

**Molekularbiologische, zellbiologische
und funktionelle Analyse
der L-Glutamat-Neurotransmitter-Transporter
des Zentralnervensystems**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**



**vorgelegt von
Christine Kiss
aus Friedrichshafen**

Hundt Druck GmbH, Köln

2008

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel

Prof. Dr. G. Schwarz

Vorsitz: Prof. Dr. A. G. Griesbeck

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2008

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel danke ich für die interessante Themenstellung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich insbesondere für die theoretische und praktische Ausbildung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. G. Schwarz danke ich für die Übernahme des Coreferats.

Mein Dank gilt ferner

Frau Britta Jenke, Frau Barbara Holz, Frau Erika Binczek, Frau Claudia Taprogge und Frau Brigitte Handwerk für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung, insbesondere Frau Britta Jenke für die Generierung der induzierbaren *Cre*-transgene Mauslinie und Frau Barbara Holz für ihre hervorragende technische Unterstützung in der Zellkultur und der Blastozysteninjektion,

Frau Dipl. Biol. Ina Hammels, Herr Dr. Robert Günter, Herr Dr. Stefan Meinzinger und Dr. Lennart van Hoch für die gute Arbeitsatmosphäre, Unterstützung und Hilfe, Frau Dipl. Biol. Ina Hammels für die kollegiale Arbeitsaufteilung und Dr. Robert Günter für seine Hilfestellung in Computerangelegenheiten, und allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerhalb des Arbeitskreises möchte ich mich bei Frau Anieke Fimmen, Herr Dr. András Frankó und Herr A. Springer bedanken.

Meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zelltypen des Nervensystems und ihre Funktion	1
1.2	Glutamat – Stoffwechselintermediat und Neurotransmitter	3
1.3	Die glutamaterge Synapse	4
1.4	Glutamattransporter im Gehirn.....	5
1.5	Die Glutamattransporterfamilie.....	7
1.6	Lokalisation der Glutamattransporter	10
1.7	Topologie der Glutamattransporter	12
1.8	Glutamatrezeptoren	14
1.8.1	Ionotrope Glutamatrezeptoren.....	15
1.8.2	Metabotrope Glutamatrezeptoren.....	16
1.9	Zur Rolle des Glutamat Neurotransmitters.....	17
1.10	Glutamat und neurologische Erkrankungen	19
1.11	Glutamattransporter defiziente Mauslinien	20
1.12	Gene <i>targeting</i> – gezielter Austausch von Genen durch homologe Rekombination... ..	22
1.13	Induzierbares <i>Cre</i> -System	24
2	Aufgabenstellung.....	26
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Strategie zur induzierbaren Ausschaltung des GLT-1 Gens.....	28
3.1.1	Konditionelle GLT-1 <i>targeting</i> Konstrukte.....	28
3.1.1.1	Konditionelles GLT-BS Konstrukt	28
3.1.1.2	Konditionelles GLT-RF Konstrukt	32
3.1.2	Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen.....	36
3.1.2.1	Homologe Rekombination des <i>targeting</i> Vektors GLT-BS	36
3.1.2.2	Homologe Rekombination des <i>targeting</i> Vektors glt-RF.....	38
3.1.3	Transiente FRT- und <i>Cre</i> -Expression.....	39
3.1.3.1	Transiente <i>Cre</i> -Expression in GLT-BS	40
3.1.3.2	Transiente Flp- und <i>Cre</i> -Expression in GLT-RF	42
3.1.4	Charakterisierung homolog rekombinierter ES-Zell Klone	45
3.2	Blastozysteninjektion.....	46
3.3	Induzierbare <i>Cre</i> -transgene Mauslinien	47
3.3.1	Funktionalität der induzierbaren <i>Cre</i> in Zellkulturstudien.....	49
3.3.2	Funktionalität der Doxyzyklin induzierten <i>Cre</i> -Expression in der Maus	51
3.3.3	Tamoxifen-aktivierbare <i>Cre</i> -Rekombinase	54
3.4	Glutamattransporter defiziente Mauslinien	54
3.5	Lokalisation cerebraler Glutamattransporter	55
3.6	Zelltransfektion.....	58
3.6.1	Erstellung der Konstrukte.....	58
3.6.2	Nachweis der Expression transfizierter Zellen.....	60
3.6.2.1	C6-Zellen.....	60
3.6.2.2	HEK293-Zellen	61
3.7	Expressionsstudien	63
3.7.1	Gehirnextrakt.....	65
3.7.2	Einfluss von Glutamat auf die Expression	66
3.7.2.1	Immortalisierte Gliazellen.....	67
3.7.2.2	Glialen Primärkulturen.....	68
3.8	Funktionelle Analyse des Glutamattransporters GLT-1 in HEK293 Zellen	70
4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	71
5	Diskussion und Ausblick	73
5.1	<i>Gene targeting</i>	73
5.2	Transiente <i>Cre</i> -und <i>Frt</i> -Expression.....	74

5.3	Blastozysteninjektion.....	75
5.4	Induzierbare <i>Cre</i> -Rekombinase.....	76
5.5	Epileptische Mausmodelle.....	79
5.6	Regulation der Glutamattransporter.....	80
5.7	Funktionalitätsstudien des Glutamattransporters GLT-1.....	82
6	Methoden.....	84
6.1	Molekularbiologische Methoden.....	84
6.1.1	DNA-Präparation.....	84
6.1.1.1	Plasmid-DNA-Präparation.....	84
6.1.1.2	Genomische-DNA-Präparation.....	84
6.1.2	Enzymatische DNA Restriktion.....	84
6.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	85
6.1.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	85
6.1.5	<i>Southern blot</i> Hybridisierung.....	85
6.1.6	RNA-Präparation.....	85
6.1.7	cDNA-Synthese.....	85
6.1.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	86
6.1.9	Ligation.....	87
6.1.10	Transformation.....	87
6.1.11	Sequenzierung.....	87
6.2	Proteinchemische, immunologische und histologische Methoden.....	88
6.2.1	Extraktion von Gesamtproteinen aus HEK293 Zellen.....	88
6.2.2	Western blot.....	88
6.2.3	Immunofärbung an GLT-1 exprimierenden HEK293 und C6 Zellen.....	89
6.2.4	Immunofärbung an Paraffinschnitten.....	89
6.2.5	Karyotypenbestimmung.....	89
6.2.6	Alkalische Phosphatase Färbung.....	90
6.3	Zellbiologische Methoden.....	91
6.3.1	Kultur embryonaler Stammzellen.....	91
6.3.2	Elektroporation embryonaler Stammzellen.....	91
6.3.3	Isolation selektionierter ES-Zellklone.....	92
6.3.4	Einfrieren und Auftauen positiver ES-Zellklone.....	92
6.3.5	Transiente <i>Cre</i> - bzw. <i>FRT</i> -Expression.....	92
6.3.6	Expression in HEK293- und C6-Zellen.....	93
6.3.7	Isolierung glialer Primärkulturen.....	93
6.4	Methoden zur Erzeugung transgener Mäuse.....	94
6.4.1	Mäusezucht.....	94
6.4.2	Blastozystenspender.....	94
6.4.3	Blastozysteninjektion.....	94
6.4.4	Vasektomierte Männchen.....	94
6.4.5	Reimplantation von Blastozysten in scheinchwangere <i>foster</i> -Mütter.....	95
6.4.6	Mikroinjektion.....	95
6.4.7	Doxyzyklin Applikation.....	95
7	Materialien.....	96
7.1	Plasmide.....	96
7.2	Oligonukleotide.....	96
7.3	Antikörper.....	99
8	Literaturverzeichnis.....	100
	Zusammenfassung.....	116
	Abstract.....	118

1 Einleitung

1.1 Zelltypen des Nervensystems und ihre Funktion

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) setzt sich im Wesentlichen aus vier Zelltypen zusammen, die schematisch in Abbildung 1 dargestellt sind.

Die Signalübertragung im Nervensystem erfolgt durch **Neuronen**; deren Dendriten eine vom Zellsoma ausgehende verästelte Struktur bilden und Verbindungen zu anderen Neuronen oder Zellen eingehen. Dabei empfangen sie Signale und leiten diese zum Zellsoma weiter. Die ankommenden Signale am Axonhügel lösen bei einem Schwellenwert ein Aktionspotential aus, das dem Alles-oder-Nichts Gesetz folgt und werden anschließend über das Axon fortgeleitet.

Oligodendrozyten ummanteln mit ihren zahlreichen Fortsätzen segmentartig bis zu 100 Axone mit mehreren Membranschichten. Da sich in myelinisierten Axonabschnitten nur wenige für die Erregungsweiterleitung wichtige Ionenkanäle befinden und die Myelinschicht die Axonmembran gegen den Extrazellulärraum isoliert, hat der internodale Bereich eine sehr niedrige Kapazität im Vergleich zu myelinisierten Axonen.

Die Übermittlung von Signalen im Nervensystem beruht auf einer sprunghaften Veränderung der Potentialdifferenz an den jeweils benachbarten Membransegmenten, den Ranvierschen Schnürringen. Die saltatorische Erregungsleitung hat einen ca. 10 fachen Geschwindigkeitsgewinn gegenüber unmyelinisierter Weiterleitung und eine große Energieersparnis zur Folge. Das Ruhepotential von -80mV wird durch $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpen unter permanenten ATP-Verbrauch durch Verschieben von Kalium-Ionen ins Zellinnere und Natrium-Ionen in den Extrazellulärraum aufrechterhalten. Wird das Ruhepotential auf chemische oder physikalische Weise aufgehoben, werden die in der Membran befindlichen spannungsgesteuerten K^+ - und Na^+ -Kanäle geöffnet und sorgen für die sprunghafte Depolarisation der Membran.

Die Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen erfolgt an Synapsen, die sich an den Kontaktpunkten bilden. Der Informationsfluss geht von der prä- zur postsynaptischen Nervenendigung aus, wobei das elektrische Signal an der präsynaptischen Endigung in ein chemisches Signal umgewandelt wird. Es kommt zu Ausschüttung von Neurotransmittern, die an der Postsynapse Rezeptoren aktivieren, die das chemische Signal wieder in ein elektrisches umwandeln können (Changeux *et al.*, 1993).

Das Gehirn ist ein „immunprivilegiertes“ Organ, das kein lymphatisches System besitzt. Dem dritten Gehirnzelltyp, der **Mikroglia**, kommt eine Immunfunktion zu. Sie werden zwar formal zur Familie der Gliazellen gerechnet, im eigentlichen Sinn handelt es sich

jedoch um Zellen des mononuklear-phagozytären Systems. Die lang gestreckten Zellen weisen einen irregulären, länglichen Zellkern mit dichtem Chromatin auf. Die Zellfortsätze können fein und sehr verzweigt sein. Mikroglia-Zellen sind in der Lage sich amöboid fortzubewegen. Sie entstehen im Gegensatz zu allen anderen Gliazellen nicht während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste und dem Neuralrohr, sondern aus Vorläuferzellen des blutbildenden Systems. Sie gehören zu den mesenchymalen Zellen, die während der embryonalen Entwicklung über Blutgefäße in das ZNS eindringen. Man findet Mikroglia sowohl in der weissen als auch in der grauen Substanz. Bei einer Gewebeläsion werden die Mikrogliazellen in große, phagozitierende Zellen umgeformt. Voraussetzung für diese Funktion ist eine spezielle molekulare Aktivierung (Rock *et al.*, 2004).

Astrozyten weisen einen verhältnismäßig kleinen Zellkörper und zahlreiche, teilweise verzweigte Fortsätze auf. Aufgrund ihrer Morphologie können folgende Typen unterschieden werden:

- Faserglia (Astrocytus fibrosus) besitzen zahlreiche, schlanke und wenig verzweigte Fortsätze. Sie kommen vor allem in der weißen Substanz vor.
- Die Fortsätze der protoplasmatischen Glia (Astrocytus protoplasmaticus) sind reichverzweigt und dicker. Sie sind charakteristisch für die graue Substanz.

Astrozyten sind am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt. So nehmen sie zum Beispiel durch die Aufnahme des Neurotransmitters Glutamat aus dem exzitatorischen synaptischen Spalt an der Informationsverarbeitung im Gehirn teil. Sie sind maßgeblich an der Flüssigkeitsregulation im Gehirn beteiligt und sorgen für die Aufrechterhaltung des Kalium-Haushaltes. Die sternförmig verzweigten Zellen bilden mit ihren Fortsätzen die Grenzmembran zur Gehirnoberfläche und zu den Blutgefäßen aus. Sie sind an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Darüber hinaus stellen sie die Versorgung der Nervenzelle mit Cholesterin sicher und sind an der Apolipoprotein E Bildung beteiligt.

Eine spezielle Form der Astrozyten ist die Radialglia. Sie nehmen eine wichtige Rolle als Leitstrukturen in der frühen Hirnentwicklung ein. Im ausgereiftem Säugergehirn sind sie nur noch im Kleinhirn als Bergmann-Glia und in der Retina als Müllerglia vorhanden.

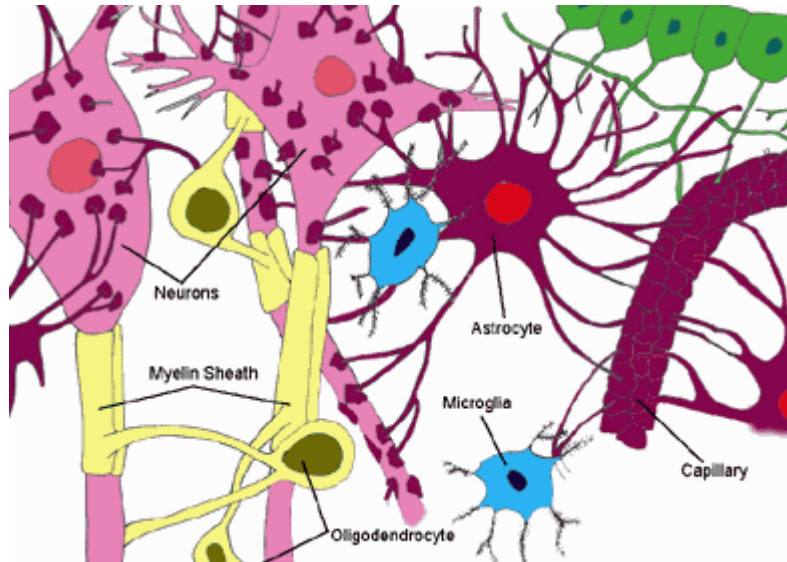


Abb.1: Schematische Darstellung wesentlichen Zelltypen des Nervensystems
 Die Oligodendrozyten ummanteln die Axone der Neuronen. Die Astrozyten werden über Blutkapillaren versorgt und umschließen die Zellkörper der Neuronen (<http://library.thinkquest.org>).

Die Astrozyten haben zahlreiche Fortsätze mit denen sie mit Oligodendrozyten, anderen Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen über Kanäle (*gap junctions*) in Verbindung stehen. Auf diese Weise bilden die zusammen als Gliazellen bezeichneten Astrozyten und Oligodendrozyten ein ausgedehntes Netzwerk in grauer und weißer Substanz aus (Mugnaini, 1986; Rasch *et al.*, 1997). Astrozyten und Oligodendrozyten sind bei der Regulation des zellulären Milieus wesentlich (Deitmer, 2001) und darüber hinaus bei der Steuerung des Neuronenwachstums beteiligt (Banker, 1980; Byavan *et al.*, 1994). Gliazellen machen einen Anteil aller Zellen im Gehirn von 65% in Nagern und 90% in Menschen aus (Pfrieger und Barres, 1995).

1.2 Glutamat – Stoffwechselintermediat und Neurotransmitter

Glutamat wird aus der dem Citratzyklus entstammenden α -Ketoglutarat und Ammoniak durch die Glutamatdehydrogenase gebildet. Dabei entsteht zunächst eine Iminverbindung, die unter Einwirkung von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) zu Glutamat reduziert wird. Die Glutaminsäure dient als NH_2 -Lieferant für Transaminierungsreaktionen und ist außerdem die Vorstufe für die Aminosäure Ornithin und ein Baustein der Folsäure.

Glutamat wurde aufgrund ihrer mannigfaltigen Aufgabe erst relativ spät als Neurotransmitter im ZNS von Säugern entdeckt (Fonnum, 1984). Im Gegensatz zu reinen neuronalen Botenstoffen wie z.B. Adrenalin, Noradrenalin oder γ -Aminobuttersäure (GABA) ist Glutamat aufgrund seiner zentralen Stellung überall im Gehirn anzutreffen

und sein Vorkommen nicht wie das anderer Transmitter auf bestimmte Bereiche beschränkt. Es ist die einzige Aminosäure, die im Gehirn oxidiert, transaminiert, aminiert und decarboxyliert wird. Aus der Decarboxylierung des exzitatorischen Transmitters Glutamat wird der inhibitorische neuronale Botenstoff GABA gebildet. Das Glutamat erfüllt alle zur Klassifizierung eines Neurotransmitters notwendigen Kriterien. Es ist präsynaptisch in spezifischen Neuronen lokalisiert und wird auf bestimmte Stimuli von der Ruhezustandkonzentration (etwa 1 μM) hin in entsprechende Mengen (1 mM) in den synaptischen Spalt freigesetzt, dass es eine postsynaptische Antwort hervorruft (Cambell und Shank, 1993). Mittels hochaffiner Transportsysteme wird der Neurotransmitter rasch und effizient aus dem synaptischen Spalt entfernt.

Glutamat, der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter unter den Aminosäuren im ZNS, kommt in allen Regionen des Gehirns in sehr hoher Konzentration vor (10 mM/kg Nassgewicht). Die Glutamatkonzentration im Nervensystem ist 100-fach höher als die von anderen Neurotransmittern, wie z.B. Dopamin, Serotonin, Taurin oder Noradrenalin (Danbolt *et al.*, 1994).

1.3 Die glutamaterge Synapse

Im Ruhezustand weisen die Nervenendigungen an den glutamatergen Synapsen einen mehrtausendfachen Glutamatkonzentrationsgradienten über der Plasmamembran auf. Während die Glutamatkonzentration intrazellulär in synaptischen Vesikeln 60–120 mM (Clements, 1992; Nicholls und Attwell, 1990) beträgt, wird sie extrazellulär auf 2-5 μM reguliert (Erecinska und Silver, 1990). Durch ein Aktionspotential wird die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran ausgelöst. Die darauffolgende Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt bewirkt einen extrazellulären Anstieg der Glutamatkonzentration auf 0,1-1 mM. An der nachgeschalteten Postsynapse löst das freigesetzte Glutamat ein Generatorpotential über unterschiedliche Typen von Rezeptoren aus.

1.4 Glutamattransporter im Gehirn

Im Hinblick auf eine getreue Signalweiterleitung und zur Vermeidung exzitatorischer Schädigung ist ein schnelles Entfernen des ausgeschütteten Transmitters aus dem synaptischen Spalt von größter Bedeutung. Ein extrazelluläres Abbausystem, wie z.B. die Acetylcholinesterase für das Acetylcholin, gibt es für Glutamat nicht. Die Aufnahme des Glutamats nach der Diffusion im synaptischen Spalt erfolgt durch hochaffine Transportsysteme, die in den Gliazellen und Neuronen lokalisiert sind.

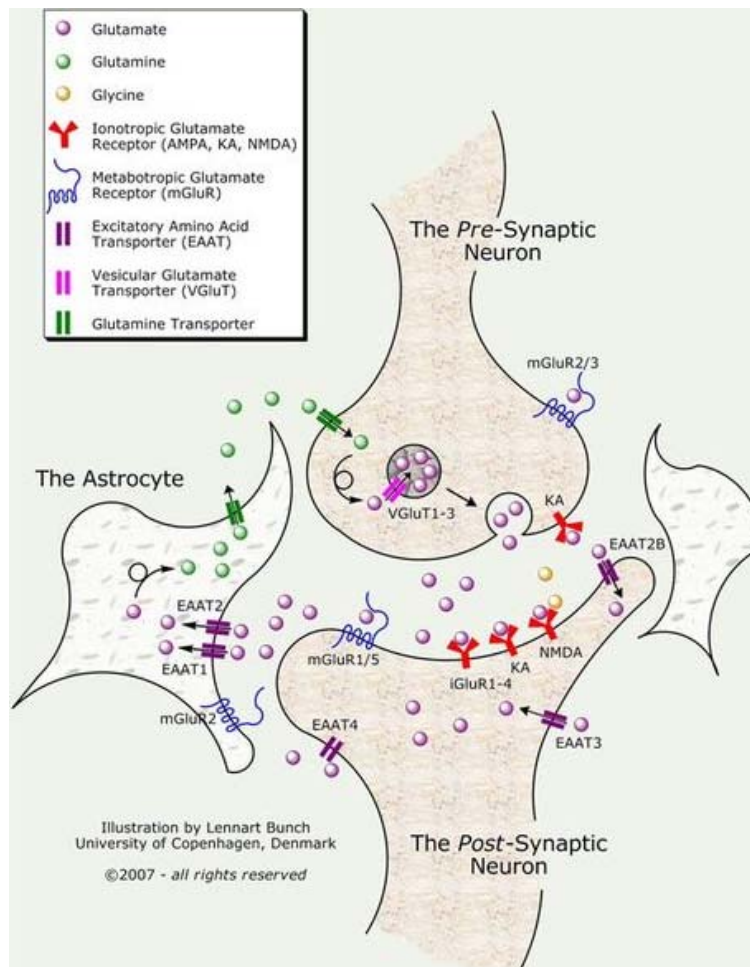


Abb. 2: Stoffwechsel und Transportvorgänge an der glutamatergen Synapse

Glutamat (roter Punkt) wird über die entsprechenden Transporter EAAT1-4 in die Zelle aufgenommen. SN und SA sind die Glutamin-Transporter. Von den ionotropischen Rezeptoren sind nur der NMDA- und der AMPA- Rezeptor aufgeführt. Die metabotrope Glutamatrezeptoren sind mit der Nervenzelle und der postsynaptischen Membran assoziiert (Bunch, 2007).

Zur Rückgewinnung aus dem synaptischen Spalt in präsynaptische Vesikel wird das in Gliazellen aufgenommene Glutamat zunächst metabolisiert (Abb. 2). Dabei entsteht Glutamin aus katalytischer Amidierung durch die Glutaminsynthetase oder α -Ketoglutarat durch die Glutamatdehydrogenase bzw. die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. Da Glutamin kein Ligand der Glutamatrezeptoren ist, kann es in den synaptischen Spalt entlassen und von dort durch ein Na^+ -unabhängiges Transportsystem wieder in die glutamatergen Neuronen aufgenommen werden. Dort katalysiert die mitochondriale Glutaminase eine Regeneration des Glutamats. α -Ketoglutarat kann als Substrat in den Citratzyklus der Gliazellen eingehen oder gelangt durch einen Na^+ -abhängigen Transporter wieder in die Nervenendigungen, wo es als Vorstufe für Glutamat oder γ -Aminobutyrat (GABA) die Transmittervorräte auffüllt (Ercinska und Silver, 1990).

Somit kommt den Glutamattransportern die Aufgabe zu, die Konzentrationsgradienten im Nervensystem aufrecht zu erhalten, die Neurone vor einer schädigenden Glutamatkonzentration zu schützen und eine präzise Reizweiterleitung sicherzustellen ((Storck *et al.*, 1992; Danbolt *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1993; Kanner *et al.*, 1993).

Die Glutamat-Transporter beziehen ihre Energie zur Glutamat-Akkumulation aus dem elektrochemischen Na^+/K^+ -Ionengradienten. Sie nutzen dabei die freie Enthalpie, die in einem elektrochemischen Potentialgradienten gespeichert ist, als Antriebskraft (Sekundärer Aktiver Transport). Sie sind in der Lage, extrazelluläre Glutamatkonzentrationen aufrecht zu erhalten, die unterhalb der Glutamatrezeptoraktivierung liegen.

1.5 Die Glutamattransporterfamilie

Der hochaffine Glutamattransporter gehört zur SCL1 Familie zu der auch die neutralen Aminosäuretransporter ASC (Alanin, Serin, Cystein) zählen. In Abbildung 3 sind die phylogenetischen Beziehungen dargestellt.

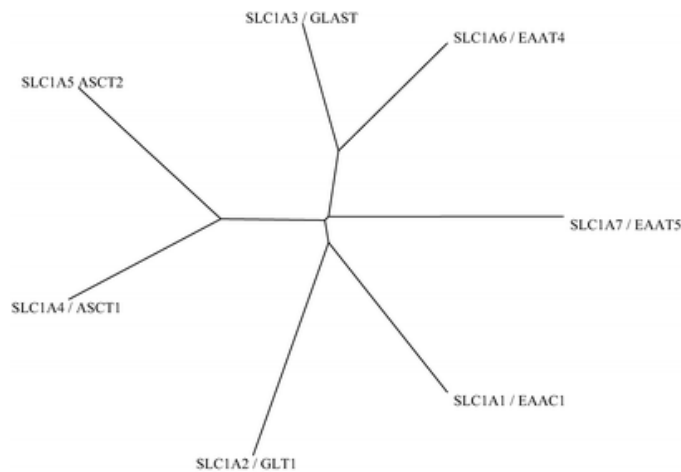


Abb. 3: Phylogenetischer Baum der SLC Familie

Die SCL1 Familie setzt sich aus zwei Unterklassen, den hochaffinen Glutamat-Transportern (SLC1A1, 2, 3, 6 und 7) und den ASC neutralen Aminosäure-Transportern (SLC1A4 und 5) zusammen (Kanai *et al.*, 2004).

Die in der Säugetiermembran lokalisierten Aminosäure-Transporter unterscheiden sich im Transport für kationische

und zwitterionische Aminosäuren sowie in ihrer Natrium- bzw. Chlorid-Abhängigkeit.

Die Familie des natriumabhängigen Glutamattransporters für anionische Aminosäuren umfasst fünf exzitatorischen Aminosäuretransporter (EAAT1-5), deren humane Isoformen eine Aminosäuresequenz-Identität zwischen 36% und 65% aufweisen (Abb. 3). Die neutralen Aminosäuretransporter ASCT1 und ASCT2 zeigen eine 57%ige Identität ihrer Aminosäuresequenz. Die Identität der zwei Unterklassen, der Glutamattransporter und neutralen Aminosäuretransporter liegt zwischen 40-44%.

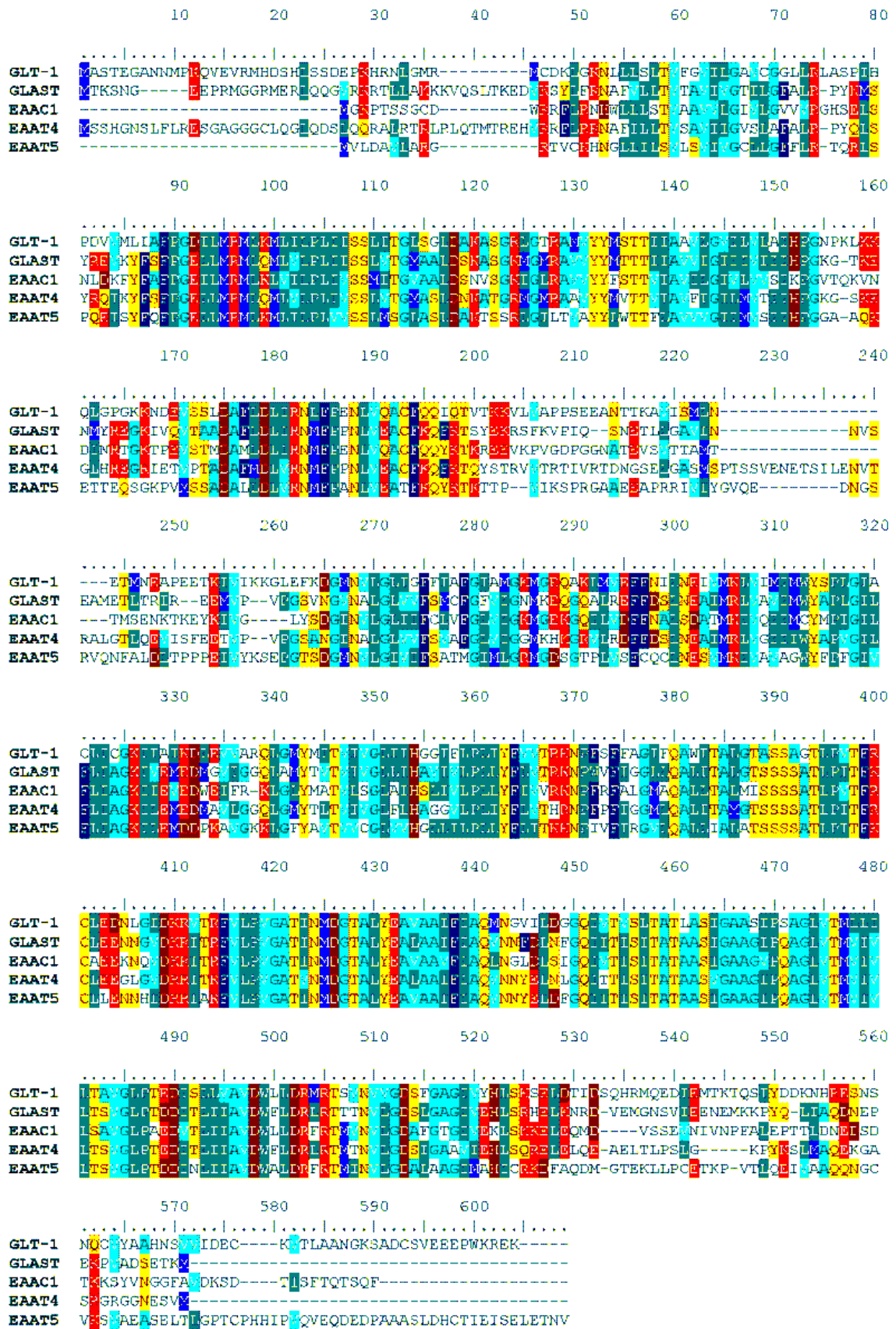


Abb. 4: Sequenzvergleich von Glutamat Transportern der Maus

Der für den Transport wichtige C-terminale Bereich zeigt eine hohe Identität. Unpolare Aminosäuren sind in blauen, ungeladene, polare in gelben und geladene, polare Aminosäuren in roten Farben dargestellt (Günter, 2007).

Die transmembranalen Glutamattransporter Glykoproteine zeichnen sich durch ihre Na⁺-abhängige Aktivität und ihrer hochaffinen Eigenschaft gegenüber Glutamat aus. Auf unterschiedlichen Wegen entdeckten 1992 drei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen fast gleichzeitig drei isoforme Glutamattransportertypen (GLAST, GLT1 und EAAC1). Stoffel und seine Mitarbeiter (Storck *et al.*, 1992) reinigten während der Isolation der Galaktosyltransferase ein 66kDa großes hydrophobes Glykoprotein aus dem Gehirn einer Ratte, das nach Protein-Mikrosequenzierung und durch die Klonierung der Oligonukleotidfragmente in der Isolierung der GLAST cDNA (EAAT1) resultierte. Kanner und seine Mitarbeiter dagegen (Danbolt *et al.* 1990) isolierten aus den Gliazellen der Ratte ein 70-80 kDa großes Glykoprotein, das L-Glutamattransportaktivität zeigte. Nach der Erzeugung eines Antikörpers gegen das Protein (Danbolt *et al.*, 1992) konnte die GLT-1 cDNA (EAAT2) isoliert werden. Transfektion von EAAT2 in HeLa Zellen resultierte in einer natriumabhängigen Glutamataufnahme in einer Rekonstruktion in Liposomen (Pines *et al.*, 1992). Und schließlich isolierte Hedigers Arbeitsgruppe EAAC1 (EAAT3) (Kanai *et al.*, 1992) aus dem Dünndarm des Kaninchens.

Da die Transporteigenschaften von EAAT1-3 die unterschiedlichen Transportaktivitäten in der Retina und im Kleinhirn nicht erklärt, wurde deshalb die EAAT4 cDNA unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide zweier konservierter Regionen von EAAT1-3 als Startpunkt der RT-PCR basierenden Klonierungsstrategie isoliert (Dehnes *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1996). Expression in Oocyten bestätigen die natriumabhängige L-Glutamat-Transportaktivität von EAAT4. EAAT5 wurde aus humaner Retina isoliert (Arriza *et al.*, 1997). Die beiden Na⁺-abhängigen neutralen Aminosäuretransporter ASCT1 und ASCT2 wurden auf der Sequenzhomologie basierend identifiziert (Arriza *et al.*, 1993; Kekuda *et al.*, 1996 ; Shafquat *et al.*, 1993; Utsunomiya-Tate *et al.*, 1996).

1.6 Lokalisation der Glutamattransporter

Die einzelnen Mitglieder der Glutamat-Transporter-Familie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung. GLAST-1 und GLT-1 sind hauptsächlich auf die Astrozyten des ZNS begrenzt (Lehre *et al.*, 1995; Rothstein *et al.*, 1994; Schultz und Stell, 1996; Wadiche *et al.*, 1995), aber auch in den Müller-Zellen der Retina (Rauen *et al.*, 2004) und in Neuronen (Mennerick *et al.*, 1998) zu finden. Antikörper gegen sowohl C-terminale wie auch N-terminale Domänen von GLT-1 weisen die höchsten Konzentrationen von GLT-1 in Astrozyten des ZNS, Hippocampus und Großhirn Cortex auf. Antikörper gegen den C-Terminus und das Gesamtprotein GLAST-1 zeigen dies für GLAST-1 in den Bergmann Gliazellen des Cerebellums (Lehre *et al.*, 1995; Rothstein *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1997; Storck, 1994), in den inneren Haarzellen der Cochlea (Furness und Lehre, 1997; Li *et al.*, 1994; Hakuba *et al.*, 2000; Furness *et al.*, 2002) und in der Hypophyse (Redecker und Pabst, 2000). In Gewebekulturen von Neuronen konnte eine GLT-1 Expression beobachtet werden (Mennerick *et al.*, 1998), sowie eine Transkription in Pyramidenzellen des Hippocampus (Schmitt *et al.*, 1997; Torp *et al.*, 1997) und darüber hinaus eine transiente Expression in den Neuronen des sich entwickelnden Gehirns (Northington *et al.*, 1999). GLT-1 und GLAST-1 werden in variierendem Verhältnis, abhängig von der Region und der benachbarten glutamatergen Synapse in Astrozyten koexprimiert (Chaudhry *et al.*, 1995; Haugeto *et al.*, 1996; Lehre *et al.*, 1995). Die im Gehirn assoziierten Glutamattransporter GLAST-1 und GLT-1 werden durchaus auch im peripherem Gewebe exprimiert (Berger und Hediger, 2006). In früheren Studien wurde die GLAST-1 Expression bereits in Plazenta (Matthews *et al.*, 1998), Pankreas (Howell 2001), Brustdrüse (Martinez-Lopez *et al.*, 1998) und Knochen beschrieben (Mason *et al.*, 1997, Mason, 2004); indessen die GLT-1 Expression in der Plazenta (Matthews *et al.*, 1998) sowie den Knochen (Mason *et al.*, 1997; Mason, 2004) beschrieben wurde. GLT-1 wurde zudem in Leber, Muskeln, Ovar, Hoden, Pankreas und Niere detektiert (Howell *et al.*, 2001). GLAST-1 zeigt eine weitere Verbreitung im peripheren Gewebe als GLT-1, wobei meistens keine Überlappung in den peripheren Zellen vorliegt. Frühere Studien von Berger und Hediger (2006) zeigten, dass GLAST-1 in den peripheren Organen im wesentlichen in Epithelzellen und zudem in Macrophagen, Lymphozyten, Fettzellen und Speicheldrüse exprimiert werden. GLT-1 hingegen wird überwiegend im Drüsengewebe, wie Brustdrüsen, Milchdrüse, Speicheldrüse aber auch in Hepatozyten und in den folliculären dendritischen Zellen der Milz und der Lymphdrüsen exprimiert. Die Expression der Glutamattransporter im peripheren Gewebe könnte eine

Bedeutung im metabolischem Stoffwechsel und darüber hinaus in der parakrinen Kommunikation unmittelbar benachbarter Zellen einnehmen (Berger und Hediger, 2006).

	GLAST-1 (EAAT1)^a SLC1A3	GLT-1 (EAAT2)^d SLC1A2	EAAC1 (EAAT3)^g SLC1A1	EAAT4ⁱ SLC1A6	EAAT5^j SLC1A7
Aminosäure-Sequenz	543	572 558 (GLT-1b)	534	561	560
Molekulargewicht	66kDa 60kDa	73kDa/62kDa* 61kDa*(GLT-1b)	69kDa ^h 57kDa*	61kDa*	61kDa*
Gewebe	Gehirn Plazenta ^k Pankreas ^l Brust ^m Knochen ⁿ	Gehirn, Retina ^e , Plazenta ^k , Knochen ⁿ , Leber ^l , Niere ^l , Muskel ^l , Hoden ^l , Eierstöcke ^l , Pankreas ^l	Dünndarm, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Muskel, Niere, Plazenta	Gehirn	Gehirn
Zellebene des Gehirns	Bergmann-Glia-Zellen, Neuronen	Astrozyten, Neuronen	Astrogliazellen, Neuronen	Cerebrale Purkinje, Dendriten	Müllerzellen der Retina
K_M für L-Glu	77µM/ 11µM ^{**c}	36-97µM ^f	12µM	?	?

Tab. 1: Übersicht über die Genfamilie der membranständigen Glutamatttransporter

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

a (Stork, 1994; Stork *et al.*, 1992), **b** (Slotboom *et al.*, 1996; Wahle und Stoffel, 1996), **c** (Arriza *et al.*, 1994; Gegelashvili *et al.*, 1997; Klockner *et al.*, 1994; Stork *et al.*, 1992), **d** (Danbolt *et al.*, 1990; Pines *et al.*, 1992), **e** (Rauen *et al.*, 2004), **f** (Arrizza *et al.*, 1994; Kirschner *et al.*, 1994; Pines *et al.*, 1992; Zerangue *et al.*, 1995), **g** (Kanai und Hediger, 1992), **h** (Valez-Faircloth *et al.*, 1996), **i** (Dehnes *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1996), **j** (Arriza *et al.*, 1997), **k** (Matthews *et al.*, 1998), **l** (Howell 2001), **m** (Martinez-Lopez *et al.*, 1998), **n** (Mason *et al.*, 1997, Mason, 2004).

EAAC1 wird in unterschiedlichen Gehirnregionen (Berger *et al.*, 1997; Kanai *et al.*, 1995) überwiegend im Hippocampus, der Hirnrinde, im Riechkolben, im Striatum, im Thalamus prä- (Bliss und Collingridge, 1993; Kanai und Hediger, 1992) und postsynaptisch (Rothstein *et al.*, 1994) exprimiert. Nachzuweisen ist es auch außerhalb des Nervensystems: in Niere (Arriza *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1994; Kanai und Hediger, 1992), Herz (Arriza *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1994; Kanai & Hediger, 1992), Muskel (Mukainaka *et al.*, 1995), Lunge (Arriza *et al.*, 1994; Mukainaka *et al.*, 1995), Plazenta (Arriza *et al.*, 1994), Darm (Kanai *et al.*, 1994) und Leber (Kanai *et al.*, 1994; Kanai und Hediger, 1992; Torp *et al.*, 1994). *Northern-Blot* Analysen zeigten für EAAC1 die

stärkste Expression in peripheren Geweben (Nakayama *et al.*, 1996). In der Niere wurde EAAC1 in der apikalen Membran des proximalen Tubulus nachgewiesen (Shayakul *et al.*, 1997). Neben glutamatergen Neuronen ist EAAC1 auch in GABAergen Neuronen wie Purkinjezellen und Vorderzellen des Rückenmarks (Rothstein *et al.*, 1994; Velaz-Faircloth *et al.*, 1996), in Astrozyten (Conti *et al.*, 1998) und in der Retina (Rauen und Kanner, 1994; Schultz und Stell, 1996) nachzuweisen.

EAAT4 ist hauptsächlich auf die cerebellaren Purkinje Dendriten (Dehnes *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1996; Fairman *et al.*, 1995; Nagao *et al.*, 1997) beschränkt, EAAT5 wird selektiv in der Retina (Arriza *et al.*, 1997) exprimiert.

1.7 Topologie der Glutamattransporter

Glutamattransporter sind Glykoproteine, die aus bis zu 600 Aminosäuren aufgebaut sind und ein Molekulargewicht abhängig von ihrer Glykosylierung zwischen 60 bis 85 kDa besitzen (Schulte *et al.*, 1995 ; Danbolt *et al.*, 1992; Lehre *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1993, Rothstein *et al.*, 1994). Die Struktur der Glutamat-Transporter wird kontrovers diskutiert. Ihnen allen sind die ersten sechs hochkonservierte membrandurchspannende α -helikale Domänen im N-terminalen Bereich, die klar aus der Hydrophatit-Analyse nach Kyde-Dolittle hervorgehen, gemeinsam. Der Mangel einer „cleavable“-Signalsequenz und immunohistochemische Studien zeigen, dass sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus zytosolisch vorliegen (Danbolt, 2001). Der intrazelluläre Teil könnte sowohl für die Lokalisation als auch für die Aktivität über Interaktion mit anderen zytosolischen Proteinen von Bedeutung sein. Die intrazelluläre Stimulierung über Kinasen zeigt eine verstärkte Aktivität. Gemeinsamkeiten bestehen in den N-Glykosylierungsstellen der extrazellulären Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne (Storck *et al.*, 1992; Pines *et al.*, 1992; Gunewald und Kanner, 1995; Arriza *et al.* 1997). Conradt *et al.* (1995) konnten zeigen, dass die N-Glykosylierungsstellen nicht für die Funktion und Kinetik des Transports von Bedeutung sind.

Die Ansichten hinsichtlich der Topologie der transportierenden Domäne (C-Terminus) des Transporters gehen weit auseinander (Wahle *et al.*, 1996; Grunewald und Kanner; 2000; Seal *et al.*, 2000; Yernool *et al.*, 2004). Aufgrund der *Glykosylierungsscanning* Mutagenesestudien des Glutamattransporters GLAST-1 wurden ebenfalls wie in den Porinen vorkommend kurze transmembranale Faltblattstrukturen für den C-terminalen Bereich postuliert (Abb. 5) (Wahle *et al.*, 1996). Die durch den Transport erfolgte Konformationsänderung werden durch die Ausbildung von Salzbrücken, z.B. in GLAST-

1 zwischen Glu406-His494 und Glu406-Arg388 stabilisiert. Beide Konformationen sind isoenergetisch, da eine annähernd gleiche Anzahl von geladenen AS-Resten in der Membran lokalisiert sind. Die β -Faltblätter stehen miteinander in Wechselwirkung und bilden einen Kanal (Conradt et al., 1996). In einer weiteren Modellvorstellung ist ein langer α -helikaler hydrophober Linker (*stretch*) parallel in die Membranebene zwischen der siebten und achten Transmembrandomäne angeordnet (Grunewald und Kanner, 2000; Seal et al., 2000).

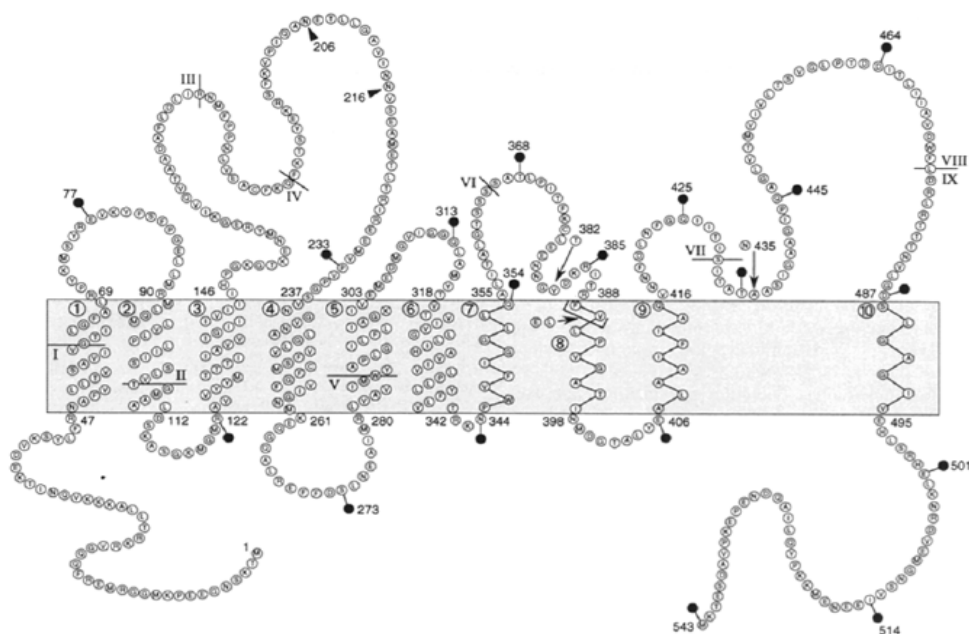


Abb. 5: Vorgeschlagene GLAST1 Topologie in der Plasmamembran (Stork et al., 1996)

Aufgrund der Glykosylierungsstudien vorgeschlagene Topologie. Die markierten Punkte bezeichnen den Aminosäurerest für den hierfür eingebrachten Glykosylierungsmarker. Im N-terminalen Bereich sind sechs α -helikale Transmembrandomänen und im C-terminalen Bereich vier β -Faltblatt Transmembrandomänen abgebildet. Durch die Pfeile werden die N-Glykosylierungsstellen gekennzeichnet.

Gouaux und seinen Mitarbeiter gelang die Kristallisation des natriumabhängigen Aspartat-Transporters GltPh aus *Pyrococcus horikoshii*, der eine 37%ige Homologie zu hEAAT2 aufweist (Yernool et al., 2004; Boudker et al., 2007). Die Struktur des Transporters ist durch acht Transmembrandomänen (TMD) und zwei *Hairpins* (HP) charakterisiert (Abb. 5). Die aus den Kristallisationsstudien resultierenden Ergebnisse stehen in größerer Übereinstimmung des von Wahle et al. postulierten Strukturmodells (1996). Der Transport erfolgt im C-terminalen Bereich des Proteins, der siebten und achten TMD und dem 1. und 2. HP und ist durch den N-terminalen Zylinder geschützt. Die Lage der *Hairpins* (*reentrant loop*) zueinander bilden den Aminosäure transportierenden Kanal. Die beiden *reentrant loops* sind im GLT-1 Transporter

entgegengesetzt orientiert (Brocke *et al.*, 2002). Die putative Substratbindungsstellen sind in den 7. und 8. Transmembrandomänen lokalisiert.

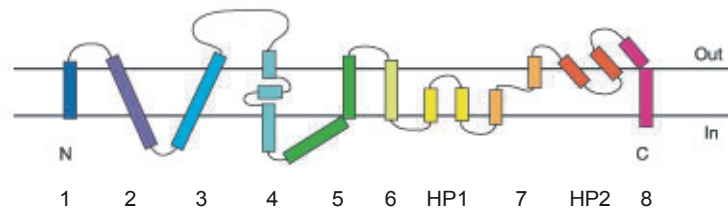


Abb. 6: Topologie des bakteriellen Aspartat-Transporters GltPh aus *Pyrococcus horikoshii*
Die Topologie basiert auf den Ergebnissen der Kristallisationsstudien. Die Ziffern 1-8 geben die Transmembrandomänen, HP1 und HP2 die Hairpins wieder (Yernool *et al.*, 2004).

Glutamattransporter treten als Monomere und/oder Homomultimäre auf (Haugeto *et al.*, 1996). Vermutlich tragen mehrere Transporteruntereinheiten zu der Ausbildung einer Transportpore bei (Kavanaugh, 1999). Studien am bakteriellen Aspartattransporter zeigen jedoch einen für jede Untereinheit unabhängigen Transport des Trimers (Yernool *et al.*, 2004; Boudker *et al.*, 2007). Aufgrund der „freeze-fracture“ Elektronenmikroskopie-Daten des humanen EAAT3 in *Xenopus leavis* Oocyten wird für den Transporter eine pentamere Struktur vorgeschlagen (Eskandari *et al.*, 2000).

1.8 Glutamatrezeptoren

Die Wirkung von Neurotransmittern bei der Erregungsübertragung und Informationsverarbeitung erfolgt an den Komponenten der Zielstrukturen, den Neurotransmitter-Rezeptoren, Membrankanälen und Second-Messenger-Systeme, zwischen denen vielfältige Wechselwirkungen bestehen. Diese beeinflussen letztlich das Membranpotential, den Metabolismus und die Genexpression der Zielzellen, was sich in kurz- und langfristigen Veränderungen der Aktivitätsmuster niederschlägt. Durch homologe und heterologe Oligomerisierung der Untereinheiten der Glutamatrezeptoren, differentielles Spleißen und mRNA-editing entsteht ein großes Repertoire funktionell unterschiedlicher Rezeptoren (Nicoll, 1990; Sommer und Seeburg, 1992). Die Expression ist dabei entwicklungs- und gewebespezifisch und verleiht jeder Synapse in bezug auf die Wirkung von Glutamat ganz unterschiedliche Eigenschaften. Die Rezeptoren werden aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften in ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren unterteilt. Die von Glutamat hervorgerufenen Neurotransmittersignale werden durch ionotrope Rezeptoren, die einen Ionenkanal bilden und metabotrope Rezeptoren, die über ein G-Protein intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, vermittelt (Nakanishi, 1992).

Zur Beendigung der Signalwirkung von Glutamat auf die Rezeptoren muss Glutamat nach der Freisetzung schnell und effektiv aus dem synaptischen Spalt und extrazellulären Raum beseitigt werden, um seine neurotoxischen Eigenschaften zu verhindern und durch seine Inaktivierung eine präzise Weiterleitung der Erregung zu ermöglichen.

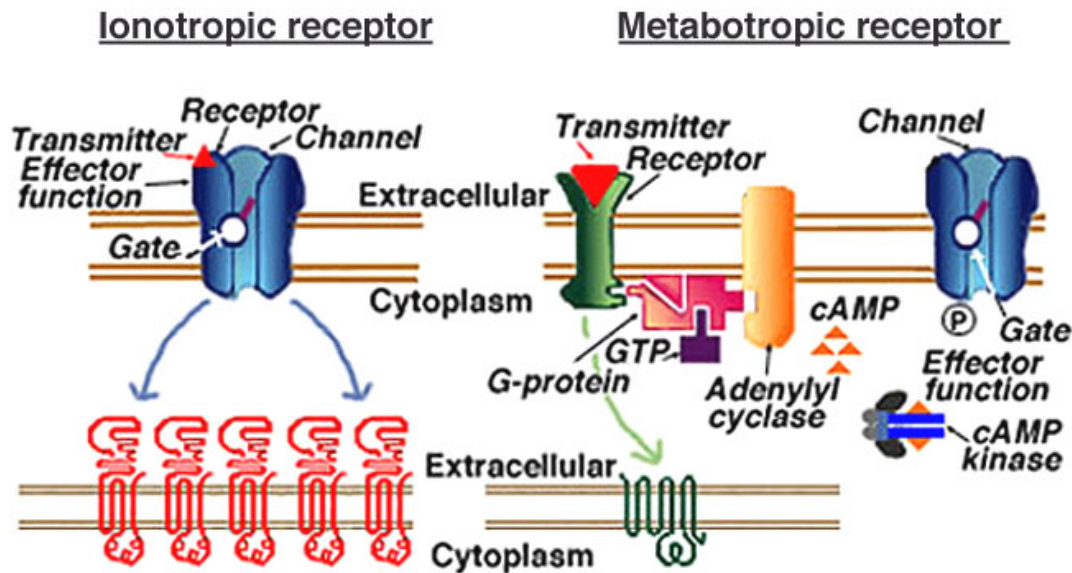


Abb. 7: Glutamatrezeptoren (Kandel *et al.*, 1991)

Auf der linken Seite der Darstellung ist ein ionotroper Rezeptor mit seinen assoziierten Ionenkanälen dargestellt, auf der rechten Seite ein metabotroper Rezeptor mit seinem über *second messenger* gekoppelten Ionenkanal.

1.8.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Die hochaffinen ionotrope Glutamatrezeptoren werden aufgrund ihrer Wechselwirkung mit selektiven Agonisten, die Glutamat oder Aspartat strukturell ähneln, in N-Methyl-Aspartat- (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat- (AMPA) oder Kainat-Rezeptoren unterteilt. Sie unterscheiden sich im Aufbau, der Sequenz ihrer Untereinheiten sowie ihren spezifischen Bindungs-, Aktivierungs- und Leitungseigenschaften. Die Stimulation der ionotropen Glutamatrezeptoren führt zur vorübergehenden Erhöhung der Membranleitfähigkeit durch die Öffnung von Rezeptor-assoziierten Kanälen, so dass Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere einströmen, sowie K^+ -Ionen aus der Zelle ausströmen können. Der Einstrom von positiven Ionen (Na^+ , Ca^{2+}) an der Synapse in das Neuron bewirkt eine Depolarisation, die als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird. AMPA-Rezeptorproteine bilden tetramere Ionenkanäle, die permeabel für Natrium- und Kalium-Ionen sind. Abhängig davon, aus welchen Protein-Untereinheiten sie

zusammengesetzt sind, können sie auch eine Calcium-Leitfähigkeit aufweisen. Durch einen starken Natrium-Einstrom und einen schwachen Kalium-Ausstrom kommt es zu einer starken und schnellen exzitatorischen Transmission. NMDA-Rezeptoren hingegen sind tetramere, nichtselektive Kationenkanäle, die zusätzlich zur ligandenabhängigen Aktivierung noch eine Spannungsabhängigkeit zeigen. Die Öffnung des NMDA-Rezeptorkanals erfordert nicht nur die Bindung von Glutamat sondern auch die Beseitigung seiner spannungsabhängigen Mg^{2+} -Hemmung (Ascher und Nowak, 1988). Aufgrund dieser Eigenschaft gilt der NMDA-Rezeptor als molekularer Koinzidenz-Detektor, da zwei Ereignisse zur gleichen Zeit stattfinden müssen, um den Rezeptor zu aktivieren (Bliss und Collingridge, 1993). Die Kanäle der NMDA-Rezeptoren öffnen und schließen langsamer als AMPA/Kainat-Kanäle und zeigen eine hohe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen auf (Seeburg, 1993). Glutamat bewirkt daher ein biphasisches depolarisierendes Potential mit einer schnellen AMPA/Kainat-Komponente und einer langsamen NMDA-Komponente.

Kainat-Rezeptoren sind pentamere Ionenkanäle, die in erster Linie für Natrium und Kalium geringfügig auch für Calcium leitfähig sind. Durch einen starken Natrium-Einstrom und einen schwachen Kalium-Ausstrom kommt es zu einer starken und schnellen Depolarisation der Zelle.

1.8.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren

Die metabotropen Glutamatrezeptoren zählen zu den phylogenetisch ältesten G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Derzeit sind 8 metabotrope Glutamat-Rezeptoren mit unterschiedlichen Splicevarianten bei Vertebraten bekannt: $mGlu_1 - mGlu_8$ ($mGluR1 - mGluR8$) (Duvoisin *et al.*, 1995). Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, pharmakologischen Eigenschaften und intrazellulären Signalwegen, mit denen sie gekoppelt sind, werden diese in drei Gruppen eingeteilt.

Zur Gruppe I gehören $mGluR1$ und $mGluR5$. Nach Bindung des Glutamats erfolgt eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C und mit einer Spaltung des rezeptorassoziierten, heteroprimeren, Gq -Proteins in die $G\beta\gamma$ -Untereinheit und die $G\alpha$ -Untereinheit (Beck-Sickinger *et al.*, 1996; Sprang *et al.*, 1997). Phospholipase C aktivierte Hydrolyse von PIP₂ führt zur Anreicherung von IP₃ und Diacylglycerol (DAG) im Zellinneren. Über IP₃-Rezeptoren kommt es zur Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Reticulum, während DAG die Proteinkinase C aktiviert (Sladeczek *et al.*, 1988).

Zur Gruppe II gehören mGluR2 und mGluR3. Sie regulieren die Adenylatcyclase negativ. Die Gruppe III bilden mGluR4, mGluR6, mGluR7 und mGluR8. Wie die Gruppe II mGluR hemmen sie die Adenylatcyclase. Die metabotropen Glutamatrezeptoren wirken nur schwach auf das Membranpotential ein.

1.9 Zur Rolle des Glutamat Neurotransmitters

Im Gehirn werden erlernte Fähigkeiten in einem speziellem Netzwerk abgespeichert. Entscheidende Grundlagen für die aktivitätsbedingten Veränderungen sind die Langzeit-Potenzierung (LTP) sowie die synaptische Depression. Weiterhin ist eine hohe Plastizität, die Fähigkeit durch Änderung der synaptischen Muster, ihre Effizienz für die Gedächtnisbildung und den Lernprozess zu modifizieren, entscheidend. Unter LTP versteht man eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung. Man bezeichnet die LTP als ein Korrelat des Lernvorgangs auf zellulärer Ebene (Barnes *et al.*, 1994; Dragoi *et al.*, 2003; Gruart *et al.*, 2006). Die für das Lernen am besten untersuchte Form der LTP findet an den Synapsen der Pyramidzellen in der CA1-Region des Hippocampus mit den Schaffner-Kolateralen statt (Whitlock *et al.*, 2006; Pastalkova *et al.*, 2006).

Auf der Ebene der synaptischen Kommunikation über aktive Rezeptoren gibt es Gemeinsamkeiten, von denen die Abhängigkeit vom ionotropen Glutamatrezeptor NMDA von besonderer Bedeutung ist (Kim *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 2000; Tsien *et al.*, 1996). Die mit dem Lernereignis verbundene Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und der dadurch vermittelte Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} steht am Beginn einer Signalkette (Lynch *et al.*, 1983; Malenka *et al.*, 1992), die zunächst zur Aktivierung, Autophosphorylierung und damit zur konstitutiven Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) führt. Parallel dazu kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und von Calcineurin. Außerdem wird die Adenylatzyklase durch Ca^{2+} /Calmodulin und möglicherweise noch von anderen modulierenden Einflüssen auf das Neuron zur Bildung von cAMP angeregt, das die Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Malinow *et al.*, 1989; Frey *et al.*, 1993; Huang und Kandel, 1994; Abel *et al.*, 1997). PKA und CAMKII aktivieren schließlich durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP responsive-element binding protein*) (Sheng *et al.*, 1990; Frey *et al.*, 1993), der durch Transkription von Genen mit der Cre-Sequenz (*CREB responsiv element*) im Promoterbereich aktiviert (Impey *et al.*, 1996).

Auch metabotrope Glutamatrezeptoren sind an der Ausprägung von Langzeit-Potenzierung und Langzeit-Depressionen (LTD) bei Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligt (Ito und Sugiyama, 1991; Bashir *et al.*, 1993a; 1993b; Kaba *et al.*, 1994; Nakanishi, 1994; Hartell, 1994; Hémart *et al.*, 1995; Riedel, 1996; Manahan-Vaughan, 1997; Overstreet *et al.*, 1997). Darüber hinaus nehmen sie an der Signalverarbeitung im visuellen (Nakanishi, 1995) und olfaktorischen System (Kaba *et al.*, 1994; Nakanishi, 1995; Geiling und Schild, 1996; Bischofberger und Schild, 1996) teil. Sie wirken auch an signalverarbeitenden Prozessen innerhalb von Neuron-Glia-Wechselwirkungen mit (Winder und Conn, 1996). Die synaptische Übertragung zwischen den Schaffer-Kollateralen und CA1-Pyramidenzellen der Ratte kann durch die Aktivierung von glialen metabotropen Glutamatrezeptoren moduliert werden (Winder *et al.*, 1996).

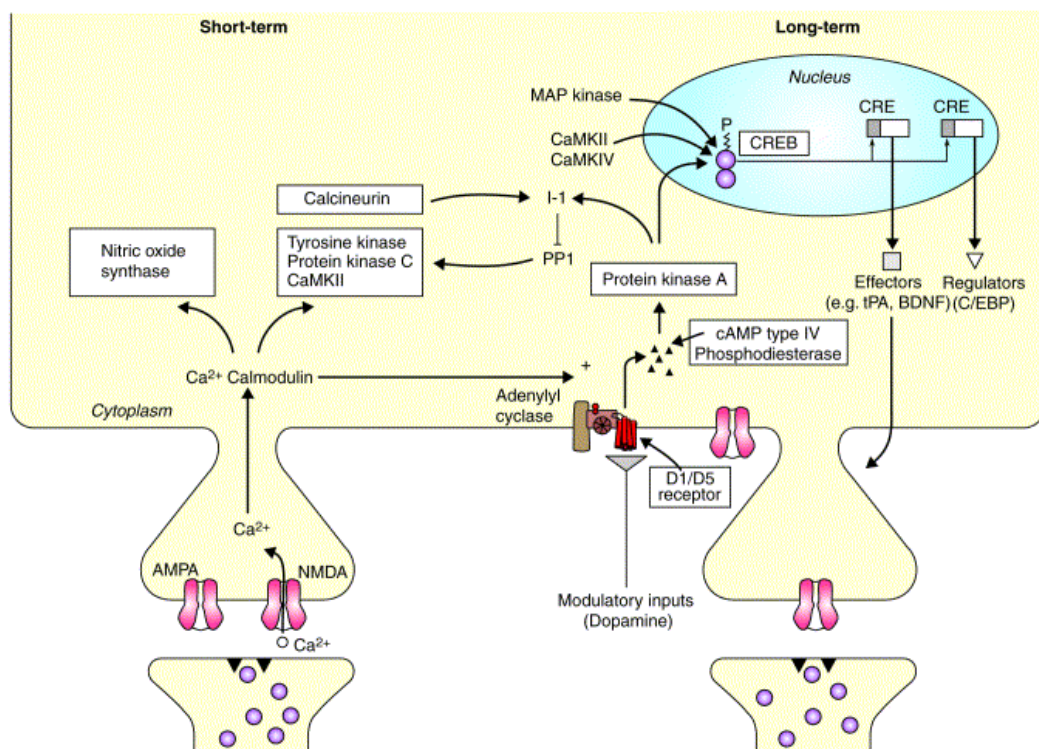


Abb. 8: Molekulare Ereignisse bei der Kurzzeit- und Langzeit-Potenzierung (Abel und Lattal, 2001)
 Durch die Glutamatbindung am NMDA-Rezeptor strömen Ca²⁺-Ionen in das postsynaptische Neuron. Durch die Ca²⁺-Ionen hervorgerufene Aktivierung von CaMKII, PK, Calcineurin und Adenylylcyclase werden die Effekte der Kurzzeit- bzw. Langzeit-Potenzierung reguliert.

1.10 Glutamat und neurologische Erkrankungen

1975 wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Glutamat als Neurotoxin wirken kann (Lukas und Newhouse, 1975). In anschließenden Experimenten wurde seine neuronenschädigende Wirkung mit dem exzitatorischen Potential von Glutamat gezeigt und der Begriff „Exzitotoxizität“ geprägt. Unter Exzitotoxizität wird eine durch übermäßige Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren insbesondere Glutamat hervorgerufene Neuronen zerstörende Erregung verstanden. Exzitotoxizität schädigt Nervenzellen durch verschiedene molekulare Mechanismen (Shaw, 1994; Thomas, 1995). Bei der akuten Exzitotoxizität findet ein anhaltender Na^+ -Einstrom über die ionotropen Glutamatrezeptoren statt. Der begleitende Cl^- - und H_2O -Einstrom führt zum Anschwellen der Neurone. Die hervorgerufene Depolarisation der Membran bewirkt eine Aufhebung der Mg^{2+} -Blockade des NMDA-Rezeptors, so dass Ca^{2+} direkt über den NMDA-Kanal einströmen kann (Chen *et al.*, 1995). Die überhöhten Ca^{2+} -Spiegel führen zur Enzyminduktion von Phospholipasen, Proteinkinase C, Proteasen und Endonukleasen. Dadurch kommt es zum Protein- und DNA-Abbau sowie zur Akkumulation von freien Fettsäuren, Diacylglycerol, Lipid-Peroxiden, Stickstoffmonoxid und Hydroxylradikalen (Chan und Fishman, 1978; Dykens *et al.*, 1987; McNamara und Fridovich, 1993). Dies führt schließlich zum Zelltod (Choi *et al.*, 1987; Manev *et al.*, 1990). Es ist gezeigt worden, dass Glutamat Neurotoxizität calciumabhängig ist (Choi *et al.*, 1987) und durch Blockierung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung gehemmt werden kann (Frandsen und Schusboe, 1992). Schwache Exzitotoxizität kann durch einen defekten Energiehaushalt hervorgerufen werden. ATP-Mangel, z.B. durch ungenügende Glukoseversorgung verursacht, führt zu einer Unterfunktion der Na^+ - K^+ -ATPase, die das Membranpotential aufrechterhält. Die daraus resultierende Depolarisation der Membran bewirkt eine Aufhebung der Mg^{2+} -Blockade des NMDA-Rezeptors. So führt eine normale Glutamatausschüttung zur Überaktivierung des NMDA-Rezeptors mit darauf folgender Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Dadurch werden Abbauenzyme aktiviert und Stickstoffmonoxid sowie freie Radikale gebildet. Eine direkte Korrelation von Glutamat induzierter Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration und die Bildung freier Radikale konnte bereits gezeigt werden (Dykens, 1994). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Mitochondrien einerseits als Puffer wirken und große Mengen Ca^{2+} aufnehmen, andererseits Hauptort der Radikalproduktion sind, die durch hohe Ca^{2+} -Spiegel hervorgerufen wird. Im normalen Alterungsprozess unterliegen insbesondere Mitochondrien starken Funktionsverlusten, da ihre DNA oxidativen Schädigungen

deutlich stärker ausgesetzt ist als die DNA des Zellkerns (Richter *et al.*, 1988). Die daraus möglicherweise resultierende Abnahme an oxidativer Phosphorylierung mag ein auslösender Faktor einer schwachen exzitotoxischen Schädigung sein. Dies wäre ein Grund für das späte Einsetzen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, für die eine schwache Exzitotoxizität postuliert wird.

Glutamatneurotoxizität trägt zu verschiedenen akuten und chronischen pathologischen Phänomenen des Nervensystems bei. Die neurotoxische Wirkung von Glutamat und Glutamat ähnlichen Exzitotoxinen zeigt sich beim China-Restaurant-Syndrom und der Muschelvergiftung, die 1987 in Canada als akutes Phänomen und als chronisches auftretendes exzitotoxisches Phänomen beim Lathyrismus und der Guam Krankheit beschrieben wurde. An chronischen degenerativen Erkrankungen mit möglicher Beteiligung von Glutamatneurotoxizität werden u. a. die Parkinsonsche (Turski *et al.*, 1991; Lange *et al.*, 1997), die Alzheimersche (Beal, 1995) und die Huntingtonsche (Young *et al.*, 1988; Beal, 1992) sowie die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Akoi *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998; Rothstein *et al.*, 1994; Trotti *et al.*, 1999) diskutiert. Während Ursache, Auslöser und Folgeerscheinungen bei diesen neurodegenerativen Krankheiten meist noch nicht klar definiert werden können, scheinen exzitotoxische Prozesse an unterschiedlichen Stellen dieser Kaskade mitzuwirken.

1.11 Glutamattransporter defiziente Mauslinien

EAAC1 *knock out* Mäuse zeigen keine bemerkenswerten neurologischen Symptome und Neurodegeneration. Allerdings entwickeln sie dicarboxolische Aminoazidurie, eine vermehrte Ausscheidung des Glutamats im Harn (Peghini *et al.*, 1997). EAAC1 ist der wichtigste Glutamattransporter der Niere, der für die Reabsorption des Glutamats in den renalen proximalen Tubulus verantwortlich ist. Für die bisher anderen bekannten Formen der Aminoazidurie, die ebenfalls auf einen Defekt der renalen Resorption beruhen, sind bisher weder Genabschnitte noch die chromosomale Lokalisation bekannt. Dieser Transportertyp wird in der Niere und in den Epithelzellen des Dünndarms exprimiert. Der erste Fall von dicarboxolischer Aminoazidurie wurde von Teijema *et al.* (1974) beschrieben, deren Ursache auf den Defekt des anionischen Aminosäuretransports in der Niere und dem Darm zugeschrieben wurde.

GLAST-1 defiziente Tiere zeigen aufgrund des kompensatorischen Effekts von EAAT2-4 keinen auffälligen Phänotyp. Weder der histologische Befund an Hirnschnitten noch die astrozytären und synaptosomalen Glutamat-Aufnahmestudien mit L-threo-3-

Hydroxyaspartat zeigten Anomalien. Im *TUNEL-Assay* der Gewebeschnitten zeigten die GLAST-1 Nullmutanten ebenfalls keine Apoptose. Aufgrund der verstärkten Inhibition in GLAST-1 defizienten Mäusen ist jedoch ein Unterschied in den Synaptosomen und Astrozyten mit Dihydrokainat zu verzeichnen. Im Verhalten der Nullmutanten ist ebenfalls kein Unterschied zu den Wildtyptieren feststellbar (Schröder, 1998; Stoffel *et al.*, 2004). Die GLAST-1/EAAC1 defizienten Mäuse zeigen ebenfalls keinen auffälligen Phänotyp (Stoffel *et al.*, 2004). Elektrophysiologisch sind verlängerte exzitatorisch, postsynaptische Ströme (EPSC) nach selektiver Aktivierung in den Purkinje Zellen der GLAST-1 defizienten und Doppelmutanten GLAST-1/EAAC1 zu verzeichnen (Stoffel *et al.*, 2004; Watase *et al.*, 1998). In den Studien von Watase *et al.* zeigen die GLAST-1 *knock out* Mäuse jedoch Koordinationsschwierigkeiten bei der Bewältigung motorisch anspruchsvoller Aufgaben (Watase *et al.*, 1998). Weiterhin konnte an den GLAST-1 Mutanten gezeigt werden, dass für eine normale Signaltransmission zwischen den Photorezeptoren und den bipolaren Zellen der Müller Zellen der Retina (Harada *et al.*, 1998) und die Aufrechterhaltung der Glutamatkonzentration im auditorischen System von Bedeutung sind (Hakuba *et al.*, 2000). Bezüglich der zentralen Rolle des Glutamats im Gehirn und als einer der beiden glialen Transporter, die stark im Gehirn verbreitet ist, überrascht das Fehlen offensichtlicher Symptome in der GLAST-1 und GLAST-1/EAAC1 defizienten Maus.

Allein die Verteilung der Transporter im Gehirn legt die Vermutung nahe, dass GLT-1 der dominante Transporter in der Aufnahme des synaptischen Glutamats ist. Die von Tanaka *et al.* (1997) veröffentlichten GLT-1 defizienten Mäuse zeigen selektives Absterben von Neuronen und führen aufgrund der epileptischen Neurotoxizität zum frühen Tod. Histologische Untersuchungen zeigen selektive neuronale Degeneration der CA1 Region des Hippocampus. Der Glutamattransport der Synaptosomen aus dem Cortex von GLT-1 defizienter Tiere ist auf 5.8% reduziert. GLT-1 defiziente Mäuse zeigen ein normales Elektroretinogram (Harada *et al.*, 1998). Durch das von Tanaka *et al.* (1997) verwendete *targeting* Konstrukt wurde eine Mutation in Exon 4 herbeigeführt. Der Verlust des GLT-1 Proteins wurde mit einem Antikörper gegen den C-Terminus nachgewiesen, lässt aber die Entstehung verkürzter N-terminaler Peptide, die wegen ihrer Hydrophobizität toxisch auf Golgi und ER Membranen wirken und somit den Phänotyp der GLT-1 *-/-* Maus eventuell mitbestimmen könnten. Da in eukaryontischen Zellen die meisten integralen Membranproteine im Zytoplasma an rER (raues endoplasmatisches Retikulum) gebundenen Polysomen synthetisiert, kotranslational in der ER-Membran

integriert und posttranslational über verschiedene Proteinsortierungs-Mechanismen zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden (Walter und Blobel, 1981; Kurzchalia *et al.*, 1986; Krieg *et al.*, 1986). Der Transfer vom Ribosom und der Einbau von Polypeptid - Domänen über und in die Membran, der sich an die *targeting*-Phase anschließt, erfolgt vermutlich über einen „Protein-leitenden-Kanal“ (Simon und Blobel, 1991). Der Transport zur Plasmamembran sollte über den cis- und trans-Golgi Apparat erfolgen.

1.12 Gene *targeting* – gezielter Austausch von Genen durch homologe Rekombination

In vielen Fällen kann man die Funktion eines Gens nur dann vollständig verstehen, wenn es im Tiermodell aufgrund einer Mutation zum Verlust seiner Funktion kommt. Während man früher eine Genfunktion meistens als Folge einer natürlichen Mutation erkannte, steht jetzt die Isolierung eines Gens, und dann die Analyse seiner Funktion *in vivo* durch Austausch gegen eine mutierte Kopie im Modell als Methode der Wahl zur Verfügung. Diese genetische Manipulation bezeichnet man als *Gen-Knockout*. Nach dieser Strategie wird die gesuchte Mutation durch homologe Rekombination (*gene targeting*), in pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) in das Genom eingebracht. Die homologe Rekombination tritt in Säugetierzellen sehr selten auf, so dass ein wirksames Selektionsverfahren notwendig ist, um die entsprechenden Zellen zu finden. In den meisten Fällen wird die eingeschleuste Genkopie durch ein eingefügtes Gen für eine Antibiotikumresistenz unterbrochen. Dadurch wird das normale Gen durch eine funktionslose Kopie ersetzt. Der *targeting*-Vektor beinhaltet klassischerweise das Gen der Neomycin-Phosphotransferase (*neo*) als positiven Selektions-Marker (Capecchi, 1989; Robbins, 1993). Um die Zellen selektieren zu können, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, befindet sich an den Enden des Konstrukts üblicherweise jeweils die Gensequenz für die Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus (HSV-tk). Zellen, die die DNA an einer zufälligen Position in das Genom einbauen, erhalten im Allgemeinen das vollständige DNA-Konstrukt einschließlich des HSV-tk-Gens. Im Gegensatz dazu führt eine homologe Rekombination zwischen dem Konstrukt und der zellulären DNA zu einem Austausch der homologen DNA-Sequenzen, so dass die nichthomologen HSV-tk-Gene an den Enden des Konstrukts verloren gehen. Zellen, die das HSV-tk-Gen enthalten, werden gegenüber der antiviralen Substanz Gancyclovir empfindlich (Capecchi, 1989; Capecchi, 1994; Robbins, 1993; Robertson, 1994).

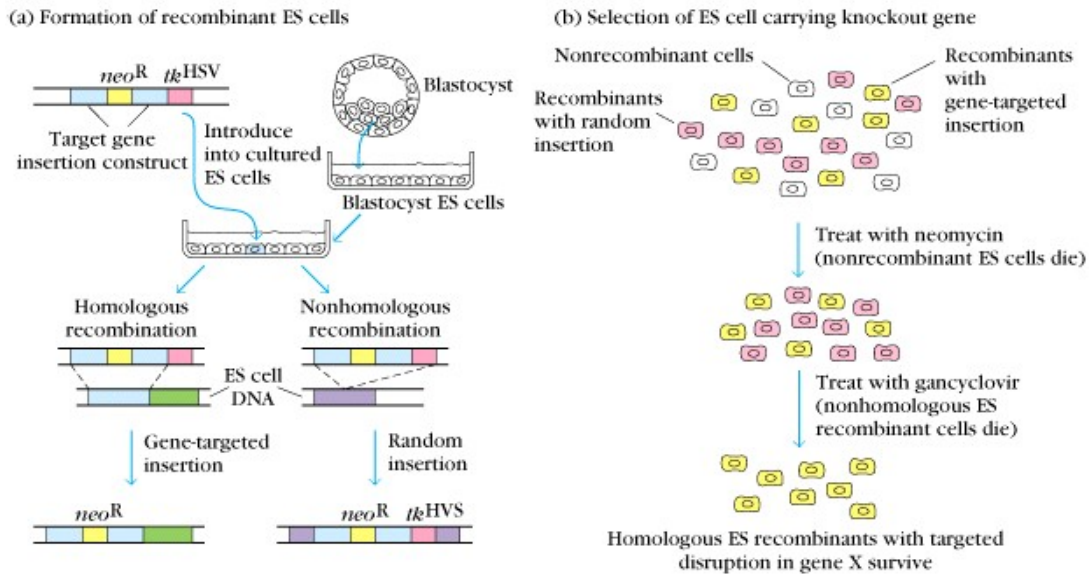


Abb. 9: Selektion homolog rekombinierter Klone (Pollock, 2007)

Aufgrund der Neomycin-Kassette und Tymidinkinase-Box im *targeting* Konstrukt erfolgt eine Selektion homolog rekombinierter Klone.

a) Darstellung auf genetischer Ebene

b) Darstellung auf ES-Zell-Ebene

Die mutierten Zellen werden nach der Blastozysteninjektion und Reimplantation in eine scheinsschwangere Maus in den sich entwickelnden Embryo integriert und nehmen an der Ausbildung aller Gewebe teil (Bradley et al., 1984). Auf diese Weise gelangt das Gen auch in die Keimbahn und wird auf einige der Nachkommen des ursprünglichen chimären Tieres übertragen. Durch weitere Züchtungen entstehen schließlich homozygote Mäuse, denen die Expression des betreffenden Genproduktes vollständig fehlt (Abb. 10).

Homozygote Tiere mit einem rezessiv letalen Gen lassen sich nicht erzeugen. Beim konditionellen Modell lassen sich Gene gewebs- und entwicklungspezifisch deletieren. Zuerst führt man die *loxP*- bzw. *FRT*-Stellen, die ein Gen oder auch nur ein einzelnes Exon flankieren, durch homologe Rekombination in das Genom ein. Normalerweise stört die Insertion dieser Sequenz in genflankierende oder intronische DNA die normale Funktion eines Gens nicht. Mäuse, die solche *loxP*- bzw. *FRT*-mutierten Gene besitzen, werden mit transgenen Mäusen gekreuzt, die das Gen der *Cre*- bzw. *FLP*-Rekombinase tragen. Dieses Gen unterliegt der Kontrolle eines gewebespezifischen oder induzierbaren Promoters. Durch Aktivierung der *Cre*- bzw. *FLP*-Rekombinase, schneiden diese Enzyme die DNA zwischen den eingefügten *loxP*- bzw. *FRT*-Stellen heraus und inaktivieren so das Gen (Dymecki, 1996; Kilby et al., 1993; Sauer und Henderson, 1988).

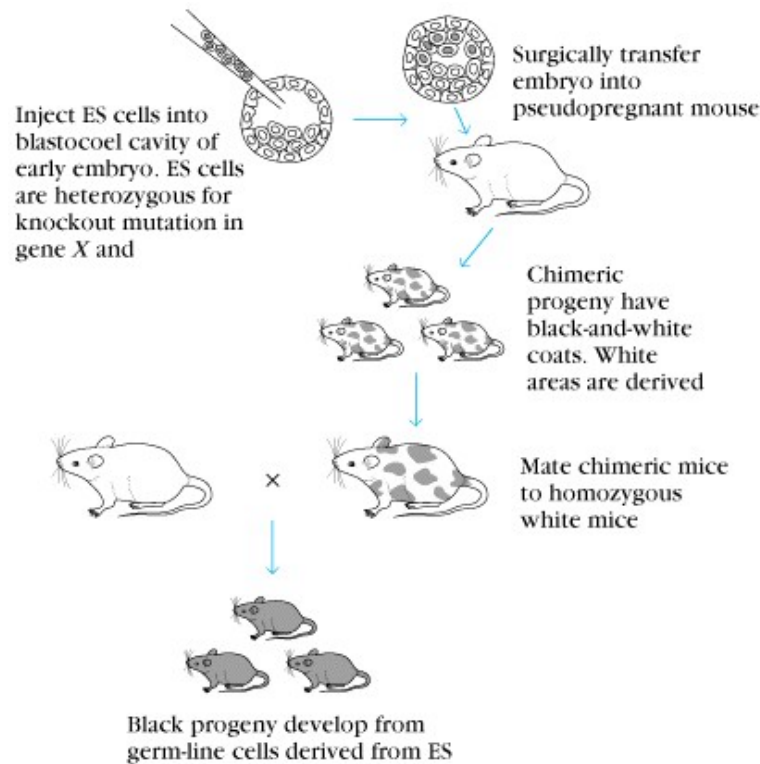


Abb. 10: Erzeugung homozygoter *knock-out* Mäuse (Pollock, 2007)

Nach der Blastozysteninjektion erfolgt die Transplantation in den Uterus scheinchwangere Mäuse. Keimbahnchimäre werden bis zur Homozygotie gekreuzt.

1.13 Induzierbares *Cre*-System

Die Kontrolle der Genexpression in Eukaryonten kann mittels eines Tetrazyklin abhängig regulierten Systems erreicht werden. Tetrazyklin kontrollierte Transaktivator (tTA, *TetOff*) oder reverse Tetrazyklin kontrollierte Transaktivator Proteine (rTA, *TetOn*) werden durch die Bindung von Tetrazyklin und besonders Anhydrotetrazyklin und Doxzyklin, ihren Effektormolekülen, in passiven bzw. aktiven Zustand versetzt. Die Transaktivatorproteine sind Fusionsproteine zwischen dem tet-Repressor und der minimal Transaktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus Proteins 16 (VP16). Ein Heptamer von tet Operator Sequenzen (tetO7) in Kombination mit einem Minimalpromoter, etwa dem des humanen Cytomegalovirus (hCMV), ermöglichen die Bindung der Transaktivatoren in ihrer aktiven Form und somit die Initiation der Transkription für ein beliebiges Gen. Der Minimalpromoter ohne Transaktivator-Molekül ist inaktiv. Somit kann über die Expression der Transaktivatoren unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promoters und die Applikation von Tetrazyklin oder seines Derivates eine entwicklungs- und gewebsspezifische Expression des kontrollierten Gens erreicht

werden (Baron und Bujard 2000; Baron *et al.*, 1997; Gossen und Bujard, 1992; Gossen und Bujard, 2002; Gossen *et al.*, 1995).

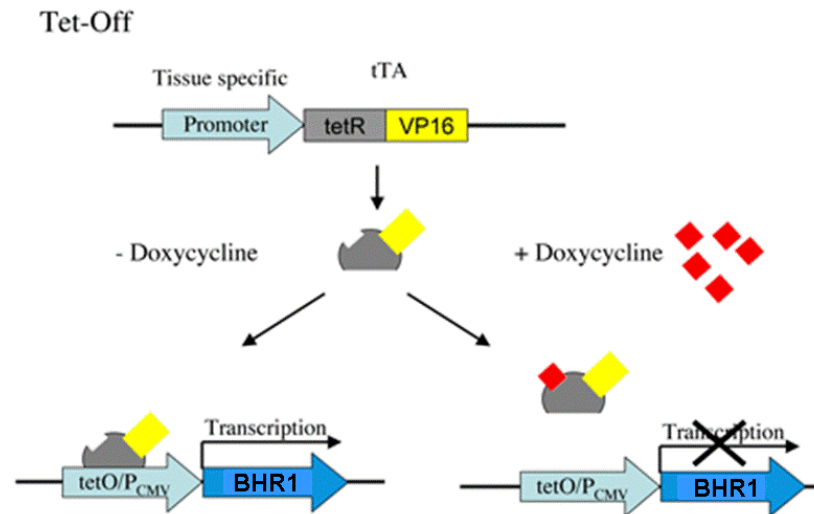


Abb. 11: Schematische Darstellung eines induzierbaren TetOff Systems

Die Expression des Aktivators tTA erfolgt unter einem gewebsspezifischen Promoter, der in Gegenwart von Doxycyclin die Transkription des unter der Kontrolle eines Minimalpromoter gelegenen Gens verhindert.

Alternativ zum induzierbaren Tetrazyklin System kann eine Regulation der *Cre*-Rekombinase durch eine an *Cre* fusionierte Östrogen Rezeptor Bindedomäne erfolgen, bei der die *Cre*-Rekombinase durch Applikation des Östrogenderivates Tamoxifen aktiviert wird und dadurch in den Zellkern gelangt. Aufgrund der modifizierten Östrogen Rezeptor Bindedomäne kann die *Cre*-Rekombinase Aktivität nur durch synthetische, nicht aber durch den natürlichen, endogenen Liganden Östradiol bzw. Östrogen induziert werden (O’Gorman *et al.*, 1991; Logie und Steward, 1995; Metzger und Feil, 1999).

2 Aufgabenstellung

Na⁺-abhängige Glutamattransporter des zentralen Nervensystems sind für die Beseitigung vom synaptisch freigesetzten, exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat verantwortlich. In der über die hochaffinen Transporter vermittelten Aufnahme des Glutamats wird das Neurotransmittersignal beendet. Dadurch wird eine präzise Weiterleitung axonaler Erregung erreicht. Eine weitere Funktion ist der Schutz vor der exzitotoxischen Wirkung des Glutamats auf Neurone. Erhöhte endogene Glutamatkonzentration werden mit langsam fortschreitenden neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer-Demenz, Multipler Sklerose, Parkinson, Corea Huntigton, Amyotrophe Lateralsklerose und Epilepsie in Verbindung gebracht.

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

1. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Erstellung einer konditionellen Glutamattransporter GLT-1 Mauslinie von der Klonierungsstrategie über die Elektroporation in embryonale Stammzellen bis hin zur Blastozysteninjektion. Bereits veröffentlichte konventionell GLT-1 defiziente Mäuse führen aufgrund epileptischer Neurotoxizität zum frühen Tod.
2. Um den Zeitpunkt und die Gewebsspezifität der Rekombination konditioneller GLT-1 Mäuse kontrollieren zu können, wurden zwei unterschiedliche Konstrukte Liganden aktivierbarer *Cre*-Rekombinasen kloniert. Die Konstrukte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer durch exogenen Liganden vermittelten Induzierbarkeit mittels Doxyzyklin bzw. Tamoxifen. Die Konstrukte der unter dem *gfap*-Promoter stehenden *Cre*-Rekombinasen wurden heterolog in das Mausgenom integriert.
3. Weiterhin wurden immunohistochemische Studien sagittaler Hirnschnitte mit Antikörper gegen die Glutamattransporter GLT-1, GLAST-1 und EAAC1 durchgeführt.
4. Für die Charakterisierung der Transporterfunktion wurden Konstrukte des Glutamattransporters GLT-1 und des Fusionsprodukt mit dem fluoreszierenden Polypeptid EGFP erstellt. Diese Konstrukte dienten der Etablierung stabil exprimierender Gliomazellen der Ratte (C6-Zellen) und HEK293 Zell-Linien.

- a) Stabile GLT-1 und EGFP-GLT-1 exprimierende C6-Zellen und primäre Gliazellen aus Wildtyp und Glutamattransporter defizienten Mäusen wurden hinsichtlich ihrer transkriptionellen Kurzzeit- und Langzeit-Regulation der Glutamatrezeptoren und ihrer Transporter in Gegenwart exzitotoxischer Glutamatkonzentration untersucht.
- b) Nach genetischer und molekularbiologischer Charakterisierung wurden die den Glutamattransporter GLT-1 und das Fusionsprotein stabil exprimierenden HEK293 Zellen für die Analyse ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften herangezogen. Die Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften durch Ganzzell-Ableitungen fand nicht im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit statt.

3 Ergebnisse

3.1 Strategie zur induzierbaren Ausschaltung des GLT-1 Gens

Für das Erstellen einer konditionierten GLT-1 Mausmutante werden drei Elemente in das Genom eingeführt:

- 1.) eine homolog rekombinierte GLT-1 Gensequenz, deren zu deletierende Sequenz-Bereiche von *loxP*-Sequenzen (*locus of crossover in P1*) bzw. *FRT*-Sequenzen (*flipase recognition target*) flankiert sind,
- 2.) die *Cre*-Rekombinase (*causes recombination*), die die Exzision in somatischen Zellen durchführt, wodurch die Expression des GLT-1 Gens ausgeschaltet wird. Ferner eine Flipase, die das mit *FRT-sites* flankierte *neo* Selektionsgen bereits auf der ES-Zellebene entfernt, da gezeigt wurde, dass das 1.8kb lange Gen der Neomycinresistenz die Expression des Gens verändern kann (Boison, 1994). Die Expression der heterolog zu integrierende *Cre*-Rekombinase wird von einem Minimalpromotor reguliert. Dieser Minimalpromotor enthält Operatoren des Tetrazyklin-Promoters, die eine Transkriptionsaktivierung vermitteln, wenn reverse *tet*-Transaktivatoren nach Tetrazyklingabe binden.
- 3.) Ein Transaktivator, der an die Minimalpromoter Sequenz der *Cre*-Rekombinase bindet. Der Promoter des Transaktivator Gens legt fest, in welchen Zellen des Organismus nach Tetrazyklin-Induktion die Exzision des *geflochten* Gens stattfindet. Im Mausmodell, das in dieser Arbeit beschrieben wird, soll die Transaktivator-Expression durch den *gfap*-Promoter reguliert werden, so erfolgt eine Astrozyten spezifische GLT-1 Defizienz.

3.1.1 Konditionelle GLT-1 *targeting* Konstrukte

3.1.1.1 Konditionelles GLT-BS Konstrukt

Aufgrund der Größe des GLT-1 Gens war ein *replacement* des gesamten Gens durch ein durch *loxP*-Sequenzen begrenztes („*gefloxtes*“) Gen in einem Rekombinationsschritt nicht möglich. In der Regel werden Genbereiche *gefloxt*, die essentielle Sequenzdaten wie das ATG-Translations-Startkodon oder regulatorische Bereiche kodieren.

Zwischen dem Translations-Startkodon in Exon I des GLT-1 Gens und dem kodierenden Bereich des Exon II liegen über 29000 Basen-Paare.

Eine durch die *Cre*-Rekombinase erfolgte Exzision von Exon IV sollte zum *frame shift* führen. Die Translation der C-terminalen Domäne, der Funktionseinheit des Transporters, ergibt ein *non-sense* Produkt. Der Verlust von Exon IV sollte somit eine GLT-1 Defizienz gewährleisten. Deshalb wurde Exon IV im *replacement* Vektor von *loxP*-Sequenzen flankiert.

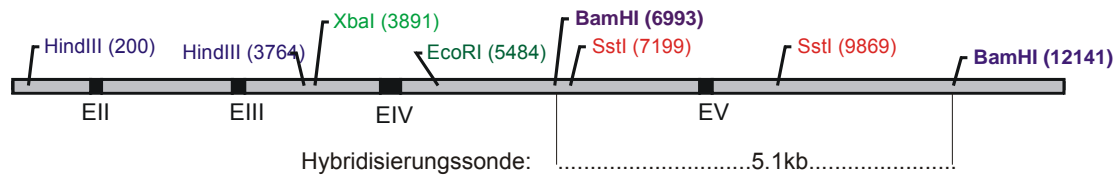
Für das *targeting* Konstrukt wurde die Positiv-Negativ-Selektions-Strategie verwendet (Mansour, 1988). Ein Neomycinresistenz Gen (*neo*) wurde in den auszutauschenden Bereich des *replacement* Vektors und eine Thymidinkinase Gen (*tk*) in den angrenzenden heterologen Abschnitt integriert. Homologe Integration führt so zur Einführung des positiven *neo*-Selektionsmarkers ohne Integration des negativen *tk*-Selektionsgens.

Idealerweise sollten Modifikationen in einem Gen, das erst zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt in der transgenen Maus ausgeschaltet werden soll, die Regulation und Funktion des Gens vorher nicht beeinflussen. Daher sollte der veränderte Genort dem Wildtyp GLT-1 Gen möglichst ähneln. Ein Einfluss der 35bp *loxP*-Sequenz auf die Transkription eines Gens, konnte bisher nicht gezeigt werden. Da das Neomycinresistenz-Gen die Expression eines Gens verändern kann, wurde die Neomycin Kasette durch die Einführung einer dritten *loxP*-Stelle ebenfalls von *loxP*-Sequenzen flankiert. Auf diese Weise ist es möglich, durch eine zusätzliche, transiente *Cre*-Expression das Selektionsgen auf ES-Zell Ebene zu entfernen. Die transgene Maus enthält dann außer zwei 35bp *loxP*-Sequenzen keine heterologen Elemente im mutierten Genort (Gu, 1994).

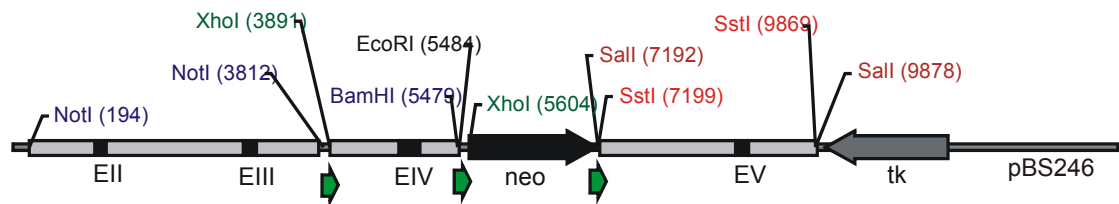
Zur Erstellung des *targeting* Konstruktes wurde folgende Klonierungsstrategie verfolgt. Abbildung 12 zeigt den *targeting* Vektor, den Genort des GLT-1 Gens und die *replacement* Strategie. Das aus einem das GLT-1 Gen enthaltenden Phagenklon isolierte 3.5kb große HindIII-Fragment wurde in den pBluescript SK II (+) Vektor subkloniert und mit einer NotI-Schnittstelle versehen. Es wurde als NotI-Fragment in den pBS246 Vektor kloniert. Mittels PCR wurde in das zweite Fragment durch einen 5' Primer eine XbaI- und einen 3' Primer eine EcoRI-Schnittstelle eingeführt. Dieses Fragment wurde zum Erhalt einer zusätzlichen *loxP-site* in den pGEM30-Vektor subkloniert und nach doppelt erfolgter XhoI-Linker Einführung in die XhoI Schnittstelle (1.7kb) des pBS246 Vektor, der das 3.5kb Fragment enthält einkloniert. Zuletzt wurde dem genomischen 2.7kb SstI-Fragment über PCR Sall-Schnittstellen eingeführt und in den modifizierten pBS246 Vektor kloniert. Die Linearisierung für die Elektroporation erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit PvuI.

Das *targeting* Konstrukt enthält 7.8kb genomische Sequenz. Zwischen Exon IV und Exon V befindet sich ein durch den *tk*-Promoter reguliertes Neomycinresistenz Gen (*neo*). Zusätzlich befinden sich drei *loxP*-Sequenzen im *targeting* Vektor, so dass Exon IV und die Neomycin Kassette von *loxP*-Stellen flankiert sind. 5' der homologen Sequenz befindet sich ein *tk*-Gen unter der Kontrolle des Phosphoglycerat Kinase Promotersx (*tk*). Das konventionelle Konstrukt unterscheidet sich vom konditionellen durch das Fehlen des 1.7-kb *XhoI* Fragmentes. Das konventionelle Konstrukt verfügt daher über zwei *loxP*-Sequenzen.

GLT-1 wt-Allel



GLT-1 targeting Konstrukt



Homolog rekombiniertes GLT-1 Allel

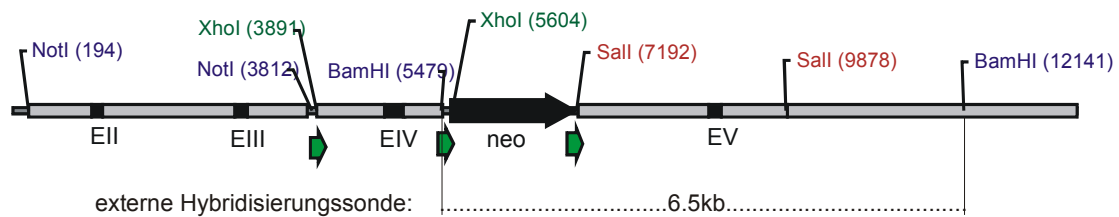


Abb. 12: Wildtyp-Genort, GLT-BS targeting Konstrukt und replacement Strategie mit Darstellung der Hybridisierungssonden

Die *Cre*-Schnittstellen sind durch grüne Pfeile dargestellt. Die für die Klonierung eingesetzten Schnittstellen sind im Konstrukt aufgeführt.

Die Funktionalität der *Cre*-Sequenzen im *targeting* Konstrukt wurde durch das *Escherichia coli* 294-*Cre* Rekombinationssystem gezeigt (Buchholz, 1996). Im konditionellen GLT-BS Konstrukt sind sowohl Exon IV als auch die Neobox von *loxP*-Sequenzen flankiert. Zunächst wurde in den *targeting* Konstrukten die *loxP*-Funktionalität geprüft.

Nach erfolgter Transformation und Plasmid-Präparation wurden die Vektoren mit dem Restriktionsenzym *PvuI* linearisiert, gelektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Für den Nachweis der erfolgten Rekombination durch Hybridisierung wurden unterschiedliche Sonden eingesetzt (Abb. 13).

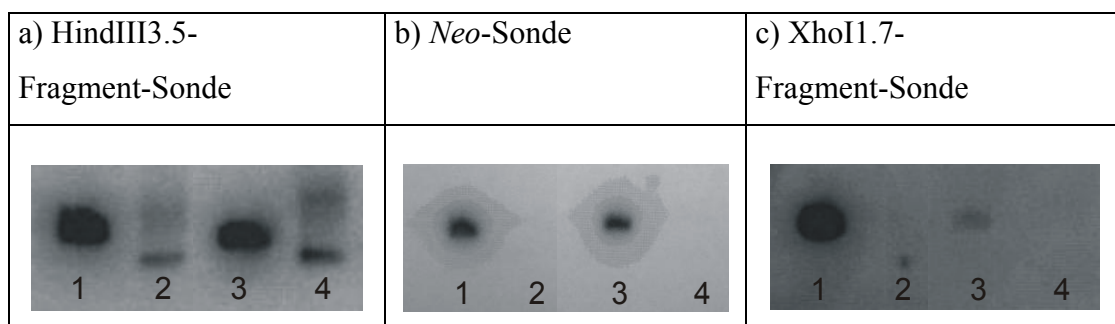


Abb. 13: Southern blot zur Funktionalität der *Cre*-Sequenzen

Hybridisierung mit a) *HindIII*3.5-Fragment-Sonde, b) *neo*-Sonde und c) *XhoI*1.7-Fragment-Sonde.

Spur 1 Positivkontrolle, nicht-rekombiniertes, konditionelles Konstrukt. Spur 2 in 294-*Cre* Zellen rekombiniertes konditionelles Konstrukt, Spur 3 konventionelles GLT-1 Konstrukt, Spur 4 in 294-*Cre* Zellen rekombiniertes konventionelles GLT-1 Konstrukt.

In vier Spuren wurde nach Hybridisierung mit der 3.5kb-*HindIII*-Fragment-Sonde ein Signal sichtbar. Das erste Fragment besitzt keine flankierenden Rekombinations-Sequenzen. Das Signal ist deshalb in allen Fragmenten nachweisbar. Mit Hilfe der Neomycin-Sonde wurde gezeigt, dass die drei *loxP*-Sequenzen im konditionellen Konstrukt und die beiden *loxP*-Sequenzen im konventionellen Konstrukt funktional sind. Ferner wurde ausschließlich in der konditionellen Positivkontrolle das 1.7kb *XhoI* Fragment detektiert. Eine schwache Bande in Spur 3c (Abb. 13) ist auf ein unzureichendes „Strippen“ des *Blots* vor der Hybridisierung mit der *neo*-Sonde zurückzuführen.

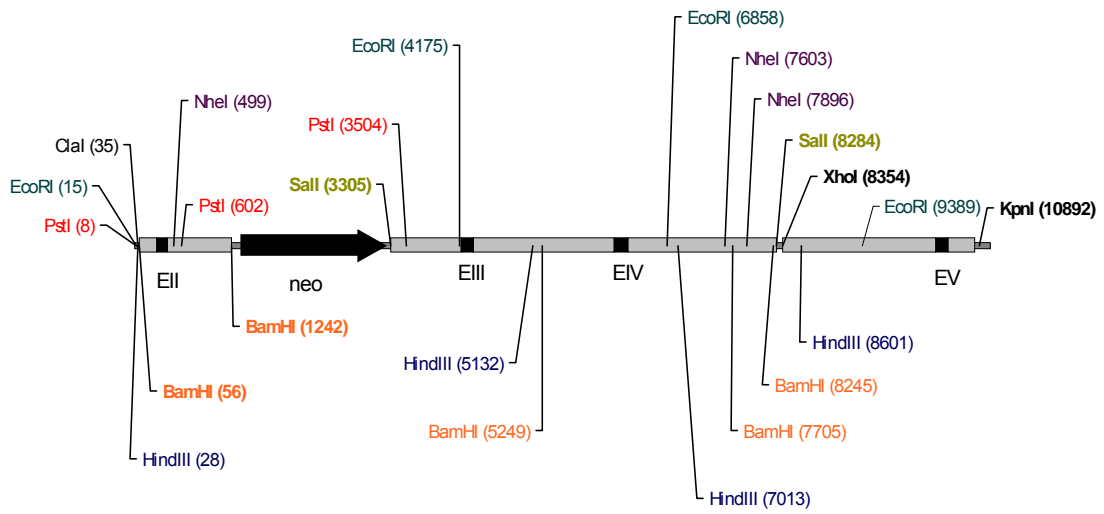
3.1.1.2 Konditionelles GLT-RF Konstrukt

Es wurde ein weiteres konditionelles *targeting* Konstrukt erstellt, bei dem der Verlust von Exon III und Exon IV zu einer GLT-1 Defizienz führt. Das von *FRT*-Sequenzen flankierte Neomycinresistenz Gen (*neo*) wurde als positiver Selektionsmarker in den auszutauschenden Bereich des *replacement* Vektors integriert. Der veränderte Genort ist dem Wildtyp GLT-1 Gens nach selektiver Entfernung der Neobox auf ES-Zell-Ebene bis auf zwei loxP-Sequenzen und einer *FRT*-Sequenz sehr ähnlich.

Zur Erstellung des *targeting* Konstruktes wurde folgende Klonierungsstrategie verfolgt. Als Grundlage für das GLT-1 *targeting* Konstrukt dienten der Rapidflirt (RF) und der pBluescript II SK (+) Vektor. Zunächst wurde das 1.2kb große BamHI-Fragment in den *pRapidflirt* kloniert. Anschließend wurde das erste Fragment einschließlich der Neomycin-Kassette und den *Cre*- und *FRT*-Schnittstellen ClaI-XhoI in den pBluescript II SK (+) Vektor kloniert. Dann erfolgte die Insertion des 5.0kb großen Sall-Fragmentes. Als letztes Fragment wurde das 1.2kb XhoI-KpnI-Fragment einligiert. Im 3. Fragment wurde zuvor über den 5'PCR-Primer eine XbaI-Schnittstelle für die Analyse der homologen Rekombination im *Southern blot* eingeführt. Die Linearisierung für die Elektroporation erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit ClaI oder KpnI.

Abbildung 14 zeigt den *targeting* Vektor GLT-RF mit den Schnittstellen (a) und die Kartierung (b).

a)



b)

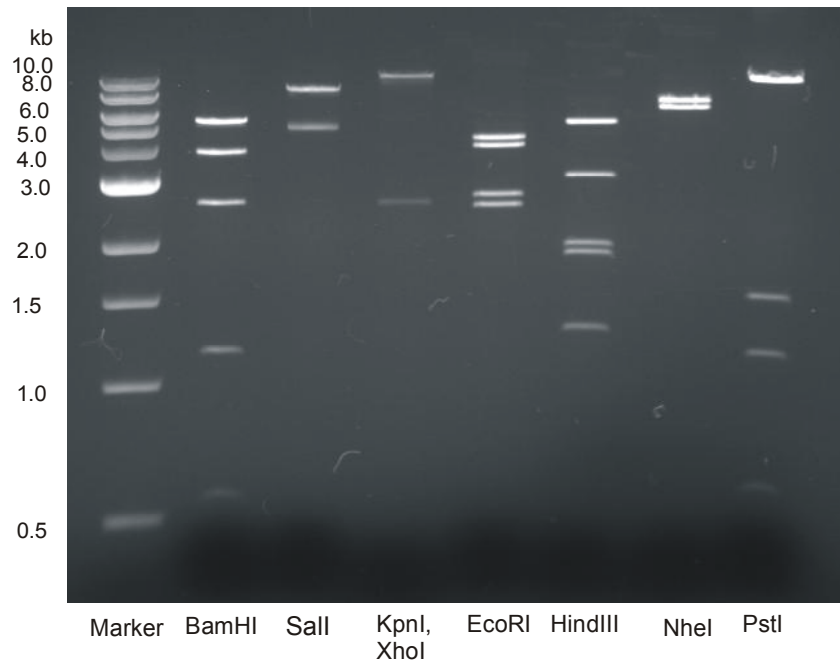


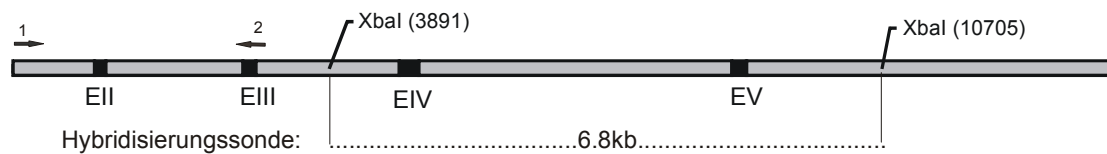
Abb. 14: Targeting Vektor GLT-RF

a) Schnittstellen

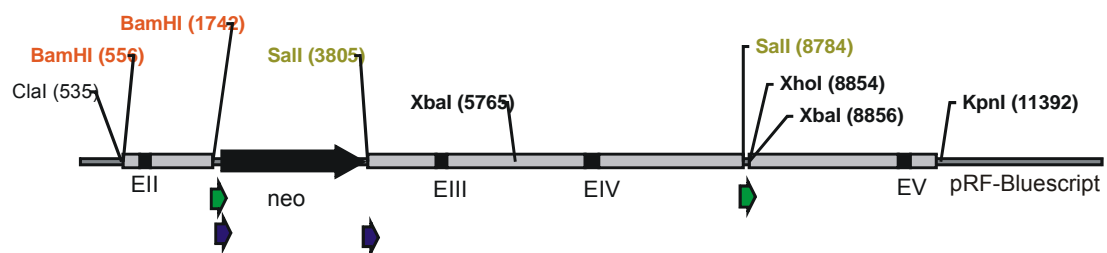
b) Kartierung

Abbildung 15 zeigt den *Targeting* Vektor, Gen-Locus des GLT-1 Gens und die *replacement* Strategie. Das *targeting* Konstrukt enthält 9.7kb genomische Sequenz. Zwischen Exon II und Exon III befindet sich ein Neomycinresistenz Gen (*neo*). Zusätzlich befinden sich zwei *FRT*-Sequenzen, die die *neo*-Kassette im *targeting* Vektor flankieren. Die *neo*-Box einschließlich Exon III und IV sind von *loxP*-Sequenzen flankiert.

GLT-1 wt-Allel



GLT-1 targeting Konstrukt



Homolog rekombiniertes GLT-1 Allel

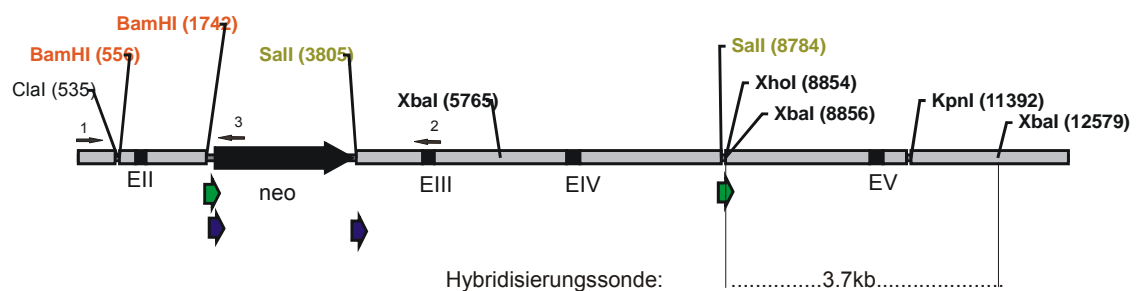


Abb. 15: Wildtyp-Genort, GLT-RF targeting Konstrukt und replacement

Die *Cre*-Schnittstellen sind durch grüne, die *FRT*-Schnittstellen durch blaue Pfeile dargestellt. Die mit den Zahlen versehenen Pfeile stellen die für die PCR verwendeten Primerpaare dar: ¹mglt1 intron1ext s, ²glt-1 exIII as und ³5' neo reverse RF.

Die Funktionalität der *Cre*- bzw. *FRT*-Sequenzen im konditionellen *targeting* Konstrukt wurde mit Hilfe des *E. coli* 294-*Cre* und *E. coli* 294-*FRT* Rekombinationssysteme gezeigt (Buchholz, 1996). Im konditionellen GLT-RF Konstrukt sind Exon III und Exon IV von *loxP*-Sequenzen und die Neomycin-Kassette von *FRT*-Sequenzen flankiert.

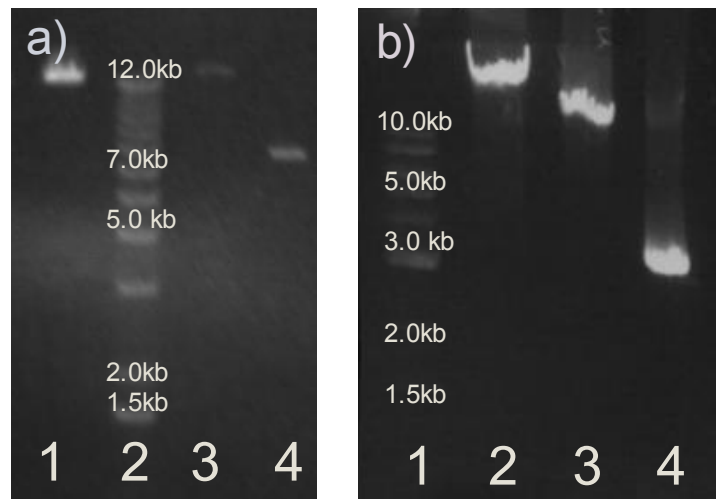


Abb. 16: Funktionalität der *Cre*- und *FRT*-Sequenzen

a) Trennung der rekombinierten, linearisierten Plasmide

1 *FRT*-rekombiniertes Plasmid, 2 kb+-Marker, 3 Positivkontrolle, nicht-rekombiniertes konditionelles Konstrukt und 4 *Cre*-rekombiniertes Plasmid.

b) PCR-Analyse mit ExonIIs-Primer und ExonVas-Primer

1 kb-Marker, 2 Positivkontrolle, PCR-Fragment des nicht-rekombinierten konditionellen Konstruktes, 3 PCR-Fragment der *FRT*-Rekombination und 4 PCR-Fragment der *Cre*-Rekombination.

In Abbildung 16a wird der Größenunterschied der PvuI linearisierten konditionellen Konstrukt DNA (1) im Vergleich zum *FRT*- (3) und *Cre*-rekombinierten Plasmid DNA (4) deutlich. Die erwarteten Größen für das konditionelle Konstrukt von 13.8kb und für das *FRT*-rekombinierte Konstrukt von 12.7kb, bei der die Neomycin-Kassette deletiert worden war, wurden bestätigt. Das in 4 dargestellte *Cre*-rekombinierte Konstrukt zeigt mit 7.8kb die geringste Größe. Durch eine *Cre*-Rekombination wurden aus dem *targeting* Konstrukt die *neo*-Box einschließlich Exon III und Exon IV entfernt. Diese Ergebnisse wurden durch eine PCR mit ExonIIs- und ExonVas-Primern bestätigt (Abbildung 16b). Aufgrund der Sequenz-Daten resultiert eine errechnete Größen von 9kb, 7.8kb und 2.8kb für die jeweiligen PCR-Fragmente.

3.1.2 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Die *targeting* Vektoren wurden durch Elektroporation in embryonale Stammzellen der Maus zur homologen Rekombination in das Genom eingeführt. Hierzu wurden R1, HM-1, V.8.1 und Bruce ES-Zellen verwendet. Die R1-ES-Zellen gehen aus der Kreuzung von 129/J und 129/Sv-CP Tieren hervor (Nagy *et al.*, 1993). Die HM-1 ES-Zellen wurden durch Injektion von E14TG2a-Zellen in HGPRT-defiziente 129/J Blastozysten gewonnen (Magin, 1992). V.8.1 Zellen wurden von R. Jaenisch, Boston, zur Verfügung gestellt. Bruce ES-Zellen wurden aus C57Bl/6 Mäusen gewonnen und von Pasparakis (Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

Ihre Totipotenz wurde durch die Cokultivierung auf einer Zellschicht von embryonalen Fibroblasten, die Zugabe von *Leukaemia inhibitory factor* (LIF) (Gearing *et al.*, 1987) und die Verwendung möglichst niedriger Zellpassagen erhalten. Nach der Positiv-Negativ-Selektion mit G481 wurden potentiell positive Klone isoliert und auf homologe Rekombination untersucht. Dazu wurde die DNA im *Southern blot* bzw. Polymerasekettenreaktion (PCR) analysiert (Abb. 17, Abb. 18).

Über *Southern blot* Hybridisierung wurde der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLAP) homologer Rekombinationsereignisse ermittelt. Restriktionsenzyme werden benutzt, die eine zusätzliche oder in der Position veränderte Schnittstelle innerhalb und eine weitere Schnittstelle außerhalb des *targeting* Vektors besitzen. So tritt bei homologen Rekombinanten zusätzlich zum Wildtyp-Fragment ein in der Länge verändertes Restriktionsfragment auf. Verwendet man dann eine außerhalb des *targeting* Vektors liegende Hybridisierungssonde, so werden nur DNA-Fragmente von Wildtyp und homolog rekombinierten Allelen markiert.

3.1.2.1 Homologe Rekombination des *targeting* Vektors GLT-BS

Für das *screening* wurde eine BamHI-Restriktion gewählt und eine externe XbaI/SspI-Sonde 3' von Exon V für den *Southern blot* gewählt. Die Sonde ergab ein 5.1kb großes Wildtyp und ein 6.5kb großes Fragment nach erfolgter homologer Rekombination. Zellklone, die eine homologe Rekombination zeigten, wurden weitergehend analysiert. Bei einem *replacement* durch homologe Rekombination müssen zwei *crossover* stattfinden, um den veränderten Genabschnitt an die Stelle des natürlichen Locus einzuführen. Bei dem hier verwendeten *targeting* Konstrukt müssen die *crossover* 5' von *loxP1* und 3' von *loxP3* erfolgen, um zusätzlich zur *neo*-Box auch die drei *loxP*-Stellen einzuführen. Dabei ist der Bereich zwischen *loxP1*- und *loxP2*-Stelle um 1.6kb kürzer als

der 5' vor der *loxP1*-Stelle mit 3.5kb, so dass eine Rekombination 5' vor der ersten *loxP1*-*site* wahrscheinlicher ist. 3' der *loxP3*-*site* sind 2.7kb isogener DNA vorhanden (Abb. 17). Ein korrektes *replacement* ohne zusätzliche heterologe Integration wurde mit der internen Sonde für das Neomycinresistenz-Gen spezifischen *neo*-Sonde nachgewiesen. Der „positive Zellklon“ wurde zur Blastozysteninjektion verwendet.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Elektroporationen. Aus siebzehn Elektroporationen mit über tausend isolierten Zellklonen befand sich ein Zellklon, der in der ersten Analyse eine homologe Rekombination zeigte. Der homolog rekombinierte positive ES-Zell Klon E24,1C besaß kein zusätzlich heterolog rekombiniertes *targeting* Konstrukt, da keine zusätzliche Bande in *Southern blot* mit der *neo*-Sonden Hybridisierung nachweisbar war.

Zellen	Spannung/V	Kapazität/ μ F	Zeitkonstante/s	Analysierte Klone (<i>Southern blot</i>)
R1	200	500	7.5-9.9	628
HM-1	200	500	7.7-8.8	227
V.8.1	400	25	0.4-0.5	218

Tab. 2: Elektroporation mit GLT-1 *targeting* Vektor (GLT-BS)

Abbildung 17 zeigt den *Southern blot* Nachweis des homolog rekombinierten GLT-1 *targeting* Vektors (a). Die durch die interne *neo*-Sonde markierten Restriktionsfragmente zeigen die erwarteten Längen (b).

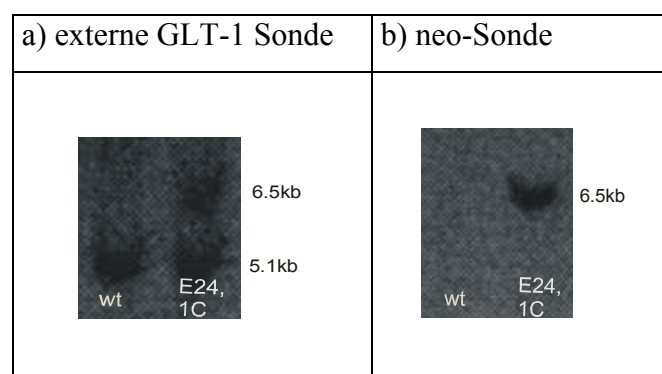


Abb. 17: *Southern blot* genomischer ES-Zell-DNA auf Grundlage des GLT-BS *targeting* Vektors

Vergleich der Hybridisierung eines wt-Klons mit dem homolog rekombinierten V.8.1 Klon E24,1C.

a) Hybridisierung mit der externen GLT-1 Sonde

b) Hybridisierung mit der internen *neo*-Sonde

3.1.2.2 Homologe Rekombination des targeting Vektors *glt-RF*

Bei einem *replacement* durch homologe Rekombination müssen im GLT-RF *targeting* Vektor zwei *crossover* stattfinden, um den veränderten Genabschnitt an die Stelle des natürlichen Locus einzuführen.

Im hier verwendeten *targeting* Konstrukt müssen *crossover* 5' von *loxP1* und 3' von *loxP3* erfolgen, damit zusätzlich zur *neo*-Box die beiden *loxP*- und *FRT*-Stellen eingeführt werden. Der Bereich zwischen *FRT2*- und *loxP2*-Sequenz ist mit 4.9kb deutlich größer als der 5' vor der *loxP1*-Stelle mit 1.2kb, so dass eine Rekombination 5' hinter der zweiten *FRT2-site* wahrscheinlicher ist (Abb. 15). Die Funktionalität der Schnittstellen wurde vor der Blastozysteninjektion durch eine transiente *Cre*- bzw. *Flp*-Expression bestätigt.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Elektroporationen mit dem auf dem *Rapidflirt-Bluescript* basierenden GLT-1 Konstrukt wieder. Aus den 34 Elektroporationen mit fast zweitausend isolierten Zellklonen befanden sich drei homolog rekombinierte Zellklone, zwei V.8.1 und ein Bruce ES-Zell Klon.

Zellen	Analysierte Klone (<i>Southern blot</i> , PCR)
HMI	302
RI	132
V.6.5	152
V.8.1	830
Bruce	355

Tab. 3: Elektroporation mit GLT-1 *targeting* Vektor (GLT-RF)
Auflistung der analysierten elektroporierten ES-Klone

Die erwarteten Größen der homologen Rekombination des GLT-RF *targeting* Konstruktes im *Southern blot* und der PCR sind in Abbildung 18 dargestellt. Für das *screening* wurde eine *XbaI*-Restriktion gewählt. Für den *Southern blot* wurde die gleiche externe Sonde wie für das GLT-BS *targeting* Vektor gewählt. Die Sonde ergab im *Southern blot* ein 6.8kb Wildtyp Fragment und ein 3.8kb Fragment für die homologe Rekombination (a). Für die PCR wurden unterschiedliche Primer-Paare eingesetzt. Der externe Primer *mglt1 intron1 ext* wurde in Kombination mit den internen Primern 5' *neo reverse RF* bzw. *glt-1*

exIII as verwendet. Das ersten Primerpaar *mgl1 intron1 ext* und 5' *neo reverse RF* ergibt für den Wildtyp Klon kein Fragment (Spur 1) und für das homolog rekombinierte ein Fragment der Größe von etwa 1.5kb (Spur 2). In der dritten und vierten Spur sind das mit den *mgl1 intron1 ext* und *glt-1 exIII as* Primerpaaren amplifizierte Fragmente dargestellt. Das Wildtyp Fragment weist eine Größe von etwa 2kb und das homolog rekombinierte eine um das *neo*-Fragment (2kb) vergrößerte Bande von 4kb auf (b).

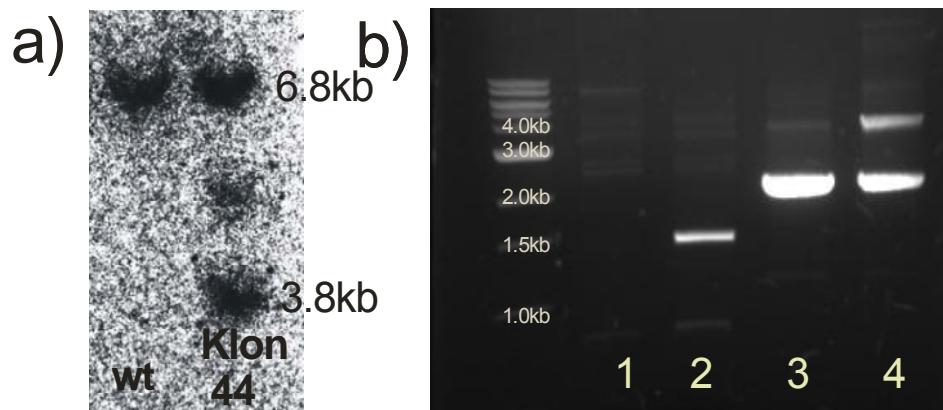


Abb. 18: Nachweis der homologen Rekombination der GLT-RF targeting Sequenz in der genomischen ES-Zell-DNA

a) Southern blot der Wildtyp und homolog rekombinierten ES-Klon DNA mit externer GLT-1 Sonde

b) PCR-Nachweis der homologen Rekombination mit den entsprechenden Primerpaaren

Für die Spuren 1 und 2 *mgl1 intron1 ext s* und 5' *neo reverse RF* und für die Spuren 3 und 4 die Primerpaare *mgl1 intron1 ext s* und *glt-1 exIII as*. Spur 1 und 3 wt Klone, Spur 2 und 4 homolog rekombinierte Klone.

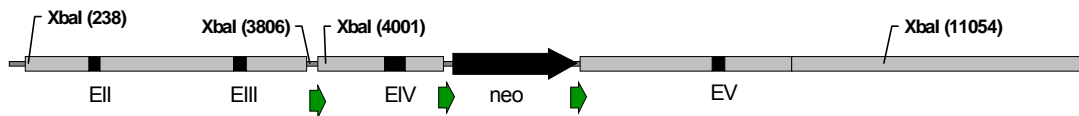
3.1.3 Transiente FRT- und Cre-Expression

Zellen, die im Nachweis eine homolog rekombinierte DNA zeigten, wurden weitergehend analysiert. Die *targeting* Konstrukte wurden mit *loxP*- beziehungsweise mit *FRT*-Sequenzen ausgestattet, um ein Ausscheiden des Selektionsmarkers noch auf ES-Zell Ebene zu ermöglichen. Der Vorteil dieser Methode bei transgenen Tieren, die erst nach Induktion ein defizientes Gen tragen sollen, besteht darin, dass das homolog rekombinierte Gen nicht von der *neo*-Box beeinflusst wird. Es wurde bereits gezeigt, dass in ES-Zellen durch eine transiente Expression der *Cre*-Rekombinase die Exzision des *gefloxten* Neomycinresistenzgens möglich ist (Gu *et al.*, 1994). Ebenfalls ist bekannt, dass durch eine transiente Expression der Flipase eine Exzision der durch *FRT*-Sequenzen flankierten DNA-Bereiche in ES-Zellen möglich ist (Seibler *et al.*, 1998; Schaft *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde eine gezielte Anwendung der beiden spezifischen Rekombinasen *Cre* und *Flp* innerhalb eines Konstruktes in ES-Zellen gezeigt (Lauth *et al.*, 2002).

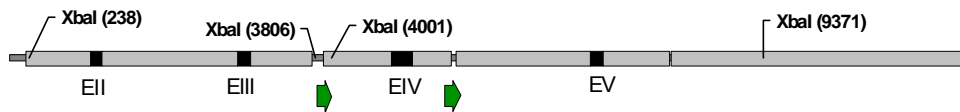
3.1.3.1 Transiente Cre-Expression in GLT-BS

Die *loxP*-Stellen, die den Selektionsmarker flankieren, stellen den Angriffspunkt der Rekombinase dar. Nach der Exzision verbleibt nur eine *loxP*-Sequenz am *targeting* Genort. Bei dem hier verwendeten Konstrukt ist das Exon IV von zwei *loxP*-Stellen flankiert, die später im transgenen Tier eine *Cre*-Exzision des Exons ermöglichen. Bei einem Genort mit drei *loxP*-Sequenzen sind drei verschiedene Produkte nach *Cre*-Exzision möglich: Im ersten Fall wird – wie gewünscht – nur die *neo*-Box ausgeschnitten (B), im zweiten Fall wird nur das Exon entfernt, und im letzten Fall wird der gesamte Genbereich zwischen den 5' und 3' *loxP*-Stellen entfernt (C) (Abb. 19).

A)



B)



C)

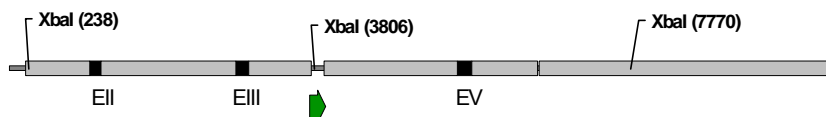


Abb. 19: Targeting Konstrukt und die Möglichkeiten der Cre-Rekombination im GLT-BS gefloxtem Konstrukt

A) Targeting Konstrukt, B) Entfernung der *neo*-Box im *targeting* Konstrukt, C) Exzision des gesamten Bereichs zwischen den äußeren *loxP*-Stellen des *targeting* Konstrukts.

Zur transienten *Cre*-Expression wurde der pBS185 Vektor beziehungsweise der pGK-*Cre* Vektor durch Elektroporation in die homolog rekombinierten ES-Zellen E24,1C eingebracht. Der pBS185 Vektor kodiert die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des hCMV-Promoters. Beide Promotoren ermöglichen eine ubiquitäre *Cre*-Expression. Des Weiteren erfolgte eine Transduktion des aufgereinigten rekombinierten Peptids His-TAT-NLS-*Cre* in den homolog rekombinierten ES-Zell-Klon E24,1C (Peitz *et al.*, 2002). Die *nuclear leader sequence* (NLS) dient der Zielsteuerung des Proteins in den Zellkern, dem Ort der Rekombination. Die TAT-Peptidsequenz erhöht die zelluläre Aufnahme des Fusionsproteins.

Eine Selektion zur Anreicherung potentiell positiver Zellklone ist bei dieser Elektroporation nicht möglich, da die gewünschten Zellklone keinen Selektionsmarker mehr tragen. Stattdessen wurde hier von jedem Klon ein geringer Teil der Zelle auf 96-Loch Platten mit G418-Medium kultiviert. Dies diente als negative Kontrolle. In Zellklone, die unter diesen Bedingungen starben, hatte eine *Cre*-Rekombination stattgefunden, die zum erwünschten Verlust der Neomycinresistenz führte.

In folgender Tabelle ist die Anzahl der rekombinierten Klone nach transienter *Cre*-Expression auf einer 96er Platte wiedergegeben.

<i>Cre</i>-System	Rekombinierte Klone
pBS185 (CMV- <i>Cre</i>)	2
pGK- <i>Cre</i>	4
pGK- <i>Cre</i>	3
<i>Cre</i> -Fusionsprotein	1

Tab. 4: Transiente *Cre*-Expression in homolog rekombinierten ES-Zellen

Die anschließende DNA-Analyse wurde mit der DNA G418-sensitiver Zellklone durchgeführt. Der RFLP Nachweis im *Southern blot* erfolgte nach XbaI Restriktion mit der externen GLT-1 Sonde. Der unveränderte, homolog rekombinierte *targeting* Vektor und das Wildtyp-Fragment ergibt eine Bande in der Größe von 7.0 kb bzw. 6.8kb. Die fehlende Intronsequenz zwischen Exon IV und Exon V entspricht der Größe der *neo*-Box. Deshalb sind die gleichen Größen im *Southern blot* für das Wildtypfragment und das gesamte *targeting* Konstrukt zu erwarten. Eine Exzision nur der *neo*-Box ergibt ein 5.8kb großes Fragment und die gesamte Exzision ergibt ein 4.1kb großes Fragment.



Abb. 20: Southern blot Nachweis der transienten Cre-Expression in ES-Zellen
Spuren 1-4 Exzision der *neo*-Box mit wt-Fragment. Spur 5 gesamtes *targeting* Konstrukt und wt-Bande.

Nach drei Elektroporationen mit dem pBS185 Vektor beziehungsweise dem pGK-*Cre* Vektor und Transduktion des *Cre*-Fusionsproteins wurde ausschließlich die Entfernung der *neo*-Box nachgewiesen (Abb. 20). Bisherige Erfahrungen haben gezeigt, dass eine partielle Exzision unwahrscheinlich ist. Daher liegt die Vermutung einer nicht vollständig über das ganze *targeting* Konstrukt erfolgten homologen Rekombination nahe. Folglich fand das erste *crossing over* 3' nach der ersten *loxP*-Sequenz statt. Das zweite *crossing over* erfolgte 3' nach der dritten *loxP*-Stelle.

3.1.3.2 Transiente *Flp*- und *Cre*-Expression in *GLT-RF*

Das *GLT-RF targeting* Konstrukt ist sowohl mit *FRT*-Sequenzen, die die *neo*-Box, und mit *loxP*-Sequenzen, die das Neomycinresistenzgens einschließlich Exon III und IV flankieren, ausgestattet. Da die *FRT*-Sequenzen den Angriffspunkt der Flipase darstellen, kann der Selektionsmarker durch eine transiente Expression schon auf ES-Zellebene selektiv ausgeschnitten werden. Ebenfalls wurde eine transiente *Cre*-Expression zur funktionellen Analyse der *loxP*-Schnittstellen durchgeführt. Die nach der Exzision des Resistenzgens verbleibenden *loxP*-Sequenzen ermöglichen im transgenen Tier die Exzision der homolog rekombinierten Exone III und IV.

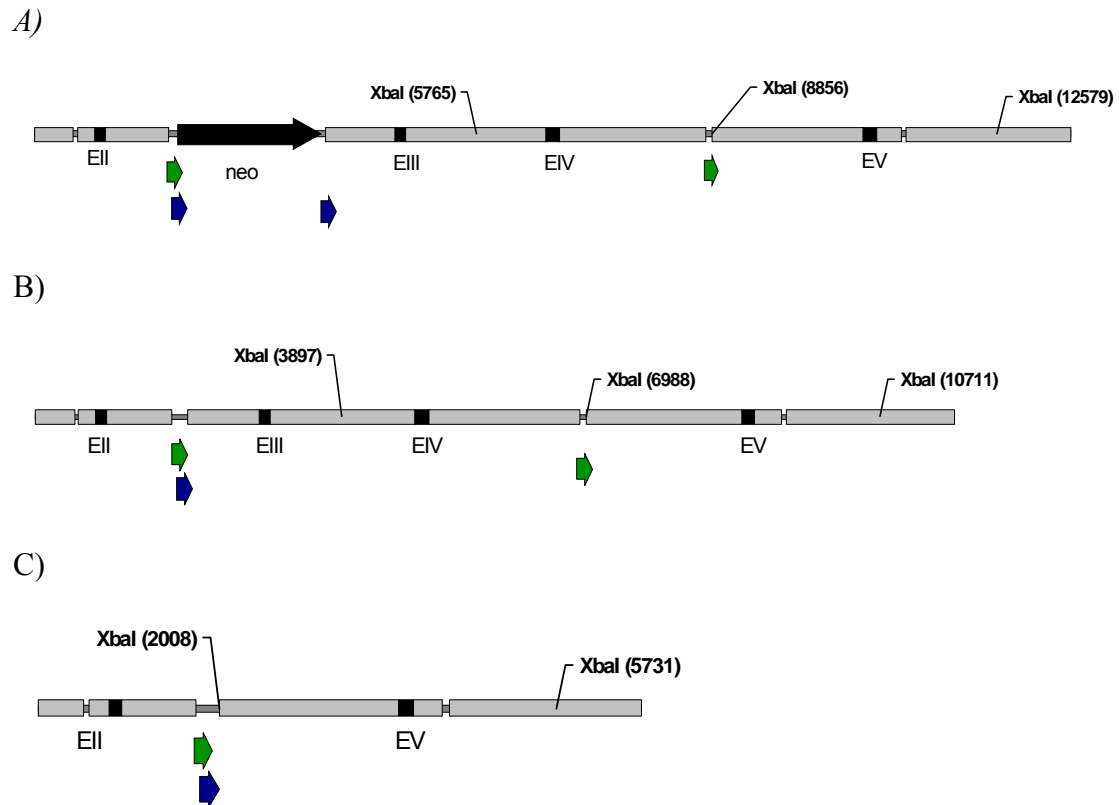


Abb. 21: Targeting Konstrukt und die Möglichkeiten der Rekombination im GLT-RF Konstrukt
 A) Homolog rekombiniertes *targeting* Konstrukt, B) Entfernung der *neo*-Box im *targeting* Konstrukt an den *FRT*-Sequenzen, C) Exzision des gesamten Bereichs zwischen den *loxP*-Stellen des *targeting* Konstrukts. Darstellung der Exone als schwarze und Intronbereiche als graue Balken. Die *neo*-Box ist als schwarzer, die *FRT*-Sequenzen sind als blaue und *loxP*-Sequenzen als grüne Pfeile dargestellt.

Im *targeting* Konstrukt (A) wird nach transienter Flipase-Expression ausschließlich die *neo*-Box ausgeschnitten, (B) nach transienter *Cre*-Expression der gesamte Genbereich der *loxP* flankierten Sequenzen entfernt (C) (Abb. 21).

Der unter dem ubiquitären PGK-Promoter stehende *Cre*- bzw. *FLP*-Rekombinase (Flipase) Vektor wurde durch Elektroporation in die homolog rekombinierten GLT-RF Bruce Zellen für die transiente Expression eingebracht. Die Selektion erfolgte unter den im Kapitel 3.1.3.1. dargestellten Bedingungen. In folgender Tabelle ist die Anzahl der rekombinierten Klone einer 96er Platte nach transienter *Cre*- bzw. *FRT*-Expression wiedergegeben.

Transientes System	Rekombinierte Klone
pGK-FRT	14
pGK-Cre	8

Tab. 5: Transiente Expression in homolog rekombinierten ES-Zellen

Die anschließende DNA-Analyse wurde mit der DNA G418-sensitiver Zellklone durchgeführt. Der RFLP Nachweis im *Southern blot* nach XbaI Restriktion kann lediglich zwischen Wildtyp Klonen und rekombinierten Klonen unterscheiden. Der *Southern blot* ergibt dabei ein 6.8kb großes Wildtyp, der homolog rekombinierte Klon (A), nach der Exzision (B) und (C) ein 3.8kb großes Fragment. Die Negativkontrolle erfolgte mit den Primerpaaren mgl1 intron1 ext S und Neo5'Flirt as. Dabei wird nur für den homolog rekombinierten ES-Zellklon auf Basis des RF-Vektors eine Bande in der Höhe von etwa 1kb erwartet (Spur 1 (a) und (b)). Der Nachweis der transienten *Cre*-Expression erfolgte mit den Primerpaaren mgl1 intron1 ext S und mgl1 EV as und der transienten Flipase-Expression erfolgte mit mgl1 intron1 ext S und frt1-rf as.

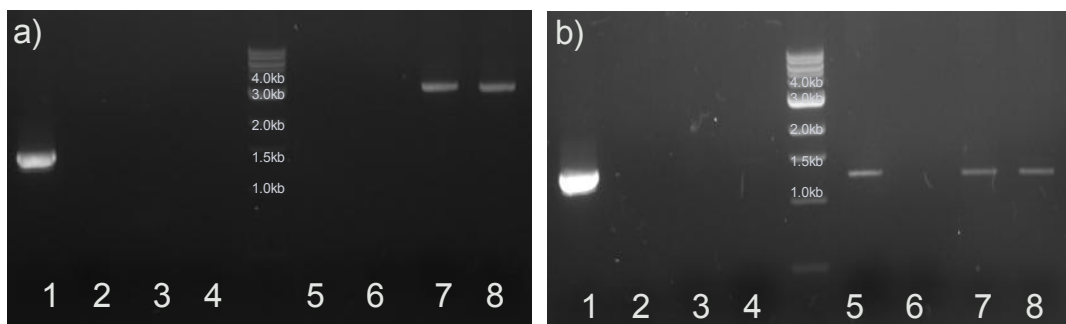


Abb. 22: PCR der transienten Expression in embryonalen Stammzellen

a) Transiente *Cre*-Expression

Spur 1 und 5 homolog rekombinierter Klon 2 und 6 wt, 3 und 7 Klon 1 Cre, Spur 7 und 8 Klon 2 Cre.
Primerpaare: 1-4 mgl1 intron1 ext S und Neo5'Flirt as, 5-7 mgl1 intron1 ext S und mgl1 EV as.

b) Transiente Flipase-Expression

Spur 1 und 5 homolog rekombinierter Klon 2 und 6 wt, 3 und 7 Klon 1 Flp, Spur 7 und 8 Klon 2 Flp.
Primerpaare: 1-4 mgl1 intron1 ext S und Neo5'Flirt as, 5-7 mgl1 intron1 ext S und frt1-rf as.

Mit den Primerpaaren mgl1 intron1 ext S und mgl1 EV as konnte ausschließlich ein PCR-Produkt in den Spuren 7 und 8 (a) amplifiziert werden. Das Wildtyp Fragment von etwa 8kb konnte nicht amplifiziert werden. Der Nachweis der Flipase vermittelten Rekombinationsereignisses muss mittels zwei PCR-Amplifikationen unter der Verwendung unterschiedlicher Primerpaare gezeigt werden (b). Nach der Flipase-Rekombination erfolgt die Exzision der Neomycin-Kassette (Spuren 3 und 4 (b)). Mit den

Primerpaaren mglt1 intron1 ext S und frt1-rf as kann nur der Wildtyp Klon (Spur 6 (b)) nicht amplifiziert werden.

Durch transiente Elektroporationen mit den Vektoren pGK-*FRT* und pGK-*Cre* konnte die Neomyzinkassette bzw. der *loxP* flankierte Genbereich selektiv entfernt werden.

3.1.4 Charakterisierung homolog rekombinierter ES-Zell Klone

Einer der wichtigsten Vorbedingungen ist die Erhaltung der Pluripotenz der embryonalen Stammzellen. Aufgrund ihres uneingeschränkten Differenzierungspotentials kann die genetische Information durch Vererbung in die Keimbahn chimärer Tiere weitergegeben werden. Für die Erstellung der Glutamattransporter GLT-1 defizienten Maus werden hierbei die Eigenschaften homolog rekombinierter ES-Zellen für die Beteiligung am Aufbau aller fötalen Gewebe zunutze gemacht. Deshalb wird in der Gewebekultur die Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen durch eine Schicht von Nährzellen aus Fibroblasten und der Zugabe des Leukämie-inhibierenden Faktors (LIF) in das Kulturmedium unterdrückt. Ein Marker der Pluripotenz ist die alkalische Phosphataseaktivität (Pease *et al.*, 1990). Das chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-indoxylphosphat (BCIP) wird in Verbindung mit Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT) durch alkalische Phosphatase zu einem Indigofarbstoff umgesetzt. Die im Hintergrund stark verminderte Phosphatase Aktivität der differenzierten embryonalen Fibroblasten kontrastiert zu den stark blau angefärbten undifferenzierten embryonalen Stammzellen.

Chromosomenmutationen können zu Deletionen, Insertionen, Duplikationen und Translokation führen. Zahlenmäßige Veränderungen zeigt sich durch das Fehlen oder eines zusätzlichen Chromosoms. Bei der Monosomie oder Trisomie spricht man von numerische Chromosomenaberration. Mäuse besitzen 40 Chromosomen, davon zwei Geschlechtschromosomen. Die in der Karyotypisierung dargestellten Chromosomen befinden sich in der Anaphase der Mitose. Die Ein-Chromatid-Chromosomen der Abbildung 23 sind willkürlich nummeriert.

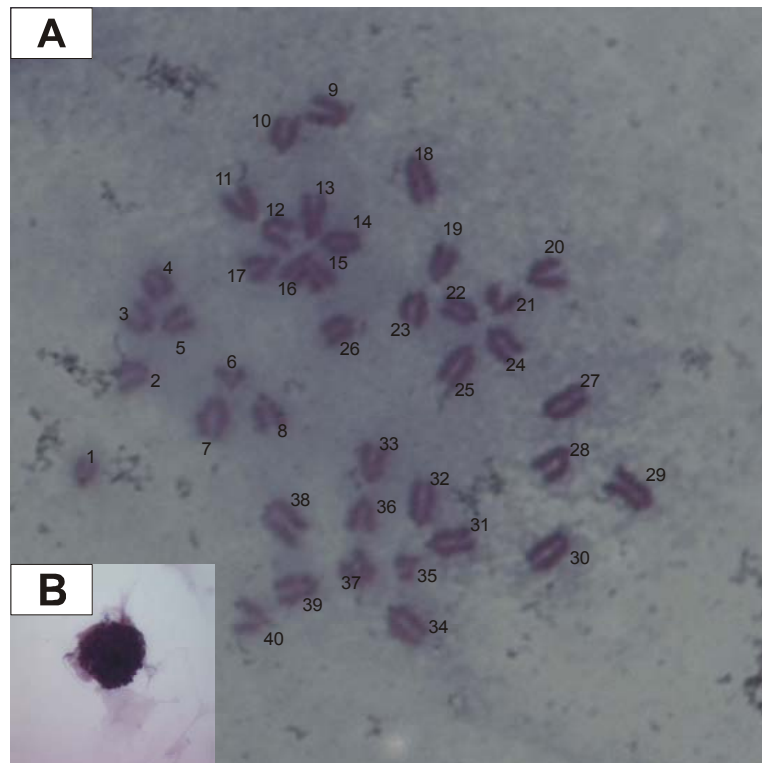


Abb. 23: Phosphatasefärbung und Karyotypisierung homolog rekombinierter ES-Zellen GLT-RF (Bruce)

a) Karyotypisierung des homolog rekombinierten ES-Zell-Klons in der Anaphase

Die Chromosomensätze sind willkürlich nummeriert.

b) Phosphatasefärbung im Vergleich undifferenzierter ES-Zellen mit differenzierten Fibroblasten

3.2 Blastozysteninjektion

Die ES-Zellen des homolog rekombinierten GLT-1 ES-Zell-Klons E24,1C (V.8.1) auf Grundlage des pBS-Vektors wurden in Blastozysten von C57Bl/6- Mäusen injiziert. Die transgenen Embryonen wurden in CD1-Leihmüttern ausgetragen. Der geschlechtsreife männliche, Fell-chimäre Nachkomme wurde mit C57Bl/6-Wildtyp-Weibchen verpaart. Mit Keimbahn chimären Männchen ergibt eine derartige Rückkreuzung Nachkommen, die den dominanten *agouti*-Fellmarker tragen und daher eine braune Fellfarbe zeigen. Insgesamt wurden 83 Blastozysten reimplantiert aus denen zwei Nachkommen hervorgingen, von denen ein Nachkomme eine geringe Fellchimärität von etwa 5% vorzuweisen hatte. Rückkreuzungsexperimente bestätigten, dass keine Keimbahn-Chimärität vorlag.

Die ES-Zellklone des homolog rekombinierten *targeting* Konstruktes GLT-RF wurden zum Teil mit dem gesamten homolog rekombinierten Locus und zum Teil mit der selektiv entfernten Neomycin-Kassette für den Transfer in Blastozysten verwendet. Insgesamt wurden 122 Blastozysten reimplantiert, die zu vier Nachkommen führten, von denen sich

alle in der Genotypisierung mittels PCR als negativ erwiesen. Die Nachkommen werden aufgrund eines fehlenden *agouti* Fellmarkers der Bruce Zellen mittels PCR charakterisiert, so dass keine Aussage über den Chimäritätsgrad getroffen werden kann.

3.3 Induzierbare *Cre*-transgene Mauslinien

Um eine induzierbar GLT-1 defiziente Maus mit *Cre-loxP*- und *tet*-System zu generieren, müssen zu den das Gen flankierenden *loxP*-Sequenzen ein *Cre*-Rekombinase-Gen und ein Transaktivator-Gen im Genom der Maus vorhanden sein. Hierfür wurde ein bizystronisches Konstrukt kloniert.

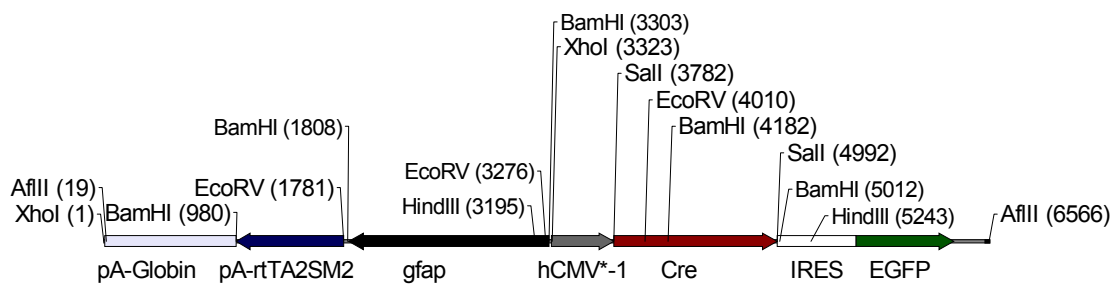
Das *Cre*-Rekombinase-Gen wird durch einen Minimalpromoter reguliert, der durch die Bindung des Transaktivators aktiviert werden kann. Der hier verwendete hCMV-Minimalpromoter (hCMV*-1) besteht aus der Promoter-Enhancer-Sequenz des Cytomegalovirus von Position -675 bis +75, bei der die Enhancer-Region gegen ein Heptamer von Tetrazyklin-Operatoren ausgetauscht wurde (Gossen und Bujard, 1992). Der reverse *tet*-Transaktivator (rtTA2^SM2) steht unter der Kontrolle des *gfap*-Promoters (*glial fibrillary acidic protein promoter*), der ausschließlich eine Genexpression in Astrogliazellen bewirkt (Brenner *et al.*, 1994; Bresnard *et al.*, 1991). Abbildung 24a zeigt das induzierbare bizystronische System der induzierbaren *Cre*-Rekombinase, die durch heterologe Rekombination ins Mausgenom integriert werden soll. Die transgene Mauslinie wird durch Mikroinjektion linearisierter Plasmid-DNA in den männlichen Vorkern mit anschließender heterologer Rekombination generiert.

Für die Klonierung der induzierbaren *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des *gfap*-Promoters mit rtTA2^SM2 als Transaktivator wurde folgende Klonierungsstrategie verfolgt. Zunächst wurde der Promoter hCMV im pIRES2-EGFP Vektor mit AseI-NheI deletiert, die überstehenden Enden aufgefüllt und anschließend religiert. Der Minimalpromoter mit heptamerisierten *tet*-Operatoren hCMV*-1 wurde XhoI-EcoRI aus dem pUHD 10-3 Vektor isoliert und mit den entsprechenden Schnittstellen in den pIRES2-EGFP Vektor inkloniert. *Cre*-NSL (Uschkureit, 2000) aus pCDNA3.1 wurde mit Sall-Linkern versehen und in den modifizierten pIRES2-EGFP Vektor inkloniert. Durch Mutation am rtTA *TetOn* Transaktivator wurde ein neues *TetOn* System eines modifizierten Transaktivators rtTA2^SM2 gebildet, das durch die Ausbildung einer strenger regulierbaren Expression gekennzeichnet ist (Urlinger *et al.*, 2000). Die rtTA2^SM-Mutation führt zu einer ausgeprägteren Induzierbarkeit in Gegenwart geringerer Konzentrationen des Tetrazyklinhomologs Doxyzyklins als rtTA oder andere

Transaktivatoren (Chenuaud *et al.*, 2004; Pluta *et al.*, 2005). Der Transaktivator rtTA2^SM2 aus dem pUHrt62-1 Vektor wurde EcoRI-BamHI und die β -Globin-Sequenz BamHI-XhoI in den pSP73 Vektor subkloniert. Die rtTA2SM2- β -Globinsequenz wurde anschließend XhoI-EcoRV in den Bluescript SK II (+) Vektor subkloniert. Der gfap-Promoter wurde über eine PCR mit EcoRV Sequenz versehenen Primern amplifiziert und anschließend in den modifizierten Bluescript SK II (+) Vektor subkloniert. Die NotI-Schnittstelle wurde mit einem XhoI-Linker versehen. Anschließend wurde die gfap-rtTA2^SM2- β -Globin-Sequenz als XhoI-Fragment Kasette in den modifizierten pIRES2-EGFP Vektor kloniert.

Folgende Abbildung zeigt das Konstrukt der Doxyzyklin aktivierbaren *Cre*-Rekombinase in einer schematischen Darstellung ihrer Schnittstellen (a) und ihrer Kartierung (b).

a)



b)

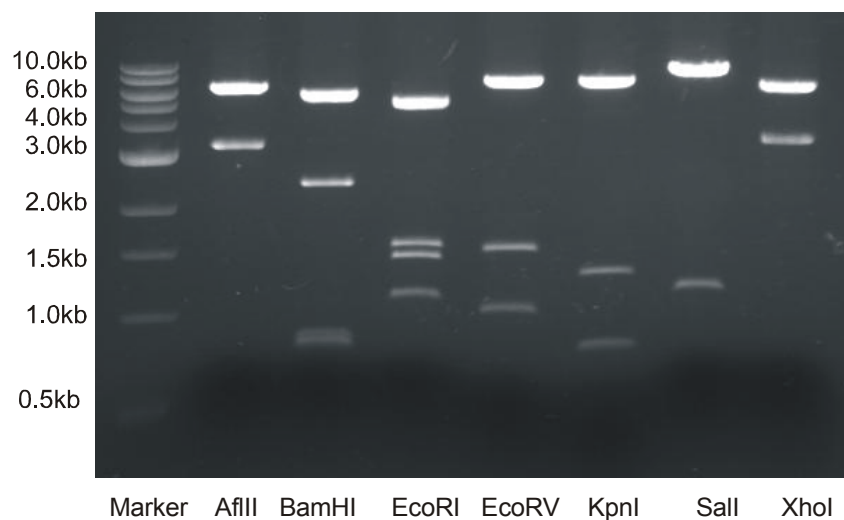


Abb. 24: Induzierbare Cre unter der Kontrolle des gfap-Promoters

a) Schematisch Darstellung der Schnittstellen

b) Kartierung des Konstruktes

3.3.1 Funktionalität der induzierbaren *Cre* in Zellkulturstudien

Da die *Cre*-Expression unter der Kontrolle eines glialen Promoters *gfap* steht, wurden die Versuche zur Induzierbarkeit in C6 Glioma Zellen aus der Ratte, die den Glutamat Transporter EAAC1, jedoch weder GLAST-1 noch GLT-1 endogen exprimieren, durchgeführt (Dowd und Robinson, 1996; Palos *et al.*, 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass C6 Zellen ausschließlich den mGluR1a Glutamat Rezeptor exprimieren (Albansanz *et al.*, 1997). Die C6 gliale Zelllinie dient hierbei als ein *in vitro* Modell für Studien glialer Zelleigenschaften. Bevor die glialen Zellen einer Transfektion unterzogen werden, wurden sie zuvor hinsichtlich ihrer Glutamattransporter und den entsprechenden Rezeptoren untersucht. Die Charakterisierung der C6 Zellen mittels RT-PCR erfolgte mit den für die Glutamat Transportern spezifischen Primern und degenerierten Primern für die Glutamat Rezeptoren. Auf die Auswahl und Lage der Primer der Transporter und Rezeptoren wird in Kapitel 3.7 Stellung bezogen. Als interner Standard diente das ubiquitäre Transkript Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT). Die Expressionsrate der Transkripte konnten mit denen des HGPRT verglichen werden. Mittels RT-PCR konnte die Expression des EAAC1 Glutamat Transporters bestätigt werden, nicht aber des metabotropen Glutamat Rezeptors mGluR1a. Weiterhin konnte ein Transkript des ionotropen Glutamat Rezeptors AMPA amplifiziert werden. Das ubiquitäre Transkript HGPRT soll ein Nachweis über die Qualität der isolierten RNA darstellen, die dem Abbau durch RNasen unterliegen könnten.

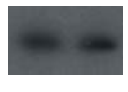


EAAC	AMPA	HGPRT
1.1	0.4	
		

Abb.25: Charakterisierung der C6 wt Zellen

Die RT-PCR wurde mit den für die Glutamattransportern spezifischen und Glutamatrezeptor degenerierten Primern durchgeführt. Hierbei konnten nur die Transkriptionsprodukte für den Glutamattransporter EAAC und für den Glutamatrezeptor AMPA amplifiziert werden. Es wurden Doppelkontrollen durchgeführt. Das Signal für *eaac-1* liegt bei ca.390bp, für *ampa* bei

ca. 340bp und für *hgprt* bei ca. 300bp.

Da ein Transkript des ionotropen Glutamat Rezeptors AMPA amplifiziert werden konnte, wurden die glialen C6 Zellen zusätzlich mit einem für das saure Gliafaserprotein GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) spezifischen Antikörper immunhistologisch charakterisiert. GFAP kommt als Intermediärfilament in Zytoplasma von Gliazellen vor und wird deshalb als Marker für Astrozyten verwendet. Aus den bipolaren O2 Vorläuferzellen (Abb. 26 A) entwickeln sich über die O4 Vorläuferzellen die sternenförmig verzweigte Astrozyten (Abb. 26 B) im natürlichen Zellverband zusätzlich zu den Oligodendrozyten.

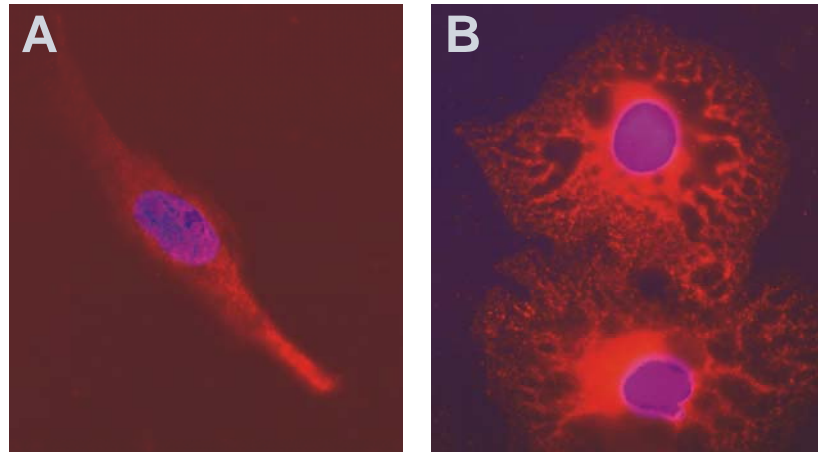


Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopie von C6 wt Ratten Gliomazellen
 Fluoreszenzaufnahmen von C6 wt Zellen mit anti-GFAP/Cy3 gekoppelten Antikörpern in 1000x Vergrößerung. Die Zellen unterscheiden sich hinsichtlich der Morphologie (A) bipolare Zelle und (B) sternförmig verzweigte Zelle.

C6-Zellen wurden mit dem in Abbildung 24a dargestellten linearisierten Vektor der Doxycyclin vermittelten Induzierbarkeit der *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des *gfap*-Promoters elektroporiert. Das Konstrukt wurde mittels PCR hinsichtlich ihrer vollständigen Rekombination in die genomische DNA der Ratten Gliomazellen untersucht. Verwendet wurden dazu unterschiedliche Primerpaare: GFAP 3'as gepaart mit *rtTA2^SM2* 3'as, *Cre*- und EGFP-Primerpaare.

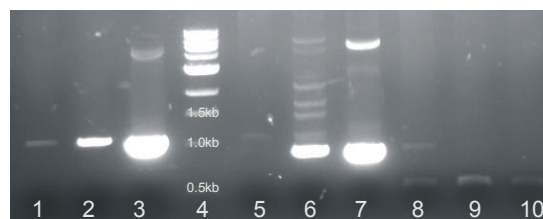


Abb. 27: Einbau des gesamten Konstruktes in C6-Zellen
 Für die Spuren 1-3 wurde das *Cre*-Primerpaar, 5-7 der GFAP 3'as zusammen mit dem Transaktivator Primer *rtTA2^SM2* 3'as und 8-10 das EGFP-Primerpaar verwendet. Spuren 1, 5 und 8 PCR-Fragment des Zellklons C6 IC3, Spuren 2, 6 und 9 PCR-Fragment des Zellklons C6 IC6 und Spuren 3, 7 und 10 des Zellklons C6 IC9.

Alle Zellklone C6 IC3, C6 IC6 und C6 IC9 zeigen eine vollständige Rekombination über das gesamte Konstrukt. Für den *Cre*-Primerpaar resultiert eine Größe von 1.1kb, den GFAP 3'as zusammen mit dem rtTA2^SM2 3'as eine Größe von 0.8kb und dem EGFP-Primerpaar eine Größe von 0.5kb. Die aus den mit den EGFP-Primern resultierenden PCR-Fragmente sind schwach zu erkennen, da sie sich auf der Höhe des farblichen Beladungspuffers Bromphenolblau befinden.

Die „kalte“ RT-PCR auf die Transkription der *Cre*-Rekombinase erfolgte 48h nach der Induktion mit Doxyzyklin. Das System der induzierbaren *Cre*-Rekombinase erweist sich in C6 Rattenglioma Zellen als funktional. So kann die *Cre*-Expression in Gegenwart von 5 µg/µl Doxyzyklin induziert werden. Die Expression das über eine IRES Sequenz gekoppelte *egfp* kann jedoch nicht induziert werden.

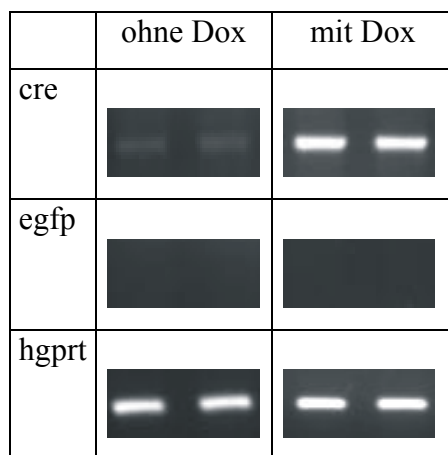


Abb. 28: Doxyzyklin induzierte *Cre*-Expression in C6 Zellen

Die RT-PCR wurde mit *cre*, *egfp* und *hgprt* spezifischen Primern durchgeführt. Für den Nachweis der Induzierbarkeit wurde Klon 9, der in Abbildung 27 dargestellten C6-Zellen verwendet. Es wurden Doppelkontrollen durchgeführt. Das Signal für *cre* liegt bei ca. 1.1kb und für *hgprt* bei ca. 300bp. Das erwartete Signal für *egfp* liegt bei ca. 0.5kb.

3.3.2 Funktionalität der Doxyzyklin induzierten *Cre*-Expression in der Maus

Das in Abbildung dargestellte Konstrukt der durch Doxyzyklin induzierbaren ortsspezifischen *Cre*-Rekombinase wurde für die Mikroinjektionsexperimente mit dem Restriktionsenzym AflIII geschnitten, auf einem Agarosegel aufgetrennt, isoliert und aufgereinigt. Etwa hundert Kopien des DNA-Fragments wurden in den männlichen Vorkern der befruchteter Eizellen injiziert und in dem am Ende der Eileiter befindenden Trichter (*Infundibulum*) einer scheinchwangeren Maus reimplantiert.

In folgender Abbildung werden die transgenen Tiere auf den vollständigen Einbau des Konstruktes in die genomische DNA der Maus untersucht. Wie bereits in Kapitel 3.3.1 über die Rekombination des Konstruktes in den glialen C6 Zellen dargestellt, wird auch die Integration des induzierbaren Konstruktes in der Maus mit unterschiedlichen Primerpaaren belegt. Alle analysierten Mäuse zeigten eine vollständige Rekombination

über das gesamte Konstrukt. Die eingeschleuste heterolog, ohne Bevorzugung an einem bestimmten chromosomalen Ort rekombinierte DNA, integriert gelegentlich wie in den Spuren 7, 8, 11, 12, 13 deutlich zu erkennen, in Form vieler hintereinander liegender Kopien an einer einzigen Stelle. Folgende Abbildung stellt einen Ausschnitt der charakterisierten Mäuse dar.

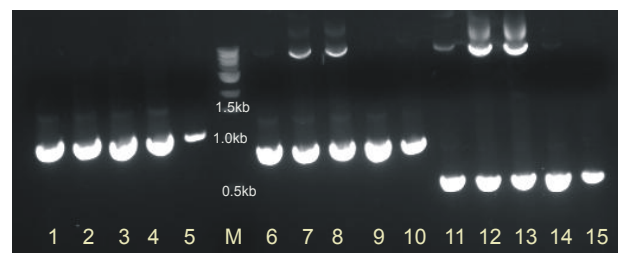


Abb. 29: Integration des gesamten Konstruktes (Ind. Cre) in der Maus

Die Charakterisierung der Mäuse erfolgte mittel PCR der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien der Maus. Für die Spuren 1-5 wurden die *Cre*-Primerpaare, die Spuren 6-10 in GFAP 3's gepaart mit rtTA2^SM2 Primer und die Spuren 11-15 EGFP-Primerpaare verwendet. Die Zuordnung der entsprechenden Mäuse ist dem Text zu entnehmen.

Da die mikroinjizierte Fremd-DNA sowohl in somatische Zellen als auch in Keimbahnzellen stabil eingebaut werden, vererben die transgenen Mäuse das Fremdgen gemäß der Mendelschen Regel an ihre Nachkommen. Die Mäuse der Abbildung 29 mit den Nummer, 35 (♂, Spur 1, 6 und 11), 111 (♂, Spur 4, 9 und 14) und 176 (♂, Spur 5, 10 und 15) wurden unmittelbar aus Vorkernexperimenten gewonnen, die Mäuse mit den Nummern 37 (♂, Spur 2, 7 und 12) und 38 (♀, Spur 3, 8 und 13) resultieren aus der Zucht transgener Tiere.

Die Kopienzahl der transgenen Tiere hinsichtlich des induzierbaren *Cre*-Konstruktes wurde mit den Primerpaaren aus genomischer DNA der Mausschwanzbiopsien bestimmt. Für die Kopienzahlbestimmung wurde für das heterolog rekombinierte Transkript mit dem Primerpaar GFAP 3's und rtTA2^SM2 in genomischer DNA amplifiziert. Als Bezugswert wurden die Primerpaare RT-GFAP Proms und RT-GFAP Promas (0.8) verwendet. Mit diesem Primerpaar kann nur die Wildtyp *gfap* Sequenz amplifiziert werden. Die aus der PCR resultierenden Größen der Transkripte beider Primerpaare liegt bei ca. 0.8kb. Die Kopienzahl der transgenen Tiere lag zwischen eins und zwei Kopien. Ein Vergleich der Ergebnisse der vollständigen Rekombination mit denen der Kopienzahlbestimmung legt die Vermutung nahe, dass die Mäuse mit den Nummern 37 und 38 und Nachkommen der transgenen Maus mit der Nummer 35 ihre zwei Kopien

hintereinander im Locus der genomischen DNA integriert haben könnten. Vermutlich waren Mäuse mit einer höheren Kopienzahl nicht überlebensfähig.









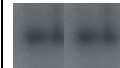

	IC35, ♂	IC37, ♂ NK IC35	IC38, ♂ NK IC35	IC111, ♂	IC176, ♀
GFAP Konstrukt	2 	2 	2 	2 	1 
GFAP wt					

Abb. 30: Kopienzahl der inzierbaren *Cre*-Maus

Quantitative Bestimmung der Kopienzahl IC: induzierbare *Cre*. NK: Nachkommen.

Die „kalte“ RT-PCR der Transkripte der *Cre*-Rekombinase aus dem Gehirn erfolgte 14 Tage nach oraler Applikation oder 10 Tage nach intraperitonealer Applikation von Doxyzyklin. Wohingegen die Expression der *Cre*-Rekombinase in C6 Rattenglioma Zellen induziert werden kann (Abb. 28), wurde kein Transkript von *cre* der transgenen Tiere nachgewiesen. Da der interne Standard *hgprt* unter den Bedingungen der RT-PCR amplifiziert wurde, kann eine Kontamination durch RNasen ausgeschlossen werden.







	mit Dox, oral Maus Nr. 67	mit Dox, i.p. Maus Nr. 37	ohne Dox, Maus Nr. 52
cre			
hgprt			

Abb. 31: Doxyzyklin induzierte *Cre*-Expression in der Maus

Die RT-PCR wurde mit *cre* und *hgprt* spezifischen Primern durchgeführt. Für den Nachweis der Induzierbarkeit wurden die Mäuse mit den Nummern 67, 37 und 52 verwendet. Es wurden Doppelkontrollen durchgeführt. Das Signal für *cre* liegt bei ca. 1.1kb und für *hgprt* bei ca. 300bp. Das erwartete Signal für *egfp* liegt bei ca. 0.5kb.

3.3.3 Tamoxifen-aktivierbare Cre-Rekombinase

Alternativ zur Doxzyklin aktivierten Cre-Rekombinase wurde ein weiteres Konstrukt kloniert, bei der die Cre-Rekombinase durch Applikation von Tamoxifen aktiviert wird. Hierbei steht der fusionierte Cre19 Östrogen Rezeptor ERT2 ebenfalls unter der Kontrolle des gfap-Promoters. Abbildung zeigt das GFAP-CRE ERT2 System, das durch heterologe Rekombination in das Mausgenom integriert werden soll. Das Cre19 mit ERT2 fusionierte Konstrukt TW18 mit einer 3' vom modifizierten Östrogenrezeptor gelegenen Polyadenylierungssequenz (polyA) lag bereits vor. Der Vektor TW18 wurde von Wunderlich (Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

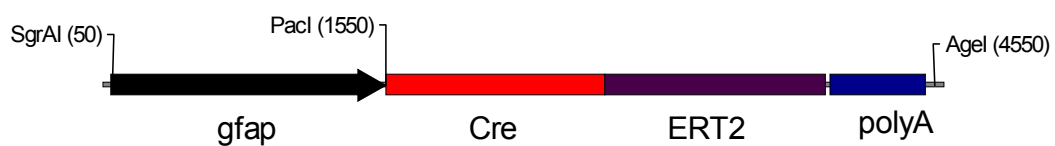


Abb. 32: Tamoxifen vermittelte Cre-Rekombinase Induzierbarkeit unter der Kontrolle des gfap-Promoters

Die Cre-Rekombinase (roter Balken) ist mit dem Östrogen Rezeptor (violetter Balken) fusioniert und dahinter mit einer Polyadenylierungssequenz (blauer Balken) versehen. Vor dem Fusionsprotein befindet sich eine 1.5kb große gfap-Promotersequenz.

Der gfap-Promoter wurde mit überhängenden Schnittstellen versehenen Primern ERT2-GFAP-s (SgrAI) und ERT2-GFAP-As (PacI), zur gerichteten Klonierung in den TW18 Vektor, amplifiziert. Hierfür wurde das PCR-Produkt zunächst in den PCRII Vektor ligiert. Der gfap-Promoter wurde mit den Restriktionsendonukleasen SgrAI und PacI im PCRII Vektor geschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des TW18 Vektors kloniert. Für die Vorkern-Injektion wurde der Vektor GFAP Cre ERT2 mit dem Restriktionsenzymen AgeI und SgrAI verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und gereinigt.

3.4 Glutamattransporter defiziente Mauslinien

Durch gezielte Zucht GLAST-1 und EAAC1 defizienter Mauslinien wurde die Doppelmutante GLAST-1/EAAC1 etabliert.

Der GLAST Defizienz wurde durch den Austausch des zweiten Exons durch eine Neomycin-Kassette erzielt (Schröder, 1998). Exon II kodiert das Startcodon, den intrazellulären N-terminalen Bereich und einen Teil der ersten transmembranalen Sequenz. Die Genotypisierung der GLAST-1 *knock-out* Mäuse erfolgte mittels *Southern blot*, wobei die DNA aus den Schwanzbiopsien der Maus mit dem Restriktionsenzym NcoI verdaut wurde. Im *Southern blot* mit einer extern 5' von Exon I liegenden

Hybridisierungssonde resultiert dabei für das Wildtyp Fragment eine Banden-Größe von 10.8kb und für den *knock-out* von 6.3kb.

Demgegenüber wurde die EAAC1 Defizienz durch Unterbrechung des ersten Exons durch Insertion einer Neomycin-Kassette hervorgerufen (Peghini *et al.*, 1997). Hierfür wurde die Neomycin-Kassette in die NarI-Schnittstelle kloniert. Für die Genotypisierung des Maus Mutantenstamms wurde auf interne Primerpaare EAACs (PP) und EAACas (PP) zurückgegriffen. Die Fragmentgrößen der PCR liegen dabei für das Wildtyp Fragment bei 250bp und das rekombinierte bei einem um die 0.9kb Neomycin-Kassette vergrößerten Fragment von 1.2kb.

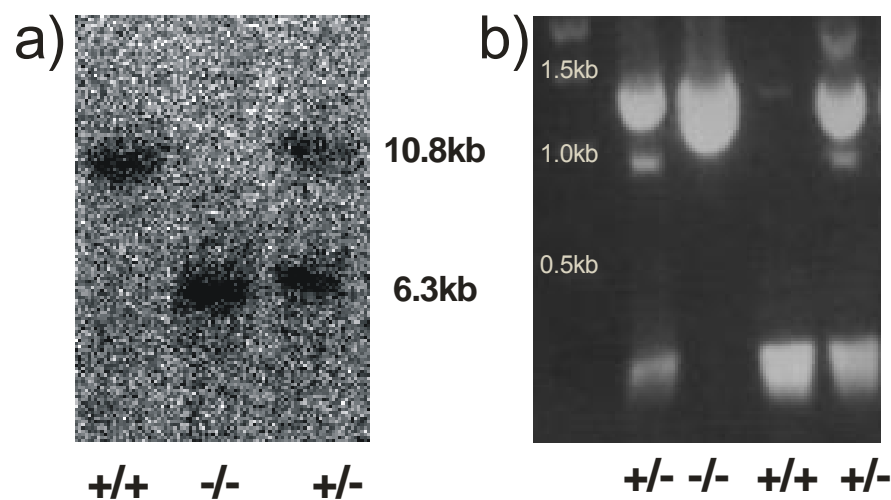


Abb. 33: Genotypisierung Glutamat-Transporter defizienter Mauslinien

a) *Southern blot*

Glast-1 *-/-* Mäuse mit einer wt-Bande von 10.8kb und für den *knock-out* von 6.3kb.

b) *PCR*

EAAC1 *-/-* Mäuse ergab ein wt-Fragment von 250bp und *knock-out* Fragment von etwa 1.2kb.

Einige weiblichen Doppelmutanten zeigen einen stärker ausgeprägten Phänotyp für Epilepsie bis zum Erreichen des stärksten Schweregrades der *grand mal* Anfälle und dem gefolgt Umfallen im Alter von einem Jahr. Sechs Monate nach ihrer Geburt zeigen beide, Männchen und Weibchen (*GLAST-1* *-/-*, DM) Verhaltensauffälligkeiten durch unablässiges „circling“ (Rennen im Kreis), wobei der Phänotyp weiblicher Tiere stärker ausgeprägt ist.

3.5 Lokalisation cerebraler Glutamattransporter

Die immunohistochemischen Nachweise mit den Antikörpern gegen GLT-1, GLAST-1, EAAC1 und GFAP erfolgte an 10 µm dicken sagittalen Hirnschnitten der Maus. Wildtyp, GLAST-1 und EAAC1 defizienten Doppelmutanten wurden zuvor mit Paraformaldehyd

perfundiert und in Paraffin eingebettet. Im folgendem Abschnitt erfolgt eine immunologische Analyse über die regionale und zelluläre Verteilung der gegen die Glutamattransporter spezifischen Antikörper im Kleinhirn und Hippocampus. Für die Transporter wurde ein mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Cyanin (Cy3) gekoppelter *anti-rabbit* und für den glialen Marker GFAP ein mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelter *anti-mouse* Antikörper eingesetzt. Für die Markierung des Zellkerns wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Diese Verbindung lagert sich bevorzugt an die AT-reiche Regionen der kleinen Furche der DNA an und fluoresziert bei Anregung im UV-Licht im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe.

Die mit DAPI angefärbten Zellkerne der Hirnschnitte sind in den einzelnen Regionen des Kleinhirns gut zu unterscheiden. Deutlich grenzt sich dabei das *Stratum granulosum* der blau fluoreszierenden, dicht beieinander liegenden Körner-Zellen von der äußeren Rindenschicht des *Stratum moleculare*, der purkinjellreichen Schicht des *Stratum Purkinjese* und der im inneren liegenden weißen Substanz, der Marklamelle ab.

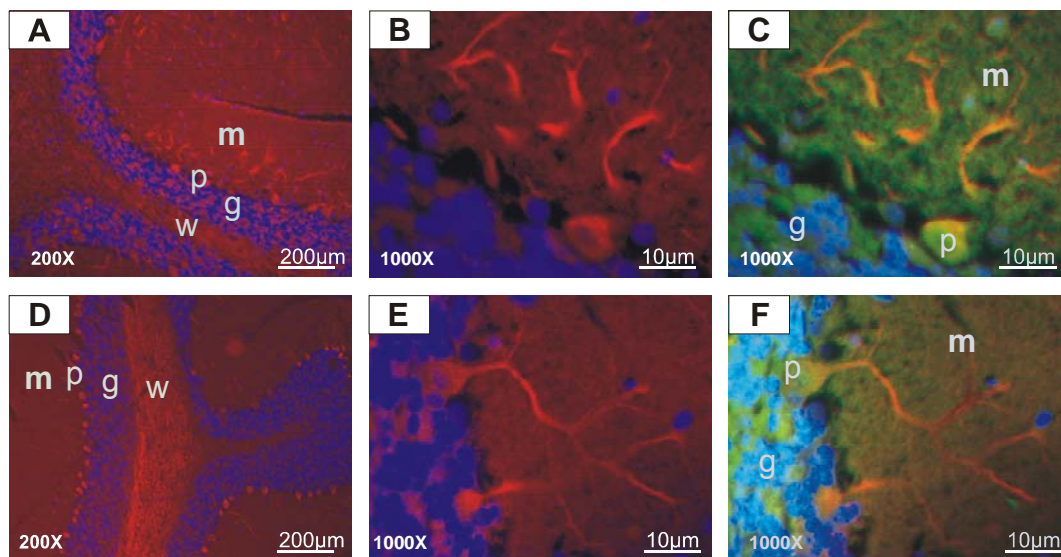


Abb. 34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Kleinhirns

A, B, C mit Cy3 gekoppelter GLT-1 Antikörper und D, E und F mit Cy3 gekoppelter EAAC1 Antikörper. Als zweiter Antikörper diente ein mit FITC gekoppelter Anti-Maus GFAP Antikörper (C, F). Durch dreifache Überlagerung wird die Kolokalisation der Antigene durch die spezifischen Antikörper gegen die Glutamat Transporter und GFAP zum Ausdruck gebracht. *Str. moleculare* (m), *Str. Purkinjese* (p), *Str. granulosum* (g) und weiße Substanz (w).

Regional zeigt der Glutamattransporter GLT-1 im Kleinhirn eine starke Verteilung über die Molekularschicht und in den kleinhirntypischen Purkinjellen und nur eine schwache Verteilung im Granulosum. Das Mark ergab keine Immunreaktion. Auf zellulären Ebene sind die nur im Kleinhirn vorkommenden Purkinje-Zellen deutlich und die Ausläufer der

Bergmann-Gliazellen im *Stratum purkinjense* zu erkennen. Der Zelleib der Bergmann-Gliazelle befindet sich in Abbildung 34C unter dem Zelleib der Purkinjezelle. In der Doppelfärbung mit den Antikörpern GLT-1 und GFAP zeigt sich, dass GLT-1 ein mit überwiegend glialen Zellen assoziierter Glutamatttransporter ist.

Die verhältnismäßig großen Somata der Purkinje Zellen waren sehr stark EAAC1 positiv. Einige ihrer in die Molekularschicht reichenden Dendriten waren ebenfalls angefärbt. Die weiße Substanz ist positiv gegenüber dem EAAC1 Antikörper. Demgegenüber zeigen die Molekularschicht und das Granulosum keine Immunreaktion.

Der gegen den Glutamatttransporter GLAST-1 zur Verfügung stehende Antikörper zeigte eine unspezifische Färbung, ohne erkennbare zelluläre Strukturen über die gesamte Molekularschicht des Kleinhirns. Die Abbildungen wurden nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Die bereits veröffentlichten Ergebnissen haben gezeigt, dass der Glutamatttransporter GLAST-1 hauptsächlich in Astrozyten des ZNS, im Kleinhirn und in geringer Konzentration im Hippocampus und Cortex lokalisiert ist (Storck et al., 1992; Rothstein et al., 1994).

Nicht nur der Glutamatttransporter GLT-1 sondern auch EAAC1 ist in den Purkinjezellen lokalisiert. Die Immunofärbung des EAAC1 ist hierbei nicht nur auf das Soma der Zellen beschränkt, sondern erstreckt sich zum Teil auch in die Dendriten. Die weiße Substanz der Markklammellen sind ebenfalls EAAC1 positiv.

Der Hippocampus, die evolutionär älteste Struktur des Gehirns, ist strukturell in den *Gyrus dentatus*, *Cornu Ammonis* (Ammonshorn) und *Subiculum* unterteilt. Sowohl im *Gyrus dentatus* als auch im Ammonshorn befinden sich eine zellreiche mittlere Schicht und zwei zellärmere Schichten, eine molekulare oberhalb und eine polymorphe Schicht unterhalb der Zellschicht. Die Färbung des Zellkerns zeigt die im Dreieck angeordneten, dicht beieinander liegenden Zellkörper der Hauptzellen des *Gyrus dentatus*, den Körnerzellen im *Stratum molekulare* (Molekularschicht) und die im Halbkreis angeordneten, etwas weniger dichten Zellkörper der Hauptzellen des Ammonshorns, den Pyramidenzellen im *Stratum pyramidale* (Pyramidalschicht).

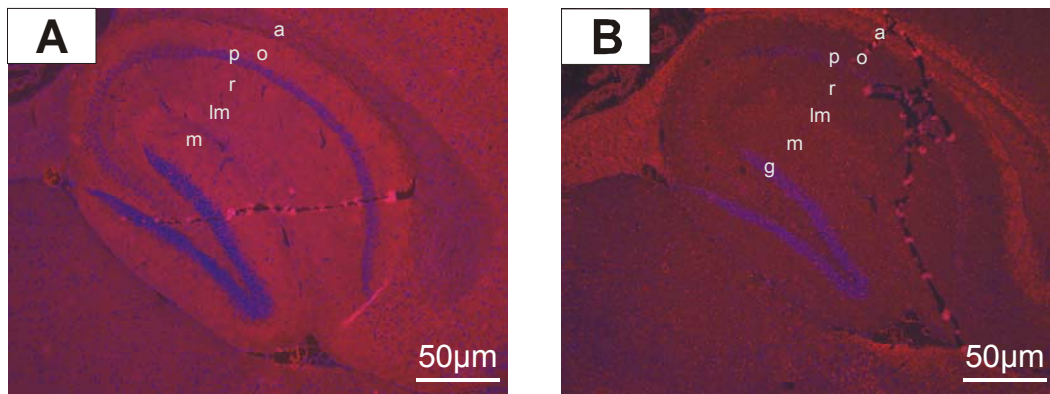


Abb. 35: Nachweis der Glutamat Transporter im Hippocampus der Maus mittels Immunofluoreszenz
 Die hierbei verwendeten Antikörper sind jeweils Cy3 gekoppelt: A) GLT-1 Antikörper, B) GLAST-1 Antikörper und C) EAAC1 Antikörper. *Str. granulosum* (g), *Str. moleculare* (m), *Str. lacunosum-moleculare* (lm), *Str. radiatum* (r), *Str. pyramidale* (p), *Str. oriens* (o) und *Alveus* (a).

Der Glutamat Transporter GLT-1 weist eine Immunreaktion im *Stratum radiale* innerhalb der CA3 Region des Ammonshorns auf. EAAC1 wurde im Alveus und dem Subiculum detektiert.

Im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen wird GLT-1 stärker in der Granularschicht der GLAST-1 EAAC1 defizienten Doppelmutanten exprimiert. Zusätzlich wird GLT-1 in der Marklamelle exprimiert. Im Hippocampus der Doppelmutante konnte kein Unterschied in der GLT-1 Expression in den Fluoreszenzaufnahmen festgestellt werden. GLT-1 wurde auch hierbei ausschließlich innerhalb der CA3 Region des Ammonshorns im *Stratum radiale* exprimiert.

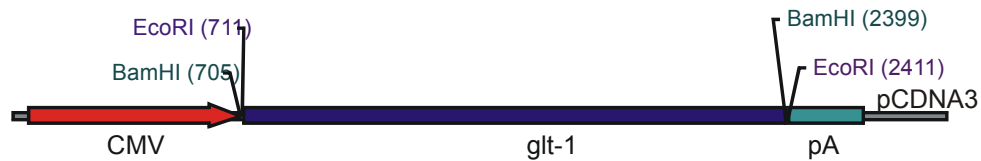
3.6 Zelltransfektion

3.6.1 Erstellung der Konstrukte

Ausgehend von der Hirn cDNA Bank neun Wochen alter Mäuse wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) die spezifische cDNA von *glt-1* mit den Primern 5'GLT1 rek NheI und 3'GLT1 rek BamHI amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor ligiert. Für die Erstellung des CMV-GLT-1 Konstruktes wurde die *glt-1*-cDNA aus dem pCR2.1 Vektor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI herausgeschnitten und in die entsprechende Schnittstelle des pcDNA3 Vektors kloniert. Aufgrund der ungerichteten Ligation des Fragmentes in das Plasmid wurde die Orientierung mittels eines Restriktionsverdau mit dem Enzym BamHI bestimmt. Die im pCR2.1 Vektor *antisense* orientierte *glt-1*-cDNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI aus dem pCR2.1 Plasmid geschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pEGFP-C1 Vektors kloniert. Die Sequenzierung des Konstrukts CMV-EGFP-GLT-1 wies

keine Leserasterverschiebung im Übergang von egfp zu glt-1 sowie in der glt-1 Sequenz auf.

a)



b)



Abb. 36: Konstrukterstellung CMV-GLT-1 und CMV-EGFP-GLT-1

a) CMV-GLT-1 Konstrukt im pcDNA3 Vektor

b) Fusionskonstrukt CMV-EGFP-GLT-1















Die in Abbildung 36 dargestellten Konstrukte wurde für die Transfektion von C6- und HEK293 Zellen verwendet. Die Expression der beiden GLT-1 Konstrukte stand unter der Transkriptionskontrolle des ubiquitär Cytomegalovirus Promoters (CMV-Promoter). Beide Vektoren tragen als Selektionsmarker das Neomycin-Resistenzgen. Das Substrat des Enzyms, ein Substratanalogon von Neomycin (G418), wurde dem Kulturmedium zur Zellselektion zugefügt. GLT-1 bzw. EGFP-GLT-1 transfizierte C6 Zellen wurden für Expressionsstudien (Kapitel 3.7.2.1) und transfizierte HEK293 Zellen für die funktionelle Charakterisierung des Glutamattransporters (Kapitel 3.8) eingesetzt.

3.6.2 Nachweis der Expression transfizierter Zellen

3.6.2.1 C6-Zellen

C6 Zellen wurden mit den linearisierten Vektoren (CMV-GLT-1 bzw. CMV-EGFP-GLT-1) mittels Lipofektamin transfiziert. Die RNA der einzeln isolierten Klone wurden in der quantitativen RT-PCR auf die Transkription der gewünschten Proteine analysiert. Verwendet wurden dazu Primer in Exon II *sense* und Exon V *antisense* Orientierung.

A) C6 glt-1

	wt	Klon 1	Klon 2	Klon 6	Klon 7	Klon 8	Klon 10
glt		1.3 	3.6 	1.8 	1.8 	1.5 	1.2 
hgprt							

B) C6 egfp-glt-1

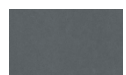
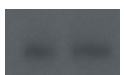




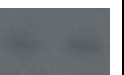





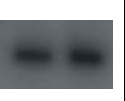

	Wt	Klon E4	Klon E5	Klon E6	Klon E7	Klon E8	Klon E9
glt		0.9 	1.2 	1.4 	0.2 	1.0 	0.3 
hgprt							

Abb. 37: Quantitative RT-PCR von GLT-1 C6 Klonen

Die RT-PCR wurde mit glt-1 und hgprt spezifischen Primern durchgeführt. Der Wildtyp von C6-Zellen zeigt keine Transkription von glt-1. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Das Signal für glt-1 liegt bei ca. 400bp und für hgprt bei ca 300bp.

A) glt-1 transfizierten Klone (Klon 1, 2, 6, 7, 8, 10) zeigen unterschiedliche Transkriptionsraten.

B) egfp-glt-1 transfizierten Klone (E4-E9) zeigen unterschiedliche Transkriptionsraten.







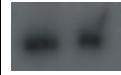







Die Transkription von glt-1 und egfp-glt-1 wurde auf die Transkripte von HGPRT bezogen und miteinander verglichen. Die Expression des transfizierten Gens glt-1 bzw. egfp-glt-1 wurde im Verhältnis zum internen Zellstandard HGPRT gesetzt.

Klon 2 der glt-1 transfizierten Gliazellen zeigt eine 3.6x erhöhte glt-1 Expression, Klon E5 und E6 der egfp-glt-1 transfizierten C6-Zellen zeigen eine etwa 1.2x bzw. 1.4x erhöhte Transkriptionsrate.

3.6.2.2 HEK293-Zellen

Die Transfektion der HEK293 mit den linearisierten Vektoren CMV-GLT-1 bzw. CMV-EGFP-GLT-1 wurde analog wie in Kapitel 3.6.2.1 dargestellten C6-Zellen ausgewertet.

A) HEK293 glt-1

	Wt	Klon 3	Klon 4	Klon 5	Klon 7	Klon 9	Klon 11
glt		1.2	0.6	0.4	1.5	1.0	1.1
							
hgprt							
							

B) HEK293 egfp-glt-1














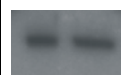
	Wt	Klon E1	Klon E2	Klon E3	Klon E4	Klon E5	Klon E9
glt		3.7	0.5	4.2	3.9	4.1	3.7
							
hgprt							
							

Abb. 38: Quantitative RT-PCR von HEK293 Klonen

Die RT-PCR wurde mit *glt-1* und *hgprt* spezifischen Primern durchgeführt. Wildtyp HEK293-Zellen zeigen keine Transkription von *glt-1*. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Das Signal für *glt-1* liegt bei ca. 400bp und für *hgprt* bei ca. 300bp.

A) Die *glt-1* transfizierten Klone (Klon 3, 4, 5, 7, 9, 11) zeigen unterschiedliche Transkriptionsraten.

B) Die *egfp-glt-1* transfizierten Klone (E1-E5, E9) zeigen unterschiedliche Transkriptionsraten.

Die analysierten Klone transkribierten *glt-1* und *egfp-glt-1* unterschiedlich stark. Die sehr stark exprimierenden Zellklone GLT-1 Klon 7 und EGFP-GLT-1 Klone E9 und E4 weisen licht-mikroskopisch sichtbare morphologische Veränderungen auf. Deshalb wurden GLT-1 Klon 1 (Abb. 38) und EGFP-GLT-1 Klon E3 für weitere Analysen verwendet.

Zusätzlich wurden die EGFP-GLT-1 Zellklone auf den Einbau des Fusionskonstrukts in das Genom der HEK293 Zellen untersucht, da die quantitative RT-PCR nur die Transkriptionsprodukte des *glt-1* erfassen. Hierzu wurde eine PCR mit Primerpaaren durchgeführt, die in *sense* Orientierung am Anfang der *egfp*-Sequenz (EGFP 5' *sense*) und in *antisense* Orientierung am Ende der *egfp*-Sequenz (EGFP 3' *antisense*) bzw.

innerhalb der *glt-1* Sequenz (GLT V as) lagen. Alle untersuchten Klone wiesen den Einbau des Fusionskonstrukts auf (Abb. 39).

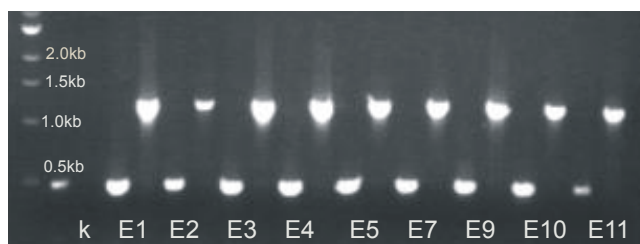


Abb. 39: PCR-Nachweis von *egfp-glt-1*

Nachweis der heterologen Rekombination von *egfp-glt-1* Sequenz in das Genom von HEK293 Zellklonen (E1-E5, E7 und E9-E11) durch PCR. Als Kontrolle wurde ein *egfp* transfizierter HEK293 Zellklon verwendet. Das 0.5kb große Fragment wurde mit EGFP spezifischen Primerpaaren und das 1.3kb große Fragment mit EGFP 3' antisense und GLT V as Primern erhalten. In allen transfizierten HEK293 Zellklonen sind Signale erkennbar.

Auf den Nachweis des Einbaus der Konstrukte in das Genom der HEK293 Zellen und der Transkription erfolgte der Nachweis der Translationsprodukte. Hierzu wurden die Membrantransporterproteine extrahiert und nach gelelektrophoretischer Trennung durch *Western blot* Analyse immunologisch analysiert. Der Nachweis erfolgte mit GLT-1 Antikörpern, die mit einem sekundären an Peroxidase gekoppelten Antikörpern detektiert wurden. Die Translationsrate in den stabil exprimierenden Zellklonen entsprach den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR Analysen. Als Positivkontrolle diente ein Hirnproteinextrakt neun Wochen alter Wildtyp-Mäuse (CD1-Mäuse).

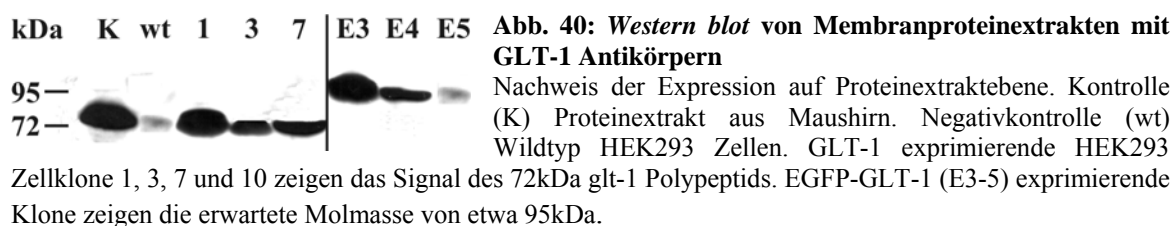


Abb. 40: *Western blot* von Membranproteinextrakten mit GLT-1 Antikörpern

Nachweis der Expression auf Proteinextraktebene. Kontrolle (K) Proteinextrakt aus Maushirn. Negativkontrolle (wt) Wildtyp HEK293 Zellen. GLT-1 exprimierende HEK293 Zellklone 1, 3, 7 und 10 zeigen das Signal des 72kDa *glt-1* Polypeptids. EGFP-GLT-1 (E3-5) exprimierende Klone zeigen die erwartete Molmasse von etwa 95kDa.

GLT-1 HEK293 Zellklone zeigten in der *Western blot* Analyse das Signal für GLT-1 mit der Molmasse von 72kDa in der Wildtyp Kontrolle. Bei den das Fusionsprotein exprimierenden Zellen lag das Signal entsprechend der Molmasse des EGFP-Protein Fragments um etwa 30kDa höher (Abb. 40).

Neben der biochemischen Analyse wurden die EGFP-GLT-1 transfizierten Zellen auf die Lokalisation des Proteins fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Deutlich zu erkennen ist,

dass EGFP-GLT-1 unter dem Fluoreszenzmikroskop membranständig erscheint (Abb. 41B). Diese Lokalisation weist darauf hin, dass eine Veränderung des N-Terminus des GLT-1 durch Fusion mit EGFP keine Auswirkung auf die Lokalisation ausübt. Somit erwies sich dieser Zellklon als geeignet für eine funktionelle Analyse.

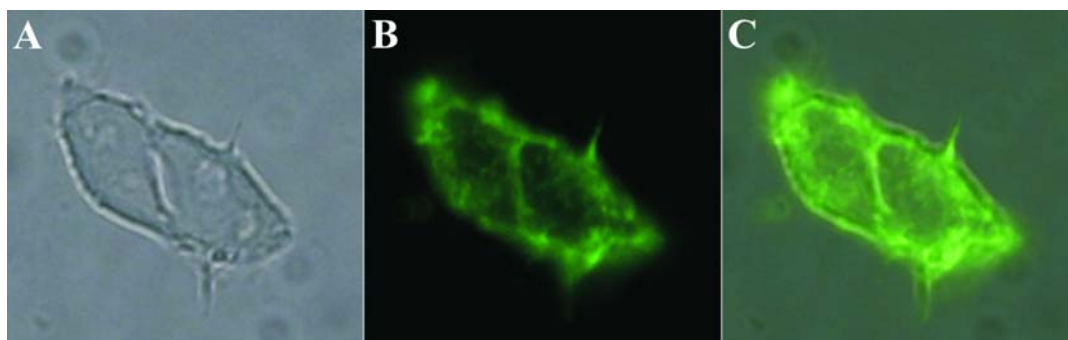


Abb. 41: Fluoreszenzmikroskopie von transfizierten HEK293 Zellklonen

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

3.7 Expressionsstudien

Innerhalb der Gruppe der Glutamaterezeptoren unterscheidet man die ionotropen und metabotropen Rezeptoren. Homologe und heterologe Oligomerisierung der Untereinheiten, differentielles Spleißen und mRNA-*editing* resultiert in einer Vielzahl funktionell unterschiedlicher Rezeptoren. Für die Analyse der transkriptionellen Regulation der Glutamaterezeptoren wurden degenerierte Primer innerhalb der konservierten Regionen der einzelnen Glutamaterezeptor Familie ausgewählt. Bei der Auswahl degenerierter Primerpaare wurde versucht, die Abweichungen am 3' Ende möglichst gering zu halten.

Die metabotropen Glutamaterezeptoren mGluR1-8 zeigen eine relativ große Varianz und werden aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften und intrazellulären Signalwegen in drei Gruppen eingeteilt. Aufgrund der relativ starken Abweichungen innerhalb der Sequenzen konnte kein degenerierter Primer für die metabotropen Rezeptoren erstellt werden. Die selektiv für den Rezeptor mGluR8 ausgewählten Primerpaaren ergeben in der quantitativer RT-PCR ein Fragment der Größe von 270bp.

Mit dem für die quantitativer RT-PCR des AMPA-Rezeptors ausgewählten Primerpaar resultiert ein 340bp großes Fragment. In folgender Abbildung ist der konservative Bereich der AMPA1-4 dargestellt. Die Abweichungen der konservierten Bereiche innerhalb der ausgewählten Primersequenz des AMPA4 sind mit roter Farbe hervorgehoben (Abb. 42A).

Stärkere Abweichungen innerhalb der Sequenz zeigt der NMDA Rezeptor, der in die Unterklassen 1-3 unterteilt wird. Da die Unterklasse 2 die meisten Vertreter aufweist, wurde der degenerierte Primer innerhalb dieser Subklasse ausgewählt. Die Abweichungen der Sequenzen innerhalb dieser Klasse sind relativ gering. Vermutlich können die Fragmente der Unterklassen 1 und 3 mit dem ausgewählten Primer für den NMDA2A (365bp) in der quantitativen RT-PCR nicht amplifiziert werden (Abb. 42B).

Für die ausgesprochen stark konservierte Domäne des Kainat-Rezeptors (1-5) resultiert in der quantitativen RT-PCR mit den ausgewählten degenerierten Primern ein 275bp großes Fragment (Abb. 42C).

(A) AMPA-Rezeptor

```

1 ATA CAT GAA GTC TGC AGA ACC GTC TGT G.....CTG AGC AAT GTG GCA GGC GTG TTC TAC ATC
2 TTA TAT GAG GAG TGC AGA GCC CTC TGT G.....CTG AGC AAC GTT GCT GGA GTA TTC TAC ATC
3 TTA CAT GAA ATC CGC AGA GCC ATC TGT G.....CTG AGC AAT GTG GCA GGC GTG TTC TAT ATA
4 CTA CAT GCG ATC GGC AGA GCC ATC TGT G.....CTG AGC AAC GTA GCA GGC GTC TTC TAC ATT

```

(B) NMDA-Rezeptor

```

1 CCA TGA TCA TCG TGG CTT CCT ACA CTG CCA A.....GGC TTT GGC ATC GGC ATG CGC AAG GAC AGC C
2A CCG TCA TCT TCC TTG CAA GTT ACA CAG CCA A.....GGC TAT GGA ATT GCT CTG CAG AAG GGC TCA C
2B CTG TCA TTT TCC TGG CCA GCT ACA CTG CCA A.....GGC TAT GGC ATT GCT ATC CAA AAA GAC TCT G
2C CTG TCA TCT TCC TCG CTA GCT ACA CGG CCA A.....GGC TAT GGC ATT GCT ATG CAG AAA GAC TCC C
2D CCG GCA TCT TTC TTG CCA GCT ATA CAG CCA A.....GGT TAT GGC ATC GCC CTA CAC AAG GGC TCC C
3A GTA TGT TTT GCC TTT CTA CAT ACA CAG CGA A.....GGC TAT GGC ATT GGT CTC CCT CCC AAC TCT C
3B GCC TGC TGG TGC TAT CCA GTT ACA CAG CCA A.....GGC TAC GGC ATA GGG CTG CCC CAA AAT TCG C

```

(C) Kainat-Rezeptor

```

1 CTT CTT GAC AGT AGA AAG GAT GGA.....ACT GCA ACC TCA CTC AGA TCG GGG GC
2 CTT TCT GAC CGT GGA ACG CAT GGA.....ACT GTA AAC TCA CGC AGA TTG GTG GC
3 CTT CCT GAC TGT GGA GCG TAT GGA.....ACT GCA ACC TCA CCC ACA TCG GTG GC
4 CTT CCT GAC TGT GCA GCG CAT GGA.....ACT GCA ACC TCA CTC AGA TTG GGG GC
5 CTT CCT CAC GGT GCA GCG CAT GGA.....ATT GCA ACC TCA CCC AGA TCG GGG GC

```

Abb. 42: Konservierte Domänen der Rezeptoren

Rot hervorgehoben sind die von der Primersequenz abweichenden Basen. Darstellung in 5'-3'-Orientierung der cDNA.

3.7.1 Gehirnextrakt

Neben der Genotypisierung wurden die *knock-out* Mäuse mit quantitativer RT-PCR auf die Defizienz der Transkripte der die Glutamattransporter kodierenden Proteine hin untersucht. Hierfür wurde die RNA aus dem Gehirn vier Wochen alter Mäuse isoliert. Die quantitative PCR erfolgte mit spezifischen Primern für *glt-1*, *glast-1* und *eaac1*. Die Primer *glt1 ExonIII*s und *glt1 ExonV*as ergaben in der PCR ein Signal von ca. 400bp. Die Primerpaare der Glutamattransporter defizienten Tiere für die codierenden Proteine GLAST-1 und EAAC1 liegen für GLAST auf Exon II unmittelbar am Translationsstart (GLASTs RT), und auf Exon VI (GLASTas RT); für EAAC1 auf Exon I unmittelbar hinter der *NarI* Schnittstelle (EAACs RT) und auf Exon IV (EAACas RT). Da die GLAST Defizienz durch den Austausch des zweiten Exons durch eine Neomycin-Kassette erzielt wurde, kann der in der sense Orientierung verwendete Primer in der cDNA nicht greifen. Die EAAC1 Defizienz wurde durch die Insertion einer Neomycin-Kassette im ersten Exon hervorgerufen. Die Termination durch die Polyadenylierungssequenzen der *neo*-Box ist unvollständig und führt deshalb mit den für die RT-PCR ausgewählten Primern zu einem detektierbaren „*non-sense*“ Transkript für das Protein EAAC1. Das Startkodon befindet sich im konventionellen Konstrukt 5' von der *neo*-Box, die Primerpaare der RT-PCR des EAAC1 Transkriptes 3' von der Neomycin-Kassette in ExonIV. Für das GLAST-1 Protein codierende PCR-Fragment resultiert ein ca. 600bp und für das EAAC1 ein Fragment von ca. 390bp. Die Transkripte der nicht ausgeschalteten Glutamattransporter kompensieren die defizienten Transporter durch eine verstärkte Expression.

Die quantitativen RT-PCR erfolgte mit Primern für die Glutamattransporter und die Glutamatrezeptoren. Die Auswahl der Primer für die Rezeptoren wurde in Kapitel 3.7 dargestellt. Zur Normalisierung und Vergleich der Transkriptionsrate wurde das ubiquitäre Transkript der Hypoxanthin-Guanidinphosphoribosyltransferase (HGPRT) auf RNA Ebene mit den entsprechenden Primern (*m-HGPRT*s und *m-HGPRT*as) als interner Standard amplifiziert. Die *steady state* mRNA Konzentration der Transporter und Rezeptoren wurden auf die von *hgprt* bezogen. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mittels *Image Quant*. Die Expressionsrate ergab sich aus dem Quotienten der cRNA Signale der Transporter bzw. Rezeptoren zum *hgprt* Wert. Die Expressionsrate der Transkriptionsprodukte der Wildtyp mRNA wird eins gesetzt. Die relative Transkriptionsrate der Mutanten wird aus Verhältnis der Expressionsrate der Transkriptionsprodukte der Mutanten zum Wildtyp gewonnen.

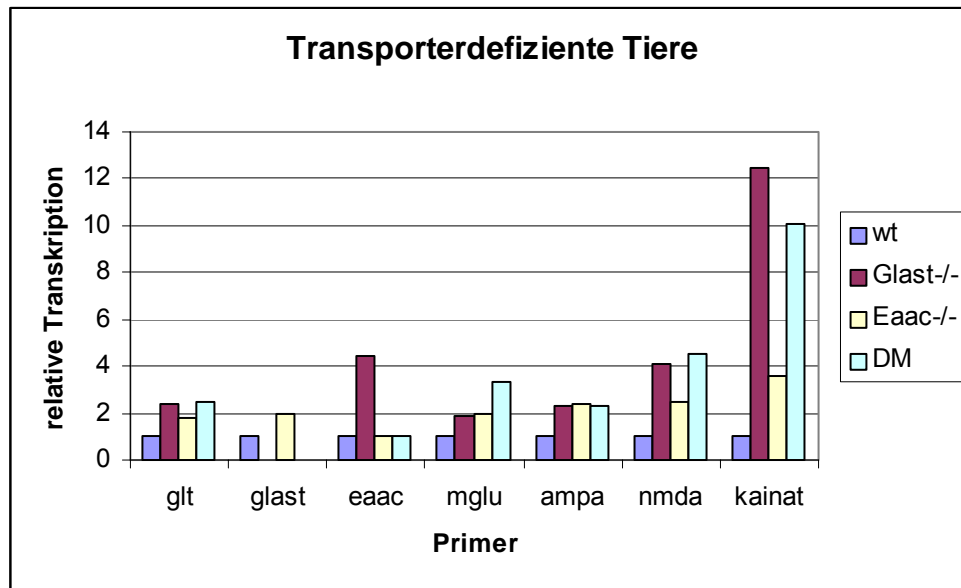


Abb. 43: Graphische Darstellung der Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR der Hirn RNA von Glutamattransporter defizienter Mauslinien

Die RNA wurde aus dem Gehirn 6 Wochen alter Glutamattransporter *knock-out* Mäusen isoliert und mit dem für die Glutamattransporter *glt-1*, *glast-1*, *eaac1* und für die Glutamatrezeptoren degenerierten Primern amplifiziert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als interner Standard wurde *hprt* verwendet.

Die Transkriptionsrate von *glt-1* ist für die Glutamattransporter GLAST-1 und EAAC-1 defizienten Mauslinien um das Doppelte hochreguliert. Die Expression des Transkriptes für den Transporter GLAST-1 ist in der EAAC1 *-/-* Maus ebenfalls verdoppelt. In der GLAST defizienten Mauslinie ist die Transkription des EAAC1 Transporters vervierfacht. Die auffälligsten Unterschiede in der Transkriptionsrate sind für die ionotropen Glutamattransporter NMDA und Kainat der GLAST-1 defizienten Mauslinie und der Doppelmutanten zu verzeichnen. Die Expressionsrate des NMDA Rezeptors ist 4x und des Kainatrezeptors 12x bzw. 10x erhöht.

3.7.2 Einfluss von Glutamat auf die Expression

L-Glutamat, der am stärksten verbreitete exzitatorische Neurotransmitter besitzt in hoher Konzentration das Potential eines Neurotoxins. In Expressionsstudien wurden Kurzzeit- und Langzeit-Regulation der Glutamatrezeptoren und ihrer Transporter in GLT-1 und EGFP-GLT-1 stabil exprimierenden C6-Zellen und primäre Gliazellen aus Wildtyp und Glutamattransporter defizienten Mäusen in Gegenwart exzitotoxischer Glutamatkonzentration untersucht. Hierfür wurden zunächst Konstrukte für die Transfektion von glialen C6-Zellen erstellt und anschließend die Transkriptionsrate transfizierter Klone bestimmt. Parallel wurden primäre Gliazellen aus Wildtyp Mäusen

und Glutamattransporter defizienten Doppelmutanten isoliert. Im Gegensatz zur Ruhezustandskonzentration von etwa 1 μM im synaptischen Spalt wurden die isolierten Zellen zur transkriptionellen Kurzzeitregulation von 20 Minuten und der Langzeitregulation von 24 Stunden einer 100 μM Glutamatkonzentration ausgesetzt. Bei entsprechenden Stimuli kann *in vivo* die Glutamatkonzentration sogar bis auf 1 mM im synaptischen Spalt ansteigen um eine postsynaptische Antwort hervorzurufen.

Im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss exzitatorischer Glutamatkonzentrationen auf die Aktivatoren bzw. Repressoren wurde die Transkription im Hinblick auf die Transkriptionsrate der Glutamattransporter und Glutamatrezeptoren untersucht.

3.7.2.1 Immortalisierte Gliazellen

In Expressionsstudien an immortalisierten Gliazellen wurde der Einfluss exzitatorischer Glutamatkonzentrationen auf die Regulation der Expression der Glutamattransporter und der Glutamatrezeptoren untersucht. Die quantitative RT-PCR wurde mit den entsprechenden Primern auf das gewünschte Protein durchgeführt. Die Expressionsrate der Zellen, die verschiedenen dem Medium zugefügten Glutamatkonzentrationen ausgesetzt wurden, wurde auf die endogene Konzentration unbehandelter Zellen bezogen.

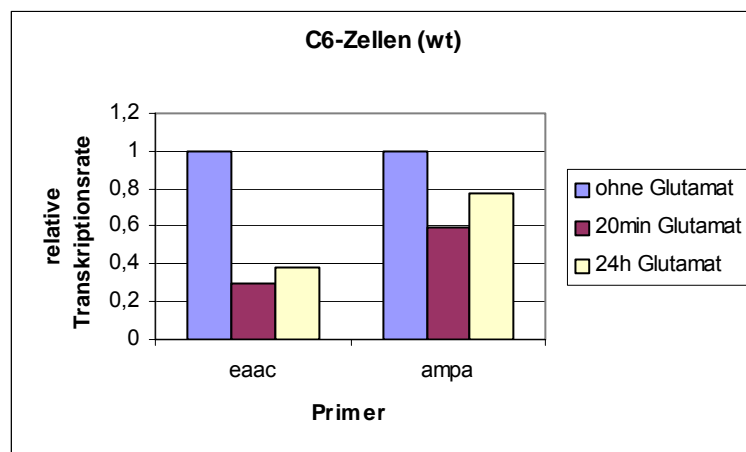


Abb. 44: Quantitative RT-PCR der Glutamat vermittelten Regulation der Expression in C6 wt Zellen Mit den Primern für die Glutamattransporter und Rezeptoren konnten nur die Transkripte für eaac und ampa amplifiziert werden.

In C6 wt Zellen wird die Expression sowohl des Transporters EAAC1 als auch des Rezeptors AMPA herunterreguliert, wobei die Auswirkungen auf die Kurzzeit-Regulation (20 min Glutamat) stärker sind als bei der Langzeit-Regulation (24 h Glutamat). In den mit dem egfp-glt Vektor transfizierten C6-Zellen wird der Glutamattransporter GLT-1 in Gegenwart erhöhter Glutamatkonzentration ebenfalls herunterreguliert, wobei erstaunlicherweise der Glutamattransporter EAAC1 im Gegensatz zu den wt Zellen hochreguliert wurde. Die Transkriptionsrate des AMPA Rezeptors blieb unter den unterschiedlichen Bedingungen nahezu unverändert.

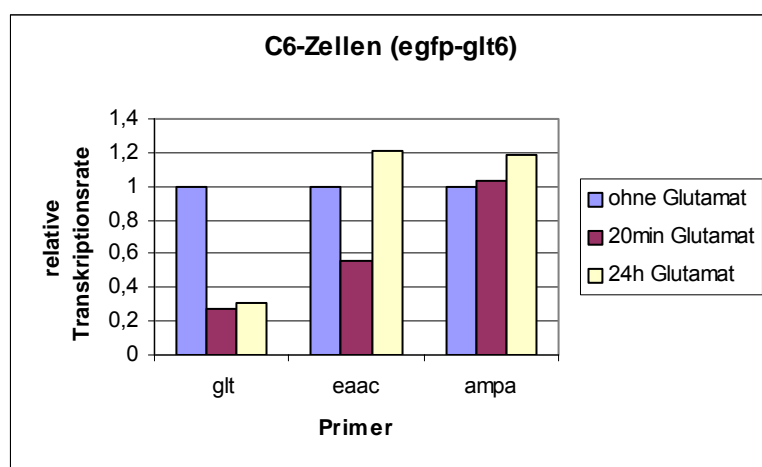


Abb. 45: Quantitative RT-PCR der Glutamat vermittelten Regulation der Expression in C6 egfp-glt transfizierten Zellen

Mit den Primern für die Glutamattransporter und Rezeptoren konnten nur die Transkripte für glt, eaac und ampa amplifiziert werden.

3.7.2.2 Glialen Primärkulturen

In Expressionsstudien an glialen Primärkulturen wurde analog zu den Studien an immortalisierten Gliazellen der Einfluss exzitatorischer Glutamatkonzentration auf die Regulation der Expression der Glutamattransporter und der Glutamatrezeptoren durchgeführt. In den glialen Primärkulturen war der metabotrope Rezeptor nicht detektierbar, obwohl im Gesamthirnextrakt vier Wochen alter Tiere das gewünschte Produkt in der quantitativen RT-PCR erhalten wurde. Aufgrund der Varianz metabotroper Rezeptoren und daraus resultierenden Abweichung innerhalb der Sequenzen konnte kein degenerierter Primer erstellt werden. Da ausschließlich das für den Glutamatrezeptor mGluR8 spezifische Primerpaar verwendet wurde, kann keine Aussage über die Expression des metabotropen Rezeptors in glialen Primärkulturen gemacht werden.

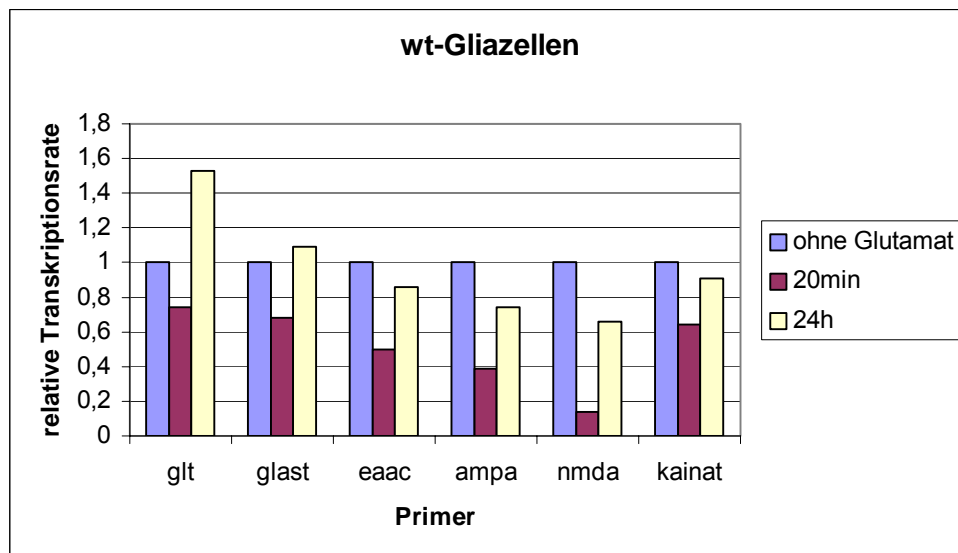


Abb. 46: Quantitative RT-PCR der Glutamat induzierten Regulation der Expression glialer Primärkulturen

Mit den Primern für die Glutamattransporter und Rezeptoren wurden nur die Transkripte der Glutamattransporter und der ionotropen Rezeptoren amplifiziert.

Die Kurzzeit- und Langzeit-Regulation der Expression der Transporter und Rezeptoren in glialen Primärkulturen unterliegen unter dem Einfluss erhöhter exogener Glutamatkonzentrationen großen Schwankungen. In Wildtyp Zellen werden die Glutamattransporter, die 20 min einer 100 μ M Glutamatkonzentration ausgesetzt sind, herunterreguliert. In den Langzeit-Studien wird die Transkription des Glutamattransporters GLT-1 aktiviert, GLAST-1 ist nahezu unverändert und die Transkription von EAAC1 ist inhibiert. In den Kurzzeit-Studien ist die Expression ionotroper Rezeptoren stark inhibiert, weniger stark in den Langzeit-Experimenten.

Als Folge der Defizienz wird die Expression des Glutamattransporters GLT-1 aus kompensatorischen Gründen aktiviert. Die ionotropen Rezeptoren AMPA und NMDA der Doppelmutanten zeigen ein ähnliches Expressionsmuster wie die Wildtyp Mäuse. Die Expression des Kainat Rezeptors ist unter den unterschiedlichen Bedingungen nahezu verdoppelt im Vergleich zu den Wildtyp Tieren.

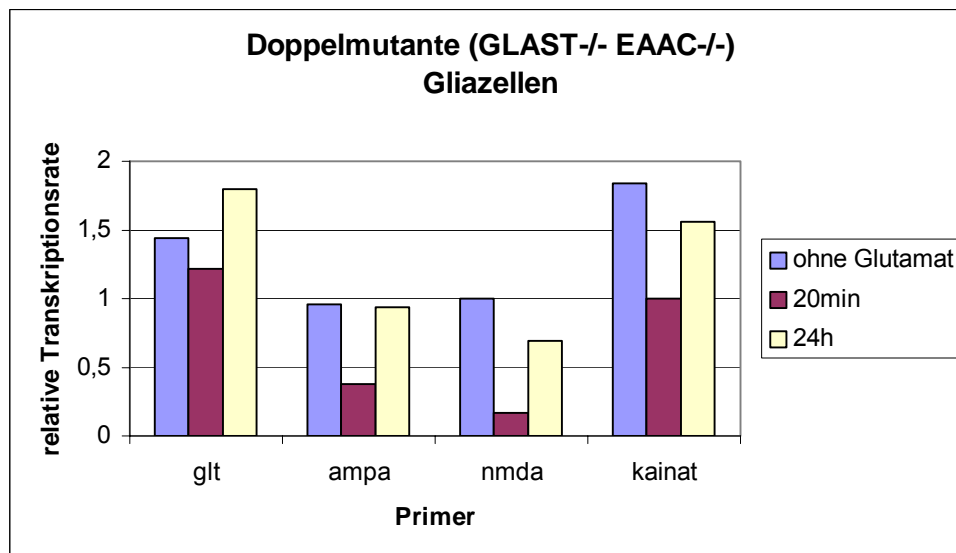


Abb. 47: Quantitative RT-PCR der Glutamat vermittelten Regulation der Expression glialer Primärkulturen Glutamatttransporter defizienter Tiere

Mit den Primern für die Glutamatttransporter und Rezeptoren konnten nur die Transkripte des Glutamatttransporters GLT-1 und der ionotropen Rezeptoren amplifiziert werden.

3.8 Funktionelle Analyse des Glutamatttransporters GLT-1 in HEK293 Zellen

Die von Günter (2007) durchgeführten funktionelle Analysen des Glutamatttransporters GLT-1 in transfizierten HEK293 Zellen bestätigen die in Kapitel 3.6.2.2 dargestellten Ergebnisse. Aufgrund der Elektrogenität des Transports konnte der in HEK293 Zellen transfizierte Glutamatttransporter elektrophysiologisch charakterisiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass eine Veränderung des N-Terminus durch Kopplung von EGFP mit GLT-1 keine Auswirkung auf den Glutamat-Transport in die Zelle ausübt. Weiterhin beeinträchtigt das fusionierte Protein die Affinität gegenüber Glutamat und Na⁺-Ionen nicht. Elektrophysiologische Studien in transfizierten HEK293 Zellen wiesen für L-Glutamat einen K_M-Wert von (32±5) μM auf. Als neues Substrat des Transports konnte L-Aspartat, mit einer etwas geringeren Affinität von (43±10) μM nachgewiesen werden. Substrat-homologe Substanzen wie L-α-Aminoadipat reduzieren die Effektivität der Aufnahme von Glutamat um (75±7) %. In Anwesenheit von L-β-Aminoadipat wurden keine Auswirkungen auf den Transport von Glutamat beobachtet. Der K_M-Wert radioaktiver Aufnahmestudien transfizierter Zellen liegt bei (55±13) μM für EGFP-GLT-1 bzw. (57±15) μM für GLT-1. Die K_M Wert für Natrium liegt mit dieser Methode bei (71±5) mM für das Fusionsprotein und (72±7) mM für GLT-1.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

A. Zur Erstellung einer **induzierbaren konditionellen Glutamatransporter GLT-1 defizienten Maus Mutante** wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei unterschiedliche *replacement* Vektoren GLT-BS und GLT-RF erstellt. Das *targeting* Konstrukt GLT-BS ist mit drei *loxP*-Sequenzen, der Erkennungssequenz der *Cre*-Rekombinase ausgestattet. Das *targeting* Konstrukt GLT-RF verfügt neben zwei *loxP*-Sequenzen über zwei *FRT*-Sequenzen, der Erkennungssequenz der *Flp*-Rekombinase.

Nach der Transformation der *targeting* Konstrukte in den Rekombinationssystemen *E. coli* 294-*Cre* bzw. *E. coli* 294-*FRT* erwiesen sich die *loxP*- bzw. *FRT*-Sequenzen in beiden Konstrukten als funktional.

Es wurde nach Elektroporation ein homolog rekombinierter ES-Zellklon des GLT-BS *targeting* Konstruktes der Linie V.8.1 identifiziert und charakterisiert. Nach der transienten *Cre*-Expression erfolgte ausschließlich die Exzision des Selektionsmarkers, nicht aber die Exzision des von den äußeren *loxP*-Sequenzen flankierten Genabschnitts. Deshalb wurde ein weiteres konditionelles *targeting* Konstrukt GLT-RF erstellt. Es wurden drei homolog rekombinierte ES-Zellklone generiert, zwei der Linie V.8.1 und einer der Linie Bruce. Die Rekombinationssequenzen *loxP* und *FRT* erwiesen sich in der transienten Elektroporation mit Konstrukten, die die *Cre*- bzw. die *Flp*-Rekombinase exprimieren, als funktional. Mit der alkalischen Phosphatase Färbung wurde die Pluripotenz der Zellen gezeigt. Die Zellen zeigten keine numerische Aberration.

Die charakterisierten ES-Zellen wurden für die Blastozysteninjektion verwendet. Aus 122 injizierten Blastozysten resultierten vier Nachkommen. Die Nachkommen zeigten keine Integration der homolog rekombinierten ES-Zellen in den Organismus. Es erfolgen weitere Blastozysten Injektionen zur Gewinnung der Maus-Mutante.

B. Für die **entwicklungs- und gewebsspezifischen Cre-Expression** zum konditionierten Ausschalten der GLT-1 Expression in der Maus wurden zwei Konstrukte erstellt. Das eine basiert auf einer durch Doxyzyklin, das andere auf einer durch Tamoxifen induzierbaren *Cre*-Rekombinase. Der eingesetzte *gfap*-Promoter gewährleistet die astrozytenspezifische Expression der Rekombinase. In glialen Zellkulturstudien erfolgte eine präzise Induktion der *Cre*-Rekombinase nach erfolgter Doxyzyklin Applikation. Die Analyse der bisher gewonnenen transgenen Mauslinie mit Doxyzyklin induzierbarer *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des *gfap*-Promoters zeigten noch keine funktionelle Aktivierung.

C. Bisherige Studien, nach der **GLAST-1 defiziente Tiere und Doppelmutanten GLAST-1/EAAC1** keinen auffälligen Phänotyp zeigen, konnten widerlegt werden. So zeigen die Mutanten ab dem Alter von einem Jahr epileptische Anfälle. Es konnte in Expressionsstudien aus dem Hirnextrakt sechs Wochen alter GLAST-1 $-/-$ und GLAST-1 $-/-$ / EAAC1 $-/-$ Mäuse eine gesteigerte Expression des ionotropen Kainatrezeptors gezeigt werden.

Ferner wurde das Expressionsmuster der Glutamatrezeptoren und der Glutamattransporter in Abhängigkeit des Neurotransmitters Glutamat in immortalisierten Ratten Gliomazellen und astrozytären Primärkulturen gezeigt. Dabei konnte ein regulatorischer Einfluss der glutamatergen Transmission auf die mRNA Transkription gezeigt werden.

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Gene targeting

Das im konditionellen Konstrukt GLT-BS unter dem starken Phosphoglycerat Kinase stehende Neomycin-Resistenzgen führte nach Elektroporation in R1, HMI und V.8.1 Zellen zu einer Anreicherung der heterolog und homolog integrierten *targeting* Konstrukte um den Faktor 3 (Tybulewicz *et al.*, 1991). Aus über tausend analysierten Klonen ging lediglich ein homolog rekombinierter Klon hervor. Für das konditionelle GLT-RF Konstrukt wurde aufgrund des fehlenden Thymidinkinase Gens kein Anreicherungsfaktor ermittelt. Drei der fast zweitausend analysierten Klone (HMI, V.8.1, Bruce) wurden als homolog rekombiniert erkannt und isoliert. Für die Elektroporation wurden etwa 2×10^7 ES-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt. Mit einem positiven Zellklon aus 17 Elektroporationen des GLT-BS linearisierten Konstruktes entspricht es einer Rekombinationsfrequenz von 2.9×10^{-9} Zellen und drei positiven Zellklonen aus 34 Elektroporationen des GLT-RF Konstruktes von 4.3×10^{-9} Zellen. Diese geringe homologe Rekombinationsfrequenz lässt sich durch die Verwendung nicht-isogener DNA zur ES-Zell-DNA erklären. Denn schon geringe Unterschiede in der Basenfolge können die homologe Rekombination beeinträchtigen (Te Riele *et al.*, 1992; Van Deursen und Wieringa, 1992). Neben der Homologie nimmt auch die Länge der auszutauschenden Genbereiche Einfluss auf die Häufigkeit einer homologen Rekombination (Hasty *et al.*, 1991). Die homologe Sequenz für das GLT-BS Konstrukt liegt bei 7.8kb und das auf dem *Rapidflirt*-Vektor basierenden Konstrukt GLT-RF bei 9.7kb. Ein Vergleich über die erfolgte homologen Rekombination der konditionellen Konstrukte für den Glutamatttransporter GLT-1 in embryonale Stammzellen zeigt eine fast vergleichbare Rekombinationshäufigkeit des GLT-BS Konstruktes gegenüber dem GLT-RF Konstrukt. Somit wirkt sich in diesem Fall eine erhöhte Sequenzhomologie des *targeting* Konstruktes von 1.9kb nicht auf die Häufigkeit des homologen Rekombinationsereignisses aus. Der aus Negativselektion resultierende geringe Anreicherungsfaktor für das GLT-BS und die fehlende Negativselektion gestalteten das *Screening* homolog rekombinierter ES-Klone zu einem zeitaufwendigen Prozess. Karyotypisierung und alkalischer Phosphatase Färbung der positiven ES-Zell Klone weisen diese für die Blastozysteninjektion geeignet aus (Abb. 23).

5.2 Transiente *Cre*-und *Frt*-Expression

Die selektive Exzision von Selektionsmarker-Genen ist für eine ungestörte Genexpression induzierbarer Nullmutationen äußerst sinnvoll. Die transiente *Cre*-Expression der Vektoren pBS185 und pGK-*Cre* und der Transfektion eines *Cre*-Fusionsproteins im positiven ES-Zell Klon mit den drei putativen *loxP*-Sequenzen des GLT-BS Konstruktes führte zur selektiven Entfernung des *gefloxten neo*-Selektionsmarker-Gens. In der Mehrzahl der Zellen blieb der Genort jedoch unverändert. Es konnten keine Zell-Klone isoliert werden, bei denen die gesamte genomische Sequenz zwischen den äußeren *loxP*-Stellen herausgeschnitten worden war (Tab. 4). Eine Veränderung der Vektorkonzentration führte hierbei genauso wenig zum Erfolg wie eine Veränderung der Elektroportionsbedingungen. Eine Mutation der drei *loxP*-Sequenzen ist aufgrund der Ergebnisse der Sequenzierung des konditionellen Konstruktes auszuschließen. Darüber hinaus wurde im Vorversuch die Funktionalität der zwei terminalen *loxP*-Sequenzen durch die Transformation des *targeting* Vektors im *Escherichia coli* 294-*Cre* Rekombinationssystem nachgewiesen (Abb. 13).

Berichten anderer Arbeitsgruppen zufolge ist eine selektive Exzision des *gefloxten* Resistenzgens genauso wahrscheinlich wie die gesamte Exzision durch die äußeren *loxP*-Stellen (Gu *et al.*, 1994). In dieser Arbeitsgruppe wurde ein weiteres konditionelles *targeting* Konstrukt für das Gen der Ceramid Galaktosyltransferase (CGT) auf Basis des pBS246 Vektors kloniert (Meinzinger, 2004). Dabei wurde eine von dem GLT-BS *targeting* Konstrukt abweichende Klonierungsstrategie verwendet. Nach der transienten *Cre*-Expression fand ebenfalls nur eines der beiden möglichen Rekombinationsereignisse statt. Hierbei erfolgte die gesamte Exzision der äußeren *loxP*-Sequenzen flankierenden Genabschnitts. Die *neo*-Kassette konnte in diesem System nicht selektiv entfernt werden. Mit der Annahme, dass die *neo*-Box die Expression des homolog rekombinierten CGT Gens nicht beeinträchtigt, wurde der embryonale Stammzell-Klon in Blastozyten injiziert. Eine mögliche Mutation der *loxP*-Schnittstellen ist auch hierbei aufgrund der aus der Sequenzierung resultierenden Ergebnisse auszuschließen.

Eine mögliche Erklärung ist eine unvollständige Rekombination des GLT-BS *targeting* Konstrukts, nach der die erste *loxP*-Schnittstelle nicht eingeführt wurde. Weiterhin könnten Unterschiede in Konsensus Sequenzen innerhalb prokaryontischer und eukaryontischer Zellen zu einer unterschiedlichen Funktionalität der *Cre*-Rekombinase in Bakterienkulturen und ES-Zellen führen. So könnte zum Beispiel eine Methylierung in Nachbarschaft der *loxP*-Sequenz die Funktionalität der *Cre*-Rekombinase in ES-Zellen

aufgrund sterischer Hinderung beeinträchtigen. CpG-Methylierung wurde bereits in regulativen Regionen wie Promoter oder Verstärker-Elementen (*enhancer*) beschrieben (Cross und Bird, 1995). So liegen zum Beispiel CpG-Inseln konstant und ubiquitär exprimierter Gene (*housekeeping genes*) überwiegend hypermethyliert vor (Bird, 1986). Darüber hinaus existieren Studien, dass Cytosin-Methylierung auch außerhalb CpG-Dinukleotiden auftritt (Grafstrom et al., 1985; Nyce et al., 1986 und Woodcock et al., 1987). Da das selektive Entfernen des Resistenzgens genauso wahrscheinlich wie eine Exzision durch die äußeren *loxP*-Schnittstellen ist (Gu *et al.*, 1994) und die mittlere *loxP*-Schnittstellen in den Zellkulturstudien hinsichtlich der Rekombination nicht funktional ist (Meinzinger, 2004), könnte eine sterische Hinderung innerhalb benachbarter der DNA-Sequenzen die Aktivität der *Cre*-Rekombinase beeinträchtigen.

Da eine Exzision des gesamten *gefloxten* Genbereichs des GLT-BS Konstruktes auf ES-Zellebene nicht möglich war, wurde ein weiteres konditionelles *targeting* Konstrukt (GLT-RF) auf Basis des *Rapidflirt* Vektors kloniert, das neben den *loxP*-Sequenzen zusätzlich über *FRT*-Sequenzen zum selektiven Entfernen des Selektionsmarkers verfügt. Im Vorversuch der Transformation des *targeting* Vektors (GLT-RF) im *Escherichia coli* 294-Cre bzw. 294-FRT Rekombinationssystem erwiesen sich die *loxP*- bzw. *FRT*-Sequenzen als funktional (Abb. 16). In Übereinstimmung der Berichte anderer Arbeitsgruppen (Gu *et al.*, 1994) konnte sowohl die von *FRT*-Sequenzen flankierte Neomycin-Kassette selektiv als auch der gesamte von *loxP*-Sequenzen flankierte Genabschnitt entfernt werden (Abb. 22).

5.3 Blastozysteninjektion

Wie sich in Experimenten der transienten *Cre*-Expression herausstellte erwies sich eine der entscheidenden *loxP*-Schnittstellen der bereits injizierten ES-Zellen auf Basis des GLT-BS Konstruktes als nicht funktional (Abb. 20). Aus den vorangegangenen Injektionsexperimenten von 83 reimplantierten Blastozysten gingen zwei Nachkommen hervor, von denen ein Nachkomme eine geringe Fellchimärität von etwa 5% vorzuweisen hatte. Rückkreuzungsexperimente bestätigten, dass keine Keimbahnchimärität vorlag.

Die *loxP*- und *FRT*-Schnittstellen des konditionellen *targeting* Konstruktes GLT-RF waren auf der ES-Zell Ebene intakt (Abb. 22). Die ES-Zellklone des homolog rekombinierten *targeting* Konstruktes GLT-RF wurden für den Transfer in Blastozysten verwendet. Insgesamt wurden 122 Blastozysten reimplantiert, die zu vier Nachkommen führten, von denen sich alle in der Genotypisierung mittels PCR als negativ erwiesen.

Mit der Funktionalität der Schnittstellen des gesamten homolog rekombinierten Lokus, der Pluripotenz und Karyotypisierung der ES-Zellen wurden die Rahmenbedingungen für die Generierung einer konditionellen GLT-1 Maus geschaffen.

5.4 Induzierbare *Cre*-Rekombinase

Zeitlich und zellspezifisch regulierte Expression endogener Gene ist ein wünschenswertes Ziel der Gentherapie aber auch in transgenen Tiermodellen.

Konventionelle GLT-1 Mäuse sterben aufgrund des selektiven Absterbens von Neuronen sowie spontaner epileptischer Anfälle frühzeitig (Tanaka *et al.*, 1997). Deshalb sollte ein Modell einer aktivierbaren *Cre*-Rekombinase zum zeit- und gewebsspezifischen, induzierten Ausschalten des GLT-1 in Astrozyten erstellt werden. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA Elemente beeinflusst die Bildung und Stabilität des Präinitiationskomplexes (Zawel und Reinberg, 1993). Für die Induzierbarkeit muss der Transkriptionsfaktor zum einen an eine spezifische DNA-Sequenz binden und zum anderen eine Domäne aufweisen, die exogene Liganden binden kann, wodurch die Transkription reguliert wird. Die DNA Bindedomäne des Liganden regulierbaren Transkriptionsfaktors sollte die Genexpression nicht beeinflussen und durch einen nicht toxischen, exogen Liganden aktivierbar sein. Die Aktivierungs- bzw. Repressordomäne muss ein hinreichendes Potential für eine hohe Expressionsrate oder „*tight*“ Repression des Zielgens aufweisen. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche regulatorische Systeme entwickelt. Das zeit- und gewebsspezifische Ausschalten des GLT-1 Gens in der Maus mittels Schwermetallionen, Isopropyl- β -thiogalaktosid (IPTG) und Hitzeschock ist aufgrund der Toxizität ihrer Liganden bzw. praktischen Undurchführbarkeit der Induktion nicht möglich (Yarranton, 1992; Baim *et al.*, 1991). Als geeignetes Modell für die Induktion höherer Organismen erweisen sich auf Tetrazyklin (Gossen *et al.*, 1995, 1992), Östrogen (O’Gorman *et al.*, 1991; Logie und Steward, 1995; Metzger und Feil, 1999), Ecdysone (No *et al.*, 1996) und Progesteron (Wang *et al.*, 1997) basierende regulatorische Systeme.

Es sollte ein Modell einer aktivierbaren *Cre*-Rekombinase zum gewebsspezifischen, induzierten Ausschalten des GLT-1 in Astrozyten erstellt werden. „Klassische“ Astrozyten weisen einen passiven Stromfluss auf und sind durch ihr kanalbildendes Protein Connexin 43 charakterisiert (Nagy und Rash, 2000; Nagy *et al.*, 2003). Es gibt eine weitere Astrozyten Unterklasse, die einen aktiven Stromfluss aufweisen und nicht durch *gap junctions* gekoppelt sind (Matthias *et al.*, 2003; Wallraff *et al.*, 2004). Neben

Connexin 43 werden auch GFAP, Vimentin, S100 β , Glutamin-Synthase, das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin-C, das hirnspezifische Lipid-Binde-Protein BLBP und Nestin in Astrozyten, aber auch während der Entwicklung in radialen Gliazellen exprimiert (Mori *et al.*, 2005).

In immunohistochemischen Kollokalisationsstudien in Wildtyp Hirnschnitten der Maus mit GLT-1 und GFAP Antikörpern wurde gezeigt, dass GLT-1 ein mit überwiegend glialen Zellen assoziierter Glutamattransporter ist (Abb. 34). In gezielten Kreuzungsexperimenten der konditionellen GLT-1 Mauslinie mit der unter dem glialen gfap-Promoter stehenden Liganden abhängigen *Cre*-Rekombinase soll die Expression von GLT-1 in Astrozyten entwicklungsabhängig ausgeschaltet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum konditionellen Ausschalten des GLT-1 Gens in den Astrozyten der Maus auf das *TetOn* System zurückgegriffen (Abb. 24). Parallel wurde ein Konstrukt auf Basis eines modifizierten Östrogenrezeptors kloniert, das ebenfalls unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen Promoters gfap steht (Abb. 32). Die Vektoren wurden mittels Restriktionsendonukleasen und PCR überprüft und zeigen die erwartete Konstitution (Abb. 24, 27, 29). Die *Internal Ribosomen Entry Site* (IRES) Sequenz sollte die konzertierte Translation der *Cre*-Rekombinase und dem *Enhanced Green Fluorescence Protein* ermöglichen.

Als *in vitro* System zur Analyse der Induzierbarkeit wurden Rattenglioma Zellen verwendet. Zuvor wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Expression der Glutamatrezeptoren und Glutamattransporter charakterisiert. Die EAAC1 Expression konnte in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen (Dowd und Robinson, 1996; Palos *et al.*, 1999) nachgewiesen werden. Neben der Expression des metabotropen Glutamatrezeptors mGluR1a Glutamat Rezeptors (Albansanz *et al.*, 1997), wurde eine Expression des ionotropen Rezeptors AMPA (Abb. 25) gezeigt. Weiterhin wurden die Zellen immunohistologisch mit dem Antikörper gegen GFAP (Abb. 26) charakterisiert. Zunächst erwies sich das Konstrukt unter Verwendung des fötalen Kälberserum (*Gibco*) im Nährmedium als „leaky“. Da Antibiotika wie Penizilline, Tetrazykline und Sulfonamide häufig als Veterinärantibiotika in der Schweine-, Geflügel- und Kälbermast eingesetzt werden (Stettler, 2004), wurde die mangelnde Regulierbarkeit auf das Tetrazyklin im FBS zurückgeführt. Unter Verwendung von FBS Gold PAA (*Cell Culture Company*), einem definiertem Kälberserum, fand eine streng geregelte *Cre*-Expression in der Zellkultur statt (Abb. 28). Die Vorkerninjektionen mit einer stabilen Integration des gesamten Transgens bei 2% der Nachkommen (Abb. 29), weicht von den erwarteten Werten (10%) ab (Hogan

et al., 1986). Die Funktionalität des Systems wurde mittels quantitative RT-PCR nach oraler bzw. intraperitonealer Applikation von Doxyzyklin nachgewiesen. Es konnten dabei keine Transkripte der *Cre*-Rekombinase bzw. EGFP nachgewiesen werden (Abb. 31). Eine verminderte Aktivität des *gfap*-Promoters und somit eine schwache Expression des reversen Transaktivators, erscheint aufgrund der Ergebnisse der *in vitro* Studien unwahrscheinlich. Wie schon mehrfach gezeigt, beeinflusst die Blut-Hirnschranke die hirnspezifische Aktivierung des reversen Transaktivators durch Doxyzyklin nicht (Michalon *et al.*, 2005; Koponen *et al.*, 2003; Mizuguchi *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003). Eine Beeinträchtigung des Wirtsorganismus durch Doxyzyklingabe zur Aktivierung der *Cre*-Rekombinase ist relativ unwahrscheinlich, da keine Nebenwirkungen in der täglich verabreichten geringen Menge von 1.4 mg intraperitoneal und 5 mg oral während des Zeitfensters von zehn Tagen auftraten (Hasan *et al.*, 2007). Ebenso ist eine effiziente Expression nach einstündiger (Adult) bzw. 13 stündiger (Embryo) Dauer von doxyzyklinhaltigem Trinkwasser (1 µg/ml) beschrieben worden (Branda und Dymecki, 2004). Der hier verwendete Zeitrahmen und die Form der Applikation übersteigen diesen Rahmen deutlich und kann daher nicht für eine fehlende Expression verantwortlich sein. Studien die auf dem gleichen Konstrukt der Doxyzyklin aktivierbaren *Cre*-Rekombinase basieren, in denen *gfap* durch einen myelinspezifischen *mbp* Promoter ersetzt wurde, zeigten im *Western blot* mit einem gegen die *Cre*-Rekombinase spezifischen Antikörper eine durch orale Applikation von Doxyzyklin präzise ausgelöste Induktion (Stoffel, 2008). Die Expression der *Cre*-Rekombinase kann durch Gegenwart von *Silencer*-Sequenzen im Promoterbereich beeinträchtigt sein. *Enhancer*- (Atchison, 1988) und *Silencer*-Regionen (Linzer und Talamantes, 1985) sind stromaufwärts gelegene cis-aktive Sequenzen, die zum Teil sehr weit von der Promotersequenz entfernt liegen können und je nachdem ob die an sie bindende Faktoren gewebe- und entwicklungsspezifisch, hormon- oder signalabhängig sind, die Transkriptionsrate erhöhen oder erniedrigen. Zusätzlich wurde ein Konstrukt einer Tamoxifen-aktivierbaren *Cre*-Rekombinase erstellt. Das Konstrukt könnte aufgrund der endogenen Östrogenkonzentration die Expression des Zielgens aktivieren. Eine Wechselwirkung des Östrogenrezeptors mit anderen endogenen Genen kann durch die ausschließliche Verwendung der Östrogenbindedomäne innerhalb des Konstruktes ausgeschlossen werden. Weiterhin könnte die exogene Östrogen bzw. Tamoxifen Applikation einen pleiotropischen Effekt hervorrufen (O’Gorman *et al.*, 1991; Logie und Steward, 1995; Metzger und Feil, 1999). Alternativ zur Tamoxifen-aktivierbaren *Cre*-Rekombinase zeigen Ecdyson kontrollierbare Systeme eine Alternative

mit geringer basaler Aktivität und geringen Nebenwirkungen des Effektormoleküls im Wirtsorganismus (No *et al.*, 1996).

5.5 Epileptische Mausmodelle

Die Inzidenz der Epilepsie - Krampfanfällen als Folge synchroner Entladung von Neuronengruppen - beträgt 1% der Bevölkerung. Hierbei wird zwischen generalisierten (*grand mal*), die bis hin zur Bewusstlosigkeit führen kann und partiellen, lokalen Anfällen (*petit mal*), bei der Betroffene angemessen auf ihre Umgebung reagieren können, unterschieden. Krampfanfälle werden bei Ungleichgewicht von Erregung und Hemmung in neuronalen Netzen hervorgerufen; deren Ursache in Defekten von Ionenkanälen, Rezeptoren und Transportern liegen können, die an der neuronalen Kommunikation beteiligt sind. Anfälle unterschiedlichen Schweregrads legen die Vermutung nahe, dass ihre Ursache im Defekt eines Gens oder mehrerer Gene liegt. So sind zum Beispiel Mutationen des Kaliumkanals $K_{V1.1}$ (Smart *et al.*, 1998) und Calciumkanals des P-Q-Typs (Fletcher *et al.*, 1996, Green and Sidman, 1962) als Kandidaten für eine Epilepsie in Tiermodellen beschrieben worden. Der Kaliumkanal $K_{V1.1}$ kodiert die porenbildende $K_{V1.1\alpha}$ -Untereinheit des axonal und präsynaptischen spannungsabhängigen *Shakertyp* K^+ -Kanäle, die das Fortschreiten des Aktionspotentials und Transmitterausschüttung regulieren. Ausschaltung sowohl des $K_{V1.1\alpha}$ Gens im Tiermodell als auch Mutationen des isoformen humanen Kanals KCNA1 führt zum vergleichbaren *grand mal* Phänotyp.

Calciumkanäle werden aufgrund ihrer pharmakologischen Inhibitoren unterteilt. Die Punktmutation der zweiten Transmembrandomäne des Ca^{2+} -Kanals des P-Q-Typs führt in Mäusen zu einem *petit mal* Phänotyp (*tottering*), dessen Ursache in einer gestörten Freisetzung von Neurotransmittern aufgrund des Defektes beim Öffnen des spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanals liegen.

Der Glutamattransporter GLAST-1 ist hauptsächlich in den Astrozyten des Kleinhirns und in geringer Konzentration im Hippocampus und Cortex lokalisiert (Storck *et al.*, 1992; Rothstein *et al.*, 1994). Neben der Regulation der Neurotransmission bieten der hochaffine Glutamattransporter Schutz vor der exzitotoxischen Wirkung des Glutamats auf Neurone (Lucas und Newhouse, 1957; Olney und Sharpe, 1969; Olney *et al.*, 1971). Eine Defizienz der Glutamattransporter könnte einen toxischen Einfluss auf benachbarte Neurone ausüben.

Histologische Untersuchungen an Hirnschnitten von ca. drei Monate alten GLAST-1 defizienten Mäusen zeigten keine lichtmikroskopisch Zelldegeneration und keine

vermehrte Apoptose. Weiterhin konnte in vorangegangenen Experimenten kein Unterschied im Lern- und Explorationsverhalten sowie der lokomotorische Fähigkeit zwischen zwei bis vier Monate alter GLAST-1 $-/-$ Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Tieren festgestellt werden (Schröder, 1998).

Jedoch traten bei ein Jahr alten überwiegend weiblichen GLAST-1/EAAC1 defizienten Tieren epileptische Anfälle auf. Die Anfälle könnten durch ein Ungleichgewicht der Expression der Transporter im Vergleich zu den entsprechenden Rezeptoren hervorgerufen werden, wobei die Kainat-Rezeptor Expression im Gehirnextrakt 6 Wochen alter Tiere um das 12fache im Vergleich zu Wildtyp Tieren erhöht ist (Abb. 43). Eine erhöhte Expression der ionotropen Rezeptoren relativ zu den Transportern resultiert in einer Übererregbarkeit, die durch Öffnen spannungsabhängiger Kanäle darunter auch die der ionotropen Glutamat-Rezeptoren hervorgerufen wird. Hohe intrazelluläre Natriumkonzentration rufen ein zytotoxisches Ödem hervor, das zum Zusammenbruch des Membranpotentials bis hin zu einer Nekrose führen kann. Aufgrund der erhöhten Glutamatkonzentration können spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet werden, die eine von den Mitochondrien ausgelöste Apoptose hervorrufen können (Ankarcrona *et al.*, 1995).

Konventionell GLT-1 defiziente Mäuse zeigen ein selektives Absterben von Neuronen sowie spontane epileptische Anfälle und sterben frühzeitig. Der Glutamattransport im Cortex von GLT-1 defizienten Tieren ist auf 5.8% reduziert (Tanaka *et al.*, 1997). Somit stellen Glutamattransporter defiziente Mausmutanten weitere Modelle für die Erforschung der Epilepsie dar.

5.6 Regulation der Glutamattransporter

Die Regulation der EAAT Expression erfolgt auf verschiedenen Ebenen, Steuerung der Transkription, mRNA Prozessierung und Translation. So üben viele Wachstumsfaktoren und lösliche Polypeptide einen Einfluss auf die EAAT Expression aus. Die GLAST-1 und EAAC1 Expression wird durch die Zugabe von Insulin Wachstumsfaktor (IGF1) und *platelet-derived* Wachstumsfaktor (PDGF) in Zellkultur Systemen verstärkt (Sims *et al.*, 2000; Gamboa *et al.*, 2002). Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und *transforming growth factor* ($TGF-\alpha$) erhöhen ausschließlich die GLT-1 Expression in Astrozyten des Rattenhirns (Zelenaia *et al.*, 2000). PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) reguliert über den PAC1 Rezeptor sowohl die GLAST-1 als auch die GLT-1 Expression über die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und

eines PKC Signalweg. Dabei wird die GLT-1 Expression aktiviert, jedoch erfolgt die PAC1 vermittelte Aktivierung der GLAST-1 Expression über einen anderen Signalweg (Figiel und Engele, 2000). PKC und PKA Erkennungssequenzen (Kanai und Hediger, 1992; Storck *et al.*, 1992, Casado *et al.*, 1993), geben den Hinweis auf ihre Beteiligung an der Regulation der Glutamattransporteraktivität. Lösliche Faktoren regulieren die Expression von GLT-1 in kortikalen Astrozyten über die Aktivierung von p42/44 MAPK (*mitogen activated protein kinase*), CREM (cyclic adenosine monophosphate responsive element modulator) und ATF-1 (*activating transcription factor-1*). Inhibierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase, EGF und des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- κ B blockiert die Zunahme der GLT-1 Expression (Gegelashvili *et al.*, 2000, Zelenaiia *et al.*, 2000). Die Glutamataufnahme wird durch drei unterschiedliche Zytokine Tumor Nekrosefaktor (TNF- α), Interferon γ und Interleukin-1 β gehemmt (Szymocha *et al.*, 2000). Ebenfalls weist Arachidonsäure einen inhibitorischen Effekt auf Transporter von Glutamat, Glycin und GABA auf (Barbour *et al.*, 1989; Rhoads *et al.*, 1983; Zafra *et al.*, 1990).

Das Expressionsmuster der Glutamatrezeptoren in primären Astrozytenkulturen weicht stark von dem des Gesamthirnextraktes ab. Die Expression des Glutamattransporters GLT-1 der Wildtyp Mäuse und der Doppelmutanten ist sowohl in Astrozytenkulturen (Abb. 46, Abb. 47) als auch im Gesamthirnextrakt (Abb. 43) nahezu gleich. Die Expression der überwiegend neuronal lokalisierten ionotropen Glutamatrezeptoren ist im Gesamthirnextrakt deutlich stärker hochreguliert als in der astrozytären Zellkultur. Dabei ist die Expression des Kainatrezeptors im Gesamthirnextrakt der Glutamattransporter defizienten Mauslinie um das 12fache hochreguliert, in der glialen Zellkultur jedoch nur um das 2fache. Studien an immortalisierten Rattenglioma Zellen (Abb. 44, Abb. 45) und primären Astrozyten Kulturen (Abb. 46, Abb. 47) zeigten, dass Glutamat sowohl in den Kurzzeit- als auch in den Langzeitstudien die Expression von *eaac1* in C6 wt Zellen und *glt1* in *egfp-glt1* transfizierten C6 Zellen herunterreguliert, während in den Langzeitstudien Glutamat die Expression von *glt1* in wt Gliazellen erhöht wird. Vermutlich regulieren verschiedene Mechanismen die *glt1* Expression in transfizierten C6 Zellen (*egfp-glt1*) und Primärkulturen. Die Expression von *glast1* und *eaac1* ist in den Primärkulturen der Wildtypzellen in den Langzeitstudien nahezu unverändert. Ebenfalls ist die Expression des ionotropen Rezeptors AMPA in den C6 Zellen unverändert. Kurzzeitstudien zeigten, dass die Expression aller ionotropen Rezeptoren sowohl in wt Gliazellen als auch in Gliazellen der Doppelmutanten um das 2fache herunterreguliert

waren, sich aber in den Langzeitstudien dem Wert der Rezeptor Expression der Gliazellen anglich.

In vitro Studien glialer Primärkulturen des Rattenhirns zeigten eine von der Erhöhung der exogenen Glutamatkonzentration konzentrationsabhängige Steigerung der mRNA GLT-1 Expression (Thorlin *et al.*, 1998, Munir *et al.*, 2000). Aktivierung des Kainatrezeptors erhöht die astrozytäre Expression von GLAST-1 (Gangelashvili *et al.*, 1996), wohingegen eine Aktivierung des NMDA Rezeptors die GLAST-1 Expression erhöht und die GLT-1 Expression in primären glialen-neuronalen Zellkulturen, herunterreguliert (Schlag *et al.*, 1998).

Eine Veränderung des EAAT Expressionsmusters (Abb. 43) und der Glutamataufnahme in Astrozyten wurde für Epilepsie und amyotrophe Lateralsklerose gezeigt (Tanaka *et al.*, 1997; Swanson *et al.*, 1997; Rothstein *et al.*, 1995). Aus der Summe der Befunde geht hervor, dass die unterschiedlichen Transportersubtypen durch klar abgetrennte, zellspezifische Mechanismen reguliert werden.

5.7 Funktionalitätsstudien des Glutamattransporters GLT-1

Für weiterführende elektrophysiologische Messungen wurde ein geeignetes Modell für die heterologe Expression von GLT-1 bzw. EGFP-GLT-1 in HEK293 Zellen erstellt. Hierzu wurden biochemische, molekularbiologische und immunohistochemische Methoden genutzt. Eine Veränderung des N-Terminus von GLT-1 durch Fusion mit dem fluoreszierenden EGFP-Protein übt keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins aus. Im Rahmen der Dissertation von Günter (2007) konnten mit dem erstellten Modell Fragen zum Einfluss von Fusionsproteinen auf die Proteinstruktur in Bezug auf Funktion, Ionenabhängigkeit, die Michaelis-Menten-Kinetik des Glutamattransports und der Einfluss von Inhibitoren des GLT-1 (EAAT2) vermittelten Transports beantwortet werden. Vergleichende Messungen der Transporteraktivität wurde zusätzlich in unbefruchteten Oocyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt, die sich aufgrund ihrer hohen Translationsfähigkeit als Expressionssystem eignen (Günter, 2007). Die fehlende Glykosylierung in *Xenopus laevis* Oozyten beeinträchtigte nicht die Funktion der Transporter wie dies bereits für GLAST-1 gezeigt wurde (Klockner *et al.*, 1994; Storck *et al.*, 1994). Funktionelle Analysen des Proteins basierten auf L-[¹⁴C]-Glutamat Aufnahmestudien sowie *patch-clamp* Messungen im *whole-cell* Modus.

	Konstrukt	Methode	Ligand	K_M
HEK293	EGFP-GLT-1	<i>patch-clamp</i>	L-Glutamat	(32+/-5) μM
			L-Aspartat	(43+/-10) μM
	GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	(57+/-15) μM
	EGFP-GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	(55+/-13) μM
Oozyten	GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	(65+/-10) μM
	EGFP-GLT-1	L-[¹⁴ C]-Glutamat	L-Glutamat	(67+/-9) μM

Tab. 6: Übersicht der beobachteten Eigenschaften der Glutamataufnahme

Auflistung der Affinitäten der Transporterproteine in den entsprechenden Expressionssystemen (Günter, 2007).

Eine Veränderung des N-Terminus von GLT-1 durch Fusion mit dem EGFP-Protein übt keinen Einfluss auf die Transporteraktivität aus. Die ermittelten Werte liegen in dem Bereich, der von Arriza für die humanen Subtypen EAAT1-3 (Arriza *et al.*, 1994) und von Dunlop für EAAT2 (Dunlop *et al.*, 1999) beschrieben wurde. Die K_M-Werte für GLAST-1 lagen abhängig vom Expressionssystem zwischen (11-77) μM (Arriza *et al.*, 1994; Gegelashvili *et al.*, 1997; Klockner *et al.*, 1994; Storck *et al.*, 1992). GLT-1 ist in der Lage neben Glutamat verschiedene andere Aminosäuren wie L-Cystein (Hayes *et al.*, 2005), L-Aspartat (Günter, 2007) zu transportieren. Jedoch transportiert GLT-1 anders als GLAST-1 bevorzugt L-Glutamat anstatt L-Aspartat. Synaptosomale Glutamtransporter werden durch L- und D-Aspartat blockiert (Rauen *et al.*, 1992). Dihydrokainat (Arriza *et al.*, 1994) und L-α-Aminoadipat (Günter, 2007) blockieren GLT-1, nicht aber GLAST-1. Der Transport des hochaffinen Glutamtransporters wird von der Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Konzentration beeinflusst. Der maximale Transport liegt bei einer Konzentration von etwa 120 mM für Na⁺ und damit unter der physiologischen von etwa 144 mM. L-Glutamat und Na⁺ werden im Verhältnis 3:1 transportiert (Günter, 2007). Eine Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration führt zu einer Änderung des elektrochemischen Potentials und kann zu einer reversen Aufnahme des Glutamats führen (Szatkowski *et al.*, 1990).

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Nicht aufgeführte Standardmethoden wurden nach Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt.

6.1.1 DNA-Präparation

6.1.1.1 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid DNA wurde aus 4-5 ml Übernachtskultur nach *Birnboim* (Birnboim, 1983) oder nach der *Boiling* Präparationsmethode (Holmes und Quigley, 1981) isoliert. Plasmidreinigung von 200 ml Übernachtskultur erfolgt mit dem Quiagen-Maxi-Präparationen-Kit (*Quiagen*) nach Herstellerangaben. Für die Übernachtskulturen wurden überwiegend Bakterien (*Escherichia coli*) der Zelllinie DH5 α und nach Bedarf *E. coli* 294-Cre, *E. coli* 294-FRT (Buchholz *et al.*, 1996), methylierungssensitive *E. coli* Dam⁻ und XL10-Gold Ultrakompetente Zellen (*Stratagene*) verwendet.

6.1.1.2 Genomische-DNA-Präparation

Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Die DNA-Präparation erfolgte nach Mansouri. In jedes Loch einer 96er Platte wurden 50 μ l Lysispuffer mit 5 μ g Proteinase K (*Merck*) eingesetzt und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Fällern der DNA mit NaCl versetztem Ethanol und waschen mit 70%igem Ethanol wurde die DNA in 30-100 μ l TE (Tris/EDTA) resuspendiert. Die DNA wurde über Nacht bei 54°C gelöst.

Präparation genomischer DNA aus Mausschwänzen

1-2 cm lange Schwanzbiopsien 21-28 Tage alter Mäuse wurde über Nacht in 700 μ l Lysismix mit 300 μ g Proteinase K versetzt, bei 54°C inkubiert, mit Isopropanol gefällt. Nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die DNA in 300 μ l TE aufgenommen und über Nacht bei 54°C gelöst.

6.1.2 Enzymatische DNA Restriktion

Enzymatische Reaktionen wurden nach Maniatis *et al.* (1989) in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystemen und Temperatur durchgeführt (Restriktionsendonukleasen: *Invitrogen*, *Roche*, *Boehringer*, *NEB-Biolabs*). Zusätzlich wurden die genomische DNA Reaktionsansätze mit 1 mM BSA und 1 mM Spermidin versetzt.

6.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels eines *NucleoSpin Extract Kits (Machery-Nagel)* nach Herstellerangaben.

6.1.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung radioaktiver Hybridisierungs sonden wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus Plasmiden über Agarose-Gelelektrophorese isoliert und unter Verwendung des *random primed DNA labelling kits (Boehringer)* mit α -[³²P]-dATP bzw. α -[³²P]-dCTP (*Amersham, Freiburg*) markiert.

6.1.5 Southern blot Hybridisierung

Für die *Southern blot* Hybridisierung wurde die DNA einem Restriktionsverdau unterworfen. Nach der Elektrophorese (Molekülgrößenmarker: 1kb-Leiter, *Life Technologies*) erfolgte ein Kapillar-blot-Transfer aus dem Agarosegel auf eine *GeneScreen Plus-Membran (PerkinElmer Life Science, Inc.)* bzw. *Nylon Membrane, positively charged (Roche)* nach der Vorschrift der Hersteller. Die Hybridisierung und das Waschen erfolgten ebenfalls nach Herstellerangaben.

6.1.6 RNA-Präparation

Die RNA wurde mit der Trizol (*Invitrogen*) Extraktionsmethode gewonnen. Dazu wurde 50-100 mg Gewebe von Mäusen bzw. Zellen (HEK293, C6, gliale Primärkulturen) einer 90er Kulturschale in 1 ml Trizol homogenisiert. Nach erfolgter Inkubation bei 15-30°C für 5 min wurden die Proben mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Die RNA wurde anschließend mit 0.5 ml Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und in RNase freiem Wasser aufgenommen.

6.1.7 cDNA-Synthese

Falls nicht anders aufgeführt wurden die Komponenten der cDNA Synthese von *Invitrogen* bezogen. Für die Amplifikation von mRNA wurden je 2 µg Gesamt RNA (~100ng polyA RNA) zur cDNA transkribiert. Hierzu wurde die RNA mit 50 µM p(dN6) (*Boehringer*) in einem Gesamtvolumen von 11.5 µl für 10 min bei 70°C inkubiert, auf Eis gekühlt, mit 2 µl 5x RT Puffer, 2 µl DTT (0.1 M), 1 µl 10 mM dNTPs (*Pharmacia*), 0.5 µl RNAsin (40U/µl) und 1 µl Superscript II (200U/µl) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 50 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 70°C inaktiviert.

6.1.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In folgender Tabelle sind die unterschiedlichen Reaktionsansätze der PCR aufgelistet mit Verwendung der entsprechenden Programmen des PCR-Cyclers (Peltier Thermal Cycler 200 Thermoblock, *Biozym*).

	Mausbiopsien (genomische DNA)	Zellkultur (genomische DNA)	RT-PCR (cDNA)	RT-PCR (genomische DNA)	Plasmid-DNA
<i>Template</i>	100ng	100ng	2µl	60ng	5ng
dNTP (10mM)	2.5µl	1µl	0.4µl	0.8µl	1µl
Primer ¹	2x1µl	2x1µl	2x0.6µl	2x1µl	2x1µl
Polymerase	0.75µl ⁶	0.3µl ⁶	0.8µl ⁵	0.75µl ⁵	1µl ⁵
Puffer	5µl ³	2µl ³	2µl ⁴	4µl ³	2µl ⁴
α-[³² P]-dCTP	-	-	0.1µl	0.2µl	-
dest. H ₂ O	ad. 50µl	ad. 20µl	13.6µl	ad. 40µl	ad. 20µl
Programm	Desatgen	Desatgen	RT-20	RT-20	Desatura

Tab. 7: Reaktionsansätze für die PCR

Auflistung der Reaktionsansätze für genomische DNA-Proben aus Schwanzbiopsien und Zellkultur, Plasmide und cDNA.

¹Primer von der Firma *Metabion International AG* synthetisiert, ²*Amersham*, ³Expand Long Template Puffer3 (*Roche*), ⁴Expand High Fidelity Puffer2 (*Roche*), ⁵hauseigene TaqB-Polymerase, ⁶Expand Long Template Polymerase (*Roche*)

Die PCR-Reaktionen wurden in 250µl Reaktionsgefäßen durchgeführt. Folgende Tabelle gibt die unterschiedlichen Programme der zu amplifizierenden Fragmente wieder. Gegebenfalls wurden die Annealingtemperaturen und Elongationszeiten an die entsprechenden Bedingungen angepasst. Dabei liegt die Annealing-Temperatur 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu erwartenden Amplifikats (~1min/kb).

	Desatgen	Desatura	RT-20
1. Initiale Denaturierung	94°C, 2.00min	94°C, 2min	94°C, 2min
2. Amplifizierung			
Denaturierung	10x 94°C, 0.15min	30x 93°C, 1.00min	20x 93°C, 1.00min
Annealing	60°C, 0.30min	60°C, 1.00min	60°C, 1.00min
Elongation	68°C, 7.00min	72°C, 1.00min	72°C, 2.30min
Denaturierung	20x 94°C, 0.15min		
Annealing	60°C, 0.30min		
Elongation	68°C, 7.00min +5min/ cycle		
Finale Elongation	68°C, 10.00min	72°C, 10.00min	72°C, 10.00min

Tab. 8: Die für die PCR verwendeten Programme im Peltier Thermal Cycler 200 Thermoblock

6.1.9 Ligation

Zur Herstellung von Konstrukten durch Insertion von DNA-Fragmenten in entsprechend linearisierte, gegebenenfalls am 5'Ende mittels alkalischer Phosphatase (CIP, *Roche*) dephosphoryliert Vektoren wurden bei 14°C in 20 µl Volumen über Nacht mit, dem entsprechendem Insert und 1 U T₄-DNA-Ligase (*Boehringer, Invitrogen*) in dem für die Ligation vorhergesehenen Puffer, inkubiert.

PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des TA Cloning Kits (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben in den pCR2.1-Vektor kloniert.

6.1.10 Transformation

Die Plasmide wurden durch einen Hitzeschock bei 42°C in kompetente Zellen transformiert und nach einer Stunde im Wasserbad bei 37°C auf die entsprechenden mit Antibiotika beschichteten LB-Platten ausgestrichen.

6.1.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte auf einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer von Applied Biosystems mit der Taq BigDye-Terminator cycle sequencing Methode.

6.2 Proteinchemische, immunologische und histologische Methoden

6.2.1 Extraktion von Gesamtproteinen aus HEK293 Zellen

Die integralen Membranproteine der Glutamatttransporter wurde mit dem Detergenz Triton-X-100 (p-t-Octylphenyl-polyoxyethylen) solubilisiert. Zur Isolierung der Membranproteine wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums und Waschen in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) in 1 ml Extraktionspuffer je Klon einer 90er Schale bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile bei 14000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Die Konzentration der Proteine aus dem Überstand wurde mittels eines BCA-Testes (*Pierce*) bestimmt. Die Endkonzentration der Proteinlösung wurde auf 10 µg/µl eingestellt, mit 20 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der Überstand wurde auf ein SDS-PAGE-Gel (Leammi, 1970) übertragen und mittels *Western blot* analysiert.

Der Extraktionspuffer setzte sich wie folgt zusammen: 50mM Tris pH7.4, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 5mM DTT, 0.32 M Sucrose, 2x Complete ohne EDTA (*Roche*), 0.5%Triton X-100.

6.2.2 Western blot

Gesamtproteine aus den HEK293 Zellen wurden für 10 min in 4x SDS-Puffer aufgekocht, in einem Polyacrylamidgel (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, *Invitrogen*) gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend für eine Stunde mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer auf eine Nitrozellulosemembran (*Schleicher Schuell*) transferiert. Die Membran wurde anschließend zur Absättigung freier Bindungsstellen in TBST-Puffer (50mM Tris/HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) mit 3%igem Milchpulver (*Nestle*) versetzt, geschüttelt und über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-Puffer gewaschen folgte die Inkubation für 2 Stunden bei 4°C mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Peroxidase Konjugat, *Sigma*) in 3% Milchpulver/TBST. Nachdem erneut 4x für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen worden war, wurde die Membran in 20ml Luminol (250mM Luminol (Aminophthalhydrazid), 80mM Cumarsäure, 100mMTris/HCl pH8.5 und 6.2µl Wasserstoffperoxid (30%ig) für zwei Minuten inkubiert und mit angepassten Belichtungszeiten auf X-OMAT AR Filme (*Kodak*) entwickelt.

6.2.3 Immunofärbung an GLT-1 exprimierenden HEK293 und C6 Zellen

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen inkubiert. Nach Entfernung des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen für 10 Minuten mit 2% Paraformaldehyd/PBS fixiert und der vorherige Waschschritt wiederholt. Die Immunofärbung erfolgte analog zur Immunofärbung an Paraffinschnitten. Nach erfolgter Färbung wurden die Deckgläschen mit der mit Zellen beschichteten Seite in wenig Fluorescent Mounting Medium (*DakoCytomation*) auf Objektträger übertragen. Anschließend erfolgte die mikroskopische Untersuchung. Dazu wurde ein mit einem für die sekundär gekoppelten Antikörper mit entsprechenden Filtern ausgestattetes Fluoreszenzmikroskop der Firma *Zeiss* verwendet.

6.2.4 Immunofärbung an Paraffinschnitten

Für die Paraffinschnitte wurde die Mäuse anästhesiert und mit 4% Paraformaldehyd in PBS über den linken Herzventrikel perfundiert.

Die Organe wurden vollautomatisch mit einem Citadell 1000 in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Mikrotom (Vogel, AS300) angefertigt. Die Schnitte wurden 2x5 min in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert.

Die auf die Objektträger aufgezogenen Paraffinschnitte wurden mit PBS gewaschen, für 15 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und in PBS/0.5% Triton-X-100 inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 3%-igem BSA/0.1% Triton-X-100 in PBS 1 Stunde blockiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit den in PBS/3% BSA/0.1% Triton-X-100 versetzten primären Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgten die folgenden Schritte im Dunkeln. Inkubation (2 Stunden) mit dem entsprechenden sekundären Antikörpern in PBS/3% BSA/0.1% Triton-X-100 und zweimaliges Waschen mit PBS/0.5% Triton-X-100 und PBS. Anschließend wurden die Schnitte in Fluorescent Mounting Medium (*DakoCytomation*) eingedeckelt und mit einem *Zeiss* Axioscope-Fluoreszenzmikroskop analysiert.

6.2.5 Karyotypenbestimmung

Die Karyotypenbestimmung von ES-Zellen (V.8.1 und Bruce) erfolgte nach dreimaliger Passage auf Gelatine beschichteten 90er Kulturschalen.

Die Synchronisierung des Zellzyklus wurde durch Zugabe von 33 µl Cholchicinlösung (Democoline solution, *Sigma*) zu 5 ml Medium und anschließender Inkubation bei 37°C für 50 Minuten erreicht. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und

anschließend mit Trypsin von der Platte abgelöst. Nach mehrfachem Waschen mit PBS und anschließender Präzipitation wurden die Zellen zur Osmolyse in 0.56% KCl-Lösung aufgenommen. Hierbei wurde das Präzipitat vorsichtig abgelöst und 1 ml KCl-Lösung tropfenweise hinzugegeben. Nach Resuspension der Zellen wurden weitere 3 ml KCl-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in der Restflüssigkeit vorsichtig resuspendiert und dreimal mit je 2 ml eiskalter frisch angesetzter Fixierlösung (Methanol/Eisessig (3:1)) durch tropfenweise Zugabe versetzt und anschließend bei 500g präzipitiert. Danach wurde das Präzipitat in 0.5-1 ml Fixierlösung aufgenommen und mit einer Pasteurpipette aus mindestens 30 cm Höhe auf einen sauberen Objektträger getropft. Nach dem Eintrocknen wurden die Objektträger in Giemsa Färbelösung (Giemsa stain, *Sigma*) gefärbt, anschließend mit H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Nach dem Eindeckeln (Entellan, *Merck*) wurden die Chromosomensätze der Zellen untersucht. Pro Zellklon wurden je 30 Chromosomensätze ausgezählt und statistisch gemittelt.

6.2.6 Alkalische Phosphatase Färbung

Zur Prüfung des Differenzierungszustandes wurden mitotisch inaktive Fibroblasten mit homolog rekombiniertem Glutamatttransporter ES-Zellklonen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen untersucht. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit Aceton/Methanol (1:1) fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurde 33 µl einer NBT (Nitroblautetrazolin) Stocklösung (100 mg NBT in 2 ml 70% Dimethylformamid (DMF)) in Kombination 17 µl BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate) Stocklösung (100 mg in 2 ml 100% DMF) als Substrat in 5 ml alkalischem Phosphatasepuffer (100 mM Tris/HCl pH9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Färbung wurden die Deckgläschen mit Entellan (*Merck*) eingedeckelt und unter einem Zeiss Mikroskop ausgewertet.

6.3 Zellbiologische Methoden

6.3.1 Kultur embryonaler Stammzellen

Das Wachstum der ES-Zellen erfolgte auf mitotisch teilungsinaktiven embryonalen Fibroblastenzellen aus 13-14 Tage alten Mäusen (MTK NEO3) in Kulturschalen unter Zugabe von LIF (Leukozyten-inhibierender-Faktor; ESGROTM, *Life Technologies*) zum Medium.

Für die hier beschriebene Elektroporation wurden embryonale Stammzellen der Zelllinie R1, HM1, V.8.1, V.6.5 und Bruce verwendet. Das ES-Zellmedium setzt sich aus Dulbecco's modified essential medium (DMEM), 15% FBS (Fötale Kälberserum, *Life Technologies*), Penicillin/Streptavidin, 0.03% Glutamin, 1250U LIF, 1mM Na-Pyruvat, 1% 100x MEM-non essential amino acids und 1 mM 2-Mercaptoethanol zusammen. Das Einfriermedium enthielt zusätzlich 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 4.8% CO₂. Das Medium wurde in 24 h Intervallen erneuert. Die Zellen wurden regelmäßig nach zwei bis drei Tagen durch Ablösen mittels 0.05% Trypsin (*Life Technologies*) passagiert.

6.3.2 Elektroporation embryonaler Stammzellen

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte mittels Elektroporation nach den Protokollen von Mansouri und Stewart. 20-30 µg des linearisierten, gereinigten *targeting* DNA-Konstruktes wurden in 800 µl Zellsuspension mit 10⁷ Zellen/ml PBS in einer Elektroporationsküvette (0.4 cm, Bio-RAD) gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension einem 8-10 ms dauerndem Strompuls von 500µF, 230V bei Raumtemperatur ausgesetzt (GenePulser, Bio-RAD). Nach weiteren 5 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen auf vier 90 mm Kulturschalen verteilt. Eine weitere Kulturschale mit 160 µl wt ES-Zellsuspension, die nicht elektroporiert wurden, diente der Kontrolle und wurde ebenfalls auf eine 90 mm Kulturschale verteilt. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde das ES-Zell-Medium gewechselt.

Die Kontrollschale mit den nicht elektroporierten Zellen und eine Schale mit elektroporierten Zellen erhielten R1 ES-Medium, das mit 250 µg/ml G418 (Genecitin (G-418 Sulfat), *Sigma*) und die mit dem GLT-BS *targeting* Konstrukt elektroporierten Zellen wurden zusätzlich zur Negativ-Selektion 2 µM GanC ausgesetzt. Nach 9 bis 13 Tagen wurden die selektionsresistenten Klonen makroskopisch sichtbar.

6.3.3 Isolation selektionierter ES-Zellklone

Von den selektionierten 90er Kulturschalen wurden Klone unter PBS mit einer sterilen Pipettenspitze einzeln abgelöst und für 5 Minuten in Trypsin auf einer 96-Loch-Platte vereinzelt. Die vereinzelt Klone wurden auf 96-Loch-Platten mit embryonalen Fibroblasten mit Kulturmedium überführt und nach 2-3 Tagen 50% auf eine mit Gelatine beschichteten 96-Loch-Platte verteilt. Die Zellen auf den gelatinebeschichteten Platten dienten der DNA-Präparation während die restlichen Zellen zur Kryokonservierung eingesetzt wurden.

6.3.4 Einfrieren und Auftauen positiver ES-Zellklone

Die ES-Zellen in 96er Loch-Kulturschalen wurden bei -70°C nach Chan und Evans (1991) eingefroren.

Für die Zellpropagation wurden sie 10-15 min bei 37°C aufgetaut, der gewünschte Klon in ein mit 1 ml ES-Zell Medium vorgelegtes Eppendorfgesäß pipettiert, abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in 100 μl ES-Zell Medium aufgenommen und in eine 96er Lochplatte mit Feederzellen überführt.

6.3.5 Transiente *Cre*- bzw. *FRT*-Expression

Die *Cre*- bzw. *FRT*-Rekombinase kodierenden Vektoren pBS185 (CMV-*Cre*), pGKCrebpA bzw. pGKFRTbpA wurden für die transiente Expression in homolog mit dem Glutamattransporter targeting Konstrukt rekombinierten ES-Zellen eingesetzt. Hierzu wurde eine ES-Zell-Suspension einer 90er Kulturschale mit 10 μg nicht linearisierter Vektoren bei einem 8-10 ms dauernden Strompuls von 500 μF und 230V bei Raumtemperatur elektroporiert (GenePulser, Bio-RAD). Nach dieser Elektroporation war keine Anreicherung unter Selektionsbedingungen möglich, da die Exzision des Selektionsmarkers das Ziel der Elektroporation darstellte. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Teil der Zellen in einer 96-Loch-Platte mit G418 versetztem ES-Zell Medium kultiviert. Zellklone, die der Selektion zum Opfer fielen, waren rekombiniert. Nachweise für das Ereignis der Rekombination durch die *Cre*- bzw. *FRT*-Rekombinase wurden mittels *Southern blot* und PCR durchgeführt.

6.3.6 Expression in HEK293- und C6-Zellen

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

Die Kultivierung der C6-Zellen erfolgte in Ham's F10, 15% Pferdeserum und 2.5% FBS (Benda *et al.*, 1968, Esteve *et al.*, 2002). Das Einbringen linearisierter Fremd-DNA erfolgte mit LipofectamineTM 2000 (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben. Bei dieser Form der Lipofektion findet eine Komplexierung der DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel statt, die leicht mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zelle einbringen.

6.3.7 Isolierung glialer Primärkulturen

Für die Präparation glialer Primärkulturen wurde das Gehirn neugeborener bzw. ein Tag alter Mäuse unter sterilen Bedingungen präpariert. Das Gehirn wurde in ein mit 500 µl SBM-Medium (DMEM und Ham's F12 1:1, 10% fötales Kälberserum, Penicillin/Streptavidin und 0.03% Natriumpyruvat) vorgelegtes Eppendorfgefäß überführt. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Die Zellen wurden durch ein 45 µm Filter separiert und 10x10⁶ Zellen auf eine mit Poly-L-Lysin beschichteten 90er Kulturschale gegeben. Das Medium wurde am darauf folgendem Tag und anschließend alle zwei Tage gewechselt.

6.4 Methoden zur Erzeugung transgener Mäuse

Alle hier nicht aufgeführten Methoden wurden nach Hogan *et al.* (1986) durchgeführt.

6.4.1 Mäusezucht

Die Mausstämme wurden bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 5.00-19.00 Uhr (Beleuchtung) und 19.00-5.00 Uhr (Dunkelheit) gehalten.

6.4.2 Blastozystenspender

Als Blastozystenspender wurden 5-7 Wochen alten C57Bl/6- bzw. B6D2F1 Weibchen (Charles River) verwendet, die zwei Tage vor der Verpaarung mit 5 U Gonadotropin (*Sigma*) und 48 h später mit 5 U humanem Chorion-Gonadotropin (*Sigma*) intraperitoneal zur Induktion einer Superovulation stimuliert wurden. 12 bis 18 h nach Verpaarung wurden die Weibchen nach Vaginalplugs selektioniert.

6.4.3 Blastozysteninjektion

Die Blastozysten wurden, wie bei Hogan *et al.* (1986) beschrieben, durch Ausblasen des Uterus von 3,5 Tage schwangeren Weibchen isoliert und vor der Injektion eine Stunde in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Mikrokapillaren wurden im Mikromanipulator (Leitz) fixiert, die Haltekapillare mit einem mit Luft gefüllten, die Injektionskapillare mit einem ölfülltem hydraulischen System verbunden. Die Injektion erfolgte in DFH-Medium (DEMEM, 10% FCS, HEPES), wobei jeweils eine Blastozyste mit der Haltekapillare fixiert wurde und mit der Injektionskapillare etwa 20 ausgesuchte ES-Zellen auf die innere Zellmasse (ICM) der Blastozyste abgelegt wurden. Erfolgreich injizierte Blastozysten wurden mindestens 1 h in M16-Medium (6xEarle, 0.1M Pyruvat, 100x P/S, 37.5xNaHCO₃, 100mg BSA) bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, bevor sie in scheinchwangere *foster*-Mütter reinplaniert wurden.

6.4.4 Vasektomierte Männchen

Mindestens zwei Monate alte, zuvor nicht verpaarte CD1-Männchen wurden, wie in Hogan *et al.* 1986 beschrieben, vasektomiert und nach einer Ruhephase von etwa 14 Tagen zur Verpaarung eingesetzt.

6.4.5 Reimplantation von Blastozysten in scheinchwangere foster-Mütter

24 h nach Verpaarung der Blastozystenspender wurden CD1-Weibchen mit vasktomierten Männchen zum Erhalt scheinchwangerer Leihmütter verpaart. Der Transfer der Blastozysten im 3.5 Stadium zurück in den Uterus erfolgte in Weibchen am Tage 2.5 p.c., um den Blastozysten die Möglichkeit zu geben, in der Entwicklung aufzuholen.

Der Transfer von je fünf bis zehn injizierten Blastozysten erfolgte in M16-Medium in ein Uterushorn einer scheinchwangeren Leihmutter.

6.4.6 Mikroinjektion

Die für die Mikroinjektion eingesetzte DNA wurde nach Herstellerangaben über eine Micrcon-Säule YM30 (Amicon) aufgereinigt.

Die DNA-Mikroinjektion in den männlichen Vorkern von befruchteten Eizellen, wurde wie in der Literatur nach Hogan *et al.* (1986) durchgeführt. Als Oozytenspender dienten superovulierte Weibchen die 2 Tage vor der Verpaarung mit 5 U Gonadotropin und nach 46-48 Stunden mit 5 U humanem Choro-Gonadotropin stimuliert und direkt verpaart wurden. Die Eier wurden aus der Ampulle des Eileiters "geplugte" Weibchen präpariert und in M16-Medium bis zur Injektion im Brutschrank (37°C, 4.8% CO₂) aufbewahrt. Die Injektion erfolgte in M2-Medium (Sigma) an einem Manipulatorstand (Leitz TypM) mit einem Mikroinjektor (Eppendorf Typ 5242, Kompressor Jun-Air Modell 6). Die injizierten Eier oder Zweizellstadien-Embryonen injizierter Blastozysten nach über Nacht Kultivierung im Brutschrank unter dem Mikroskop (Wild/Heerbur) wurden in das Infundibulum einer scheinchwangeren Maus implantiert.

6.4.7 Doxyzyklin Applikation

Die eingesetzte Doxyzyklin Konzentration des in C6 Ratten Gliomazellen transfizierten Tetrazyklin induzierbaren Systems lag zwischen 0.5 µg/µl und 5µg/µl. Die Zellen wurden nach 24 bzw. 48 Stunden analysiert (Urlinger et al., 2000; Kim et al., 2001).

Transgene Mäuse, die das Konstrukt der induzierbaren Cre-Rekombinase (*TetOn* System) unter der Kontrolle des gfap-Promoters exprimieren, wurden über eine Dauer von zehn Tagen täglich intraperitoneal 1.5 mg einer Doxyzyklinlösung verabreicht (Zhu et al., 2007).

Alternativ wurden 10 µl einer 0.5 mg/µl Doxyzyklinlösung in 30%iger Succrose oral über eine Dauer von 10-14 Tage appliziert.

7 Materialien

7.1 Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet:

CRE-NLS pCDNA3.1 (Uschkureit, 2000)

pBluescript II SK (+) (GenBank 52328)

pBS185 (*Gibco life Technologies*)

pBS246 (*Gibco life Technologies*)

pCDNA3 (*Invitrogen*)

pCR2.1 (*Invitrogen*)

pEGFP-C1 (*Clontech*)

pGEM30 (Gu *et al.*, 1993)

pIRES2-EGFP (*Clontech*)

pPGK-CrebpA (Rajewski, Universität zu Köln, unveröffentlicht)

pPGK-Flp (Stewart, EMBL, unveröffentlicht)

pSP73 (*Promega*)

pUHD 10-3 (Bujard, ZMBH, unveröffentlicht)

pUHG 17-1 (Gossen *et al.*, 1995)

pUHrt62-1 (Bujard, ZMBH, unveröffentlicht)

Rapidflirt (Wunderlich, Universität zu Köln, unveröffentlicht)

TW18 (Wunderlich, Universität zu Köln, unveröffentlicht)

7.2 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma *Metabion International AG* synthetisiert.

Konditionelles GLT-1 Konstrukt

Erstellung des konditionellen Konstrukts GLT-BS mit den Primern:

5' Exon V Sall GGT CGA CAG AGC GCA GCT CAA GTA GTC ACT

3' Exon V Sall TTG TCG ACC AGA GCT CAC TGC ATG TGC TAG

Erstellung des konditionellen Konstrukts GLT-RF mit den Primern:

GLT1 int1-int2s BamHI GCA AGG GAA TGA CTC CTG GGA TCC CCG ACT

GLT1 int1-int2as BamHI GGCAGC TGA GAT GCT ACA GGG GAT CCA GGG

GLT1 int2-int4s Sall CCC TGG ACC ACC TGT CGA CTC GCA GCT GCC

GLT1 int2-int4as Sall AGG TCA TTT AAA AAC ACT CGT CGA CAG GCC
 GLT1 int4-int5s XhoI, XbaI AAC TCG AGG GGC TCT AGA GGA GTG TTT TTA
 AAT GAC CT
 GLT1 int4-in5as XhoI ACA AGC CTC GAG CTT CTG CAA AGA GAC AGC

Externe Sonde

Sonde 5' SspI BamHI AAG GAT CCT ATG TAG GAT GTG ATC AGC AGC
 Sonde 3' XbaI BamHI GGA TCC ATT AAG ACT CTG GAA AGA CTA GTC

Nachweis der homologen Rekombination mit den Primern:

mgl1 intron1 ext S CAC ACC CCA GCC CCT TGT TAT TAA GAG AAT
 Glt-1 ex IIIas GCC CGC CAC ACA CTG CTC CCA GGA TGA CAC
 Neo5' Flirt as CGC ATG CTC CAG ACT GCC TTG GGA AAA

Nachweis der transienten Cre- und Flipase-Expression (GLT-RF):

mgl1 intron1 ext S CAC ACC CCA GCC CCT TGT TAT TAA GAG AAT
 Neo5' Flirt as CGC ATG CTC CAG ACT GCC TTG GGA AAA
 flt1-rf as AAT AGG AAC TTC GGA ATA GGA ACT TCG TCG
 mgl1 EV as TTT CAT TCA ACA TGG AGG TAC CGC CTT GGT

Induzierbare Cre-Rekombinase

GFAP-Promoter für das *TetOn* System:

GFAPs (EcoRV) CTC ACC TTG GCA TAG ATA TCA TGG TCA GGG
 GFAPas (EcoRV) ATT GGA TAT CCT GAG GGG GTG GAG CTG

GFAP-Promoter für das ERT System:

ERT2-GFAP-s (SgrAI) CAC CGG CGC TGT GCT CCA GGC CTC CTT CGA TG
 ERT2-GFAP-as (PacI) TTA ATT AAC TCC TCT CAC CCC ACT GAG CTC AC

Bestimmung der vollständigen Rekombination der Ind. Cre (*TetOn* System):

Cres CCG CGG CCG CGT CGA CCA TGG CCA ATT TAC TGA CCG TA
 Creas CTA GGG CCC CT ACT AGT ATC GCC ATC TTC CAC CAG GCG
 GFAP3's AAA GCC TTG ACT CTG GGT ACA GTG ACC TCA
 rtTA2 3'as ATC CTT ACT TAG TTA CCC GGG GAG CTA GTC

RT-EGFPs TCA CCT ACC CCG TGC AGT CCT TCA GC
RT-EGFPas ATC CCG AGA GTG ATC CCG GCG GC
ERT2-GFAP-s CAC CGG CGC TGT GCT CCA GGC CTC CTT CGA TG
ERT2-GFAP-as TTA ATT AAC TCC TCT CAC CCC ACT GAG CTC AC

Kopienzahlbestimmung

wt-Fragment:

RT-GFAP Proms CTC CCT CAC TAT GCC ATT ATT CAG GAT TGG
RT-GFAP Promas (0.8) CAT GCT GGA GTC TTT CTT TCT GTA ACA GGG

transgenes Fragment:

GFAP3's AAA GCC TTG ACT CTG GGT ACA GTG ACC TCA
rtTA2 3'as ATC CTT ACT TAG TTA CCC GGG GAG CTA GTC

Rekombiniertes GLT-1

Rekombiniertes GLT-1 für die Zelltransfektion:

5'GLT1 rek NheI GCT AGC ATG GCA TCA ACA GAG GGT GCC
3'GLT1 rek BamHI GGA TCC TTG GCT GAG AAT CGG GTC ATT ATT

Nachweis des Fusionskonstruktes:

EGFP 3'sense ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG AAC GCC GCC

EAAC-/-

Aufrechterhaltung der Zucht:

EAACs (PP) CCG CCA CGC AAA ACC ACC GTG CTC GGT CCC
EAACas (PP) CTA GTA CCA CGGCGGCCA CGG TTG AGA GCA

Primer für RT-PCR:

HGPRTs GCT GAC CTG CTG GAT TAC ATT AAA GCA CTG
HGPRTas ATT CCT GAA GCT CTC ATT ATA GTC AAG GGC
glt1 Exon IIIs TCC CGG GGG TAC CAT ACT CAT GAG GAT GCT
glt1 Exon Vas TTT CAT TCA ACA TGG AGG TACCGC CTT GGT
GLASTs RT ATG ACC AAAAGC AAC GGA GAA GAG CCT AGG
GLASTas RT AAG CAG GCT TCT ACC AGA TTG GGA GGG AAC
EAACs RT CTT CCT ACG GAA TCA CTG GCT GCT GCT TCT
EAACas RT AAC ATG GCA TCC ATG GTG CTG ACT TCA GGG

mGluR8s	CCA CCT TTG TGA TTG TGA CCT TTG TCC GCT
mGluR8as	ATC ACC AGCTGG GAT GCT GGG CTG ATG
AMPA4s	CTA CAT GCG ATC GGC AGA GCC ATC TGT G
AMPA4as	AAT GTA GAA GAC GCC TGC TAC GTT GCT CAG
NMDA2As	CCG TCA TCT TCC TTG CAA GTT ACA CAG CCA A
NMDA2Aas	TGA GCC CTT CTG CAG AGC AAT TCC ATA GCC
Kainat4s	CTT CCT GAC TGT GCA GCG CAT GGA
Kainat4as	GCC CCC AAT CTG AGT GAG GTT GCA GT

7.3 Antikörper

1. Antikörper

Anti-Glt	1:200	polyklonaler Antikörper gegen 17-32 AS (Danbolt <i>et al.</i> , 1990)
Anti-EAAT2	1:200	polyklonaler Antikörper gegen 1-85 AS des hEAAT2 aus dem Kaninchen (<i>Santa Cruz Biotechnology, INC.</i>)
Anti-Glast	1:1000	anti-AS12 polyklonal gegen N-terminales Peptid aus dem Kaninchen (Schröder, 1998)
Anti-cEAAC1	1:1000	(Rothstein <i>et al.</i> , 1994)
Anti-Gfap	1:800	aus der Maus isoliert <i>Dianova</i> (Osborne <i>et al.</i> , 1985)

2. Antikörper

Anti-rabbit IgG Cy3	1:800	<i>Jackson</i>
Anti-mouse IgG FITC	1:500	<i>Sigma</i>
Anti-rabbit IgG Peroxidase	1:12000	<i>Sigma</i>

8 Literaturverzeichnis

- Abel, T. and Lattal, K.M. (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 180-187.
- Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R. and Bourchouladze, R. (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**: 615-626.
- Aitken P.G, Breese, G.R., Dudek, F.F., Edwards, F., Espanol, M.T., Larkman, P.M., Lipton, P., Newman, G.C., Nowak, T.S.Jr., Panizzon, K.L., Raley-Susman, K.M., Reid, K.H., Rice, M.E., Sarvey, J.M., Schoepp, D.D., Segal, C.P., Taylor, C.P., Teyler, T.J. and Voulalas, P.J. (1995) Preparative methods for brain slices: a discussion. *J Neurosci Meth* **59**: 139-149.
- Albasanz, J. L., Ros, M. and Martin, M. (1997) Characterization of metabotropic glutamate receptors in rat C6 glioma cell. *Eur J Pharmacol* **326** : 85-91.
- Andiamampandry, C., Siffert, J.-C., Schmitt, M., Garnier, J.-M., Staub, A., Muller, C., Gobaille, S., Mark, J. and Maitre, M. (1998) Cloning of a rat brain succinic semialdehyde reductase involved in the synthesis of the neuromodulator γ -hydroxybutyrate. *Biochem J* **334**: 43-50.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. and Nicotera, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis and apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**: 961-973.
- Aoki, M., Lin, C.L., Rothstein, J.D., Geller, B.A., Holster, B.A., Munsat, T.L., Horvitz, H.R. and Brown, R.H. Jr. (1998) Mutations in the glutamate transporter EAAT2 gene do not cause abnormal EAAT2 transcripts in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **43**: 645-652.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kananaugh, M.P and Amara, S.G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chlorid conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4155-416.
- Arriza, J.L., Fairman W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh M.P. and Amara, S.G. (1994) Functional comparison of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* **14**: 5559-5569.
- Arriza, J.L., Kavanaugh M.P., Fairman W.A., Wu, Y.N., Murdoch, G.H., North, R.A. and Amara, S.G. (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* **268**: 15329-15332.
- Ascher, P. and Nowak, L. (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate response of mouse central neurones in culture. *J Physiol* **399**: 247-266.
- Atchison, M. L. (1988) Enhancers: mechanisms of action and cell specificity. *Annu Rev Cell Biol* **4**: 127-153.
- Baim, S.B., Labow, M.A., Levine, A.J. and Shenk, T.A. (1991) Chimeric mammalian transactivator based on the lac repressor that is regulated by temperature and isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5072-5076.
- Banker, G.A. (1980) Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* **209**: 809-810.
- Barbour, B., Szatkowski, M., Ingledew, N. and Attwell, D. (1989) Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature* **342**: 918-920.
- Barnes, C.A., Jung, M.W., McNaughton, B.L., Korol, D.L., Andreasson, K. and Worley, P.F. (1994) LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels. *J Neurosci* **14**: 5793-5806.

- Baron, U. and Bujard, H. (2000) Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol* **327**: 401-421.
- Baron, U., Gossen, M. and Bujard, H. (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* **25**: 2723-2729.
- Bashir, Z.I., Bortolotto, Z.A., Davies, C.H., Berretta, N., Irving, A.J., Seal, A.J., Henley, J.M., Jane, D.E., Watkins, J.C. and Collingridge, G.L. (1993) Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* **363**: 347-350.
- Beal, M.F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* **38**: 357-366.
- Beal, M.F. (1992) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness? *Ann Neurol* **31**: 119-130.
- Beck-Sickinger, A.G. (1996) Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* **1**: 502-513.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**: 370-371.
- Berger, U.V and Hediger, M.A. (2006) Distribution of the glutamate transporters GLT-1 (SLC1A2) and GLAST (SLC1A3) in peripheral organs. *Anat Embryol* **211**: 595-606.
- Berger, U.V and Hediger, M.A. (1998) Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridisation. *Anat Embryol (Berl)* **198**: 13-30.
- Bird, A.P. (1986) CpG rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-213.
- Birnboim, H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of Plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**: 243-255.
- Bischofberger, J. and Schild, D. (1996) Glutamate and N-acetyl-aspartyl-glutamate block HVA calcium currents in frog olfactory bulb neurones via an mGluR2/3-like receptor. *J Neurophysiol* **76**: 2089-2092.
- Blanton, M.G., Lo, T.J., Kriegstein, A.R. (1989) Whole cell recording from neurons in slices of retilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Meth* **30**: 203-210.
- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**: 31-39.
- Bliss, T.V. and Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**: 331-356.
- Boison, D. (1994) Funktionelle Analyse der Proteolipidproteine PLP und DM20 im transgenen Mausmodell. Dissertation, Universität zu Köln.
- Borden L.A., Murali-Dhar, T.G., Smith, K.E., Weinshank, R.L., Branchek, T.A. and Gluchowski, C. (1995) Tiagabine, SKF89976-A, CI-966, and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT. *Eur J Pharmacol* **269**: 219-224.
- Boudker, O., Ryan, M.R., Yernool, D., Shimamoto, K. and Gouaux, E. (2007) Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* **445**: 387-393.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H. and Robertson, E. (1984) Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**: 255-256.
- Branda, C.S. and Dymecki, S.M. (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* **6**: 7-28.

- Brenner, M., Kisseberth, W.C., Su, Y., Besnard, F. and Messing, A. (1994) GFAP Promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* **14**: 1030-1037.
- Bresnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H.J. and Frese, E. (1991) Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J Biol Chem* **266**: 18877-188883.
- Brocke, L., Bendahan, A., Grunewald, M. and Kanner, B.I. (2002) Proximity of two oppositely orientated reentrant loops in the glutamate transporter GLT-1 identified by paired cysteine mutagenesis. *J Biol Chem* **277**: 3985-3992.
- Brown, T.M. and Zander, A.M. (1990) Hippocampus. The synaptic organisation of the brain. Oxford. University press. New York.
- Buchholz, F., Angrand P.-O. and Steward A. F. (1996) A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP Recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* **24**: 3118-3119.
- Bunch, L. (2007) Department of medical chemistry. University of Copenhagen.
- Byravan, S., Foster, L.M., Phan T., Verity A.N. and Campagnoni A.T. (1994) Murine oligodendroglial cells express nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8812-8816.
- Cambell, G.L. and Shank, R.P. (1983) Uptake of glutamate and GABA in synaptosomal enriched cell populations of cerebellum. *Glutamine, Glutamate and GABA in the central nervous system*, Alan R. Liss, Inc., New York, 343-354.
- Capecci, M.R. (1994) Gezielter Austausch von Genen. *Spektrum der Wissenschaft* **5**: 44-52.
- Capecci, M.R. (1989) Alterate the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288-1292.
- Casado, M., Bendahan, A., Zafra, F. et al. (1993) Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J Biol Chem* **268**: 27313-27317.
- Caudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danboldt, N.C. and Storm-Mathisen, J. (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localization revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* **15**: 711-720.
- Chan, S.Y. and Evans, M.J. (1991) In situ freezing and of embryonic stem cells in multiwell plates. *Trends Genet* **7**: 76.
- Chan, P.H. and Fishman, R.A. (1978) Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid induced brain swelling. *J Neurochem* **35**: 1004-1007.
- Changeux J.P. (1993) Chemical signaling in the brain. *Sci Amer* **296**: 30-77.
- Chen, Q., Harris, C., Brown, C.S., Howe, A., Surmeier, D.J. and Reiner, A. (1995) Glutamate-mediated excitotoxic death of cultured striatal neurons is mediated by non-NMDA receptors. *Exp Neurol* **136**: 212-224.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficacy transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**: 1418-1482.
- Chenoud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J.E., Provost, N., Joussemet, B., Bujard, H., Samulski, R.J., Favre, D. and Moullier, P. (2004) Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **9**: 410-418.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., and Kriegstein, A.R. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* **7**: 369-379.
- Clements, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E. and Westenbrook, G.L. (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* **258**: 1498-1501.

- Conradt, M. and Stoffel, W. (1995) Functional analysis of the high affinity, Na⁺-dependent glutamate transporter GLAST-1 by site directed mutagenesis. *J Biol Chem* **270**: 25207-25212.
- Conradt, M., Storck, T. and Stoffel, W. (1995) Localization of N-glycosylation sites and functional role of the carbohydrate units of GLAST-1, a cloned brain L-glutamate/L-aspartate transporter. *J Biochem* **229**: 682-687.
- Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J.D. and Melone, M. (1998) EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* **6**: 108-116.
- Cross, S.H. and Bird, A.P. (1995) CpG island and genes. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 309-314.
- Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**: 1-21.
- Danbolt, N.C., Pines, G. and Kanner B.I. (1990) Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochem* **29**: 6734-6740.
- Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J. and Kanner B.I. (1992) An (Na⁺ - K⁺) coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neurosci* **51**: 295-310.
- Danbolt, N.C. (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol* **44**: 377-396.
- Deitmer J.W. (2001) Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol* **129**: 71-81.
- Dehnes, Y., Chaudhry, F.H., Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J. and Danbolt, N.C. (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci* **18**: 3606-3619.
- Dowd, L. A. and Robinson, M. B. (1996) Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na⁺-dependent L-glutamate transporter activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *J Neurochem* **67**: 508-516.
- Dragoi, G., Harris, K.D and Buzsaki, G. (2003) Place representation within hippocampal networks is modified by long-term potentiation. *Neuron* **39**: 843-853.
- Dunlop, J., Lou, Z., Zhang, Y. and McIlvain, H.B. (1999) Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter. *Br J Pharmacol* **128**: 1485-1490.
- Duvoisin, R.M., Zhang, C. and Ramonell, K. (1995) A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci* **15**: 3075-3082.
- Dymecki, S.M. (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6191-6196.
- Dykens, J.A. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *J Neurochem* **63**: 584-591.
- Dykens J.A., Stern, A. and Trenkner, E. (1987) Mechanism of kainate toxicity to cerebellar Neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J Neurochem* **49**: 1222-1228.
- Erecinska, M and Silver, I.A. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* **35**: 245-296.
- Eskandari, S., Kreman, M., Kavanaugh, M.P., Wright, E.M. and Zampighi, G.A. (2000) Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8641-8646.

- Estève, P.O., Chicoine, E., Robledo, O., Aoudjit, F., Descoteaux, A., Potworowski, E.F. and St-Pierre, Y. (2002) Protein Kinase C- ζ regulates transcription of the matrix Metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 in TNF- α in glioma cell via NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **277**: 35150-35155.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (2000) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**: 599-603.
- Felsenfeld, G. and Groundine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448-453.
- Figiel, M., and Engele, J. (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci* **20**: 3596-3605.
- Fine, E.J., Ionita, C.C. and Lohr, L. (2002) The history of the development of the cerebellar examination. *Semin Neurol* **22**: 275-284.
- Fletcher, C. F., Lutz, C.M., O'Sullivan, T.N., Shaughnessy, J.D.Jr., Hawkes, R., Frankel, W.N. Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (1996) *Cell* **87**: 607-717.
- Frey, U., Huang, Y.Y. and Kandel, E.R. (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* **260**: 1661-1664.
- Fonnum, F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* **42**: 1-11.
- Frandsen, A. and Schusboe, A. (1992) Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the excitotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionate and kainate in cultured cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2590-2594.
- Furness, D.N., Hulme, J.A. Lawton, D.M. and Hackney, C.M. (2002) Distribution of the glutamate/aspartate transporter GLAST in relation to the afferent synapses of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *J Neurosci* **9**: 234-237.
- Furness, D.N. and Lehre, K.P. (1997) Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea. *Eur J Neurosci* **9**: 1961-1969.
- Gamboa, C. and Ortega, A. (2002) Insulin-like growth factor-1 increases activity and surface levels of the GLAST subtype of glutamate transporter. *Neurochem Int* **40**: 397-403.
- Gearing, D.P., Gough, N.M., King, J.A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Simpson, R.J., Nice, E.C., Kelso, A. and Metcalf, D. (1987) Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). *EMBO*, **6**: 3995-4002.
- Gegelashvili, G., Dehnes, Y., Danbolt, N.C. and Schousboe, A. (2000) The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int* **37**: 163-170.
- Gegelashvili, G., Danbolt, N.C. and Schousboe, A. (1997) Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem* **69**: 2612-2615.
- Gegelashvili, G., Civenni, G., Racagni, G., Danbolt, N.C., Schousboe, I. and Schousboe, A. (1996) Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* **8**: 261-265.
- Geiling, H. and Schild, D. (1996) Glutamate-mediated release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 108-110.
- Grafstrom, R.H., Yuan, R. and Hamilton, D.L. (1985) The characteristics of DNA methylation in an in vitro DNA-synthesizing system from the mouse fibroblasts. *Nucleic Acid Res* **13**: 2827-2842.
- Green, M.C. and Sidman, L.R. (1962) Tottering: a neuromuscular mutation in the mouse and its linkage with oligosyndactyly. *J Hered* **53**: 233-237.

- Grewal, S. I. S. and Moazed, D. (2003) Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression. *Science* **301**: 798-802.
- Giaume C. and Venance L. (1995) Gap junctions in brain glial cells and development. *Perspect Dev Neurobiol* **2**: 335-345.
- Glicstein, M. (2007) What does cerebellum really do? *Curr Biol* **17**: R824-827.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** : 1766-1769
- Gossen, M. and Bujard, H. (1993) Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* **21**: 4411-4412.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5547-5551.
- Gruart, A., Munoz, M.D. and Delgado-Garcia, J.M. (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* **26**: 1077-1087.
- Grunewald, M and Kanner, B. (1995) Conformational changes monitored on the glutamate transporter GLT-1 indicate the existence of two neurotransmitter-bound states. *J Biol Chem* **270**: 17017-17024.
- Grunewald, M and Kanner, B.I. (2000) The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain is restricted by its substrate. *J Biol Chem* **275**: 9684-9689.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H. and Rajewsky, K. (1994) Deletion of a DNA-polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**: 103-106.
- Gu, H., Zou, Y.-R. and Rajewsky, K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**: 1155-1164
- Günter, R.H. (2007) Der Glutamatransporter GLT-1 des zentralen Nervensystems. Zellbiologische und elektrophysiologische Untersuchungen. Dissertation. Universität zu Köln.
- Hartell, N.A. (1994) Induction of cerebellar long-term depression requires activation of glutamate metabotropic receptors. *Neuroreport* **5**: 913-916.
- Hakuba, N., Koga, K., Gyo, K., Usami, S. and Tanaka, K. (2000) Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci* **20**: 8750-8753.
- Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K. and Tanaka, K. (1998) Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4663-4666.
- Hasty P., Rivera-Perez, J. and Bradley, A. (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **11**: 5586-5591.
- Haugeto, O., Ullensvang, K., Levy, L.M., Chaudhry, F.A., Honore, T., Nielsen, M., Lehre, K.P. and Danbolt, N.C. (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* **271**: 27715-27722.
- Hayes, D., Wiesner, M., Rauen, T and McBean, G.J. (2005) Transport of L-[14C]cystine and L-[14C]cysteine by subtypes of high affinity glutamate transporter over-expressed in HEK cells. *Neurochem Int* **46**: 585-594.
- Hémart, N., Daniel, H., Jaillard, D. and Crépel, F. (1995) Receptors and second messengers involved in long-term depression in rat cerebellar slices in vitro: a reappraisal. *Eur J Neurosci* **7**: 45-53.
- Hodgkin, A.L. (1976) Chance and design in electrophysiology : an informal account of certain experiments on nerves carried out between 1934 and 1952. *J Physiol* **263**: 1-21.

- Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E. (1986) *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. New York.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Howell, J.A., Matthews, A.D., Swanson, K.C., Harmon, D.L. and Matthews, J.C. (2001) Molecular identification of high-affinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney and pancreas. *J Anim Sci* **79**:1329-1336 .
- Huang, Y.Y. und Kandel, E.R. (1994) Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem* **1**: 74-82.
- Impey, S., Mark, M., Villacres, E.C., Poser, S., Chavkin, C. and Storm, D.R. (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**: 937-982.
- Ito, I. and Sugiyama, H. (1991) Roles of glutamate receptors in long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuroreport* **2**: 333-336.
- Kanai, Y. and Hediger M.A. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* **447**: 469-479.
- Kanai, Y., Bhide, P.D., DiFigila, M. and Hediger, M.A. (1995) Neuronal high-affinity glutamate transport in the central nervous systems. *Neuroreport* **6**: 2357-2362.
- Kanai, Y., Stelzner, M., Nussberger, S., Khawaja, S., Herbert, S.C., Smith, C.P. and Hediger, M.A. (1994) The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport. *J Biol Chem* **269**: 20599-20606.
- Kanai, Y. and Hediger, M. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**: 467-471.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M. (1991) *Principles of Neural Science*. Elsevier. New York.
- Kaba, H., Hayashi, Y., Higuchi, T and Naanishi, S. (1994) Induction of an olfactory memory by activation of a metabotropic glutamate receptor. *Science* **265**: 262-264.
- Kaufman, R.J., Murtha, P. and Davies, M.V. (1987) Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells. *EMBO* **6**: 187-193.
- Kekuda, R., Prasad, P.D., Fei, Y.J., Torres-Zamorano, V., Sina, S., Yang-Feng, T.L., Leichbach, F.H. and Ganapathy, V. (1996) Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem* **271**: 18657-18661
- Kilby, N.J., Snaith, M.R. and Murray, J.A.H. (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* **9**: 413-421.
- Kim, J.J., Fanselow, M.S., DeCola, J.P. and Landeira-Fernandez, J. (1992) Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by N-methyl-D-aspartate antagonist APV. *Behav Neurosci* **106**: 591-596.
- Kim, J.J., DeCola, J.P., Landeira.Fernandez, J. and Fanselow, M.S. (1991) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behav Neurosci* **105**: 126-133.
- Kim, T.-Y. and Kaelin, G.Jr. (2001) Differential control of transcription by DNA-bound cyclins. *Mol Biol Cell* **12**: 2207-2217.
- Kirschner, M.A., Arriza, J.L., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Magenis, E. and Amara, S.G. (1994) The mouse and human excitatory amino acid transporter gene (EAAT1) maps to chromosome 15 and a region of syntenic homology on human chromosome 5. *Genomics* **22**: 631-633.

- Klockner, U., Storck, T., Conradt, M. and Stoffel, W. (1994) Functional properties and substrate specificity of the cloned L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 from rat brain expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* **14**: 5759-5765.
- Koponen, J.K., Kankkonen, H., Kannasto, J., Wirth, T., Hillen, W., Bujard, H. and Herttuala, S.Y. (2003) Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther* **10**: 459-466.
- Krieg, U.C., Walter, P. und Johnson, A.E. (1986) Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8604-8608.
- Kurzchalia, T.V., Wiedmann, M., Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S., Bielka, H. and Rapoport, T.A. (1986) The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54k polypeptide of the signal recognition particle. *Nature* **320**: 634-636.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lange, K.W., Kornhuber, J. and Riederer, P. (1997) Dopamine/glutamate interactions in Parkinson's disease. *Neurosci Behav Review* **21**: 393-400.
- Lauth, M., Spreafico, F., Dethleffsen, K. and Meyer, M. (2002) Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res* **30**: e115.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathiesen, J. and Danbolt, N.C. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* **15**: 1835-1853.
- Levy L. M., Lehre, K.P., Rolstadt, B. and Danbolt, A. (1993) A monoclonal antibody raised against an (Na⁺ + K⁺) coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Lett* **317**: 79-84.
- Li, H.S., Niedzielski, A.S., Beisel, K.W., Hiel, H., Wenthold, R.J. and Morley (1994) Identification of a glutamate/aspartate transporter in the rat cochlea. *Hear Res* **78**: 235-242.
- Lin, C.L., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L. and Rothstein, J.D. (2001) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **20**: 589-602.
- Lineberg, J. and Ebendal, T. (1999) Use of an internal ribosome entry site for bicistronic expression of Cre recombinase or rtTA transactivator. *Nucleic Acids Res* **27**: 1552-1554.
- Linzer, D. I. H. and Talamantes, F. (1985) Nucleotide sequence of mouse prolactin and growth hormone mRNAs and expression of these mRNAs during pregnancy. *J Biol Chem* **260**: 9574-9579.
- Logie, C. and Steward, F. (1999) Ligand-regulated site specific-recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5940-5944.
- Lucas, D.R. and Newhouse, J.P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layer of the retina. *Arch. Ophthalmol* **58**: 193-201.
- Lynch, G., Kessler, M., Halpain, S. and Baudry, M. (1983) Biochemical effects of high-frequency synaptic activity studied with in vitro-slices. *Fed Proc* **42**: 2886-2890.
- Magin, T. M., McWhir, J. and Melton D.W. (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* **20**: 3795-3798.
- Malenka, R.C., Lancaster, B. and Zucker, R.S. (1992) Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* **9**: 121-128.

- Malinow, R., Schulman, H. and Tsien, R.W. (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **245**: 862-866.
- Manahan-Vaughan, D. (1997) Group 1 and group 2 metabotropic glutamate receptors play differential roles in hippocampal long-term depression and long-term potentiation in freely moving rats. *J Neurosci* **17**: 3303-3311.
- Manev, H., Costa, E., Wroblewski, J.T. and Guidotti, A. (1990) Abusive stimulation of excitatory amino acid receptors: a strategy to limit neurotoxicity. *FASEB J* **4**: 2789-2797.
- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R and Capecchi, M.R. (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selektable genes. *Nature* **336**: 348-352.
- Mansouri, A. Homologous recombination in embryonic stem cells. MPI for Biophysical Chemistry, Dep. Of Molecular Cell Biology, Göttingen, Germany.
- Martinez-Lopez, I., Garcia, C. Barber, T., Vina, R.J. and Miralles, V.J. (1998) The L-glutamate transporters GLAST (EAAT1) and GLT-1 (EAAT2): expression and regulation in rat lactating mammary gland. *Mol Membr Biol* **15**: 237-242.
- Mason, D.J (2004) The role of glutamate transporter in bone cell signalling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **4**: 128-131.
- Mason, D.J., Suva, L.J., Genever, P.G., Patton A.J., Steukle, S., Hillam, R.A. and Skerry, T.M. (1997) Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as olteotropic agents? *Bone* **20**: 199-205.
- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Huttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H. and Steinhäuser, C. (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* **23**: 1750-1758.
- Matthews, J.C., Beveridge, M.J., Malandro, M.S., Rothstein, J.D., Cambell-Thompson, M., Verlander, J.W., Kilberg, M.S. and Novak, D.A. (1998) Activity and protein localization of multiple glutamat transporters in gestation day 14 vs. day 20 rat placenta. *Am J Physiol* **274**: C603-C614.
- McNamara, J.O. and Fridovich, I. (1993) Did radicals strike Lou Gehrig? *Nature* **326**: 20-21.
- Mennerick, S., Dhond, R.P., Benz, A., Xu,W., Rothstein, J.D., Danbolt, N.C., Isenberg, K.E. and Zorumski, C.F. (1998) Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *J Neurosci* **18**: 4490-4499.
- Meinzinger, S. (2004) *Biochemische und molekularbiologische Studien zur Funktionsanalyse der UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase*. Dissertation. Universität zu Köln.
- Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T, Mishina, M., Numa,S. and Sakmann, B. (1986) Patch-clamp measurements on *Xenopus leavis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Arch* **407**: 577-588.
- Metzger, D. and Feil,R. (1999) Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotech* **10**: 470-476.
- Meyer, T., Meyer, B., Sitte, W., Ludolph, A.C, Speer, A. and Küther, G. (1996) The glial glutamate transporter complementary DNA in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **40**: 456-459.
- Michalon, A., Kashibu, K., Baumgärtel, K., Spirig, D.H. and Mansuy, I.M. (2005) Inducible and neuron-specific gene expression in the adult mouse brain with the rTA2S-M2 system. *Genesis* **43**: 205-212.

- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kühn, R. and Götz, M. (2006) Inducible gene deletion in astroglia and radial Glia – A valuable tool for functional and lineare analysis. **54**: 21-34.
- Mori, T., Buffo, A. und Götz, M. (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* **69**: 67-99.
- Muzugichi, H., Xu, Z.-L., Sakurai, F., Mayumi, T. and Hayakawa, T. (2003) Tight positive gegulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. *Hum Gene Ther* **14**: 1265-1267.
- Mugnaini, E. Ed. (1986) Cell junctions of astrocytes, ependyma, and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells. New York, Academic.
- Mukainaka, Y., Tanaka, K., Hagiwara, T. and Wada, K. (1995) Molecular cloning of two gluatamate transporter subtypes from mouse brain. *Biochim Biophys Acta* **1244**: 233-237.
- Munir, M., Correale, D.M. and Robinson, M.B. (2000) Substrate-induced up-regulation of Na(+) dependent glutamate transport acitivity. *Neurochem Int* **37**: 147-162.
- Nagao, S., Kwak, S. and Kanazawa, I. (1997) EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantlty lokalized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neurosci* **78**: 929-933.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J. C. (1993) Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Stem Cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8424-8428.
- Nagy, A. and Rash, J.E. (2000) Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* **32**: 29-44.
- Nagy, J.I., Ionescu, A.V., Lynn, B.D., Rash, J.E. (2003) Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* **44**: 205-218.
- Nakanishi, S. (1995) Second order neurones and receptor mechanisms in visual- and olfactory –information processing. *Trends Neurosci* **18**: 359-364.
- Nakanishi, S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* **13**: 1031-1037.
- Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain fuction. *Science* **258**: 597-603.
- Nakayama, T., Kawakami, H., Tanaka, K. and Nakamura, S. (1996) Expression of three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions an peripheral tissues. *Brain Res Mol* **36**: 189-192.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1992) Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik. *Spektrum der Wissenschaft* **5**: 48-56.
- Nicoll, R.A., Malenka, R.C. and Kauer, J.A. (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **70**: 513-565.
- Nicolls, D. and Attwell, D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 462-468.
- No, D., Yao, T.P. and Evans, R.M. (1996) Ecdosome-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3346-3351.

- Northington, F.J. Trystman, R.J., Koehler, R.C. and Martin, L.J. (1999) GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain. *J Neurobiol* **39**: 515-526.
- Nyce, J., Liu, L., Jones, P.A. (1986) Variable effects of the DNA-synthesis inhibitors upon DNA methylation in mammalian cell. *Nucleic Acid Res* **14**: 4353-4367.
- O’Gormann, S., Fox, D. T. and Wahl, G. M. (1991) Recombinase-activated gene activation and site-specific integration in mammalian cell. *Science* **251**: 1351-1355.
- Olney, J.W. and Shape, L.G. (1969) Glutamate neurotoxicity and Huntingtons’s chorea. *Nature* **271**: 557-559.
- Olney, J.W., Ho, O.L. and Rhee, V. (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulfur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* **14**: 61-70.
- Overstreet, L.S., Pasternak, J.F., Colley, P.A., Slater, N.T. and Trommer, B.L. (1997) Metabotropic glutamate receptor mediated long-term depression in developing hippocampus. *Neuropharmac* **36**: 831-844.
- Palos, T. P., Zheng, S. and Howard, B. D. (1999) Wnt signaling induces GLT-1 expression in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* **73**: 1012-1023.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Fallace, E., Fenton, A.A. and Sacktor, T.C. (2006) Storage of spatial information by maintenance the mechanism of LTP. *Science* **313**: 1141-1144.
- Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D. and Williams R. L. (1990) Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplement with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* **141**: 344-353.
- Peghini, P., Jantzen, J. and Stoffel, W. (1997) Glutamate transporter EAAC-1 deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO* **16**: 3822-3832.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. and Edenhofer, F. (2002) Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: A tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Genetics* **99**: 4489-4494.
- Pfriege F.W. and Bares B.A. (1995) What the fly’s glial tell the fly’s brain? *Cell* **83**: 671-674.
- Pines, G.I., Zhang, Y. and Kanner, B.I. (1992) Counterflow of L-glutamate in plasma membrane vesicles and reconstituted preparation from rat brain. *Nature*, **360**: 464-467.
- Pluta, K., Luce, M.J., Bao, L., Agha-Mohammadi, S. and Reiser, J. (2005) Tight control of a transgenic expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med* **7**: 803-817.
- Pollock, R. (2007) Department of Biology. Occidental College. Los Angeles. <http://faculty.oxy.edu/pollock/>
- Rahic, P. (2001) Neurocreationism- making new cortical maps. *Science* **294**: 1011-1012.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kühn, R., Betz, U.A.K., Müller, W., Roes, J. and Schwenk, F. (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* **98**: 600-603.
- Rash, J. E., Duffy, H.S. Dudek, F.E., Bilhartz, B.L., Whalen, L.R. and Yasumura, T. (1997) Grind-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat entral nervous system, with evidence for a “panglial syncytium” that is not coupled to neurons. *J Comp Neurol* **388**: 265-292.
- Rauen, T., Wiessner, M., Sullivan, R., Lee, A. and Pow, D.V. (2004) A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocaliation of GLT1c in the mammalian retina and brain. *Neurochem Int* **45**: 1095-1106.
- Rauen, T. and Kanner, B.I. (1994) Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett* **169**: 137-140.

- Rauen, T., Jeserich, G., Danboldt, N.C. and Kanner, B.I. (1992) Comparative analysis of sodium-dependent L-glutamate transport of synaptosomal and astroglial membrane vesicles from mouse cortex. *FEBS Lett* **312**: 15-20.
- Redecker, P. and Pabst, H. (2000) Immunohistochemical study of the glutamate transporter proteins GLT-1 and GLAST in rat an gerbil pineal gland. *J Pineal Res* **28**: 179-184.
- Richter, C., Park, J.W. and Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6465-6467.
- Riedel, G. (1996) Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurosci* **19**: 219-224.
- Rhoads, D.E., Ockner, R.K., Peterson, N.A. and Raghupathy, E. (1983) Modulation of membrane transport by free fatty acids: inhibition of synaptosomal sodium-dependent amino acid uptake. *Biochemistry* **22**: 1965-1970.
- Rock, R.B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W.S., Cheeran, M., Lokensgard, J.R. and Peterson, P.K. (2004) Role of Microglia in Central Nervous Infections. *Clin Microbiol Rev* **17**: 942-064.
- Robbins, J. (1993) Gene targeting. The precise manipulation of the mammalian genome. *Circ Res* **73**: 3-9.
- Robertson, E.J. (1991) Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line. *Biol Reprod* **44**: 238-245.
- Rothstein, J.D. (1996) Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci* **3**: 348-359.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, Martin, L.J. and Kuncl, R.W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **38**: 73-84.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N. and Kuncl, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**: 713-725.
- Rothstein, J. D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M. and Kuncl, R.W. (1993) Chronic glutamate uptake inhibition produces a model of slow neurotoxicity. *PNAS* **90**: 6591-6595.
- Rothstein, J.D., Martin, L.J. and Kuncl, R.W. (1992) Decreased brain and spinal cord glutamate transport in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **326**: 1464-1468.
- Sauer, B. and Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5166-5170.
- Schaft, J., Ashery-Padan, R., van Hoeven, F., Gruss, P. and Stewart, A. F. (2001) Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis* **31**: 6-10.
- Schlag, B.D., Vondrasek, J.R., Munir, M., Kalandadze, A., Zelenaiia, O.A., Rothstein, J.D. and Robinson, M.B. (1998) Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP and analogs and neurons. *Mol Pharmacol* **53**: 355-369.
- Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B. and Kugler, P. (1997) Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci* **17**: 1-10.
- Schröder, K. (1998) Funktionelle Analyse des Glutamattransporters GLAST-1 *in vivo*. Anwendung der *gene targeting* Technologie zur Erstellung transgener Mausmodelle. Dissertation. Universität zu Köln.
- Schulte, S. and Stoffel, W. (1995) UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase and glutamate/aspartate transporter. Copurification and characterization of the two glycoproteins. *Eur J Biochem* **233**: 947-935.
- Schultz, K and Stell, W.K. (1996) Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci Lett* **211**: 191-194.

- Scoville, W.B. and Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**: 11-21.
- Seal, R.P., Leighton, B.H. and Amara, S.G. (2000) A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **25**: 695-706.
- Seeburg, P.H. (1993) The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 297-303.
- Seibler, J., Schubeler, D., Fiering, S., Groudine, M. and Bode, J. (1998) DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochem* **37**: 6229-6234.
- Shafqat, S., Tamarappoo, B.K., Kilberg, M.S. Puranam, R.S., McNamara, J.O., Guadano-Ferraz, A. and Fremerey, F-T. Jr (1993) Cloning and expression of a novel Na⁽⁺⁾-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na⁺/glutamate transporters. *J Biol Chem* **268**: 15351-15355.
- Shakyakul, C., Kanai, Y., Lee, W.S., Brown, D., Rothstein, J.D. and Hediger, M.A. (1997) Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *Am J Physiol* **273**: F1023-F1029.
- Shaw, P.J. (1994) Excitotoxicity and motor neuron disease: a review of the evidence. *J Neurol Sci* **124**: 6-13.
- Sheng, M., McFadden, G. and Greenberg, M.E. (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* **4**: 571-582.
- Shimizu, E., Tang, Y.P., Rampon, C. and Tsien, J.Z. (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* **290**: 1170-1174.
- Simon, S.M. and Blobel, G. (1991) A protein-conduction channel in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **65**: 371-380.
- Sims, K.D., Straff, D.J. and Robinson, M.B. (2000) Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **275**: 5228-5237.
- Sladeczek, F., Récasens, M. and Bockaert, J.(1988) A new mechanism for glutamate receptor action: phosphoinositide hydrolysis. *Trends Neurosci* **11**: 545-549.
- Slotboom, D.J., Konigs, W.N. and Lolkema, J.S. (1999) Structural features of the glutamate transporter family. *MMBR* **63**: 293-307.
- Smart, S.L., Lopantsev, V., Zhang, C.L., Robbins, C.A., Wang, H., Chiu, S.Y., Schwarzkroin, P.A., Messing, A. and Tempel, B.L. (1998) Deletion of the K_v1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron* **20**: 809-819.
- Solis, R.R., Davis, A.C. and Bradley, A. (1993) Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* **225**: 855-878.
- Sommer, B. and Seeburg, P.H. (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 291-296.
- Sprang, S.R. (1997) G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem* **66**: 639-678.
- Steriade, M., Jones, E.G. and McCormick, D.A. (1997) *Thalamus-Organisation and function*. Oxford: Elsevier Science.
- Steriade, M and Timofeev, I. (2003) Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron* **37**: 563-576.

Stettler, S. (2004) Extrahierbarkeit und Transportverfügbarkeit von Sulfonamiden in Grünlandböden nach Gülle Applikation. Diplomarbeit. Eidgenössische Technische Hochschule.

Stoffel, W. (2008) Daten unveröffentlicht.

Stoffel, W., Körner, R., Wachtmann, D. and Keller, B.U. (2004) Functional analysis of glutamate transporter in excitatory synaptic transmission of GLAST1 and GLAST1/EAAC1 deficient mice. *Mol Brain Res* **128**: 170-181.

Storck, T. (1994) Na⁺-abhängiger Glutamat/Aspartat-Transporter aus dem zentralen Nervensystem der Ratte: Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung. Dissertation. Universität zu Köln.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. and Stoffel, W. (1992) Structure, expression, and funktional analysos of a Na⁺-dependent L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 (EAAT1) from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10955-10959.

Swanson, R.A., Liu, J., Miller, J.W., Rothstein, J.D., Farrell, K., Stein, B.A. and Longuemare, M.C. (1997) Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* **17**: 932-940.

Szatkowski, M., Barbour, B. and Attwell, D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* **348**: 443-446.

Szymocha, R., Akaoka, H., Brisson, C., Beurton-Marduel, P., Chalon, A., Bernard, A., Didier-Bazes, M., Belin, M.F. and Giraudon, P. (2000) Astrocytic alterations induced by HTLV type 1 infected T lymphocytes : a role for Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**: 1723-1729.

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nisikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M. and Wada, K. (1997) Epilepsy and exaceration of brain injury in mice lacking glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**: 1699-1702.

Teijema, H.L., Van Gelderen H.H., Giesberts, M.A. and Laurent de Angulo, M.S. (1974) Dicarboxylic aminoaciduria: an inborn error of glutamate and aspartate transport with metabolic implications, in combination with a hyperprolinemia. *Metabolism*, **23**: 115-123.

Te Riele,H., Maandag, E.R. and Berns, A. (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 5128-5132.

Thomas, J.R. (1995) Excitatory amino acids in health and disease. *J Am Geriatr Soc* **43**: 1279-1289.

Thorlin, T., Roginski, R.S., Choudhury, K., Nilsson, M., Ronnback, L., Hansson, E. and Eriksson, P.S. (1998) Regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 by glutamate and delta-opioid receptor stimulation. *FEBS Lett* **425**: 453-459.

Torp, R., Hoover, F., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J. and Ottersen, O.P. (1997) Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and rEAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. *Anat Embryol (Berl)* **195**: 317-326.

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

Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H. Jr. and Hediger, M.A. (1999) SOD mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* **2**: 848.

Tsien, J.Z., Huerta, P.T. and Tonegawa, S. (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**: 1327-1338.

Turski, L., Bessler, K., Rettig, K.-J., Loeschmann, P.-A. and Wachtel, H. (1991) Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate anagonists. *Nature* **349**: 414-419.

- Tybulewicz, V.L.J., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T. and Mulligan, R.C. (1991) Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *c-abl* protooncogene. *Cell* **65**: 1153-1163.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M., Bujard, H. and Hillen, W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7963-7968.
- Uschkureit, T. (2000) Struktur –Funktionsanalyse der Myelinmembran von Axonen des zentralen Nervensystems durch Gen-Ablation mittels homologer Rekombination. Dissertation. Universität zu Köln.
- Utsunomiya-Tade, N., Endou, H. and Kanai, Y. (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* **271**: 14883-14890.
- Valez-Faircloth, M., McGraw, T.S., Alandro, M.S., Fremeau, R.T.J., Kilberg, M.S. and Anderson, K.J. (1996) Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain. *Am J Physiol* **270**: C67-76.
- Van Deursen, J. and Wieringa, B. (1992) Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors. *Nucl Acids Res* **20**: 3815-3820.
- Wadiche, J.I., Amara, S.G. and Kavanaugh, M.P. (1995) Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* **15**: 721-728.
- Wahle, S. and Stoffel, W. (1996) Membrane topology of the high-affinity L-glutamate transporter (GLAST-1) of the central nervous system. *J Cell Biol* **135**: 1867-1877.
- Walter, P. and Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**: 557-561.
- Wallraff, A., Odermatt, B., Willecke, K. and Steinhauser, C. (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junctions coupling. *Glia* **48**: 36-43.
- Wan, Q., Man, H.Y., Liu, F., Brauntan, J., Niznik, H.B., Pang, S.F., Brown, S.M. and Wang, Y.T. (1999) Differential modulation of GABA_A receptor function by Mel_{1a} and Mel_{1b} receptors. *Nat Neurosci* **2**: 401-402.
- Wang, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y. and O'Malley, B.W. (1997) Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nature Biotech* **15**: 239-243.
- Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. and Tanaka, K. (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* **10**: 976-988.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G. and Bear, M.F. (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* **313**: 1093-1097.
- Winder, D. and Conn, P.J. (1996) Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial-neuronal communication. *J Neurosci Res* **46**: 131-137.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J. and Diver, W.P. (1987) The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide. *Biochem Biophys Res Commun* **145**: 888-894.
- Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Tanaka, K., Wada, K. and Inoue, Y. (1996) EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport* **7**: 2013-2017.
- Yamamoto, M., Wada, N., Kitabatake, Y., Watanabe, D., Anzai, M., Yokoyama, M., Teranishi, Y. and Nakanishi, S. (2003) Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *J Neurosci* **23**: 6759-6767.

- Yarranton, G.T. (1992) Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotech* **3**: 506-511.
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y. and Gounaux, E. (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **431**: 811-818.
- Young, A.B., Greenamyre, J.T., Hollingsworth, Z., Albin, P.D.C., Shoulson, I. and Penney, J.B. (1988) NMDA-receptor lossess in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* **241**: 981-983.
- Zafra, F., Alcantara, R., Gomena, J., Argon, C. and Gimenez, C. (1990) Arachidonic acid inhibits glycine transport in cultured glial cells. *Biochem J* **271**: 237-242.
- Zawel, L. and Reinberg, D. (1993) Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog Res Mol Biol* **44**: 67-108.
- Zelenaia, O., Schlag, B.D., Gochenauer, G.E., Ganel, R., Song, W., Beesley, J.S., Grinspan J.B., Rothstein, J.D. and Robinson, M.B. (2000) Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol* **57**: 667-678.
- Zerangue, N., Arriza, J.L., Amara, S.G. and Kavanaugh, M.P. (1995) Differential modulation of the human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J Biol Chem* **270**: 6433-6435.
- Zhu, P., Aller, M.I., Baron, U., Cambridge, S., Bausen, M., Herb, J., Saeinski, J., Cetin, J., Osten, A., Nelson, M.L. Kügler, S., Seeburg, P.H., Sprengel, R. and Hasan, M.T. (2007) Silencing and un-silencing of tetracycline-controlled genes in neurons. *PLoS*, e533.

Zusammenfassung

Die Glutamattransporter des ZNS (EAAT) bilden eine Familie von Plasmamembranständigen Transmembran-Proteinen, die als hochaffine, Na⁺-abhängige Transporter, die die Neurotransmitter-Konzentration im synaptischen Spalt für eine getreue Signalweiterleitung regulieren und exzitotoxische Schädigungen verhindern.

In topologischen immunhistochemischen Studien mit GLT-1 und GFAP Antikörpern wurde gezeigt, dass GLT-1 ein überwiegend in astroglialen Zellen exprimierter Glutamattransporter ist.

In dieser Arbeit sollte zum Studium der normalen und pathophysiologischen Bedeutung des GLT-1 Transporters ein Astrozyten-spezifisch und entwicklungsabhängig induzierbares konditionelle *glt-1 null* Mausmodell erstellt und analysiert werden.

Zur Herstellung dieses Mausmodells für die konditionelle Gen-Ausschaltung des Glutamattransporters GLT-1 wurden zwei unterschiedliche *replacement* Vektoren GLT-BS und GLT-RF konstruiert. Mit dem Nachweis der korrekten genomischen DNA Sequenz des gesamten GLT-RF *targeting* Konstruktes, der Isolierung homolog rekombinierter ES-Zell Klone, Überprüfung der Pluripotenz und des Karyotyps wurden die Rahmenbedingungen für die Generierung einer konditionellen GLT-1 Maus geschaffen.

Durch Vorkern-Mikroinjektion wurde bisher eine *Cre*-Rekombinase exprimierende transgene Mauslinie generiert, die auf der Basis des *TetOn* Systems unter dem Astrozyten spezifischen Promoter *gfap* die *Cre*-Rekombinase Doxycyclin induzierbar exprimiert. Die funktionelle Analyse dieser transgenen Mauslinie zeigte keine Aktivierbarkeit. In glialen Zellkulturstudien hingegen wurde eine präzise Induktion der *Cre*-Rekombinase erzielt. Auf einem ähnlichen Konstrukt mit der Doxycyclin induzierbaren *Cre*-Rekombinase, in dem *gfap* durch den myelinspezifischen *mbp* Promoter ersetzt wurde, zeigten im Tiermodell nach oraler Doxycyclin Applikation eine präzise ausgelöste Induktion.

In weiteren Studien zur Bedeutung der beiden anderen hauptsächlichen Glutamat Transporter wurden frühere Beobachtungen an GLAST-1 defizienten und Maus-Doppelmutanten GLAST-1/EAAC1 durch den wichtigen Befund, dass überwiegend weibliche Doppelmutanten im Alter von einem Jahr epileptische Anfälle entwickeln. Analysen zur Beziehung Glutamat Transporter und Glutamat Rezeptor-Expression zeigten dass sechs Wochen alte GLAST-1 ^{-/-} und GLAST-1 ^{-/-} / EAAC1 ^{-/-} Mäuse eine gesteigerte Expression des ionotropen Kainatrezeptors aufweisen.

Expressionsmuster der Glutamatrezeptoren und der Glutamattransporter in Abhängigkeit des Neurotransmitters Glutamat wurden ermittelt. Dabei wurde der regulatorische Einfluss der glutamatergen Transmission auf die mRNA Transkription aufgezeigt.

Abstract

Glutamate transporters of the CNS (EAAT) form a family of plasma membrane residing transmembrane proteins, which regulate as high affinity Na^+ -dependent transporters in the synaptic cleft signal transduction and protect against excitotoxic neuronal damage.

Immunohistochemical topology studies using GLT-1 and GFAP antibodies revealed that GLT-1 is predominantly expressed in astroglia. In this thesis an astrocyte – and a development specific conditional *glt-1 null* mouse mutant model should be generated, which would unveil the normal and pathophysiological function of GLT-1.

For the conditional knock out of *glt-1* two different replacement vectors were constructed GLT-BS and GLT-RF targeting constructs. The correct genomic structure of the mutated gene locus harbouring the GLT-RF targeting sequence was established, homologously recombined ES-cell clones isolated and their pluripotency and correct karyotype established. Blastocyst injection for the generation of the mouse mutant are under way.

A transgenic mouse line bearing the *cre*-recombinase gene, which is inducible on the basis of the *TetOn* system under the astrocyte specific *gfap* promoter was generated by pronuclear microinjection. Expression studies on the induction of the *cre*-recombinase transgene by doxycycline in these transgenic lines show no activation so far. However, a precise induction of the *cre*-recombinase was achieved in glial cell culture. A similar construct, in which the *gfap* promoter was replaced by the myelin specific *mbp* promoter, resulted in a transgenic mouse line which allowed a successful *cre*-recombinase induction.

In an extension of previous studies on the neurophysiological and neuropathological role of the two other dominant glutamate neurotransmitter transporters GLAST-1 and the double mutant GLAST-1/EAAC1 earlier observations were expanded by the important finding, that predominantly female double mutants at one year of age developed epileptic seizures and the “cycling syndrome”.

Analyses, correlating glutamate transporter and glutamate receptor expression, were carried out in six week old GLAST-1 $-/-$ and GLAST-1 $-/-$ / EAAC1 $-/-$ mice. Up-regulation of the expression of the ionotropic kainate receptor has been observed. The expression pattern of both the glutamate receptor families and of the glutamate transporters has been evaluated in dependence of the neurotransmitter glutamate concentration. A regulatory effect of glutamatergic transmission on the steady state level of glutamate transporter mRNA.

ERKLÄRUNG

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

Christine Kiss

Köln, den 15.04.2008

Lebenslauf

Name/Vorname:	Kiss, Christine
Geburtsdatum/-ort:	21.08.1976, Friedrichshafen
Eltern:	Emeric Kiss Judith Varga
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung:	
08/1983-07/1987	Bodenseeschule St. Martin Grundschule, Fischbach
08/1987-07/1993	Dr. Joseph Eberle Ailingen Realschule
08/1993-05/1996	Droste Hülshoff Schule, Friedrichshafen
Mai 1996	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Hochschulbildung:	
10/1996-/2001	Studium der Chemie an der Universität zu Münster
2001-2002	Diplomarbeit im Institut für Biochemie der Universität zu Münster unter Leitung von Prof. Dr. E. A. Galinski
06-07/2002	Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Anorganische Chemie der Universität Münster
01/2003-04/2008	Promotionsarbeit im Institut für Biochemie/Laboratorium für molekulare Neurowissenschaften (Med. Fakultät) der Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel
Praktikum:	
09/2002-12/2002	Bayer CropScience, Monheim
Köln, April 2008	

