

**Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.-J. Wagner**

Abteilung Zelluläre Neurobiologie

Lehrbereich: Anatomie und Neuroanatomie

Abteilungsleiter: Professor Dr. H.-J. Wagner

**Regulation der Expression des Glutamattransporters
GLT-1 in Astrozyten durch Dopamin**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard- Karls- Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Verena Eveline Rozanski**

**aus
Augsburg**

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-J. Wagner

2. Berichterstatter:

Professor Dr. F. Lang

Meinen Eltern

„Hieraus erklärt sich auch der Grund, warum kein vernünftiger und bescheidener Philosoph je versucht hat, die letzte Ursache eines Naturvorgangs anzugeben oder die Aktion jener Kraft deutlich aufzuweisen, welche irgendeine Wirkung im Universum hervorbringt. Man gibt zu, daß das Äußerste, was menschliche Vernunft vermag, darin besteht, die Naturphänomene hervorbringenden Prinzipien zu größerer Einfachheit zu bringen und – mittels Analogieschließens, Erfahrung und Beobachtung – die vielen einzelnen Wirkungen auf einige wenige allgemeine Ursachen zurückzuführen. Wir würden aber vergeblich versuchen, die Ursachen dieser allgemeinen Ursachen zu entdecken, noch werden wir je imstande sein, uns mit irgendwelchen besonderen Erklärungen von ihnen zufriedenzugeben.“

David Hume, 1748

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Stand der Forschung	1
1.2 Glutamat und Glutamattransporter	2
1.3 Dopamin und Dopaminrezeptoren	6
1.4 Fragestellung der Arbeit	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Materialien	9
2.1.1 Allgemeine Ausrüstung	9
2.1.2 Versuchstiere	9
2.1.3 Zellkultur.....	9
2.1.4 Immunzytochemie	10
2.1.5 PCR.....	11
2.1.6 Proteinaufbereitung und Western Blot.....	11
2.2 Rezepte	13
2.2.1 Zellkultur.....	13
2.2.3 Immunzytochemie	14
2.2.4 PCR.....	14
2.2.5 Proteinaufbereitung und Western Blot.....	15
2.3 Methoden	17
2.3.1 Haltung der Versuchstiere	17
2.3.2 Gliakultur	17
2.3.3 Immunzytochemie	19
2.3.4 RNA-Isolation	20
2.3.5 Reverse Transkription	21
2.3.6 Real- time PCR	22
2.3.7 Proteinaufbereitung	27
2.3.8 Durchführung der Western Blot Experimente.....	28

2.4 Statistische Analyse	29
3. Ergebnisse	31
3.1 Charakterisierung der Gliakulturen	31
3.2 Beeinflussung der Expression von GLT- 1 durch Dopamin	32
3.2.1 Transkriptionale Veränderungen im Expressionsmuster	32
3.2.2 Translationale Veränderungen im Expressionsmuster	45
4. Diskussion	46
4.1 Untersuchung des astrozytären Expressionsmusters des Glutamatttransporters GLT- 1 unter dopaminerger Stimulation	46
4.2 Regulation der Expression von GLT- 1	48
4.3 Schlussfolgerungen	54
5. Zusammenfassung	55
6. Abbildungen und Tabellen	57
6.1 Abbildungsverzeichnis	57
6.2 Tabellenverzeichnis	58
7. Literaturverzeichnis	59
8. Danksagung	70
9. Lebenslauf	71

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:

ADHD

ALS

AMPA

APS

AQP-4

A β

ATF-1

ATP

BCA

Bp

BSA

cAMP

CREM

D₁, D₂

DA

dbcAMP

DHK

dNTP

DTT

EAAT

Bedeutung:

Attention Deficit

Hyperactivity Disorder

Amyotrophe

Lateralsklerose

Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-

Methyl-4-Isoxazol-

Propionat

Ammoniumpersulfat

Aquaporin 4

Beta-Amyloid

Activating transcription
factor 1

Adenosintriphosphat

Bicinchoninic acid

Basenpaare

Bovines Serumalbumin

Zyklisches

Adenosinmonophosphat

cAMP responsive element
modulator

Dopaminrezeptoren

Dopamin

Dibutyryl-cyclisches

Adenosinmonophosphat

Dihydrokainat

Desoxyribonukleosidtri-
phosphat

Dithiothreitol

Excitatory Amino Acid

Transporter

Abkürzung:

EGF
FGF- 2
FITC

g

GABA

GLAST

GLT- 1
HEPES

HMBS

KA
L-AP 4

MAP Kinase

MEM

mGLUR

MRP
MS
NBM
NF – κB

Bedeutung:

Epidermal growth factor
Fibroblast growth factor 2
Fluorescein-5-
Isothiocyanat
1) Gramm
2) Erdbeschleunigung,
= 9,81 m/s²
Gamma-Amino-
Buttersäure
Glutamate aspartate
transporter
Glutamate transporter 1
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-
piperazinyl)-
ethansulfonsäure
Hydroxymethylbilan-
Synthetase
Kainat
L(±)-2-Amino-4-
Phosphobuttersäure (L-
AP4)
Mitogen-activated protein
kinase
Minimum essential
medium
Metabotroper
Glutamatrezeptor
Meerrettichperoxidase
Multiple Sklerose
Neurobasalmedium
Nuclear factor κB

Abkürzung:

NMDA

PA

PACAP

PCR

PDGF

PI-3-K

PKA

PKB

RT

SCH 33290

SUL

SCL

TBOA

TNF- α

SDS

PMSF

TEMED

Bedeutung:

N-Methyl-D-Aspartat

Paraformaldehyd

Pituitary adenylate

cyclase- activating

polypeptide

Polymerase chain reaction

Platelet derived growth

factor

Phosphatidyl-Inositol-3-

Kinase

Proteinkinase A

Proteinkinase B

Raumtemperatur

Inhibitor des D₁-Rezeptors

Sulpirid, Inhibitor des D₂-

Rezeptors

Soluble carrier series

Threo- β -

Benzoyloxyaspartat

Tumor necrosis factor

alpha

Sodium dodecyl sulfate

Phenylmethylsulfonyl-

fluorid

N,N,N',N'-

Tetramethylethylen-

diamin

1. Einleitung

1.1 Stand der Forschung

Das Striatum gehört zu den Basalganglien und übernimmt eine zentrale Rolle bei der Feinabstimmung von Bewegungsabläufen (Paoletti et al, 2008), ebenso wie bei kognitiven Prozessen (Dabir et al, 2006). Für die regelrechte Entwicklung des Striatums und die korrekte Ausbildung striataler Bahnsysteme ist die zeitlich und räumlich koordinierte Interaktion von Entwicklungssignalen erforderlich (Liu und Graybiel, 1998; Jain et al, 2001; Figiel et al, 2007; Luk et al, 2003). Zu diesen zählen Neurotrophine und Wachstumsfaktoren, aber auch die klassischen Neurotransmitter Dopamin und Glutamat.

Glutamat vermittelt die Proliferation striataler Neurone (Luk et al, 2003; Gandhi et al, 2008) sowie die Ausbildung nigrostriataler dopaminergere Projektionen (Plenz, Kitai, 1998). Außerdem steuert es die neuronale Migration, Differenzierung und die Entwicklung striataler cholinergere Interneurone (Ortuno-Sahagun et al, 1997; Furuta et al, 1997; Liu et al, 1998; Gallo, Ghiani, 2000).

Dopamin fördert die Kompartimentierung des Striatum (Schmidt et al, 1996) sowie die regelrechte morphologische und funktionelle Differenzierung GABAerger Neurone (Schmidt et al, 1998; Brito et al, 2004); Weiterhin wird es für die regelrechte Ausbildung des striatalen Neuropeptidsystems (Nedergaard et al, 2002) benötigt. Experimente, in denen die dopaminergere Afferenzen aus dem Striatum inhibiert wurden, verzeichneten gravierende striatale Funktionsstörungen (van der Kooy D, 1996).

Unter den striatalen Entwicklungssignalen nimmt Dopamin eine koordinierende Funktion ein, indem es die Expression des Wachstumsfaktors BDNF (Brain derived neurotrophic factor) (Küppers, Beyer, 2001) und der Glutamat-Decarboxylase 65 und 67 reguliert (Küppers et al, 2000). Zudem fördern präsynaptische Dopamin D₂- Rezeptoren die Freisetzung von Glutamat (Bamford et al, 2004).

Neben einem ausgewogenen Transmittergleichgewicht hängt die erfolgreiche Differenzierung zentralnervöser Schaltkreise auch von Interaktionen zwischen Astroglia und Neuronen ab (Hatten, Mason, 1986; Voutsinos-Porche et al,

2003; Ortuno-Sahagun et al, 1997). Entgegen der früher vertretenen Position, Astrozyten seien rein passive Zellen, werden ihnen gegenwärtig vermehrt aktive Aufgaben zugeschrieben wie die Kontrolle der Mikrozirkulation und Beteiligung an der Synapsenbildung (Gates et al, 2001; Dabir et al, 2006; Bezzi et al, 2001; Takano et al, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass aktivierte Astrozyten Ca^{++} -abhängig Glutamat freisetzen können (Nedergaard et al, 2002).

Klinisch wird ein Ungleichgewicht des dopaminergen und glutamatergen Systems in Verbindung gebracht mit kinetischen Störungen wie M. Parkinson und dem Tourette- Syndrom (Paoletti et al, 2008; Bonsi et al, 2007; Missale et al, 2006), Aufmerksamkeitsstörungen, z.B. ADHD und der Schizophrenie (Carlsson, 2001).

1.2 Glutamat und Glutamattransporter

Zusätzlich zu seiner Funktion als morphogenetisches Entwicklungssignal gilt Glutamat als der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter im adulten ZNS von Säugetieren (Danbolt, 2001; Duan et al, 1999; Fonnum, 1984; Reye, 2002; Kosugi et al, 2006).

Infolge der ausgeprägten Neurotoxizität von Glutamat und wegen eines verbesserten Signal- Rausch- Verhältnis soll seine extrazelluläre Konzentration möglichst niedrig gehalten werden (McDonald et al, 1998; Urushitani et al, 2001; Danbolt, 2001). Die extrazelluläre Glutamatkonzentration wird reguliert durch die intrazelluläre Aufnahme von Glutamat über Glutamattransporter sowie Freisetzung von Glutamat aus Axonterminalen (Conti et al, 1999; Chen et al., 2002; Danbolt, 2001).

Unter den membranständigen Glutamattransportern wurden bislang fünf Subtypen identifiziert, die sich hinsichtlich ihrer morphologischen und pharmakologischen Eigenschaften charakterisieren lassen (s. Tabelle1; Kanai und Hediger, 1992; Fairman et al, 1995; Pines et al, 1997). Glutamattransporter zählen zur Familie der EAAT (Excitatory Acid Amino Transporter) und unterscheiden sich untereinander in ihrem regional und zellulär spezifischen Expressionsmuster sowie ihren pharmakologischen Eigenschaften.

EAATs sind hochaffine, Na^+ -abhängige Transporter, die aus Homo-Oligomeren bestehen und untereinander zu 50-60 % sequenzhomolog sind (Storck et al, 1997; Danbolt, 2001). Es handelt sich bei ihnen um aktive Transporter, die Glutamat unter Energieverbrauch intrazellulär aufnehmen. Die Energie für den Transport entstammt dem transmembranären Ionengradient (Hediger, 1999; Danbolt, 2001). Die Glutamataufnahme stellt einen elektrogenen Prozess dar, bei dem pro Molekül Glutamat drei Na^+ -Moleküle in das Zellinnere gebracht werden, ein Proton und ein K^+ -Ion hingegen in den Extrazellulärraum (s. Abbildung 1). Dieser Transportmechanismus führt zu einer Zunahme positiver Ladung im Zellinneren und dadurch zu einer Abnahme des negativen Membranpotentials (Danbolt, 2001).

Neben dem Glutamattransport fungieren EAATs als Cl^- -Kanäle (Shigeri et al, 2004) und Wasserporen (Macaulay et al, 2002).

GLT-1 ist der wichtigste Transporter im Telencephalon und Striatum, wo er über 90 % des Glutamattransportes übernimmt (Rothstein et al, 1996; Tanaka et al; 1997; Danolt, 2001). Die GLT-1 Expression nimmt kontinuierlich bis zum 26. postnatalen Tag zu, während GLAST vor allem pränatal exprimiert wird (Furuta et al, 1997).

Abbildung 1: Schematisches Modell der Glutamattransporter GLT - 1 und GLAST

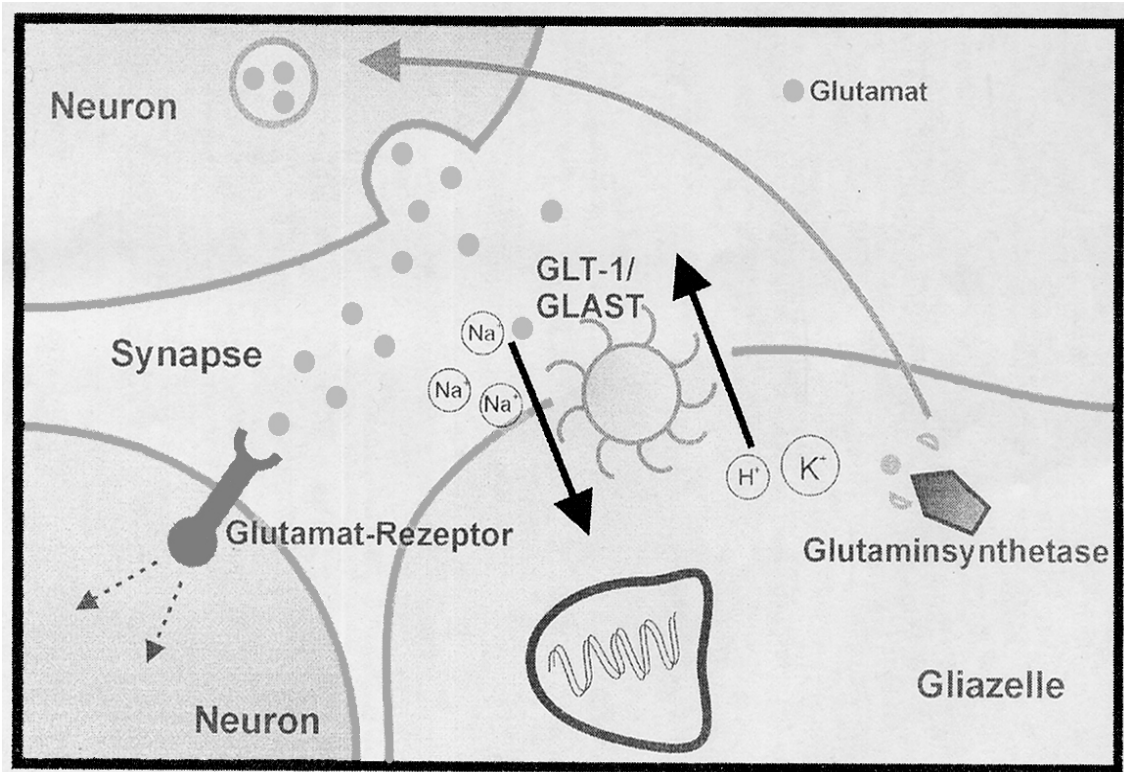


Abbildung 1: Extrazelluläres Glutamat wird durch die astroglialen Glutamattransporter GLT-1 und GLAST intrazellulär aufgenommen. Gleichzeitig werden drei Na⁺- Ionen in das Zellinnere, ein H⁺- und K⁺- Ion aus der Zelle befördert (s. Text). Abbildung aus Maucher, 2003, S.11

Tabelle 1: Übersicht über die Familie der Na⁺ - abhängigen-Glutamattransporter

Einteilung nach EAAT ¹	Benennung des Transporters	Inhibitoren	Regionale Lokalisation	Zelluläres Vorkommen
EAAT 1	GLAST	TBOA ²	Cerebellum	Astrozyt
EAAT 2	GLT- 1	Kainat-Derivate, z.B. DHK ³	Telenencephalon, Basalganglien, Hippocampus, Striatum	Astrozyt, Neuron
EAAT 3	EAAC 1		Cerebellum	Neuron, Astrozyt
EAAT 4			Purkinjezellen (spines)	Neuron

¹ EAAT: Excitatory Acid Amino Transporter

² Threo-β-Benzoylaspartat

³ Dihydrokainat

1.3 Dopamin und Dopaminrezeptoren

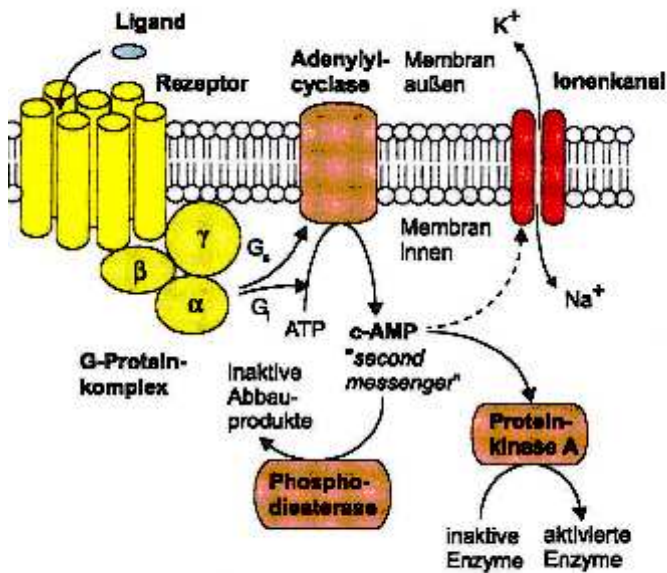
Als bedeutender Neurotransmitter ist Dopamin im limbischen System beteiligt an der Regulation des Belohnungssystems, des Suchtverhaltens und in den Basalganglien an der Koordination von Bewegungen (Matute et al, 1998).

Dopamin wirkt üblicherweise durch Aktivierung membranständiger, G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Diese leiten ihr Signal durch Aktivierung bzw. Inhibition der Adenylatcyclase fort. Der dabei entstandene Anstieg (Abfall) des cAMP-Spiegels führt zu einer Aktivierung (Inhibition) der Proteinkinase A. Diese Wirkungen werden durch Bindung an G-Proteine. Die Untereinheit $G_s(\alpha)$ übt einen stimulierenden Effekt auf die Adenylatcyclase aus, die Untereinheit $G_i(\alpha)$ einen inhibierenden (Matute et al, 2006; s. Abbildung 2).

Neben diesem klassischen Transduktionsweg können Dopaminrezeptoren ihr Signal durch Aktivierung weiterer G-Protein-Untereinheiten auch über andere Kaskaden weiterleiten (Jin et al, 2001; Sidhu, 1998; Wang et al, 1995), so etwa über die Phospholipase C nach Aktivierung von $G_q(\alpha)$ (Wang et al, 1995).

Dopaminrezeptoren werden in zwei große Untergruppen eingeteilt, die D_1 - sowie die D_2 - Familie. D_1 - Rezeptoren wirken stimulierend auf die Adenylatcyclase, D_2 -Rezeptoren inhibierend. Der Dopamin D_5 - Rezeptor zählt zur D_1 - Familie, weist jedoch im Vergleich zum D_1 - Rezeptor eine deutlich höhere Affinität zu Dopamin auf. Im Gegensatz zu D_1 bindet D_5 an die Untereinheit $G_z(\alpha)$ der G-Proteine (Sidhu, 1998). Durch die erleichterte Freisetzung von Acetylcholin steht der D_5 -Rezeptor außerdem in Zusammenhang mit dem cholinergen Stoffwechsel (Berlanga et al, 2005).

Abbildung 2: Schematisches Modell eines G- Protein-gekoppelten Dopaminrezeptors



Dopaminrezeptoren leiten ihr Signal klassischerweise über G-Proteine an die Adenylatcyclase und die Proteinkinase A weiter. (Abbildung aus Gerber, S. 8)

1.4 Fragestellung der Arbeit

Die regelrechte morphologische Entwicklung und funktionelle Differenzierung des Striatum beruht auf der zeitlich und räumlich koordinierten Interaktion zahlreicher Entwicklungssignale, zu denen auch die Neurotransmitter Dopamin und Glutamat zählen. Unter den Entwicklungssignalen nimmt Dopamin eine koordinierende Funktion ein.

Astrozytäre Kulturen aus dem Striatum neugeborener Mäuse exprimieren Dopamin- Rezeptoren der D₁- Familie und stellen somit Zielzellen für Dopamin dar. Die Funktion dieser Dopamin- Rezeptoren ist bisher nur unzureichend untersucht; insbesondere ist nicht bekannt, welche Parameter striataler Astrozyten über den in unserer Arbeitsgruppe entdeckten hochsensitiven Dopamin D₅- Rezeptor reguliert werden. Weiterhin können aktivierte Astrozyten Ca⁺⁺- abhängig Glutamat freisetzen und so zu dessen Verfügbarkeit beitragen. Dies gab Anlass zu der Hypothese, dass Dopamin in seiner Funktion als koordinierendes Entwicklungssignal die Verfügbarkeit von Glutamat über astrozytäre D₅- Rezeptoren kontrollieren könnte. Ein entscheidendes Element in der Regulation des Glutamatstoffwechsels stellt dabei der Glutamattransporter GLT- 1 dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob und inwiefern Dopamin das astrozytäre Expressionsmuster des Glutamattransporters GLT- 1 beeinflusst und über welche Rezeptoren dies gegebenenfalls vermittelt wird.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Allgemeine Ausrüstung

Material

Aqua dest.
Kühlzentrifuge Biofuge fresco
Photometer DU 62
Pipettenspitzen Dual Filter T.I.P.S.
Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes
Thermomixer 5436
Tischzentrifuge Biofuge pico
Vortexer Vortexgenie 2

Hersteller

Fluka, St. Louis, USA
Heraeus, Hanau
Beckmann, Basel (CH)
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Heraeus, Hanau
Heraeus, Hanau
Scientific Industries,
Philadelphia, USA

2.1.2 Versuchstiere

Tierart

Balb/ c –Mäuse

Bezugsquelle

Tierstall des
Tierforschungszentrums Ulm,
Harlan Winkelmann GmbH,
Borchen

2.1.3 Zellkultur

Material

APS⁴
B 27
Brutschränke

Dopamin
Fetales Kälberserum

Hersteller

Sigma-Aldrich, München
Gibco, Gaithersburg, USA
Heraeus, CO₂ Inkubator BBD
6220
Sigma-Aldrich, München
Gibco, Gaithersburg, USA

⁴ APS: Ammoniumperoxodisulfat, (NH₄)₂S₂O₈

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Fungizon	Gibco, Gaithersburg, USA
Glutathion	Sigma-Aldrich, München
Hank`s Medium	Gibco, Gaithersburg, USA
HEPES ⁵	Serva, Warwickshire, UK
Kulturschalen	Greiner, Frickenhausen
MEM ⁶	Gibco, Gaithersburg, USA
Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen
Multiwell-Platten Costar	Sigma-Aldrich, München
NBM ⁷	Gibco, Gaithersburg, USA
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Gaithersburg, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Poly-DL-Ornithin	Sigma-Aldrich, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
SCH 33290 ⁸	Tocris, Bristol, UK
Sulpirid ⁹	Tocris, Bristol, UK
Trypsin	Gibco, Gaithersburg, USA
Zellinkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau

2.1.4 Immunzytochemie

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Mikroskop: Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss, Göttingen
FITC ¹⁰	DAKO, Glostrup, DK
HRP	Horse Radisch Peroxidase
Moviol 488	Carl Roth, Karlsruhe
Parafomaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Primärantikörper (rabbit, anti-cow GFAP ¹¹)	DAKO, Glostrup, DK

⁵ HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

⁶ MEM: Minimal Essential Medium

⁷ NBM: Neurobasalmedium

⁸ D₁-Antagonist, C₁₇H₁₈ClNO

⁹ D₂-Antagonist, C₁₅H₂₃N₃O₄S

¹⁰ FITC: Fluorescein Isothiocyanat

¹¹ GFAP: Glial fibrillary acidic protein

Material

Saponin
 Sekundärantikörper: Alexa Fluor 488 dye

Hersteller

Sigma-Aldrich, München
 Molecular probes, Leiden, NL

2.1.5 PCR

Material

GLT 1- Primer
 Hexanukleotide (10x)
 HMBS-Primer
 Kapillaren (20 µl)
 LightCycler® 2.0 Sample Carousel
 M-MLV Reverse Transkriptase
 PCR Oligonukleotidprimer (dNTP)
 Peq-Gold
 Quanti Tect™ SYBR® Green PCR kit
 Taq DNA Polymerase
 Standardpuffer

Hersteller

Thermo Electron, Hampshire, UK
 Boehringer, Mannheim
 Qiagen, Basel (CH)
 Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
 Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
 Invitrogen, Carlsbad, USA
 Interactiva, Ulm
 PeqLab, Erlangen
 Qiagen, Basel (CH)
 Invitrogen, Carlsbad, USA
 Qiagen, Basel (CH)

2.1.6 Proteinaufbereitung und Western Blot

Material

Acrylamid ¹²
 BCA™ Protein Assay ¹³
 B-Mercaptoethanol
 Bromphenolblau
 BSA ¹⁴

Hersteller

Carl Roth, Karlsruhe
 Pierce, Rockford, USA
 Fluka, St Louis, USA
 Sigma-Aldrich, München
 Pierce, Rockford, USA

¹² C₃H₅NO

¹³ BCA: bicinchoninic acid

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Chemilumineszenz-Set	Amersham, Buckinghamshire, UK
ECL Western Blotting detection reagens	Amersham, Buckinghamshire, UK
GLT-1- Ak (Meerschweinchen)	Chemicon, Hampshire, UK
Glycin ¹⁵	Sigma-Aldrich, München
HEPES ¹⁶	Serva, Warwickshire, UK
Homogenisator Sonifier 250	Branson, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MRP- konjugierter Sekundär-Ak	Jackson Immunoresearch
Photometer DU 62	Beckmann, Basel (CH)
Ponceau S ¹⁷	Sigma-Aldrich, München
Power Pack 200/300	BioRad, München
Proteinmarker: Chemiluminescent Blue Ranger	Pierce, Rockford, USA
SDS ¹⁸	Sigma-Aldrich, München
TEMED ¹⁹	Carl Roth, Karlsruhe
Geltransferblotter Transblot SD	BioRad, München
TRIS ²⁰	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
TWEEN 20 ²¹	Carl Roth, Karlsruhe
Urea	Carl Roth, Karlsruhe
Nitrozellulosemembran	Carl Roth, Karlsruhe

¹⁴ Bovines Serumalbumin

¹⁵ C₂H₅NO₂

¹⁶ 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, C₈H₁₈N₂O₄S

¹⁷ 3-Hydroxy-4-((2-sulfo-4-((4-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)- 2,7-naphthalindisulfonsäure, C₂₂H₁₆N₄Na₄O₁₃S₄

¹⁸ Natriumdodecylsulfat, C₁₂H₂₅NaO₄S

¹⁹ Tetramethylethylendiamin, C₆H₁₆N₂

²⁰ Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, C₄H₁₁NO₃

²¹ Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat, C₅₈H₁₁₄O₂₆

2.2 Rezepte

2.2.1 Zellkultur

MEM²²:

Für 1 Liter:

MEM mit Earl`s Salzen

2,20 g NaHCO₃

5,00 g D - Glucose

0,29 g L-Glutamin

550 ml Penicillin / Streptomycin

100 ml Fungizon

pH 7,2-7,4

NBM²³:

Für 100 ml:

550 µl Penicillin / Streptomycin

100 µl Fungizon

200 µl B27

100 ml NBM

pH 7,2

Präparationspuffer:

145 ml NaCl

4 mM KCl

15 mM HEPES

pH 7,2

²² MEM: Minimal Essential Medium

²³ NBM: Neurobasalmedium

Dispersionslösung:

MEM- Earl's Kulturmedium mit 10 % FCS ²⁴
30 mM Glucose
15 mM HEPES
pH 7,2

2.2.3 Immunzytochemie

Ziegenserum:

0,3 % Triton X-100
0,3 M NaCl
100 ml PBS

2.2.4 PCR

2x QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix:
HotStar Taq DNA Polymerase
Quanti Tect SYBR® Green PCR buffer
(Tris HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄)
5 mM MgCl₂
pH 8,7
dNTP ²⁵ Mix

²⁴ FCS: Fetal Calf Serum

²⁵ dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate

2.2.5 Proteinaufbereitung und Western Blot

Lysepuffer:

62,5 mM Tris-HCl
2 % SDS ²⁶
10 % Saccharose
0,5 mM PMSF ²⁷
10 µg/µl Aprotinin

Trenngel (12,5 %)

Für 2 Gele:
40 % Acrylamid (3,13 ml)
1,5 mM Tris-HCl(2, 5 ml)
H₂O (4,27 ml)
10 % SDS (0,1 ml)
4 M Urea (2,4 g)
10 % APS (30 µl)
TEMED ²⁸ (15 µl)
pH 6,8

Sammelgel (5 %):

Für 2 Gele:
40 % Acrylamid (1,25 ml)
0,5 mM Tris-HCl (2,5 ml)
H₂O (6,15 ml)
10 % SDS (0,1 ml)
2 M Urea (1, 2 g)
10 % APS (30 µl)
TEMED (15 µl)
PH 6,8

²⁶ SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

²⁷ PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid, C₇H₇FO₂S

²⁸ TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, C₆H₁₆N₂

Ladepuffer:

Für 10 ml:

250 mM Tris (0,03 g)

4 % SDS (0,4 g)

10 % Glycerin (1 ml)

0,006 % Bromphenolblau (0,6 mg)

2 % Mercaptoethanol (0,2 g)

pH 6,8

Transferpuffer:

Für 1 Liter:

5 mM Tris HCl (30 g)

50 mM Glycin (155 g)

0,1% SDS (10 g)

pH 8,3

Ponceau S-Färbung:

0,02 % Ponceau S

0,3 % Trichloracetat

0,3 % Sulfosalicylat

TBS:

Für 1 Liter:

8,76 g NaCl

6,00 g TRIS

pH 7,6

1x TBS :

150 mM NaCl

50 mM TRIS

pH 7,6

Waschpuffer:

1x TBS
0,05 % TWEEN 20

Blockpuffer:

1x TBS
5 % Milchpulver
0,05 % TWEEN 20

Inkubationspuffer:

1x TBS
0,05 % TWEEN
0,5 % Milchpulver

2.3 Methoden

2.3.1 Haltung der Versuchstiere

Alle Experimente wurden mit Balb/c Mäusen durchgeführt. Diese wurden vom Tierforschungszentrum Ulm und der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden in einem 12- stündigen Tag - Nacht-Zyklus gehalten und mit einer Standarddiät aus Pellets und Wasser nach Belieben ernährt. Verpaarungen fanden während eines 12- stündigen Intervalls statt, wobei als Tag 0 der Tragezeit der Tag nach der Kopulation angesetzt wurde. Für die Zellkulturen wurde mesencephales bzw. striatales Gewebe neugeborener Mäuse am ersten postnatalen Tag präpariert.

2.3.2 Gliakultur

Astrogliale Kulturen wurden aus dem Striatum und Mesencephalon neugeborener Balb/c Mäuse angefertigt, die am ersten postnatalen Tag dekapitiert wurden.

Nach steriler Eröffnung des Schädels in mediansagittalem Schnitt wurde das Gehirn entnommen und die Meningen entfernt, um Striatum und Mesencephalon zu präparieren gemäß Schmidt et al, 1996. Die striatale Anlage wurde nach dorsal und lateral durch das Corpus callosum abgegrenzt, nach ventral durch die vordere Kommissur und nach medial durch den Seitenventrikel. Das Mesencephalon wurde nach rostral vom Diencephalon und nach basal vom Rhombencephalon getrennt. Unmittelbar nach der Präparation wurde das entnommene Gewebe in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Nach mechanischer Zerkleinerung mittels Pipette wurden die Gewebestücke für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Ca^{++} - und Mg^{++} -freiem PBS inkubiert, das 1 % Trypsin und 0,02 % EDTA enthielt, um die Zellen enzymatisch aus dem Gewebeverband zu lösen. Die lytische Wirkung von Trypsin wurde dadurch beendet, dass die Gewebestücke in MEM transferiert wurden, das mit 20 % FCS angereichert worden war. Die Suspension wurde über einem Nylonnetz mit 50 μm Maschengröße gefiltert und anschließend für 5 Minuten bei 1400 rpm²⁹ zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml MEM mit 20 % FCS aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer (Tiefe 0,100 mm, Fläche 0,0025 mm²) gezählt. Dazu wurden 20 μl dieser Suspension im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Zellzahl pro 4 ml Lösung entsprach der Anzahl der in der Neubauer-Kammer gezählten Zellen multipliziert mit dem Faktor 100 000. Defekte Zellen ließen sich mit einer tryptanblauhaltigen Zählösung anfärben.

Die Zellen wurden in 9,6 cm² großen Kulturschalen ausgesät, die über Nacht mit einer Poly-DL-Ornithinlösung der Konzentration 0,1 mg/ml beschichtet und anschließend zweifach mit sterilem Wasser ausgespült und getrocknet worden waren. Die Zellschalen wurden unter standardisierten Bedingungen inkubiert (CO₂ Inkubator BBD 6220 Heraeus, 37 °C, Luft mit 5 % CO₂- Anteil, 95 % Luftfeuchtigkeit).

Im Stadium der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin gesplittet (0,1 % Trypsin) und in geringerer Dichte wieder ausgesät. Konfluente Zellen wurden

²⁹ rpm: rotations per minute

bei Raumtemperatur kurz mit 0,1 % Trypsin inkubiert (2 ml/ 9,6 cm²), so dass sie ihre Adhärenz zum Boden der Schale verloren. Die Trypsinwirkung wurde durch das Hinzufügen von 8 ml MEM mit 10 % FCS aufgehoben und die Zellsuspension wurde für 5 Min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wiederum in MEM aufgenommen und die ursprünglich aus einer 9,6 cm² Schale stammenden Zellen auf insgesamt drei verteilt, d.h. die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 gesplittet.

Bei der zweiten Aussaat wurden die Zellen in 3,5 cm² große Schalen verteilt. Sobald die Gliazellen der zweiten Passage das Stadium der Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in serumfreies NBM überführt, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel stattfand.

Die Zellen wurden täglich mit folgenden Hormonen in der Verdünnung 1:100 behandelt: DA³⁰ [10⁻⁴ M], DA [10⁻⁵ M], DA [10⁻⁵ M] + SUL³¹ [10⁻⁶ M], DA [10⁻⁵ M] + SCH³² [10⁻⁶ M]. Diese Konzentrationen liegen unterhalb der zytotoxischen Grenze von Dopamin [10⁻³ M]. Um Dopamin vor Oxidation zu schützen, fügten wir Glutathion in einer Konzentration von 10⁻⁵ M hinzu.

Nach der 7- tägigen Behandlungsphase wurden die Zellkulturen hinsichtlich ihrer Eignung für weitere Experimente mikroskopisch analysiert. Dabei befanden sich ca. 70 % der Astrozyten im Stadium der Konfluenz.

2.3.3 Immunzytochemie

Mit immunzytochemischen Methoden erfolgte der Nachweis, dass sich die verwendeten Kulturen spezifisch aus Astrozyten zusammensetzten.

Dazu wurden die Zellen mit dem gegen Astrozyten gerichteten Markerprotein GFAP (Glial fibrillary acidic protein) gefärbt und nach zweimaligem Waschen mit 10 mM PBS für 30 Min mit 4 % Paraformaldehyd (PA) in 100 mM PBS (pH 7,3) fixiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit 10 mM PBS für 30 Minuten wurden die Zellen mit 0,05 % Saponin in 10 mM PBS permeabilisiert.

³⁰ DA: Dopamin

³¹ SUL: Sulpirid, Antagonist am D₂-Rezeptor

³² SCH: SCH 33290, Antagonist am D₁-Rezeptor

Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 30 Minuten in einem 16 % igen Ziegenserum bei Raumtemperatur inkubiert.

Über Nacht wurden die Zellen bei 4° C mit dem primären Antikörper (Rabbit, Anti –GFAP, DAKO, Dänemark, Bestell Nr.: Z0334) in der Verdünnung 1:200 inkubiert. GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ist das in reifen Astrozyten vorherrschende Intermediärfilament und gilt als konventioneller Marker für Astrozyten. Der hier verwendete Antikörper weist laut Angaben des Herstellers eine 90- 95 % Sequenzhomologie zu anderen Spezies auf und kann deshalb auch an Zellen eingesetzt werden, die aus der Spezies *Mus musculus* (Maus) gewonnen wurden.

In einem nächsten Schritt wurden die Kulturen zweimal mit 10 mM PBS gewaschen und für 2 Stunden mit dem Sekundärantikörper (HRP³³, Goat, Antirabbit, IgG gekoppelt an Alexa Fluor 488- dye, Molecular Probes, Invitrogen, USA, Katalog Nr.: T-20922) in der Verdünnung 1:200 inkubiert. Dieser Fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper kann mit einem FITC (Fluorescein Isothiocyanat) - Filter visualisiert werden.

Alle immunzytochemisch gefärbten Kulturen wurden getrocknet, und die Plättchen für die mikroskopische Auswertung auf Objektträgern in Moviol© fixiert. Die photographische Dokumentation fluoreszierender Proben wurde mittels konfokaler Lasermikroskopie an einem Axioplan 2 Imaging Pol – Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Die Anregung des fluoreszierenden Farbstoffes erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm. Bei der Negativkontrolle, die nicht mit einem Primärantikörper behandelt worden war, ließen sich keine Antikörperbindungen nachweisen.

2.3.4 RNA-Isolation

Zur Untersuchung des transkriptionalen Expressionsmusters von GLT- 1 wurde aus den behandelten Zellen zunächst die Gesamtmenge an mRNA isoliert und durch eine Reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA transformiert. Die spezifisch für GLT- 1 kodierende cDNA wurde anschließend mittels real - time

³³ HRP: Horse Radish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)

PCR unter Verwendung GLT- 1 spezifischer Primer amplifiziert. Um die Ergebnisse mehrerer Zellkulturen mit unterschiedlicher Stoffwechselaktivität miteinander vergleichen zu können, wurden die gemessenen Absolutwerte in Relation zu einem internen Standard, dem sog. house-keeping gene (hier HMBS: Hydroxymethylbilan-Synthetase), gesetzt und dadurch standardisiert.

Die Gesamtmenge an RNA wurde aus den Gliakulturen mit Hilfe des Peq Gold-Kits gemäß den Angaben des Herstellers (PeqLab, Erlangen) isoliert. Dazu wurden die Zellen, die in den 3,5 cm² großen Petrischalen kultiviert worden waren, mit 1 ml der PEQGold RNA Pure© –Lösung lysiert und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Zu jeder Probe wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt und nach dem Vortexen für 15 Minuten bei 15 000 g³⁴ und 4° C zentrifugiert. Die dabei entstandene wässrige Phase wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit Isopropanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert und für 15 Minuten bei 15 000 g und 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Ethanol (eiskalt, 70 %) gewaschen, um ausgefallene Salze zu entfernen und erneut für 10 Minuten bei 15 000 g und 4° C zentrifugiert. Die RNA wurde für 5 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 12 µl sterilem Wasser aufgenommen.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde durch Absorptionsmessungen mit dem Spektralphotometer (Beckmann, DU 62) bei 260 nm ermittelt. Eine optische Dichte von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Die extrahierte mRNA, die die Gesamt-RNA enthielt, wurde bei –70° C aufbewahrt.

2.3.5 Reverse Transkription

Aus den ermittelten Konzentrationen wurde dasjenige Probenvolumen berechnet, das genau 2 µg mRNA enthielt, und für die Reverse Transkription in die komplementäre cDNA eingesetzt. Dabei wurde das Pipettierschema gemäß Tabelle 2 verwendet. Um die Reaktion nicht vorzeitig und unkontrolliert zu starten, wurde das Enzym M-MLV (Reverse Transkriptase) zuletzt hinzugefügt.

³⁴ g hier im Sinne der Erdbeschleunigung

Tabelle 2: Pipettierschema für die Reverse Transkription

Substanz	Menge [μ l]
Standardpuffer	10
DTT ³⁵ 0,1 MM	5
Hexanukleotide 2 μ g/ μ l	2
dNTP ³⁶ (Oligonukleotid-Primer)	4
M-MLV (Reverse Transkriptase)	2

Bei den hier eingesetzten Primern handelte es sich um unspezifische Oligonukleotid-Primer, so dass die Gesamtmenge der aus den Zellen isolierten mRNA vollständig in cDNA überführt wurde. Eine Selektion hinsichtlich des Targetgens GLT- 1 fand zu diesem Zeitpunkt noch nicht statt.

Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 37° C angesetzt. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurden die Proben für 5 Minuten bei 97° C denaturiert. Die transkribierte cDNA konnte bis zu ihrer weiteren Verwendung bei –20°C gelagert werden.

2.3.6 Real- time PCR

Unter Verwendung GLT- 1 spezifischer Primer (s. Tabelle 4) konnte mittels Real- time PCR eine selektive Amplifikation derjenigen cDNA- Stränge erfolgen, die ausschließlich für das GLT-1 Protein kodieren.

Hierfür wurde das Pipettierschema gemäß Tabelle 3 umgesetzt.

³⁵ DTT: Dithiothreitol

³⁶ dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

Tabelle 3: Pipettierschema für PCR- Kapillaren

Verwendete Substanzen	GLT - 1	HMBS
Mastermix (Quanti Tect SYBR® Green PCR kit)	10 µl	10 µl
H ₂ O (RNAse-frei)	7,5 µl	6 µl
Primer	0,5 µl	2 µl

Das Quanti tect SYBR® Green PCR kit setzt sich aus einer hitzestabilen DNA Polymerase (HotStar Taq DNA Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, geklont in *E.coli* EC 2.7.7.7), einem Puffergemisch (mit Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8,7) und einem dNTP-Mix zusammen (mit dATP, dCTP, dGTP und dTTP/dUTP), der Substanz SYBR Green I, dem Farbstoff Rox und 5 mM MgCl₂ zusammen.

GLT- 1 wurde dabei als *gene of interest* untersucht und in Relation zu dem *house-keeping gene* HMBS (Hydroxymethylbilan-Synthetase) gesetzt, das von der Zelle konstitutiv exprimiert wird. Die Expressionshöhe eines internen Standardgens korreliert nur mit der Stoffwechselaktivität der einzelnen Zelle, nicht jedoch mit externen Einflüssen.

Die für die Amplifikation eingesetzten Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer	Genbank Nr.	Produktlänge	Annealing-Temperatur	Sequenz
GLT-1	AB_007810.1	92 bp ³⁷	58°c	Sense: 5`-GAG CCA AAG CAC CGA AAC- 3` Antisense: 5`-CCC AGG ATG ACA CCA AAC-3`
HMBS	NM_000125.2	207bp	61°C	Sense: 5`- CGA CAC TGT GGT AGC GAT GC-3` Antisense: 5`- CCT TGG TAA ACA GGC TCT TCT TC-3`

Entsprechend der Daten der Genbank ³⁸ erkennt der GLT- 1 Primer alle Spleißvarianten des Transporters .

Jeweils 18 µl des Mastermixes (SYBR® Green PCR kit, Qiagen) wurden in Glaskapillaren pipettiert und zu jeder Probe 2 µl der entsprechenden cDNA hinzugefügt. Die Proben wurden in den LightCycler®2.0 überführt (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), der gemäß Tabelle 5 programmiert wurde. An eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95° C schlossen sich 45 einminütige Zyklen an, während derer die Amplifikation bei 58° C sowie die Elongation bei 72° C stattfanden. Zuletzt folgte eine ca. dreiminütige Abkühlungsphase.

Anhand der Schmelzkurvenanalyse ließ sich die Spezifität der Amplifizierungsprodukte überprüfen. Die Schmelzkurven kamen durch kontinuierliche Fluoreszenzmessungen während der Segmente 1- 3 der Schmelzphase zustande. Dabei wurden die Proben zunächst für 15 s von 95°C auf 65° C abgekühlt, anschließend wieder auf 95° C erhitzt.

³⁷ bp: Basenpaare

³⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

Tabelle 5: Programmierung des LightCyclers

Programm	Zyklen	Segment- nummer	Zieltemperatur [°C]	Zeitdauer [sec]	Differenz [°C/sec]
Denaturierung	1	1	95	900	20
Amplifizierung	45	1	95	15	20
		2	58	20	20
		3	72	16	20
Schmelzkurve	1	1	95	5	20
		2	65	15	20
		3	95	0	0,1
Abkühlen	1	1	40	30	20

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green geht mit der Doppelstrang-DNA einen fluoreszierenden Komplex ein. Der Anstieg der Fluoreszenz wird als Maß für die Produktamplifizierung im Verlauf der PCR-Zyklen gewertet. Die Fluoreszenz wird als Funktion der Zyklenanzahl dargestellt (s. Abbildung 3). Aus dem Graphen lässt sich der *crossing-point* ablesen als der erste Schnittpunkt der Kurve mit einem bestimmten Schwellenwert, dem sog. *Threshold* (vgl. Abbildung 3). Je höher der Wert des *crossing-point* ausfiel, also um so mehr Zyklen nötig waren, um einen bestimmten Fluoreszenzwert zu erreichen, desto weniger DNA enthielt die eingesetzte Probe. Als Ausschlusskriterium galten ein *crossing point* > 30,00 sowie eine ausgeprägte Varianz in der Höhe der Kreuzungspunkte. Dies war bei den mesencephalen Kulturen, die mit Dopamin [10⁻⁵] behandelt worden waren, der Fall.

In den Negativkontrollen, in denen zu dem Mastermix destilliertes Wasser hinzugefügt wurde, lagen die Kreuzungspunkte im nicht- messbaren Bereich (> 41,00).

Infolge der Varianz an Reaktivität und metabolischer Aktivität unter den einzelnen Zellen, konnten die gewonnenen Daten nicht aufeinander bezogen werden. Um diese zellspezifischen Parameter herauszumitteln, wurden die

Kreuzungspunkte von GLT- 1 in Relation zu den Kreuzungspunkten des internen Standards HMBS (Hydroxymethylbilan-Synthetase) gesetzt. Dieses Gen weist ein stabiles Expressionsniveau in den untersuchten Astrozyten auf. Dieses Verfahren entsprach einer relativen Quantifizierung. Dabei wurden die Konzentrationen des Zielgens und des internen Standards sowie deren Effizienzwerte miteinander verglichen. Die jeweiligen Konzentrationen an mRNA ließen sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Konzentration} = 10^{((\text{crossing-point} - \text{intercept})/\text{slope})}$$

Intercept: logarithmische Konzentration der eingesetzten cDNA Menge in der Verdünnungsprobe 1:1

Slope: Steigung der Eichgeraden

Abbildung 3: Diagramm zur Ermittlung der crossing-points

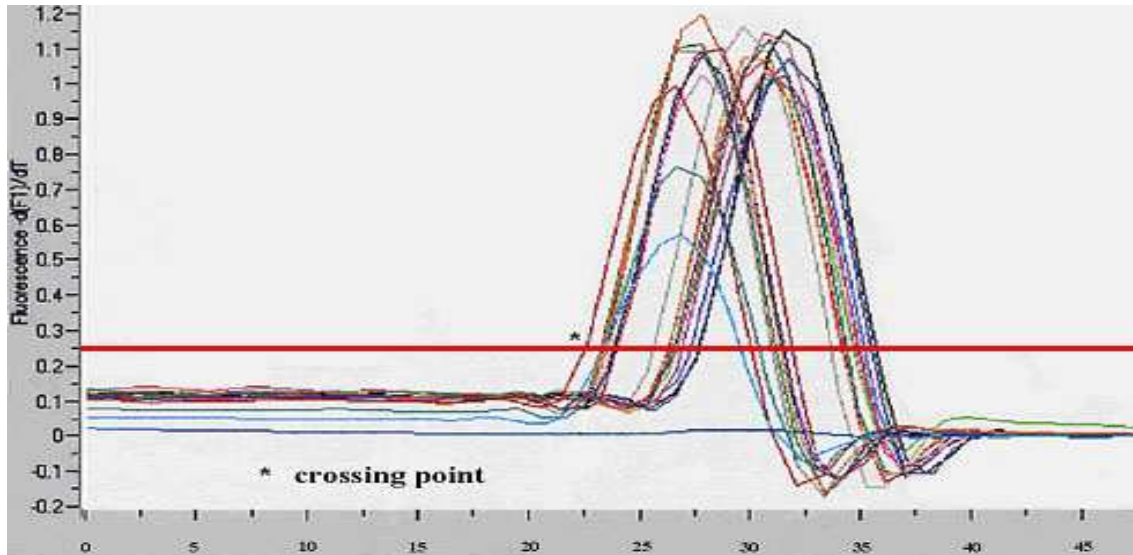


Abbildung 3 zeigt, wie aus den Fluoreszenzgraphen der jeweilige crossing point einer Probe graphisch bestimmt werden kann: Der crossing point entspricht dem ersten Schnittpunkt des Fluoreszenzgraphen mit einem eingeführten threshold.

2.3.7 Proteinaufbereitung

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS (10 mM, pH 7,5) gewaschen und in 100 µl Lysepuffer pro Schale aufgenommen. Um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen, wurde das Lysat kurz mit Ultraschall (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA) behandelt. Nach 5 minütiger Denaturierung bei 95° C konnten die Proteinlösungen bei -70° C aufbewahrt werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Katalognummer 23227) Dazu wurden aus jeder Proteinprobe 6 µl Proteinlösung abpipettiert und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben.

Für die Erstellung der Eichreihe wurde Bovines Serumalbumin (BSA) der Konzentration 2 mg/ml mit SDS- Lysepuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden 9 Eichproben mit einem Gesamtvolumen von je 50 µl in linear aufsteigender Albuminmenge von 0 µg bis 20 µg erstellt. Die zu messenden Proteinproben wurden mit 54 µl SDS-Probenpuffer auf ein Gesamtvolumen von 60 µl aufgefüllt, wovon erneut 10 µl abpipettiert und mit 40 µl SDS-Probenpuffer ergänzt wurden. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Proben mit dem Vortexer intensiv gemischt. Insgesamt wurden zwei Verdünnungsreihen der Proteinproben in den Konzentrationen 1:10 bzw. 1:50 erstellt. Jede Probe enthielt ein Gesamtvolumen von 50 µl.

Die BCA-Lösung wurde dadurch vorbereitet, dass Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1 gemischt wurden. Von dieser Lösung wurde jeweils 1 ml in alle Proben gegeben (sowohl Eichreihen als auch verdünnte Proteinlösungen). Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 60° C wurden die Proben bei Raumtemperatur abgekühlt und ihre Absorption bei 562 nm im Photometer (Beckmann, DU 62) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde aus den gemessenen Absorptionswerten der Proteinproben in Relation zu den Werten für die Eichkurve ermittelt. Graphisch entsprach der Umrechnungsfaktor der Steigung der Eichgeraden. Abbildung 4 zeigt eine exemplarische Eichgerade.

Abbildung 4: Exemplarische Eichgerade zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration

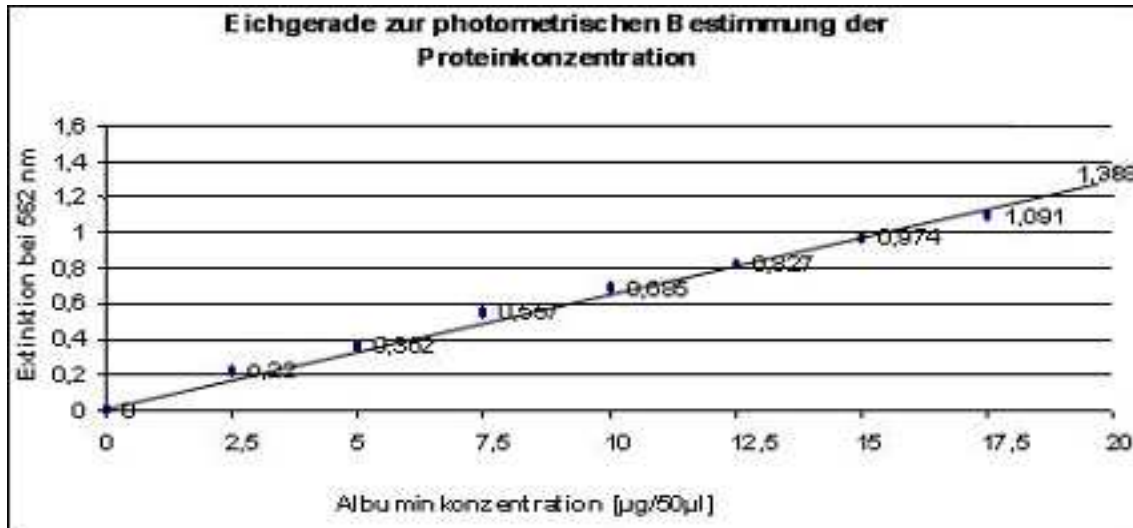


Abbildung 4 zeigt eine exemplarische Eichgerade bei der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration. Der Regressionskoeffizient beträgt 0,991.

2.3.8 Durchführung der Western Blot Experimente

Für die Elektrophorese wurden die Geltaschen (12,5 % Urea) mit derjenigen Menge an Proteinlösung beladen, die genau 20 µg Protein enthielt. Eine Tasche wurde für den Proteinmarker (Chemiluminescent Blue MW Marker Mix, Pierce, USA) reserviert. Nach einer Laufzeit von 6 h bei einer konstanten Spannung von 80 V (PowerPack 300, Bio Rad) in der mit Ladepuffer gefüllten Elektrophoresekammer befanden sich die Proteine im Sammelgel (5 % Urea). Von dort wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zunächst wurde das Sammelgel unter kontinuierlicher Benetzung durch das Transferpufferbad auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Der Proteintransfer erfolgte anschließend in einem semi-dry Blotverfahren bei einer Stromstärke von 0,1 A über einen Zeitraum von einer Stunde hinweg (PowerPack 200). Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Membran in Ponceau-S-Lösung

gegeben und dadurch die Proteinbanden visualisiert. Durch zweifaches Waschen mit destilliertem Wasser wurde der Ponceaufarbstoff wieder von der Membran entfernt.

Unspezifische Bindungsstellen wurden dadurch geblockt, dass die Membran für 30 Minuten im Blockpufferbad auf einem Rüttler inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Erstantikörper (Meerschwein, anti GLUT- 1, Chemicon 71 kDa, AB1783, Gen Nr: NM_004171.3) in der Verdünnung 1: 500 über Nacht bei 4° C inkubiert. Laut Angaben des Herstellers handelt es sich hierbei um einen GLUT- 1 spezifischen Antikörper, der, auch wenn an der Ratte entwickelt, infolge der ausgeprägten Sequenzhomologie zwischen beiden Spezies, ebenso an der Maus angewandt werden kann.

Nach drei Waschschritten (zu je 10 Minuten) mit dem Waschpuffer wurden die Membranen bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (Esel, Anti- Guinea Pig IgG, Meerrettichperoxidase, Jackson ImmunoResearch, Bestell Nr.: 706-035-148) in der Verdünnung 1:1000 inkubiert. Dieser ist an eine Meerrettich-Peroxidase (MRP) gekoppelt und ermöglicht dadurch die Visualisierung der Bindung des Erstantikörpers. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls durch drei Waschschrritte entfernt. Beide Antikörper, der primäre wie der sekundäre, wurden in 5 ml Blockpuffer verdünnt, der mit Trockenmilch in einer Konzentration von 0,2 % angereichert war.

Die Immunreaktion wurde unter Verwendung des Chemilumineszenz-Sets von Amersham (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, UK) visualisiert. Nach den Angaben des Herstellers wurden Reagens A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen inklusive Negativkontrollen wurden in je 1 ml der Lösung getränkt und dann anschließend manuell in der Dunkelkammer entwickelt. Dabei wurden Belichtungsfilme (Hyperfilm ECL, Amersham, UK) in Paustechnik auf die belichteten und fixierten Filme übertragen.

2.4 Statistische Analyse

Um die Wirkung von Dopamin auf die Expression von GLUT- 1 zu untersuchen, wurden drei unabhängige Experimente an jeder Zellkultur durchgeführt. Dabei

standen pro Aufarbeitung zwischen 4 und 10 neugeborene balb/c Mäuse zur Verfügung. Die Differenzen zwischen den behandelten Proben und Kontrollen wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Tests durch das Statistikprogramm SigmaStat 2.03 überprüft. Als Kriterium für Signifikanz galt $p \leq 0,05$. Alle in dieser Arbeit angegebenen Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardfehler. Die optischen Dichten der Amplifikationsprodukte werden als relative optische Dichten in Bezug auf die entsprechenden Werte des internen Standards HMBS präsentiert.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Gliakulturen

Alle nachfolgenden Untersuchungen wurden an mesencephalen und striatalen Gliakulturen nach der zweiten Passage durchgeführt. In unserer Arbeitsgruppe waren zuvor immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen das astrozytär spezifische Intermediärfilament GFAP (glial fibrillary acidic protein) durchgeführt worden. Diese hatten gezeigt, dass die Kulturen zu über 90 % aus Astrozyten bestanden (s. Abbildung 5).

Abbildung 5: GFAP³⁹-immunreaktive Astrozyten nach der zweiten Passage

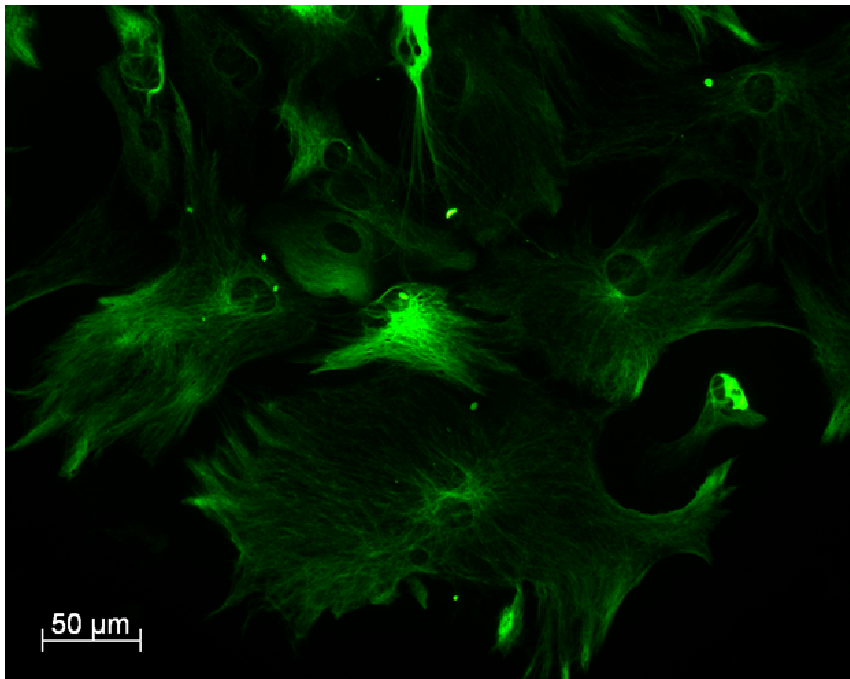


Abb. 2 zeigt eine repräsentative immunhistochemische Färbung einer Astrozytenkultur. Etwa 70 % befanden sich im Stadium der Konfluenz. Die Mehrzahl der GFAP-immunreaktiven Zellen weist große, flache und unregelmäßig begrenzte Zellkörper auf.

³⁹ GFAP: glial fibrillary acidic protein

3.2 Beeinflussung der Expression von GLT- 1 durch Dopamin

An astroglialen Kulturen aus Striatum und Mesencephalon wurde untersucht, ob Dopamin das Expressionsmuster von GLT- 1 in Astrozyten verändert. Für einen Zeitraum von 7 Tagen wurden die Zellen täglich mit Dopamin (DA) in den Konzentrationen 10^{-4} M bzw. 10^{-5} M behandelt. Um die dabei aktivierten Rezeptoren zu identifizieren, wurde ein Teil der Zellen mit einer Kombination aus Dopamin [10^{-5} M] und den Dopaminrezeptorantagonisten SCH 33290 (D₁- Antagonist) und Sulpirid (D₂- Antagonist) in der Konzentration 10^{-6} M behandelt. Als Referenzwert galt die unbehandelte Kontrollschale, deren Wert als 100 % gesetzt wurde.

Der GLT- 1 mRNA-Gehalt dieser Zellen wurde mittels PCR bestimmt, die Proteinmenge an GLT- 1 über die Western Blot Analyse. Die Diagramme geben die prozentualen Abweichungen der untersuchten Proben von den Kontrollwerten wieder, die gleich 100 % gesetzt wurden (s. Abbildungen 3, 4, 5 und 6). Die hierfür ermittelten relativen und absoluten Werte sind in den Tabellen 7, 8, 11 und 12 enthalten. Als Kriterium der statistischen Signifikanz gilt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$. Die p-Werte der untersuchten Daten sind in den Tabellen 5, 6, 9 und 10 wiedergegeben.

3.2.1 Transkriptionale Veränderungen im Expressionsmuster

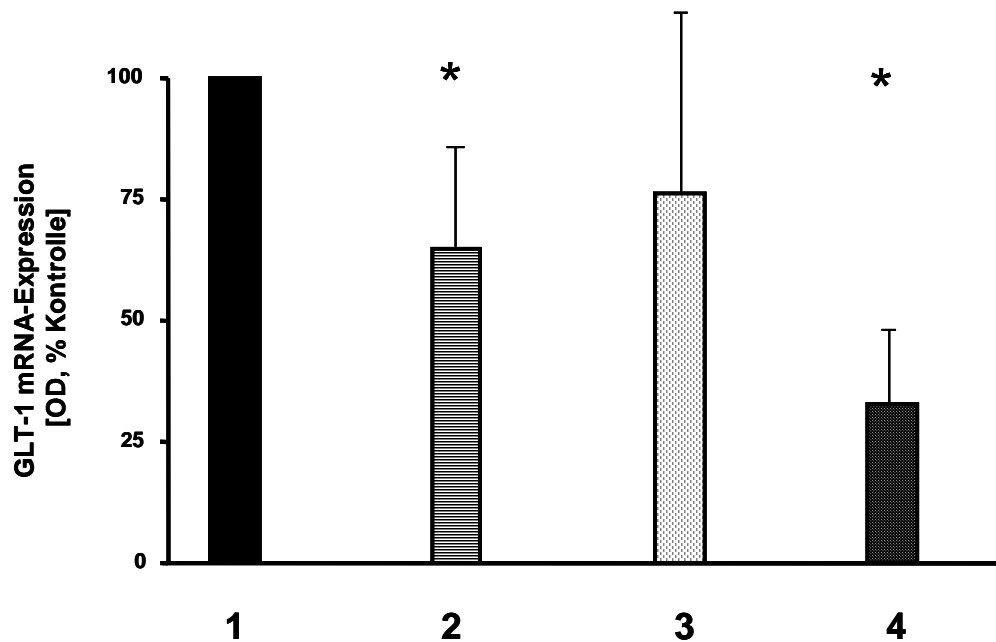
Im ersten Abschnitt der Experimente sollte herausgefunden werden, ob die Behandlung mit Dopamin Auswirkungen auf die in vitro Expression von GLT- 1 mRNA in Astrozyten zeigt.

Im *Mesencephalon* führte Dopamin [10^{-4} M] zu einer statistisch signifikanten Reduktion an GLT- 1 mRNA auf etwa 65 % des Ausgangswertes (s. Abbildung 6). Eine statistisch signifikante Abnahme an GLT- 1 mRNA konnte ebenfalls unter Behandlung mit Dopamin [10^{-5} M] und dem D₂- Rezeptorantagonisten Sulpirid [10^{-6} M] verzeichnet werden. In Gegenwart des D₁- Rezeptorantagonisten SCH 33290 [10^{-6} M] erzielte Dopamin [10^{-5} M] jedoch keine Abnahme der GLT-1 mRNA. Die Verhinderung des dopaminergen

Effektes durch Blockade des D₁- Rezeptors bedeutet, dass Dopamin eine Abnahme der GLT- 1 mRNA über diesen Rezeptor bewirkt.

Im *Striatum* rief Dopamin in der Konzentration 10⁻⁵ M eine Abnahme der GLT- 1 Menge auf etwa 70 % des Kontrollwertes hervor, in der Konzentration 10⁻⁴ M auf ca. 50 % (s. Abbildung 7). Unter Antagonisierung des D₂- Rezeptors durch Sulpirid [10⁻⁶ M] wurde eine statistisch signifikante Reduktion an GLT- 1 mRNA auf etwa 25 % der Kontrollmenge verzeichnet. Ebenso wie im Striatum erzielte Dopamin [10⁻⁵ M] in Gegenwart des D₁- Antagonisten SCH 33290 [10⁻⁶ M] keine Veränderung der GLT- 1 mRNA. Dies bedeutet wiederum, dass die dopaminerge Abnahme an GLT- 1 mRNA über den D₁- Rezeptor vermittelt wird.

Abbildung 6: In vitro Expression der GLT- 1 mRNA in mesencephalen Astrozyten

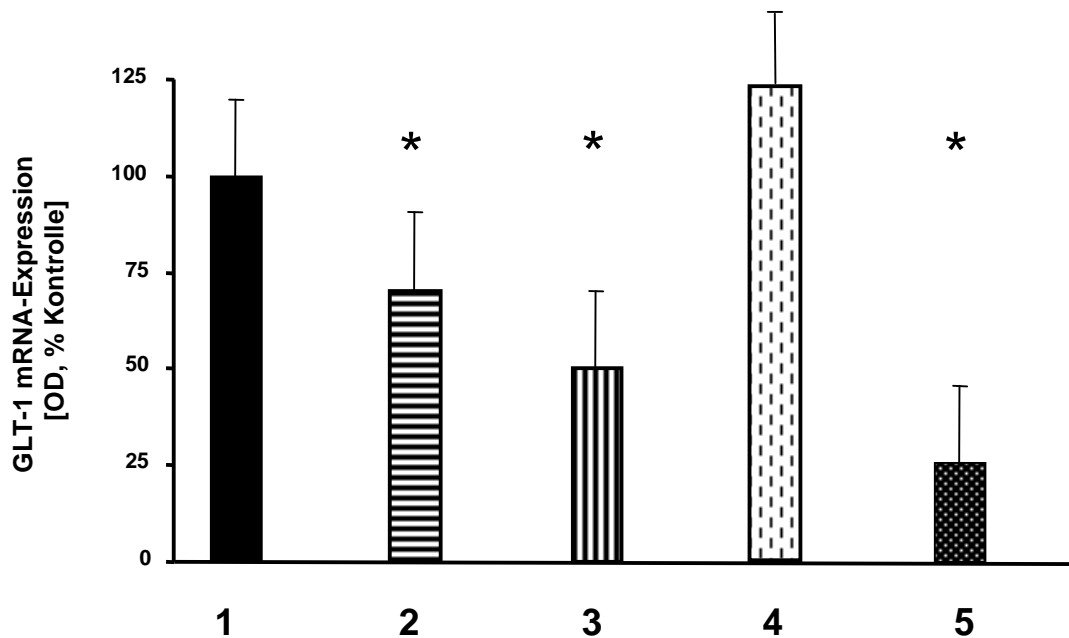


- 1: Kontrolle
2: DA [10^{-4} M]
3: DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]
4: DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]

Die gemessenen Differenzen zwischen der Kontrolle und den Proben für DA [10^{-4} M] und DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M] sind statistisch signifikant, was durch den Stern (*) angezeigt wird. Die Daten entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichungen.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);
SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Abbildung 7: In vitro Expression der GLT-1 mRNA in striatalen Astrozyten



- 1: Kontrolle
 2: DA [10^{-4} M]
 3: DA [10^{-5} M]
 4: DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]
 5: DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]

Die gemessenen Differenzen zwischen der Kontrolle und den Proben für DA [10^{-4} M], DA [10^{-5} M], DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M] sind statistisch signifikant, was durch den Stern (*) angezeigt wird. Die Daten entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichungen.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);
 SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Tabelle 6: Statistische Signifikanz der ermittelten PCR - Daten im Mesencephalon

Die angegebenen Werte entstammen den Berechnungen des Statistikprogrammes SigmaStat 2.03 und beziehen sich auf die Prozentualränge der Messergebnisse. Diese sind in den jeweils rechten Spalten von Tabelle 8 aufgelistet.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Untersuchte Proben im Vergleich zur Kontrolle	p-Wert
DA [10^{-4} M]	0,010
DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]	0,345
DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]	0,004

Tabelle 7: Statistische Signifikanz der ermittelten PCR- Daten im Striatum

Die angegebenen Werte entstammen den Berechnungen des Statistikprogrammes SigmaStat 2.03 und beziehen sich auf die Prozentualränge der Messergebnisse. Diese sind in den jeweils rechten Spalten von Tabelle 9 aufgelistet.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Untersuchte Proben im Vergleich zur Kontrolle	p-Wert
DA [10^{-4} M]	0,002
DA [10^{-5} M]	0,006
DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]	0,080
DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]	0,003

)

Legende zu den Tabellen 8 und 9:

Die Daten entsprechen den Messergebnissen, die mit dem LightCycler erzielt wurden. Die linke Spalte enthält die Absolutwerte, die rechte die prozentuale Verteilung in Bezug auf den Kontrollwert, der als 100 % festgesetzt wurde.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 -Antagonist);SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

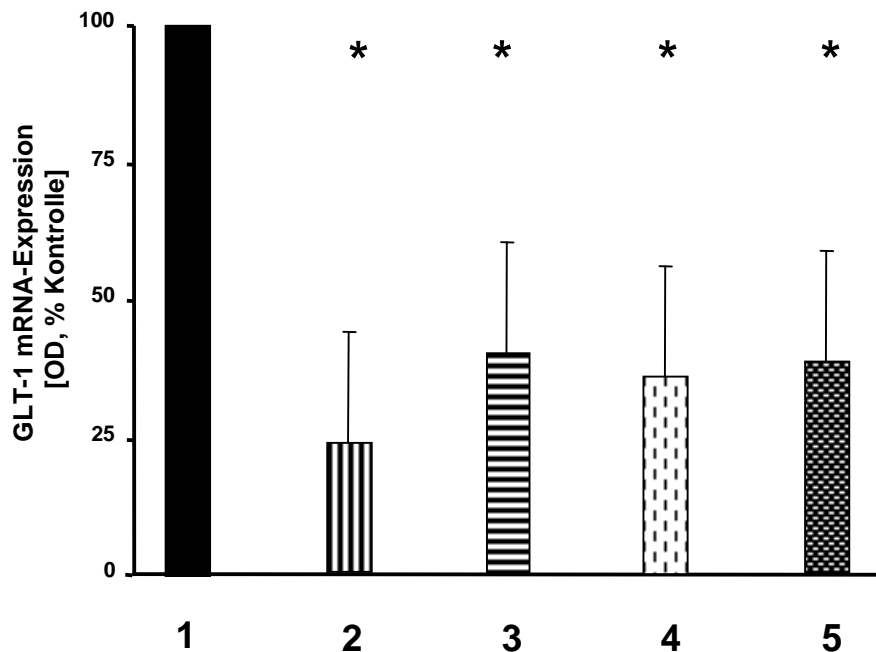
Tabelle 8: Messergebnisse der PCR-Daten im Mesencephalon

Kontrollen	Mittelwerte	%	DA [10^{-4}]	%	DA [10^{-5}] + SCH[10^{-6}]	%	DA [10^{-5}] + SUL[10^{-6}]	%
981,21		100	59,14	6,03	210,47	21,45	267,76	27,29
1623,28	-	100	-	-	691,31	41,66	-	-
1695,59	1659,44	100	160,68	9,68	1094,69	65,97	-	-
46,14	-	100	22,91	25,04	106,79	116,73	29,35	32,08
277,71	-	100	240,00	262,32	46,48	50,81	41,67	45,54
61,33	-	100	43,53	47,58	177,96	194,51	24,64	26,93
31,81	-	100	49,64	54,26	-	-	-	-
40,47	91,49		44,49	48,63	-	-	-	-
Σ (%)	100		64,79		76,39		32,96	

Tabelle 9: Messergebnisse der PCR-Daten im Striatum

Kontrollen	Mittelwerte	%	DA[10 ⁻⁵]	%	DA[10 ⁻⁴]	%	DA[10 ⁻⁵]+ SCH [10 ⁻⁶]	%	DA[10 ⁻⁵]+ SUL [10 ⁻⁶]	%
218,29		100	252,58	178,09	114,87	80,99	637,99	449,86	15,90	11,21
74,15		100	130,99	92,36	-	-	-	-	32,04	22,59
134,87		100	73,61	51,90	-	-	-	-	-	-
281,78	141,82	100	-	-	-	-	-	-	-	-
345,67		100	323,69	80,88	350,75	87,64	185,92	46,46	335,72	83,89
408,82		100	358,50	89,58	223,12	55,76	256,29	64,04	-	-
312,10		100	273,69	68,64		-	-	-	-	-
788,32		100	-	-		-	-	-	-	-
647,37		100	-	-		-	-	-	-	-
394,18	400,18		-	-		-	-	-	-	-
771,26		100	111,56	12,37	260,01	28,82	309,83	34,35	42,89	4,76
1032,62		100	127,22	14,10	12,69	1,41	183,22	20,31	42,27	4,69
-	901,94	100	414,83	45,99	430,24	47,70	-	-	-	-
Σ (%)	100,00		70,43		50,39		123,00		25,42	

Abbildung 8: In vitro Expression von GLT-1 Protein in mesencephalen Astrozyten

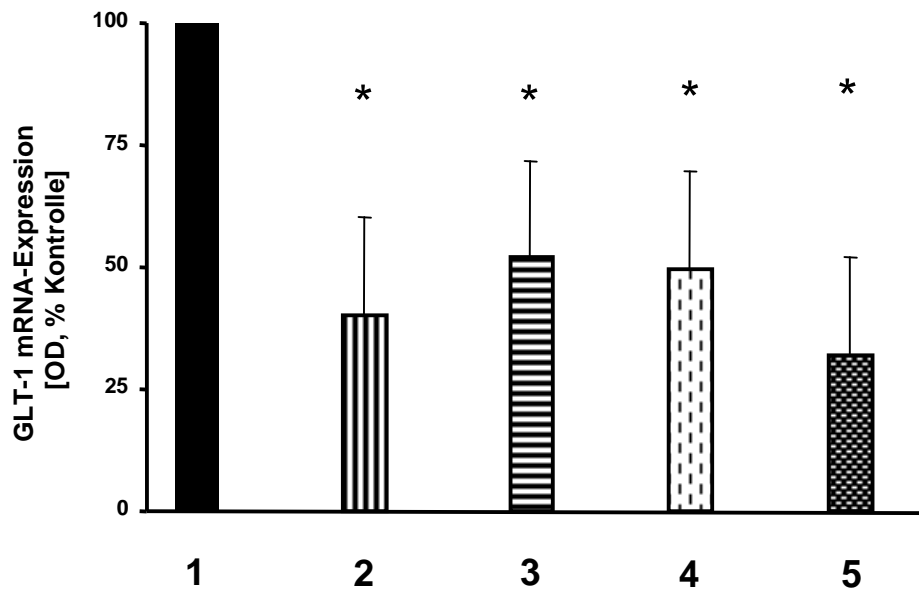


- 1: Kontrolle
2: DA [10⁻⁴ M]
3: DA [10⁻⁵ M]
4: DA [10⁻⁵ M] + SCH [10⁻⁶ M]
5: DA [10⁻⁵ M] + SUL [10⁻⁶ M]

Die gemessenen Differenzen zwischen der Kontrolle und den Proben für DA [10⁻⁴ M], DA [10⁻⁵ M], DA [10⁻⁵ M] + SUL [10⁻⁶ M] sind statistisch signifikant, was durch den Stern (*) angezeigt wird. Die Daten entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichungen.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D₁- Antagonist);
SUL: Sulpirid (D₂- Antagonist)

Abbildung 9: In vitro Expression von GLT- 1 Protein in striatalen Astrozyten



1: Kontrolle

2: DA [10^{-4} M]

3: DA [10^{-5} M]

4: DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]

5: DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]

Die gemessenen Differenzen zwischen der Kontrolle und den Proben für DA [10^{-4} M], DA [10^{-5} M], DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M] sind statistisch signifikant, was durch den Stern (*) angezeigt wird. Die Daten entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichungen.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);

SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Tabelle 10: Statistische Signifikanz der ermittelten Western-Blot Daten im Mesencephalon

Die angegebenen Werte entstammen den Berechnungen des Statistikprogrammes SigmaStat 2.03 und beziehen sich auf die Prozentualränge der Messergebnisse. Diese sind in den jeweils rechten Spalten von Tabelle 12 aufgelistet.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Untersuchte Proben im Vergleich zur Kontrolle	p-Wert
DA [10^{-4} M]	< 0,001
DA [10^{-5} M]	< 0,001
DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]	0,002
DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]	< 0,001

Tabelle 11: Statistische Signifikanz der ermittelten Western-Blot Daten im Striatum

Die angegebenen Werte entstammen den Berechnungen des Statistikprogrammes SigmaStat 2.03 und beziehen sich auf die Prozentualränge der Messergebnisse. Diese sind in den jeweils rechten Spalten von Tabelle 9 aufgelistet.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Untersuchte Proben im Vergleich zur Kontrolle	p-Wert
DA [10^{-4} M]	< 0,001
DA [10^{-5} M]	0,042
DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]	< 0,001
DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]	< 0,001

Legende zu Tabellen 12 und 13:

Die Daten entsprechen der optischen Dichte der Western Blot Membranen, die mit dem Softwareprogramm Image J® ausgewertet wurden. Die linke Spalte zeigt die Absolutwerte, die rechte den relativen Anteil an den Kontrollwerten, die als 100 % festgelegt wurden. DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 -Antagonist); SUL: Sulpirid (D_2 -Antagonist)

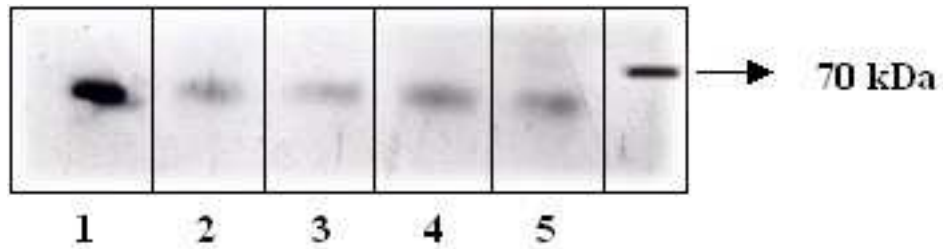
Tabelle 12: Messergebnisse der Western Blot Daten im Mesencephalon

	Kontrollen	%	DA[10 ⁻⁴]	%	DA[10 ⁻⁵]	%	DA[10 ⁻⁵]+ SCH [10 ⁻⁶]	%	DA[10 ⁵] + SUL [10 ⁻⁶]	%
	9310,15	100	1946,01	20,90	4155,32	44,63	2585,93	27,78	2397,16	25,75
	9714,79	100	3352,10	34,51	4382,38	45,11	5124,91	52,75	4600,96	47,36
	9614,28	100	1498,59	15,59	2989,32	31,09	2604,67	27,01	4070,18	42,33
Σ (%)	100		23,66		40,28		35,87		38,48	

Tabelle 13: Messergebnisse der Western Blot Daten im Striatum

	Kontrollen	%	DA[10 ⁻⁴]	%	DA[10 ⁻⁵]	%	DA[10 ⁻⁵]+ SCH [10 ⁻⁶]	%	DA[10 ⁵] + SUL [10 ⁻⁶]	%
	6933,10	100	3034,21	43,76	4871,98	70,27	3401,21	49,06	1782,18	25,71
	6249,85	100	2577,03	42,24	1208,48	19,33	2577,03	50,83	2707,26	43,32
	7775,38	100	2743,18	35,28	7775,38	65,96	2743,18	48,95	2076,03	27,70
Σ (%)	100		40,09		51,86		49,62		31,91	

Abbildung 10: Repräsentativer Western Blot aus mesencephaler Kultur

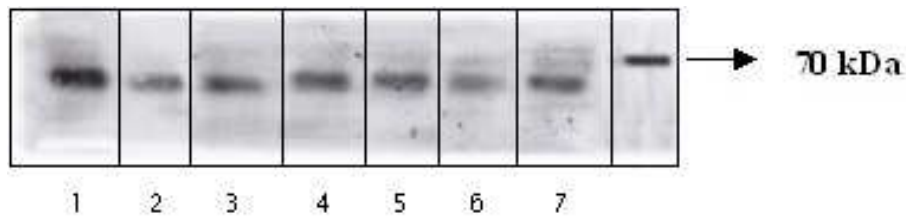


- 1: Kontrolle
- 2: DA [10^{-5} M]
- 3: DA [10^{-4} M]
- 4: DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]
- 5: DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]

Gezeigt wird die Expression von GLT-1 Protein in mesencephalen astroglialen Kulturen in An- und Abwesenheit von Dopamin und Dopaminrezeptorantagonisten.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);
SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

Abbildung 11: Repräsentativer Western Blot aus striataler Kultur



- 1: Kontrolle
- 2: DA [10^{-5} M]
- 3: DA [10^{-4} M]
- 4: DA [10^{-5} M] + SUL [10^{-6} M]
- 5: DA [10^{-5} M] + SCH [10^{-6} M]

Gezeigt wird die Expression von GLT-1 Protein in striatalen astroglialen Kulturen in An- und Abwesenheit von Dopamin und Dopaminrezeptorantagonisten.

DA: Dopamin; SCH: SCH 33290 (D_1 - Antagonist);
SUL: Sulpirid (D_2 - Antagonist)

3.2.2 Translationale Veränderungen im Expressionsmuster

Im zweiten Abschnitt wurde untersucht, ob sich die Reduktion der Expression von GLT- 1 unter Dopamineinfluss auch auf der Proteinebene zeigte. Nach Isolation der Proteinmenge aus oben beschriebenen Kulturen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Auf den Membranen konnten breite Banden im Bereich von 70 kDA identifiziert werden, die mit den bisherigen Beschreibungen der Größe des GLT- 1 Proteins übereinstimmten.

Für die Experimente wurden die Zellen, die aus zwei bzw. drei unterschiedlichen Kulturen stammten, über sieben Tage hinweg im Intervall von 24 Stunden mit Dopamin in den Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M sowie den Dopaminrezeptorantagonisten SCH (D_1 - Antagonist) und SUL (D_2 - Antagonist) behandelt. Die hier gezeigten Daten entsprechen der optischen Dichte der Western Blot Banden. In Analogie zu den PCR-Ergebnissen sind die Daten dabei nicht als Absolutwerte dargestellt, sondern als relative Anteile an den Kontrollwerten, die gleich 100 % gesetzt wurden. Die einzelnen Werte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung. Die translationalen Veränderungen der Expression von GLT- 1 fielen in beiden Regionen statistisch signifikant aus.

Im *Mesencephalon* rief Dopamin in der Konzentration 10^{-4} M eine Reduktion des GLT- 1 Proteins auf ca. 23 % des Ausgangswertes hervor, in der Konzentration 10^{-5} M eine Abnahme auf etwa 40 % des Kontrollwertes (s. Abbildung 8). In Anwesenheit des D_1 - Rezeptorantagonisten SCH 33290 [10^{-6} M] induzierte DA [10^{-5} M] ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme an GLT-1 Protein auf ca. 35 % des ursprünglichen Wertes. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich in Gegenwart des D_2 - Antagonisten Sulpirid [10^{-6} M] beobachten: Hier sank das GLT-1 Protein auf ca. 38 % ab.

Im *Striatum* nahm die Proteinmenge unter Behandlung mit DA [10^{-4} M] auf ca. 40 % ab, unter Hinzufügen von DA [10^{-5} M] auf ca. 52 % (s. Abbildung 9). In Kombination mit dem D_1 - Antagonisten SCH 33290 [10^{-6} M] erzielte DA [10^{-5} M] eine Reduktion des GLT- 1 Proteins auf ca. 49 % , zusammen mit Sulpirid [10^{-6} M] auf ca. 32 %.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung des astrozytären Expressionsmusters des Glutamattransporters GLT- 1 unter dopaminergem Stimulation

Die vorliegende Arbeit lieferte Hinweise, dass Dopamin das in vitro Expressionsmuster des Glutamattransporters GLT- 1 auf Astrozyten während der Entwicklung beeinflusst.

Transkriptional zeigte sich in beiden Regionen eine statistisch signifikante Abnahme an GLT- 1 mRNA. Dieser Effekt konnte durch den D₁- Rezeptorantagonisten SCH 33290, nicht aber durch den D₂- Rezeptorantagonisten Sulpirid, blockiert werden. Dies bedeutet, dass das dopaminerge Signal auf Ebene der Transkription über den D₁- Rezeptor weitergeleitet wurde.

Translational rief Dopamin im Mesencephalon wie auch im Striatum ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme der GLT- 1 Proteinkonzentration hervor. Dieser Effekt ließ sich weder durch Antagonisieren des D₁- Rezeptors noch des D₂- Rezeptoren blockieren, so dass das dopaminerge Signal keinem Rezeptortypus zugeordnet werden konnte. Dieser Befund legte die Annahme einer Dopaminrezeptor- unabhängigen Signaltransduktion nahe.

Bei der Interpretation der erzielten Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Expression von Glutamattransportern auf verschiedenen Ebenen gesteuert werden kann (Danbolt, 2001; Vermeiren et al, 2005; Beart et al, 2007). Modifikationen können transkriptional, translational oder posttranslational erfolgen. Mit den oben beschriebenen Experimenten wurden die transkriptionalen und translationalen Veränderungen erfasst, nicht aber die posttranslationalen. Zu diesen zählen die Synthese der Transporter aus Homooligomeren, der Transport aus dem Golgi- Apparat zur Zellmembran und vice versa (sog. trafficking) sowie die Beeinflussung der Transporteraktivität durch Phosphorylierung (Danbolt, 2001; Gegelashvilli, et al, 1997). Im Gegensatz zu transkriptionalen und translationalen Veränderungen führen posttranslationale Modifikationen zu einer raschen Veränderung des Expressionsmusters.

Abbildung 12 zeigt eine Übersicht über die unterschiedlichen Faktoren, die posttranslationale Modifikationen an GLT-1 steuern. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, metabotrope Glutamatrezeptoren, Kinasen und Strukturproteine (Beart et al, 2007).

Die Annahme Dopamin- induzierter posttranslationaler Modifikationen könnte die Differenz zwischen dem transkriptionalen und translationalen Expressionsmuster von GLT- 1 erklären (Mitosek-Szewczyk et al, 2008). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Höhe der Expression nicht mit der Aktivitätsrate der Glutamattransporter korreliert (Danbolt, 2001; Vermeiren et al, 2005).

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Messungen der Glutamatkonzentrationen an Dopamin- behandelten Astrozytenkulturen ergaben einen Anstieg des extrazellulären Glutamats bei konstanter intrazellulärer Glutamatkonzentration; gleichzeitig nahm die Glutamat-Aufnahmekapazität von GLT- 1 zu (Brito et al, 2009). Der verzeichnete Anstieg des extrazellulären Glutamats lässt sich angesichts der erhöhten Aufnahmekapazität von GLT- 1 nicht auf eine Dopamin- vermittelte Reduktion der Expression an GLT- 1 zurückführen. Vielmehr legen auch diese Befunde die Annahme posttranslationaler Modifikationen von GLT- 1 durch Dopamin nahe, auch wenn sie keine Beweise liefern.

Weitere Studien zeigten die Regulation der Oberflächenexpression von GLT- 1 durch Zytokine und Proteinkinase C- abhängige Signaltransduktionswege (Nametaka et al, 2008). Ob Dopamin nach Aktivierung von D₁- Rezeptoren über PKC ebenfalls posttranslationale Modifikationen bewirken könnte, müsste in weiteren Experimenten nachgewiesen werden.

Abbildung 12: Übersicht über die Regulation posttranslationaler Modifikationen an Glutamattransportern

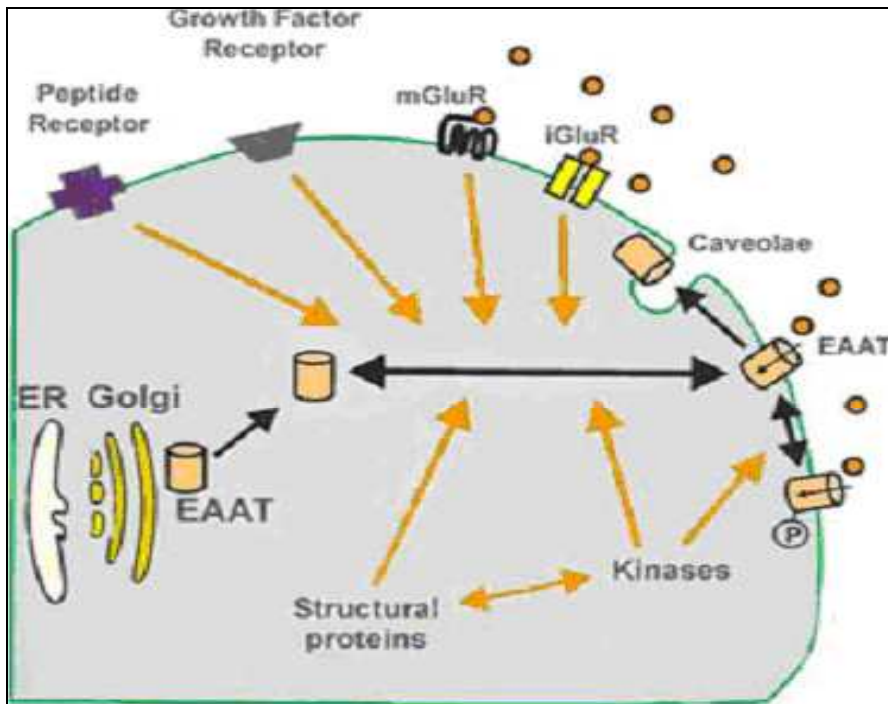


Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Faktoren, die posttranslationale Modifikationen an Glutamattransportern beeinflussen. (Abbildung modifiziert nach Beart et al, 2007)

ER: Endoplasmatisches Reticulum
 EAAT: Excitatory Amino Acid Transporter
 mGlu R: metabotroper Glutamatrezeptor

4.2 Regulation der Expression von GLT- 1

Transkriptional konnte die Dopamin- induzierte Abnahme an GLT- 1 durch einen D₁-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden. Dieses Ergebnis impliziert eine Beteiligung des D₁- Rezeptors an der intrazellulären Signalweiterleitung. Damit deckt sich dieser Befund nicht mit Studien, die einen Anstieg an cAMP, wie er durch Aktivierung von D₁- Rezeptoren ausgelöst wird, als Induktor für die Expression von GLT- 1 identifizierten (Zelenaia et al, 2000; Schlag et al, 1998; Swanson et al, 1997). Zytotoxische Zellschädigungen und Apoptosen durch

Dopamin, die zu einer Reduktion der GLT- 1 Expressionshöhe führen würden, waren mittels FACS- Analyse ausgeschlossen worden.

Eine paradoxe Reduktion der GLT- 1 Konzentration trotz eines Anstieges an cAMP ist in der Literatur nach Schädel-Hirn-Traumata beschrieben. Dabei beruhte der Rückgang an GLT- 1 auf der inhibierenden Wirkung von Endothelinen (Lehmann et al, 2008; Rozycka et al, 2004). Ob Dopamin in den oben beschriebenen Experimenten in Wechselwirkung mit Endothelinen trat, könnte nur durch zusätzliche Experimente geklärt werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit, die in Betracht gezogen werden muss, ist durch die alternativen Signaltransduktionswege, durch die Dopaminrezeptoren ihr Signal weiterleiten können, gegeben (vgl. hierzu Kapitel 1.3 Dopamin und Dopaminrezeptoren).

Die durch Dopamin induzierte Abnahme an astrozytärer GLT- 1 mRNA muss als entwicklungspezifisches Phänomen gewertet werden. Insbesondere prä- und perinatal sind exakt regulierte Interaktionen zwischen dem dopaminergen und glutamatergen Transmittersystem entscheidend für die regelrechte Ausbildung striataler Bahnsysteme. Gegenläufige Regulationen sind daher notwendig, um eine Homöostase zwischen Dopamin und Glutamat aufrechtzuerhalten. In diesem Sinne stellen entgegengesetzte Effekte von Dopamin keinen Widerspruch dar, sondern eine gegenseitige Ergänzung. So rief in einem Tiermodell von M. Parkinson eine chronische Applikation von L-DOPA eine Zunahme an GLT- 1 mRNA auf adulten striatalen Neuronen hervor. Dieser Effekt wurde über D₁- Rezeptoren vermittelt und ging einher mit einer gesteigerten Expression an D₃ mRNA (Queslati et al, 2007; St Hilaire et al, 2005). Der Dopamin D₃- Rezeptor gehört zur Familie der D₂- Rezeptoren und führt zu einer Abnahme an GLT- 1. Die Tatsache, dass ein Anstieg an GLT- 1 mRNA begleitet wird von einer gesteigerten Expression an D₃ mRNA, die ihrerseits die GLT- 1 Expression inhibiert, deutet auf eine differenzierte Regulation der GLT- 1 Expression hin, bei der sich stimulierende und inhibierende Faktoren ausgleichen. Angesichts der Notwendigkeit einer Transmitterhomöostase erscheint es plausibel, dass Dopamin über

D₁- Rezeptoren die Expression von GLT- 1 auf striatalen Neuronen fördert, auf Astrozyten hingegen hemmt.

Weiterhin muss bedacht werden, dass der peri- und postnatale Bedarf an Glutamat nicht mit dem adulten gleichgesetzt werden darf. Da Glutamat ein wichtiges Entwicklungssignal für die korrekte striatale Differenzierung darstellt (Luk et al, 2003, Gandhi et al, 2008; van der Kooy, 1996), ist es denkbar, dass es während der Ontogenese in höheren Konzentrationen verfügbar sein muss. Höhere extrazelluläre Konzentrationen würden durch eine verminderte Expression des Glutamatttransporters GLT- 1 erreicht.

Translational konnte der dopaminerge Effekt keinem der klassischen Dopaminrezeptoren zugeordnet werden, so dass hier alternative Signalwege in Betracht gezogen werden müssen, etwa durch Wechselwirkungen zwischen Dopamin und anderen Botenstoffen.

Zahlreiche Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor), TGF-alpha (Tumor Growth Factor- alpha), FGF- 2 (Fibroblast Growth Factor- 2), PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) und PDGF (Platelet derived growth factor) steigern die Expression von GLT- 1 (Figiel et al, 2003; Maucher et al, 2003; Beart et al, 2007 ; Zeleniaia, 2000 ; Perego et al, 2000). Nach Aktivierung einer membranständigen Tyrosinkinase kann das Signal intrazellulär auf verschiedenen Transduktionswegen weitergeleitet werden, die untereinander Quervernetzungen aufweisen und eine gemeinsame Endstrecke aufweisen. Unter diesen Kaskaden konnten die Ras/Raf-Kaskade, Phosphatidyl-Inositol-3- Kinase (PI-3 K), Proteinkinase B (PKB), Phospholipase C (PLC), Calcium- Calmodulin- Kinase (Ca/MK), Proteinkinase C (PKC) sowie die Proteinkinase A (PKA) identifiziert werden (Li et al, 2006; Gegelashvilli et al, 2000). Abbildung 13 zeigt eine Übersicht über die Signaltransduktionswege, über die GLT-1 induziert werden kann. Die Kaskaden konvergieren auf die Transkriptionsfaktoren NF-κB (Nuclear factor κB), CREM (cAMP responsive element modulator) und ATF- 1 (Activating transcription factor 1), die die Expression von GLT- 1 mRNA steigern.

Es wäre denkbar, dass Dopamin durch Inhibition eines Wachstumsfaktors die GLT- 1 Expression senkt.

Als weiterer möglicher Mediator für die Dopamin -induzierte Abnahme an GLUT- 1 kommt der Adenosinrezeptor A_2A in Betracht, der mit dem dopaminergen wie auch glutamatergen Transmittersystem in Verbindung steht. So führte eine Aktivierung des A_2A - Rezeptors zu einer Abschwächung des dopaminergen Signals bei gleichzeitiger Verstärkung glutamaterger Effekte (Agnati et al, 2004; Domenici et al, 2004; Wu et al, 2005). Der Adenosin A_2A - und Dopamin D_2 - Rezeptor bilden einen G- Protein- gekoppelten, antagonistisch regulierten Rezeptorkomplex, der die Verfügbarkeit und Transmission von Glutamat beeinflusst (Ferre et al, 2004, 2008; Rosin et al, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der A_2A - Rezeptor glutamaterge Synapsen kontrolliert und die GABAerge Signalintensität steigert (Schiffmann et al, 2007; Rosin et al, 2003). Bei der Behandlung L-DOPA - induzierter Dyskinesien wird der Adenosin A_2A - Rezeptor zunehmend als pharmakologischer Ansatzpunkt diskutiert (Fuxe et al, 2007).

Über eine Aktivierung des A_2A - Rezeptors fördert der Wachstumsfaktor GDNF (Glial cell line derived neurotrophic factor) die Freisetzung von Dopamin wie auch Glutamat aus striatalen Neuronen und kontrolliert die kortikostriatale glutamaterge Transmission (Gomes et al, 2005, 2006). Unter Annahme eines multifaktoriell regulierten Transmittergleichgewichtes erscheint es durchaus möglich, dass Dopamin durch Interaktion mit GDNF die GLUT- 1 Expression und damit auch die Verfügbarkeit von Glutamat reguliert. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten weitere Experimente durchgeführt werden, die das astrozytäre Expressionsmuster von GLUT- 1 in Kulturen untersuchen, die gleichzeitig mit Dopamin sowie Agonisten und Antagonisten des A_2A - Rezeptors behandelt werden.

Eine ähnliche Funktion kann auch für den Wachstumsfaktor BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) angenommen werden. Bekannt ist, dass Dopamin über D_1 - Rezeptoren die BDNF- Expression auf striatalen Neuronen reguliert, die zeitlich mit der Ausbildung dopaminergere Synapsen im Striatum einhergeht (Küppers und Beyer, 2001; Constantini et al, 1999). Eine enge funktionelle Koppelung zwischen beiden Botenstoffen lässt sich weiterhin aus der

gemeinsamen Regulation von GAD 67⁴⁰ in striatalen GABAergen Neuronen ablesen (Küppers et al, 2000). Ebenso konnte gezeigt werden, dass BDNF die astrogliale Sensitivität gegenüber Dopamin durch Steigerung der Expression des dopaminergen D₅-Rezeptors erhöht (Brito et al, 2004). Angesichts der ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen beiden Botenstoffen wäre es prinzipiell denkbar, dass BDNF auch nicht-rezeptorvermittelte Effekte von Dopamin auf Astrozyten fördert.

Auch wenn eine Dysfunktion der dopaminergen Transmission schon lange als entscheidender Faktor in der Ätiologie neuropsychiatrischer Erkrankungen wie dem Parkinson-Syndrom und der Schizophrenie bekannt ist, wurde erst in den letzten Jahren die Bedeutung der Interaktionen zwischen dem dopaminergen und glutamatergen Regelkreisläufen als pathogenetisch relevant entdeckt (Missale et al, 2006).

Faktoren, die die Expression von GLT-1 regulieren, könnten therapeutisch genutzt werden für eine gezielte Induktion von Glutamattransportern, insbesondere bei Erkrankungen, die auf einem Glutamatüberschuss beruhen, wie z.B. ALS, Epilepsie, ADHD, Alzheimer, etc. (Vanoni et al, 2004; Lauderback et al, 2001). So konnten zytoprotektive Effekte bei selektiver Erhöhung der GLT-1-Expression durch Ceftriaxon und Neuroimmunophilin GPI-1046 verzeichnet werden (Lee et al, 2008; Ganel et al, 2006)

⁴⁰ GAD: Glutamat Decarboxylase

Abbildung 13: Übersicht über die möglichen Signaltransduktionswege, deren Aktivierung zu einer Induktion von GLT- 1 führt

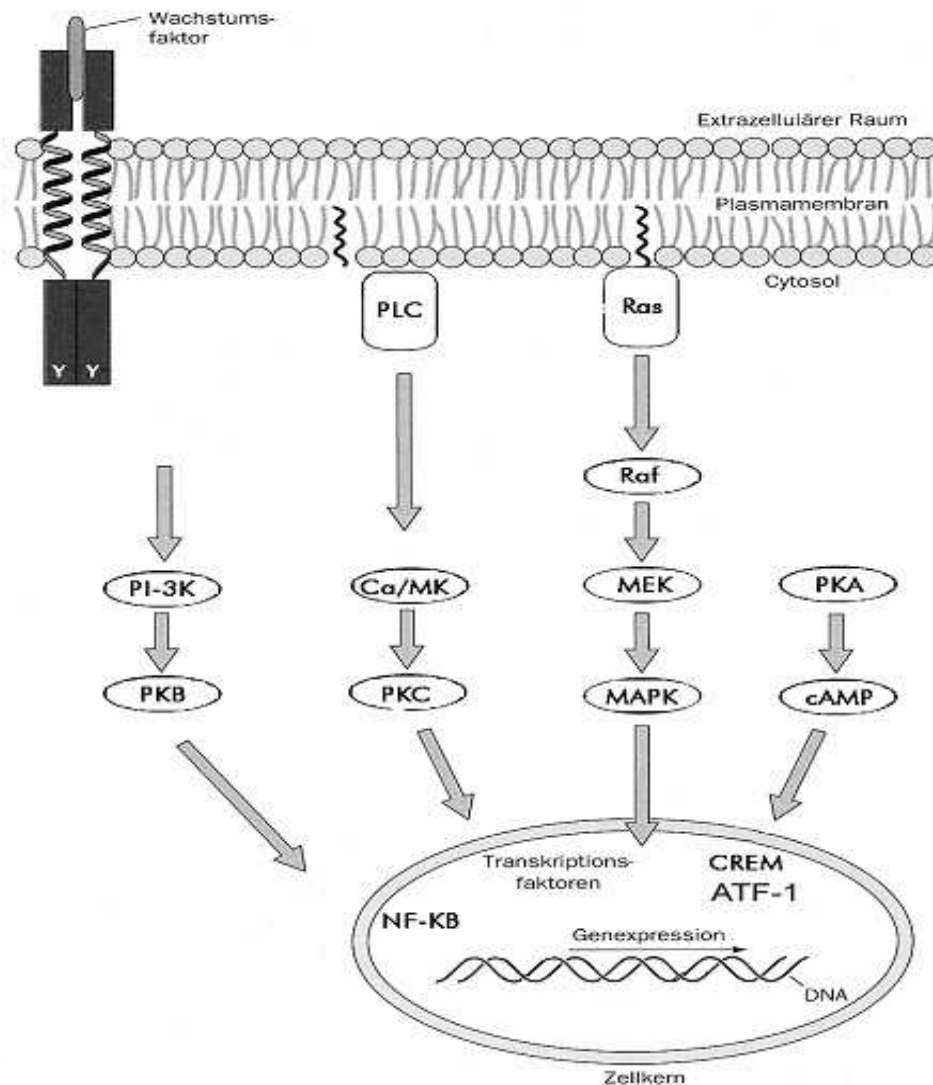


Abbildung 13 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Signaltransduktionswege, über die die Expression von GLT- 1 mRNA induziert werden kann. (Abbildung modifiziert nach Beck-Sickinger, S. 217)

PKA/PKB/PKC: Proteinkinase A/B/C; PI-3K: Phosphatidylinositol- 3- Kinase; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; PLC: Phospholipase C; Ca/MK: Calcium-Calmodulin-Kinase; Ras/Raf/MEK: Eigennamen; NF-KB: Nukleärer Transkriptionsfaktor KB; CREM: cAMP responsive element modulator; ATF- 1: activating transcription factor 1;

4.3 Schlussfolgerungen

Auf Ebene der Transkription führte Dopamin über D₁- Rezeptoren zu einer Abnahme an GLT- 1. Dieser Befund überrascht insofern, als cAMP, das nach Aktivierung von D₁- Rezeptoren entsteht, im adulten Organismus als Induktor von GLT- 1 bekannt ist. Das Ergebnis kann als entwicklungspezifisches Phänomen gewertet werden. Zusätzlich liefert es Hinweise auf eine multifaktorielle Regulation der GLT-1 Expression und damit der Glutathomöostase.

Translational wurde ebenfalls eine Abnahme an GLT- 1 unter Dopamin beobachtet, doch konnte sie keinem Dopaminrezeptor zugeordnet werden. Interaktionen zwischen Dopamin und anderen Botenstoffen, über die das dopaminerge Signal weitergeleitet wird, müssten in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Dabei muss insbesondere an den Adenosin A₂A- Rezeptor, BDNF und GDNF gedacht werden.

Da Dopamin nicht nur die Expression, sondern auch die Aktivitätsrate von GLT- 1 beeinflusst (vgl. Brito et al, 2009), könnten in weiteren Experimenten Dopamin- vermittelte posttranslationale Modifikationen an GLT-1 untersucht werden. Diese sind, im Gegensatz zu Veränderungen des Expressionsmusters, bereits nach kurzer Zeit nachweisbar (Gao, 2006)

Die Kenntnis der Expressionsfaktoren von Glutamattransportern könnte für eine gezielte Induktion der Transporter genutzt werden. Von therapeutischer Relevanz ist dies insbesondere bei Erkrankungen, die auf einem Glutamatüberschuss beruhen wie ADHD, Tourette-Syndrom, etc.

5. Zusammenfassung

Das Striatum gehört zu den Basalganglien und übernimmt eine zentrale Funktion bei der Koordination von Bewegungsabläufen sowie bei Lernen und Gedächtnisbildung (Paoletti et al, 2008; Dabir et al, 2006) Für die regelrechte Ausbildung striataler Bahnsysteme ist die zeitlich und räumlich koordinierte Interaktion zahlreicher Entwicklungssignale erforderlich (Jain et al, 2001; Liu et al, 1998). Zu diesen zählen Neurotrophine und Hormone, aber auch die Neurotransmitter Dopamin und Glutamat. Unter den Entwicklungssignalen nimmt Dopamin eine koordinierende Funktion ein, indem es die Expression von GDNF und der Glutamat- Decarboxylase reguliert (Bamford et al, 2004; Küppers et al, 2000, 2001).

Für die striatale Entwicklung sind neben den Botenstoffen auch Wechselwirkungen zwischen Neuronen und Astrozyten bedeutsam (Hatten, Mason, 1986; Voutsinos-Porche et al, 2003; Ortuno-Sahagun et al, 1997).

In unserer Arbeitsgruppe war auf Astrozyten ein hochsensitiver Dopamin D_5 - Rezeptor, der zur Familie der D_1 - Rezeptoren gehört, entdeckt und damit Astrozyten als Zielzellen von Dopamin identifiziert worden. Darüber hinaus sind Astrozyten in der Lage, Ca^{++} - abhängig Glutamat auszuschütten (Danbolt, 2001).

Diese Entdeckung gab Anlass zu der Hypothese, dass Dopamin über Astrozyten die Verfügbarkeit von Glutamat kontrollieren könnte. Glutamat wird primär nicht enzymatisch abgebaut, sondern über Glutamattransporter in das Zellinnere aufgenommen Während der Entwicklung ist insbesondere GLT- 1 an der Ausbildung von Synapsen und der Gewährleistung von Neuroplastizität beteiligt (Northington et al, 1998, 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das astrozytäre Expressionsmuster des Glutamattransporters GLT- 1 unter dopaminergem Stimulation im Striatum und Mesencephalon neugeborener balb/c Mäuse zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellkulturen über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich mit Dopamin [10^{-4} M bzw. 10^{-5} M] und den Dopaminrezeptorantagonisten SCH 33290 (D_1 - Antagonist) und Sulpirid (D_2 - Antagonist), jeweils in der Konzentration 10^{-6} M

behandelt. Die Konzentrationen an GLT- 1 wurden sowohl auf Ebene der mRNA als auch des Proteins bestimmt.

Die Experimente erbrachten eine statistisch signifikante Reduktion der GLT- 1 Expression unter dopaminergem Stimulation auf Ebene der Transkription wie auch Translation. Transkriptional zeigte sich eine Beteiligung der D₁-Rezeptoren an der Weiterleitung des dopaminergen Signals. Das transkriptionale Ergebnis entsprach nicht der Erwartungshaltung gemäß der aktuellen Studienlage, der zufolge eine Aktivierung von D₁- Rezeptoren die GLT-1 Expression auf adulten Astrozyten erhöht. Die registrierte Abweichung kann als entwicklungspezifische Besonderheit gewertet werden. Da Glutamat ein wichtiges Entwicklungssignal darstellt, ist es denkbar, dass der perinatale Bedarf an Glutamat höher als der adulte ist. Dies würde bedeuten, dass auch die perinatale Regulation der Verfügbarkeit von Glutamat von der adulten abweicht.

Translational konnte kein bestimmter Rezeptorsubtypus als Vermittler des dopaminergen Effektes identifiziert werden, so dass alternative Transduktionswege für das dopaminerge Signal in Betracht gezogen werden.

Dabei ist insbesondere an Interaktionen zwischen Dopamin und Endothelinen, Wachstumsfaktoren und dem Adenosin- A_{2A}- Rezeptor zu denken. Die Kenntnis der Signaltransduktionswege, über die die Expression von GLT- 1 reguliert wird, könnte therapeutisch genutzt werden für die gezielte Induktion von Glutamattransportern bei Krankheiten, die auf einem Überschuss des neurotoxischen Glutamat beruhen, z.B. ADHD, M. Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose.

6. Abbildungen und Tabellen**6.1 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematisches Modell der Glutamattransporter GLT - 1 und GLAST	4
Abbildung 2: Schematisches Modell eines G- Protein-gekoppelten Dopaminrezeptors.....	7
Abbildung 3: Diagramm zur Ermittlung der crossing-points.....	26
Abbildung 4: Exemplarische Eichgerade zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration	28
Abbildung 5: GFAP -immunreaktive Astrozyten nach der zweiten Passage	31
Abbildung 6: In vitro Expression der GLT- 1 mRNA in mesencephalen Astrozyten	34
Abbildung 7: In vitro Expression der GLT- 1 mRNA in striatalen Astrozyten ...	35
Abbildung 8: In vitro Expression von GLT- 1 Protein in mesencephalen Astrozyten	39
Abbildung 9: In vitro Expression von GLT- 1 Protein in striatalen Astrozyten	40
Abbildung 10: Repräsentativer Western Blot aus mesencephaler Kultur	43
Abbildung 11: Repräsentativer Western Blot aus striataler Kultur	44
Abbildung 12: Übersicht über die Regulation posttranslationaler Modifikationen an Glutamattransportern	48
Abbildung 13: Übersicht über die möglichen Signaltransduktionswege, deren Aktivierung zu einer Induktion von GLT- 1 führt	53

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Familie der Na ⁺ -abhängigen- Glutamattransporter	5
Tabelle 2: Pipettierschema für die Reverse Transkription	22
Tabelle 3: Pipettierschema für PCR- Kapillaren	23
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer.....	24
Tabelle 5: Programmierung des LightCyclers.....	25
Tabelle 6: Statistische Signifikanz der ermittelten PCR- Daten im Mesencephalon.....	36
Tabelle 7: Statistische Signifikanz der ermittelten PCR- Daten im Striatum.....	36
Tabelle 8: Messergebnisse der PCR- Daten im Mesencephalon	37
Tabelle 9: Messergebnisse der PCR- Daten im Striatum	38
Tabelle 10: Statistische Signifikanz der ermittelten Western- Blot Daten im Mesencephalon.....	41
Tabelle 11: Statistische Signifikanz der ermittelten Western- Blot Daten im Striatum.....	41
Tabelle 12: Messergebnisse der Western- Blot Daten im Mesencephalon	42
Tabelle 13: Messergebnisse der Western Blot - Daten im Striatum	42

7. Literaturverzeichnis

Agnati LF, Leo G, Vergani AV, Martinez E, Hochemeyer J, Lluís C, Franco R, Fuxe K, Ferré S. 2004. Neuroprotective effects of L-DOPA co-administered with the adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 in an animal model of Parkinson's disease. *Brain Res. Bull* 64 (2): 155-64

Arriza J, Torp R, Danbolt N, Levy L, Meldrum B, Ottersen O. 1997. Expression of glial glutamate transporters GLT-1 and GLAST is unchanged in the hippocampus in fully kindled rats. *Neuroscience* 78: 351-359

Bamford NS, Robinson S, Palmiter RD, Joyce JA, Moore C, Meshul CK. 2004. Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci.* 24: 9541-9552

Beart PM, Shea RD. 2007. Transporter for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol.* 150, 5-17

Beck-Sickinger, Hahn (Hrsg.), *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley Verlag, Weinheim, 2002; ISBN: 3-527-30519 -X

Berlanga ML, Simpson TK, Alcantara AA. 2005. Dopamine D₅ receptor localisation in cholinergic neurons of the rat forebrain and diencephalon: a potential neuroanatomical substrate involved in mediating dopaminergic influences on acetylcholine release. *J Comp Neurol.* 492(1): 34-49

Berman SB, Hastings TG. 1997. Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J Neurochem.* 69: 1185-1195

Bezzi P, Domercq M, Vesce S, Volterra A. 2001. Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Prog Brain Res.* 132: 255-65

Bonsi P, Cuomo D, Picconi B, Sciamanna G, Tscherter A, Tolu M, Bernardi G, Calabresi P, Pisani A. 2007. Striatal metabotropic glutamate receptors as a target for pharmacotherapy in Parkinson's disease. *Amino Acids* 32 (2): 165-7

Brito V, Beyer C, Küppers E. 2004. BDNF-Stimulation of Dopamine D₅ receptor expression in developing striatal astrocytes involves PI3-kinase signalling. *Glia* 46, 284-295

Brito, V. 2004. The role of glia during striatal ontogenesis: Convergence of the major developmental signals in astrocytes, (Diss.)

Carlsson ML. 2001. On the role of prefrontal cortex glutamate for the antithetical phenomenology of obsessive compulsive disorder and attention deficit

hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25, 5-26

Chao SZ, Ariano MA, Peterson DA, Wolf ME. 2002. D1 dopamine receptor stimulation increases GluR1 surface expression in nucleus accumbens neurons, *J Neurochem.* 83 (3): 704-12

Chen L, Bokanick JD, Nisikova M, Searmans JK, Yang CR. 2007. Dopamine D1/5 receptor-mediated long-term potentiation of intrinsic excitability in rat prefrontal cortical neurons: Ca²⁺-dependent intracellular signalling. *J Neurophysiol.* 97 (3):2448-64

Chen W, Wang GJ. 2002. Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes of the brain. *J Neurosci.* 22: 2142-2152

Constantini LC, Feinstein SC, Radeke MJ, Snyder-Keller A. 1999. Compartmental expression of trkB receptor protein in the developing striatum. *Neuroscience* 89: 505-513

Conti F, Weinberg RJ. 1999. Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends in Neuroscience* 22, 451-458

Dabir DV, Robinson MB, Swanson E, Zhang B, Trojanow JQ, Lee VM. 2006. Impaired Glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J Neurosci.* 26: 644-654

Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Progr. Neurobiol.* 65, 1-105

Domenici MR, Pepponi R, Martire A, Tebano MT, Potenza RL, Popoli P. 2004. Permissive role of adenosine A2A receptors on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) mediated effects in the striatum, *J Neurochem.* 90 (5): 1276-9

Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. 1999. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J of Neurosci.* 19 (23) : 10193-10200

Engel J, Zschocke J, Figiel M, Clement AM, Bayatthi N. 2005. Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions. *J Biol. Chemistry*, Vol 280 (41), 34924-34932

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375 (6532): 599-603

Ferre S, Ciruela F, Canals M, Marcellino D, Burgueno J, Casado V, Hillion J, Torvinen M, Fanelli F, Benedetti P, Goldberg SR, Bouvier M, Fuxe K, Agnati LF,

Lluis C, Franco R, Woods A. 2004. Adenosine A_{2A} – dopamine D₂ receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat Disord.* 10 (5): 265-71

Ferre S, Quiroz C, Woods AS, Cunha A, Popoli P, Ciruela F, Lluis C, Frnaco R, Azdad K, Schiffmann SN. 2008. An update on adenosine A_{2A}- dopamine D₂-receptor interactions: implications for the function of G- protein coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 14(15): 1468-74

Figiel M, Allritz C, Lehmann C, Engele J. 2007. Gap junctional control of glial glutamate transporter expression. *Mol. Cell, Neurosci.* 35 (1): 130-7

Figiel M, Maucher T, Roczyka J, Bayatti N, Engele J. 2003. Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp.Neurol.* 183: 124-135

Fonnum F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in the mammalian brain. *Neurochem.* 42(1):1-11

Furuta A, Rothstein JD, Lee M. 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat cns development. *J Neurosci.* 12(21) 8363-8375

Fuxe K, Marcellino D, Genedani S, Agnati L.2007. Adenosine A_{2A} receptors, dopamine D (2) receptors and their interactions in Parkinson`s disease. *Mov Disord.*, 22 (14): 1990-2017

Gallo V, Ghiani C. 2000. Glutamate receptors in glia, new inputs, new cells and new functions. *Trends Pharmacol Sci.* 21:252-258

Gandhi R, Luk KC, Rymar W, Sadikot AF. 2008. Group I mGluR5 metabotropic glutamate receptors regulate proliferation of neuronal progenitors in specific forebrain developmental domains. *J Neurochem.* 104 (1): 155-72

Ganel R, Ho T, Maragakis NJ, Jackson M, Steiner JP, Rothstein JD. 2006. Selective up-regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporter GLT-1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection. *Neurobiol Dis.* 21: 556-562

Gao C, Sun X, Wolf ME. 2006. Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 98 (5):1664-77

Gao C, Sun X, Wolf ME. 2006. Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 98 (5): 1664-77

Gates MA, Dunnett SB. 2001. The influence of astrocytes in the development, regeneration and reconstruction of the nigrostriatal dopamine system. *Restorative Neurology and Neuroscience* 19: 67-83

Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A. 1997. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT-1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem* 69: 2612-2615

Gerber S. 2007. Identifikation und Charakterisierung der Dopamin-Rezeptoren des Flohs *Ctenocephalides felis*. (Diss.) unter:
http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=983722293&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=983722293.pdf

Gerlach, Warnke, Wewetzke (Hrsg.), *Neuropsychopharmaka im Kindes- und Jugendalter, Grundlagen und Therapie*, Springer Verlag, Wien, 2004; ISBN: 3-211-00825

Ginsberg SD, Martin LJ, Rothstein JD. 1995. Regional deafferentiation down-regulates subtypes of glutamate transporter proteins. *J Neurochem.* 65(6): 2800-3

Gomes Ca, Simoes PF, Canas PM, Quiroz C, Sebastiao AM, Ferre S, Cunha RA, Ribeiro JA. 2005. GDNF control of the glutamatergic cortico-striatal pathway requires tonic activation of adenosine A₂A receptors. *J Neurochem.* 108 (5): 1208-19,

Gomes CA, Vaz SH, Ribeiro JA, Sebastiao AM. 2006. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) enhances dopamine release from striatal nerve endings in an adenosine receptor- dependent manner. *Brain Res.* 1113(1): 129-36

Graybiel AM. 1990. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *TINS* 13: 244-254

Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL, Pisane P. 2005. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface regulation of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem. Intern.* 46, 337-346

Hanson E, Rönnebeck L. 1988. Neurons from substantia nigra increase the efficacy and potency of second messenger arising from striatal astroglia dopamine receptors. *Glia* 1: 393-397

Hatten ME, Mason CA. 1986. Neuron-astroglia interactions in vitro and in vivo. *Trends Neurosci.* 9: 168-174

Hediger MA. 1999. Glutamate transporters in kidney and brain. *Am. J. Physiol.* 277

- Her LS, Goldstein LS. 2008. Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *J Neurosci.* 28 (50): 13662-72
- Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Ann Rev Neurosci* 17: 31-108
- Holt, DJ, Graybiel Ann M, Saper C.B. 1997. Neurochemical architecture of the human striatum. *J. comp. Neurology* 384: 1-25
- Hu Z, Cooper M, Crockett DP, Zhou R,. 2004. Differentiations of the midbrain dopaminergic pathways during mouse development. *J Com Neurol.* 476 (3): 301-11
- Jain. 2001. Developing Striatal Astrocytes Involves PI₃-Kinase Signaling. *Glia* 46:284-295
- Jin LQ, Wang HY, Friedman E. 2001 Stimulated D₁ dopamine receptors couple to multiple G_αproteins in different brain regions. *J Neurochem.* 78 (5): 981-90
- Jung A.B, Bennett JP.1996. Development of striatal dopaminergic function; dopaminergic regulation of transcription of the immediate early gene zif 268 and of D1 and D2 receptors during pre-and postnatal development. *Dev. Brain. Res.* 14: 121-132
- Kanai Y, Hediger MA. 1992. Primary structure and functional characterisation of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471
- Kerr JN, Wickens JR. 2001. Dopamine D1/D5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. *J Neurophysiol.* 85 (1): 117-24
- Kinor N, Geffen R, Golomb E, Zinman T, Yadid G. 2001. Dopamine increases glial cell line-derived neurotrophic factor in human fetal astrocytes. *Glia* 33: 143-150
- Kon C, Soon-Tae L, Dong-In S. 2007. Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter GLT-1 (EAAT2) upregulation. *Stroke* 38: 177-182
- Kosugi T, Kawahara K, Yamada T, Nakajima T, Tanaka M. 2005. Functional significance of the preconditioning-induced down-regulation of glutamate transporter GLT-1 in neuron/ astrocyte cocultures. *Neurochem.Research*, Vol 30: 1109-1116
- Kosugi T, Kawahara K. 2006. Reversed astrocytic GLT-1 during ischemia is crucial to excitotoxic death of neurons, but contributes to the survival of astrocytes themselves. *Neurochem. Res.* 31: 933-943

Küppers E, Beyer C. 2001. Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport* 12: 1175-1178

Küppers E, Sabolek M, Anders U, Pilgrim C, Beyer C. 2000. developmental regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA expression and splicing in the rat striatum by dopamine. *Mol Brain Res* 81: 19-28

Lauderback CM, Hackett JM, Huang FH, Keller JN, Szweda LI, Markesberry WR, Butterfield DA. 2001. The glial glutamate transporter GLT-1 is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of A β 1-42. *J Neurochem.* 78: 413-416

Lee SG, Su, ZZ, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, Volsky DJ, Fisher PB. 2008. Mechanisms of Ceftriaxone Induction of Excitatory Amino Acid Transporter 2 Expression and Glutamate Uptake in Primary Human Astrocytes. *J Biol Chem.* 283 (19): 13116-13123

Lehmann C, Eisner F, Engele J. 2008. Role of endothelins as mediators of injury- induced alterations of glial glutamate turnover. *J Neurosci Res.* 86 (3): 660-7

Li LB, Vang Toan SV, Zeleniaia O, Watson DJ, Wolfe JH, Rothstein JD, Robinson MB. 2006. Regulation of astrocytic glutamate transporter expression by AKT: evidence for a selective transcriptional effect on the GLT-1/EAAT-2 subtype. *J Neurochem.* 97:759-771

Liebau S. 2004. Vergleichende Analyse der Genexpressionsprofile von humanen adulten neuronalen Stammzellen (Diss.) unter: <http://vts.uni-ulm.de/doc.asp?id=5276>

Liu F, Graybiel AM. 1998. Activity-regulated phosphorylation of cAMP response element binding protein in the developing striatum: implications for patterning the neurochemical phenotypes of striatal compartments. *Dev Neurosci* 20: 229-236

Luk, KC, Kennedy TE, Sandikot AF. 2003. Glutamate promotes proliferation of striatalneuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. *J. Neuroscience*, 23: 2239-2250

Macaulay N, Gether U, Klaerke DA, Zeuthen T. 2002. Water transport by the Na-coupled glutamate cotransporter. *J Physiol.* 530, 357-378

Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. 2006. *Glia* 53(2): 212-224

Maucher T. 2003. Regulation des glialen Glutamattransportes durch den Wachstumsfaktor Fibroblast Growth Factor 2 FGF-2 (Diss.) unter:

http://vts.uni-ulm.de/docs/2004/3822/vts_3822.pdf

Mc Donald J, Althomsons S, Hyre K, Choi D, Goldberg M. 1998. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 4: 291-297

Missale C, Fiorentini C, Busi C, Collo G, Spano PF. 2006. The NMDA/D1 receptor complex as a new target in drug development. *Curr Top Med Chem.* 6 (8):801-8

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225

Mitosek-Szewczyk K, Sulkowski G, Stelmasek Z, Struzynska L. 2008. Expression of glutamate transporters GLT-1 and GLAST in different regions of rat brain during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*, 155(1):45-52

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-62

Nametaka K, Harada C, Kohyama K, Matsumoto Y, Harada T. 2008. Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolarisation. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3273-3280

Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat.Rev Neurosci.* 3: 748-755

Ortuno-Sahagun D, Beas-Zarate C, Adame-Gonzalez G, Feria-Velasco A. 1997. Effect of L-glutamate on cholinergic neurotransmission in various brain regions and during the development of rats, when administered perinatally. *Neurochem Int.* 31(5): 683-92

Ozawa T, Nakagawa T, Shige K, Minami M, Satoh M. 2001. Changes in the expression of glial glutamate transporters in the rat brain accompanied with morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal. *Brain Res.* 905: 254-258

Paoletti P, Vila I, Lizcano JM, Alberch J, Gines S. 2008. Dopaminergic and glutamatergic signalling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration : the role of p25/ cyclin dependent kinase 5. *J Neurosci.* 28 (40): 10090-101

Perego C, Vanoni C, Bossi M, Massari S, Basudev H, Longhi R, Pietrini G. 2000. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures., *J Neurochem.* 75, 1076-1084

Pines J, Toldo L, Lafont F. 1997. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 9(5): 603-4

Plenz T, Kitai ST. 1998. Regulation of the nigrostriatal pathway by metabotropic glutamate receptors during development. *J. Neuroscience* 18: 4133-4144

Queslati A, Sgambato-Faure V, Melon C, Kachidian P, Gubellini P, Amri M, Kerkerian- Le Goff L, Salin P. 2007. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus potentiates L- DOPA- induced neurochemical changes in the striatum in a rat model of Parkinson`s disease. *Journal of Neuroscience* 27, 2377-2386

Reuss B, Leung DSY, Ohlemeyer C, Kettenmann H, Unsicker K. 2000. Regionally distinct regulation of astroglial neurotransmitter receptors by fibroblast-growth-factor-2, *Mol.Cell. Neurosci*,16: 42-58

Reuss B, Unsicker K. 2000. Survival and differentiation of dopaminergic mesencephalic neurons are promoted by dopamine-mediated induction of FGF-2 in striatal astroglial cells. *Mol Cell Neurosci.* 16: 781-792

Reuss B., Unsicker K. 2001. Atypical neuroleptic drugs downregulate dopamine sensitivity on rat cortical and striatal astrocytes. *Mol Cell.Neurosci.* 18: 197-209

Reye, P, Sullivan R, Scott H, Pow DV. 2002. Distribution of Two Splice Variants of the Glutamate Transporter GLT-1 in Rat Brain and Retina. *Glia* 38:246-255

Rodriguez-Kern A, Gegelashvilli M, Shousboe A, Zhang, J, Sung L, Gegelashvilli G. 2003. Bety-amyloid and brain- derived neurotrophic factor, BDNF, upregulate the expression of GLT1-/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-KB. *Neurochem. International* 43:363-370

Rosin DL, Hettinger BD, Lee A, Linder J. 2003. Anatomy of adenosine A₂A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function. *Neurology* 61 (11, Suppl. 6): S. 10-11

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kunci RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16 3): 675-86

Rozyczka J, Figiel M, Engele J. 2004. Endothelins negatively regulate glial glutamate transporter expression. *Brain Pathol.*14 (4): 406-14

Samuelsson C, Kumilien E, Flink R, Lindholm D, Ronne-Engström E. 2000. Decreased cortical levels of astrocytic glutamate transport protein GLT-1 in a rat model of posttraumatic epilepsy. *Neurosci Lett.* 289 (3): 185-188

Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferre S. 2007. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.* 83(5): 277-92

Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, Kalandadze A, Zeleniaia OA, Rothstein JD, Robinson MB. 1998. Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol.* 53 (3):355-69

Schlüter K, Figiel M, Rozyczka J, Engele J. 2002. CNS- region specific regulation of glial glutamate transporter expression. *Eur J Neurosci.* 16(5):836-42

Schmidt U, Beyer C, Oestreicher I, Schilling K, Pilgrim C. 1996. Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons. *Neuroscience* 74: 453-460

Schmidt U, Pilgrim C, Beyer C. 1998. Differentiative effects of dopamine on striatal neurons involve stimulation of the cAMP/PKA pathway. *Mol Cell Neurosci.* 11(1-2):9-18

Shigeri Y, Seal R, Shimamoto K. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev.* 45 (3): 250-265

Sidhu A, Niznik HB. 2000. Coupling of dopamine receptor subtypes to multiple and diverse G proteins. *Int J Dev Neurosci.* 18(7): 669-677

Sidhu A. 1998. Coupling of D₁ and D₅ dopamine receptors to multiple G proteins. Implications for understanding the diversity in receptor G-protein coupling. *Mol Neurobiol.* 16(2): 125-134

St Hilaire M, Landry E, Levesque D, Rouillard C. 2005. Denervation and repeated L- DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of dopamine D₁-dependent mechanisms, *Neurobiology of Disease* 20, 450-460

Storck T, Schulte S, Hofmann S, Stoffel W. 1997. Structure, expression and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10955-10959

Struzynska L, Chalimoniuk M, Sulkowski G. 2005. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in lead-exposed adult brain, *Neurochem. International*, 47, 326-333

Swanson R, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Longuemare MC. 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci.* 17 (3), 932-940

Takano T, Tian GF, Lou N, Han X, Nedergaard M. 2006. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* 9(2):260-267

Tanaka T, Kang J, Jaiswal JK, Simon SM, Lin JHC, Yu Y, Li Y, Dienel G, Zielke HR, Nedergaard M. 2005. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes, *PNAS* 102 (45): 16466-16471

Tawfik VL, Lacroix-Fralish ML, Bercury KK, Nutile-Mc Menemy N, Harris BT; Deleo JA. 2006. Induction of astrocyte differentiation by propentofylline increases glutamate transporter expression in vitro: heterogeneity of the quiescent phenotype. *Glia*, 54 (3): 193-203

Tseng KT, O`Donnell. 2004. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms, *J Neurosci.* 24(22): 5131-5139

Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Yokoyama H, Nakajima A, Mitsuyama Y, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H, Willmore LJ. 2001. Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid. *J Neurochem.* 76 (3):892-900

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

van der Kooy D. 1996. Early postnatal lesions of the substantia nigra produce massive shrinkage of the rat striatum, disruption of patch neuron distribution, but no loss of patch neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 94: 242-245

Vanoni C, Massari S, Losa M, Carrega P, Perego C, Conforti L, Pietrii G. 2004. Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Cell Sci.* 117(22): 5417-26

Vemuganti L, Raghavendra R, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ. 2001. Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci.* 21 (6): 1876-1883

Vermeiren C, de Hemptinne I, Vanhouette N, Tilleux S, Maloteaux JM, Hermans E. 2006. Loss of metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of glutamate transport in chemically activated astrocytes in a rat model of ALS; *J Neurochem.* 96:719-731

Vermeiren C, Najmi M, Vanhoutte N, Tilleux S, de Hemptine I, Maloteaux JM, Hermans E. 2005. Acute up-regulation of glutamate uptake mediated by mGluR5a in reactive astrocytes. *J Neurochem.* 94: 405-416

Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37: 275-286

Wang HY, Undie AS, Friedman E. 1995. Evidence for the coupling of G_q protein to D₁-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation, *Mol Pharmacol* 48(6):988-994

Ward NL, Hagg T. 2000. BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol* 162: 297-310

Wu SS, Frucht SJ. 2005. Treatment of Parkinson's disease: what's on the horizon? *CNS drugs*, 19(9): 723-43

Zanassi P, Paolilla A, Montecucco A, Avvedimento EV, Schinelli S. 1999. Pharmacological and molecular evidence for dopamine D1 receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J Neurosci. Res.* 58: 544-552

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

Zeng XN, Sun XL, Gao L, Fan Y, Ding JH, Hu G. 2007. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes, *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 34-39

Zhou QY, Palmiter RD. 1995. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic and aphagic. *Cell* 83: 1197-1209

Informationen aus dem Internet:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

8. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit durch ihre Erfahrung, Ratschläge, Hilfe und Geduld fachlich wie auch mental Beistand geleistet haben.

In Ulm geht mein Dank an Natalie Damm, Marianne Lehner, Stefan Liebau und Sieglinde Hartwich. In Tübingen bedanke ich mich bei Corinna Gleiser, Xenia Härtel und Veronica Brito.

Ganz besonders dankbar bin ich vor allem meinem Kollegen Jörg Hawes sowie meiner Betreuerin PD Dr. Eva Küppers und Herrn Prof. Dr. Grissmer für ihre Geduld und freundliche Unterstützung.

Vielen Dank zuletzt an meine Eltern und Herrn Dr. Wittmann, die so viel Verständnis für meine langen Arbeitszeiten zeigten und sich bereitwillig als Korrekturleser und Motivatoren zur Verfügung stellten.

9. Lebenslauf

Name:	Verena Eveline Rozanski
Geburtsdatum und –ort:	16. Juni 1984, Augsburg
09/1990-07/1994:	Johann-Strauß-Grundschule, Augsburg
09/1994-07/2000:	Gymnasium Königsbrunn
09/2000-07/2001:	Maria-Theresia-Gymnasium, Augsburg
09/2001-07/2003:	A.B. von Stetten´sches Institut, Augsburg Abschluss: Abitur (Note: 1,0)
10/2003-12/2009:	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
10/2006-10/2009:	Studium der Philosophie an der Universität Ulm mit dem Abschluss des „Bachelor of Arts“
Famulaturen:	
03/2006:	Famulatur in der Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Bartels, Berlin
09/2006:	Famulatur in der Abteilung für Neurochirurgie, Charité Campus Virchow, Berlin
03/2007:	Famulatur in der Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie, Charité Campus Mitte, Berlin
08/2007:	Famulatur im Department of Neurology, No 10 People`s Hospital, Shanghai, China
08/2008-07/2009:	Praktisches Jahr am Bundeswehrkrankenhaus Ulm
25.11.2009	Ärztliche Prüfung (Staatsexamen) an der Universität Ulm
Weitere Qualifikationen:	
06/2000:	First Certificate of English, University of Cambridge
06/2001:	Certificate of Advanced English, Cambridge
Seit 10/2003:	Stipendiatin der Bayerischen Begabtenförderung