

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie
Leiter Prof. Dr. A. C. Ludolph

**Mutationsscreening und
alternative Spleißvarianten
des Glutamattransporters EAAT2
bei amyotropher Lateralsklerose**

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

vorgelegt von
Andrea Heike Lydia Fromm
aus Waiblingen
2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias M. Böckers

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Krankheitsbild der amyotrophen Lateral-Sklerose | 1 |
| 1.2 Glutamat als Neurotransmitter | 2 |
| 1.3 Glutamat als Neurotoxin | 3 |
| 1.4 Die verschiedenen Glutamatttransportsysteme | 4 |
| 1.5 Funktionelle Eigenschaften hochaffiner Glutamatttransporter | 6 |
| 1.6 Genfamilie und Expressionsmuster der Glutamatttransporter | 7 |
| 1.7 Molekulare Charakterisierung des Glutamatttransporters EAAT2 | 9 |
| 1.8 Die mRNA des menschlichen Glutamatttransporters EAAT2 | 10 |
| 1.9 Untersuchung der glutamatergen Neurotransmission | 11 |
| 1.10 Grundlagen des Spleißens | 13 |
| 1.11 Zielstellung | 23 |
| 2 Material und Methoden | 26 |
| 2.1 Patienten und Kontrollproben | 26 |
| 2.2 Chemikalien | 26 |
| 2.3 Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 2.4 Enzyme | 28 |
| 2.5 DNA-Molekulargewichtsmarker | 28 |
| 2.6 Oligonukleotide Primer | 29 |
| 2.7 Puffer und Lösungen | 31 |
| 2.8 Geräte | 33 |
| 2.9 Methoden | 34 |
| 3 Ergebnisse | 44 |
| 3.1 PCR-Amplifizierungen | 44 |

| | |
|--|-------------|
| 4 Diskussion | 52 |
| 4.1 Genomische EAAT2-DNA und defizitärer Glutamattransport | 52 |
| 4.2 Alternative/aberrante Spleißvarianten von EAAT2 | 52 |
| 5 Zusammenfassung | 59 |
| 6 Literaturverzeichnis | 60 |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | VI |
| Danksagung | VIII |
| Lebenslauf | IX |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| 5'-UTR | 5'-Untranslatierte Region, mRNA-Bereich, der nicht translatiert wird |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose; degenerative Motoneuronenerkrankung |
| ALS2-Gen | Alsin Gen (Gruppe der GTPase-regulierenden Proteine) |
| AMPA | α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionacid |
| AS | Aminosäure |
| ATG, atg | Startkodon im genetischen Code |
| ATPase | Enzyme zum Auf- oder Abbau von Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare; Längenangabe doppelsträngiger Nukleotidsequenzen |
| BPS | Verzweigungssequenz (branch point sequence) |
| BSA | Rinder- Serumalbumin (bovine serum albumin) |
| CDS | Codierende Sequenz (Proteinkodierende DNA-Sequenz) |
| ChA | Chromosomenaberration |
| C-Terminus | Carboxyterminus eines Peptids, das die freie Carboxylgruppe trägt |
| cDNA | Complementary (Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure |
| ddH ₂ O | deionisiertes und destilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat |
| EAAC-1 | Excitatory amino acid carrier-1 |
| EAAT | Excitatory amino acid transporter |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FTD | Frontotemporal dementia |
| GABA | Gamma-aminobutyric acid |
| GLAST | Glutamat-Aspartat-Transporter |
| GLTR | Glutamattransporter |

| | |
|------------|---|
| GLT-1 | Glutamatttransporter-1 |
| HBGT | Human brain glutamate transporter |
| HEAAC1 | Human excitatory amino acid carrier 1 |
| HGlut1 | Human glutamatetransporter1 |
| hnRNP | heterogenous nuclear ribonucleoprotein |
| IP3 | Inositoltrisphosphat |
| kb | Kilobasen |
| kDa | kiloDalton (atom. Masseneinheit) |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| NO | Stickstoff |
| nt | Nukleotide; Längenangabe einer einsträngigen Nukleotidsequenz |
| N-Terminus | Aminoterminus eines Peptids, das die freie Aminogruppe trägt |
| ORF | open reading frame; Offener Leserahmen |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaktion) |
| mBBP | mammalian branch point binding protein |
| mRNA | messenger (Boten-)RNA |
| RNAse | Ribonuklease |
| RT-PCR | Reverse Transkription mit anschließender PCR |
| RT | Reverse Transkriptase bzw. Reverse Transkription |
| SA | Spleißakzeptor, 3'-Spleißstelle |
| SD | Spleißdonor, 5'-Spleißstelle |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| snRNA | small nuclear RNA |
| snRNP | small nuclear ribonucleoprotein particle |
| SOD1 | Superoxiddismutase 1 |
| SR | Serin/Arginin- reich |
| SSCP | Single strand conformation Polymorphism |

| | |
|------|---|
| SF1 | Splice factor 1 |
| TAE | Lösung aus Tris-Base, Eisessig und EDTA |
| TBE | Lösung aus Tris Base, Borsäure und Na ₂ EDTA |
| TLE | Temporallappenepilepsie |
| U2AF | U2 snRNP auxiliary factor |
| UTR | Untranslatierte Region |
| ZNS | Zentralnervensystem |

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der amyotrophen Lateral-Sklerose

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS), ist eine rasch fortschreitende, degenerative Krankheit unbekannter Ätiologie, die erstmals im Jahre 1869 von J.M.Charcot beschrieben wurde [17]. Sie ist durch einen selektiven und kombinierten Untergang des ersten und zweiten Motoneurons gekennzeichnet [102, 11]. Durch den Befall der Motoneurone entstehen typische Symptomenkomplexe die einzeln oder überlagert auftreten:

1. Symptome des geschädigten ersten Motoneurons sind zentrale Paresen mit gesteigertem Muskeltonus und Eigenreflexen sowie pathologischen Fremdreflexen.
2. Symptome des geschädigten zweiten Motoneurons ergeben das Syndrom der spinalen Muskelatrophie. Es bestehen Muskelatrophien mit schlaffen Paresen, Faszikulationen, Myopathien und erloschene oder verminderte Eigenreflexe.
3. Durch eine Schädigung des zweiten Motoneurons im Bereich der kaudalen Hirnnervenkerne entsteht das Bild der Bulbärparalyse mit Dysarthrie, Dysphonie und Dysphagie [22].

Die Inzidenz der ALS beträgt 0,8-2,6/100.000, die Prävalenz liegt bei 3-8/100.000. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 50-70 Jahren mit einem Gipfel um das 60. Lebensjahr. Das männliche Geschlecht überwiegt mit 1,6:1 [2, 16].

Man unterscheidet zwischen einer sporadischen (sALS)-, familiären (fALS) und einer endemischen Form der amyotrophen Lateralsklerose, wobei die sALS mit 90-95% am häufigsten auftritt. Ätiologie und Pathogenese der sALS sind bis heute

nicht bekannt. Die familiäre Form, an der 5-10% der Patienten erkranken, entsteht durch einen genetischen Defekt. Es sind bislang acht Genorte auf verschiedenen Chromosomen durch genetische Kopplungsanalyse identifiziert worden. Als erstes Gen wurde 1993 die Superoxiddismutase(SOD1) nachgewiesen [77]. Im Jahr 2001 konnte das ALS2-Gen identifiziert werden [36]. Die verantwortlichen Gene der verbleibenden sechs Genorte sind noch unbekannt. Die endemische Form der ALS existiert in drei unterschiedlichen ethnisch und geographischen Gruppen. Diese befinden sich auf Guam, im Südwesten Neuguineas und auf der Kii-Halbinsel Japans. In diesen Populationen sind deutlich erhöhte Inzidenzen beschrieben wurden. Die Häufigkeit der Erkrankung war dort aber in den letzten Jahrzehnten stark rückläufig. Zusätzlich zu den Zeichen einer ALS entwickelt sich dort häufig ein Parkinson-Demenz-Komplex [3, 28, 29, 90].

Die Krankheit verläuft immer unaufhaltsam progredient. Die mittlere Lebenserwartung nach Krankheitsbeginn beträgt zwei bis vier Jahre [103, 68]. Der Krankheitsverlauf ist sehr variabel. 19-39% der Patienten leben länger als fünf Jahre und 8-22% der ALS-Patienten leben über zehn Jahre [68, 45, 60]. Mit geringerem Erkrankungsalter ist von einer höheren Lebenserwartung des ALS-Patienten auszugehen [24]. Negative Prädiktoren für die Lebenserwartung von ALS-Patienten sind bulbärer Beginn und niedrige Vitalkapazität [30]. Beim Bulbärtyp ist die Krankheitsdauer mit 2,2 Jahren deutlich verkürzt [14, 40].

Bei der ALS besteht keine kausale Therapie. Die Behandlung mit dem Glutamatantagonisten "Riluzol" führt zu einer Verlängerung der Überlebenszeit um wenige Monate [53, 7].

1.2 Glutamat als Neurotransmitter

Bei den meisten Neurotransmittern handelt es sich um äußerst spezifische Proteine, die für ihre Rolle als Überträgerstoff maßgeschneidert sind. Daher war es eine große Überraschung, als sich in elektrophysiologischen Studien Anfang der 60er Jah-

re herausstellte, daß ein so verbreitetes Stoffwechselprodukt wie Glutamat über ein starkes exzitatorisches Potential an einer Vielzahl von Synapsen verfügt. Es zeigte sich, daß Glutamat an vielen Funktionen des ZNS, wie motorischen, kognitiven und mnestischen, beteiligt ist. Quantitativ gesehen ist Glutamat der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter [20]. Da man bei der Untersuchung synaptischer Vesikel mit hohen Acetylcholin- und biogenen Aminkonzentrationen keine signifikante Menge an Glutamat fand, vermutete man, daß die als Neurotransmitter funktionierenden Aminosäuren direkt aus dem Zytoplasma der Nervenendigungen freigesetzt werden. Mit der Entdeckung der Ca^{2+} -abhängigen vesikulären Glutamatfreisetzung und der Kompartimentierung von Glutamat in den Nervenendigungen konnten diese Fragestellungen gelöst werden [67]. Die Freisetzung von Glutamat aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt wird durch eine hohe Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen im Zytoplasma ausgelöst, die durch Ca^{2+} -Kanäle erzeugt wird. Im Ruhezustand liegen die Glutamatkonzentrationen im synaptischen, extrazellulären Raum bei $1\ \mu\text{M}$, im präsynaptischen Zytoplasma bei $10\ \text{mM}$ und im Lumen der glutamatergen synaptischen Vesikel bei $100\ \text{mM}$. Diese Gradienten werden über Glutamatwiederaufnahme-Mechanismen aufrechterhalten. Sie sind durch drei verschiedene elektrochemische Transportsysteme charakterisiert

1.3 Glutamat als Neurotoxin

Glutamat verfügt nicht nur über ein exzitatorisches, sondern auch über ein exzitotoxisches Potential. Der Begriff Exzitotoxizität beschreibt den toxischen Effekt exzitatorischer Aminosäuren auf das dendrosomale Funktionssystem von Neuronen. So konnten in einem Mausmodell nach hochdosierter Glutamatexposition (parenterale Gabe von $0,5\text{-}4,0\ \text{mg Glutamat/g}$) neuronale Funktionsstörungen in verschiedenen Hirnregionen, besonders im Hypothalamus, nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang wurde später an einer dissoziierten kortikalen Zellkultur bestätigt. So verursacht eine extrazelluläre Glutamatkonzentration von $100\ \mu\text{M}$ nach fünfminütiger

Exposition einen selektiven Neuronenuntergang [18]. Bereits eine Erhöhung der synaptischen Glutamatkonzentration von $1\mu\text{M}$ auf $5\mu\text{M}$ führt zu einer gesteigerten Aktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren und einer nachfolgenden exzitoxischen Schädigung von Neuronen [25, 49]. Durch die exzessive postsynaptische Glutamatrezeptor-Aktivierung kommt es zur dauernden Ionenkanalöffnung. Diese prolongierte Neuronendepolarisation führt zu folgenden Mechanismen in der Zelle:

- Erhöhten Na^+ - und Wasser-Einstrom mit der Folge der osmotischen Zellschwellung, die (initial potentiell reversibel) für den frühen Zelltod verantwortlich ist.
- exzessive Aktivierung postsynaptischer Glutamat-Rezeptoren. Diese wird getriggert durch einen Kationeneinstrom (NMDA-Rezeptor: Ca^{2+} , Na^+ ; AMPA/Kainat-Rezeptor: Na^+) bzw. Modulation des Botenstoffes IP3 (G-Proteingekoppelte Glutamatrezeptoren). Es kommt über eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung zur Aktivierung verschiedener zellulärer Enzymsysteme. Folgende Enzymsysteme sind daran beteiligt: Proteinkinase C, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, NO-Synthetase, Phospholipasen, Proteasen und Endonukleasen.
- Die Ausbreitung der Exzitotoxizität erfolgt durch weitere Calciumfreisetzung aufgrund des beginnenden Zellunterganges [40].

Funktionsstörungen des hochaffinen Glutamattransports, die zu einer erhöhten toxischen extrazellulären Glutamatkonzentration und anschließendem Neuronenuntergang führen, werden als pathogenetischer Aspekt neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer [85, 52] und ALS [83, 89, 80] diskutiert.

1.4 Die verschiedenen Glutamattransportersysteme

Entsprechend ihrer Zelltopik sind plasmamembranale, mitochondriale und vesikuläre Glutamattransportersysteme zu unterscheiden. Sie weisen unterschiedliche funk-

tionelle Eigenschaften, Ionenabhängigkeiten und Substrataffinitäten auf. Gegenwärtig sind drei Glutamattransportersysteme bekannt:

1. Das Na^+ -abhängige hochaffine System
2. Das Cl^- -abhängige hochaffine System
3. Das Protonen-abhängige niedrigaffine System.

An der Plasmamembran finden sich Na^+ -und Cl^- -abhängige, hochaffine sowie niedrigaffine Glutamattransporter. Neben dem Na^+ -abhängigen hochaffinen Glutamattransport, der Gegenstand der folgenden Darstellungen sein wird, wird auch ein chloridabhängiger, plasmamembranaler hochaffiner Glutamattransport beschrieben [1, 41]. Für das Na^+ -abhängige hochaffine System kann man folgende Funktionen differenzieren:

1. Rückführung von Glutamat in präsynaptische neuronale Zellen: Gliazellen geben durch die Glutamin-Synthetase entstandenes Glutamin in den Extrazellulärraum ab oder es wird als Substrat im Zitratzyklus oxidiert. Neurone können extrazelluläres Glutamin aufnehmen, wieder zu Glutamat resynthetisieren und in Vesikeln speichern. (Der erste Schritt besteht in der Umwandlung von Glutamat in Glutamin durch die gliaspezifische Glutaminsynthetase. Glutamin kann im Gegensatz zu Glutamat leicht die gliale und neuronale Zellmembran passieren und so in das präsynaptische Neuron gelangen. Dort erfolgt unter Abspaltung von Ammoniak die Resynthese von Glutamat, vermittelt durch die mitochondriale Glutaminase.)
2. Schutz der Neurone vor Exzitotoxizität durch Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration
3. Modulation und mögliche Beteiligung an der Termination der Signaltransmission [20, 93].

In Neuronen erfolgt der Transport in die Vesikel Na^+ -unabhängig, mit einer geringen Affinität und für Glutamat-Anionen spezifisch. Er wird durch ein ATPase-abhängiges Membranpotential an der Innenseite der Vesikel, das Protonen in die Vesikel pumpt, aufrechterhalten. Die extrazelluläre Glutamatkonzentration beträgt ca. $2\text{-}5\mu\text{M}$, die zytoplasmatische ca. $100\text{-}200\mu\text{M}$, im Vesikel ca. 200mM [25, 67].

Der Cl^- abhängige Glutamattransport setzt die Anwesenheit von Cl^- -Ionen, nicht aber einen Cl^- -Gradienten voraus [25]. Das System hat eine hohe Affinität zu Glutamat, aber einen 100 bis 1000fach geringere V_{max} als der Na^+ -abhängige Glutamattransport [42]. Mechanismus und Funktion des Cl^- -abhängigen Glutamattransports sind nicht geklärt. Untersuchungen an der Zellkultur haben eine Beteiligung am Cystintransport, das als Vorläufer des Cysteins und somit des Glutathions gilt, zeigen können [61]. Als drittes plasmamembranales Glutamattransportsystem existiert ein niedrigaffines Glutamattransporterprotein, dessen funktionellen Merkmal und zelluläre Topik noch unbekannt sind. Angenommen wird eine funktionelle Beteiligung dieses Transporters bei der Glutamataufnahme in GABAerge Neurone [25].

1.5 Funktionelle Eigenschaften der Na^+ -abhängigen hochaffinen Glutamattransporter

Die Glutamatausschüttung und nachfolgende Aktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren erfolgt durch eine Ca^{2+} -abhängige Exozytose des vesikulären Glutamats in den synaptischen Spalt. Gliazellen und Neuronen verfügen über membranständige hochaffine Glutamattransporterproteine, die das freigesetzte Glutamat wieder aus dem synaptischen Spalt entfernen. Beim Transport werden zwei Na^+ und ein H^+ im Kotransport mit einem Glutamat-Anion entlang ihres über der Membran liegenden elektrochemischen Gradienten in die Zelle aufgenommen, ein K^+ aus der Zelle heraustransportiert [20]. Der elektrochemische Na^+/K^+ -

Gradient muß durch die Na/K-ATPase aufrechterhalten werden, da sonst der Transport sistiert oder sich dessen Richtung umkehrt [67]. Über diesen Mechanismus wird die Aktivierung der Glutamatrezeptoren beendet und die synaptische, d.h. extrazelluläre, Glutamatkonzentration unter das neurotoxische Niveau gebracht. Die Regulation der synaptischen Glutamatkonzentration wird ausschließlich durch diese Glutamatwiederaufnahme in Glia oder das präsynaptische Neuron gewährleistet. Im synaptischen Spalt existiert kein Enzymmuster zur Glutamatmetabolisierung. Das Glutamat in der Gliazelle wird dem präsynaptischen Neuron über den Glutamat/Glutamin-Kreislauf wieder verfügbar gemacht (siehe 1.4).

1.6 Genfamilie und Expressionsmuster der hochaffinen, natriumabhängigen Glutamattransporter

Bis heute konnten fünf plasmamembranale hochaffine natriumabhängige Glutamattransporter, EAAT1 - EAAT5, molekular charakterisiert werden. Die fünf Transporter unterscheiden sich in ihrer Topik, der Anzahl der transmembranalen Domänen, dem Expressionsmuster histologisch, zellulär und subzellulär [31] und in ihren pharmakologischen Eigenschaften [5], siehe Tabelle 1.

Das EAAT2-Protein ist durch eine hauptsächlich homologe Expression im ZNS gekennzeichnet. EAAT1, EAAT3 und EAAT4 sind durch ein differenzielles Verteilungsmuster im ZNS gekennzeichnet: EAAT1(Cerebellum » Hippocampus > Kortex > Striatum), EAAT3 (Hippocampus > Kortex = Striatum > Cerebellum) [81], EAAT4 (Cerebellum) [26]. EAAT5 ist bevorzugt in der Retina exprimiert [4]. Gegenwärtig lassen sich EAAT3 und EAAT4 als neuronenspezifisch [66] und EAAT2 als astroglial bezeichnen [54]. EAAT1 wird durch Astroglia sowie durch bestimmte Neuronenpopulationen exprimiert [81].

Tabelle 1: Übersicht über die bisher publizierten fünf verschiedenen Na⁺-abhängigen hochaffinen Glutamattransportertypen mit Angabe der Namen, Organismen, Genbankloki sowie der Autoren und der Literaturangabe.

Abkürzung "genom.": genomische DNA, alle anderen Transporter sind aus komplementärer DNA isoliert.

| Name | Mensch | Tiere | Gen Bank | Autor/Erstbeschreiber | Lit. |
|-------|----------------|----------------------|----------|---------------------------|-------|
| EAAT1 | | GLAST (Ratte) | X 63744 | Storck 1992 | [94] |
| | HBGT | | L 19158 | Shashidaran 1993 | [75] |
| | EAAT1 | | U 03504 | Arriza 1994 | [24] |
| | HGLUT1 | | D 26443 | Kawakami 1994 | [52] |
| | Glast1(genom.) | | Z31703- | Stoffel 1996 | [92] |
| | | MGlut1 cDNA (Maus) | — | Tanaka 1993 | [44] |
| | | mGlut1 (genom. Maus) | D 63816 | Hagiwara 1996 | [20] |
| EAAT2 | | GLT1 (Ratte) | X 67857 | Pines 1992 | [96] |
| | HBGT2 | | U 01824 | Shashidaran 1994 | [59] |
| | EAAT2 | | U 03505 | Arriza 1994 | [24] |
| | GLTR | | Z 32517 | Manfras 1994 | [5] |
| EAAT3 | | EAAC1(Frosch) | L 12411 | Kanai, Hedinger 1992 | [25] |
| | HBGT3 | | U 08989 | Shashidaran 1994 | [6] |
| | EAAT3 | | U 03506 | Arriza 1994 | [24] |
| | HEAAC1 | | U 06469 | Kanai 1994 | [49] |
| | | mEAAC1 (Maus) | D 43797 | Mukainaka, Tanaka 1995 | [70] |
| EAAT4 | EAAT4 | | U 18244 | Fairman 1995 | [102] |
| | | mEAAT4 (Maus) | D 83262 | Maeno- Hikichi 1997 | [31] |
| EAAT5 | EAAT5 | | U 76362 | Arriza 1997 | [14] |

1.7 Molekulare Charakterisierung des Glutamattransporters EAAT2

Die cDNA des EAAT2 kodiert über einen Bereich von 1719 bp für wahrscheinlich 573 Aminosäuren [86], die relative molekulare Masse beträgt 64 kDa [69]. Bisher wurden drei homologe humane cDNA des EAAT2 kloniert: HBGT II [86], EAAT2 [5] und GLTR [50].

Das menschliche EAAT2 Gen liegt auf Chromosom 11p13-p12 [47] bzw. 11p11.2-p13 [100]. Der Genlocus des EAAT2 besteht aus 50kb. Sie enthält 10 Exons mit einer Länge zwischen 127 bis 251 bp und durchschnittlicher Länge von 177 bp. Die Länge der Introns variiert zwischen 2,2 kb und 15 kb mit einer durchschnittlichen Basenlänge von 5,5 kb [55]. EAAT2 wird ubiquitär im ZNS exprimiert, überwiegend in perisynaptischen Gliazellen [5, 20, 81]. Lokalisationen mit hoher Expression sind der Kortex, Nucleus caudatus, Nucleus basalis Meynert, Hippocampus und das spinale Vorderhorn [58]. Es zeigte sich, daß der astrogläre Transporter EAAT2 für über 90% der Glutamat-Wiederaufnahme verantwortlich ist, wobei der Verlust von EAAT2 einen starken Anstieg der synaptischen Glutamatkonzentration zur Folge hat [101].

Bislang ist keine krankheitsspezifische Variabilität in der kodierenden DNA des EAAT2-Transporters bekannt.

1.8 Die mRNA des menschlichen Glutamattransporters EAAT2

Tabelle 2: Boten-RNA des menschlichen Glutamattransporters EAAT2

| | | | | | | |
|------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1 | gatagtgctg | aagaggaggg | gcgttcccag | accatggcat | ctacggaagg | tgccaacaat |
| 61 | atgcccaagc | aggtcgaagt | gccaatgcc | gacagtcac | ttggctcaga | ggaaccaagg |
| 121 | cacgggcacc | tgggcctgag | cctgtgtgac | aagctgggga | agaatctgct | gctcacctg |
| 181 | acggtgtttg | gtgtcatcct | gggagcagt | tgtggagggc | ttcttcgctt | ggcatctccc |
| 241 | atccaccctg | atgtggttat | gttaatagcc | ttcccagggg | atatactcat | gaggatgcta |
| 301 | aaaatgctca | ttctccctct | aatcatctcc | agcttaatca | cagggttgct | aggcctggat |
| 361 | gctaaggcta | gtggccgctt | gggcacgaga | gccatggtgt | attacatgct | cacgaccatc |
| 421 | attgctgcag | tactgggggt | cattctggct | ttggctatcc | atccaggcaa | tccaagctc |
| 481 | aagaagcagc | tggggcctgg | gaagaagaat | gatgaagtgt | ccagcctgga | tgcttctctg |
| 541 | gaccttattc | gaaatctctt | ccctgaaaac | cttgtccaag | cctgctttca | acagattcaa |
| 601 | acagtgacga | agaaagtctt | ggttgcacca | ccgccagacg | aggaggccaa | cgcaaccagc |
| 661 | gctgaagtct | ctctgttgaa | cgagactgtg | actgaggtgc | cggaggagac | taagatgggt |
| 721 | atcaagaagg | gcctggagtt | caaggatggg | atgaacgtct | taggtctgat | agggtttttc |
| 781 | attgcttttg | gcatcgctat | ggggaagatg | ggagatcagg | ccaagctgat | ggtggatttc |
| 841 | ttcaacattt | tgaatgagat | tgtaatgaag | ttagtgatca | tgatcatgtg | gtactctccc |
| 901 | ctgggtatcg | cctgcctgat | ctgtggaag | atcattgcaa | tcaaggactt | agaagtgggt |
| 961 | gctaggcaac | tggggatgta | catggtaaca | gtgatcatag | gcctcatcat | ccacgggggc |
| 1021 | atctttctcc | ccttgattta | ctttgtagtg | accaggaaaa | acccttctc | cctttttgct |
| 1081 | ggcattttcc | aagcttggat | cactgcctcg | ggcaccgctt | ccagtgtctgg | aactttgcct |
| 1141 | gtcacctttc | gttgcctgga | agaaaatctg | gggattgata | agcgtgtgac | tagattcgct |
| 1201 | cttctctgtg | gagcaaccat | taacatggat | ggtacagccc | tttatgaagc | ggtggccgcc |
| 1261 | atctttatag | cccaaataaa | tgggtgtgtc | ctggatggag | gacagattgt | gactgtaagc |
| 1321 | ctcacagcca | ccctggcaag | cgtcggcgcg | gccagtatcc | ccagtgccgg | gctggtcacc |
| 1381 | atgctcctca | ttctgacagc | cgtgggcctg | ccaacagagg | acatcagctt | gctggtggct |
| 1441 | gtggactggc | tgctggacag | gatgagaact | tcagtcaatg | ttgtgggtga | ctcttttggg |
| 1501 | gctgggatag | tctatcacct | ctccaagtct | gagctggata | ccattgactc | ccagcatcga |
| 1561 | gtgcatgaag | atattgaaat | gaccaagact | caatccattt | atgatgacat | gaagaaccac |
| 1621 | agggaaagca | actctaatac | atgtgtctat | gctgcacaca | actctgtcat | agtagatgaa |
| 1681 | tgcaaggtaa | ctctggcagc | caatggaaag | tcagccgact | gcagtgttga | ggaagaacct |
| 1741 | tggaaacgtg | agaaataagg | atatgagtct | cagcaaattc | ttgaataaac | tccccagcgt |

1.9 Untersuchung der glutamatergen Neurotransmission

1.9.1 ALS und glutamaterge Dysfunktion

Ausgangspunkt für die Untersuchung der glutamatergen Neurotransmission bei ALS waren initiale Berichte einer Glutamatkompartimentierungsstörung im ZNS [70, 82]. Die ersten Bericht eines systemischen Defekts im Metabolismus dieser exzitatorischen Aminosäure konnten im weiteren Verlauf nicht bestätigt werden. Aufgrund der erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentrationen im Zusammenhang mit ALS wurden in nachfolgenden Arbeiten die Na^+ -abhängigen Glutamattransport-systeme in Astrozyten und Neuronen untersucht. Die folgenden Befunde unterstützten das Modell einer glutamatergen Dysfunktion, die aufgrund eines reduzierten Glutamattransports und einer damit verbundenen erhöhten Glutamatkonzentration zu einem Untergang der Nervenzellen führt. Bei Messungen des hochaffinen Na^+ -abhängigen Glutamattransports in einer Synaptosomen-Präparation stellte man fest, daß bei ALS-Patienten die Glutamataufnahme um 66% im zervikalen Rückenmark und um 47% im motorischen Kortex erniedrigt ist. Synaptosomen sind artifizielle Vesikel, die nach Homogenisierung des neuronalen Gewebes, Isolierung synaptischer Zellfragmente und Selbstentfaltung dieser Membranfragmente zu Vesikeln in einem definierten Medium entstehen. Die Untersuchung der Glutamataufnahme in Synaptosomen gilt als klassische in vitro-Methode zur Analyse der Glutamat-Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt in das präsynaptische Neuron oder in die umgebende Glia.

Kinetische Untersuchungen des Hirn- und Rückenmarkgewebes von ALS-Patienten ergaben eine Verminderung der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} des Glutamattransports bei unveränderter Substrataffinität K_m . Die Messung der maximalen Transportgeschwindigkeit ist ein Indikator für die relative Dichte der Transportproteine [80].

Bei weiteren Untersuchungen stellte man fest, daß es in Folge einer selektiven Hemmung des Glutamattransports in einer organotypischen Rückenmarkskultur zu einem kontinuierlichen Anstieg der Glutamatkonzentration im Kulturmedium und einer langsamen Degeneration der Motoneuronen kommt [79]. Die Entdeckung, daß die Glutamatentfernung aus dem synaptischen Spalt von verschiedenen hochaffinen Glutamattransportersubtypen realisiert wird, führte zu Untersuchungen, ob ein Zusammenhang zwischen ALS und dem Verlust eines spezifischen Glutamattransportersubtyps besteht. Mit Western-Blot und immunhistochemischen Methoden wurde der selektive und ALS-spezifische Verlust des astroglären Transporters EAAT2 beschrieben [83].

In weiteren Arbeiten zeigte sich, daß eine spezifische Expressionshemmung der einzelnen Glutamattransportersubtypen durch Antisense-Oligonukleotide *in vitro* und *in vivo*, eine selektive und spezifische Hemmung der Proteinexpression und des Glutamattransports verursacht. Der Verlust des gliären Glutamattransporters EAAT2 führt zu einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration, in deren weiteren Verlauf neurodegenerative Merkmale aufgrund exzitotoxischer Schädigung und fortschreitende Paralysen auftreten [78].

1.9.2 Expressionsregulation von Genen und deren Mechanismen

Die Expression eines Gens wird überwiegend über die Transkription gesteuert [96]. Zunehmend wird aber auch die Bedeutung der posttranskriptionellen Modifikationen der prä-mRNA an der Expressionsregulation erkannt. Verschiedenen Mechanismen wie 5'-Capping und 3'-Polyadenylierung sowie Spleißen und auch alternatives Spleißen determinieren die Struktur der reifen mRNA. Initiationsfaktoren, regulatorische Proteine und Response-Elemente beeinflussen die Translationsrate und die mRNA-Stabilität [21, 37, 72].

1.10 Grundlagen des Spleißens

1.10.1 Spleißen der prä-mRNA

Posttranskriptional wird die prä-mRNA zur reifen mRNA prozessiert. Dazu gehört die Übertragung einer Cap-Struktur (m⁷gppp-Gruppe) auf das 5'-Ende und die Polyadenylierung des 3'-Endes [87] sowie das Herausspleißen von nichtkodierenden Intronsequenzen und das Zusammensetzen der kodierenden Exonsequenzen. Die Grundlage des Spleißens bilden zwei Transesterreaktionen. Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-Hydroxygruppe eines Adenosins, das nahe dem 3'-Ende des Introns in der Verzweigungssequenz (branch point sequence) lokalisiert ist, auf die 3'-5'-Phosphodiesterbindung des Guanosins am 5'-Ende des Introns. Dabei wird das 5'-terminale Nukleotid des Introns über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung kovalent mit dem Verzweigungsnukleotid verknüpft. Als Zwischenprodukte entstehen eine Lariatstruktur aus Intron und 3'-Exon sowie das freie 5'-Exon. Die freie 3'-Hydroxygruppe des 5'-Exons reagiert im zweiten Schritt nukleophil mit der 3'-5'-Phosphodiesterbindung des 3'-Exons. Dabei werden die beiden Exons zum fertigen Spleißprodukt verbunden und das verzweigte Intron freigesetzt [13, 43]. Durch alternative Spleißereignisse können von einer prä-mRNA durch die Kombination verschiedener Spleißstellen unterschiedliche mRNAs prozessiert werden. Die Anforderungen, die beim Spleißen einer prä-mRNA erfüllt sein müssen, umfassen daher, neben der Katalyse der Transesterreaktion, die räumliche Organisation der prä-mRNA, die nukleotidgenaue Definition und Erkennung von Intron- und Exonsequenzen sowie die Regulation der jeweils korrekten Spleißstellenauswahl bei alternativen Spleißereignissen. Dies wird durch eine Anzahl von Wechselwirkungen zwischen Sequenzelementen der prä-mRNA und Komponenten des Spleißosom ermöglicht.

1.10.2 Exon-Intron-Grenzen

Auf der Ebene der prä-mRNA sind die Exon-Intron-Grenzen durch drei charakteristische Sequenzabschnitte gekennzeichnet: die 5'-Spleißstelle oder Spleißdonor (SD), die 3'-Spleißstelle oder Spleißakzeptor (SA) mit dem Vorgelagerten, meist 10-20 Nukleotide langen Polypyrimidintrakt, sowie die ungefähr 15-40 Nukleotide 5'-wärts des Spleißakzeptors gelegene Verzweigungsstelle (BPS, branch point sequence). Die Sequenzen der 5'-Spleißstellen humaner Gene sind sehr heterogen. In der Konsensussequenz AG/GTRAGT (R=A oder G) ist neben den Nukleotiden GT, über die sich diese so genannten kanonischen Spleißstellen definieren, nur das Purin in Position +3 nahezu 100% konserviert. Die Verzweigungssequenz ist durch eine degenerierte Konsensussequenz YNYURAY (Y=Pyrimidin (Thymin, Cytosin), R=Purin (Adenin, Guanin), N= beliebig) beschrieben. Die 3'-Spleißstelle eines Introns ist durch die Sequenz YAG und eine Präferenz der vorangehenden Nukleotide für Pyrimidine gekennzeichnet [13]. Neben diesen kanonischen Introns, die aufgrund der intronbegrenzenden Nukleotide auch als GT-AG-Introns bezeichnet werden, wurden in seltenen Fällen auch andere Sequenzen gefunden. Im Falle des EAAT2 sind alle Intron-Exongrenzen über GT-AG definiert.

1.10.3 Die Bildung des Spleißosoms

Die nukleotidgenaue Erkennung der Exon/Intron-Grenzen wird durch eine Anzahl von Wechselwirkungen zwischen den konservierten Bereichen der Spleißstellen und Komponenten des Spleißosoms ermöglicht. Das Spleißosom, ein in seiner Komplexität dem Ribosom vergleichbarer Ribonukleoprotein-Komplex [10], setzt sich aus mehr als 50 Proteinen und 5 nukleären Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNPs) zusammen [13, 43, 105]. Diese snRNPs bestehen aus spezifischen Proteinkomponenten und kurzen, uracilreichen RNAs (U snRNA). Bei der Assemblierung des Spleißosoms auf der prä-mRNA binden die U snRNAs, unterstützt von Proteinkomponenten, an komplementäre Sequenzen der 5'- und 3'-Spleißstellen, so wie der

Verzweigungssequenz [13]. Die Assemblierung des Spleißosoms beginnt mit der Bildung des E-Komplexes [57]. Zuerst erfolgt die Assoziation des U1 snRNPs an den Spleißdonor. Zur Erkennung der 3'-Spleißstelle bindet zunächst der Spleißfaktor SF1/mBBP (Splice factor 1/ mammalian branch point binding protein) an die Verzweigungssequenz und das Heterodimer U2AF65/35 an die Polypyrimidinsequenz und an das AG-Dinukleotid der 3'-Spleißstelle [75]. Die Rekrutierung von U2AF bereitet die Bindung des U2 snRNPs, das bereits mit dem E-Komplex assoziiert vorliegt, an die Verzweigungssequenz vor. Schon in diesem Stadium scheint sich eine Verbindung zwischen der 5'- und 3'-Spleißstelle auszubilden. Die Umwandlung des Spleißosoms zum A-Komplex ist durch die Verdrängung des SF1/mBBP durch die U2 gekennzeichnet, die an die BPS bindet [6, 59]. Die Bindung der U2 snRNA wird durch verschiedenste Spleißfaktoren unterstützt. Der B-Komplex wird durch den Eintritt des U4/U6.U5 tri-snRNPs gebildet. Er enthält alle für das Spleißen nötigen Komponenten, liegt jedoch zunächst in einer inaktiven Form vor. Die Aktivierung des Spleißosoms erfolgt durch Umlagerungen der RNA/RNA-Bindungen. Die RNA-Duplexstruktur zwischen U4 und der U6 snRNA wird zugunsten einer Bindung der U6 snRNA an die 5'-Spleißstelle aufgelöst. Die dabei verdrängte U1 snRNA und die U4 snRNA verlassen das Spleißosom. Jetzt ist der spleißaktive C-Komplex entstanden. Es finden dort zwei Transester-Reaktionen statt, die die Exons miteinander verbinden. Das Intronariat wird degradiert und die freigewordene U snRNPs stehen für den nächsten Spleißzyklus zur Verfügung [62, 94].

1.10.4 Alternatives Spleißen

Das alternative Spleißen eukaryotischer Gene ermöglicht die Expression strukturell ähnlicher Proteine, die sich in einigen Domänen unterscheiden und dementsprechend eine andere Funktion ausüben können. Im humanen Genom exprimieren mehr als die Hälfte der Gene mindestens zwei durch alternatives Spleißen entstandene Proteinisoformen. Dadurch lässt sich das kodierende Potential eines Organismus vervielfachen. Weiterhin kann durch alternatives Spleißen die Stabilität

oder die Lokalisation einer RNA variieren oder zusätzliche Regulationsebenen für gewebe- oder entwicklungspezifische Transkripte geschaffen werden. Neben dem konstitutiven Spleißen kommt dem alternativen Spleißen der prä-mRNA eine zunehmende Bedeutung zu [39, 91]. Beim alternativen Spleißen werden andere als die üblichen Spleißstellen verwendet. Durch Veränderungen der stark konservierten konstitutiven Spleißstellen können die snRNA-Untereinheiten U1, U2 und U5 intensiver an kryptische Spleißstellen binden [39]. Die verschiedenen Formen alternativen Spleißens und die Veränderungen der Spleißstellen wurden insbesondere im Gehirn systematisch untersucht [95]. Die durch alternatives Spleißen entstandene heterogene reife mRNA kann qualitativ und quantitativ andere Funktionen aufweisen. Das Translationsprodukt kann auch an einer anderen Lokalisation verwendet werden [91].

1.10.5 Spleißregulierende Sequenzen

Neben den bisher beschriebenen Sequenzen der SA und SD und der BPS können cis-wirkende Elemente in Introns und Exons die Spleißeffizienz und die Auswahl von Spleißstellen in alternativen Spleißereignissen beeinflussen. Man kann sie in spleißfördernde und spleißhemmende Elemente unterteilen. An diese regulatorischen Sequenzen binden Mitglieder der hnRNP- oder SR- Proteinfamilie [92]. Die hnRNPs zeigen dabei meist eine inhibierende Wirkung während die SR-Proteine oft eine spleißfördernde Wirkung ausüben [34, 99].

Die hnRNP-Proteine

Die hnRNPs gehören zu den häufigsten Proteinen im Zellkern. Sie verpacken kotranskriptional die entstehenden Transkripte [23]. Neben dieser strukturgebenden Funktion sind sie an der Regulation der Transkription, des alternativen Spleißens, der Polyadenylierung, des mRNA-Exports und der Translation beteiligt [44]. Bisher konnte zu verschiedenen hnRNPs eine Funktion bei alternativen Spleißprozessen zugeord-

net werden [8].

Die SR-Proteine

Es sind bislang elf verschiedene SR-Proteine identifiziert worden [34], deren Funktion in unterschiedlichster Art und Weise mit dem Spleißen assoziiert sind. SR-Proteine binden bereits kotranskriptional an die prä-mRNA und sind praktisch an allen Schritten der Spleißosomassemblierung beteiligt. SR-Proteine sind nicht nur essentielle Faktoren in konstitutiven Spleißprozessen, sondern können auch eine Funktion als Spleißregulatoren in alternativen Spleißereignissen ausüben [34, 99]. Neben den Funktionen in der Spleißosomassemblierung und in der Regulation alternativer Spleißprozesse sind SR-Proteine wahrscheinlich an der Definition der Exon- und Intronsequenzen beteiligt [74].

1.10.6 Spleißformen

Intronretention

Bei dieser einfachsten Form des alternativen Spleißens kann ein Intron in der reifen RNA verbleiben, es wird also nicht herausgespleißt. Falls dabei der offene Leserahmen erhalten bleibt kommt es zum Einfügen von Peptidsegmenten in das ursprüngliche Protein. Bleibt der offene Leserahmen nicht erhalten, kann es zum Abbruch der Genprodukte aufgrund der Leserasterverschiebung kommen, oder zu funktionslosen Produkten führen.

Alternative 5'-Donorstellen und 3'-Acceptorstellen

Hierbei verbleibt ein Teil eines Introns, entweder das 5'-oder das 3'-Ende, in der reifen RNA. Es wird also nur ein Teilstück eines Introns herausgespleißt. Die Folgen dieser alternativ gespleißten mRNA sind schon bei 1.10.6. beschrieben

Innere sich gegenseitig ausschließende Exons

Innere Exons schließen sich hier gegenseitig aus. Es wird immer nur jeweils ein Exon des Exonpaares herausgespleißt und das andere verbleibt in der mRNA. Es verbleiben niemals beide Exons in der reifen RNA und werden niemals beide Exons zusammen herausgespleißt. Es entstehen dabei Proteine mit einer konstanten Aminosäuresequenz am Beginn und am Ende des Proteins. Die Sequenz im Bereich der Mitte des Proteins ist variabel.

Exonskipping / Exondeletion

Manche Exons können unabhängig von anderen Exons wie Introns herausgespleißt werden oder sie verbleiben in der reifen RNA. Gewöhnlicherweise bleibt der Leserahmen erhalten, unabhängig davon, ob das Exon herausgespleißt wird oder nicht. Bei manchen Genen kommt es durch die Aufnahme des Exons zu Leserasterverschiebungen oder zu vorzeitigem Strangabbruch.

1.10.7 Alternatives Spleißen bei EAAT2

Bislang wurden beim EAAT2 Transporter fünf unterschiedlich gespleißte mRNA-Transkripte entdeckt. Zwei der Transkripte wurden in einer amerikanischen Arbeitsgruppe kloniert und als "Exon-9-skipping-RNA" und als "Intron-7-retention-RNA" bezeichnet [48]. Aufgrund der Untersuchung von regulatorischen Gensequenzen und posttranskriptioneller Regulation des EAAT2-Gens wurden 4 neuartige EAAT2-Isoformen kloniert. Sie wurden als EAAT2/ C1-4 bezeichnet. Zusätzlich wurde die Komplexität der 5'-regulatorischen EAAT2-Sequenz nachgewiesen durch die Klonierung von weiteren acht EAAT2-Isoformen, die auf alternativem Spleißen bisher nicht bekannter untranslatierter Exons beruht [56]. Die vier neuartigen mRNA-Transkripte sind bereits abschließend charakterisiert worden. EAAT2/C1 und EAAT2/C3 entstehen durch Deletion der proteinkodierenden Exons 8 bzw. 6. EAAT2/C2 und

EAAT2/C4 gehen auf die Nutzung interner Spleißstellen zurück. Bei sämtlichen Spleißprodukten bleibt der offene Leserahmen erhalten. Die Spleißvarianten führen zu einer Deletion definierter Nukleotid- und Aminosäuresequenzen. Aufgrund zweier unterschiedlichen Nomenklaturen (siehe Tabelle 1) für die genomische Struktur des EAAT2-Gens wurde erst später erkannt, dass die amerikanische "Exon-9-skipping-RNA" der EAAT2/ C1-RNA entsprach.

1.10.8 Spleißen von EAAT2

Tabelle 3: Exon-Intron-Grenzen von EAAT2

| Exon | Position in der cDNA | 5' Spleißdonor | Intron (kb) | 3' Spleißakzeptor |
|------|----------------------|--|-------------|---|
| utr | 72-168 | AAGGACAG gtgggtgaatcccattgcaatc | 5.0 | aatctctgccttcactctgttccag TGCCAACAA |
| 1 | 169-308 | GGTGTTTG gtaggtacctgtactacccccac | 2.5 | aaatcatattgtttccccttcttag GTGTCACCT |
| 2 | 309-461 | AATCACAG gtaagactacctcactagtgct | 2.2 | atcctctgcatttctttcaatccag GGTTGTCAG |
| 3 | 462-712 | TTCAACAG gtaacccaaagttcaaatgtgct | 6.0 | ctgcctttttccctcactctgactag ATTCAAACA |
| 4 | 713-881 | CGTCTTAG gtaggccagctgggtggccggg | 4.0 | tatgtaatgtgattcacccaacag GTCTGATAG |
| 5 | 882-1008 | ATCATGTG gtaagtggcctgttcttacttcta | 5.0 | atgctgtttttccctttgtgtttttag GTA CTCTCC |
| 6 | 1009-1242 | GCTTCCAG gtagagaacaaaagaaatca | 5.5 | gccttcttcttcttcttcttcttag TGCTGGAAC |
| 7 | 1243-1437 | ACTGTAAG gtgagaagggtggggtaaac | 5.5 | gacctgaacttctctgttctcatag CCTCACAGC |
| 8 | 1438-1572 | TGGCTGCT gtaagtgtctgtggatggggttct | >15 | tgaaccttttctgttcttcttcttag GGACAGGAT |
| 9 | 1573-1804 | AATGCAAG gtacatttcccattcatggatc | 5.0 | ctggatgttgatgattattattttag GTA ACTCTG |
| 10 | 1805-1933 | | | |

EAAT2

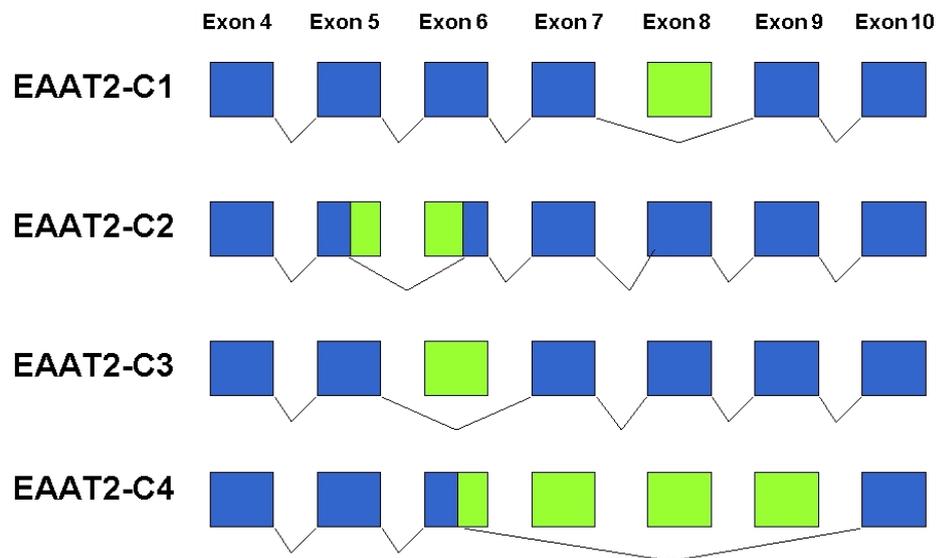


Abbildung 1: Spleißen von EAAT2, C1 - C4

EAAT2/C1

("EXON 9-SKIPPING RNA")

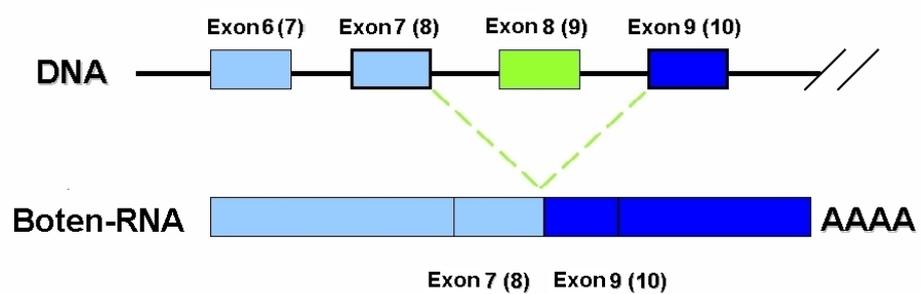


Abbildung 2: Spleißen von EAAT2/C1

EAAT2/C2

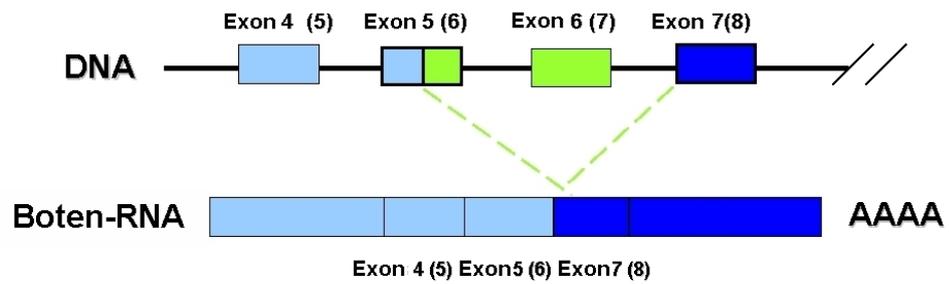


Abbildung 3: Spleißen von EAAT2/C2

EAAT2/C3

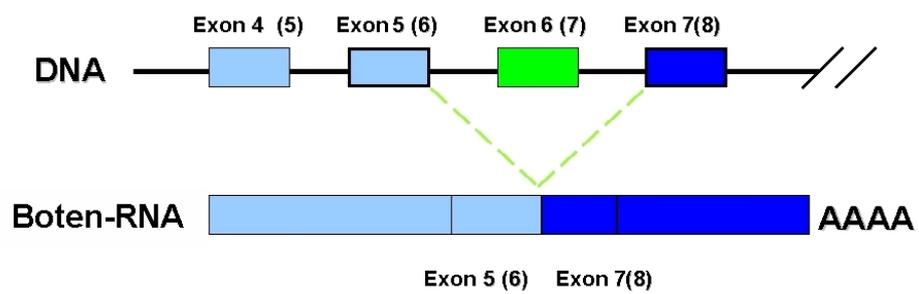


Abbildung 4: Spleißen von EAAT2/C3

EAAT2/C4

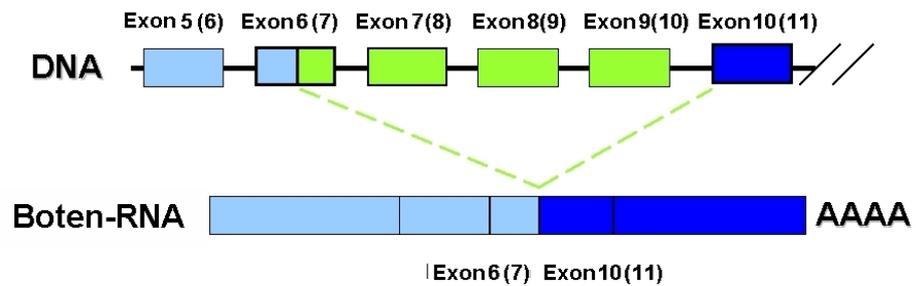


Abbildung 5: Spleißen von EAAT2/C4

EAAT2/Int ("INTRON 7-RETENTION RNA")

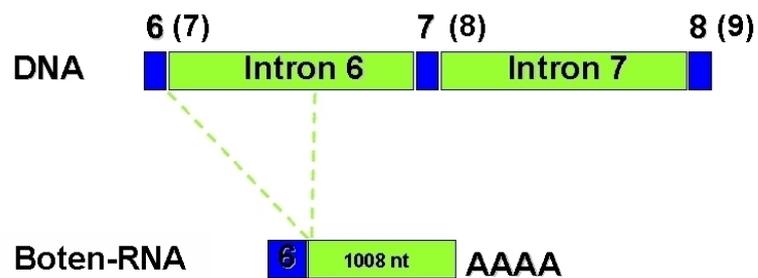


Abbildung 6: Spleißen von EAAT2/Int

Nachfolgende Tabelle 4 gibt einen Überblick über die mRNA-Transkripte

Tabelle 4: *Gesamtübersicht der untersuchten EAAT2-Transkripte*

| Transkripte | |
|-------------|---|
| EAAT2/C1 | Vollständige Deletion des Exons CDS 8 |
| EAAT2/C2 | Teilweise Deletion des Exons CDS 5 und vollständige Deletion des Exons CDS 6 |
| EAAT2/C3 | Vollständige Deletion des Exons CDS 6 |
| EAAT2/C4 | Teilweise Deletion des Exons CDS 6 und vollständige Deletion der Exons CDS 7, 8 und 9 |
| EAAT2/Int | Einbezug des Intron 6 mit nachfolgendem Strangabbruch |

1.11 Zielstellung

EAAT2 spielt bei der Wiederaufnahme des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat aus dem synaptischen Spalt im gesamten ZNS eine entscheidende Rolle. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß bei unterschiedlichen akut und chronisch neurologischen Erkrankungen EAAT2 vermindert exprimiert wird. Mit den biochemischen Befunden des defizitären Glutamatttransporters bei Patienten mit amyotropher Lateralsklerose [80], entstand die Frage nach dem möglichen molekulargenetischen Korrelat der Aufnahme-Minderung. Die EAAT2-Genregulation unter normalen und pathogenetischen Bedingungen ist bisher allerdings nur unvollständig aufgeklärt. Weitere Erkenntnisse über regulatorischen Mechanismen des EAAT2 rücken in den Mittelpunkt des Interesses. Bei einem ALS-Patienten mit einem sehr niedrigen EAAT2-Proteingehalt wurden zusätzliche EAAT2-Transkripte gefunden, diese Transkripte sollen in 60% der Fälle in Verbindung mit ALS stehen. In unserer Arbeitsgruppe wurden aus gesundem Gehirn 4 neue EAAT2-Transkripte geklont.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war das Mutationsscreening der codierenden Sequenzen des Glutamatttransporters GLT-1 bei immunhistochemisch vorselektionierten Patienten. Ein weiteres Ziel war es, die fünf neuen Spleißformen im Hinblick auf Vorkommen, Häufigkeit und Spezifität zu charakterisieren:

- Sind einzelne Spleißformen häufiger bei ALS-Patienten zu finden als bei Gesunden?
- Sind bei ALS-Patienten vermehrt alle fünf Spleißformen vorhanden?
- Gibt es Spleißformen die nahezu nur bei ALS-Patienten oder nur bei Gesunden vorkommen?
- Gibt es irgendwelche spezifischen Muster im Auftreten der Spleißformen?

Diese Untersuchungen behandeln wesentliche Aspekte aus einer Vielzahl der potentiellen Ursachen der biochemischen Transportminderung. Das Mutationsscreening gibt Aufschluß über mögliche Sequenzänderungen im kodierenden Bereich des Glutamattransportergens. Vor dem Hintergrund eines sporadischen Auftretens der ALS gilt das Vorliegen einer multigenen Krankheitsentstehung als wahrscheinlich. So ist der Nachweis von möglichen Mutationen oder Polymorphismen von Interesse. Die EAAT2/C1-Isoform hat für die Untersuchung der ALS-Pathogenese eine besondere Bedeutung. So wurde in einer amerikanischen Arbeitsgruppe diese Isoform, unabhängig von der vorliegenden Arbeit, bei ALS-Patienten vermehrt vorgefunden und als ALS-spezifisches Spleißprodukt bezeichnet [48]. Durch quantitative RT-PCR wurde gezeigt, daß in ALS-Proben mit einem geringen EAAT2 Proteingehalt die Mehrzahl der EAAT2-mRNA in Form von alternativen Splicingprodukten vorhanden war. Untersuchungen offenbarten dort, daß die alternative EAAT2-mRNA gewöhnlich in sALS-Patienten vorhanden ist. 65% aller postmortem Proben enthielten diese Isoform. Die relative Menge dieser abnormen EAAT2-mRNA korrelierte mit dem Grad des EAAT2 Proteinverlustes in ALS-Gewebe. Unabhängige Studien des Liquors von lebenden Patienten bestätigten dort den Zusammenhang mit ALS. In vitro Analysen ließen darauf schließen, daß die von der alternativen mRNA translatierten Proteine einem rapiden Zerfall und in vitro einen dominanten negativen Effekt auf Wildtyp-EAAT2, in Form von Proteinverlust und Aktivitätsminderung produzierten. Von der Arbeitsgruppe wird eine Nutzung der Isoform als biologischer Marker der ALS vorgeschlagen. Die Entdeckung eines biologischen Markers wäre für

die Früherkennung der ALS von großer Bedeutung. Bislang kann die Erkrankung nur durch rein klinisch vorhandenen Merkmale diagnostiziert werden (El Escorial criteria). Die Erkrankung ist jedoch im Frühstadium nicht leicht zu diagnostizieren. Durch einen biologischen Marker wäre es möglich, die Erkrankten schon im Frühstadium zu behandeln und somit eventuell eine Lebensverlängerung herbeiführen. Mögliche andere Ursachen des biochemischen Transportdefizits wie Modulationen der Transkriptionsregulation, Translationsregulation und Proteinreifung bleiben in dieser Studie unberücksichtigt. Voraussetzung dieser Studien war die Kenntnis der DNA-Sequenz des EAAT2-Transporters. In der Arbeitsgruppe von Dr. T. Meyer war zuvor die EAAT2-DNA-Sequenz bestimmt worden [55]. Der gliäre EAAT2-Transporter ist aus folgenden Gründen von besonderer Bedeutung:

1. Es besteht eine selektive verminderte EAAT2 Expression im Motorcortex bei ALS-Patienten [83].
2. Die Expressionshemmung des Transporters EAAT2 durch Antisense Oligonucleotide verursacht im Mausmodell eine neurologische Symptomatik, die typische Merkmale einer Motoneuronschädigung aufweist [78].

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollproben

Die vorgelegte Arbeit wurde mit Gewebeproben von 17 Patienten mit sporadischer amyotropher Lateralsklerose (sALS) und 11 Kontroll-Patienten durchgeführt. Die aus dem Gewebe isolierte DNA und RNA wurde von Dr. Pamela Shaw, University of Newcastle upon Tyne, UK, zur Verfügung gestellt.

Die ALS-Patienten erfüllten alle die El Escorial Kriterien für definitive oder wahrscheinliche ALS [11]. Die Todesursachen der Kontrollgruppe waren koronare Herzkrankheit (7), Lungenemphysem (1), chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung (1), Bronchopneumonie (1) und Corpuscarcinom des Uterus (1). Der Altersdurchschnitt bei den ALS-Patienten lag bei 70.0 (± 18.0) Jahren, in der Kontrollgruppe lag er bei 67.3 (± 21.3) Jahren.

2.2 Chemikalien

| | |
|---|-------------------|
| Acrylamid (Rotiphorese Gela) | Roth |
| Agarose NA | Pharmacia Biotech |
| Albumin bovine fraction V pH | Serva |
| Ammoniumpersulfat | Pharmacia Biotech |
| Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Roth |
| Bisacrylamid (Rotiphorese GelB) | Roth |
| Borsäure | J.T.Baker |
| Bromphenol blau | Pharmacia Biotech |

| | |
|--|-------------------|
| EDTA | Sigma |
| Eisessig | Roth |
| Ethanol absolut z.A. | Merck |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Formaldehydlösung extra pure | Merck |
| Formamid (CH ₃ NO) | Sigma |
| Glycerol | Sigma |
| Isopropanol 99,7% | Roth |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Sigma |
| Mercaptoethanol | Sigma |
| Mineralöl | Sigma |
| Natronlauge 1N | J.T.Baker |
| Natriumhydroxidpellets | J.T.Baker |
| NaBH ₄ | Sigma |
| Repel-Silane ES | Pharmacia Biotech |
| RNAse Inhibitor | GibcoBRL |
| RNAse H | GibcoBRL |
| Salzsäure (HCL) | J.T.Baker |
| SDS (Sodiumdodecylsulfat) | Pharmacia Biotech |
| Silbernitrat (AgNO ₃) | Roth |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) | Pharmacia Biotech |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Base | Amersham |
| Ultrapure dNTP Set 100 <i>mM</i> Solutions | Pharmacia Biotech |
| RT | GibcoBRL |

2.3 Verbrauchsmaterialien

Falcontube

PCR Softtubes 0.2 *ml*

Biozym

PCR Softtubes 0.5 *ml*

Biozym

Gel Bond Trägerfolie

Biozym

Safe-Lock 0.5 *ml*

Eppendorf

Safe-Lock 1.5 *ml*

Eppendorf

Sterilfilter Minisart Porengröße 0.45 μm Sartorius

2.4 Enzyme

Taq-DNA-Polymerase 5.000 *U/ml* Boehringer Mannheim

SuperScript TM II

Gibco BRL

RNase H

GibcoBRL

2.5 DNA-Molekulargewichtsmarker

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die DNA-Molekulargewichtsmarker

- "Lambda DNA-Hind III Φ X-174 DNA-Hae III Digest" und
- "100 Base-Pair Ladder"

beide von der Firma Pharmacia Biotech verwendet.

2.6 Oligonukleotide Primer

2.6.1 Mutationsscreening-Primer

Die Schmelztemperaturen werden in der Regel so berechnet:

$$T_m = (A + T) \times 2 + (C + G) \times 4.$$

Sie wird jedoch bei Primern die länger als 20 Nukleotide sind, ungenau. In diesem Fall wählt man eine Temperatur die 3-5 °C unter der berechneten T_m liegt. In dieser Arbeit wurden die Schmelztemperaturen wie folgt berechnet:

$$T_m = (A + T) \times 2 + (C + G) \times 4 - 5.$$

Tabelle 5: Übersicht der Primer zum Mutationsscreening

| | T_m | Basensequenz |
|-----|-------------------|---|
| i1 | $T_m: 59^\circ C$ | 5'- TCT CTC TAA TCT CTG CCT TCA C-3' |
| i2 | $T_m: 59^\circ C$ | 5'- GGT GGG GTA GTA CAG GTA CC-3' |
| i3 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- CTG AAT AAG TGT CTA GAG TAA GTC -3' |
| I4 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- GTT AGC CAG GCA CTA GTG AGG- 3' |
| I5 | $T_m: 57^\circ C$ | 5'- GTC ATT AGC ACA AAC GTG ATA G- 3' |
| I6 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- TTA GAG GAC TGG AGA AGA GAG C- 3' |
| I7 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- GCC TTT TTT CCC TCA CTC TGA C- 3' |
| I8 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- CAG AAT CCC GGA CCA CCA GC- 3' |
| I9 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- TCC TTC TAT GTA ATG TGA TTC ACC- 3' |
| I10 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- CTA AGA AGT AAG AAC AAG GCC AC- 3' |
| I11 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- AAT CCC TAA TGA TCT CTT CAA TGC- 3' |
| I12 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- AAG AGT GAG CAA AGA GAA AGG TG- 3' |
| I13 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- GCT TCT CTA ATG TGG ACA TAA CC- 3' |
| I14 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- GGG GAA ACA GGG TAG AGG TTG- 3' |
| I15 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- TTT CCA TGA CCT GAA CTT CTC TG- 3' |
| I16 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- ACT CAC AGT CCC AGC AGA ACC- 3' |
| I17 | $T_m: 59^\circ C$ | 5'- ATA ATA TGC TTC CTC ACT GAA CC- 3' |
| I18 | $T_m: 59^\circ C$ | 5'- TAT ATA CAA GTC TCG ATA TCC ATG- 3' |
| i19 | $T_m: 59^\circ C$ | 5'- GTC TGT AAG CTG GAT GTT GAT G- 3' |
| O29 | $T_m: 61^\circ C$ | 5'- CAG TTA CCA TAG GAT ACG CTG G- 3' |

2.6.2 Spleißvarianten-Primer

Tabelle 6: Übersicht der Spleißvarianten-Primer

| | T_m | Basensequenz |
|-----|---------------------|--|
| O3 | $T_m: 57^\circ C$ | 5' - ATG AAC GTC TTA GGT CTG ATA G -3' |
| O4 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - AAG AAT TTG CTG AGA CTC ATA TCC -3' |
| O8 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - ATG TCC ACG ACC ATC ATT GCT G -3' |
| O10 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - TTT CAA CAG ATT CAA ACA GTG ACG -3' |
| O18 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - GTC TGA GCT GGA TAC CAT TGA C -3' |
| O29 | $T_m: 50,9^\circ C$ | 5' - CAG TTA CCA TAG GAT ACG CTG G -3' |
| OH1 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - CAA CAA TAT GCC CAA GCA GGT G -3' |
| OH2 | $T_m: 51^\circ C$ | 5' - CAT ATC CTT ATT TCT CAC GTT TCC -3' |
| C1 | $T_m: 59^\circ C$ | 5' - AGA TTG TGA CTG TAA GGG ACA G -3' |
| C2 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - GTT TTT CAT TGC TTT TGG CAC CG -3' |
| C3 | $T_m: 63^\circ C$ | 5' - GTG ATC ATG ATC ATG TGT GCT GG -3' |
| C4 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - GGA TGT ACA TGG TAA CAG TGG C -3' |
| C4R | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - CCA TTG GCT GCC ACT GTT ACC -3' |
| 6-1 | $T_m: 57^\circ C$ | 5' - CAC CGC TTC CAG GTA GAG AAC -3' |
| 6-2 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - GAT TCA GTC CAA GAT GAT AGT CC -3' |
| 6-3 | $T_m: 61^\circ C$ | 5' - TGC TGG GAT TAC AAG CAT GAG C -3' |

2.7.3 SSCP

10x-TBE-Puffer (pH 8,3): 1,0 M Tris Base
1,0 M Borsäure
20 M EDTA

Laufpuffer für SSCA: 180 ml 10x TBE
200 ml Glycerol
ad 2 l Aqua bidest

10% SSCA-Gel: 165 ml Acrylamid
25 ml Bisacrylamid
45 ml 10x TBE-Puffer
50 ml Glycerol

ad 500 ml Aqua bidest

2.7.4 Silberfärbung

Lösung A: 10 % EtOH
0,5 % Eisessig
89,5 % Aqua bidest

Lösung B: 0,1 % Silbernitrat
99,9 % Aqua bidest

Lösung C: 1,5 % NaOH
0,01 % NaBH₄
0,15 % Formaldehyd
98,34 % Aqua bidest

2.8 Geräte

| | |
|---|-------------------|
| Analysenwaage BP | Sartorius |
| Autoklav, Modell 2540 EL | Tuttnauer |
| Elektrophorese-Kammer (Sub-Cell-GT-System) | Bio-Rad |
| Heiz- und Magnetrührer (IKAMAG RH) | Janke & Kunkel |
| Kühlsystem Haake K15 | Haake |
| Labor-pH-Meter (pH 526, MultiCal R) | WTG |
| Mikrowelle | AEG |
| Multiphor II | Pharmacia Biotech |
| Photodokumentationssystem für Agarosegele (Gel Doc 1000) | Bio-Rad |
| Power Supply (Power Pac 200, 3000) | Bio-Rad |
| Thermocycler (TRIO-Thermoblock) | Biometra |
| Thermocycler (UNO-Thermoblock) | Biometra |
| Tischzentrifuge (Biofuge pico) | Heraeus |
| Video copy processor (P66DE) | Mitsubishi |
| Vortex MS1 | Bender & Hobein |

2.9 Methoden

2.9.1 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

Aufgrund der negativen elektrischen Ladung der DNA können DNA-Moleküle in einem konstanten elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls von seiner Form und seiner elektrischen Ladung ab. Da die meisten DNA-Moleküle im Verhältnis zu ihrer Masse annähernd die gleiche Ladung besitzen, verwendet man zur Auftrennung Agarose- oder Polyacrylamidgele, die aus einem System von Poren bestehen, deren Größe von der jeweiligen Gelkonzentration abhängig ist. Um die positive Elektrode zu erreichen, müssen die DNA-Moleküle durch diese Öffnungen wandern. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen. Deshalb werden DNA-Moleküle in der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle verhält sich umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Bei mehreren unterschiedlich großen DNA-Fragmenten liegen in dem Gel zahlreiche Banden vor. Zur Größenabschätzung der einzelnen DNA-Fragmente trägt man parallel einen Satz von Restriktionsfragmenten bekannter Größe, einen sogenannten Größenmarker, auf. Über einen Positionsvergleich der Banden kann man die Fragmentgrößen ermitteln. Dabei ist die Laufstrecke linearer Nucleinsäuren proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Gelelektrophorese auf einem Agarosegel

Alle PCR-Produkte wurden zuerst auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Moleküle wurden über Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ethidiumbromid hat die Fähigkeit zwischen den einzelnen Basen des DNA-Doppelstranges zu interkalieren. Ethidiumbromid fluoresziert rot-orange bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht von 254 nm oder 300 nm Wellenlänge. Die Agarose wurde mit 1x-TAE-Puffer, pH 8,0, angesetzt und bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt.

Nach Zugabe von 0,8 μg Ethidiumbromid (10mg/ml) pro 1 ml Gellösung und Abkühlen auf ca. 60°C erfolgte das Gießen der Gele im Gelschlitten. Die Dicke der Gele betrug 0,8 mm . Der Probenauftrag erfolgte nach Abkühlung und Erstarrung des Gels. Das Auftragsvolumen betrug jeweils $10\mu\text{l}$.

Übersicht Agarosegelelektrophorese

Zusammensetzung der Proben: 9,0 μl DNA +
1,0 μl 10x Probenpuffer

Laufbedingungen: Laufpuffer 1x-TAE, pH 8,0
Spannung 80 V
Zeit 20 min

Gelelektrophorese auf einem Polyacrylamidgel

Die DNA-Fragmente, die zur Erhebung von alternativen Splicingvarianten hergestellt wurden, wurden anschließend auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Anschluß an den Lauf wurden die DNA-Moleküle durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Das Polyacrylamidgel wurde 1 Stunde vor dem Lauf auf einem Supportfolie gegossen. Nach der Erstarrung des Gels erfolgte der Probenauftrag. Das Auftragsvolumen betrug $5\mu\text{l}$.

Übersicht Polyacrylamidgelelektrophorese

Zusammensetzung: 1,0 μl DNA
4,0 μl 1x Probenpuffer

| | | |
|------------------|------------|-----------------|
| Laufbedingungen: | Laufpuffer | SSCP-Laufpuffer |
| | Leistung | 25 Watt |
| | Temperatur | 15 °C |
| | Zeit | 1,5 - 2,5 h |

Übersicht Silberfärbung

Das Gel wurde auf einem Schüttler mit folgenden Lösungen inkubiert:

1. Puffer A (Ethanol-Essig-Lösung) 2 x 3 min
Spülen mit Aqua bidest
2. Puffer B (0,1%ige Silberlösung) 15 min
Spülen mit Aqua bidest
3. Puffer C (Fixierer) 5 - 15 min
Spülen mit Aqua bidest
4. Trocken
Zur dauerhaften Aufbewahrung und als Schutz vor dem Austrocknen wird das Gel in eine Klarsichtfolie verbracht.

2.9.2 PCR-Techniken

Die PCR (Polymerase Chain Reaktion) ist eine in vitro-Methode zur Synthese von spezifischen, kurzen DNA-Sequenzen. Es setzt voraus, daß die Sequenzen an den Rändern der Zielregion bekannt sind, ermöglicht dann jedoch, den Bereich zwischen zwei definierten Stellen zu amplifizieren. Um ein solches definiertes DNA-Fragment zu vervielfältigen, verwendet man zwei Oligonucleotide, sogenannte Primer, die zu Bereichen an den Seiten der Zielregion des jeweils gegenüberliegenden

Stranges komplementär sind. Eine Serie von repetitiven Zyklen, die aus Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung der Primer an die denaturierte DNA und Verlängerung der DNA durch DNA-Polymerase die vom 3'-OH-Ende eines jeden Primers ausgeht, führt zu einer exponentiellen Anhäufung von DNA-Molekülen. Da die in einem Zyklus synthetisierten Reaktionsprodukte als Matrizen für den nächsten Zyklus dienen, kommt es bei jedem Reaktionszyklus zu einer Verdopplung der Moleküle. Zur Synthese der Produkte verwendet man hitzestabile Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt bei 70°C , doch übersteht es auch die kurzzeitigen Denaturierungsschritte. Die PCR wurde verwendet bei:

1. der Generierung von DNA-Fragmente die der SSCP-Mutationsanalyse zugänglich waren. Die Primerpaare wurden dabei so gewählt, daß sie die 10 Exons des EAAT2 eingrenzten. Die Länge der DNA-Fragmente lag zwischen 127 bp und 251 bp.
2. der Vervielfältigung von cDNA und
3. bei der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (variable EAAT2 Transkripte) zur Überprüfung von alternativen Splicingvarianten. Dabei wurde die Lage der Primer so gewählt, daß sie genau einen Teil der Sequenz vor und einen Teil der Sequenz nach dem herausgespleißten Fragment enthielt.

Bei der Überprüfung der alternativen Splicingvarianten wurde, zur Erhöhung der Spezifität, im Anschluß an die erste PCR eine sogenannte nested-PCR durchgeführt. Die bei der nested-PCR verwendeten Primer liegen innerhalb der bei der ersten PCR verwendeten Primer.

Reaktionsansatz für die 1. Generierung von DNA -Fragmenten:

2,5 μl PCR-Puffer
 1,0 μl dNTP (10mM)
 2,0 μl Primer 1
 2,0 μl Primer 2
 1,0 μl genomische DNA
 0,2 μl Taq-Polymerase
 16,3 μl ddH₂O

25,0 μl

Reaktionsansatz für die 2. Vervielfältigung von c DNA und 3. Vervielfältigung von DNA - Fragmenten (variable EAAT2 Transkripte):

5,0 μl PCR-Puffer
 5,0 μl Primer 1
 4,5 μl Primer 2
 0,7 μl Taq-Polymerase
 15,3 μl ddH₂O

30,5 μl

Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden mit 50 μl Mineralöl überschichtet.

Thermocycler-Programme:

| | | | |
|------------------|---------------|----------|-------|
| Für PCR 1 und 3: | Denaturierung | 4 min | 95 °C |
| | | 1 min | 95 °C |
| | Annealing | 1 min | 60 °C |
| | Extension | 1 min | 72 °C |
| | | 10 min | 72 °C |
| | | ∞ | 4 °C |

| | | | |
|------------|---------------|--------|-------|
| Für PCR 2: | Denaturierung | 4 min | 95 °C |
| | | 1 min | 95 °C |
| | Annealing | 2 min | 60 °C |
| | Extension | 1 min | 72 °C |
| | | 10 min | 72 °C |
| | | ∞ | 4 °C |

2.9.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ermöglicht die Vervielfältigung und Verwendung einer RNA-Sequenz. Da RNA nicht als Matrize für eine PCR dienen kann, wurde die Reverse Transkription mit der PCR kombiniert. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) wird aus einer mRNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang (cDNA =complementary DNA) synthetisiert. Das Enzym stammt ursprünglich aus bestimmten RNA-Viren und spielt eine wichtige Rolle bei deren Replikation. Die entstehende cDNA kann man nun wiederum zur weiteren PCR einsetzen.

Durch eine reverse Transkription ist es möglich, aus jeder mRNA doppelsträngige DNA herzustellen. Das ist besonders einfach bei mRNAs, die am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz besitzen. Zuerst wird ein Primer an das Poly(A)-Ende angelagert. Dabei handelt es sich um eine kurze Poly(dT)-Sequenz, die dazu dient, ein freies 3'-Ende zu erzeugen, das von der Reversen Transkriptase verlängert werden kann. Andere mögliche Primer sind zufällige Hexanucleotide. Sie können an beliebigen komplementären Stellen der mRNA binden. Es entstehen dabei inkomplette kurze cDNA Stücke. Spezifische oligonucleotid Sequenzen können auch als Primer eingesetzt werden. Sie setzen an ausgewählten, bekannten Stellen der mRNA an. Die Reaktion des Enzyms verläuft in der normalen 5'→3'-Richtung, wobei es entsprechend der komplementären Basenpaarung mit der mRNA-Matrize pro Schritt ein Desoxynucleotid anfügt. Das Produkt der Reaktion ist ein Hybridmolekül, das aus

dem mRNA-Matrizenstrang und dem angelagerten komplementären DNA-Strang besteht. Die *in vitro*-Synthese von DNA-Strängen ist oft unvollständig.

Zusammenfassung der möglichen unterschiedlichen Primer für die reverse Transkription:

1. Oligo(dT) bindet an den Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der RNA. Dieser Primer produziert häufig eine komplette cDNA.
2. Zufällige Hexanucleotide
3. Spezifische oligonukleotid Sequenzen

Diese Primerart wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt.

Bei der verwendeten Super Script II-RT der Firma Gibco BRL handelt es sich um eine modifizierte MMLV (Moloney murine leukemia virus)-Reverse Transkriptase. Diesem Enzym fehlt die intrinsische RNase H-Aktivität, wodurch längere Transkripte entstehen. Die Effizienz der Reaktion variiert zwischen 5% und 90%.

Die Synthese der cDNA erfolgt in drei Schritten:

1. Bei 70 °C werden die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen.
2. Bei 25 °C erfolgt das Annealing der Primer.
3. Bei 42 °C liegt das Arbeitsoptimum der MMLV-RT.

Der verwendete RNase Inhibitor stammt ebenfalls von der Firma Gibco BRL.

Aufgrund der geringeren Stabilität von RNA im Vergleich zu DNA und der Gefahr des Abbaus der RNA durch RNasen ist eine saubere Arbeitsweise von großer Bedeutung. So werden ausschließlich steril verpackte Filterspitzen und autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet. Die Arbeitsfläche sowie die verwendeten Pipetten werden mit 70% Ethanol gereinigt. Der Arbeitsplatz an dem mit RNA gearbeitet wird ist speziell gekennzeichnet.

2.9.4 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

| | | |
|------------------|-------------|--------------------------|
| Reaktionsansatz: | 0,5 μ l | RNase Inhibitor |
| | 1,0 μ l | RNA (= 500ng total RNA) |
| | 0,5 μ l | 50 μ M Random Primer |
| | 5,5 μ l | DEPC-ddH ₂ O |

7,5 μ l

| | | |
|-----------------------|-------|--------|
| Reaktionsbedingungen: | 67 °C | 10 min |
| | 4 °C | 5 min |

Kurz abzentrifugieren

| | | |
|------------------------|-------------|-------------------------|
| Zugabe des Master-Mix: | 4,0 μ l | First Strand Buffer |
| | 2,0 μ l | DTT |
| | 2,5 μ l | 10 mM dNTP-Mix |
| | 1,0 μ l | 200U/ μ l RNase |
| | 2,5 μ l | DEPC-ddH ₂ O |

12 μ l

| | | |
|-----------------------|-------|--------|
| Reaktionsbedingungen: | 25 °C | 10 min |
| | 42 °C | 2 min |

| | | |
|------------|-------------|----------------|
| Zugabe von | 1,0 μ l | Superscript II |
|------------|-------------|----------------|

| | | |
|-----------------------|-------|----------|
| Reaktionsbedingungen: | 72 °C | 10 min |
| | 4 °C | ∞ |

2.9.5 Mutationsscreening mit SSCP

Man kann Sequenzveränderungen anhand ihrer Auswirkungen auf die Wanderung kurzer Fragmente von Einzelstrang-DNA ausmachen. Die dabei angewandte Technik bezeichnet man als Analyse des Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (kurz SSCP, aus single strand conformation polymorphism).

1 μl des PCR-Produktes wurde in 5 μl des SSCP-Auftragpuffer gelöst und 5 μl dieses Ansatzes zur SSCP eingesetzt. Um die Proben in die SSCP-Methode einsetzen zu können muß die DNA in denaturierte Einzelstränge übergeführt werden. Dies geschieht auf einem Heizblock (94 °C, 2 min). Das Gel wurde 1 Stunde vor dem Auftragen der Proben auf einem Supportfilm gegossen und über 30 min einem Elektrophoresevorlauf (15 Watt) unterzogen. Jede Probe wird in mindestens zwei Elektrophoreseläufen mit SSCP analysiert. Die Elektrophoreseläufe finden bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C und 11 °C, bzw. 15 °C und 4 °C) statt. Die Temperatur wird durch einen der Elektrophoresekammer angeschlossenen Kühlblock eingestellt und konstant gehalten. Durch die kombinierte und einzelne Veränderung der Geldichte und der Lauftemperatur lassen sich insgesamt acht verschiedene SSCA-Bedingungen unterscheiden.

Tabelle 7: *Gelbedingungen für Single strand conformation Polymorphism*

| SSCP-Bedingungen | Gelkonzentration [%] | Temperatur [°C] |
|------------------|----------------------|-----------------|
| I | 5 | 4 |
| II | 5 | 11 |
| III | 5 | 15 |
| IV | 5 | 20 |
| V | 10 | 4 |
| VI | 10 | 11 |
| VII | 10 | 15 |
| VIII | 10 | 20 |

2.9.6 Generierung von Exon-Fragmenten zur SSCP durch Amplifizierung mit PCR

Die genomische DNA wurde als Matrix in eine PCR-Amplifizierung über 30 Zyklen eingesetzt (94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 30 sec). Die Amplifizierung setzt die Bindung zweier Oligonukleotide (sogenannte Primer), die zu den beiden 3'-Enden des DNA-Doppelstranges komplementär sind, an die denaturierte DNA voraus. Durch die Wahl der Primerpaare wird die Spezifität der Amplifizierungsprodukte determiniert. Die Primerpaare wurden komplementär zu den die Exons eingrenzenden Intronsequenzen gewählt. Die auf diese Weise hergestellten Exonfragmente waren zwischen 127 bp und 251 bp lang und somit für eine Single Strand Conformational Analysis (SSCA) zugänglich. Die Position der Primer wird im Intronbereich gewählt, sodaß das vollständige Exon für die SSCA-Mutationsanalyse zur Verfügung steht. Die Produkte der Amplifizierung wurden im Vergleich zu einem Plasmid-DNA-Längenstandard hinsichtlich ihrer Größe gelelektrophoretisch (2% Agarose) aufgetrennt. Bei Nachweis spezifischer Amplifizierungsprodukte wurde der PCR-Ansatz auf ein SSCA-Gel aufgetragen.

2.9.7 Statistische Auswertung

Die beobachtete Präsenz von EAAT2-Transkripten wurde durch eine χ^2 -Statistik auf Gruppenunabhängigkeit getestet. Bei Zellmengen kleiner fünf lieferte ein Fisher-Test einseitige *P*-Werte. Als nomineller Signifikanzwert wurde ein Wert von $P < 0,05$ akzeptiert.

Eine Post-hoc-Analyse mittels einfacher Varianzanalyse wurde ausgeführt, um die Hypothese einer Altersabhängigkeit der signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen mit Präsenz von PCR-Produkten für bestimmte EAAT2-Transkripte aufzuweisen.

3 Ergebnisse

3.1 PCR-Amplifizierungen

Die Produkte der PCR-Amplifizierungen zeigen sich in der analytischen Gelelektrophorese als spezifische Banden. Die spezifischen Banden stellten sich für die einzelnen Ansätze mit unterschiedlicher Intensität dar. Diese Unterschiede sind in erster Linie auf Differenzen der DNA-Konzentrationen, die in die PCR-Reaktion eingesetzt wurden, und somit auf zahlenmäßige Unterschiede der Zellen im Patientenblut zurück zu führen. Die so erhaltenen Amplifizierungsprodukte korrespondierten in ihrer Größe mit den erwarteten PCR-Produktlängen.

3.1.1 PCR-Produkte zum Mutationsscreening

Die PCR-Produkte die zum Mutationsscreening amplifiziert wurden hatten eine durchschnittliche Größe von 200 bp, das entsprach in etwa der durchschnittlichen Exongröße von GLT-1 von 177 bp. Für sämtliche Patienten und Kontrollen war es möglich SSCP geeignete Fragmente zu amplifizieren. Da dies möglich war, kann man davon ausgehen, dass es keine Sequenzabweichungen in der Primerbindungsregion gibt. Sequenzabweichungen dort könnten den Primer hindern an die Startsequenz zu binden. In der Agarosegelelektrophorese werden stark abweichende Transkriptvarianten, z. B. durch deletierte Basenpaare, durch unterschiedliches Laufverhalten erkennbar. Bei den PCR-Produkten wurden weder Größenunterschiede zwischen den unterschiedlichen Proben, noch Größenabweichungen innerhalb einer Exongruppe sichtbar. Es konnten aus jeder Patienten- und Kontrollprobe die jeweiligen PCR-Produkte amplifiziert werden.

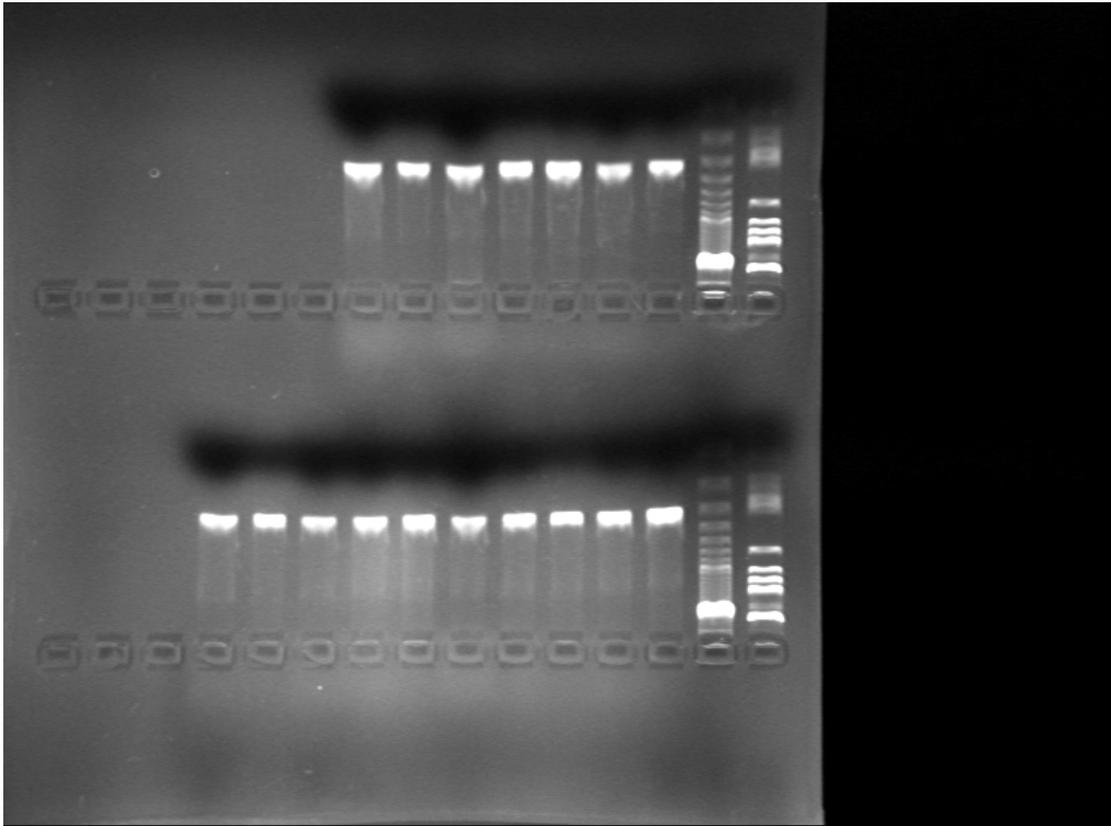


Abbildung 7: *Produkte der PCR-Amplifizierung (Exon6, Patient 1-16) werden in spezifischen Banden in einer Agarosegelelektrophorese dargestellt. Die Fragmentlänge wird durch die parallel aufgetragenen Marker (ganz rechts) bestimmt*

3.1.2 Mutationsscreening mit SSCP

Die Darstellung der einzelsträngigen und doppelsträngigen DNA-Fragmente geschieht durch eine Elektrophorese der denaturierten PCR-Produkte der Exons 1-10 auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Die doppelsträngige DNA hat eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit und läuft vor der einzelsträngigen DNA. Die Position der doppelsträngigen DNA korrespondiert mit der erwarteten Fragmentlänge im Vergleich zu einem parallel aufgetragenem Marker. Der Nachweis von doppelsträngiger DNA nach Denaturierung der zur SSCP eingesetzten Fragmente, beruht einerseits auf der Unvollständigkeit der

Denaturierung sowie der Renaturierung der Einzelstränge zwischen der Hitzedenaturierung und der Auftragung auf das Acrylamidgel. So wurde eine unterschiedliche Intensität der doppelsträngigen DNA-Fragmente zwischen den einzelnen Ansätzen und SSCP-Läufen sichtbar und erklärlich. Die DNA-Einzelstränge, die eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit haben, kommen "unterhalb" der doppelsträngigen DNA zur Darstellung. Die denaturierten Einzelstränge sind zueinander komplementär und besitzen deshalb unterschiedliche Basensequenzen. Die Sekundärstruktur der Einzelstränge wird über ihre Basensequenzen determiniert. Die Laufeigenschaften der Einzelstränge im Acrylamidgel ergeben sich über ihre Sekundärstruktur. In der Vielzahl der SSCP-Läufe waren beide Einzelstränge einzeln zu identifizieren. In Abhängigkeit von den Gelbedingungen (Geldichte, Lauftemperatur, siehe Tabelle 7) waren die Positionen der Einzelstränge zueinander variabel. Bei bestimmten Laufbedingungen waren die Einzelstränge nur schwer zu differenzieren. Manchmal kam es durch ähnliche Sekundärstrukturen und somit ähnliche Laufeigenschaften zum "Übereinanderlaufen" beider Einzelstränge. In diesen Fällen konnte nur ein Einzelstrang identifiziert werden. In der Mehrzahl der Aufträge waren neben den beschriebenen Einzel- und Doppelbanden noch weitere Banden unterschiedlichster Größe vorhanden. Ihr Auftreten war inkonstant und bei wiederholter Generierung durch eine weitere PCR nicht reproduzierbar. Bei den genannten Banden handelt es sich um unspezifische PCR-Produkte. Bei keinem der 28 Proben konnten differierende Banden in den jeweiligen Exons festgestellt werden.

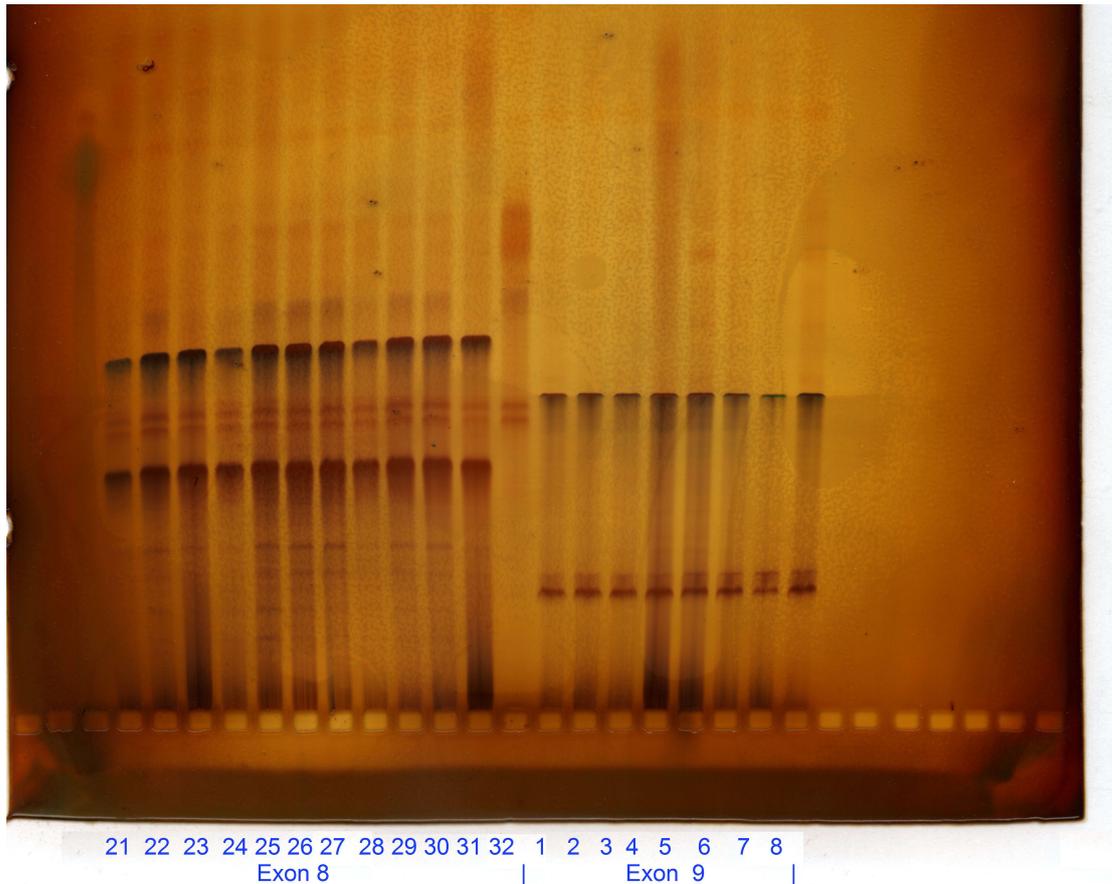


Abbildung 8: Darstellung der DNA-Einzelstränge (Exon8 und 9 von Patient 1-8 und 21-32) durch Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung

3.1.3 EAAT2-cDNA

Die cDNA wurde mit Hilfe der analytischen Gelelektrophorese dargestellt (wie unter 2.9.1 Beschrieben). Die amplifizierte cDNA hatte wie erwartet eine Größe von circa 2,2 kb.

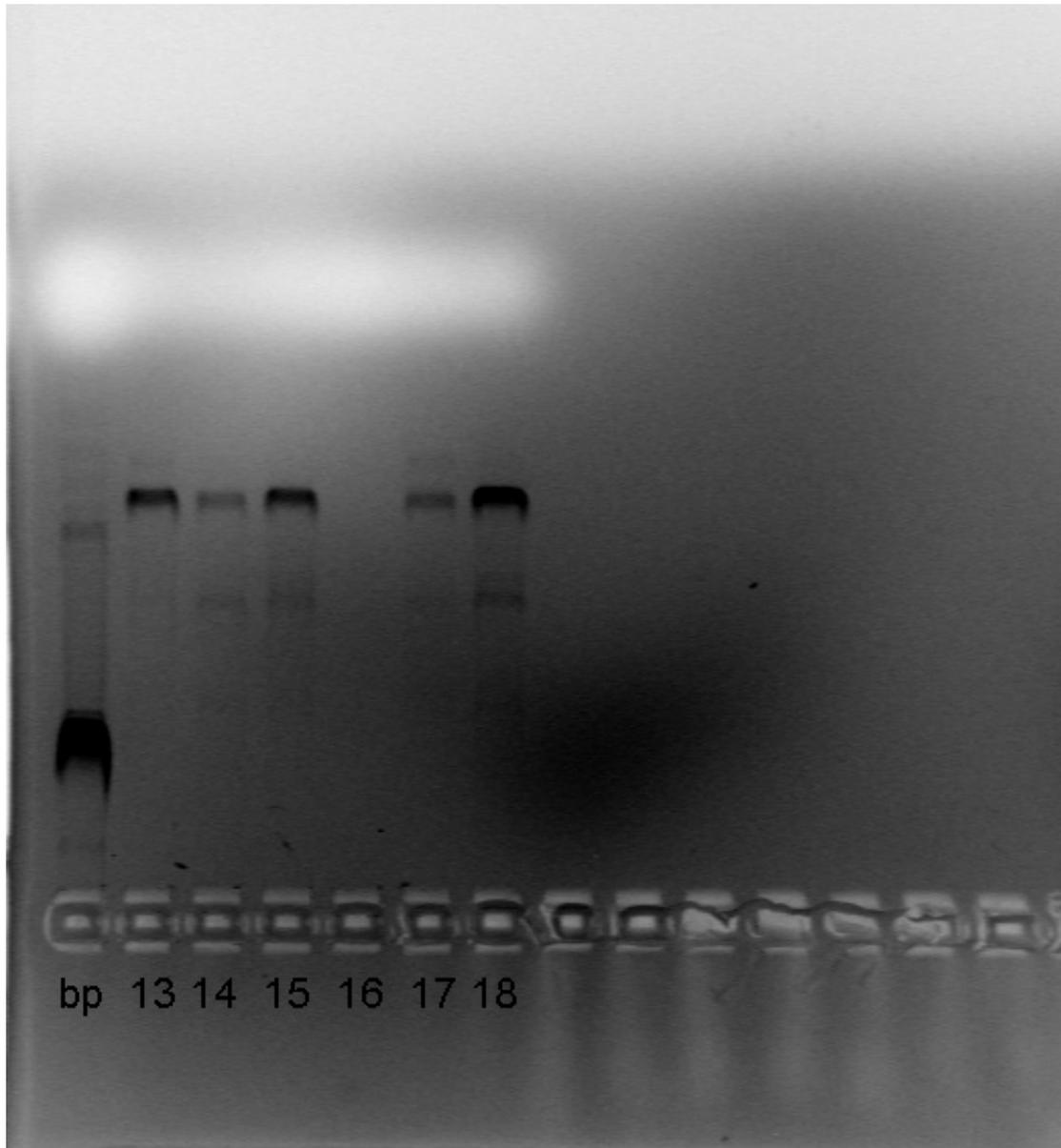


Abbildung 9: *Darstellung der cDNA (cDNA C3, Patient 13-18) durch Elektrophorese auf einem Agarosegel. Über den ganz links aufgetragenen Marker (bp) wird die Länge bestimmt*

3.1.4 PCR-Produkte der Spleißformen von EAAT2

Die PCR-Produkte C1-C4 und EAAT2/Int kamen durch eine analytische Gelelektrophorese auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel mit anschließender

Silberfärbung zur Darstellung. Die PCR-Produkte zur Überprüfung der Spleißvarianten korrespondierten, wenn sie auftraten, ebenso mit den erwarteten Größen. Die Produkte von C1 zeigten eine spezifische Bande bei 350 bp (errechnete Größe : 342 bp), C2 700 bp (errechnete Größe 688 bp), C3 700 bp (errechnete Größe 670 bp) und C4 400 bp (errechnete Größe 418 bp). Die PCR-Produkte von EAAT2/Int lagen bei 900 bp (errechnete Größe 911bp). Es zeigte sich, daß keine der EAAT2-Transkripte ausschließlich in der ALS oder in der Kontrollgruppe exprimiert wurde. EAAT2/ Int wurde in der Hälfte aller Motokortexproben gefunden, mit einer vermehrten Expression in der ALS- Gruppe (59%) verglichen mit der Kontrollgruppe (36%). Im Unterschied dazu wurden die EAAT2-Transkripte C1-C4 gleichermaßen in der ALS sowie in der Kontrollgruppe exprimiert. EAAT2/C1 war in den meisten Motorkortexproben vorhanden (89%). Die Transkripte EAAT2/C3 und C4 wurden weniger häufig exprimiert (C3 46% und C4 32%). EAAT2/C2 wurde nur sehr selten gefunden (11%).

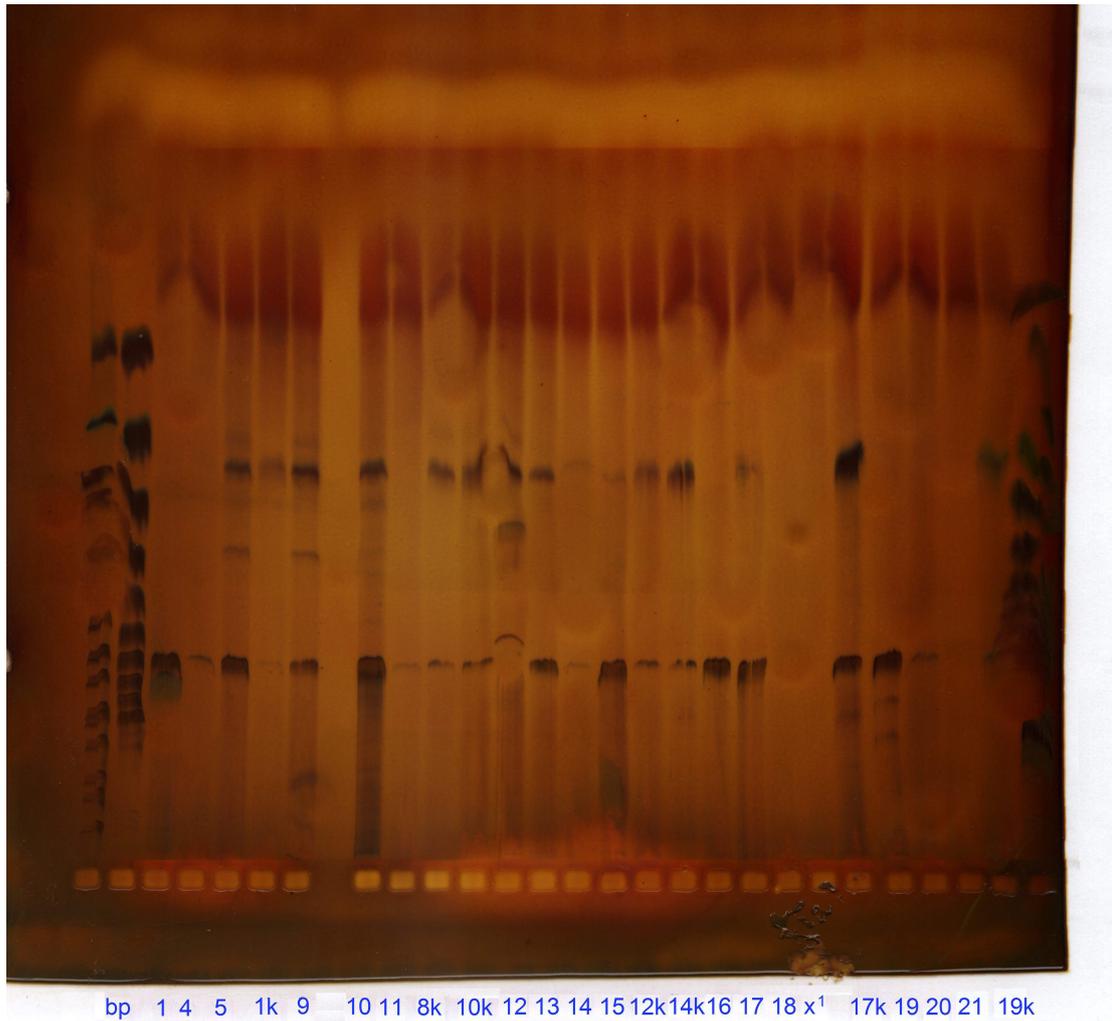


Abbildung 10: Darstellung der Spleißprodukte (6-3 Patient 1-21) durch analytische Gelelektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Die Größe wird über die links aufgetragenen Marker (bp) bestimmt.

Tabelle 8: *Ergebnisse über das Vorkommen der fünf untersuchten Spleißvarianten bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) und Kontrollpatienten*

| Transkript | ALS-Patienten(17) | | Kontroll-Patienten(11) | |
|------------|-------------------|---------------|------------------------|---------------|
| | Vorhanden + | Abwesend - | Vorhanden + | Abwesend - |
| EAAT2/C1 | 15 (0,88) | 2 (0,12) | 10 (0,91) | 1 (0,09) |
| EAAT2/C2 | 2 (0,12) | 15 (0,88) | 1 (0,09) | 10 (0,91) |
| EAAT2/C3 | 8 (0,47) | 9 (0,53) | 5 (0,45) | 6 (0,55) |
| EAAT2/C4 | 5 (0,29) | 12 (0,71) | 4 (0,36) | 7 (0,64) |
| EAAT2/Int | 10 (0,59) | 7 (0,41) | 4 (0,36) | 7 (0,64) |
| Transkript | Insgesamt(28) | | χ^2 | P Wert |
| | Vorhanden + | Abwesend - | | |
| EAAT2/C1 | 25 (0,89) | 3 (0,11) | 0,049 | 0,823 |
| EAAT2/C2 | 3 (0,11) | 25 (0,89) | 0,049 | 0,823 |
| EAAT2/C3 | 13 (0,46) | 15 (0,54) | 0,007 | 0,934 |
| EAAT2/C4 | 9 (0,32) | 19 (0,68) | 0,148 | 0,700 |
| EAAT2/Int | 14 (0,5) | 14 (0,5) | 1,348 | 0,246 |

4 Diskussion

4.1 Genomische EAAT2-DNA und defizitärer Glutamattransport

Nach den Befunden des defizitären Glutamattransportes bei der sporadischen ALS, war es wichtig die Ursache dafür zu finden. Es lag nahe zunächst einen genetischen Defekt des wichtigsten Transporterproteins auszuschließen. Die vorliegende Studie zeigt nun, dass Sequenzabweichungen der kodierenden Regionen der gliären EAAT2-DNA nicht die primäre Ursache der sporadischen Form der amyotrophen Lateralsklerose bei den hier untersuchten Patienten darstellt. Die verminderte Expression des gliären Glutamat-Transporters EAAT2, der quantitativ mit über 90% des Gesamttransports bei der Wiederaufnahme die größte Rolle spielt, ist unbestritten. Unklar ist weiterhin, welches die molekularen Grundlagen der reduzierten Expression sind.

Während der Zusammenstellung des ersten Teils dieser Arbeit kam die Diskussion, über alternative/aberrante Spleißprozesse der EAAT2-RNA als Ursache der Transporterstörung, auf. In diesem Zusammenhang entstand der zweite Teil dieser Arbeit.

4.2 Alternative/aberrante Spleißvarianten des Glutamattransporters EAAT2

Keine der fünf analysierten EAAT2 Spleißvarianten konnten, im Gegensatz zu der amerikanischen Rothstein-Gruppe, als ALS spezifisch detektiert werden. Allein schon die Tatsache, dass die Spleißvarianten in unserer Arbeitsgruppe primär aus gesundem, humanem Kontrollgehirngewebe kloniert wurden, lassen darauf schlie-

Ben dass eine spezifische Assoziation der EAAT2-Spleißprodukte mit der ALS unwahrscheinlich ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten aufzeigen, dass die Expression der fünf Spleißvarianten bei der ALS viel komplexer ist, als ursprünglich angenommen. Es konnten sowohl von erkranktem wie auch von gesundem Motokortex Spleißvarianten-Transkripte amplifiziert und ausgewertet werden (siehe Tabelle 8).

Eine primäre Verursachung der ALS durch die untersuchten fünf Spleißvarianten, auch insbesondere der Spleißvarianten EAAT2/C1 und EAAT2/Int die als ALS spezifisch bezeichnet wurden, kann durch das nahezu homogene Auftreten der Spleißvarianten, als unwahrscheinlich angenommen werden. Beide fehlerhafte Transkripte kodieren über nicht funktionale EAAT2-Polypeptide. Bei Koexpression mit dem EAAT2-Wildtyp führen sie durch eine dominante Regulation zu einer Verminderung der Transporterexpression [24].

Die statistische Analyse zur Häufigkeitsverteilung ($P > 0.05$) zeigte auf, daß keine der EAAT2-Transkripte gruppenabhängig sind. Vergleicht man jedoch die unterschiedlichen P-Level zeigt sich, daß EAAT2/Int einen leichten Trend zur vermehrten Expression der Transkripte in der ALS-Gruppe hat (Typ 1 Fehlerwahrscheinlichkeit = 24.6%). Vergleicht man die Expressionsraten von EAAT2/C1-C4 und EAAT2/Int bezugnehmend auf das Alter der Patienten, zeigte die Einweg-Analyse der Varianz keine signifikante Unterschiede im Alter zwischen den verschiedenen Gruppen ($F(4,57)=0.49$; $P=0.74$). So konnte man ausschließen, daß das Alter einen Effekt auf das Expressionsmuster der untersuchten EAAT2-Transkripte hat.

EAAT2/C1-C4 wurden in unterschiedlichen Häufigkeiten im Motorkortex entdeckt. Dieser Befund entspricht den allerersten Berichten dieser Spleißform [2, 16]. Sequenzanalysen und Splicescoreberechnungen weisen darauf hin, daß EAAT2/C1 und EAAT2/C3 eine Art der alternativen Spleißform Exondeletion sind. Der Splicescore für EAAT2/C1 ist bei 5' = 6.0 und bei 3' = 7.2, für EAAT2/C3 ist der Score bei 5' = 4.5 und bei 3' = 8.8. Verglichen mit der durchschnittlichen 5' und 3' Splicescores von 8.0 und 9.4, deutet es darauf hin, daß sowohl CDS 6 und CDS 8 von schwachen Spleißstellen umschlossen sind und somit Bestandteil der Regula-

tion durch alternatives Spleißen sind. Im Gegenteil hierzu sind bei EAAT2/C2 und EAAT2/C4 die deletierten Sequenzen nicht von Konsensussequenzen eingerahmt. Dies könnte durch Vielfalt der Allele bedingt sein oder auf eine abnormale oder unbekannte Spleißform hinweisen. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen eine reichliche Expression der alternativen Spleißformen EAAT/C1 und EAAT2/C3. Die Spleißform C1 war bei 88% der ALS-Patienten und in 91% der Kontrollpatienten, C3 bei 47% der ALS-Patienten und 45% der Kontrollpatienten vorhanden. Die aberranten Spleißformen EAAT2/C2 und EAAT2/C4 waren bei einer geringen Zahl der Kontroll- und ALS-Gewebeproben amplifizierbar. C2 war bei 12% der ALS-Patienten und 9% der Kontrollpatienten, C4 bei 29% der ALS-Patienten und 36% der Kontrollpatienten vorhanden. Interessanterweise zeigte das Transkript EAAT2/Int einen leichten Trend zur vermehrten Amplifikation im ALS-Gewebe an. EAAT2/Int wurde bei 52% der ALS-Patienten im Vergleich zu 36% der Kontrollen detektiert. Diese Differenzen im Nachweis könnten darauf schließen lassen, daß eine veränderte Expression dieses Transkriptes bezüglich des Krankheitsprozesses bestehen könnte. Diese Unterschiede im Nachweis von EAAT2/Int könnten als Differenzen der quantitativen Expression in Betracht gezogen werden. Um diese Tendenz weiter zu bestätigen wären weitere Untersuchungen nötig. Die Quantifizierung von Spleißvorgängen im menschlichen Hirngewebe postmortem ist allerdings technisch sehr schwierig und Untersuchungen von menschlichem Hirngewebe im zeitlichen Verlauf der Krankheit sind natürlich nicht möglich. Untersuchungen im transgenen Mausmodell der autosomal-dominanten Form der ALS, das krankheitsassoziierte Mutationen der Superoxiddismutase 1 (SOD1) exprimiert, sind noch nicht erfolgt. Vielleicht könnte sich im Mausmodell die Rolle dieses Transkriptes im Verlauf der Krankheit aufklären lassen.

Zwischenzeitlich wurden Untersuchungen der Spleißvarianten EAAT2/C1 und EAAT2/Int bei Patienten mit Temporallappenepilepsie und einer Kontrollgruppe durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden ebenso wie in dieser Arbeit beide Transkripte im Motorkortex, der TLE-Patienten und der Kontrollgruppe, gefunden [38]. Eine andere Gruppe untersuchte ein verkürztes EAAT2-Transkript (EAAT2b)

im Motorkortex von ALS-Patienten. EAAT2b zeigte im motorischen Kortex der ALS-Patienten eine höhere Expression im Vergleich zu den Kontrollen[51]. Für das weitere Verständnis der ALS-Pathogenese und die mögliche Nutzung von EAAT2 als biologischen Marker wären die ALS-Spleißvorgänge in der zeitlichen Sequenz der Erkrankung von Bedeutung.

Eine ganz neue Untersuchung von EAAT2-Transkripten im Verlauf der ersten Lebensjahre zeigte eine deutliche Zunahme von fast allen untersuchten Transkripten im Zeitraum zwischen dem Lebensalter 1-2 Monaten und 1-2 Jahren [46].

Eine ursächliche Erklärung der verminderten Glutamattransporterexpression lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ableiten. Bei Untersuchungen der 5'- und 3'-untranslatierten Spleißvarianten (5'UTR, 3'UTR) im transgenen Mausmodell konnte ein eindeutiges topisches Verteilungsmuster festgestellt werden [27]. Im Verlauf der Erkrankung veränderte sich auch die Anzahl der einzelnen Varianten.

Die beschriebenen Veränderungen der Verteilung und der verminderten Glutamattransporterexpression erklären zumindest teilweise die selektive Vulnerabilität der Motoneurone gegenüber exzitotoxischen Schädigungen, die sich vermutlich kumulativ über einen langen Zeitraum entwickeln und schließlich die Kompensationsfähigkeit der Motoneurone überschreitet. Eine Expressionsanalyse von unterschiedlichen 5'-Spleißvarianten unter hypoxischen Bedingungen im Tiermodell, verursacht durch 3-Nitropropion Säure, zeigte in verschiedenen Gehirnregionen eine unterschiedliche Regulation der einzelnen Transkripte. Zwei der Transkripte (mEAAT2/5UT4 und mEAAT2/5UT5) wurden z. B. im Frontalkortex der Mäuse hochreguliert, während sie im Hippokampus herunterreguliert wurden. Dies untermauert eine Hypothese, dass RNA-Spleißen auch ein Faktor der posthypoxischen Genregulation sein könnte [65]. Neuere Kenntnisse deuten darauf hin, dass die Störungen im Glutamatstoffwechsel auch sekundäre Phänomene im Verlauf der Erkrankung sein könnten [106].

Diese Hypothese wird durch Untersuchungen an einem transgenen Mäusestamm

(G85A-SOD1-Maus) erhärtet, der wesentliche Kennzeichen der Motoneuronenerkrankung ALS aufweist. Die zeitlich parallele Untersuchung von Proteinexpression des GLT-1 und histologisch nachweisbaren gliären und neuronalen Veränderungen bei diesem SOD-Mausmodell zeigt, daß einer Verminderung der Glutamattransporterbindungsstellen eine morphologische Veränderung der Astrozyten vorausgeht [12]. Desweiteren wurde festgestellt, dass die SOD-1 Mutation sowohl in neuronalen Zellen wie auch in nicht neuronalen Zellen vorhanden sein muss um die Erkrankung auszulösen [71]. Allerdings kann die Krankheit nicht ausgelöst werden wenn die Mutation ausschließlich in der Astroglia vorhanden ist [33]. Das genauere Wissen der Interaktionen von Astroglia und Motoneuronen könnte zum weiteren Verständnis des Fortschreitens der Erkrankung beitragen. Es gibt Hypothesen die einen defekten ‚Crosstalk‘ zwischen Astroglia und Motoneuronen für die Ursache der ALS halten [106]. Ein anderer Hinweis auf den möglicherweise sekundären Charakter des Transportdefizits wurde durch die Bestimmung der Glutamattransporterbindungsstellen bei ALS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen geliefert. In der Substantia gelatinosa des Rückenmarks von ALS-Patienten war eine verminderte Dichte der Transporterbindungsstellen nachweisbar. Diese Region ist Endigungsgebiet für glutamaterge kortikospinale Bahnen. Proportional zur Verminderung der Transporterbindungsstellen fand sich eine erhöhte Zahl gliärer Zellen, möglicherweise im Sinne einer reaktiven Gliose. Die Beobachtungen sprechen dafür, daß der Rückgang von Glutamattransporterbindungsstellen auf den Verlust glutamatergen Nervenendigungen zurückzuführen ist [88].

Eine ursächliche Bedeutung der Astrocytose/Gliose mit nachfolgender Immunreaktivität wird auch durch Befunde bekräftigt, die eine längere Überlebensdauer von transgenen SOD 1-Mäusen die mit Minocycline behandelt wurden, zeigen. Minocycline stoppt entzündliche Prozesse und ist insbesondere in der Lage die auftretende Mikroglie zu hemmen [9].

Weitere Untersuchungen gaben Hinweise auf eine systemische Beteiligung des Immunsystems. Im peripheren Blut wurden aktivierte Monocyten/Makrophagen unter-

sucht und dabei fand sich bei ALS-Patienten ein erhöhtes Niveau. Eine direkte Verbindung zwischen dem Ausmaß der Makrophagenaktivierung und der Progression der Krankheit konnte hergestellt werden [107]. Inzwischen wird bei der Krankheitsentstehung von einem eher multifaktoriellen Geschehen ausgegangen. Vielfältige neue Untersuchungen beschäftigen sich mit der Abklärung von Risikofaktoren für die ALS. Ein möglicher genetischer Risikofaktor könnten Mutationen im Angiogenin-Gen darstellen. Grundlagenwissenschaftliche Arbeiten zeigten die Bedeutung des Angiogenins, ein Mitglied der Ribonuklease A-Familie, für das Neuritenwachstum und deren Wegfindung. Sieben Sequenzvarianten im Angiogenin-Gen wurden bei der ALS beschrieben. Bei funktionellen Untersuchungen dieser Varianten, zeigte sich deren eingeschränkte oder verlorene ribonukleolytische Eigenschaft, die sich durch vermindertes Neuritenwachstum und vermindertes Aufnehmen von Zellkontakten darstellte. Zusätzlich hatten die Varianten einen zytotoxischen Effekt auf Motoneurone [97, 19, 98, 35]. Weitere mögliche Risikofaktoren könnten Chromosomenaberrationen (ChA) darstellen. Bei ALS-Patienten wurde ein erhöhter Prozentsatz (5,9%) von Chromosomenaberrationen im Vergleich zur Normalbevölkerung (0,05-0,01%) gefunden. Fünf verschiedene Formen von ChA konnten aufgezeigt werden. Die Chromosomenveränderungen sind aber wahrscheinlich nicht alleine ursächlich für die Krankheit, da auch bei gesunden Verwandten die gleichen Veränderungen ausgemacht werden konnten. Weitere Aufschlüsse über die Rolle der ChA, sowie mögliche Kandidatengene der ALS werden jetzt durch die Untersuchung der Bruchpunkte erwartet. Bei einem Patienten mit einer Translokation $t(18;21)(q23;22.1)$ befand sich der Bruchpunkt in unmittelbarer Nähe des SOD-1-Gens. Die geringe räumliche Distanz könnte auf Wechselwirkungen hindeuten [73]. Eine Vielzahl weiterer genetischer Risikofaktoren wurden und werden aktuell untersucht. Dazu gehören Mutationen im Dynactin-Gen, Polymorphismen im Tau-Gen, beide kodieren für Proteine die am axonalen Transport beteiligt sind [64, 63, 104], und Sequenzveränderungen im IFT4-Gen (Intraflagellar transport protein 74) welches ein Risikofaktor für die ALS-FTD darstellen könnte. Eine große Anzahl von weiteren möglichen Ätio-

pathogenesefaktoren wurde bislang schon überprüft und nicht für ursächlich erachtet. Dazu gehören Oxidativer Stress [76], Ubiquitin-Proteinkonjugate [84], nervalen Wachstumsfaktoren [15, 32] und auch ein zuviel an motorischer Aktivität bei ALS-Patienten, im Sinne eines Umweltfaktors. Abschließend kann gesagt werden, dass die Ätiologie und Pathogeneseforschung der ALS weiterhin durch hypothetische Überlegungen geprägt ist. Viele der Hypothesen werden zurzeit in transgenen Tiermodellen überprüft und es bleibt zu hoffen damit der Ätiopathogenese weiter auf die Spur zu kommen.

5 Zusammenfassung

Bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose wurde eine selektive Expressionsminderung des Glutamatransporters EAAT(Excitatory amino acid transporter)2 in pathogenetisch relevanten Hirnregionen, dem sensomotorischen Cortex, gefunden. Die glutamaterge Dysfunktion führt durch verminderte Glutamatwiederaufnahme und einem synaptischen Glutamatexzess zu einer Überaktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren mit nachfolgendem Neuronenuntergang. Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Mutationsscreening der codierenden Sequenzen des Glutamatransporters EAAT2. Des weiteren wurden fünf der alternativ / aberranten EAAT2-Spleißprodukte in Hinsicht auf ihr Vorkommen bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose und Kontrollpatienten in dieser Studie ermittelt. Die vorliegende Studie zeigt, daß Sequenzabweichungen der kodierenden Regionen der gliären EAAT2-DNA nicht die primäre Ursache der sporadischen Form der amyotrophen Lateralsklerose bei den hier untersuchten Patienten darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen an, daß die Expression der variabel gespleißten EAAT2 RNA Arten bei der Amyotropher Lateralsklerose viel komplexer ist, als ursprünglich angenommen. Keiner der in der Studie analysierten EAAT2-Transkripte können als spezifisch für die Amyotropher Lateralsklerose bezeichnet werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] **Amara S , Arriza J.** Neurotransmitter transporters three distinct gene families. *Curr Opin Neurobiol*, 3: 337–344 (1993).
- [2] **Armon C, Kurland L, Daube J , O'Brien P.** Epidemiologic correlates of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 41: 1077–1084 (1991).
- [3] **Arnold A, Edgren D , Palladino V.** Amyotrophic lateral sclerosis: fifty cases observed on guam. *J Nerv Ment Dis*, 117: 135–139 (1953).
- [4] **Arriza J, Eliasof S, Kavanaugh M , Amara S.** Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 4155–4160 (1997).
- [5] **Arriza J, Fairman W, Wadiche J, Murdoch G, Kavanaugh M , Amara S.** Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci*, 14: 5559–5569 (1994).
- [6] **Bennett M, Michaud S, Kingston J , Reed R.** Protein components specifically associated with presliceosome and spliceosome complexes. *Genes Dev*, 6: 1986–2000 (1992).
- [7] **Bensimon G, Lacomblez L , Meininger V.** A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/riluzole study group. *N Engl J Med*, 330: 585–591 (1994).
- [8] **Blanchette M , Chabot B.** Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilisation. *EMBO J*, 18: 1939–1952 (1999).
- [9] **Blum D, Chtarto A, Tenenbaum L, Brotchi J , Levivier M.** Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, 17: 359–366 (2004).

- [10] **Brody E , Abelson J.** The spliceosome: yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science*, 228: 963–967 (1985).
- [11] **Brooks B.** El escorial world federation of neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. subcommittee on motor neuron diseases/amyotrophic lateral sclerosis of the world federation of neurology research group on neuromuscular diseases and the el escorial >clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis< workshop contributors. *J Neurol Sci Suppl*, 124: 96–107 (1994).
- [12] **Brujin L, Becher M, Lee M, Anderson K, Jenkins N, Copeland N, Sisodia S, Rothstein J, Borchelt D, Price D , Cleveland D.** ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18: 327–338 (1997).
- [13] **Burge C, Tuschl T , Sharp P.** Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. R.F. Gesteland and J.F. Atkins (eds.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 525–560 (1999).
- [14] **Caroscio J, Calhoun W , Yahr M.** Prognostic factors in motor neuron disease: A prospective study of survival. In: Rose, F.C. (ed) *Research Progress in Motor Neuron Diseases* Pitman, Bath, 34–43 (1984).
- [15] **Cassina P, Pehar M, Vargas M, Castellanos R, Barbeito A, Estevez A, Thompson J, Beckman J , Barbeito L.** Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochemistry*, 93: 38–46 (2005).
- [16] **Chancellor A , Warlow C.** Adult onset motor neuron disease: worldwide mortality, incidence and distribution since 1950. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55: 1106–1115 (1992).

- [17] **Charcot J.** Lecons sur les maladies du système nerveux. Delahaye, Paris, . (1973).
- [18] **Choi D.** Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1: 623–634 (1988).
- [19] **Crabtree B, Thiyagarajan N, Prior S, Wilson P, Iyer S, Ferns T, Shapiro R, Brew K, Subramanian V, Acharya K.** Characterization of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem*, 46(42): 11810–11818 (2007).
- [20] **Danbolt N.** The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol*, 44: 337–396 (1994).
- [21] **Day D, Tuite M.** Posttranscriptional gene regulatory mechanism in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol*, 157: 361–371 (1998).
- [22] **Dengler R, Tröger N.** Amyotrophische Lateralsklerose und Bulbärparalyse. In: HC Hopf, G Diener, HC Diener, H Reichmann (Hrsg.) *Neurologie in Klinik und Praxis*. 3. Auflage Thieme, Stuttgart (2002).
- [23] **Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG.** hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*, 62: 289–321 (1993).
- [24] **Eisen A, Schulzer M, MacNeil M, Pant B, Mark E.** Duration of amyotrophic lateral sclerosis is age dependent. *Muscle Nerve*, 16: 27–32 (1993).
- [25] **Erecinska M, Silver J.** Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 35: 599–603 (1995).
- [26] **Fairman W, Vandenberg R, Arriza J, Kavanaugh M, Amara S.** An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, 375: 599–603 (1995).

- [27] **Felbecker A.** Neue Isoformen des Glutamattransporters EAAT2: RNA-Sequenzen und genomische Organisation. Dissertation (2003). <http://vts.uni-ulm.de/doc.asp?id=3521>.
- [28] **Gajdusek D.** Motor neuron disease in natives of New Guinea. *N Engl J Med*, 268: 474–476 (1963).
- [29] **Gajdusek D , Salazar A.** Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology*, 32: 107–126 (1982).
- [30] **Gay P, Westbrook P, Daube JR, Litchy W, Windebank AJ , Iverson R.** Effects of alterations of pulmonary function and sleep variables on survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Mayo Clin Proc*, 66: 686–694 (1991).
- [31] **Gegelashvili G , Schousboe A.** High affinity glutamate transporters: Regulation of expression and activity. *Molec Pharmacol*, 52: 6–15 (1997).
- [32] **Giess R, Goetz R, Schrank B, Ochs G, Sendtner M , Toyka K.** Potential implications of a ciliary neurotrophic factor gene mutation in a German population of patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve*, 21: 236–238 (1988).
- [33] **Gong Y, Parsadanian A, Andreeva A, Snider W , Elliott J.** Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motorneuron degeneration. *J Neurosci*, 20: 660–665 (2000).
- [34] **Graveley BR.** Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6: 1197–1211 (2000).
- [35] **Greenway M, Anderson P, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, Patterson V, Swingler R, Kieran D, Prehn J, Morrison K, Green A, Acharya K, Brown R , Hardiman O.** ANG mutations segregate with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 38: 411–413 (2006).

- [36] **Hadano S, Hard C, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Deron R, Miyamoto N, Showguchi I, Mijata J, Okada Y, Singaraja R.** A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial angiotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 29: 166–173 (2001).
- [37] **Hentze M.** Determinants and regulation of cytoplasmic mRNA stability in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1090: 192–281 (1991).
- [38] **Hoogland G, Oort R, Proper E, Jansen G, van Rijen P.** Alternative splicing of glutamate transporter EAAT2 RNA in neocortex and hippocampus of temporal lobe epilepsy patients. *Epilep Res*, 59: 75–82 (2004).
- [39] **Horowitz D, Krainer AR.** Mechanism for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet*, 10: 100–106 (1994).
- [40] **Jablecki C, Berry C, Leach J.** Survival prediction in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 12: 833–841 (1989).
- [41] **Kanner B.** Glutamate transporters from brain: a novel neurotransmitter transporter family. *FEBS Lett*, 325: 95–99 (1993).
- [42] **Kessler M, Baudry M, Lynch G.** Use of cystine to distinguish glutamate binding from glutamate sequestration. *Neuroscience Letters*, 81: 221–226 (1987).
- [43] **Kramer A.** The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 65: 367–409 (1996).
- [44] **Krecic AM, Swanson MS.** hnRNP complexes composition, structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 363–371 (1999).
- [45] **Kristensen O, Melgaard B.** Motor neuron disease: prognosis and epidemiology. *Acta Neurol Scand*, 56: 299–308 (1977).

- [46] **Lauriat T, Schmeidler J, McInnes A.** Early rapid rise in EAAT2 expression follows the period of maximal seizure susceptibility in human brain. *Neurosci Lett*, 412/1: 89–94 (2007).
- [47] **Li X, Francke U.** Assignment of the gene SLC1A2 coding for the human glutamate transporter EAAT2 to human chromosome 11 bands p13-p12. *Cytogenet Cell Genet*, 71: 212–213 (1995).
- [48] **Lin CL, Bristol L, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein J.** Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 20: 613–622 (1998).
- [49] **Lipton S, Rosenberg P.** Mechanism of disease excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, 330: 613–622 (1994).
- [50] **Manfras B, Rudert W, Trucco M, Boehm B.** Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human brain and pancreas. *Biochim Biophys Acta*, 1995: 185–188 (1994).
- [51] **Maragakis N, Dykes-Hoberg M, Rothstein J.** Altered expression of the glutamate transporter EAAT2b in neurological disease. *Ann Neurol*, 55/4: 469–477 (2004).
- [52] **Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L.** Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 40: 759–766 (1996).
- [53] **McGeer E, McGeer P.** Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Biodrugs*, 19: 31–37 (2005).
- [54] **Medina L, Figueredo-Cardenas G, Rothstein J, Reiner A.** Differential abundance of glutamate transporter subtypes in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-

- vulnerable versus ALS-resistant brain stem motor cell groups. *Exp Brain Res*, 52: 17–31 (1996).
- [55] **Meyer T, Ludolph A, Morkel M, Hagemeyer C, Speer A.** Genomic organization of the excitatory amino acid transporter gene GLT-1. *Neuroreport*, 8: 775–777 (1997).
- [56] **Meyer T, Münch C, Liebau S, Fromm A, Schwalenstöcker B, Völkel H, Ludolph A.** Splicing of the glutamate transporter EAAT2: a candidate gene of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65: 954 (1998).
- [57] **Michaud S, Reed R.** An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev*, 5: 2534–2546 (1991).
- [58] **Milton J, Banner S, Ince P, Piggot N, Fray A, Thatcher N, Horne C, Shaw P.** expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res*, 52: 17–31 (1997).
- [59] **Moore M, Query C, Sharp P.** Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In R. F. Gesteland and J. F. Atkins (eds.), *The RNA world*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 303–357 (1993).
- [60] **Mulder D, Howard FJ.** Patient resistance and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Mayo Clin Proc*, 51: 537–541 (1976).
- [61] **Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT.** Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2: 1547–1558 (1989).
- [62] **Murray H, Jarrell KA.** Flipping the switch to an active spliceosome. *Cell*, 96: 599–602 (1999).

- [63] **Münch C, Prechter F, Renshi X, Linke P, Prudlo J, Kuzma M, Kwiecinski H, Ludolph A, Meyer T.** Frequency of a tau genotype in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 236(1-2): 13–16 (2005).
- [64] **Münch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld A, Kurt A, Prudlo J, Peraus G, Hanemann C, Stumm G, Ludolph A.** Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *BMC Neurol* 6, 44: 75–82 (2006).
- [65] **Münch C, Zhu B, Leven A, Stamm S, Einkörn H, Schwalenstöcker B, Ludolph A, Riepe M, Meyer T.** Differential regulation of 5' splice variants of the glutamate transporter EAAT2 in an in vivo model of the glutamate transporter EAAT2 in an in vivo model of chemical hypoxia induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurosci Res*, 71: 819–825 (2003).
- [66] **Nagao S, Kwak S, Kanazawa I.** EAAT 4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje Cell dendrites and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neurosci*, 78: 929–933 (1997).
- [67] **Nicholls B, Attwell D.** The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 462–468 (1990).
- [68] **Norris F, Shepherd R, Denys E.** Onset, natural history and outcome in idiopathic adult motor neuron disease. *J Neurol Sci*, 118: 48–55 (1994).
- [69] **Pines G, Danbolt N, Björas M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner B.** Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 360: 464–467 (1992).
- [70] **Plaitakis A, Constantakakis J, Smith J.** The neuroexcitator amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 24: 446–449 (1988).

- [71] **Pramatarova A, Laganieri J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau G.** Neuron specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci*, 21: 3369–3374 (2001).
- [72] **Preiss T, Hentze M.** from factors to mechanism: translation and translational control in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, 9: 515–521 (1999).
- [73] **Prudlo J, Alber B, Kalscheuer V, Roemer K, Martin T, Dullinger J, Sittinger H, Niemann S, Heutink P, Ludolph A, Ropers H, Zang K, Meyer T.** Chromosomal translocation t (18;21)(q23;q22.1) indicates novel susceptibility loci for frontotemporal dementia with ALS. *Ann Neurol*, 55: 134–138 (2004).
- [74] **Reed R.** Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev*, 6: 215–220 (1996).
- [75] **Reed R.** Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 340–345 (2000).
- [76] **Robberecht W.** Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 247: 1–6 (2000).
- [77] **Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan J, Deng H.** Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362: 59–62 (1993).
- [78] **Rothstein J, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW.** Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16: 675–686 (1996).
- [79] **Rothstein J, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl R.** Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 6591–6595 (1993).

- [80] **Rothstein J, Martin L , Kuncl R.** Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 326: 1464–1468 (1992).
- [81] **Rothstein J, Martin L, Levey A, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N , Kuncl R.** Localisation of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13: 713–725 (1994).
- [82] **Rothstein J, Tsai G, Kuncl R, Clawson L, Cornblath D, Drachman D, Pestronk A, Stauch B , Coyle J.** Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 28: 18–25 (1990).
- [83] **Rothstein J, Van Kammen M, Levey A, Martin L , Kuncl R.** Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 38: 73–84 (1995).
- [84] **Schiffner D, Autilio-Gambetti L, Chio A, Gambetti P, Giordana M, Gulotta F, Mighelli A , Vigliani M.** Ubiquitin in motor neuron disease: study at the light and electron microscope. *J Neuropath Exp Neurol*, 50: 463 (1991).
- [85] **Scott H, Tannenberg A , Dodd P.** variant forms of neuronal glutamate transporter sites in Alzheimer's disease cerebral cortex. *J Neurochem*, 64: 2193–2202 (1995).
- [86] **Shashidharan P, Wittenberg J , Plaitakis A.** Molecular cloning of human brain glutamate/aspartate transporter II. *Biochem Biophys Acta*, 1191: 393–396 (1994).
- [87] **Shatkin AJ , Manley JL.** The end of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol*, 7: 838–842 (2000).
- [88] **Shaw P , Ince P.** a quantitative autoradiographic study of (3H) kainate binding sites in the normal human spinal cord, brainstem and motor cortex. *Brain Res*, 641: 39–45 (1994).

- [89] **Shaw P , Ince P.** Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 244: 3–14 (1997).
- [90] **Shiraki H , Yase Y.** Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in Kii peninsula: comparison with the same disorders in Guam and with Alzheimer's disease. In: Vinken, P.J., G.W. Bruyn, H.L. Klawans, (eds.) *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 59 (J.M.B.V. de Jong, ed.) *Diseases of the Motor System* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 59: 273–300 (1991).
- [91] **Smith C, Patton JG , Nadal-Ginard B.** Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet*, 23: 527–577 (1989).
- [92] **Smith CW , Valcarcel J.** Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*, 25: 381–388 (2000).
- [93] **Sonnewald U, Westergaard N , Schousboe A.** Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia*, 21: 56–63 (1997).
- [94] **Staley JP , Guthrie C.** Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*, 92: 315–326 (1998).
- [95] **Stamm S, Zhang MQ, Marr T , Helfman D.** A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons. *Nucleic Acids Res*, 22: 1515–1526 (1994).
- [96] **Strachan T , Read A.** *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 10–23 (1996).
- [97] **Subramanian V, Crabtree B , Acharya K.** Human angiogenin is a neuroprotective factor and Amyotrophic Lateral Sclerosis associated angiogenin variants affect neurite extension/pathfinding and survival of motor neurons. *Hum Mol Genet*, ddm290 (2007). doi:10.1093/hmg/ddm290.

- [98] **Subramanian V , Feng Y.** A new role for angiogenin in neurite growth and pathfinding: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 16: 1445–1453 (2007). doi:10.1093/hmg/ddm095.
- [99] **Tacke R , Manley JL.** Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 358–362 (1999).
- [100] **Takai S, Kawakami H, Nakayama T, Yamada K , Nakamura S.** Localization of the gene encoding the human l-glutamate transporter (GLT-1) to 11p11.2-p13 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*, 97: 387–389 (1996).
- [101] **Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M , Wada K.** Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, 276: 1699–1702 (1997).
- [102] **Tandan R.** Clinical features and differential diagnosis of classical motor neuron disease. In: Williams AC, editor, *Motor neuron disease*, London: Chapman and Hall Medical, 1–27 (1994).
- [103] **Tysnes OB, Vollset S, Larsen J , Aarli J.** Prognostic factors and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology*, 13: 226–235 (1994).
- [104] **Usarek E, Kuzma-Kozakiewicz M, Schwalenstöcker B, Kazmierczak B, Münch C, Ludolph A , Baranczyk-Kuzma A.** Tau Isoform Expression in Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurochem Res*, 31/5: 597–602 (2006).
- [105] **Will CL , Luhrmann R.** Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 320–328 (1997).
- [106] **Zhang R, Gascon R, Miller R, Gelinas D, Mass J, Hadlock K, Jin X, Reis J, Narvaez A , McGrath M.** Evidence for systemic immune system alterations

in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *Journal of Neuroimmunology*, 159: 215–224 (2005).

- [107] **Zhang R, Gascon R, Miller R, Gelinas D, Mass J, Hadlock K, Jin X, Reis J, Narvaez A , McGrath M.** Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *Journal of Neuroimmunology*, 159: 215–224 (2005).

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | <i>Spleißen von EAAT2, C1 - C4</i> | 20 |
| 2 | <i>Spleißen von EAAT2/C1</i> | 20 |
| 3 | <i>Spleißen von EAAT2/C2</i> | 21 |
| 4 | <i>Spleißen von EAAT2/C3</i> | 21 |
| 5 | <i>Spleißen von EAAT2/C4</i> | 22 |
| 6 | <i>Spleißen von EAAT2/Int</i> | 22 |
| 7 | <i>Exon 6 Patient 1-16</i> | 45 |
| 8 | <i>Exon 8 / 9</i> | 47 |
| 9 | <i>cDNA C3, Patient 13-18</i> | 48 |
| 10 | <i>Single strand conformation Polymorphism 6-3, Patient 1-21</i> | 50 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|---|--|----|
| 1 | <i>Übersicht über die bisher publizierten fünf verschiedenen Na⁺-abhängigen hochaffinen Glutamattransportertypen</i> | 8 |
| 2 | <i>Boten-RNA des menschlichen Glutamattransporters EAAT2</i> | 10 |
| 3 | <i>Exon-Intron-Grenzen von EAAT2</i> | 19 |
| 4 | <i>Gesamtübersicht der untersuchten EAAT2-Transkripte</i> | 23 |
| 5 | <i>Übersicht der Primer zum Mutationsscreening</i> | 29 |
| 6 | <i>Übersicht der Spleißvarianten-Primer</i> | 30 |
| 7 | <i>Gelbedingungen für Single strand conformation Polymorphism</i> | 42 |
| 8 | <i>Ergebnisse über das Vorkommen der fünf untersuchten Spleißvarianten bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) und Kontrollpatienten</i> | 51 |

Danksagung

Zu guter letzt möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gebührt

- Herrn Prof. Dr. A. C. Ludolph
- Herrn Dr. Thomas Meyer
- Herrn Dr. Christoph Münch
- Frau Birgit Schwalenstöcker
- meinem Ehemann Markus