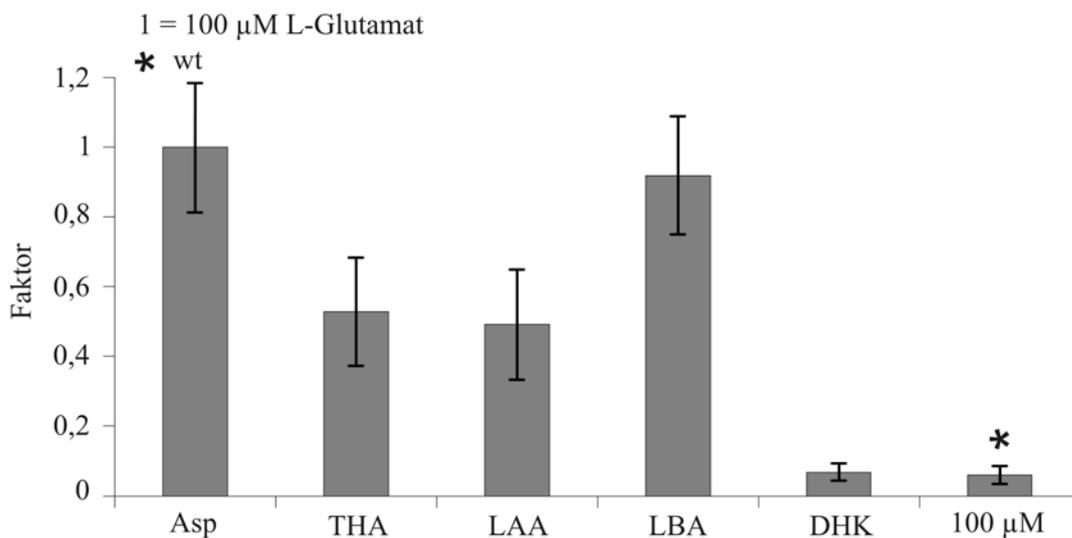


Abbildung 33: Inhibition des Glutamattransports in *patch-clamp* Versuchen

Der Grad der Inhibition wurde bei 100 μM Glutamat in Gegenwart des Inhibitors. Der Inhibitor Dihydrokainat (DHK) wurde in einer Konzentration von 10 μM angewendet. DL-threo-3-Hydroxy-Aspartat (THA) und L- α Aminoacidipat (LAA) reduzieren den Transport auf ungefähr 50 %. L- β -Aminoacidipat (LBA) zeigt wie auch L-Aspartat (Asp) keine Auswirkung auf die Aufnahme der Nettoladung.

Anders als in den Aufnahmestudien wurde in Gegenwart von L-Aspartat keine Reduzierung der Glutamataufnahme beobachtet (99 % \pm 19 %, vgl. bei Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[^{14}C]-Glutamat mit einem reduzierten Transport von 55 % (\pm 10 %) (3.2.4.3)). Abbildung 34 zeigt exemplarisch die Reduzierung des Transports in Anwesenheit von L- α -Aminoacidipat und DL-threo-3-Hydroxyaspartat an einer Zelle. In beiden Fällen wurde durch Auswaschen mit ECS-Medium wieder ein Anstieg der Amplitude erreicht.

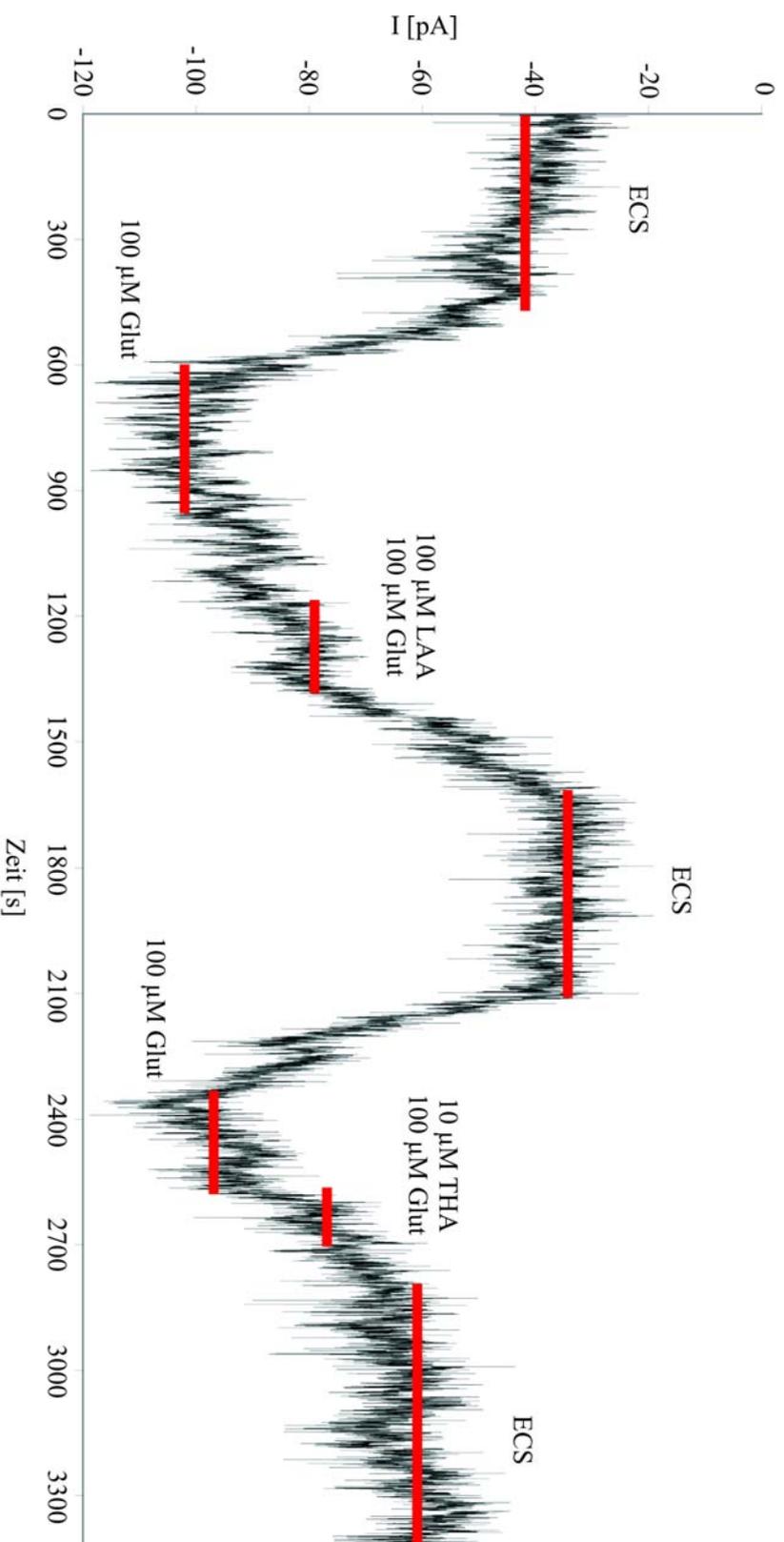


Abbildung 34: Patch-clamp Messungen an transfizierten HEK293 Zellen in Gegenwart von Inhibitoren

Der Wechsel von extrazellulärer Lösung (ECS) zu Glutamat-haltiger Lösung (100 μ M Glut) zeigt den Transport der Aminosäure. Eine anschließende, zusätzliche Applikation der jeweiligen Inhibitoren L- α -Aminoadipat (100 μ M LAA) bzw. D/L-Threo-Hydroxyaspartat (100 μ M THA) in Gegenwart von 100 μ M Glutamat zeigt jeweils einen Rückgang des Transportsignals.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der GLT-1 vermittelte Glutamatttransportprozeß im *Xenopus laevis* Oozyten System und in HEK293 Zellen funktionell charakterisiert. Die Elektrogenität des Transports erlaubte die Anwendung elektrophysiologischer Methoden als analytische Methode.

Es konnte gezeigt werden, daß eine Veränderung des N-Terminus durch Kopplung von EGFP mit GLT-1 keine Auswirkungen auf die Lokalisation ausübt. Zudem ist die Fähigkeit von GLT-1 Glutamat in die Zelle zu transportieren gleichermaßen nicht beeinträchtigt, wie auch die Affinitäten gegenüber Glutamat und Na⁺-Ionen. So konnte aus den Aufnahmestudien in *Xenopus laevis* Oozyten die Michaelis-Menten-Konstanten K_M für EGFP-GLT-1 von 67 µM (± 9 µM) für Glutamat und für Na⁺-Ionen von 63 mM (± 23 mM) bestimmt werden. Im Vergleich zeigte GLT-1 in dem hier verwendeten Glutamataufnahme System innerhalb der bekannten Affinitäten für Glutamat und Na⁺-Ionen K_M-Werte von 65 µM (± 10 µM, Glutamat) und 71 mM (± 11 mM, Na⁺). Die ermittelten Hill-Koeffizienten betragen für Glutamat 1,3 und für Na⁺ 2,9.

Aufnahmestudien in transfizierten HEK293 Zellen wiesen für L-Glutamat einen K_M-Wert von 55 µM (± 13 µM, EGFP-GLT-1) bzw. 57 µM (± 15 µM, GLT-1) und einen Hill-Koeffizienten von 1,1 für beide Transporter auf. Die Natrium Affinität lag mit dieser Methode bei 71 mM (± 5 mM) für das Fusionsprotein und 72 mM (± 7 mM) für GLT-1. Beide zeigten einem Hill-Koeffizienten von 3,4. Mit elektrophysiologischen Methoden wurde eine höhere Affinität gegenüber Glutamat mit 32 µM (± 5 µM) und ein Hill-Koeffizient von 1,4 in EGFP-GLT-1 exprimierenden HEK293 Zellen ermittelt. Als neues Substrat des Transports konnte L-Aspartat nachgewiesen werden. Im Vergleich zu L-Glutamat zeigte GLT-1

gegenüber L-Aspartat eine geringere Affinität ($43 \mu\text{M} (\pm 10 \mu\text{M})$, Hill-Koeffizient 1,2). Substrathomologe Substanzen wie L- α -Aminoadipat reduzierten die Effektivität der Aufnahme von Glutamat ($75\% \pm 7\%$). In Anwesenheit von L- β -Aminoadipat wurden keine Auswirkungen auf den Transport von Glutamat beobachtet.

Desweiteren konnte eine Abhängigkeit der Transportfähigkeit von extrazellulärem Ca^{2+} in Aufnahmestudien gezeigt werden. Wurde der Gehalt an Ca^{2+} auf $0,5 \text{ mM}$ verringert, reduzierte sich der Transport von Glutamat auf $54\% (\pm 8\%)$ bezogen auf den Transport bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen (2 mM). In Abwesenheit von Ca^{2+} verringerte sich der Transport auf $39\% (\pm 5\%)$. In der Ganzzell-Ableitung wurde ein Rückgang des Transports auf $80\% (\pm 7\%)$ in Abwesenheit von Ca^{2+} gemessen. Höhere Konzentrationen von Ca^{2+} scheinen eine gering erhöhte, nicht signifikante Aufnahme von Glutamat zu bewirken. Ein Co-Transport von Ca^{2+} bei der Glutamataufnahme konnte ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse erweitern die Substrateigenschaften, die für einen Transport essentiell sind und zeigen weitere Einflüsse von Ionen auf den Transport. Es wurde gezeigt, daß Fusionskonstrukte der Glutamattransporter mit EGFP ausgezeichnet für *in vivo* Studien geeignet sind. Dies gilt sowohl für GLT-1 als auch für die verwandten Transporter GLAST-1 und EAAC1.

5 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionalität von GLT-1 bzw. EGFP-GLT-1 in heterologen Expressionssystemen analysiert. Hierzu wurden geeignete Modelle erstellt, um die möglichen Auswirkungen sowie die Funktion des Transports näher zu bestimmen. Dazu wurden biochemische, molekularbiologische, immunzytochemische und elektrophysiologische Methoden genutzt.

GLT-1 ist in der Plasmamembran von Astrozyten des zentralen Nervensystems als integrales Protein lokalisiert. Seine Topologie weist sechs Transmembranhelices am N-terminalen Ende und vier putative β -Faltblattdomänen mit der Transportdomäne am C-terminalen Ende auf. Es konnte gezeigt werden, daß eine Veränderung des N-Terminus von GLT-1 durch Fusion mit dem fluoreszierenden EGFP-Protein keinen Einfluß auf die Lokalisation des Proteins ausübt. Mit den erstellten Modellen konnten die Fragen zum Einfluß von Fusionsproteinen auf die Proteinstruktur in Bezug auf Lokalisation und Funktion, die Ionenabhängigkeit, die Transportkinetik, die Michaelis-Menten-Kinetik des Glutamattransports und der Einfluß von Inhibitoren und potentiellen Aktivatoren des GLT-1 (EAAT2) vermittelten Transports beantwortet werden. Hierzu wurden zwei heterologe Expressionssysteme verwendet: *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293 Zellen. Funktionelle Analysen des Proteins basierten auf L-[¹⁴C]-Glutamat Aufnahmestudien sowie *patch-clamp* Messungen im *whole-cell* Modus. Die fehlende Glykosylierung in *Xenopus laevis* Oozyten beeinträchtigte nicht die Funktion der Transporter, wie dies bereits für GLAST-1 gezeigt wurde (Klockner *et al.*, 1994; Storck, 1994).

5.1 Funktionelle Eigenschaften von GLT-1 und EGFP-GLT-1 im Vergleich

Frühere Studien über die Struktureigenschaften von GLT-1 bzw. den verwandten Glutamattransportern zeigen, daß wichtige regulatorische und funktionelle Eigenschaften für den Transport im mittleren bis C-terminalen Bereich des Proteins vorliegen. Wichtige Sequenzabschnitte in der Nähe des N-Terminus liegen mit dem Serinrest S113 - ein Ziel für die PKC regulierte Aktivität des Transporters (Casado *et al.*, 1993; Marcus Conrath, 1996) - und Transmembrandomäne 2 (*chloride permeation pathway*), deren extrazellulär angrenzender Bereich in der Nähe der Membranassoziierten Transportfunktionsdomäne liegt (Ryan *et al.*, 2004). Eine Beeinträchtigung der Funktion des Transporters durch N-terminale Fusion mit EGFP sollte daher nicht vorliegen. Dies konnte hier sowohl für die Lokalisation als auch für die Funktion des Fusionsproteins im Vergleich mit dem nativen Protein gezeigt werden.

Immunfärbungen an *Xenopus laevis* Oozyten und deren Membranextrakten wiesen auf die korrekte Lokalisation in der Membran hin, wie auch in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an HEK293 Zellen bestätigt werden konnte. Inwieweit Spleißvarianten von GLT-1 mit Variationen im N-Terminus bzw. C-Terminus andere Ergebnisse liefern könnten, ist in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen der Spleißvarianten sollte jedoch lediglich ein Einfluß auf die Lokalisation, nicht aber auf die Funktion der Transporter möglich sein.

GLT-1 und EGFP-GLT-1 wurden funktionell im *Xenopus laevis* Oozyten Expressionssystem untersucht. Ausgehend von den bei GLAST-1-Untersuchungen (Storck, 1994) optimierten Transportbedingungen konnte hier gezeigt werden, daß in Aufnahmestudien kein signifikanter Transportunterschied zwischen GLT-1, EGFP-GLT-1 und GLAST-1 vorliegt. Der direkte Vergleich zwischen GLT-1 und EGFP-GLT-1 zeigte die gleiche Sättigungskinetik für Glutamat. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sowohl GLT-1, als auch GLAST-1 und EAAC1 bei einer

Modifizierung mit N-terminalen EGFP, keine Veränderungen der Transporteigenschaften aufweisen. Untersuchungen von Wahle et al. haben gezeigt, daß Modifikationen am C-terminalen Ende zum Funktionsverlust führen (Wahle & Stoffel, 1996).

Die Radioisotopenmethode belegte für GLT-1, die für einen Na⁺-abhängigen, hochaffinen Glutamattransport charakteristischen Michaelis-Menten-Konstanten von 65 µM (± 10) für L-Glutamat und 71 mM (± 11) für Na⁺-Ionen und einem Hill-Koeffizienten-Verhältnis dieser von 3:1. Die ermittelten Werte liegen in dem Bereich, der von Arriza für die humanen Subtypen EAAT1-3 (Arriza *et al.*, 1994) und von Dunlop für EAAT2 (Dunlop *et al.*, 1999) beschrieben wurde. Der fusionierte Transporter wich von diesen ermittelten Affinitätswerten im Bereich der Fehlertoleranz mit 67 µM (± 9) für L-Glutamat und 63 mM (± 23) für Na⁺-Ionen nur gering ab. *Patch-clamp* Messungen an den exprimierenden HEK293 Zellen wiesen für GLT-1, wie auch für EGFP-GLT-1, ähnliche im Bereich der Meßgenauigkeit liegende Affinitätswerte für Glutamat auf. (Tabelle 2). Die aus dem Nettoladungsfluß berechneten Michaelis-Menten-Werte für L-Glutamat lagen mit etwa 32 µM in beiden Fällen über dem K_M-Wert für GLAST-1 von 11 µM (Storck *et al.*, 1992). Vergleichsweise zeigte die Radioisotopenmessung an HEK293 Zellen für GLT-1 und EGFP-GLT-1 einen K_M-Wert von 57 µM (± 15 µM) bzw. 55 µM (± 21) für L-[¹⁴C]-Glutamat, während frühere Studien bei rGLAST-1 77 µM (Storck *et al.*, 1992) bzw. 62 µM (Tanaka, 1993b) und 72 µM für mGLAST-1 (Tanaka, 1993a) nachgewiesen haben.

Die Bindungsstellen für Na⁺-Ionen, die nach Zhang bei den Serinresten S440 und S443 liegen (Zhang & Kanner, 1999), werden somit nicht durch mögliche Konformationsänderungen beeinflusst, da andernfalls ein reduzierter Transport stattgefunden hätte. Eine N-terminale Fusion mit EGFP führt dementsprechend nicht zu einer Veränderung der Lokalisation und Transporteigenschaften von GLT-1. Dies gilt ebenfalls, wie im Ansatz gezeigt, für die beiden weiteren Mitglieder dieser Transporterfamilie GLAST-1 und EAAC1 und konnte qualitativ mit Hilfe der

2-Elektroden-*voltage-clamp* Messung für die drei Mitglieder der Na⁺-abhängigen, hochaffinen Glutamattransporterfamilie erhärtet werden. Dies ermöglicht die Nutzung der Fusionskonstrukte unter Kontrolle geeigneter Promotoren für Rescueexperimente unter Aufrechterhaltung der physiologischen Eigenschaften des jeweiligen Transporters. Somit können die fluoreszierenden Eigenschaften des Fusionstransporters für Studien in Hirnschnitten und zellbiologischen Studien vorteilhaft genutzt werden.

	Konstrukt	Methode	Ligand	K _M	Hill
HEK293	EGFP-GLT-1	<i>patch-clamp</i>	L-Glutamat	32 μM ± 5	1,4
			L-Aspartat	43 μM ± 10	1,2
	GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	57 μM ± 15	1,1
			Na ⁺	72 mM ± 7	3,4
EGFP-GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	55 μM ± 13	1,1	
		Na ⁺	71 mM ± 5	3,4	
Oozyten	GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	65 μM ± 10	1,3
			Na ⁺	71 mM ± 11	2,9
	EGFP-GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	67 μM ± 9	1,3
			Na ⁺	63 mM ± 23	2,9

Tabelle 2: Übersicht der beobachteten Eigenschaften der Glutamataufnahme

Die in dieser Arbeit beobachteten Affinitäten und Hill-Koeffizienten der beiden untersuchten Transporterproteine zu Liganden sind nach Expressionssystem und Methode sortiert dargestellt.

5.2 Substrateigenschaften für den Transport durch EGFP-GLT-1 und GLT-1

GLT-1 ist in der Lage, neben L-Glutamat verschiedene andere Aminosäuren zu transportieren. Hierzu zählen L-Cystein, das von GLT-1 wie auch von GLAST-1 und EAAC1 transportiert werden (K_M 20 - 110 μM) (Hayes *et al.*, 2005) kann. Pines *et al.* postulierten 1992 die Stereospezifität des Transporters (Pines *et al.*, 1992), die sich jedoch in späteren Analysen in Form des Transports von D-Aspartat nicht bestätigte (Gundersen *et al.*, 1993). Storck bestimmte mit der Radioisotopenmethode für rGLAST-1 einen K_M-Wert von 65 μM für L-Aspartat und somit eine höhere Affinität

als für L-Glutamat (77 μM). In *voltage-clamp* Versuchen lag die Affinität für L-Glutamat bei 11 μM . In Aufnahmestudien konnte gezeigt werden, daß sowohl die L-Form als auch die D-Form von Aspartat den Transport von L-Glutamat inhibiert bzw. Aspartat bevorzugt transportiert wird (Storck *et al.*, 1992).

Der hier untersuchte Glutamattransporter GLT-1 der Maus zeigte eine entgegengesetzte Affinität für L-Glutamat und L-Aspartat. Elektrophysiologisch wurde hier für L-Glutamat ein K_M -Wert von 32 μM ($\pm 5 \mu\text{M}$), und für L-Aspartat von 43 μM ($\pm 10\mu\text{M}$) bestimmt. Die Radioisotopenmessung mit L-[^{14}C]-Glutamat konnte dies bestätigen. In Gegenwart von L-Aspartat wurde die Aufnahme von L-Glutamat auf 55 % (± 10 %) reduziert. (Tabelle 2) Bei elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte sich jedoch keine Änderung des Signals und dadurch im Gesamttransport der Nettoladungen. Daraus läßt sich schließen, daß über GLT-1 beide Aminosäuren gleichermaßen transportiert werden. Vergleichende Messungen des Transports dieser Aminosäuren lassen unter Berücksichtigung der Aufnahmestudien mittels der Radioisotopenmethode den Schluß zu, daß GLT-1, anders als GLAST-1, bevorzugt L-Glutamat anstatt L-Aspartat transportiert. Mit dieser Fähigkeit unterscheidet sich GLT-1 auch von den synaptosomalen und astroglialen Glutamattransportern in Membranvesikeln, die u.a. durch L- und D-Aspartat blockiert werden (Rauen *et al.*, 1992). Der GLT-1 vermittelte Co-Transport von L-Glutamat bzw. L-Aspartat und Na^+ erfolgt im Verhältnis von etwa 3:1 (Tabelle 2). Dies stimmt mit den Studien von Storck für L-Glutamat bei GLAST-1 überein. GLAST-1 ist in der Lage die L-Aspartat-homologen L-Cysteinsulfinat und L-Cysteat, sowie die L-Glutamat-homologen Aminosäuren L-Homocysteinsulfinat und L-Homocysteat zu transportieren (Storck *et al.*, 1992). Dihydrokainat (Arriza *et al.*, 1994) und, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, L- α -Amino adipat blockieren GLT-1, nicht aber GLAST-1.

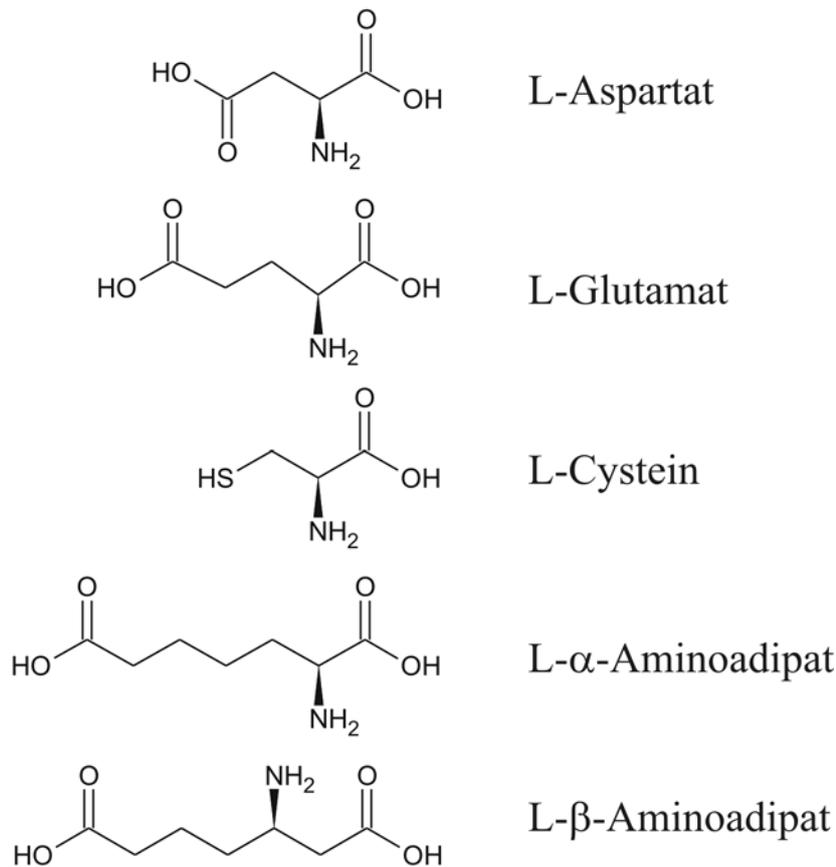


Abbildung 35: Strukturen der verwendeten Aminosäuren

Weitere verwendete Aminosäuren, auf die nicht näher eingegangen wird, sind Dihydrokainat und DL-threo-3-Hydroxyaspartat

Messungen mit Glutamat und Aspartat homologen Aminosäuren (Abbildung 35) an GLT-1 und EGFP-GLT-1 zeigten die Bedeutung der Lage der Aminogruppe im Molekül der Aminosäure. Hier konnte durch Applikation von L- α -Amino adipat eine Reduzierung des Glutamattransports um etwa 25 % gezeigt werden. L- α -Amino adipat ist in Säugern ein Intermediat im Abbau von Lysin, das zu α -Keto adipat metabolisiert und letztlich über Glutaryl-CoA zu Acetoacetyl-CoA umgewandelt wird. Durch elektrophysiologische *patch-clamp* Messung konnte diese Reduzierung des Transport bestätigt werden. Eine Applikation von L- β -Amino adipat

zeigte in der Radioisotopenmessung keine veränderte Aufnahme von Glutamat. Daraus läßt sich schließen, daß neben der endständigen geladenen Carboxylgruppe, der SH-Gruppe bei Cystein (Hayes *et al.*, 2005) bzw. der SO_2^- (L-Cysteinsulfinat und L-Homocysteinsulfinat) und SO_3^- (L-Cysteat und L-Homocysteat) (Storck, 1994), die α -Amino-Gruppe für den Transport oder dessen Inhibition vermutlich essentiell ist. Dies könnte durch weitere Untersuchungen mit ungeladenen α -Aminosäuren sowie einem Vergleich des Transports in Anwesenheit der β -Aminoform von L-Glutamat und L-Aspartat erhärtet werden. Insbesondere GLAST-1 und GLT-1, aber auch die weiteren Mitglieder dieser Glutamattransporterfamilie weisen eine hohe Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenz und der postulierten Strukturen auf. Bezüglich der ungeladenen Aminosäuren ist daher ein ähnliches Transportverhalten zu erwarten. Für GLAST-1 konnte Storck bereits nachweisen, daß keine ungeladenen Aminosäuren transportiert werden (Storck *et al.*, 1992).

5.3 Ionenabhängigkeit des Transports

Bei den hochaffinen Glutamattransportern handelt es sich um Na^+ -abhängige Transporter. In den hier aufgeführten Aufnahmestudien konnten frühere Studien bestätigt werden, daß wegen des Na^+ Co-Transports der Transport von L-Glutamat parallel der Na^+ -Konzentration reduziert wird. Eine vollständige Abwesenheit von Na^+ -Ionen führt zu einer vollständigen Inaktivierung des Transports von L-Glutamat. Der maximale Transport liegt bei einer Konzentration von etwa 120 mM für Na^+ und damit unter der physiologischen von etwa 144 mM. L-Glutamat und Na^+ werden im Verhältnis 3:1 transportiert (Tabelle 2).

Weitere Kationen, die den Transport hochaffiner Glutamattransporter beeinflussen, sind K^+ und Ca^{2+} . Die physiologischen extrazellulären Konzentrationen liegen für K^+ bei 4 mM und Ca^{2+} bei etwa 1,5 bis 2 mM. Eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration führt zu einer Änderung des elektrochemischen Potentials und

dadurch zu einer Inhibition des Glutamattransports und kann zu einer reversen Aufnahme von Glutamat führen (Szatkowski *et al.*, 1990).

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit ein Effekt von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen nachgewiesen werden. Berry *et al.* zeigten 2005 zuvor einen indirekten Einfluß auf die Regulation des Transports. Seine Arbeitsgruppe konnte nachweisen, daß der den GLT-1 und EAAC1 Transport fördernde bzw. für GLAST-1 inhibierende Effekt durch Docosahexaensäure (DHA) in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen ausbleibt (Berry *et al.*, 2005). Bei DHA handelt es sich um eine der am meisten im Säugerhirn verbreiteten, mehrfach ungesättigten Fettsäure (Lopez *et al.*, 1995). Daß Ca^{2+} -Ionen für den Glutamattransport eine Rolle spielen, konnte in verschiedenen Studien für intrazelluläres Ca^{2+} gezeigt werden. Presinilin-1 reguliert die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase (LaFerla, 2002; Leissring *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2000). Presinilin defiziente Mäuse weisen in Neuronen eine verringerte Aufnahme von Glutamat auf, wie zumindest für die GLT-1 verwandten Glutamattransporter EAAC1 und für GLAST-1 nachgewiesen wurde (Yang *et al.*, 2004). Zusätzlich beeinflusst intrazelluläres Ca^{2+} über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher den Glutamattransporter (Yamaguchi *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite bewirkt Glutamat über metabotrope Glutamatrezeptoren einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Astrozyten (Wang *et al.*, 2006). Ein allgemeiner Einfluß von extrazellulärem Ca^{2+} auf die Aufnahme von Glutamat konnte in Synaptosomen gezeigt werden (Zhu *et al.*, 1999).

Die vorliegende Arbeit liefert Indizien für einen weiteren möglichen Ca^{2+} -Einfluß auf den Transport von Glutamat durch GLT-1, wobei es sich bei diesem Einfluß nicht um einen Co-Transport handelt. Zwar wurde der Transport in Abwesenheit von Ca^{2+} je nach Methode unterschiedlich stark reduziert, allerdings könnte dies auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen sein (vgl 5.4). Da in *patch-clamp* Versuchen Ca^{2+} bekannterweise für ein stabiles *gigaseal* notwendig ist, wurden hier die *gigaseal*-Ausbildung und der Durchbruch der Membran in Anwesenheit von Ca^{2+} -haltiger extrazellulärer Lösung durchgeführt. Mögliche Ca^{2+} -Bindungen

könnten selbst nach längerem Umspülen mit Ca^{2+} -freier Lösung unter Umständen nicht aufgehoben werden. Um mögliche Bindungen von Ca^{2+} auszuschließen, sollten daher weitere Versuche mit Hilfe von Lösungen mit Ca^{2+} -Pufferfähigkeit, wie z.B. 1 mM EGTA Lösung, durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Verwendung des Chelatbildners BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetat, 5-10 mM). Der Vorteil von BAPTA besteht neben der schnelleren Bindungskinetik gegenüber EGTA (Tsien, 1980) darin, daß bei 1 mM EGTA möglicherweise, wie bei cholinergen Inhibitionsstudien gezeigt (Fuchs & Evans, 1988), der Effekt ausbleibt. Ein weiterer Ansatz unter Berücksichtigung der Arbeiten von Yernool (Yernool *et al.*, 2004) wären Untersuchungen bezüglich einer möglichen Oligomerisierung von Glutamattransportern unter Einfluß der Ca^{2+} -Konzentration. Yernool führte Untersuchungen am bakteriellen GLT-1 Homolog GltP durch. Dabei handelt es sich um einen membranständigen Glutamattransporter, dessen Bindungsstellen für die Substrate bei räumlicher Betrachtung in Übereinstimmung mit Untersuchungen an murinen Glutamattransportern liegen.

Nach bisherigen Erkenntnissen handelt es sich bei den murinen Formen um monomere Proteine. Allerdings sind in *Western-Blot* Analysen grundsätzlich in geringen Mengen mögliche di- und trimere Strukturen zu finden. Hinweise für eine Di- oder Trimerisierung sind bislang nicht bekannt. Im Gegensatz dazu konnte Yernool zeigen, daß die bakterielle Form als Trimer existiert. Ein möglicher Ansatzpunkt für einen Dimerisierungseinfluß von Ca^{2+} , könnten die Glykosylierungsstellen zwischen Transmembrandomäne III und IV sein. In Punktmutationsanalysen konnte zwar kein Einfluß auf die Transportfunktion oder die Affinität zum Liganden nachgewiesen werden, wohl aber auf das Dimerisierungsverhalten bei *in vitro* Untersuchungen. (Marcus Conradt, 1996) In diesem Zusammenhang könnte Ca^{2+} eine Rolle spielen, dies würde allerdings nicht die hier, in Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-[^{14}C]-Glutamat, beobachteten Effekt auf die Transporteffizienz erklären. Ein weiterer zu

untersuchender Aspekt ist, ob der Einfluß durch die Reduzierung des extrazellulären Ca^{2+} gleichermaßen über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher verläuft, wie dies für intrazelluläres Ca^{2+} (Yamaguchi *et al.*, 1998) bekannt ist, oder ob dies auf einem anderen Weg erfolgt.

5.4 Methoden und Abweichungen

Das *Xenopus laevis* Oozyten Expressionssystem weist für genaue qualitative Untersuchungen einige Nachteile auf. Diese sind u.a. mit einer Expressionsvariabilität in Oozyten zu erklären (Tate *et al.*, 1989). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden sowohl bei 2-Elektroden-*voltage-clamp* Messungen wie auch bei Aufnahmestudien einzelner Oozyten, teilweise sehr deutlich unterschiedliche Meßergebnisse beobachtet. Die Nachteile des Oozyten Expressionssystems gegenüber stabil exprimierenden Zell-Linien bestehen u.a. darin, daß die Injektion von Oozyten immer mit einer Verletzung der Eihülle einhergeht, die sich nachteilig auf die Expression auswirken kann. Desweiteren können, trotz Auswahl des Dumont-Stadiums V-VI, Unterschiede in der Entwicklung auftreten, die bei in Kultur gehaltenen Zell-Linien nicht zu beobachten sind. Ein weiterer Aspekt liegt in den Unterschieden der Meßmethoden. Bei *voltage-clamp* Messungen durchstoßen die Meßelektroden die Oozytenhülle. Daraus resultiert ein größerer, sogenannter *leak*-Strom, der auf eine geringere Abgrenzung des Oozyten-Inneren und der extrazellulären Lösung zurückzuführen ist. Als Folge dessen sind größere Meßschwankungen zu beobachten. Bei der *patch-clamp* Messung hingegen fällt der *leak*-Strom aufgrund der *gigaseal*-Bildung geringer aus. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an definiert stabil exprimierenden Zell-Linien durchgeführt.

Die Untersuchungen mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen weisen eine Diskrepanz zu Radioisotopenmessungen auf. Der prinzipielle Unterschied der beiden Methoden besteht darin, daß mit den Radioisotopenmessungen die

Glutamataufnahme direkt bestimmt wird. Bei der *voltage-clamp*, wie auch der *patch-clamp* Methode, werden hingegen die Transporte aus dem gemessenen Strom ermittelt. Der gemessene Strom setzt sich dabei nicht nur aus dem eigentlich zu untersuchenden Glutamattransport, sondern auch aus dem Nettostrom der gesamten Ladungsverschiebung beim Transportzyklus zusammen. Im Fall der untersuchten Glutamattransporter ergibt sich diese Ladungsverschiebung zusätzlich zur Glutamataufnahme aus dem Co-Transport von einem Glutamat und drei Na⁺-Ionen und dem Antiport von einem K⁺-Ion je Transportzyklus. Eine Möglichkeit für die genauere Bestimmung der Stöchiometrie ist die Bestimmung der Aufnahme von L-[¹⁴C]-Glutamat bei gleichzeitiger Applikation von ²²Na⁺ in, den Transporter exprimierenden, HEK293 Zellen. Zudem könnte man aus einzelnen Konzentrations-Abhängigkeitsstudien von Glutamat, Na⁺-Ionen und der Inhibition durch extrazelluläre K⁺-Ionen (Szatkowski *et al.*, 1990) die Hill-Koeffizienten ermitteln.

Die Diskrepanz zwischen den Affinitätswerten ist unklar. So reichen die bislang gemessenen K_M-Werte für GLAST-1 von 11 - 77 μM (Arriza *et al.*, 1994; Gegelashvili *et al.*, 1997; Klockner *et al.*, 1994; Storck *et al.*, 1992), für GLT-1 bei der Ratte von 10 μM (Pines *et al.*, 1992) bis 36 - 97 μM für Mensch und Maus (Arriza *et al.*, 1994; Kirschner *et al.*, 1994; Pines *et al.*, 1992; Zerangue *et al.*, 1995). Mögliche Ursache könnte eine unterschiedliche Regulation der Transporter in den verschiedenen Expressionssystemen sein (Zerangue *et al.*, 1995). Als ein Beispiel zählt dazu die unterschiedliche Einflußnahme von Docosahexaensäure auf die Transporter. So wird bei GLT-1 und EAAC1 in Anwesenheit von Docosahexaensäure die Affinität zu D-Aspartat erhöht, bei GLAST-1 hingegen inhibiert. Diese Effekte wiederum sind abhängig von extrazellulärem Ca²⁺ (Berry *et al.*, 2005). Weiter könnte bei heterologen Expressionssystemen die Varianz in der Transporterdichte und anderen Faktoren wirksam sein. Es bieten sich daher Messungen in Astrozyten abgeleiteten Zell-Linien, wie z.B. stabile C6-Zellklone, an. Ein Nachteil der C6-Zellen ist allerdings die nativ vorkommende Expression von

GLAST-1 in diesen Zellen. Als Alternative könnten Messungen an Hirnschnitten vorgenommen werden. Vorzugsweise sind hier Hirnschnitte von GLAST-1 defizienten Mäusen zu verwenden. Allerdings beinhalten auch diese Messungen Nachteile. Zum einen ist die Frage der Signalintensität zu klären. Dies könnte an C6-Zellen durch Vergleich von Wildtyp mit transfizierten Zellen überprüft werden. Auf der anderen Seite komplizieren in Hirnschnitten *gap junctions* die Einzelzellableitungen. Daher sollten beide Methoden ergänzend durchgeführt werden.

Unterschiede in den Meßergebnissen des extrazellulären Ca^{2+} -Einflusses bei Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L- ^{14}C -Glutamat und *patch-clamp* Studien sind auf die Bedeutung des Calciums für die *patch-clamp* Technik zurückzuführen. So ist Ca^{2+} für die Ausbildung eines stabilen *gigaseals* notwendig (Markus Numberger, 1996). Desweiteren ist bekannt, daß eine Reduzierung des freien Calciums in *patch-clamp* Versuchen zu einem erhöhten Rauschen führt (Noble & Powell, 1991).

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Allgemeine Arbeitsanweisungen der Molekularbiologie, Proteinbiochemie, Zellkultur sowie tierexperimentelle Arbeiten, die hier nicht näher beschrieben sind, wurden auf Grundlage von Standardprotokollen (Mulhardt C., 2000; Rehm H, 2000; Sambrook J, David, J and Russell, W, 2001) durchgeführt.

6.1.1 Plasmid-DNA-Präparation

Minipräparationen von Plasmid-DNA wurden aus 2 ml Übernachtskulturen nach der Methode der alkalischen Lyse von *Birnboim* (Birnboim, 1983) und anschließender Phenol-Chloroform (1:1) Extraktion isoliert. Maxipräparationen erfolgten aus 200 ml Übernachtskulturen nach dem Protokoll der Firma *Quiagen* (Hilden).

6.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für einen üblichen PCR-Ansatz wurden 50-100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Der Inkubationsansatz enthielt:

5 pmol	<i>antisense-primer</i>
5 pmol	<i>sense-primer</i>
10 mmol	dNTPs
5 U	Taq-Polymerase
5 µl	10x Taq-Puffer
ad 50 µl Wasser	

Für die PCR wurde der Multicycler PTC200 (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) eingesetzt. Temperatur und Zyklenlänge wurden den jeweiligen Reaktionen angepaßt. Das Standard-Programm lief über folgende Stufe:

I.	Denaturierungsvorlauf	94 °C	2 Minuten
II.	Amplifikationszyklus (25-30 Wiederholungen)		
	Denaturierung	94 °C	1 Minute
	Primer Annealing	48-68 °C	2 Minuten
	Primerverlängerung	68 °C	2 Minuten
III.	Terminale Verlängerung	68 °C	4 Minuten
IV.	Kühlung	4 °C	

6.1.3 Reverse-Transkription (RT)

Für die Amplifikation von mRNA wurden je 1 µg Gesamt-RNA (~100 ng Poly(A) RNA) revers transkribiert. Hierzu wurde die RNA in 4,5 µl Wasser und 1 µl p(dN)₆ für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert, zwei Minuten auf Eis gekühlt und mit 2 µl 5x RT Puffer (Gibco/BRL, Eggenstein), 1 µl DTT(0,1 M), 0,5 µl RNAsin (40 U, Roche, Mannheim), 0,5 µl SuperscriptII (200 U, Gibco/BRL, Eggenstein) und 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), versetzt und für 1 h bei 42 °C inkubiert und 15 Minuten bei 70 °C gehalten.

6.1.4 Quantitative RT-PCR

Für quantitative RT-PCR-Reaktionen wurde folgender Ansatz verwendet:

Zur Stammreaktionslösung wurden radioaktiv markiertes [³²P]-dCTP (10 µCi) pro 10 Ansätze zugegeben. Die Amplifikation erfolgte über 20-25 Zyklen. Anschließend wurden die Proben auf ein 6 %iges TBE Polyacrylamid Gel aufgetragen und für ungefähr eine Stunde bei einer Spannung von 200 V getrennt. Danach erfolgte die Quantifizierung mittels Phosphoimager und Image Quant (Molecular Dynamics, Sunnyvale USA).

2 µl RT-Ansatz (vgl 6.1.3)
0,6 µl sense Primer (10 mM)
0,6 µl antisense Primer (10 mM)
0,4 µl dNTP (10 mM)
0,8 µl MgCl₂ (50 mM)
2 µl 10x Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 500 mM KCl)
0,8 µl Taq B Polymerase
12,8 µl Wasser

6.1.5 *In vitro* Transkription

Die RNA-Synthese erfolgte nach Goldin und Sumikawa in 50 µl (Alan L. Goldin and Katumi Sumikawa,): Reaktionspuffer nach Angaben des Herstellers

0,5 mM ATP, CTP, UTP sowie 0,1 mM GTP und 0,5 mM m⁷GpppG
10 mM DTT
40 U RNAsin
5 µg linearisiertes Plasmid
40 U SP6 bzw. T7-Polymerase (ad 40 U nach 1 Stunde)

Die Inkubation erfolgte 3 Stunden bei 37 ° C und anschließend 15 Minuten mit 10 U DNase . Nachfolgend wurde das Reaktionsgemisch mit 100 µl Phenol und zweimal mit je 100 µl Chloroform extrahiert. Die Fällung erfolgte nach Zugabe von 40 µl 6 M NH₄OAc mit 225 µl Ethanol bei -70 °C (30 Minuten). Nach Waschen mit 70 % Ethanol wurde die cRNA in 20 µl ddH₂O aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

6.1.6 Gelelektrophoretische Analyse der *in vitro* Transkriptions Produkte

Die Denaturierung der RNA erfolgte nach Synthese in 3 µl 4/3 DLG. für eine Stunde bei 50 °C. Anschließend wurde die RNA mit 1 µl Orange G Ladepuffer versehen und auf ein 1% iges Agarose (in 1 x BE, 5 mM Natriumiodessigsäure) Gel aufgetragen.

BE 50x BE	4/3 DLG
0,5 M BES (2-[Bis-(2 hydroxyethyl)-amino]-ethansulfonsäure)	3330 µl DMSO
5 mM EDTA	965 µl 40 %-iges Glyoxal (frisch deionisiert)
mit NaOH auf pH 6,7	133 µl 50x BE/DEPC pH 6,7
DEPC behandeln.	2,5 µg Ethidiumbromid je µl

6.1.7 Expression in HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum bei 37 °C in Gegenwart von 5 % CO₂ kultiviert. Für die Transfektion mittels Elektroporation wurden 7x10⁶ Zellen pro Ansatz in 800 µl Medium aufgenommen und mit 5 µg linearisierter DNA versetzt. Vor und nach der Elektroporation (450 µF, 250 V) wurde 5 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden ausplattiert und nach 24 Stunden unter Selektionsbedingungen (900 µg/ml G418) gehalten. Nach 14-tägigem Selektionsdruck wurden Einzelklone isoliert und in Kultur expandiert.

6.1.8 Isolierung genomischer DNA aus HEK293 Zellen

Die genomische DNA aus HEK293 Zellen wurde nach *Current Protocols in Molecular Biology* isoliert. Dazu wurde von in 90 mm Platten kultivierten Zellen das Medium entfernt und anschließend mit PBS die Zellen gewaschen. Die Zellen wurden in Lysispuffer resuspendiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Extraktion der DNA nach Phenol-Chloroform-Extraktion präzipitiert und in 200 µl TE aufgenommen.

6.1.9 Isolierung von RNA aus HEK293 Zellen

RNA wurde mit der TRIZOL-Methode nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.2 *Xenopus laevis* Oozyten Methoden

6.2.1 Froschhaltung

10 Tiere wurden in einem abgedunkelten 200 l Becken bei etwa 18 - 20 °C gehalten. Die Fütterung erfolgte zweimal in der Woche mit roten Mückenlarven (10 g pro Frosch). Einmal pro Woche wurde das Wasser gewechselt.

6.2.2 Oozytenentnahme

Die Frösche wurden mit einer 0,1 %-igen Lösung des hautgängigen Narkotikums MS222 betäubt. Anschließend wurde ein Teil des Ovars operativ entnommen. Der ca. 1 cm lange Schnitt durch die Bauchhaut und Bauchdecke wurde jeweils mit Nahtmaterial (*Catgut*) vernäht und die Frösche bis zum Nachlassen der Betäubung in feuchtem Schaumstoff gehalten. Die Oozyten wurden durch einstündige Kollagenase-Typ-II (Sigma, Seelze) Behandlung (20 mg/12 - 15 ml Ca²⁺-freiem Medium) vereinzelt und anschließend gründlich mit *Barth's* modified saline (BS) gewaschen. Unversehrte Oozyten der Entwicklungsstadien V und VI wurden für die cRNA Injektion verwendet.

6.2.3 Injektion der cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Injektionskapillaren wurden mit einer Kapillaren-Zieh-Apparatur von List-Medical (Modell L/M-3P-A) gezogen und in einen Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar) eingespannt. Nach Einsaugen von etwa 2 µl cRNA oder Wasser wurden in die Oozyten etwa 20 - 50 nl durch Druckluft (Mikroinjektor FemtoJet, Eppendorf) injiziert. Der Injektionsdruck betrug zwischen 800 und 1000 Torr und wurde für 0,5 -

0,8 Sekunden angelegt. Nach einstündiger Inkubationszeit wurden intakte Oozyten einzeln in *Barth's modified saline* Medium bei 18 °C für 20 - 24 Stunden gehalten.

6.2.4 L-[¹⁴C]-Glutamat-Aufnahme Messungen

20 - 24 Stunden nach der cRNA-Injektion (respektive Wasser-Injektion) wurden Oozyten einzeln für 15 Minuten in 100 µl BS-Medium mit 0,1 mM L-[¹⁴C]-Glutamat (spezifische Aktivität 45 mCi/mmol) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml 0,1 mM Glutamat-haltigem BS-Medium wurden die Oozyten in 1 %-igem SDS homogenisiert, die aufgenommene Menge Radiokativität und daraus die aufgenommene Menge L-Glutamat bestimmt. Die Messung erfolgte in 5 ml *Ultimatm* (Packard Bioscience) in einem Flüssig-Szintillationszähler (Beckmann, LS 800). Inhibitoren wurden in einer 10fach konzentrierten Lösung aufbewahrt.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen wurde mittels Gelelektrophorese nach *Laemmli* (1970) durchgeführt.

6.3.2 *In vitro* Translation

Durch *in vitro* Transkription gewonnene cRNA wurde wie folgt in Gegenwart von Hunde-Pankreas-Mikrosomen translatiert:

60 %	Retikulozytenlysat (15 µl; Amersham, Freiburg)
2,5 mM	Mg ²⁺ -Ionenkonzentration
100 mM	K ⁺ -Ionenkonzentration
50 µM	proteinogene Aminosäuren ohne Methionin
1 µl	1 µCi/µl [³⁵ S]-Methionin (15 µCi/µl, Amersham, Freiburg)
0,1 µl	0,1 µg/µl cRNA
2 µl	Hundepankreas-mikrosomen (Roche, Mannheim)

Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C wurden Aliquots von jeweils 12,5 µl mit jeweils 12,5 µl Mikrosomenpuffer (140 mM KOAc, 50 mM TEA, 2,5 mM Mg(OAc)₂; pH 7,5) versetzt. Anschließend wurde durch Zentrifugation für jeweils 10 Minuten bei 800 x g Zellkerne und bei 10.000 x g Mitochondrien entfernt. Durch Ultrazentrifugation 100.000 x g für 60 Minuten bei 4 °C wurden die Mikrosomen sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment mit 25 µl Mikrosomenpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Aufnahme erfolgte in 40 µl Laemmli-Probenpuffer (4 % SDS, 2 % 2-Mercaptoethanol, 12 % Glycerin; 50 mM Tris/HCl pH 8,8) und anschließender Größenfraktionierung über eine 4 - 12 % Gradienten SDS-PAGE. Das Gel wurde 1 Stunde in 10 %-iger Essigsäure/50 % Methanol fixiert

und zweimal 30 Minuten in DMSO entwässert. Nach 1 Stunde Schütteln in 22 % PPO/DMSO, anschließendem Wässern und einer Stunde in 3 % Glycerin wurde das Gel im Vakuum getrocknet und autoradiographiert.

6.3.3 Isolierung von Membranproteinen aus HEK293 Zellen

Zur Untersuchung von Membranproteinen wurden diese zuerst in Lösung gebracht. Integrale Membranproteine lösen sich mit Detergenzien, periphere Membranproteine hingegen lassen sich schon in Puffern mit hoher oder niedriger Ionenstärke oder hohem pH lösen.

Da GLT-1 ein integrales Membranprotein ist, wurde es mit dem Detergenz Triton-X-100 (p-t-Octylphenyl-polyoxyethylenen) solubilisiert. Zur Isolierung der Membranproteine wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums und Waschen in PBS in 200 µl 0,5 % Triton-X-100 je Klon (24-Lochplatte) bei 4 °C eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Zelldetritus durch zehnmünütige Zentrifugation bei etwa 18.000 x g entfernt. Der Überstand wurde auf ein SDS-PAGE-Gel übertragen und mittels *Western-Blot* analysiert.

6.3.4 Isolierung der *Xenopus laevis* Oozyten-Translationsprodukte

20 - 24 Stunden nach der cRNA Injektion wurden 5 Oozyten in 600 µl 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 0,1 M NaCl, 1% Triton X-100 und 1 mM PMSF lysiert und unlösliche Zellbestandteile durch 3-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde mittels *Western-Blot* analysiert.

6.3.5 *Western-Blot*

SDS-Gele wurden mittels *NuPage[™]* Transfer System (Invitrogen) auf Nitrocellulose Membran (Schleicher Schuell) übertragen. Die Membran wurde anschließend zur

Absättigung freier Bindungsstellen in 3 % BSA/PBS geschüttelt und über Nacht bei 4 °C mit den entsprechend verdünnten Antiseren inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,1 % NP-40/PBS folgte die Inkubation für 2 Stunden bei 4 °C mit dem jeweiligen sekundärem Antikörper in 1 % BSA/PBS. Der oben angeführte Waschschrift wurde wiederholt.

Anschließend wurde in 20 ml Luminol (250 mM Luminol (Aminophtalhydrazid), 80 mM Cumarsäure, 1 M TrisHCl und 6,2 µl Wasserstoffperoxi (30 %ig)) für zwei Minuten inkubiert und mit angepaßten Belichtungszeiten auf X-OMAT AR Filme (Kodak, Stuttgart) entwickelt.

6.3.6 Immunfärbungen an GLT-1 exprimierenden Zellen

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen inkubiert. Nach Entfernung des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen für 10 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd/PBS fixiert und der vorherige Waschschrift wiederholt. Die Immunfärbung erfolgte analog zur Immunfärbung an Oozyten Schnitten (vgl 6.3.8)

6.3.7 Fluoreszenzmikroskopie von EGFP-GLT-1 Klonen

Zur mikroskopischen Untersuchung der EGFP-GLT-1-Fusionsklone werden die HEK293 Zellen auf Objektträger übertragen. Dazu wurden Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet und in 24-Lochplatten gelegt. Nach Entfernung des Mediums und Waschen in PBS wurden die Deckgläschen mit der mit Zellen beschichteten Seite in wenig Glyceringelatine auf Objektträger übertragen. Anschließend erfolgte die mikroskopische Untersuchung. Dazu wurde ein, wie unter Immunofluoreszenz 5.2.18 beschrieben, mit Blaufilter ausgestattetes Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss verwendet.

6.3.8 Immunzytochemische Untersuchungen von *Xenopus laevis* Oozyten Gefrierschnitten

24-72 Stunden nach der cRNA-Injektion wurden Oozyten bei -20 °C in Tissue-Tek® eingebettet. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Schnitte mit einer Schnittdicke von 5-7 µm angefertigt und bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) für 15 Minuten fixiert. Es folgte eine Inkubation mit PBS/0,5 % Triton-X-100. Die Schnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 3 %-igem BSA/0,1% Triton-X-100 in PBS 1 Stunde blockiert. Der primäre Antikörper wurde in PBS/3 %BSA/0,1 % Triton-X-100 über Nacht bei 4 °C mit den Schnitten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgten die nächsten Schritte im Dunkeln. Inkubation (1 Stunde) mit dem sekundärem Antikörper ((anti-rabbit-Cy3) 1:10000) in PBS/3 % BSA/0,1 % Triton-X-100, dreimaliges PBS/0,5 % Triton-X-100 und zweimaliges Waschen in PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Zeiss Axioscope-Fluoreszenzmikroskop analysiert.

6.4 Elektrophysiologische Methoden

6.4.1 Elektrophysiologische Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten

Die Messungen wurden 24 - 72 Stunden nach der Injektion der jeweiligen cRNAs bei Raumtemperatur durchgeführt und die Oozyten dabei mit Perfusions-Medium umspült. Die Mikroelektroden aus Borosilikatglas (Außendurchmesser 1 mm, Innendurchmesser 0,78 mm, Wandstärke 0,22 mm, *Hilgenberg*) wurden mit einem vertikalen *Patch*-Pipetten-Puller (L/M-3P-A) gezogen und mit 3 M KCl gefüllt. Verwendet wurden nur Elektroden mit einem elektrischen Widerstand von 1-2 M Ω . Mit Hilfe von hydraulischen Mikromanipulatoren wurden die Mikroelektroden möglichst lotrecht in die Oozyten eingestochen. Bei intakten Oozyten liegt das Membranpotential bei -30 bis -60 mV das hier mit einem *Oocyte Clamp* Verstärker (Warner Instruments, Hamden USA, OC 725B) auf -90 mV eingestellt wurde. Spannungskommandos wurden durch die Software von *HEKA* (*Patchmaster 2*) über einen AD-Wandler (Instrutech Corp, ITC 16) erzeugt, die auch zur Aufnahme der Daten verwendet wurde. Zur Analyse diente die Software *Fitmaster* (*HEKA*, Lambrecht). Alle Daten wurden über eine Frequenzweiche (10 Hz, -3 db) gefiltert und mit 100 Hz digitalisiert. Unter der Annahme, daß das L-Glutamat keinen anderen Effekt als die Aktivierung des Transporters besitzt, entspricht I_{GLT1} der Differenz des Membranstromes (injizierter Strom) vor und während der Applikation des L-Glutamats.

6.4.2 Elektrophysiologische Messungen an HEK293 Zellen

Zu untersuchende Zellen wurden in 24-Loch Platten auf Deckgläschen kultiviert. Während der Messungen wurden die Zellen mit täglich frisch angesetzter

extrazellulärer Lösung (ECS) überspült. Die Steuerung des Mikroskops, der Meßkammer und der Mikroelektrode erfolgte durch Piezokristall-gesteuerte Mikromotoren (Luigs&Neumann GmbH). Für die Mikroelektroden wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (Innendurchmesser 0.87 mm, Wandstärke 0,63 mm, *Hilgenberg*) mit einem vertikalen *Patch-Pipetten-Puller* (L/M-3P-A) gezogen und mit intrazellulärer Lösung (KG40) gefüllt. Für die Messungen wurden Elektroden verwendet, die einen elektrischen Widerstand R von 5-9 MΩ aufwiesen.

Die Meßelektroden wurden an die Zellen herangefahren und ein *gigaseal* ausgebildet. Durch Erzeugung eines Unterdrucks wurde das die Kapillare verschließende Membranstück aus der Zellmembran entfernt. Während der Messungen wurde das Membranpotential mit einem *Axopatch 200A* (*Axon Instruments*) Verstärker über einen externen AD-Wandler (*Instrutech Coop.*, *ITC16*) bzw. *EPC9* (*HEKA*) und der Software *Patchmaster* (*HEKA*) auf -70 mV eingestellt.

Extrazelluläre Lösung (ECS)		Intrazelluläre Lösung (ICS/KG40)	
NaCl	150 mM	KCL	30 mM
KCl	3 mM	HEPES	10 mM
MgCl ₂	1 mM	Phosphokreati	10 mM
HEPES	10 mM	n	
CaCl ₂	2 mM	ATG-Mg	4 mM
Glucose	10 mM	GTP-Na	0,3 mM
pH 7,4 eingestellt mit NaOH, ca 310 mOsm		pH 7,3 eingestellt mit KOH, ca 290 mOsm	

6.4.3 Ca²⁺ Fluoreszenz Messungen

Intrazelluläre Calcium-Konzentrationsänderungen wurden mit dem Ca²⁺ Indikator Fura-2 durchgeführt. (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Poenie, 1990) Für die Fluoreszenz-Messungen wurde eine Imago/SensiCam CCD Kamera mit 640x480 chip (Till Photonics, Planegg) verwendet. Der Polychromator IV (Till Photonics, Planegg) war über ein optisches Kabel an das inverse Olympus IX 70 Mikroskop (Olympus, Hamburg) gekoppelt. Die Kamera und der Polychromator wurden mit Hilfe der Software Vision (Version 4.0, Till Photonics (Planegg), Windows-PC) kontrolliert.

Die HEK293 Zellen wurde über die *patch*-Pipette mit Fura-2 (200 μ M in der Pipette) versehen. Aufnahmen erfolgten über 40x 1.15 NA Wasser Immersion (UApo/340) Objektive. Die Datenaufnahme wurde bei 340 nm, 360 nm oder 380 nm (Polychromator, Reflexion über 410 nm dichromatischen Spiegel (DCLP410, Chroma, Fürstenfeldbruck)) durchgeführt. Emissionen wurden mit einem 440 nm *long-pass* Filter (LP440, Chroma, Fürstenfeldbruck) detektiert und die Daten mit 40 x 30 Frames (8 x 8 on-chip Einteilung) für schnelle kinetische Messungen bzw. 80 x 60 Frames (4 x 4) für langsame Lademessungen aufgezeichnet. Die Analyse der Bilder (*analog-to-digital units* (adu)) erfolgte in 12 Bit Grauskalierung. Für Berechnungen der Kinetik wurde der Durchschnittswerte von adu aus der Mitte der Zelle verwendet.

7 Materialien

Die Chemikalien hatten die Qualität *pro analysis* und wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Fluka, Sigma, Gibco™ oder Roche (Mannheim) bezogen. Zum Ansetzen aller Lösungen wurde entionisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage von Millipore (Billerica, USA) verwendet.

Geräte

Brutschränke	Heraeus Instruments, Düsseldorf
DNA-Thermal-Cycler	Biozym, Hessisch Oldendorf
Gene Pulser	Biorad, München
Imago/SensiCam CCD Kamera (640x480 chip)	Till Photonics, Planegg
Kühlzentrifuge J2HS	Beckmann, Krefeld
Laborzentrifuge Sorvall MC 12V	DuPont, Bad Homburg
Laborzentrifuge Biofuge A	Heraeus Christ, Osterode
Mikroinjektor FemtoJet	Eppendorf, Hamburg
Olympus IX 70	Olympus, Hamburg
Polychromator IV	Till Photonics, Planegg
Phosphorimager 445 SI	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Photometer PMQII	Zeiss, Jena
Mikroskope Axiovert	Zeiss, Jena
sterile Werkbank Lamin Air HA 2448 GS	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Wasserbäder	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Laborwaage Basic	Sartorius, Göttingen
Feinwaage Mettler	Spoerhase AG, Gießen

Medien, Antibiotika und Supplemente

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto Trypton	DIFCO, Detroit USA
LB-Medium	nach Sambrook et al(Sambrook J, David, J and Russell, W, 2001)
Chloramphenicol (CA)	Merck, Darmsstadt
Cymeven (Gancyclovir)	Syntex GmbH, Aachen
DMSO	Sigma, Seelze
DMEM	Biochrom, Berlin
ESGROTM (LIF)	GIBCO BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FBS)	GIBCO BRL, Eggenstein
Gelatine	Sigma, Seelze
Geneticin G418	GIBCO BRL, Eggenstein
Glutamin	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Seelze
2-Mercaptoethanol	Sigma, Seelze
Natriumpyruvat	Biochrom, Minden
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Minden
Penicillin	Biochrom, Minden
Streptomycin	Biochrom, Minden

Zellkulturmaterial

Elektroporations-Küvetten 0,4cm	Biorad, München
Kulturschalen	Costar
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden

Antikörper

anti rabbit IgG Cy3 Konjugat	Sigma, Seelze
anti rabbit IgG alkalische Phosphatase(AP) Konjugat	Sigma, Seelze
anti rabbit IgG Peroxidase Konjugat	Sigma, Seelze
anti mouse GLT1	Kanner (Pines <i>et al.</i> , 1992)

Isotope

[α - ³² P]dATP (3000 Ci/mmol, 0,02 μ Ci/ μ l)	Amersham, Freiburg
[α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol, 0,02 μ Ci/ μ l)	Amersham, Freiburg
L-[¹⁴ C]-Glutamat (253mCi/mmol, 0,05 μ Ci/ μ l)	Amersham, Freiburg

Molekularbiologische und biochemische Kits

Quiaex Agarose Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel, Düren
NuPage	Invitrogen, Karlsruhe

Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim
Klenow-Polymerase	Roche, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
	GIBCO BRL, Eggenstein
	Merck, Darmstadt
	New England Biolabs, Ipswich USA
Ribonuklease A (RNase A)	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	GIBCO BRL, Eggenstein
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Trypsin	GIBCO BRL, Eggenstein

Primer

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>GC%</i>	<i>Länge</i>
5'GLT1 rek NheI	gct agc atg gtc agt gcc aac aat atg cc	52	29
3'GLT1 rek BamHI	gga tcc tca tat gca ggt ctc gat atc cag	50	30
GLT I s	ttt ctg ttg cgg ccg cca aca ata ttc cca	50	30
GLT IV as	tcc tca gat gga ggt acc acc aga acc ttc	53	30
m-HGPRT s	gct gac ctg ctg gat tac att aaa gca ctg	47	30
m-HGPRT as	att cct gaa gta ctc att ata gtc aag ggc	40	30
EGFP 3' sense	atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc	67	30

Chromatographie-, Filter- und Filmmaterialien

Agarose für Elektrophoresen	GIBCO BRL, Eggenstein
Biogel P30	Biorad, München
GeneScreenPlus™	NEN
X-OMAT AR Filme	Kodak, Stuttgart
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel

Chemikalien

Acrylamid	Biorad, München
Bisacrylamid	Biorad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
	Fluka, Buchs Schweiz
Dextransulfat	Pharmacia, New York USA
Ethidiumbromid	Sigma, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
IPTG	Gerbu, Gaiberg
Methylenblau	Fluka, Buchs Schweiz
TEMED	Fluka, Buchs Schweiz
x-Gal (2% in DMF)	Gerbu, Gaiberg
Tris	Paesel+Lorey GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Seelze
andere Chemikalien (p.A. oder p.p.A.)	verschiedene

Nukleinsäuren und Nukleosiddtriphosphate

Molekülmassenmarker 1kb-Leiter	GIBCO BRL, Eggenstein
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche, Mannheim

Vektoren

pBlueskript II SK+	Stratagene, La Jolla, USA
pEGFP-C3	Clontech, Palo Alto USA
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe

Organismen

DH5 α	Laborpräparation
--------------	------------------

Software

Axiovision (Mikroskopie)	Zeiss, Jena
Bibus (Referenzen)	http://bibus-biblio.sourceforge.net/wiki/index.php/Main_Page
Bioedit/ClustalX (Alignment)	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
Corel Draw (Graphik)	Corel
Gnumeric (Diagramme)	http://www.gnome.org/projects/gnumeric/
Image Quant (Quantifizierung)	Molecular Dynamics, Sunnyvale USA
OpenOffice.org 2.1 (Text/Tabellen)	http://de.openoffice.org/
Patchmaster/Fitmaster (Clamp)	HEKA, Lambrecht
Photoshop CS	Adobe
Vision	Version 4.0, Till Photonics (Planegg)

8 Abkürzungen

ALS	Amyotrophe Lateral Sklerose
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isazolpropinat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetat
bp	Basenpaare
BS-Medium	<i>Barths modified saline</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
CIP	alkaline phosphatase from calf intestine
cpm	counts per minute
DHA	Docosahexaensäure
DHK	Dihydrokainat
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAAT	<i>excitatory amino acid transporter</i>
EAAC	<i>excitatory amino acid carrier</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FBS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
g	Erdbeschleunigung = $9,81\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$
Ganc	Gancyclovir
HEPES	2[-4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl(1)]-ethansulfonsäure

HP	<i>hairpin</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAA	L- α -Aminoacidipat
LBA	L- β -Aminoacidipat
LSM	konfokalen Lasermikroskopieaufnahmen
LIF	Leukaemia inhibitory factor
LTP	<i>long-term potentiation</i>
M	Molar
mRNA	messenger RNA
neo	Neomycin Phosphotransferase
neo-box	Neomycin Phosphotransferase-Gen mit Promotor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PNS	peripheres Nervensystem
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium -n- Dodecylsulfat
SOD-1	Superoxid-Dismutase
TE	Tris-EDTA
THA	DL-threo-3-Hydroxyaspartat
TM	Transmembrandomäne
tk	Thymidin Kinase
tk-box	Thymidin Kinase-Gen mit Promotor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit, Einheit für die Enzymaktivität
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

- Alan L. Goldin and Katumi Sumikawa (). "Methods in Enzymology" Ion Channels "Preparation of RNA for Injection into Xenopus Oocytes" **207**, .
- Aramori, I. & Nakanishi, S. (1992). Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells *Neuron* **8**, 757-765.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P. & Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4155-4160.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P. & Amara, S.G. (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex *J Neurosci* **14**, 5559-5569.
- Ascher, P. & Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture *J Physiol* **399**, 247-266.
- Barbour, B., Brew, H. & Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium *Nature* **335**, 433-435.
- Barbour, B., Szatkowski, M., Ingledew, N. & Attwell, D. (1989). Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells *Nature* **342**, 918-920.
- Bashir, Z.I., Bortolotto, Z.A., Davies, C.H., Berretta, N., Irving, A.J., Seal, A.J., Henley, J.M., Jane, D.E., Watkins, J.C. & Collingridge, G.L. (1993). Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors *Nature* **363**, 347-350.
- Beal, M.F. (1992). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases *FASEB J* **6**, 3338-3344.
- Bendahan, A., Armon, A., Madani, N., Kavanaugh, M.P. & Kanner, B.I. (2000). Arginine 447 plays a pivotal role in substrate interactions in a neuronal glutamate transporter *J Biol Chem* **275**, 37436-37442.
- Berry, C.B., Hayes, D., Murphy, A., Wiessner, M., Rauen, T. & McBean, G.J. (2005). Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. *Brain Res* **1037**, 123-133.
- Birnboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243-255.

- Blakely, R.D., Robinson, M.B. & Amara, S.G. (1988). Expression of neurotransmitter transport from rat brain mRNA in *Xenopus laevis* oocytes *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9846-9850.
- Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus *Nature* **361**, 31-39.
- Brocke, L., Bendahan, A., Grunewald, M. & Kanner, B.I. (2002). Proximity of two oppositely oriented reentrant loops in the glutamate transporter GLT-1 identified by paired cysteine mutagenesis *J Biol Chem* **277**, 3985-3992.
- Bruhwyler, J., Chleide, E., Liegeois, J.F. & Carreer, F. (1993). Nitric oxide: a new messenger in the brain *Neurosci Biobehav Rev* **17**, 373-384.
- Burger, P.M., Mehl, E., Cameron, P.L., Maycox, P.R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P. & Jahn, R. (1989). Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate *Neuron* **3**, 715-720.
- Campbell, G.L., Shank, R.P. (1983). Uptake of glutamate and GABA in synaptosomal and enriched cell populations of cerebellum *Glutamine, Glutamate and GABA in the central nervous system. Alan R. Liss, Inc., New York* , 343-354.
- Casado, M., Bendahan, A., Zafra, F., Danbolt, N.C., Aragon, C., Gimenez, C. & Kanner, B.I. (1993). Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C *J Biol Chem* **268**, 27313-27317.
- Chapman, A.G. (2000). Glutamate and epilepsy *J Nutr* **130**, 1043S-5S.
- Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C. & Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry *Neuron* **15**, 711-720.
- Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system *Neuron* **1**, 623-634.
- Clements, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E. & Westbrook, G.L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft *Science* **258**, 1498-1501.
- Collard, J.F., Cote, F. & Julien, J.P. (1995). Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis *Nature* **375**, 61-64.
- Colman, A. (1984). in: Transcription and Translation: A Practical Approach Hrsg. Hames, B.D. & Higgins, S.J., IRL, Oxford, 217-302 , .

- Conradt, M. & Stoffel, W. (1995). Functional analysis of the high affinity, Na(+)-dependent glutamate transporter GLAST-1 by site-directed mutagenesis *J Biol Chem* **270**, 25207-25212.
- Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J.D. & Melone, M. (1998). EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex *Cereb Cortex* **8**, 108-116.
- Danbolt, N.C. (1994). The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain *Prog Neurobiol* **44**, 377-396.
- Danbolt, N.C., Pines, G. & Kanner, B.I. (1990). Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain *Biochemistry* **29**, 6734-6740.
- Dehnes, Y., Chaudhry, F.A., Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J. & Danbolt, N.C. (1998). The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia *J Neurosci* **18**, 3606-3619.
- Drejer, J., Meier, E. & Schousboe, A. (1983). Novel neuron-related regulatory mechanisms for astrocytic glutamate and GABA high affinity uptake *Neurosci Lett* **37**, 301-306.
- Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals *J Morphol* **136**, 153-179.
- Dunlop, J., Lou, Z., Zhang, Y. & McIlvain, H.B. (1999). Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter *Br J Pharmacol* **128**, 1485-1490.
- Erecinska, M. & Silver, I.A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain *Prog Neurobiol* **35**, 245-296.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P. & Amara, S.G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel *Nature* **375**, 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**, 3596-3605.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain *J Neurochem* **42**, 1-11.
- Fuchs, P.A. & Evans, M.G. (1988). Voltage oscillations and ionic conductances in hair cells isolated from the alligator cochlea. *J Comp Physiol [A]* **164**, 151-163.
- Gegelashvili, G. & Schousboe, A. (1998). Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters *Brain Res Bull* **45**, 233-238.

- Gegelashvili, G., Danbolt, N.C. & Schousboe, A. (1997). Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia *J Neurochem* **69**, 2612-2615.
- Gegelashvili, G., Dehnes, Y., Danbolt, N.C. & Schousboe, A. (2000). The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms *Neurochem Int* **37**, 163-170.
- Greene, J.G. (1999). Mitochondrial function and NMDA receptor activation: mechanisms of secondary excitotoxicity *Funct Neurol* **14**, 171-184.
- Grunewald, M. & Kanner, B. (1995). Conformational changes monitored on the glutamate transporter GLT-1 indicate the existence of two neurotransmitter-bound states *J Biol Chem* **270**, 17017-17024.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- Gundersen, V., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen, J. (1993). Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience* **57**, 97-111.
- Hartinger, J. & Jahn, R. (1993). An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles *J Biol Chem* **268**, 23122-23127.
- Haugeto, O., Ullensvang, K., Levy, L.M., Chaudhry, F.A., Honore, T., Nielsen, M., Lehre, K.P. & Danbolt, N.C. (1996). Brain glutamate transporter proteins form homomultimers *J Biol Chem* **271**, 27715-27722.
- Hayes, D., Wiessner, M., Rauen, T. & McBean, G.J. (2005). Transport of L-[14C]cystine and L-[14C]cysteine by subtypes of high affinity glutamate transporters over-expressed in HEK cells. *Neurochem Int* **46**, 585-594.
- Johnson, R. (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport *Physiol Rev* **68**, 232-307.
- Kanai, Y. & Hediger, M.A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter *Nature* **360**, 467-471.
- Kanai, Y., Smith, C.P. & Hediger, M.A. (1993). The elusive transporters with a high affinity for glutamate *Trends Neurosci* **16**, 365-370.
- Kanai, Y., Stelzner, M., Nussberger, S., Khawaja, S., Hebert, S.C., Smith, C.P. & Hediger, M.A. (1994). The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport *J Biol Chem* **269**, 20599-20606.

Kanner, B. (1993a). Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family *FEBS Lett* **325**, 95-99.

Kanner, B.I. (1993b). Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family *FEBS Lett* **325**, 95-99.

Kanner, B.I. (1994). Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation *J Exp Biol* **196**, 237-249.

Kanner, B.I. & Schuldiner, S. (1987). Mechanism of transport and storage of neurotransmitters *CRC Crit Rev Biochem* **22**, 1-38.

Kavanaugh, M.P., Bendahan, A., Zerangue, N., Zhang, Y. & Kanner, B.I. (1997). Mutation of an amino acid residue influencing potassium coupling in the glutamate transporter GLT-1 induces obligate exchange *J Biol Chem* **272**, 1703-1708.

Kim, J.W., Closs, E.I., Albritton, L.M. & Cunningham, J.M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor *Nature* **352**, 725-728.

Kirschner, M.A., Arriza, J.L., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Magenis, E. & Amara, S.G. (1994). The mouse and human excitatory amino acid transporter gene (EAAT1) maps to mouse chromosome 15 and a region of syntenic homology on human chromosome 5. *Genomics* **22**, 631-633.

Klockner, U., Storck, T., Conradt, M. & Stoffel, W. (1994). Functional properties and substrate specificity of the cloned L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 from rat brain expressed in *Xenopus* oocytes *J Neurosci* **14**, 5759-5765.

LaFerla, F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **3**, 862-872.

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

Leissring, M.A., Akbari, Y., Fanger, C.M., Cahalan, M.D., Mattson, M.P. & LaFerla, F.M. (2000). Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol* **149**, 793-798.

Levy, L.M., 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⁺-dependent glutamate uptake *J Neurosci* **18**, 9620-9628.

Lopez, G.H., Ilincheta de Boscherio, M.G., Castagnet, P.I. & Giusto, N.M. (1995). Age-associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **112**, 331-343.

Malinow, R., Schulman, H. & Tsien, R.W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP *Science* **245**, 862-866.

- Marcus Conradt (1996). Der gehirnspezifische Glutamattransporter GLAST-1 - Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Regulation durch in-vitro-Mutagenese *Dissertation* , .
- Markus Numberger, A.D. (1996). Patch-Clamp-Technik *Spektrum-Akademischer Vlg* , .
- Masliah, E., Alford, M., DeTeresa, R., Mallory, M. & Hansen, L. (1996). Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease *Ann Neurol* **40**, 759-766.
- Matute, C., Domercq, M., Fogarty, D.J., Pascual de Zulueta, M. & Sanchez-Gomez, M.V. (1999). On how altered glutamate homeostasis may contribute to demyelinating diseases of the CNS *Adv Exp Med Biol* **468**, 97-107.
- Meldrum, B. & Garthwaite, J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease *Trends Pharmacol Sci* **11**, 379-387.
- Mennerick, S., Dhond, R.P., Benz, A., Xu, W., Rothstein, J.D., Danbolt, N.C., Isenberg, K.E. & Zorumski, C.F. (1998). Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures *J Neurosci* **18**, 4490-4499.
- Mitrovic, A.D., Amara, S.G., Johnston, G.A. & Vandenberg, R.J. (1998). Identification of functional domains of the human glutamate transporters EAAT1 and EAAT2 *J Biol Chem* **273**, 14698-14706.
- Mukainaka, Y., Tanaka, K., Hagiwara, T. & Wada, K. (1995). Molecular cloning of two glutamate transporter subtypes from mouse brain *Biochim Biophys Acta* **1244**, 233-237.
- Mulhardt C. (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg* , .
- Muller, D., Buchs, P.A., Stoppini, L. & Boddeke, H. (1991). Long-term potentiation, protein kinase C, and glutamate receptors *Mol Neurobiol* **5**, 277-288.
- Naito, S. & Ueda, T. (1983). Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles *J Biol Chem* **258**, 696-699.
- Naito, S. & Ueda, T. (1985). Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles *J Neurochem* **44**, 99-109.
- Nakayama, T., Kawakami, H., Tanaka, K. & Nakamura, S. (1996). Expression of three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions and peripheral tissues *Brain Res Mol Brain Res* **36**, 189-192.
- Nicholls, D. & Attwell, D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids *Trends Pharmacol Sci* **11**, 462-468.

- Nicoletti, F., Bruno, V., Catania, M.V., Battaglia, G., Copani, A., Barbagallo, G., Cena, V., Sanchez-Prieto, J., Spano, P.F. & Pizzi, M. (1999). Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection *Neuropharmacology* **38**, 1477-1484.
- Nicoll, R.A., Malenka, R.C. & Kauer, J.A. (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system *Physiol Rev* **70**, 513-565.
- Noble, D. & Powell, T. (1991). The slowing of Ca²⁺ signals by Ca²⁺ indicators in cardiac muscle. *Proc Biol Sci* **246**, 167-172.
- Northington, F.J., Traystman, R.J., Koehler, R.C. & Martin, L.J. (1999). GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain *J Neurobiol* **39**, 515-526.
- O'Neill, C.M., Ball, S.G. & Vaughan, P.F. (1994). Effects of ischaemic conditions on uptake of glutamate, aspartate, and noradrenaline by cell lines derived from the human nervous system *J Neurochem* **63**, 603-611.
- Ogawa, W., Kim, Y.M., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (1998). Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter *J Bacteriol* **180**, 6749-6752.
- Okamoto, K. & Sekiguchi, M. (1991). Synaptic receptors and intracellular signal transduction in the cerebellum *Neurosci Res* **9**, 213-237.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S. & Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling *Nature* **369**, 744-747.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E. & Kanner, B.I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter *Nature* **360**, 464-467.
- Poenie, M. (1990). Alteration of intracellular Fura-2 fluorescence by viscosity: a simple correction. *Cell Calcium* **11**, 85-91.
- Rauen, T. & Kanner, B.I. (1994). Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae *Neurosci Lett* **169**, 137-140.
- Rauen, T., Jeserich, G., Danbolt, N.C. & Kanner, B.I. (1992). Comparative analysis of sodium-dependent L-glutamate transport of synaptosomal and astroglial membrane vesicles from mouse cortex *FEBS Lett* **312**, 15-20.
- Rauen, T., Wiessner, M., Sullivan, R., Lee, A. & Pow, D.V. (2004). A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT1c in the mammalian retina and brain *Neurochem Int* **45**, 1095-1106.

Rehm H (2000). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg* , .

Rhoads, D.E., Ockner, R.K., Peterson, N.A. & Raghupathy, E. (1983). Modulation of membrane transport by free fatty acids: inhibition of synaptosomal sodium-dependent amino acid uptake *Biochemistry* **22**, 1965-1970.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P. & Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis *Nature* **362**, 59-62.

Rothstein, J.D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M. & Kuncl, R.W. (1993). Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6591-6595.

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

Rothstein, J.D., Martin, L.J. & Kuncl, R.W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis *N Engl J Med* **326**, 1464-1468.

Ryan, R.M., Mitrovic, A.D. & Vandenberg, R.J. (2004). The chloride permeation pathway of a glutamate transporter and its proximity to the glutamate translocation pathway *J Biol Chem* **279**, 20742-20751.

Sahai, S. (1990). Glutamate in the mammalian CNS *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **240**, 121-133.

Sambrook J, David, J and Russell, W (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* , .

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

Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B. & Kugler, P. (1997). Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry *J Neurosci* **17**, 1-10.

Schultz, K. & Stell, W.K. (1996). Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species *Neurosci Lett* **211**, 191-194.

Seal, R.P., Leighton, B.H. & Amara, S.G. (2000). A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines *Neuron* **25**, 695-706.

- Seeburg, P.H. (1993). The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels *Trends Pharmacol Sci* **14**, 297-303.
- Shaw, P.J. (1994). Excitotoxicity and motor neurone disease: a review of the evidence *J Neurol Sci* **124 Suppl**, 6-13.
- Shaw, P.J. (1999). Calcium, glutamate, and amyotrophic lateral sclerosis: more evidence but no certainties *Ann Neurol* **46**, 803-805.
- Slotboom, D.J., Lolkema, J.S. & Konings, W.N. (1996). Membrane topology of the C-terminal half of the neuronal, glial, and bacterial glutamate transporter family *J Biol Chem* **271**, 31317-31321.
- Soderling, T.R., Tan, S.E., McGlade-McCulloh, E., Yamamoto, H. & Fukunaga, K. (1994). Excitatory interactions between glutamate receptors and protein kinases *J Neurobiol* **25**, 304-311.
- Sommer, B. & Seeburg, P.H. (1992). Glutamate receptor channels: novel properties and new clones *Trends Pharmacol Sci* **13**, 291-296.
- Storck, T. (1994). Ein Na-abhängiger Transporter/Aspartat-Transporter aus dem zentralen Nervensystem der Ratte: Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung *Dissertation, Universität zu Köln*, .
- 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**, 10955-10959.
- Swanson, R.A., Farrell, K. & Stein, B.A. (1997). Astrocyte energetics, function, and death under conditions of incomplete ischemia: a mechanism of glial death in the penumbra *Glia* **21**, 142-153.
- Szatkowski, M., Barbour, B. & Attwell, D. (1990). Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake *Nature* **348**, 443-446.
- Tanaka, K. (1993a). Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain *Neurosci Lett* **159**, 183-186.
- Tanaka, K. (1993b). Expression cloning of a rat glutamate transporter *Neurosci Res* **16**, 149-153.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T. et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1 *Science* **276**, 1699-1702.
- Tate, S.S., Urade, R., Getchell, T.V. & Udenfriend, S. (1989). Expression of the mammalian Na+-independent L system amino acid transporter in *Xenopus laevis* oocytes *Arch Biochem Biophys* **275**, 591-596.

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

Torp, R., Hoover, F., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J. & Ottersen, O.P. (1997). Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and EAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis *Anat Embryol (Berl)* **195**, 317-326.

Tsien, R.Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**, 2396-2404.

Velaz-Faircloth, M., McGraw, T.S., Alandro, M.S., Fremeau, R.T.J., Kilberg, M.S. & Anderson, K.J. (1996). Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain *Am J Physiol* **270**, C67-75.

Voisin, P., Viratelle, O., Girault, J.M., Morrison-Bogorad, M. & Labouesse, J. (1993). Plasticity of astroglial glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake in cell cultures derived from postnatal mouse cerebellum *J Neurochem* **60**, 114-127.

Wadiche, J.I., Amara, S.G. & Kavanaugh, M.P. (1995). Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport *Neuron* **15**, 721-728.

Wahle, S. & Stoffel, W. (1996). Membrane topology of the high-affinity L-glutamate transporter (GLAST-1) of the central nervous system *J Cell Biol* **135**, 1867-1877.

Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T. & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci* **9**, 816-823.

Williams, J.H., Errington, M.L., Lynch, M.A. & Bliss, T.V. (1989). Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus *Nature* **341**, 739-742.

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**, 2013-2017.

Yamaguchi, S., Endo, K., Kitajima, T., Ogata, H. & Hori, Y. (1998). Involvement of the glutamate transporter and the sodium-calcium exchanger in the hypoxia-induced increase in intracellular Ca²⁺ in rat hippocampal slices. *Brain Res* **813**, 351-358.

Yang, Y., Kinney, G.A., Spain, W.J., Breitner, J.C.S. & Cook, D.G. (2004). Presenilin-1 and intracellular calcium stores regulate neuronal glutamate uptake. *J Neurochem* **88**, 1361-1372.

Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y. & Gouaux, E. (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii* *Nature* **431**, 811-818.

- Yoo, A.S., Cheng, I., Chung, S., Grenfell, T.Z., Lee, H., Pack-Chung, E., Handler, M., Shen, J., Xia, W., Tesco, G. et al. (2000). Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron* **27**, 561-572.
- Zafra, F., Alcantara, R., Gomeza, J., Aragon, C. & Gimenez, C. (1990). Arachidonic acid inhibits glycine transport in cultured glial cells *Biochem J* **271**, 237-242.
- Zarbiv, R., Grunewald, M., Kavanaugh, M.P. & Kanner, B.I. (1998). Cysteine scanning of the surroundings of an alkali-ion binding site of the glutamate transporter GLT-1 reveals a conformationally sensitive residue *J Biol Chem* **273**, 14231-14237.
- Zerangue, N. & Kavanaugh, M.P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter *Nature* **383**, 634-637.
- Zerangue, N., Arriza, J.L., Amara, S.G. & Kavanaugh, M.P. (1995). Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J Biol Chem* **270**, 6433-6435.
- Zhang, Y. & Kanner, B.I. (1999). Two serine residues of the glutamate transporter GLT-1 are crucial for coupling the fluxes of sodium and the neurotransmitter *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1710-1715.
- Zhang, Y., Bendahan, A., Zarbiv, R., Kavanaugh, M.P. & Kanner, B.I. (1998). Molecular determinant of ion selectivity of a (Na⁺ + K⁺)-coupled rat brain glutamate transporter *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 751-755.
- Zhang, Y., Pines, G. & Kanner, B.I. (1994). Histidine 326 is critical for the function of GLT-1, a (Na⁺ + K⁺)-coupled glutamate transporter from rat brain *J Biol Chem* **269**, 19573-19577.
- Zhou, J. & Sutherland, M.L. (2004). Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity *J Neurosci* **24**, 6301-6306.
- Zhu, B.G., Chen, Y.Z. & Xing, B.R. (1999). Effect of calcium on the uptake of glutamate by synaptosomes: possible involvement of two different mechanisms. *J Neural Transm* **106**, 257-264.

Zusammenfassung

Der Glutamattransporter GLT-1 ist ein Transmembranprotein, das im ZNS überwiegend in Astrozyten lokalisiert ist. Seine Funktion als hochaffiner, Na^+ -abhängiger Transporter besteht in der Entfernung des Neurotransmitters Glutamat aus dem synaptischen Spalt. Dies ermöglicht eine getreue Signalweiterleitung und die Vermeidung von exzitatorischer Schädigung.

Von den Glutamattransportern GLT-1 und den fluoreszierenden GLT-1 wie auch GLAST-1 und EAAC1, die am N-Terminus mit dem fluoreszierenden Polypeptid EGFP fusioniert sind, sind Konstrukte für die heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293 Zellen (*human embryonic kidney*) erstellt worden. Die Untersuchungen dieser Arbeit belegen, daß GLT-1 als auch das Fusionsprotein während des *Zell-targeting* korrekt prozessiert und funktionell in die Plasmamembran eingebaut werden.

Deshalb wurden die Konstrukte zur Charakterisierung von GLT-1 in Neurotransmitter Aufnahmestudien in GLT-1 transfizierten *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293 Zellen mit radioaktiv markiertem L- ^{14}C -Glutamat, als auch in elektrophysiologischen *whole-cell voltage*- und *patch-clamp* Experimenten angewandt. Die Ionenspezifität für Na^+ -Ionen, K_M -Werte von Glutamat und Na^+ -Ionen, die Kinetik der Glutamataufnahme und verschiedene Inhibitoren des GLT-1 Transporters wurden ermittelt. Die vorliegende Arbeit beschreibt zusätzlich den Einfluß von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen auf den Transport von Glutamat. Im Gegensatz zu Na^+ wird Ca^{2+} nicht von GLT-1 transportiert, Ca^{2+} -Ionen beeinflussen aber den Transport von L-Glutamat. Diese Beobachtungen erweitern unsere Kenntnisse über den Effekt von intrazellulärem Ca^{2+} hinaus auf die GluT Familie.

Strukturanaloge Substrate des natürlichen Neurotransmitters Glutamat sind genauer klassifiziert worden. Zusätzlich zur endständigen geladenen Carboxylgruppe oder der SH-Gruppe in Liganden, konnte die essentielle Bedeutung der Aminogruppe in

α -Position – wie in L- α -Aminoadipat – für die Bindung des Liganden bewiesen werden. Ungeladene Aminosäuren oder β -Aminosäuren, wie L- β -Aminoadipat, zeigen dagegen keinen Einfluß auf den Transport von L-Glutamat. Es wurde gezeigt, daß GLT-1, ähnlich wie GLAST-1, L-Aspartat transportieren kann.

Abstract

Glutamate transporter GLT-1 is a transmembrane protein, which is mainly localized in astrocytes of the CNS. GLT-1 is a high affinity Na⁺ dependent transporter, which removes the neurotransmitter glutamate from the synaptical cleft, an essential process required for defined signal transduction and to avoid excitatory damage.

Glutamate transporter GLT-1 and fluorescent GLT-1 as well as GLAST-1 and EAAC1, which contained the transporter-polypeptide fused to the fluorescent protein EGFP at the N-terminal end of the glutamate transporter were constructed for heterologous expression in *Xenopus laevis* oocytes and HEK293 (human embryonic kidney) cells. The experiments described here prove, that GLT-1 and likewise the fusionprotein are targeted during the cellular transport to and functionally incorporated into the the plasmamembrane. Therefore the fluorescent-labeled GLT-1 and likewise GLAST-1 and EAAC1, two other members of the glutamate transporter family, heterologously expressed in different cell system, like *Xenopus oocytes* and HEK293 cells, proved to be valuable tools for cell biological, biochemical and electrophysiological studies in the characterization of these excitatory glutamate transporters.

Neurotransmitter uptake studies in GLT-1 transfected *Xenopus oocytes* and HEK293 cells used radioactive labeled L-[¹⁴C]-glutamate associated with the method of choice, the electrophysiological whole cell voltage- and patch-clamp experiment, were applied to the characterization of GLT-1. The ion specificity for Na⁺ ions, K_M values of glutamate and Na⁺ ions, the kinetics of glutamate uptake and several inhibitors of the GLT-1 transporter were established. The present work also describes the influence of Ca²⁺ ions on glutamate transport. Unlike Na⁺, Ca²⁺ ions are not transported by GLT-1 but affect the transport of L-glutamate. These observations expand our view of the effect of intracellular Ca²⁺ on the GluT family.

The structural requirements of ligands with structures analogous to the genuine neurotransmitter glutamate have been classified more exactly. In addition to the terminal charged carboxyl-group or the SH-group in ligands, the amino group in α -position – as in L- α -aminoadipate - turned out to be essential for the binding properties of ligands. Uncharged amino acids or β -amino acids, as L- β -aminoadipate, do not show any influence on the transport of L-glutamate. It is shown that GLT-1 has a similar ability to transport L-aspartat as GLAST-1.

Erklärung

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen), die anderen im Wortlaut oder im Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel betreut worden.

Robert Günter

Köln, den 02.02.2007

Lebenslauf

Name, Vorname	Günter, Robert Heinz
Geburtsdatum/-ort	30.07.1975 Orsoy/Rheinberg
Eltern	Helga Günter geb. Lorenz Heinz-Albert Günter
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	
1983 - 1987	Ernst-Moritz-Arndt Grundschule Neukirchen-Vluyn
1987 - 1993	Julius-Stursberg Gymnasium Neukirchen-Vluyn
1993 - 1995	Grafschafter Gymnasium Moers
Hochschulbildung	
10/1995 - 03/1999	Studium der Biologie an der Universität zu Rostock
03/1999- - 08/2002	Studium der Biologie an der Universität zu Köln Diplomarbeit im Institut für Biochemie Laboratorium für molekulare Neurowissenschaften (Med. Fakultät) der Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel
09/2002 - 04/2007	Promotionsarbeit im Institut für Biochemie Laboratorium für molekulare Neurowissenschaften (Med. Fakultät) der Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel
03/2006	<i>Voltage-clamp</i> Studien an der Universität zu Jena
05/2006 - 01/2007	<i>Patch-clamp</i> Studien am Forschungszentrum Jülich

Köln, Februar 2007