Abteilung Anatomie und Zellbiologie Prof. Dr. Tobias M. Böckers Universität Ulm

Regulation des glialen Glutamattransports durch den Wachstumsfaktor ,,Fibroblast growth factor 2" (FGF-2)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

> Tobias Maucher Freiburg im Breisgau 2003

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Reinhard Marre

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Engele

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Albert C. Ludolph

Tag der Promotion: 15.1.2004

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen	6
2.	Einleitung	9
	2.1 Glutamat	9
	2.2 Glutamattransporter	10
	2.3 Regulation des Glutamattransports	12
	2.4 FGF-2	13
	2.5 Glialer Glutamattransport und ZNS-Pathologie	14
	2.6 Fragestellung dieser Arbeit	15
3.	Material und Methoden	16
	3.1 Materialien	16
	3.1.1 Allgemeines	16
	3.1.2 Versuchstiere	16
	3.1.3 Zellkultur	16
	3.1.4 Proteinisolation, Proteinkonzentrationsmessung und Western-Blot	17
	3.1.5 Real-Time-RT-PCR	17
	3.1.6 Immunzytochemie	18
	3.1.7 Glutamataufnahme-Messung	18
	3.2 Rezepte	19
	3.2.1 Zellkultur	19
	3.2.2 Immunzytochemie	20
	3.2.3 Proteinisolation, Proteinkonzentrationsmessung und Western-Blot	20
	3.2.4 Glutamataufnahme-Messung	21
	3.3 Methoden	23
	3.3.1 Haltung der Versuchstiere	23
	3.3.2 Gliakultur	23
	3.3.3 Immunzytochemische Färbung der Gliakulturen	24
	3.3.4 Proteinisolation und Proteinbestimmung	24
	3.3.5 Western-Blot-Analyse	25
	3.3.6 Bestimmung der glialen Glutamataufnahme	26
	3.3.7 Real-time RT-PCR	27
	3.4 Statistik	28

4. Ergebnisse	29
4.1 Charakterisierung der Gliakulturen	29
4.2 Wirkung von FGF-2 auf die Glutamattransporter-Expression	30
4.3 Einflüsse von FGF-2 auf die gliale Glutamataufnahme	34
4.4 Signalwege bei der Stimulation der Glutamattransporter-Expression durch	I
FGF-2/PD98059	.36
4.5 Effekte von FGF-2/PD98059 auf die Glia-Morphologie	38
5 Diskussion	20
5. Diskussion	39
5.1 Untersuchung des glialen Glutamattransports an primaren	
Astrozytenkulturen	39
5.2 Steigerung der glialen Glutamattransporter-Expression durch FGF-	
2/PD98059 und daran beteiligte Signalwege	41
5.3 Unabhängigkeit von morphologischer Gliadifferenzierung und	
Glutamattransporter-Expression	45
5.4 Glialer Glutamattransport und ZNS-Pathologie	46
5.5 Schlussfolgerung	47
6. Zusammenfassung	.48
7. Literatur	50
8. Danksagung	.64

1. Abkürzungen

<u>Abkürzung:</u>	Bedeutung:
ABC	Avidin-Biotin Peroxidase-Komplex
AK	Antikörper
Akt	Eine Proteinkinase
ALS	Amyotrophische Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxasol-4-
	Propionat
AMPAr	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxasol-4-
	Propionat-Rezeptor
AP-1	Heterodimerer Transkriptionsfaktor
ASCT-1/-2	Amino acid transporter 1/2
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREB	cAMP response element binding protein
DAB	3,3'-Diaminobenzindintetrahydrochloriddihydrat
dbcAMP	Dibutyryl-zyklisches Adenosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAAC	Excitatory amino acid carrier
EAAT	Excitatory amino acid transporter
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal related kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
	(entspricht: bFGF=basic fibroblast growth factor)
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung

Abkürzung:	Bedeutung:
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamate aspartate transporter
GLT-1	Glutamate transporter 1
Gö6976	Ein PKC-Inhibitor
GTRAP	Glutamate transporter associated protein
h	Stunde(n)
H89	Ein PKA-Inhibitor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HSP-90	Ein Hitze-Schock-Protein
ΙκΒ	NF-κB-Regulator
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
I	Liter
Ly294002	Ein PKB/Akt/PI3K-Inhibitor
Μ	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
MEK	MAP-/ERK-Kinase
MEM	Minimal essential medium
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
M-MLV	Reverse-Transkriptase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRP	Meerretichperoxidase
n	Anzahl der Stichproben/Werte
NF-κB	Nuclear factor κΒ
ng	Nanogramm
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAr	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
р	Konfidenzintervall
PAC1	PACAP-Rezeptor 1
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PACAP-(6-38)	Ein PACAP-Rezeptor-Antagonist
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

Abkürzung:	<u>Bedeutung:</u>	
PD98059	MAP-Kinase-Inhibitor	
PDGF	Platelet-derived growth factor	
PDTC	1-Pyrrolidincarbodithionische Säure	
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	
РКА	Protein-Kinase A	
РКВ	Protein-Kinase B	
РКС	Protein-Kinase C	
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	
PS	Pferdeserum	
S	Substratkonzentration	
RNA	Ribonukleinsäure	
Raf	Eine Seronin-/Thyrosin-Kinase	
RT	Reverse Transkription	
SDS	Dodezylsulfat-Natriumsalz	
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
TGFα	Transforming growth factor α	
ΤΝFα	Tumor-Nekrose-Faktor α	
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)	
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit in der	
	Michaelis-Menten-Gleichung	
ZNS	Zentralnervensystem	

2. Einleitung

2.1 Glutamat

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS des Säugers und steuert im erwachsenen Hirn auch plastische Prozesse, wie sie beispielsweise der Gedächtnisbildung zugrunde liegen (Bashir et al., 1993; Bliss und Collingridge, 1993). Während der Hirnentwicklung kontrolliert Glutamat die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen und induziert anschließend deren funktionelle und morphologische Differenzierung (Gallo und Ghiani, 2000). Glutamat wirkt über zwei unterschiedliche Rezeptortypen. Zum einen über sogenannte ionotrophe Glutamatrezeptoren, die als ligandengesteuerte Ionenkanäle fungieren und aufgrund ihrer Selektivität gegenüber den Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDAr), α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxasol-4-Propionat (AMPAr) sowie Kainat (Kainat-Rezeptor) weiter unterteilt werden (Hollmann und Heinemann, 1994; Nakanishi, 1992). Zum anderen über G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine, die als metabotrope Glutamatrezeptoren zusammengefasst werden und zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege/-proteine wie der Phospholipase C oder der Adenylatzyklase führen (Conn und Pin, 1997; Nakanishi, 1994; Pin und Duvoisin, 1995). In hohen extrazellulären Konzentrationen stellt Glutamat ein äußerst potentes Neurotoxin dar, welches zu einer Überstimulation von Neuronen und zum neuronalen Zelltod führt. Für diese sogenannte Exzitotoxizität werden verschiedene Pathomechanismen diskutiert, die sich unter anderem in der Geschwindigkeit der Zellschädigung unterscheiden: Die Aktivierung von AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren sowie metabotropen Rezeptoren der Gruppe I führt zum Na²⁺-Einstrom in die Zelle und dadurch zu einer raschen osmotischen Zellschädigung (McDonald et al., 1998; Leigh und Meldrum, 1996; Nicoletti et al., 1996; Saroff et al., 2000). Die Aktivierung vor allem des NMDA-Rezeptors ist mit einer Erhöhung der zytoplasmatischen Ca++-Konzentration verbunden. Eine hohe intrazelluläre Ca++-Konzentration beeinflusst die Aktivität vieler Enzyme (darunter Proteasen, Endonukleasen, Phosholipasen, Stickoxidsynthetase) und führt so längerfristig zu Veränderungen im Energiestoffwechsel, zur Entstehung von freien Radikalen und konsekutiver oxidativer Zellschädigung (Urushitani et al., 2001).

2.2 Glutamattransporter

Synaptisch freigesetztes Glutamat wird äußerst rasch von hochaffinen, natriumabhängigen Glutamattransportern aus dem Extrazellulärraum entfernt (Abb. 1). Diese Glutamatwiederaufnahme dient sowohl der Beendigung der glutamergen Neurotransmission und damit der Wiederherstellung eines hohen Signal-Rausch-Verhältnisses an der Synapse als auch der Verhinderung hoher (neurotoxischer) Glutamatkonzentrationen. Bisher sind bei Nagern und Mensch insgesamt fünf Glutamattransporter identifiziert worden, die in zwei unterschiedlichen Nomenklaturen als GLAST/EAAT-1, GLT-1/EAAT-2, EAAC-1/EAAT-3, EAAT-4 und EAAT-5 bezeichnet werden (Pines et al., 1992; Kanai und Hediger, 1992; Storck et al. 1992; Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1994; Arriza et al., 1997). Alle diese Transporter zeigen eine etwa 50% ige Sequenzhomologie (Kanner, 1993; Kanai et al., 1993; Danbolt, 1994; Gegelashvili und Schousboe, 1997; Robinson und Dowd, 1997; Amara, 1996) und bilden eine Genfamilie mit den neutralen Aminosäure-Transportern ASCT-1 und ASCT-2. Außerdem bestehen Sequenzhomologien mit bakteriellen Glutamattransportern und Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch PKC und PKA (Arriza et al., 1993; Shafqat et al., 1993; Utsunomiya-Tate et al., 1996; Nelson, 1998). Zu anderen Neurotransporter-Familien bestehen keine strukturellen Ähnlichkeiten. Diese Glutamattransporter arbeiten als Antiporter; nach der gegenwärtigen Vorstellung transportieren sie jeweils ein Glutamatmolekül zusammen mit drei Na⁺-Ionen ins Zellinnere und im Gegenzug ein H⁺-Ion und ein K⁺-Ion in den Extrazellulärraum (Zerangue und Kavanaugh, 1996; Levy et al., 1998). Der transmembranäre Ionengradient liefert die hierfür benötigte Energie. Es ist außerdem bekannt, dass Glutamattransporter auch als ligandengesteuerte Chloridkanäle fungieren. Die höchste Chloridleitfähigkeit wurde für EAAT-4 und EAAT-5 gemessen, welche andererseits eine geringe Glutamataufnahme-Kapazität besitzen. Die Transporter mit hoher Glutamataufnahme-Kapazität (EAAT-1,-2 und -3) haben hingegen eine niedrige Chloridleitfähigkeit (Lester et al., 1996, zur Übersicht). Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass EAAT-3 und EAAT-4 mit sogenannten "Glutamate transporter associated proteins" gekoppelt sind, welche den Glutamattransport beschleunigen oder hemmen (Lin et al., 2001). Die einzelnen Glutamattransporter-Subtypen werden im Gehirn sowohl Zelltypauch Hirnregionen-spezifisch exprimiert: EAAC-1/EAAT-3 liegt spezifisch als ausschließlich in Neuronen vor (Conti et al., 1998), GLT-1/EAAT-2 wird hauptsächlich von Gliazellen exprimiert, kann aber auch in Neuronen vorkommen (Brooks-Kayal et al., 1998; Furuta et al., 1997a; Lehre et al., 1995 Rothstein et al., 1994; Storck et al., 1992;, Torp et a., 1997), die Expression von GLAST/EAAT-1 ist praktisch ausschließlich auf Gliazellen beschränkt (Storck et al.,1992), EAAT-4 und EAAT-5 werden relativ selektiv von den Purkinjezellen des Kleinhirns bzw. in der Retina exprimiert (Arriza et al.,1997). Neuere Befunde, die mit Hilfe von "Knock-out"- bzw. "Antisense"-Techniken erzielt wurden, sprechen augenblicklich dafür, dass es sich bei GLT-1/EAAT-2 um den wichtigsten Glutamattransporter in Vorderhirn und Striatum handelt, welcher hier über 90% des extrazellulären Glutamats aufnimmt (Rothstein et al., 1996; Tanaka et al., 1997). GLAST/EAAT-1 leistet dagegen etwa 60% der Glutamataufnahme im Cerebellum (Watase et al., 1998).



Abb. 1 Schematische Darstellung der Funktion der glialen Glutamattransporter Die glialen Glutamattransporter "Glutamate transporter 1"(GLT-1) und "Glutamate aspartate transporter"(GLAST) pumpen jeweils ein Glutamatmolekül zusammen mit drei Natrium-lonen (Na⁺) ins Zellinnere und im Gegenzug ein Wasstersoff-lon (H⁺) und ein Kalium-lon (**K**⁺) in den Extrazellulärraum; damit werden exzitotoxische Glutamatkonzentrationen vermieden und ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis an der Synapse gewährleistet. Als Energiequelle dient hierbei der transmembranäre lonengradient. Unter ischämischen Bedingungen kann es zu einer Umkehrung in der Transportrichtung kommen. Die intragliale Glutaminsynthetase trägt über die Umwandlung von Glutamat in Glutamin zum Recycling des Glutamats bei.

2.3 Regulation des Glutamattransports

Der GLT-1- und GLAST-abhängige Glutamattransport wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Posttranslationale Veränderungen wie die Phosphorylierung der Transporter führen zu schnellen Änderungen der Transporteraktivität (Geglashvili und Schousboe, 1997). Phosphorylierung der spezifischen Serin-Reste von GLT-1 erhöht beispielsweise dessen Aktivität (Zhang und Kanner, 1999); die GLAST-Aktivität hingegen wird durch Phosphorylierung an Nicht-Konsensus-Stellen herabgesetzt (Conradt und Stoffel, 1997; Gonzalez und Ortega, 1997). Eine rasche Steigerung des Glutamattransports wird darüberhinaus durch die Translokation von GLAST aus zytoplasmatischen Speichern an die Zellmembran erreicht (Duan et al., 1999). Zu den bisher bekannten Substanzen, die die Transporteraktivität und -lokalisation in der Zelle beeinflussen können, gehören Phorbolester, PDGF, Glutamat, Arachidonsäure sowie α-Amyloidpeptid (Chan et al., 1983; Correale et al., 1998; Davis et al., 1998; Harris, 1996; Keller et al., 1997; Parpura-Gill et al., 1997; Trotti et al., 1995; Zerangue et al., 1995). Langsame Veränderungen des Glutamattransports sind durch die Steuerung der Transporterexpression möglich. Erste Hinweise auf das Vorliegen solcher steuernden Einflüsse ergaben sich aus der Beobachtung, dass die Transporterexpression zunimmt, wenn Gliazellen mit Neuronen kokultiviert werden (Gegelashvili et al., 1997, Swanson et al., 1997, Schlag et al., 1998). Da dieser Effekt nicht auftritt wenn die Gliakulturen man mit gereinigten Neuronenmembranfraktionen behandelt, kommen nur diffusible, von Neuronen abgegebene Faktoren für diesen Effekt in Frage. Unserer Arbeitsgruppe ist es kürzlich gelungen zu zeigen, dass Neurone die gliale Glutamattransporter-Expression mittels "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide" (PACAP) steuern (Figiel und Engele, 2000). Zu den weiteren bis heute identifizierten extrazellulären Faktoren, die die Expression glialer Glutamattransporter stimulieren, zählen TGFa und EGF (Zelenaia et al., 2000).

2.4 FGF-2

FGF-2 gehört der FGF-Wachstumsfaktor-Familie an, welche aus mindestens 23 Mitgliedern besteht und selbst zu den "Heparin binding growth factors" zählt (Szebenyi und Fallon, 1999). Es sind mehrere FGF-2-Isoformen bekannt, welche nach ihrer Molekularmasse unterschieden werden (18000 d, 21000 d und 23000 d; Prats et al., 1989; Florkiewicz, 1989). FGF-2 wird schon in der frühen Hirnentwicklung exprimiert; im adulten Gehirn wird es sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen produziert (Junier, 2000; Szebenyi und Fallon, 1999). Bis heute sind vier FGF-Rezeptor-Untertypen im Gehirn identifiziert worden, welche als FGFR1, FGFR2, FGFR3 sowie FGFR4 bezeichnet werden (Szebenyi und Fallon, 1999). Astrozyten exprimieren FGFR1, FGFR2 und FGFR3 (Reilly et al., 1998). Alle genannten Rezeptoren besitzen Tyrosin-Kinase-Aktivität. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zu einer Dimerisierung mit konsekutiver Autophosphorylierung des Rezeptors an Tyrosinresten. An diesen Tyrosinresten können wiederum eine Vielzahl von intrazellulären Signalproteinen phosphoryliert werden, wobei diese Aktivierung Zelltyp-spezifisch zu erfolgen scheint. FGF-2 aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege in Gliazellen. In Oligodendrozyten-Vorläuferzellen führt FGF-2 über die MAP-Kinase ERK-2 zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, welche durch Inhibition von Tyrosin-Kinasen oder der Proteinkinase C gehemmt werden kann (Yim et al. 2001). In manchen Zellen führt FGF-2 auch zur Aktivierung der PKA (Pursiheimo et al. 2000). Zu den weiteren FGF-2-Wirkungen in Gliazellen zählt die Induktion der Zellproliferation und die morphologische Zellreifung (Perraud et. al., 1988, Sensenbrenner et. al., 1987). FGF-2 steuert auch die Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen (Kilpatrick und Bertlett, 1995; Reynolds und Weiss, 1996; Qian et al., 1997; Vescovi et al., 1993; Waschek et al., 1998; Lu et al., 1998; Heldin und Westmark, 1999). Für die Pathologie des ZNS scheint FGF-2 ebenfalls von Bedeutung zu sein; so steigt beispielsweise die FGF-2-Konzentration in der Umgebung verletzter Hirnareale an und führt hier zu einer reaktiven Astrogliose (Logan et. al., 1992; Eclancher et al., 1990; Gomez-Pinilla et al., 1995). Diese verschiedenen Wirkungen von FGF-2 auf Gliazellen lassen es möglich erscheinen, dass FGF-2 auch eine Rolle bei der Regulation der glialen Glutamataufnahme spielen könnte.

2.5 Glialer Glutamattransport und ZNS-Pathologie

Für verschiedene Erkrankungen des Zentralnervensystems sind charakteristische Veränderungen der Glutamattransporter-Expression festgestellt worden (Sims und Robinson, 1999, zur Übersicht). Nach traumatischen Hirnverletzungen wird eine Abnahme der GLT-1-/EAAT-2- und GLAST-/EAAT-1-Expression im Kortex beobachtet (Rao et al., 1998). Ebenso kommt es nach ischämischer Neuronenschädigung zu einer Abnahme der Glutamattransporter-Expression; hiervon sind EAAC-1/EAAT-3 und GLT-1/EAAT-2 betroffen (Martin et al., 1997; Torp et al., 1995). Die Transportrichtung der Glutamattransporter kann sich außerdem unter ischämischen Bedingungen umkehren (Gemba et al., 1994; Madl und Burgesser, 1993). Bei ALS-Patienten kommt es zu einer selektiven Abnahme der GLT-1-Proteinkonzentration und des Glutamattransportes in Motorkortex und Rückenmark (Rothstein et al., 1995). Der GLT-1-mRNA-Gehalt ist hier jedoch erstaunlicherweise nicht betroffen. Bei einer Analyse von GLT-1-Transkripten von ALS-Patienten fiel allerdings auf, dass bei diesen vermehrt eine verkürzte GLT-1-Spleiß-Form in Motorkortex und Rückenmark exprimiert wird. Diese Spleiß-Variante wird zwar translatiert, vermutlich jedoch nicht in die Zellmembran eingebaut. Bei 65% der untersuchten ALS-Patienten geht die Expression dieser Variante außerdem mit einer Abnahme von Wildtyp-GLT-1 einher, was dafür spricht, dass diese Variante eine dominant negative Wirkung ausübt (Lin et al. 1998; Bristol und Rothstein 1996). In Gewebeproben aus dem frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten ist der GLT-1-Proteingehalt im Vergleich zu GLAST und EAAT-3/EAAC-1 ebenfalls deutlich erniedrigt. Ähnlich wie bei der ALS bleibt die Menge an mRNA unbeeinflusst, was augenblicklich dahingehend interpretiert wird, dass es auch hier zur Expression aberranter GLT-1-Spleißformen kommen könnte (Li et al., 1997). Dagegen fand sich in post-mortem gewonnenem Striatumgewebe von Chorea-Huntington-Patienten ein verminderter GLT-1-mRNA-Gehalt (Arzberger et al., 1997). Die klinische Relevanz des glialen Glutamattransports wird des Weiteren auch durch die Beobachtung unterstrichen, dass bei GLT-1-Knock-Out-Mäusen vermehrt epileptische Anfälle auftreten, Neurone in bestimmten Hirnarealen sterben und die Neurone auch anfälliger gegen traumatische Hirnschädigungen sind (Tanaka et al., 1997).

2.6 Fragestellung dieser Arbeit

Die gravierenden Folgen der Glutamatexzitotoxizität werfen die Frage auf, über welche Regulationsmechanismen erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen verhindert werden und wie sich diese Mechanismen beeinflussen lassen. Der wichtigste Schritt zur Prävention dieser Exzitotoxizität besteht physiologischerweise in der Aufnahme des Glutamats in Gliazellen mittels der glialen Glutamattransporter GLT-1 und GLAST. Bisher ist jedoch wenig darüber bekannt, wie die Funktion dieser Glutamattransporter sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen reguliert wird. Der Wachstumsfaktor FGF-2 übt eine Reihe verschiedenartiger Wirkungen auf Gliazellen aus und wurde beispielsweise nach Hirntraumen in erhöhter Konzentration in der Umgebung der Schädigung nachgewiesen, so dass er bei der Regulation der glialen Glutamattransporter eine wichtige Rolle spielen könnte. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob der gliale Glutamattransport durch Behandlung von Astrozytenkulturen mit FGF-2 beeinflusst wird und über welche Signalwege diese Einflüsse gegebenenfalls vermittelt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeines

Material
Biofuge fresco/pico
Thermomixer 5436

Bezugsquelle/Hersteller Heraeus Eppendorf

3.1.2 Versuchstiere

<u>Tierart</u> Rattus norvegicus (Sprague Dawley) Bezugsquelle/Hersteller Charles River, Sulzfeld

3.1.3 Zellkultur

Material	Bezugsquelle/Hersteller
100-mm-Zellkulturschalen	Greiner
48er-Multiwell-Platten	Costar
Brutschränke	Heraeus
dbcAMP	Sigma
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung	Gibco
F-12-Mischung	Gibco
Fetales Kälberserum	Gibco
FGF-2	Gibco
Gö6976	Calbiochem
H89	Calbiochem
Hank's balancierte Salzlösung	Gibco
Ly294002	Calbiochem
MEM mit Earl's Salzen	Gibco
Mikroskop	Zeiss
PD98059	Calbiochem
PDTC	Calbiochem

Material	Bezugsquelle/Hersteller
Pferdeserum	Gibco
Poly-D-Ornithin	Sigma

3.1.4 Proteinisolation, Proteinkonzentrationsmessung und Western-Blot

Material	Bezugsquelle/Hersteller
Acrylamid-Lösung	Roth
Aktin-AK	Santa Cruz
BCA-Kit	Pierce
Dokumentationssoftware:	
Image Master VDS	Pharmacia
Elektroblot-Geräte:	
-Power Pack 200/300	BioRad
-Transblot SD	BioRad
Filmentwicklungsgerät: -Hyperprocessor	Amersham
GLAST-AK	Chemicon
GLT-1-AK	Chemicon
Methanol	Merck
Anti-Meerschweinchen-AK,	
MRP-konjugiert	Jackson Laboratories
Anti-Ziege-AK, MRP-konjugiert	Santa Cruz
Molekulargewichtsstandard	Invitrogen
Photometer DU-62	Beckmann
Protein-Bestimmungs-Set	Pierce
Set für verstärkte Chemiluminesenz	Amersham

3.1.5 Real-Time-RT-PCR

Material	Bezugsquelle/Hersteller
PeqGold-Kit	PeqLab
M-MLV	Promega
Random-Hexamer Primer	Thermo Hybaid

Material	Bezugsquelle/Hersteller
Primer:	
<u>GLT-1 sense:</u>	
5'-cca tcc gag gag gcc aat ac-3'	Thermo Hybaid
GLT-1 antisense:	
5'-caa gca ggc gat acc cag c-3'	Thermo Hybaid
<u>B-Aktin sense:</u>	
5'-cta caa tga gct gcg tgt ggc-3'	Thermo Hybaid
<u>B-Aktin antisense:</u>	
5'-cag gtc cag acg cag gat ggc-3'	Thermo Hybaid
LightCycler	Roche Diagnostics
LightCycler-DNA Master SYBR-Green I	Roche Diagnostics
QIAquick-Säulen	Qiagen

3.1.6 Immunzytochemie

Material	Bezugsquelle/Hersteller
GFAP-AK	Accurate
Glutaminsynthetase-AK	Biogenesis
Saponin	Sigma
Biotinylierter anti-Hase-AK	Vector Labs
Biotinylierter anti-Ziege-AK	Vector Labs
Vectastain ABC-KIT	Vector Labs

3.1.7 Glutamataufnahme-Messung

Material	Bezugsquelle/Hersteller
DAB	Sigma
F-12-Medium-Mischung (Ham)	Gibco
Flüssigszintillationsmeßgerät 1600 TR	Packard
Glutamat	Sigma
³ H-markiertes Glutamat	Amersham
(spez. Aktivität: 237,5x10 ¹⁰ Bq/mmol)	
MEM mit Earl's Salzen	Gibco
Methionin-Sulfoximin	Sigma

<u>Material</u> Paraformaldehyd UltimaGold Szintillationsflüssigkeit Bezugsquelle/Hersteller Merck Packard

3.2 Rezepte

3.2.1 Zellkultur

Bezeichnung	<u>Rezept</u>
F-12-Medium	pro Liter:
	1 Packung F-12 Mischung
	1,176 g NaHCO ₃
	2,2 g D-Glukose
	0,146 g L-Glutamin
	3,5 g HEPES
	pH 7,4
Minimal-Essential Medium	pro Liter:
	MEM mit Earl's Salzen
	2,2 g NaHCO3
	5 g D-Glukose
	0,292 g L-Glutamin
	pH 7,4
<u>N2-Medium</u>	je nach benötigter Menge:
	MEM/F12 im Verhältnis 1 : 1
	0,05 mg/ml Transferin
	0,5 µg/ml Insulin
	5x10 ⁻¹⁰ M Trijodthyronin
	3x10 ⁻⁸ M Na ₂ SeO ₃
	2x10 ⁻⁸ M Progesteron
	10 ⁻⁴ M Putreszin
PBS	pro Liter:
	386,4 mg NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O
	1,022 g Na ₂ HPO ₄

Bezeichnung	<u>Rezept</u> 8,766 g NaCl
3.2.2 Immunzytochemie	
Bezeichnung Antikörper-Verdünnungs-Lösung	<u>Rezept</u> pro 100 ml 500 mg BSA 50 mg NaN ₃
<u>DAB-Lösung</u>	 15 mg DAB 6 μl H₂O₂ (33%ig) mit Tris-Lösung zu 20 ml auffüllen 60 mM Tris-Base 2% SDS 10 % Sukrose 2 mM PMSF
<u>Sukrose-Puffer</u>	0,25 M Sukrose 5 mM Tris HCl pH 7,2

3.2.3 Proteinisolation, Proteinkonzentrationsmessung und Western-Blot

Bezeichnung	<u>Rezept</u>
5%iges Polyacrylamid-Gel	pro 10 ml
	2,5 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8
	1,25 ml 40% Acrylamid-Lösung
	100 µl 10% SDS
	100 µl 10% Ammoniumpersulfat
	10 µl TEMED
10%iges Polyacrylamid-Gel	pro 10 ml
	2,5 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8
	2,5 ml 40% Acrylamid-Lösung
	100 µl 10% SDS

Bezeichnung	<u>Rezept</u> 50 μl 10% Ammoniumpersulfat 5 μl TEMED
Ponceau S	
(10-fach konzentrierte Vorratslösung)	pro Liter:
	2 g Ponceau S
	30 g Trichloressigsäure
	30 g Sulfosalicylsäure
Proben-Puffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8
	4% SDS
	10% Glyzerol
	2% β-Mercaptoethanol
Proteinelektrophoresepuffer	25 mM Tris HCl
	192 mM Glyzin
	0,035% SDS
	auf pH 8,3 einstellen
TBS	pro Liter:
	8,766 g NaCl
	6,06 g Tris
	рН 7,6
Transfer-Puffer	pro Liter:
	2,9 g Glyzin
	5,8 g Tris
	0,37 g SDS
	200 ml Methanol
3.2.4 Glutamataufnahme-Messung	
Bezeichnung	Rezept
Glutamataufnahme-Puffer mit LiCl	5 mM Tris

10 mM HEPES

Bezeichnung	Rezept
	140 mM LiCl
	2,5 mM KCl
	1,2 mM CaCl ₂
	1,2 mM MgCl ₂ •6H ₂ O
	1,2 mM K ₂ HPO ₄
	10 mM Dextrose
	1 mM Methionin-Sulfoximin
Glutamataufnahme-Puffer mit NaCl	5 mM Tris
	10 mM HEPES
	140 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	1,2 mM CaCl ₂
	1,2 mM MgCl ₂
	1,2 mM K ₂ HPO ₄
	10 mM Dextrose
	1 mM Methionin-Sulfoximin

3.3 Methoden

3.3.1 Haltung der Versuchstiere

Die Experimente wurden mit Sprague Dawley Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Es herrschte ein Tag/Nacht-Rhythmus von je 12 h. Zur Verpaarung wurden die Tiere für 12 h zusammen gesetzt. Zwei bis drei Tage alte Tiere wurden durch Dekapitation getötet.

3.3.2 Gliakultur

Aus den zerebralen Hemisphären wurden primäre Gliakulturen angelegt, indem zunächst unter sterilen Bedingungen der Schädel eröffnet wurde, die Hemisphären herauspräpariert und die Meningen sorgfältig entfernt wurden. Die Gewebstücke wurden in eisgekühltem N2-Medium gesammelt, anschließend mit der Schere zerkleinert und dann für 20 min bei Raumtemperatur in 0,1% iger Trypsinlösung inkubiert. Die Trypsinwirkung wurde durch Überführen der Gewebsstücke in Hanks-gepufferte-Salzlösung mit 10% fetalem Kälberserum gestoppt. Die anverdauten Gewebsstücke wurden durch mehrmaliges Aufund Abpipettieren in 10 ml Kunststoff-Pipetten dissoziiert. Nicht zerkleinerte Stückchen wurden mittels Filtrieren durch ein Nitex-Netz mit 20 µm Porengröße entfernt. Die erhaltene Zellsuspension wurde 5 min bei 400 g zentrifugiert und das Zellpellet in vollständigem Kulturmedium (MEM mit 10% Pferdeserum) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun auf 100-mm-Zellkulturschalen verteilt, so dass die pro Schale ausgesäte Zellmenge etwa drei präparierten Rattenhirnen entsprach. Durch Zugabe von vollständigem Kulturmedium wurde ein Gesamtvolumen von 10 ml/Schale erhalten. Die Kulturschalen waren zuvor für 1 h mit 0,1 mg Poly-D-Ornithin/ml gecoatet und danach mit sterilem Wasser gespült worden. Die Zellkulturen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre aus 90% Luft und 5% CO₂ bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde zum ersten Mal nach 24 h gewechselt und danach jeden dritten Tag. Alle beschriebenen Experimente wurden mit dreimal passagierten Gliakulturen durchgeführt. Zum Passagieren wurde das Medium konfluenter Kulturen abgenommen und die Kulturen bei Raumtemperatur mit 2 ml einer 0,1% igen Trypsin-Lösung bis zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden (nach etwa 3 min) inkubiert. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 10 ml MEM/10% PS gestoppt und die Zellen für 5 min bei 400 *g* zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in MEM/10% PS resuspendiert und die Zellsuspension in drei neue 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät. Für Glutamataufnahme- und Immunzytochemie-Experimente wurden die Zellen nach der dritten Passage in 48-Multiwell-Platten ausgesät. Für alle beschriebenen Experimente wurden subkonfluente Kulturen der dritten Passage auf serumfreies N2-Medium umgestellt. Dazu wurde das serumhaltige Medium abgenommen, die Zellkulturschalen mit N2-Medium gespült und danach in N2-Medium weiterkultiviert. Abhängig vom jeweiligen Versuch wurden dem N2-Medium folgende Faktoren zugesetzt: dbcAMP (10⁻⁴ M), FGF-2 (25 ng/ml), H89 (10⁻⁵ M), Gö6976 (10⁻⁶ M), Ly294002 (10⁻⁵ M), PDTC (10⁻⁴ M), PD98059 (2,5x10⁻⁵ M).

3.3.3 Immunzytochemische Färbung der Gliakulturen

Die Zellen wurden 20 min in 4-prozentigem Paraformaldehyd (in PBS) fixiert, 30 min mit 0,05% igem Saponin (in PBS) permeabilisiert und anschließend mit anti-GFAP- (1:1250) bzw. anti-Glutaminsynthetase-Antikörpern (1:2000) bei 4°C inkubiert. Nach 24 h wurden die Kulturen dreimal mit 10 mM PBS gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit geeigneten biotinylierten sekundären Antikörpern inkubiert. Alle Antikörper wurden mit Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Der Nachweis der Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgte mit Hilfe des Vectastain ABC-Kits nach den Angaben des Herstellers. Die Sichtbarmachung der Markierung erfolgte mittels DAB-Lösung in Anwesenheit von H₂O₂. Die Farbentwicklung wurde in der Regel nach 20 min durch dreimaliges Waschen mit PBS gestoppt und die Zellen anschließend unter dem Mikroskop fotografiert.

3.3.4 Proteinisolation und Proteinbestimmung

Zur Proteinisolation wurden konfluente Gliakulturen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen dann mit 400 µl Lyse-Puffer pro 100-mm-Schale lysiert. Das Zelllysat wurde in Reaktionsgefäße auf Eis überführt und einige Sekunden mit Ultraschall behandelt, um die Löslichkeit der Proteine weiter zu erhöhen. Die Proteinlösung wurde anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert und dann bei -70°C gelagert. Der Protein-Gehalt der Proben wurde mittels BCA Protein-Bestimmungs-Kit (Pierce) laut den Angaben des Herstellers ermittelt. Die Erstellung der Eichgeraden erfolgte unter Verwendung einer BSA-Verdünnungsreihe. Aus konfluenten 100-mm-Zellkulturschalen konnten in der Regel 1 bis 2 mg Protein gewonnen werden.

3.3.5 Western-Blot-Analyse

Es wurden 5%ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden 1:1 mit Probenpuffer gemischt, für 5 min auf 100°C erhitzt und dann das Gel mit 15 µg Protein pro Tasche beladen. Die Elekrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V über ca. 1 h durchgeführt; anschließend wurden die Gele in Transfer-Puffer überführt und die Proteine für ca. 15 min bei 15 V auf Nitrocellulosestreifen transferiert. Zur Kontrolle erfolgreichen Proteintransfers des wurden die Nitrocellulosestreifen mit Ponceau-S-Lösung unspezifische gefärbt. Um Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurden die Nitrocellulosestreifen für 30 min in einer 5% igen Lösung aus fettarmer Milch in TBS/0,05% Tween20 inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 12 h bei 4°C. Folgende primäre Antikörper (in TBS/5% fettarme Milch) wurden verwendet: anti-GLT-1 (1:4000), anti-GLAST (1:1000), anti-Glutaminsynthetase (1:2000), anti-Aktin (1:1000). Nach Abschluss der Inkubation wurden die Nitrocellulosestreifen dreimal für ca. 10 min in TBS/0,05%-Tween20-Lösung gewaschen und danach mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur versetzt. Folgende, mit Meerrettichperoxidase konjugierte sekundäre Antikörper wurden hierzu verwendet (gelöst in TBS/5% fettarme Milch): anti-Meerschweinchen (1:3000) gegen die anti-GLAST- und anti-GLT-1-Antikörper sowie anti-Ziege (1:1000) gegen die anti-Aktin-Antikörper. Die Antikörpermarkierung wurde mit dem Amersham-ECL-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers nachgewiesen und mittels eines ECL-Films dokumentiert. Die immunreaktiven Proteinbanden wurden mit der Image-Master-VDS-Software densitometrisch ausgewertet und der Wert der jeweiligen GLT-1- bzw. GLAST-Bande mit dem Wert der zugehörigen Aktin-Bande normalisiert.

3.3.6 Bestimmung der glialen Glutamataufnahme

Alle im Folgenden beschriebenen Aufnahmelösungen wurden jeweils sowohl mit natriumals auch mit lithium-haltigem Trispuffer angesetzt. Als Stocklösung diente ein Aufnahmepuffer mit einer Glutamatkonzentration von 960 µM. Diese Lösung enthielt anteilig radioaktiv-markiertes (³H-)Glutamat mit einer Aktivität von 3,77x10⁴ Bq/ml. Aus der Stocklösung wurden durch Verdünnen mit dem entsprechenden natrium- bzw. lithiumhaltigen Puffer Aufnahmelösungen mit Glutamatkonzentrationen von 320, 160, 80 und 40 µM hergestellt. Zur Messung der glialen Glutamataufnahme wurden kortikale Gliazellen zunächst 1 h mit natrium- oder lithiumhaltigen Tris-Puffer ohne Glutamat vorinkubiert und anschließend für 10 min mit glutamathaltiger Aufnahmelösung versetzt. Der zelluläre Glutamattransport wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit eiskaltem, lithiumhaltigen Puffer gestoppt. Die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde mittels Flüssigszintillation bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst durch Zugabe von 200 µl 0,1 M NaOH-Lösung lysiert und dann die mit den Zellen assoziierte Radioaktivität in Anwesenheit von jeweils 4 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationszähler gemessen. Als spezifische (natriumabhängige) Glutamataufnahme wurde die Differenz zwischen der in Anwesenheit von Natrium und der in Anwesenheit von Lithium aufgenommenen Radioaktivität gewertet. Die ermittelte spezifische Glutamataufnahme wurde pro Milligramm Gesamtprotein und Minute berechnet. Um mögliche Einflüsse des enzymatischen Glutamatabbaus auf das Aufnahmeverhalten auszuschließen, wurden alle Aufnahmemessungen in Anwesenheit des Glutamin-Synthetase-Inhibitors Methionin-Sulfoximin (1 mM) durchgeführt. Der V_{max}und der K_m-Wert der Glutamataufnahme unter den einzelnen Behandlungen wurde nach linearer Transformation (Eadie-Hofstee) der erhaltenen Aufnahmewerte ermittelt.

3.3.7 Real-time RT-PCR

Die Gesamt-RNA der primären Gliakulturen wurde mit Hilfe des PegGold-Kits (PegLab, Schwalbach, Germany) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Konzentration wurde anhand der spektrophotometrischen Absorption bei 260 nm gemessen. Zur reversen Transkription wurden pro 1 µl RNA-Lösung 200 U M-MLV (Promega, Madison WI) und 2 µg "random hexamer primer" (Thermo Hybaid, Ulm, Germany) hinzugegeben; insgesamt wurden dabei je 2 µg RNA transkribiert. Der RNA-Gehalt wurde mittels "real-time polymerase chain reaction" quantifiziert, wobei folgende Primer zur Anwendung kamen: GLT-1, sense: 5'-cca tcc gag gag gcc aat ac-3'; antisense: 5'-caa gca ggc gat acc cag c-3'; Produkt-Länge: 265 bp; B-Aktin (als interner Standard); sense: 5'-cta caa tga gct gcg tgt ggc-3'; antisense: 5'-cag gtc cag acg cag gat ggc-3'; Produkt-Länge, 271 bp (alle Thermo Hybaid). Die Amplifikation wurde in einem Endvolumen von 10 µl durchgeführt, welches 1 µl cDNA-Probe (bzw. Standard) enthielt sowie 1 µl LightCycler-DNA Master SYBR-Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), MgCl₂ (3 mM) und sense/antisense Primer (jeweils 5 pmol). Zur Amplifikation wurde dieser Reaktionsansatz für 90 s auf 95°C erhitzt, gefolgt von 45 Zyklen von jeweils 5 s Inkubieren bei 55°C und ansschließend jeweils für 20 s bei 72°C. Hierzu wurde der LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) sowie die mitgelieferte Software zur Auswertung verwendet. Um die Spezifität der Amplifizierungsprodukte zu überprüfen wurden nach den Amplifikationszyklen Schmelzkurven bestimmt, indem die Proben zunächst um 20°C/s auf 65°C für 15 s abgekühlt und dann um 0,1°C/s auf 95°C erhitzt wurden, während kontinuierliche Fluoreszenzmessungen stattfanden. Zur Erstellung einer Standard-Kurve wurde zunächst eine Verdünnungsreihe aus dem entsprechenden, mittels QIAquick-Säulen gereinigten PCR-Produkt in Wasser angelegt. Diese Verdünnungen wurden mittels Real-Time-RT-PCR amplifiziert und Fluoreszenzkurven erstellt. Anhand der zweiten Ableitung jeder dieser Fluoreszenzkurven ergab sich jeweils derjenige Amplifikationszyklus mit der maximalen Amplifikationsbeschleunigung ("second derivative maximum method"). Hierbei wird davon ausgegangen, dass bei Erreichen dieser Amplifikationszyklen alle Reaktionsansätze gleichviel PCR-Produkt enthalten. So ergab sich jeweils eine Standardkurve (PCR-Produkt-Konzentrationen der Verdünnungsreihe gegenüber der jeweils zugehörigen Zyklusnummer des Zyklus mit der maximalen Amplifikationsbeschleunigung) anhand derer dann die Konzentration unbekannter Proben bestimmt werden konnte. Diese Werte wurden mit dem zugehörigen Aktin-Wert normalisiert.

3.4 Statistik

Die Experimente wurden i.d.R. alle mindestens dreimal durchgeführt. Die Daten eines Experiments stammen aus Untersuchungen von Zellkulturen des gleichen Materials, das heißt von Kulturen, die zur gleichen Zeit angelegt und behandelt wurden. Die statistische Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mittels des Students-*t*-Tests; als Signifikanzgrenze galt dabei ein p-Wert von $\leq 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Gliakulturen

Alle im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden mit kortikalen Kulturen nach der dritten Passage durchgeführt. Die immunzytochemische Färbung der unbehandelten Kulturen mit Antikörpern gegen das astrozytenspezifische Intermediärfilamentprotein GFAP bestätigte die bereits früher gemachte Beobachtung (Franke et al., 1998), dass diese Kulturen zu über 90% aus Astrozyten bestehen (Abb. 2).



Die Mehrzahl der GFAP-immunreaktiven Zellen in Kultur besaß große, flache und unregelmäßig begrenzte Zellkörper und hatte damit das Aussehen von Typ-I-Astrozyten. Einige wenige GFAP-immunreaktive Zellen (ca. 1%) waren sternförmig mit multiplen breiten Fortsätzen und entsprachen morphologisch Typ-II-Astrozyten (Raff et al., 1983 a,b). Diese Befunde zeigen, dass das verwendete Kultivierungsprotokoll die Herstellung hoch angereicherter Astrozytenkulturen ermöglicht.

4.2 Wirkung von FGF-2 auf die Glutamattransporter-Expression

Um die potentiellen Einflüsse von FGF-2 auf die Expression der Glutamattransporter GLT-1 und GLAST zu untersuchen, wurden kortikale Gliakulturen für 72 h mit FGF-2 (25 ng/ml) behandelt und anschließend der GLT-1- und GLAST-Proteingehalt mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. In unbehandelten Gliakulturen lagen in der Regel geringe Mengen an GLT-1 und GLAST vor. Sowohl der GLT-1-Gehalt als auch der GLAST-Gehalt blieb nach Behandlung mit FGF-2 praktisch unverändert (Abb. 3), was zeigt, dass FGF-2 primär keinen Einfluss auf die Expression der glialen Glutmattransporter ausübt. FGF-2 gilt als ein äußerst potentes Gliamitogen, welches die Gliaproliferation über die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (Raf-MEK-ERK) steuert (Bayatti und Engele,



Abb. 3 Einfluss von FGF-2 auf die astrogliale GLT-1- und GLAST-Expression Aufgereinigte Kulturen kortikaler Astrozyten wurden für 72 h mit "Fibroblast growth factor 2" (FGF-2; 25 ng/ml) in An- bzw. Abwesenheit des "Mitogen-activated pathway"-Kinase-Inhibitors PD98059 (2,5x10⁵ molar) behandelt und anschließend der "Glutamate transporter 1"(GLT-1)-Gehalt mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Als Ladekontrolle wurden die Blots zusätzlich mit Aktin-Antikörpern gefärbt. Die Zahlen geben die mittlere Zunahme der GLT-1- bzw. "Glutamate aspartate transporter"(GLAST)-Expression (mit Standardabweichung) aus drei Experimenten an. Die densitometrische Auswertung immunreaktiver Banden erfolgte wie unter Punkt 3.3.5 beschrieben. Beachte, dass FGF-2 die GLT-1-/GLAST-Expression nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von PD98059 stimuliert. 2001). In einer weiteren Versuchsreihe wurden daher kortikale Gliakulturen für 72 h mit FGF-2 (25 ng/ml) in Anwesenheit des MAP-Kinase-Inhibitors PD98059 (2,5x10⁻⁵ M) behandelt, wodurch der mitogene Effekt von FGF-2 gehemmt ist (Bayatti und Engele, 2001). Unter diesen Bedingungen nahm der GLT-1- und GLAST-Gehalt behandelter Kulturen gegenüber den Kontrollen um das 3,1±1-fache (n=3, p<0,05) bzw. 2,9±0,7-fache (n=3, p<0,05) zu. PD98059 (2,5x10⁻⁵ M) alleine hatte keinen Einfluss auf die GLT-1- und GLAST-Expression (Abb. 3). Diese Befunde deuten daraufhin, dass FGF-2 die gliale Glutamattransporter-Expression nur in ruhenden, nicht proliferierenden Astrozyten steuert. Der mitogene Einfluss von FGF-2 auf Gliazellen ist konzentrationsabhängig und erreicht zwischen 50 und 100 ng/ml ein Maximum (Engele und Bohn, 1992). Um die Wechselwirkung zwischen Zellproliferation und Glutamattransporter-Expression näher zu charakterisieren, wurden daher kortikale Astrogliakulturen für 72 h mit unterschiedlichen



Abb. 4 a,b,c,d Einfluss unterschiedlicher FGF-2-Konzentrationen auf die GLT-1-/GLAST-Expression in kortikaler Glia

Kulturen kortikaler Astroglia wurden 72 h mit den angegebenen "Fibroblast growth factor 2" (FGF-2)-Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit des "Mitogen-activated pathway"-Kinase-Inhibitors PD98059 (2,5x10⁻⁵molar) behandelt und anschließend mittels Western-Blot-Analyse der "Glutamate transporter 1"(GLT-1)- bzw. "Glutamate aspartate transporter" (GLAST)-Gehalt bestimmt. Beachte, dass mit zunehmender FGF-2-Konzentration sowohl die GLT-1- als auch die GLAST-Expression abnimmt. kD=Kilodalton FGF-2-Konzentrationen behandelt und anschließend der GLT-1- bzw. GLAST-Gehalt mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 50 ng/ml hatte FGF-2 keinen Einfluss auf die basale GLT-1 Expression, während FGF-2-Konzentrationen zwischen 50 und 100 ng/ml zu einer deutlichen Abnahme des GLT-1-Gehalts führten (Abb. 4a). Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 5 bis 100 ng/ml trat dagegen bei gleichzeitiger Anwesenheit von PD98059 $(2.5 \times 10^{-5} \text{ M})$ eine deutliche Zunahme der GLT-1-Expression gegenüber den nur mit FGF-2 behandelten Kulturen auf (Abb. 4c). Im Falle von GLAST nahm die basale Expression bereits ab einer Konzentration von >10 ng FGF-2/ml deutlich ab (Abb. 4b). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von PD98059 stimulierte FGF-2 die GLAST-Expression bis zu einer Konzentration von 25 ng/ml, während sie bei höheren FGF-2-Konzentrationen in etwa der von unbehandelten Kontrollen entsprach (Abb. 4d). Da die gliale Glutamattransporter-Expression sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene reguliert werden kann (Gegelashvili und Schousboe, 1997, zur Übersicht), wurde mittels Real-Time-RT-PCR untersucht, ob die FGF-2-Behandlung auch die Expression der entsprechenden Gen-Transkripte beeinflusst (Abb. 5). Entsprechend den Befunden auf Proteinebene hatte FGF-2 alleine (25 ng/ml, 72 h) keinen signifikanten steigernden Einfluss auf die GLT-1-mRNA-Expression, während sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von PD98059 die Zahl der GLT-1-Transkripte im Vergleich zur Kontrolle in etwa verdoppelte $(2,1\pm0,4-fach, n=3, p<0,05)$. Anders als auf Proteinebene nahm die GLT-1-mRNA-Expression in Kulturen, die nur mit PD98059 behandelt wurden, gegenüber der Kontrolle signifikant ab (0,5±0,1-fach, n=3, p<0,05).



Abb. 5 Einfluss von FGF-2 auf die GLT-1-mRNA-Expression kortikaler Astroglia Astrozytenkulturen wurden 72 h mit "Fibroblast growth factor 2" (FGF-2; 25 ng/ml), FGF-2 (25 ng/ml) in Kombination mit dem "Mitogen-activated pathway"-Kinase-Inhibitor PD98059 (2,5x10⁻⁵ molar) sowie mit PD98059 (2,5x10⁻⁵ molar) alleine behandelt und anschließend der Gehalt an "Glutamate tranporter 1"- Messenger-Ribonukleinsäure (GLT-1-mRNA) bestimmt (mittels Real-Time-Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR). Dargestellt ist der Mittelwert der PCR-Produkt-Konzentration dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Vergleichbar mit den Ergebnissen auf Proteinebene tritt nur in FGF-2/PD98059-behandelten Kulturen eine Zunahme der GLT-1mRNA-Expression auf.

4.3 Einflüsse von FGF-2 auf die gliale Glutamataufnahme

Um zu untersuchen, ob die beobachtete FGF-2/PD98059-induzierte Expression der Glutamattransporter auch mit einer tatsächlichen Veränderung der glialen Glutamataufnahme einhergeht, wurden Glutamataufnahme-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden Gliakulturen zunächst 72 h mit FGF-2 oder FGF-2 in Kombination mit PD98059 behandelt und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen radioaktivmarkiertem (³H-)Glutamat inkubiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde nach 10 min anhand von Flüssigszintillation bestimmt. Tabelle 1 zeigt Ergebnisse dieser Aufnahmeexperimente. Die Ermittlung der V_{max}- und K_m-Werte der Glutamataufnahme erfolgte nach linearer Transformation der erhaltenen Daten (nach Eadie-Hofstee). In Kulturen, die für 72 h mit einer Kombination aus FGF-2 (25 ng/ml) und PD98059 (2,5x10⁻ ⁵ M) behandelt wurden, lag der scheinbare V_{max}-Wert gegenüber den Kontrollen (21,6±2,8 nmol/min/mg Protein) und nur mit FGF-2 behandelten Kulturen (22,7 nmol/min/mg Protein) um etwa das 1,5-fache höher $(32,8\pm4,7 \text{ nmol/min/mg Protein}, p<0,05)$. Gleichzeitig nahm auch der scheinbare Km-Wert der Glutamataufnahme in FGF-2/PD98059-behandelten Kulturen (102 \pm 18 μ M, p<0,05) gegenüber der Kontrolle um etwa das 2-fache zu (47,9±10,1 µM). Eine ähnliche Zunahme der V_{max}- und K_m-Werte (37,5±7,8 nmol/min/mg Protein, 90,1 \pm 29,6 μ M, p<0,05) trat auch in TGF α -behandelten (50 ng/ml; 72 h) Kulturen auf, welche als Positivkontrolle dienten. Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass FGF-2 in Kombination mit PD98059 nicht nur zu einer erhöhten Transporterexpression sondern auch zu einer Steigerung der glialen Glutamataufnahme führt.

Faktor	<u>Anzahl der</u> Experimente	<u>V_{max} (nmol/min/mg</u> <u>Protein)</u>	<u>K</u> _m <u>(μ-molar)</u>
Kontrolle	6	21,6 ± 2,8	47,9 ± 10,1
TGFα	3	37,5 ± 7,8	90,1 ± 29,6
FGF-2/PD98059	3	32,8 ± 4,7	102 ± 18
FGF-2	1	22,7	43,7

Tab. 1 Funktionelle Parameter der glialen Glutamataufnahme unter verschiedenen Behandlungen

Astrozytenkulturen wurden 72 h mit "Transforming growth factor a" (TGFa; 50 ng/ml), "Fibroblast growth factor 2" (FGF-2; 25 ng/ml) oder FGF-2 (25 ng/ml) in Kombination mit dem "Mitogen-activated pathway"-Kinase-Inhibitor PD98059 (2,5x10⁻⁵ molar) behandelt und anschließend die Aufnahme von Glutamat bestimmt (siehe Punkt 3.3.6). Die Ermittlung der Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) und Michaelis-Menten-Konstante (K_m) der Glutamataufnahme erfolgte nach linearer Transformation der erhaltenen Daten (nach Eadie-Hofstee). Dargestellt sind die Mittelwerte mehrerer Experimente mit Standardabweichung.

4.4 Signalwege bei der Stimulation der Glutamattransporter-Expression durch FGF-2/PD98059

Zur Identifizierung der Signalwege, über welche die stimulatorischen Einflüsse von FGF-2/ PD98059 auf die gliale Glutamattransporter-Expression vermittelt werden, wurden einzelne Signalproteine spezifisch inhibiert; folgende Inhibitoren wurden hierfür verwendet: der Proteinkinase-A-Inhibitor H89 (10⁻⁵ M), der Proteinkinase-B-Inhibitor Ly294002 (10⁻⁵ M), der Proteinkinase-C-Inhibitor Gö6976 (10⁻⁶ M) sowie der NF-κB-Inhibitor PDTC (10⁻⁴ M). Gliazellkulturen wurden 72 h entweder mit FGF-2 alleine oder mit FGF-2 (25 ng/ml) in Kombination mit PD98059 (2,5x10⁻⁵ M) sowie jeweils einem der obigen Inhibitoren behandelt. Der GLT-1- und GLAST-Gehalt nach Behandlung wurde mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Der stimulatorische Einfluss von FGF-2/PD98059

$\begin{array}{c} \textbf{GLT-1} \\ \textbf{FGF-2} & - & + & + & + & + & + & + & + & + & +$											
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GLT-1		-	-		-	-	-	+		
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	FGF-2	_	+	+	+	+	+	+			
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	PD98059	—	_	+	+	+	+	+			
H89 + - + LY294002 + + - PDTC + + + + + + + + + + + + + + + +	GÖ 6976	—	_	—	+	_	_	_			
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	H89	—	—	—	—	+	—	—			
PDTC + + + + + + + + + + + + + + + + +	LY294002	-	_	_	_	_	+	_			
GLAST FGF-2 +	PDTC	—	_	—	_	—	_	+			
FGF-2 - + <th>GLAST</th> <th></th> <th></th> <th>-</th> <th>-</th> <th>***</th> <th>-</th> <th></th> <th></th> <th>-</th> <th>-</th>	GLAST			-	-	***	-			-	-
PD98059 - + </td <th>FGF-2</th> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>_</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td>	FGF-2	-	+	+	+	+	_	+	+	+	+
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	PD98059	—	—	+	+	+	_	_	+	+	+
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GÖ 6976	—	—	—	+	_	—	—	—	—	—
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	H89	—	-	_	_	+	_	_	—	_	—
PDTC +	LY294002	—	—	—	—	—	—	—	—	+	_
	PDTC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+



Kortikale Astrogliakulturen wurden für 72h mit den angegebenen Kombinationen von "Fibroblast growth factor 2" (FGF-2;25 ng/ml), dem "Mitogen-activated pathway"-Kinase-Inhibitor PD98059 (2,5x10⁻⁵ molar), dem Proteinkinase-C-Inhibitor Gö6976 (10⁻⁶ molar), dem Proteinkinase-A-Inhibitor H89 (10⁻⁵ molar), dem Proteinkinase-B-Inhibitor Ly294002 (10⁻⁵ molar) sowie PDTC (10⁻⁴ molar), einem Inhibitor u.a. des "Nuclear factor κ B", behandelt und anschließend der "Glutamate tranporter 1"(GLT-1)- bzw. "Glutamate aspartate transporter"(GLAST)-Gehalt mittels Western-Blot-Analyse bestimmt.

auf die GLT-1-Expression unterblieb sowohl in Anwesenheit von Gö6976, H89, Ly94002 als auch von PDTC (Abb. 6). Im Gegensatz dazu war der stimulatorische Einfluss von FGF-2/PD98059 auf die GLAST-Expression nur mit H89 und PDTC hemmbar, während sowohl Gö6976 als auch Ly294002 ohne inhibitorische Wirkung blieben (Abb. 6). Bei PDTC handelt es sich um einen potenten NF-κB-Inhibitor, von dem allerdings auch Wirkungen auf andere Signalmoleküle bekannt sind (Liao et al. 2000; Chen et al., 2000; DeMeester et al., 1998). Um die Spezifität der beobachteten PDTC-Wirkung näher zu charakterisieren, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass NF-kB erst nach Phosphorylierung und anschließender Degradierung des Bindungsproteins IkB in den Zellkern transloziert und dort die Genaktivität reguliert (Karin, 1999; zur Übersicht). Der Nachweis von aktiviertem IkB unter den verschiedenen Behandlungen erfolgte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper. Die Stimulation von Astrogliakulturen mit TNF α (20 ng/ml), einem bekannten, potenten Aktivator von NF- κ B, führte innerhalb von 5 min zu einer deutlichen Zunahme des phosphorylierten IκB (Abb. 7). Eine ähnliche IkB-Aktivierung fand bei 5-minütiger Stimulation mit FGF-2 alleine oder in Kombination mit PD98059 nicht statt (Abb. 7). Eine IkB-Aktivierung unterblieb auch nach längerer Behandlungsdauer (60 min). Insgesamt läßt dies darauf schließen, dass NF-



κB nicht an der Vermittlung der stimulatorischen FGF-2/PD98059-Effekte beteiligt ist.

4.5 Effekte von FGF-2/PD98059 auf die Glia-Morphologie

In früheren Arbeiten wurde wiederholt darauf hingewiesen, dass die Wirksamkeit extrazellulärer Faktoren auf die Glutamattransporter-Expression eine morphologische Differenzierung der Gliazellen voraussetzt (Swanson et al. 1997; Zelenaia et al, 2000). Um die Einflüsse der verschiedenen Behandlungen auf die Astrozytenmorphologie genauer zu untersuchen, wurden kortikale Astrozyten für 72 h mit FGF-2 in An- bzw. Abwesenheit von PD98059 kultiviert und anschließend mittels GFAP-Immunzytochemie gefärbt. Die Mehrzahl der GFAP-immunreaktiven Zellen in FGF-2-behandelten Kulturen entwickelte multiple Fortsätze und entsprach damit reifen Astrozyten (Abb. 8). Eine vergleichbare Morphologie wies auch die Mehrzahl der GFAP-immunreaktiven Zellen nach Behandlung mit einer Kombination aus FGF-2 und PD98059 auf. Diese Befunde machen deutlich, dass induzierte morphologische Differenzierung die exogen von Astrozyten nicht notwendigerweise mit einer erhöhten Glutamattransporter-Expression einhergeht.



Abb. 8

Morphologie "Glial fibrillary acidic protein"(GFAP)-immunreaktiver Astrozyten nach dreitägiger Behandlung mit "Fibroblast growth factor 2"(FGF-2; 25 ng/ml) (A) bzw. mit FGF-2 (25 ng/ml) und dem "Mitogen-activated pathway"-Kinase-Inhibitor PD98059 (2,5x 10⁻⁵ molar) (B). Vergrößerung: ca. 250fach

5. Diskussion

5.1 Untersuchung des glialen Glutamattransports an primären Astrozytenkulturen

Die Aufnahme von extrazellulärem Glutamat durch die glialen Glutamatransporter GLT-1 und GLAST gilt als Hauptweg der Glutamat-Wiederaufnahme im Gehirn (Rothstein et al., 1996; Sims und Robinson, 1999, zur Übersicht). "Knock-out-" und Gen-Inaktivierungs-Studien zeigten, dass GLT-1 ca. 90% des Glutmattransports im Vorderhirn leistet (Rothstein et al., 1996). Trotz der Bedeutung des glialen Glutamattransports für die Hirnfunktion ist bisher wenig über die an seiner Regulation beteiligten Faktoren bekannt. Da GLT-1 sowohl in Glia als auch in Neuronen vorliegt (Brooks-Kayal et al., 1998; Furuta et al., 1997a; Lehre et al., 1995 Rothstein et al., 1994; Storck et al., 1992; Torp et a., 1997) und darüberhinaus Neurone bekanntermaßen die Expression glialer Glutamattransporter beeinflussen (Schlag et al., 1998), wurden alle Untersuchungen an aufgereinigten Astrozytenkulturen durchgeführt. Hierzu wurden Dissoziationskulturen der Großhirn-Hemisphären 1 bis 3 Tage alter Ratten angelegt und in Anwesenheit von 10% Pferdeserum kultiviert. Diese Kultivierungsbedingungen fördern die Proliferation von Gliazellen nicht jedoch die der vorhandenen Neuronen (Morrison und de Vellis, 1983). Durch dreimaliges Passagieren konfluenter Kulturen war es weiterhin möglich, den Anteil an verbleibenden Neuronen auf unter 1% zu senken. Wie die Markierung mit dem Astrozytenmarker GFAP zeigte, bestanden Kulturen nach der dritten Passage hauptsächlich aus Astrozyten vom Typ 1, welche sich morphologisch als polygonale, flache Zellen darstellen. Um des Weiteren Wechselwirkungen zwischen Serumbestandteilen und den exogen zugeführten Substanzen auszuschließen, wurden die Kulturen vor Behandlungsbeginn auf serumfreies, definiertes N2-Medium umgestellt. Potentielle Einflüsse von FGF-2 auf die Transporterexpression wurden zunächst mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung GLT-1- und GLASTspezifischer Antikörper untersucht. Da die Steuerung der glialen Glutamattransporter-Expression auch ausschließlich auf translationaler Ebene erfolgen kann (Gegelashvili et al., 1996), war es von Interesse, inwiefern FGF-2 einen Effekt auf die mRNA-Expression ausübt. Zu diesem Zweck wurden der GLT-1- und GLAST-mRNA-Gehalt mittels Real-Time-RT-PCR quantifiziert. Die Glutamattransporter EAAT3 und EAAT4 können mit sogenannten "Glutamate transporter associated proteins" (GTRAP) interagieren, welche den Glutamattransport entweder hemmen oder beschleunigen (Lin et al., 2001). Obwohl entsprechende GTRAPs für GLT-1 und GLAST bisher nicht identifiziert wurden, kann die Existenz solcher Proteine gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden. Daher ist denkbar, dass ein Anstieg der Transporterexpression nicht notwendigerweise mit einer erhöhten Glutamataufnahme einhergehen muss. Um diese Möglichkeit zu berücksichtigen wurden die Effekte der FGF-2-Behandlung auf die Glutamataufnahme anhand von Aufnahme-Experimenten weiter untersucht. Die Berechnung der K_m- und V_{max}-Werte der Glutamataufnahme erfolgte nach linearer Transformation der Aufnahmedaten (Eadie-Hofstee) und entsprach in unbehandelten Kulturen in etwa den in der Literatur bislang publizierten Werten (Schlag et al., 1998).

5.2 Steigerung der glialen Glutamattransporter-Expression durch FGF-2/PD98059 und daran beteiligte Signalwege

den bisher identifizierten Faktoren, welche die Expression der Zu glialen Glutamattransporter stimulieren, zählen PACAP und die EGFR-Liganden EGF und TGFa (Zelenaia et al., 2000; Figiel und Engele 2000). Die nun erzielten Befunde belegen, dass auch FGF-2 bei gleichzeitiger Hemmung der MAP-Kinase-(ERK)-Aktivität die Expression der glialen Glutamattransporter GLT-1 und GLAST sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stimuliert und eine Zunahme der maximalen Glutamataufnahme-Geschwindigkeit bewirkt. Eine Aussage, zu welchem Anteil GLT-1 bzw. GLAST zu dieser Steigerung der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit beitragen, ist augenblicklich nicht möglich, da spezifische Inhibitoren von GLT-1 bzw. GLAST nur in heterologen Kultursystemen, nicht aber in primären Astrozytenkulturen wirksam sind (Schlag et al., 1998). Neben der Erhöhung der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit für Glutamat führten EGF, TGFa und FGF-2/PD98059 auch zu einer scheinbaren Zunahme des Km-Wertes der Glutamataufnahme. Eine scheinbare Erhöhung des Km-Wertes der Glutamataufnahme wurde bereits in anderen Arbeiten nach Behandlung kortikaler Astroglia mit dbcAMP bzw. PACAP beobachtet (Schlag et al., 1998; Figiel und Engele, 2000). Dies wurde dahingehend interpretiert, dass der gesteigerte Glutamattransport zu einer raschen Abnahme der Glutamatkonzentration in unmittelbarer Umgebung der Transporter führt, welche durch Diffusionsprozesse aus der weiteren Umgebung nur verzögert ausgeglichen werden kann und in der Folge mit einer Überschätzung des Km-Wertes einhergeht (Schlag et. al., 1998).

Interessanterweise sprechen die gemachten Beobachtungen augenblicklich dafür, dass der stimulatorische Effekt von FGF-2 auf die Glutamattransporter-Expression im Gegensatz zur Wirkung der oben aufgeführten extrazellulären Faktoren vom proliferativen Status der Gliazellen abhängt und nur in ruhenden, nicht-proliferativen Zellen erfolgt. Bei gesteigerter Mitoserate, wie sie nach Behandlung kortikaler Gliakulturen mit hohen FGF-2-Konzentrationen auftritt (Engele und Bohn, 1992), nimmt die GLT-1- und GLAST-Expression deutlich ab. FGF-2 induziert die Gliaproliferation über die Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade (Kurino et al., 1996; Bayatti und Engele, 2001). Nur nach Hemmung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade (und damit der Gliaproliferation) mittels PD98059 war ein Einfluss von FGF-2 auf die Glutamattransporter-Expression

nachweisbar. Eine mögliche Erklärung, weshalb FGF-2 die gliale Glutamattransporter-Expression nur unter Hemmung der MAP-Kinase-Aktivität stimuliert, wurde kürzlich in einer Arbeit von Bayatti und Engele (2001) aufgezeigt. Hier wurde beobachtet, dass PD98059 nicht nur die FGF-2-induzierte ERK-Aktivierung hemmt, sondern gleichzeitig eine CREB-Aktivierung bewirkt, was als Hinweis auf eine Umleitung FGF-2-abhängiger Signalwege durch Hemmung der MAP-Kinase-Kaskade interpretiert wurde (Abb. 9).



Abb. 9 Hypothetischer Mechanismus der FGF-2-abhängigen Steuerung der glialen Glutamattransporter-Expression

Bei ungehemmter Aktivität der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade führt "Fibroblast growth factor 2" (FGF-2) zu einer verstärkten Gliaproliferation. Die experimentelle Hemmung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs mittels PD98059 bzw. eventuell die physiologische Hemmung durch zyklisches Adenosinmonophosphat(cAMP)-gekoppelte Faktoren resultiert in einer Umleitung FGF-2-abhängiger Signalwege über die Proteinkinasen A, B und/oder C und bewirkt eine Steigerung der glialen Glutamattransporter-Expression (GLT-1 und GLAST). Das an diesen stimulatorischen Einflüssen beteiligte "Down-stream"-Signal ist bislang unbekannt. Raf=Seronin-/Thyrosin-Kinase; ERK=Extracellular signal related kinase; MEK=ERK-Kinase; PD98059=ein "Mitogen-activated pathway"-Kinase-Inhibitor

Bisher liegen allerdings keine Hinweise für eine Beteiligung von CREB an der Regulation der glialen Glutamattransporter-Expression vor. Es ist des Weiteren möglich, dass von der PD98059-induzierten Umleitung andere Signalproteine betroffen sind, welche einen Einfluss auf die Expression der glialen Glutamattransporter ausüben. In diesem Zusammenhang wäre auch zu klären, warum die EGFR-Liganden TGFα und EGF, welche beide ebenfalls potente Gliamitogene darstellen (Simpson et al., 1982), die Transporter-Expression im Gegensatz zu FGF-2 unabhängig vom proliferativen Status induzieren. Eine Hemmung der FGF-2-induzierten Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade erfolgt in Gliazellen unter physiologischen Bedingungen durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts (Bayatti und Engele, 2000), was den Schluss nahe legt, dass FGF-2 die Expression glialer Glutamattransporter in Kooperation mit cAMP/PKA-gekoppelten extrazellulären Faktoren steuert. Durch Inhibition einzelner Signalproteine ließ sich zeigen, dass die stimulatorischen Einflüsse von FGF-2/PD98059 auf die GLT-1-Expression sowohl durch PKA, PKC als auch PI3K/Akt vermittelt werden. Im Gegensatz dazu erfordert die FGF-2/PD98059-induzierte Zunahme der GLAST-Expression lediglich die PKA-Aktivierung. Diese Beobachtungen ergänzen weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass die stimulatorischen Einflüsse abhängig vom Transportertyp und vom jeweils verwendeten extrazellulären Faktor durch PKA, PKC, und/oder Akt vermittelt werden (Figiel et al., Publikation in Vorbereitung). Akt, ERK, PKC und PKA aktivieren alle NF-κB (Ozes et al., 1999; Zhong et al., 1998; Minneman et al., 2000; Vertegaal et al., 2000), jenes Signalmolekül, welches kürzlich für die Vermittlung der stimulatorischen TGFa- und EGF-Effekte auf die Glutamattransporter-Expression verantwortlich gemacht wurde (Zelenaia et al., 2000). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich, dass der NF-kB-Inhibitor PDTC die FGF-2/PD98059-Wirkung auf die Glutamattransporter-Expression vollständig unterband (Abb. 7). Andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten diesen inhibitorischen PDTC-Effekt auch für die Wirkungen von PACAP und TGFa auf die Transporterexpression (Figiel und Engele, unveröffentlichte Befunde). Dieser Effekt kommt nicht durch eine allgemeine PDTC-Toxizität zustande, da PDTC gleichzeitig die Aktivierung anderer Signalproteine wie beispielsweise die dbcAMP-induzierte CREB-Phosphorylierung in kultivierter Astroglia nicht beeinflusst (Bayatti und Engele, unveröffentlichte Befunde). Interessanterweise führen weder FGF-2/PD98059 (wie in dieser Arbeit gezeigt) noch TGFα, EGF, PACAP, PDGF (Figiel und Engele, unveröffentlichte Ergebnisse) zu einer

Phosphorylierung von IkB und damit einer Aktivierung von NF-kB in kortikalen Astrozyten. Eine solche NF-kB-Aktivierung erfolgte dagegen bei Behandlung mit dem Zytokin welches keine stimulatorischen Einflüsse auf TNFα, die gliale Glutamattransporter-Expression ausübt (Fine et al., 1996; Ye und Sontheimer, 1996; Figiel und Engele, unveröffentlichte Beobachtungen). PDTC inhibiert nicht nur NF-kB, sondern wirkt auch als Chelator und Antioxidans und beeinflusst die Aktivität einer Reihe anderer Signalproteine, wie AP-1, JNK, HSP-90 (Liao et al. 2000; Chen et al., 2000; DeMeester et al., 1998). Wir interpretieren daher unsere Beobachtungen augenblicklich dahingehend, dass die stimulatorischen Einflüsse von TGFa, EGF, PACAP, PDGF und FGF-2/PD98059 auf die Glutamattransporter-Expression durch ein gemeinsames, bisher nicht bekanntes PDTC-sensitives "Down-stream"-Signal vermittelt werden. Für die Existenz eines gemeinsamen "Down-stream"-Signals spricht unter anderem auch die Beobachtung, dass die oben genannten Faktoren keine additive Wirkung auf die Glutamattransporter-Expression besitzen (Engele, persönliche Mitteilung).

5.3 Unabhängigkeit von morphologischer Gliadifferenzierung und Glutamattransporter-Expression

Die Beobachtung, dass EGF, TGFa und dbcAMP die morphologische Differenzierung kultivierter Gliazellen induzieren und erst nach längerer Behandlungsdauer mit diesen Faktoren eine Zunahme der Glutamattransporter-Expression auftritt, führte ursprünglich zu der Annahme, dass die Expression der Glutamattransporter nur in morphologisch reifen Astrozyten regulierbar ist (Swanson et al. 1997; Zelenaia et al, 2000). PACAP induziert jedoch die GLAST- und GLT-1-Expression in Astrozyten unabhängig von deren morphologischer Differenzierung (Figiel und Engele, unveröffentlichte Ergebnisse). Die gleichzeitige Behandlung mit EGF- bzw. TGFa und dem MAP-Kinase-Inhibitor PD98059, welcher die durch EGF- bzw. TGFα-vermittelte Induktion der Gliaproliferation (Bayatti und Engele, 2002) und deren Effekte auf die Astrozytenmorphologie unterbindet (Figiel, unveröffentlichte Ergebnisse), verhinderte nicht die Induktion der GLT-1- und GLAST-Expression. Die vorliegende Arbeit belegt wiederum, dass FGF-2 die morphologische Reifung der Gliazellen bewirkt, ohne die Glutamattransporter-Expression zu beeinflussen. Insgesamt lassen diese Befunde den Schluss zu, dass die morphologische Astrozytendifferenzierung im Gegensatz zur ursprünglichen Hypothese keine Voraussetzung für die Glutamattransporter-Expression darstellt.

5.4 Glialer Glutamattransport und ZNS-Pathologie

FGF-2, PDGF, EGF und TGF α werden sowohl von Gliazellen als auch von Neuronen synthetisiert (Junier et al., 2000; Szebenyi und Fallon, 1999; Valenzuela et al., 1999), während PACAP selektiv von Neuronen produziert zu werden scheint (Figiel und Engele, 2000). Alle Daten deuten im Moment darauf hin, dass im gesunden Gehirn die Glutamattransporter-Expression vor allem durch neuronales PACAP reguliert wird und hier FGF-2, PDGF, EGF und TGFα allenfalls eine untergeordnete Rolle spielen. Tötet man beispielsweise die Neuronen in Glia-Neuronen-Kokulturen ab, kommt es zu einem massiven Abfall der GLT-1-Expression (Schlag et al., 1998). Ebenso führen Fornix- und kortikostriatale Läsionen zu einem vorübergehenden Abfall der GLT-1- und GLAST-Protein-Konzentration in Striatum bzw. Hippocampus (Ginsberg et al., 1995; 1996). Und die stimulatorischen Einflüsse von Neuronen-konditioniertem Medium auf die gliale Glutamattransporter-Expression können durch Zugabe von PACAP-inaktivierenden Antikörpern oder dem PACAP-Rezeptor-Antagonisten PACAP-(6-38) praktisch vollständig unterbunden werden, während eine ähnliche Hemmung der Glutamattransporter-Expression nach Inaktivierung des EGF-Rezeptors nicht auftritt (Figiel und Engele, 2000). Im Gegensatz zum gesunden Gehirn muss davon ausgegangen werden, dass FGF-2, PDGF, EGF und TGFa eine zentrale Rolle bei Steuerung der Glutamattransporter-Expression nach Hirnschädigungen spielen. Nach kortikalen Hirnschäden sinkt die gliale Glutamattransporter-Expression innerhalb von Stunden ab und erholt sich dann binnen einiger Tage wieder (Rao et al., 1998). Dieser biphasische Effekt reflektiert wahrscheinlich den durch Neuronenschädigung bedingten Verlust des neuronalen PACAP-Einflusses auf die Glutamattransporter-Expression und das anschließende Einsetzen eines FGF-2-, EGF-, TGFa- und/oder PDGF-abhängigen Kompensationsmechanismus (Sims und Robinson, 1999; zur Übersicht). Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass FGF-2, PDGF, EGF und TGFa die PACAP-Wirkung auf die gliale Glutamattransporter-Expression bei bestimmten pathologischen Hirnzuständen ersetzen. Tatsächlich kommt es nach Hirntraumen weder zu einer Hochregulation von PACAP noch des selektiven PACAP-Rezeptors PAC1, jedoch zu einer massiven Erhöhung der FGF-2-, PDGF-, EGF- und TGFα-Synthese in reaktiven Astrozyten (Gomez-Pinilla und Cotman, 1992, Logan et. al., 1992; Lisovoski et al., 1997; Junier, 2000) und der PDGF-Synthese in Neuronen und Makrophagen (Takayama et al.,

1994). Berücksichtigt man die zentrale Bedeutung der Astrozyten bei der Wiederaufnahme von extrazellulärem Glutamat und damit für die Beendigung der glutamergen Neurotransmission, ist die Regulation der glialen Glutamattransporter-Expression durch multiple extrazelluläre Faktoren wenig überraschend.

5.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass FGF-2 unter Inhibition des MAP-Kinase-Signalwegs in Astrozytendissoziationskulturen die gliale Glutmattransporter-Expression induziert und eine Steigerung des Glutamattransports bewirkt. Dabei führt die Inhibition des MAP-Kinase-Signalwegs wahrscheinlich zu einer Umlenkung FGF-2-induzierter Signalwege zu Adenylatzyklase-abhängigen Signalwegen. Eine wichtige Aufgabe wird sein, zu klären, wie FGF-2, PACAP, EGF und/oder TGFα die glutamerge Neurotransmission im gesunden bzw. im kranken Gehirn beeinflussen. Beispielsweise verringert die innerhalb von Stunden nach einem Schlaganfall begonnene intravenöse FGF-2-Gabe die Größe des infarzierten Gebietes (Ay et al., 1999). Eine Erklärung, welche sich aus den vorgelegten Resultaten ergibt, wäre, dass FGF-2 zusammen mit cAMPgekoppelten Faktoren die Glutamattransporter-Expression stimuliert und so den durch Glutamatexzitotoxizität bedingten neuronalen Zelltod verhindert. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse könnte helfen, Neuronenschädigungen bei akuten Hirnverletzungen oder aber auch im Rahmen chronischer Hirnerkrankungen, wie der Amyotrophen Lateralsklerose, der Alzheimerschen Krankheit und der Chorea Huntington, welche bekanntermaßen mit einer gestörten Expression glialer Glutamattransporter einhergehen, zu begrenzen (Sims und Robinson, 1999; zur Übersicht).

6. Zusammenfassung

Störungen der glialen Glutamattransporter-Expression und die daraus resultierende Zunahme des extrazellulären Glutamatgehalts gelten heute als eine zentrale Ursache für den bei vielen akuten und chronischen Hirnerkrankungen auftretenden neuronalen Zelltod. Trotz des großen klinischen Interesses sind die extra- und intrazellulären Mechanismen, welche die Expression der glialen Glutamattransporter "Glutamate transporter 1" (GLT-1) und "Glutamate aspartate transporter" (GLAST) steuern, bis heute weitgehend ungeklärt. Zu den bislang identifizierten extrazellulären Faktoren mit einem Einfluss auf die Expression der glialen Glutamattransporter zählen "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide" (PACAP) sowie die EGF-Rezeptor-Liganden "Epidermal growth factor" (EGF) und "Transforming growth factor α " (TGF α). Alle augenblicklich verfügbaren Daten sprechen dafür, dass im intakten Gehirn die Steuerung der GLT-1- und GLAST-Expression im wesentlichen durch PACAP erfolgt, welches selektiv von Neuronen bereitgestellt wird, während EGF und TGFa vor allem eine kompensatorische Funktion nach Hirnverletzung übernehmen und unter diesen pathologischen Bedingungen verstärkt von reaktiver Astroglia produziert werden. Neben EGF und TGFα synthetisieren reaktive Astrozyten ebenfalls vermehrt den Wachstumsfaktor "Fibroblast growth factor 2" (FGF-2), welcher einen potenten Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Gliazellen ausübt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, inwiefern auch FGF-2 die Expression der glialen Glutamattransporter steuert. Da GLT-1 in geringem Umfang von Neuronen exprimiert wird und um Einflüsse durch neuronale Faktoren auszuschließen, wurden alle Untersuchungen an aufgereinigten Astrogliakulturen des Kortex postnataler Ratten durchgeführt. Die 72-stündige Behandlung dieser Kulturen mit FGF-2 führte zu einem vermehrten Auftreten von morphologisch differenzierten Astrozyten, die durch sternartige Fortätze charakterisiert waren, blieb jedoch anders als TGFa oder EGF ohne Einfluss auf die GLT-1- und GLAST-Expression. Aufgrund der kürzlich erhaltenen Befunde, dass die Hemmung der Raf-MEK-ERK-Signalkette ("Mitogen-activated pathway"-Kinase-Kaskade) in Astrozyten mit einer Umleitung FGF-2-abhängiger Signalwege einhergeht, wurde kortikale Astroglia zusätzlich für 72 h mit einer Kombination aus FGF-2 und dem "Extracellular signal related kinase"(ERK)-Inhibitor PD98059 behandelt. Unter diesen Bedingungen nahm die GLT-1- und GLAST-Expression sowohl auf Messenger-Ribonukleinsäure(mRNA)- als auch auf Protein-Ebene deutlich zu

darüber hinaus mit einer 1.5-fachen Zunahme der und war maximalen Glutamataufnahmegeschwindigkeit verbunden. Eine Hemmung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade tritt in Astrozyten auch nach Zunahme des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat(cAMP)-Gehalts auf, woraus geschlossen werden kann, dass FGF-2 unter physiologischen Bedingungen nur in Anwesenheit weiterer cAMP-gekoppelter Signale einen Einfluss auf die Glutamattransporter-Expression ausübt. Pharmakologische Untersuchungen erlaubten zu zeigen, dass der stimulatorische Einfluss von FGF-2 und PD98059 auf die GLT-1 Expression sowohl durch den Proteinkinase-A-Inhibitor H89, den Proteinkinase-C-Inhibitor Gö6976, als auch den Akt(Proteinkinase B)-Inhibitor Ly294002 hemmbar ist, während im Falle von GLAST eine ähnliche Hemmung nur durch H89 erfolgt. Diese Beobachtungen belegen einerseits, dass FGF-2 und PD98059 die GLT-1 und GLAST Expression über unterschiedliche Signalwege steuert und sprechen andererseits dafür, dass der FGF-2-Signalfluss nach Hemmung der Raf-MEK-ERK-Signalkette zu Signalproteinen mehreren unterschiedlichen umgeleitet wird. In bisherigen Untersuchungen wurde darauf hingewiesen, dass die stimulatorischen Einflüsse von PACAP, EGF und TGFα auf die GLT-1- und GLAST-Expression auch durch PDTC, einen potenten Inhibitor des "Nuclear factor kB"(NF-κB), hemmbar sind, dass jedoch keiner der obigen Faktoren zu einer Aktivierung des NF-kB-Regulator IkB in kortikaler Astroglia führt und es somit hierbei zu keiner NF-kB-Aktivierung kommt. Vergleichbare Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit auch für FGF-2 und PD98059 gemacht, was die Hypothese unterstützt, dass alle stimulatorischen Einflüsse auf die gliale Glutamattransporter-Expression durch ein gemeinsames, bislang unbekanntes PDTCsensitives "Down-stream" Signal vermittelt werden. Insgesamt belegen diese Ergebnisse, dass FGF-2 unter bestimmten zellulären Bedingungen einen potenten Einfluss auf die Expression glialer Glutamattransporter ausübt und damit vor Glutamat-induzierten Hirnschäden schützen kann.

7. Literatur

Akbar MT, Torp R, Danbolt NC, Levy LM, Meldrum BS, Ottersen OP: Expression of glial glutamate transporters GLT-1 and GLAST is unchanged in the hippocampus in fully kindled rats. Neuroscience <u>78</u>: 351-359 (1997)

Amara SG: Neurotransmitter transporters: new insights into structure, function and pharmacology. Rev Bras Biol <u>56</u>: 5-19 (1996)

Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG: Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. J Biol Chem <u>268</u>: 15329-15332 (1993)

Arriza JL, Fairman WA, Wadliche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG: Functional comparison of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. J Neurosci <u>14</u>: 5559-5569 (1994)

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG: Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. Proc Natl Acad Sci USA <u>94</u>: 4155-4160 (1997)

Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A: Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. J Neuropathol Exp Neurol <u>56</u>: 440-454 (1997)

Ay H, Ay I, Koroshetz WJ, Finklestein SP: Potential usefulness of basic fibroblast growth factor as a treatment for stroke. Cerebrovasc Dis <u>9</u>: 131-135 (1999)

Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berretta N, Irving AJ, Seal AJ, Henley JM, Jane DE, Watkins JC, Collingridge GL: Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. Nature <u>363</u>: 347-350 (1993)

Bayatti N, Engele J: Cyclic AMP modulates the response of central nervous system glia to

fibroblast growth factor-2 by redirecting signalling pathways. J Neurochem <u>78</u>: 1-10 (2001)

Bayatti N, Engele J: (unveröffentlichte Befunde)

Bliss TV, Collingridge GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature <u>361</u>: 31-39 (1993)

Bristol LA, Rothstein JD: Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. Ann Rev Neurol <u>39</u>: 676-686 (1996)

Brooks-Kayal AR, Munir M, Jin H, Robinson MB: The glutamate transporter, GLT-1, is expressed in cultured hippocampal neurons. Neurochem Int <u>33</u>: 95-100 (1998)

Chan PH, Kerlan R, Fishman RA: Reductions of gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake and (Na+ + K+)-ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. J Neurochem <u>40</u>: 309-316 (1983)

Chen SH, Liu SH, Liang YC, Lin JK, Lin-Shiau S.Y.. Death signaling pathway induced by pyrrolidine dithiocarbamate-Cu(2+) complex in the cultured rat cortical astrocytes. Glia <u>31</u>: 249-261 (2000)

Choi DW: Excitotoxic cell death. J Neurobiol 23: 1261-1276 (1992)

Conn PJ, Pin JP: Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol <u>37</u>: 205-237 (1997)

Conradt M, Stoffel W: Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. J Neurochem <u>68</u>: 1244-1251 (1997)

Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M: EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. Cereb Cortex <u>8</u>: 108-116 (1998)

Correale DM, Kalandadze A, Zelenaia O, Robinson MB: Comparision of the regulation of cell surface expression of the GLT-1, GLAST and EAAC1 of glutamate transporters. Soc Neurosci Abstr <u>24</u>: 2071 (1998)

Danbolt NC: The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. Prog Neurobiol <u>44</u>: 377-396 (1994)

Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB: Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. J Neurosci <u>18</u>: 2475-2485 (1998)

DeMeester SL, Buchman TG, Qiu Y, Dunnigan K, Hotchkiss RS, Karl IE, Cobb JP: Pyrrolidine dithiocarbamate activates the heat shock response and hereby induces apoptosis in primed endothelial cells. Shock <u>10</u>: 1-6 (1998)

Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA: Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. J Neurosci <u>19</u>: 10193-10200 (1999)

Ebner S, Dunbar M, McKinnon RD: Distinct roles for PI3K in proliferation and survival of oligodendrocyte progenitor cells. J Neurosci Res <u>62</u>: 336-345 (2000)

Eclancher F, Perraud F, Faltin J, Labourdette G, Sensenbrenner M: Reactive astrogliosis after basic fibroblast growth factor (bFGF) injection in injured neonatal rat brain. Glia <u>3</u>: 502-509 (1990)

Engele J: Persönliche Mitteilung (2003)

Engele J, Bohn C: Effects of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF) on glial precursor cell proliferation: age dependency and brain region specificity. Devl Biol <u>152</u>: 363-372 (1992)

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG: An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. Nature <u>375</u>: 599-603 (1995)

Figiel M, Engele J: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuronderived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. J Neurosci <u>20</u>: 3596-3605 (2000)

Figiel M, Engele J: (unveröffentlichte Befunde)

Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, Bayatti N, Engele J: Identification and functional characterization of extracellular factors regulating glial glutamate transporter expression. (Publikation in Vorbereitung)

Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, Gelbard HA: Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. J Biol Chem <u>271</u>: 15303-15306 (1996)

Florkiewicz RZ, Sommer A: Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. Proc Natl Acad Sci USA <u>86</u>: 3978-3981 (1989)

Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ: Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. J Neurosci <u>17</u>: 8363-8375 (1997a)

Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD: Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. Neuroscience <u>81</u>: 1031-1042 (1997b)

Gallo V, Ghiani CA: Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. Trends Pharmacol Sci <u>21</u>: 252-258 (2000)

Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I, Schousboe A:

Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. Neuroreport <u>8</u>: 261-265 (1996)

Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A: Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. J Neurochem <u>69</u>: 2612-2615 (1997)

Gegelashvili G, Schousboe A: High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. Mol Pharmacol <u>52</u>: 6-15 (1997)

Gemba T, Oshima T, Ninomiya M: Glutamate efflux via the reversal of the sodiumdependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. Neuroscience <u>63</u>: 789-795 (1994)

Ginsberg SD, Martin LJ, Rothstein JD: Regional deafferentiation downregulated subtypes of glutamate transporter proteins. J Neurochem <u>65</u>: 2800-2803 (1995)

Ginsberg SD, Rothstein JD, Price DL, Martin LJ: Fimbria-fornix transections selectively down-regulate subtypes of glutamate transporter and glutamate receptor proteins in septum and hippocampus. J. Neurochem. <u>67</u>: 1208-1216 (1996)

Gomez-Pinilla F, Cotman CW: Transient lesion-induced increase of basic fibroblast growth factor and its receptor in layer VIb (subplate cells) of the adult rat cerebral cortex. Neuroscience <u>49</u>: 771-780 (1992)

Gomez-Pinilla F, Vu L, Cotman C: Regulation of astrocyte proliferation by FGF-2 and heparan sulfate in vivo. J.Neuroscience <u>15</u>: 2021-2029 (1995)

Gonzalez MI, Ortega A: Regulation of the Na+-dependent high affinity glutamate/aspartate transporter in cultured Bergmann glia by phorbol esters. J Neurosci Res <u>50</u>: 585-590 (1997)

Harris ME, Wang Y, Pedigo NW Jr., Hensley K, Butterfield DA, Carney JM: Amyloid

beta peptide (25-35) inhibits Na+-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. J Neurochem <u>67</u>: 277-286 (1996)

Hollmann M, Heinemann S: Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neurosci <u>17</u>: 31-108 (1994)

Junier M: What role(s) for TGFa in the central nervous system? Prog Neurobiol <u>62</u>: 443-473 (2000)

Kanai Y, Hediger MA: Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. Nature <u>360</u>: 467-471 (1992)

Kanai Y, Smith CP, Hediger MA: A new family of neurotransmitter transporters: the highaffinity glutamate transporters. FASEB J <u>7</u>: 1450-1459 (1993)

Kanner BI: Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family. FEBS Lett <u>325</u>: 95-9 (1993)

Karin M: The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. J Biol Chem <u>274</u>: 27339-27342 (1999)

Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP: Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. J Neurochem <u>69</u>: 273-284 (1997)

Kilpatrick TJ, Bartlett PF: Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. J Neurosci <u>15</u>: 3653-3661 (1995)

Kurino M, Fukunaga K, Ushio Y, Miyamoto E: Cyclic AMP inhibits activation of mitogen-activated protein kinase and cell proliferation in response to growth factors in cultured rat cortical astrocytes. J Neurochem <u>67</u>: 2246-2255 (1996)

Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC: Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. J Neurosci <u>15</u>: 1835-1853 (1995)

Leigh PN, Meldrum BS: Excitotoxicity in ALS. Neurology 47: 221-227 (1996)

Lester HA, Cao Y, Mager S: Listening to neurotransmitter transporters. Neuron <u>17</u>: 807-810 (1996)

Levy LM, Warr O, Attwell D: 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 <u>18</u>: 9620-9628 (1998)

Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E: Glutamate transporter alterations in Alzheimer's disease are possibly associated with abnormal APP expression. J Neuropathol Exp Neurol <u>56</u>: 901-911 (1997)

Liao HL, Zhu Y, Wang N, Verna L, Stemerman MB: Selective activation of endothelial cells by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate: involvement of C-jun N-terminal kinase and AP-1 activation. Endothelium <u>7</u>: 121-133 (2000)

Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD: Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT-2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. Neuron <u>20</u>: 589-602 (1998)

Lin CL, Orlov I, Ruggiero AM, Dykes-Hoberg M, Lee A, Jackson M, Rothstein JD: Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. Nature <u>410</u>: 84-88 (2001)

Lipton SA, Rosenberg PA: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N Engl J Med <u>330</u>: 613-622 (1994)

Lisovoski F, Blot S, Lacombe C, Bellier JP, Dreyfus PA, Junier MP: Transforming growth factor alpha expression as a response of murine motor neurons to axonal injury and mutation-induced degeneration. J Neuropathol Exp Neurol <u>56</u>: 459-471 (1997)

Logan A, Frautschy SA, Gonzales AM, Baird A: A time course for the focal elevation of synthesis of basic fibroblast growth factor and one of its high-affinity receptors (flg) following a localized cortical brain injury. J Neuroscience <u>12</u>: 3828-3837 (1992)

Lu N, Zhou R, DiCocco-Bloom: Opposing mitogenic regulation of PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms. J Neurosci Res <u>53</u>: 651-662 (1998)

Madl JE, Burgesser K: Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. J Neurosci <u>13</u>: 4429-4444 (1993)

Martin J-L, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ: Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. Ann Neurol <u>42</u>: 335-348 (1997)

McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP: Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. Nat Med <u>4</u>: 291-297 (1998)

Meldrum B, Garthwaite J: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol Sci <u>11</u>: 379-387 (1990)

Miller HP, Levey AI, Rothstein JD, Tzingounis AV, Conn PJ: Alterations in glutamate transporter protein levels in kindling-induced epilepsy. J Neurochem <u>68</u>: 1564-1570 (1997)

Minneman KP, Lee D, Zhong H, Berts A, Abbott KL, Murphy TJ: Transcriptional responses to growth factor and G protein-coupled receptors in PC12 cells: comparison of alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. J Neurochem <u>74</u>: 2392-2400 (2000)

Morrison RS, de Vellis J: Differentiation of purified astrocytes in a chemically defined medium. Brain Res <u>285</u>: 337-45 (1983)

Nakanishi S: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science <u>258</u>: 597-603 (1992)

Nakanishi S: Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. Neuron <u>13</u>: 1031-1037 (1994)

Nelson N: The family of Na+/Cl- neurotransmitter transporters. J Neurochem <u>71</u>: 1785-1803 (1998)

Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knopfel T: Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? Trends Neurosci <u>19</u>: 267-271 (1996)

Olney JW: Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. Biological Psychiatry <u>26</u>: 505-525 (1989)

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB: NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. Nature <u>401</u>: 82-85 (1999)

Parpura-Gill A, Beitz D, Uemura E: The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. Brain Res <u>754</u>: 65-71 (1997)

Perraud, F, Labourdette G, Miehe M, Sensenbrenner M: Comparison of the morphological effects of acidic and basic fibroblast growth factor on rat astroblasts in culture. J Neurosci Res <u>20</u>: 1-11 (1988)

Pin JP, Duvoisin R: The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. Neuropharmacology <u>34</u>: 1-26 (1995) Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Strom-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI: Cloning and expression of a rat L-glutamate transporter. Nature <u>360</u>: 464-467 (1992)

Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA, et al.: High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. Proc Natl Acad Sci USA <u>86</u>: 1836-1840 (1989)

Pomerance M, Gavaret JM, Breton M, Pierre M: Growth factor-regulated phosphatidylinositol-3-kinase in astrocytes. Involvement of pp60c-src. Cell Mol Biol <u>40</u>: 653-664 (1994)

Pursiheimo JP, Jalkanen M, Tasken K, Jaakkola P: Involvement of protein kinase A in fibroblast growth factor-2-activated transcription. Proc Natl Acad Sci USA <u>97</u>: 168-173 (2000)

Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S: FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. Neuron <u>18</u>: 81-93 (1997)

Raff MC, Abney ER, Cohen J, Lindsay R, Noble M: Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides and growth characteristics. J Neurosci <u>3</u>: 1289-1300 (1983a)

Raff MC, Miller RH, Noble M: A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. Nature <u>303</u>: 390-396 (1983b)

Rao VL, Baskaya MK, Dogan A, Rothstein JD, Dempsey RJ: Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. J Neurochem <u>70</u>: 2020-2027 (1998)

Reilly JF, Maher PA, Kumari VG: Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-

beta1 and FGF-2. Glia 22: 202-210 (1998)

Reynolds BA, Weiss S: Clonal and population analyses demonstrate that an EGFresponsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. Dev Biol <u>175</u>: 1-13 (1996)

Robinson MB, Dowd LA: Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodiumdependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. Adv Pharmacol <u>37</u>: 69-115 (1997)

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW: Localization of neuronal and glial glutamate transporters. Neuron <u>13</u>: 713-725 (1994)

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW: Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol <u>38</u>: 73-84 (1995)

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF: Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. Neuron <u>16</u>: 675-686 (1996)

Saroff D, Delfs J, Kuznetsov D, Geula C: Selective vulnerability of spinal cord motor neurons to non-NMDA toxicity. Neuroreport <u>11</u>: 1117-1121 (2000)

Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, Kalandadze A, Zelenaia OA, Rothstein JD, Robinson MB: Regulation of glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. Mol Pharmacol <u>53</u>: 355-369 (1998)

Sensenbrenner M, Labourdette G, Pettman B, Perraud F, Besnard F: Neuronal-derived factors regulating glial cell proliferation and maturation. J Physiol Paris <u>82</u>: 288-290 (1987)

Shafqat S, Tamarappoo BK, Kilberg MS, Puranam RS, McNamara JO, Guadano-Ferraz A,

Fremeau RT Jr.: Cloning and expression of a novel Na(+)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na+/glutamate cotransporters. J Biol Chem <u>268</u>: 15351-15355 (1993)

Simpson DL, Morrison R, de Vellis J, Herschman HR: Epidermal growth factor binding and mitogenic activity on purified populations of cells from the central nervous system. J Neurosci Res <u>8</u>: 453-462 (1982)

Sims KD, Robinson MB: Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. Crit Rev Neurobiol <u>13</u>: 169-197 (1999)

Storck T, Schulte S, Hofmann S, Stoffel W: Structure, expression and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. Proc Natl Acad Sci USA <u>89</u>: 10955-10959 (1992)

Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC: Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. J Neurosci <u>17</u>: 932-940 (1997)

Szebenyi G, Fallon JF: Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. Int Rev Cytol <u>185</u>: 45-106 (1999)

Takayama S, Sasahara M, Iihara K, Handa J, Hazama F: Platelet-derived growth factor Bchain-like immunoreactivity in injured rat brain. Brain Res <u>653</u>: 131-140 (1994)

Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahasshi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K: Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science <u>276</u>: 1699-1702 (1997)

Torp R, Lekieffre D, Levy LM, Haug FM, Danbolt NC, Meldrum BS, Ottersen OP: Reduced postischemic expression of a glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. Exp Brain Res 103: 51-58 (1995)

Torp R, Hoover F, Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Otterson OP: Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and rEAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. Anat Embryol <u>195</u>: 317-326 (1997)

Trotti D, Volterra A, Lehre KP, Rossi D, Gjesdal O, Racagni G, Danbolt NC: Arachidonic acid inhibits a purified and reconstituted glutamate transporter directly from the water phase and not via the phospholipid membrane. J Biol Chem <u>270</u>: 9890-9895 (1995)

Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A, Shimohama S: N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca(2+) overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca(2+) influx. J Neurosci Res <u>63</u>: 377-387 (2001)

Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y: Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na+-dependent neutral amino acid transporter. J Biol Chem <u>271</u>: 14883-14890 (1996)

Valenzuela CF, Kazlauskas A, Weiner JL: Roles of platelet-derived growth factor in the developing and mature nervous systems. Brain Res Brain Res Rev <u>24</u>: 77-89 (1997)

Vertegaal AC, Kuiperij HB, Yamaoka S, Courtois G, van der Eb AJ, Zantema A: Protein kinase C-alpha is an upstream activator of the IkappaB kinase complex in the TPA signal transduction pathway to NF-kB in U2OS cells. Cell Signal <u>12</u>: 759-768 (2000)

Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S: bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. Neuron <u>11</u>: 951-966 (1993)

Waschek JA, Casillas RA, Nguyen TB, DiCocco-Bloom EM, Carpenter EM, Rodriguez WI: Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. Proc Natl Acad Sci USA <u>95</u>: 9602-

9607 (1998)

Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K: Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. Eur J Neurosci <u>10</u>: 976-988 (1998)

Ye ZC, Sontheimer H.. Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. Neuroreport <u>7</u>: 2181-2185 (1996)

Yim SH, Hammer JA, Quarles RH: Differences in signal transduction pathways by which platelet-derived and fibroblast growth factors activate extracellular signal-regulated kinase in differentiating oligodendrocytes. J Neurochem <u>76</u>: 1925-1934 (2001)

Zelenaia O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD, Robinson MB: Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. Mol Pharmacol <u>57</u>: 667-678 (2000)

Zerangue N, Arizza GL, Amara SG, Kavanaugh MP: Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. J Biol Chem <u>270</u>: 6433-6435 (1995)

Zerangue N, Kavanaugh MP: Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. Nature <u>383</u>: 634-637 (1996)

Zhang Y, Kanner BI: Two serine residues of the glutamate transporter GLT-1 are crucial for coupling the fluxes of sodium and the neurotransmitter. Proc Natl Acad Sci USA <u>96</u>: 1710-1715 (1999)

Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the co-activator CBP/p300. Mol Cell <u>1</u>: 661-671 (1998)

8. Danksagung

Mein Dank geht an die Mitarbeiter der Abteilung Anatomie und Zellbiologie für ihre Hilfsbereitschaft. Speziell bei Esther möchte ich mich für den extra improvisierten, sehr guten "Einsteigerkurs in molekularbiologische Arbeitstechniken" bedanken.

Herrn Prof. Dr. Engele danke ich für seine Bereitschaft eine medizinische Doktorarbeit als Doktorvater über alle Schwierigkeiten hinweg geduldig zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. Pilgrim gilt meine Dankbarkeit dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, in seiner Abteilung zu arbeiten.

Gita, Joanna, Magda, Nadhim, Tatjana und Veysel haben mir mit ihrer Hilfsbereitschaft und Freundschaft das "Laborleben" erleichtert und auch den Humor in unserem Labor nicht zu kurz kommen lassen.

Herrn Dr. Maciej Figiel, ohne den diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, verdanke ich die unermüdliche Erläuterung der verschiedenen Arbeitstechniken und die ständige Unterstützung mit Rat und Tat.

Thanks, Maciej !