

Aus der Klinik für Neurologie  
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas F. Münte

---

**Superfusionsversuche an Schnitten des zerebralen Kortex  
des Menschen im Vergleich zur Ratte:  
Detektion und Interaktion endogener Neurotransmitter**



Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von  
Katharina Prauß  
aus Hamburg

Lübeck 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Moser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Bader

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2015

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 16.11.2015

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>2. Einführung</b> .....	8
2.1. Die Großhirnrinde .....	8
2.1.1. Zellulärer Aufbau.....	9
2.1.2. Laminäre Gliederung .....	9
2.1.3. Kortikale Säulen.....	9
2.1.4. Vergleich des Nervensystems von Ratte und Mensch .....	10
2.2. Zelluläre Strukturen.....	10
2.2.1. Neurone.....	11
2.2.1.1. Aufbau .....	11
2.2.1.2. Membran- und Aktionspotential.....	11
2.2.1.3. Synapsen .....	12
2.2.1.4. Neurotransmission und Neuromodulation .....	12
2.2.2. Gliazellen .....	13
2.2.2.1. Astroglia .....	13
2.2.2.2. Oligodendroglia .....	14
2.2.2.3. Mikroglia.....	15
2.2.3. Energieversorgung der zellulären Strukturen .....	15
2.3. Neurotransmitter .....	16
2.3.1. Zusammenspiel von Neuronen und Gliazellen.....	16
2.3.2. Neurotransmittermetabolismus .....	16
2.3.3. Glutamat.....	17
2.3.3.1. Vorkommen von Glutamat im ZNS.....	17
2.3.3.2. Glutamatausschüttung.....	17
2.3.3.2.1. Nichtvesikuläre Glutamatausschüttung .....	18

---

2.3.3.2.2.	Vesikuläre Glutamatausschüttung .....	19
2.3.3.3.	Glutamatrezeptoren.....	19
2.3.3.3.1.	Metabotrope Glutamatrezeptoren .....	19
2.3.3.3.2.	Ionotrope Glutamatrezeptoren.....	19
2.3.3.3.3.	Synaptische Plastizität.....	21
2.3.3.4.	Exzitotoxizität, Energieunterversorgung und Neurodegeneration.....	21
2.3.3.5.	Glutamatreuptake .....	23
2.3.3.6.	Glutamattransporter .....	23
2.3.3.6.1.	Glutamattransporter in der Plasmamembran .....	23
2.3.3.6.2.	Vesikuläre Glutamattransporter .....	24
2.3.4.	Glutamin.....	25
2.3.4.1.	Funktion.....	25
2.3.5.	GABA .....	26
2.3.5.1.	GABA-Ausschüttung .....	26
2.3.5.2.	GABA-Rezeptoren.....	26
2.3.5.3.	GABA-Metabolisierung.....	27
2.4.	Zielsetzung und Fragestellung.....	27
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1.	Material.....	29
3.1.1.	Geräte.....	29
3.1.1.1.	Allgemeine Laborausstattung .....	29
3.1.1.2.	Geräte für die Gewebegewinnung und -präparation.....	30
3.1.1.3.	Geräte für die Superfusion .....	30
3.1.1.4.	Geräte für HPLC.....	30
3.1.2.	Chemikalien.....	31
3.1.2.1.	Allgemeine Laborausstattung .....	31
3.1.2.2.	Chemikalien für die Gewebegewinnung und -präparation.....	31
3.1.2.3.	Chemikalien für die Superfusion .....	31

---

3.1.2.4.	Chemikalien für HPLC.....	32
3.2.	Methoden.....	33
3.2.1.	Inkubationsmedien für die Superfusionsversuche.....	33
3.2.1.1.	Herstellung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit für die humanen Versuche 34	
3.2.1.2.	Herstellung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit für die Rattenversuche ....	35
3.2.2.	Weitere eingesetzte Lösungen.....	37
3.2.2.1.	Herstellung der Zusatzlösungen.....	37
3.2.2.2.	Herstellung des Eluenten .....	37
3.2.2.3.	Herstellung der Glutamat-Glutamin-GABA-Standardlösungen .....	38
3.2.2.4.	Herstellung von internen Standards .....	39
3.2.2.5.	Herstellung der Derivatisierungslösung .....	40
3.2.3.	Superfusionsversuch .....	41
3.2.3.1.	Gewebegewinnung .....	42
3.2.3.1.1.	Humane Versuche .....	42
3.2.3.1.2.	Rattenversuche .....	42
3.2.3.2.	Gewebepräparation .....	43
3.2.3.3.	Gewinnung von Probenmaterial durch Superfusion.....	43
3.2.4.	Messung der Proben mittels HPLC.....	45
3.2.5.	Elektrochemische Detektion .....	47
3.2.6.	Auswertung der Chromatogramme .....	48
3.2.6.1.	Interne Standards.....	48
3.2.6.2.	QEy-Standards.....	49
3.2.7.	Statistik.....	50
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
4.1.	Basale Neurotransmitterausschüttung .....	52
4.2.	Vergleich Mensch und Ratte .....	52
4.3.	Beeinflussung der Neurotransmitterausschüttung.....	53

---

4.3.1.	Neurotransmitterausschüttung unter Veratridin.....	53
4.3.2.	Neurotransmitterausschüttung unter Tetrodotoxin.....	54
4.3.3.	Neurotransmitterausschüttung unter TBOA.....	55
4.3.4.	Neurotransmitterausschüttung unter LMS.....	56
4.3.5.	Neurotransmitterausschüttung unter TBOA und LMS.....	57
4.3.6.	Neurotransmitterausschüttung unter TBOA, LMS und TTX.....	58
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
5.1.	Validierung der Methode der Superfusion .....	60
5.1.1.	Methodik.....	60
5.1.2.	Vitalität des Gewebes.....	61
5.2.	Vergleichbarkeit von Experimenten mit Rattengewebe und humanem Gewebe .....	61
5.3.	Basale endogene Neurotransmitterausschüttung .....	62
5.4.	Neurotransmitterinteraktionen .....	62
5.4.1.	Glutamat-Glutamin-Zyklus .....	62
5.4.2.	Neurotransmittermetabolisierung im Rahmen des Citratzyklus .....	64
5.4.3.	Metabolisierung von GABA .....	65
5.5.	Interaktionen zwischen Glutamat und GABA.....	66
5.5.1.	Basaler exzitatorischer Überhang .....	66
5.5.2.	Depolarisationsabhängige Glutamat- und GABA-Ausschüttung.....	67
5.5.3.	Feedback-Mechanismus als Schutz vor Exzitotoxizität .....	67
5.6.	Glutaminabhängige Regulation der Ausschüttung von Glutamat und GABA.....	68
5.6.1.	Funktionen von Glutamin.....	68
5.6.2.	Glutamintransporter .....	68
5.6.3.	Glutaminabhängige Regulation der Glutamatkonzentration.....	69
5.6.3.1.	Basaler Glutamat:Glutamin-Quotient .....	69
5.6.3.2.	EAAT-vermittelte Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration .....	69
5.6.4.	Glutaminabhängige Regulation der GABA-Konzentration .....	70
5.7.	Intrazellulärer Glutaminspeicher .....	71

---

5.8. Ausblick .....	71
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>79</b>
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>80</b>

# 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>aCSF</b>	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
<b>Ag</b>	Silber
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
<b>ASAT</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>ADP</b>	Adenosin-Diphosphat
<b>ATP</b>	Adenosin-Triphosphat
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>Ca</b>	Calcium
<b>Cl</b>	Chlorid
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>EAAT</b>	exzitatorischer Aminosäuretransporter (engl. <i>excitatory amino acid transporter</i> )
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>engl.</b>	englisch
<b>EPSP</b>	exzitatorisches postsynaptisches Potential
<b>EZR</b>	Extrazellulärraum
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>GLUT</b>	Glucosetransporter
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-Triphosphat
<b>IPSP</b>	inhibitorisches postsynaptisches Potential
<b>K</b>	Kalium
<b>kPa</b>	Kilopascal = $10^3$ Pascal
<b>l</b>	Liter
<b>LDH</b>	Laktat-Dehydrogenase
<b>LMS</b>	L-Methionin sulfoximin
<b>LTD</b>	long-term depression
<b>LTP</b>	long-term potentiation
<b>MCT</b>	Monocarboxylasetransporter
<b>mm</b>	Millimeter = $10^{-3}$ Meter

---

<b>mM</b>	Millimolar = mmol/l = Millimol pro Liter
<b>mmol</b>	Millimol = $10^{-3}$ Mol
<b>mV</b>	Millivolt = $10^{-3}$ Volt
<b>nA</b>	Nanoampère = $10^{-9}$ Ampère
<b>Na</b>	Natrium
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</b>	Natrium-Kalium-Triphosphatase
<b>nKRBP</b>	normal Krebs Ringer Bicarbonat Puffer
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>OPA</b>	ortho-Phtaldialdehyd
<b>pmol</b>	Picomol = $10^{-12}$ Mol
<b>QEγ</b>	Glutamin - Glutamat - GABA, (Q, E, γ als Einbuchstabencode der entsprechenden Aminosäure)
<b>TBOA</b>	DL-threo-β-Benzyloxyaspartat
<b>TTX</b>	Tetrodotoxin
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>VER</b>	Veratridin
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## 2. EINFÜHRUNG

Die Funktion des Gehirns kann als ein gewaltiges Kommunikationsnetzwerk angesehen werden. Um komplizierten Anforderungen gerecht zu werden, ist das Gehirn auf ein großes Repertoire an Molekülen, die Adaptationsfähigkeit von Zellen und eine bestimmte Umstrukturierungsfähigkeit der beteiligten Strukturen angewiesen. Die Neurone in der grauen Substanz erzeugen hierbei Signale, die in Form von Neurotransmittern zwischen den Zellen kommuniziert und mithilfe der weißen Substanz fortgeleitet werden. Das Zusammenspiel von Neuronen und ihren Helferzellen, den Gliazellen, ist dabei die Grundlage und soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

### 2.1. DIE GROßHIRNRINDE

Das Hirngewebe kann in graue sowie weiße Substanz aufgeteilt werden. Die weiße Substanz besteht überwiegend aus Gliazellen sowie myelinisierten Axonen der in der grauen Substanz lokalisierten Somata der Neurone. In der grauen Substanz entstehen durch Wechselwirkungen zwischen Neuronen und Gliazellen Signale, die mithilfe der weißen Substanz an andere Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) oder auch ins periphere Nervensystem weitergeleitet werden. Die räumliche Trennung von neuronalen Zellkörpern und ihren Axonen entspricht dem Prinzip der ökonomischen Strukturierung von Leitungsbahnen für eine maximale Vernetzung einerseits und einen minimalen Verbrauch von Raum andererseits (Campbell, 1904). Der zerebrale Kortex als oberflächlichste Schicht des Großhirngewebes bildet dabei nur einen Teil der grauen Substanz. Weitere Anteile liegen in den Basalganglien, im Kleinhirn sowie im Rückenmark (Smith, 1927).

Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen den Zellen, eignet sich insbesondere der zerebrale Kortex, der - im Gegensatz zu beispielsweise den Basalganglien - einen anatomisch gut zugänglichen und abgrenzbaren Teil der grauen Substanz darstellt. Für die vorliegende Arbeit wurde in Rattenversuchen ausschließlich frontaler Kortex, beim menschlichen Gewebe frontaler sowie temporaler Kortex untersucht.

Zur Bewältigung komplexer Aufgaben ist ein Netzwerk an Neuronen notwendig, dessen einzelne Neurone miteinander kommunizieren können müssen. Je dichter ihre Somata beieinander liegen, desto effektiver ist die Kommunikation. Auch die regionale Spezialisierung der Kortexfunktionen wird so ermöglicht. Dementsprechend lässt sich der Kortex landkartenartig in funktionelle Felder unterteilen. Die entsprechende Einteilung in die sogenannten Brodmann-Areale erfolgte bereits Anfang des 20. Jahrhunderts (Brodmann, 1909). Inzwischen gibt es Hinweise auf physiologische interindividuelle Unterschiede der Architektur des zerebralen Kortex (Zilles et al., 2004). Daher

kann dessen hier zugrunde gelegter Aufbau nicht auf jedes Individuum übertragen werden; der prinzipielle Aufbau des zerebralen Kortex behält jedoch weiterhin seine Gültigkeit.

### **2.1.1. ZELLULÄRER AUFBAU**

Der menschliche zerebrale Kortex ist ca. 2-3 mm dick und umfasst durch die Architektur in Form von Gyri eine Oberfläche von mehreren hundert Quadratzentimetern.

Es kommen exzitatorische Neurone mit erregender sowie inhibitorische Neurone mit hemmender Wirkung auf andere Neurone im Kortex vor. Die exzitatorischen Neurone entsprechen den Pyramidenzellen. Sie wurden nach ihrem hervorstechenden apikalen Dendriten benannt, der sich typischerweise zur Oberfläche hin richtet. Die pyramidalen Dendriten enthalten Dornfortsätze, deren Dichte die Fähigkeit des Neurons anzeigt in der gegebenen Schicht Signale zu empfangen (Shipp, 2007).

Inhibitorische Neurone bilden nur 20% der kortikalen Neurone. Dennoch sind sie in ihrer Morphologie vielseitiger als exzitatorische Neurone. Einige tragen selbsterklärende Namen, z. B. Korb- oder Kandelaber-Zellen, da sie sich wie Körbe um andere Zellkörper schlingen oder zahlreiche Zellkontakte aufbauen, die an die Verzweigungen eines Armleuchters erinnern. Die inhibitorischen Zellen des Kortex werden auch einfach als Interneurone bezeichnet. Ihre Axone sind ausschließlich „intrinsisch“, da sie nicht in die weiße Substanz vordringen und nur kurze, lokale Verbindungen herstellen. Auch einige Pyramidenzellen sind „intrinsisch“, die meisten enden jedoch mit ihren Axonen in der weißen Substanz und sind dementsprechend „extrinsisch“ (Shipp, 2007).

### **2.1.2. LAMINÄRE GLIEDERUNG**

Die Kortexoberfläche lässt sich in sechs horizontale Schichten einteilen. Diese enthalten jeweils verschiedene Arten an Neuronen oder unterschiedliche Teile davon. Ein Neuron wird immer der kortikalen Schicht zugeordnet, in der sein Zellkörper lokalisiert ist.

Es existieren sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Verbindungen. So entsteht ein Netzwerk, das sich selbst reguliert (Shipp, 2007).

### **2.1.3. KORTIKALE SÄULEN**

Neben den horizontalen Schichten ist der Kortex vertikal in Säulen organisiert. Diese kortikalen Säulen sind vor allem in den primären sensorischen Arealen, also insbesondere im Gyrus postcentralis, dem visuellen sowie dem akustischen Kortex, ausgeprägt und zeichnen sich durch

eine starke Konnektivität innerhalb einer Säule aus. Sie stellen damit sozusagen die elementaren Verarbeitungseinheiten der Großhirnrinde dar (Mountcastle, 1997; Shipp, 2007).

#### **2.1.4. VERGLEICH DES NERVENSYSTEMS VON RATTE UND MENSCH**

Aufgrund der stark begrenzten Verfügbarkeit menschlichen Hirngewebes für experimentelle Studien wird auf Tierexperimente zurückgegriffen, bei denen heute die Ratte das Standardmodell ist. Die Überprüfung der Übertragbarkeit von Ergebnissen der Tierexperimente auf den Menschen muss weiterführenden Einflüssen auf die Humanmedizin vorangehen. Hierzu sind wichtige Grundlagen wie das Vorhandensein und die Verteilung von Neuronen und Gliazellen im ZNS beider Spezies bekannt.

Ungefähr 171 Milliarden Zellen machen das menschliche ZNS aus, wovon ca. die Hälfte Neurone sind. Nur 19 % der Neurone sind im zerebralen Kortex lokalisiert. Der Kortex nimmt jedoch 82 % der Gehirnmasse ein. Der zerebrale Kortex macht bei Nagetieren 77 % aus, hier befinden sich ca. 17 % aller zerebralen Neurone. Somit haben Menschen im Vergleich zu Nagetieren keine signifikant erhöhte relative Zahl an Neuronen im Kortex (Azevedo et al., 2009). Würde man jedoch die Anzahl an Neuronen und Nicht-Neuronen in einem Nagetierhirn auf eine Gesamthirnmasse, die einem menschlichen Gehirn entspricht, umrechnen, so hätte das Nagetierhirn trotz der gleichen Masse eine deutlich geringere Zahl an Zellen (58 Milliarden statt 171 Milliarden Zellen) und einen noch weitaus niedrigeren Anteil an Neuronen an der Gesamtzellzahl (21 % statt 50 %). In absoluten Zahlen ausgedrückt kann man bei der Ratte von einer Hirnmasse von 1,802 g mit 200 Millionen Neuronen und beim Menschen von einem Gewicht von 1508 g und 86.000 Millionen Neuronen ausgehen (Herculano-Houzel, 2009). Dementsprechend variiert die Dichte der grauen Substanz erheblich zwischen Ratte und Mensch (Mechelli et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit soll natives Kortexgewebe von Ratte und Mensch in Superfusionsversuchen umspült und endogene Neurotransmitter gemessen werden. Der Metabolismus der Neurotransmitter soll untersucht werden, um zu prüfen, ob die molekularen Vorgänge bei Ratte und Mensch vergleichbar sind und auf vergleichbare Art und Weise moduliert werden können.

#### **2.2. ZELLULÄRE STRUKTUREN**

Im Folgenden sollen die genannten beteiligten Zellen, Neurone und Gliazellen, sowie deren Unterformen gesondert vorgestellt werden.

### 2.2.1. NEURONE

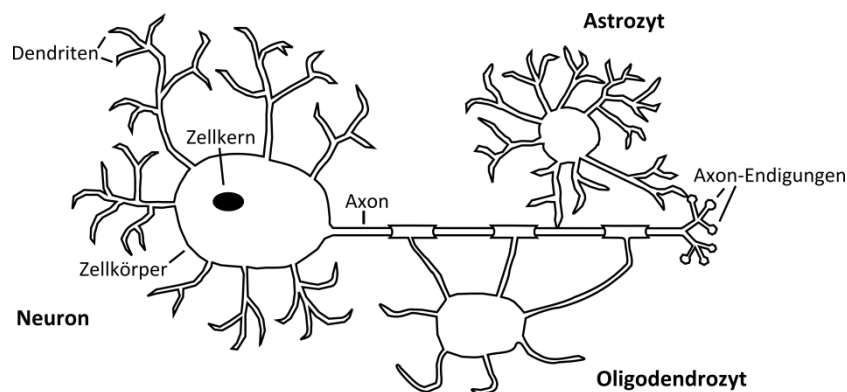


ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES NEURONS, ASTROZYTEN UND OLIGODENDROZYTEN

Neurone sind die einzigen Elemente des Nervensystems, die Nervenimpulse leiten können. Sie bilden die strukturelle Untereinheit des Nervengewebes (Johnson et al., 2010).

#### 2.2.1.1. AUFBAU

Neurone bestehen aus einem Zellkörper und seinen Fortsätzen, die in mehrere Dendriten und ein Axon unterteilt werden können (siehe Abbildung 1). Dendriten und Zellkörper werden als rezeptiv bezeichnet. Sie empfangen Impulse anderer Zellen und leiten diese zum Axonhügel, der Ursprungsstelle des Axons am Zellkörper, weiter. Je nach Stärke der Reize wird das Membranpotential der axonalen Membran verändert und es können so Aktionspotentiale generiert werden. Diese Impulse werden entlang des Axons an seine Endigungen weitergeleitet. Hierbei spricht man von der dynamischen Polarisierung des Neurons (Tahirovic und Bradke, 2009).

#### 2.2.1.2. MEMBRAN- UND AKTIONSPOTENTIAL

Im Innern des Neurons herrscht ein negatives Ruhepotential, das normalerweise zwischen -60 und -70 mV liegt. In Ruhe sind bestimmte  $K^+$ -Kanäle aktiv, um durch einen  $K^+$ -Ausstrom das negative Membranpotential aufrechtzuerhalten. Für eine Signalübermittlung generieren Neurone auf einen Reiz hin Aktionspotentiale, wodurch das Membranpotential auf Werte gegen null angehoben wird. Wenn die Membran über eine bestimmte Schwelle hinaus depolarisiert wird, kommt es zu einem Aktionspotential. Dieses erfolgt nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“, was bedeutet, dass es keine kleinen oder großen Aktionspotentiale gibt. Die Reize hierfür können in einem lokalen  $Na^+$ - oder  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch postsynaptische Aktivierung entsprechender Neurotransmitter-Rezeptoren oder in der Fortleitung eines Aktionspotentials bestehen, wodurch spannungsabhängige, schnelle  $Na^+$ -Kanäle geöffnet werden. Entsprechend ihrer Bezeichnung

führen sie zu einem schnellen Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen und damit zu einer lokalen Depolarisation der Membran. Durch die Depolarisation werden spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet und  $\text{K}^+$ -Kanäle werden vermehrt aktiviert, um eine Repolarisation einzuleiten. Im Gegensatz zu den schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanälen sind die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle länger aktiv und verhindern durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle die schnelle Repolarisation. Die  $\text{K}^+$ -Kanäle brauchen wiederum länger als die schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle, um das Maximum ihrer Wirkung zu erreichen. Erst dann kann die Membran durch einen  $\text{K}^+$ -Ausstrom auf ihr Ruhepotential zurück überführt werden. Die Anwesenheit verschiedener Kanaltypen mit unterschiedlichen Eigenschaften sorgt für die Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Ionen-Haushalts der Zelle (Parker, 2006).

### **2.2.1.3. SYNAPSEN**

Zwischen den einzelnen Neuronen besteht keine direkte zelluläre Kontinuität (Fodstad, 2001). Sie können aber an ihren Schnittstellen, den bis zu  $10^5$  verschiedenen Synapsen pro Neuron (Laughlin und Sejnowski, 2003), über den sogenannten synaptischen Spalt hinweg miteinander kommunizieren. Für die Signalübertragung werden dabei an der präsynaptischen Membran eines Neurons Neurotransmitter ausgeschüttet, die auch präsynaptisch am selben Neuron, meist jedoch an der postsynaptischen Membran des nächsten Neurons oder an nahegelegenen Gliazellen an entsprechende Rezeptoren binden (Johnson et al., 2010).

### **2.2.1.4. NEUROTRANSMISSION UND NEUROMODULATION**

Der in den synaptischen Spalt ausgeschüttete Botenstoff kann je nach Rezeptor, den er bindet, und je nach Effekt, den er auf den synaptischen Informationsaustausch hat, die Funktion eines Neurotransmitter oder -modulators übernehmen. Die Unterschiede sollen hier beleuchtet werden.

Ein Teil der an der postsynaptischen Membran lokalisierten Rezeptoren machen den direkten Ein- oder Ausstrom von Ionen über Kanälen möglich. Sie nennen sich ionotrope Rezeptoren und nehmen an der Neurotransmission teil. Der Ionenaustausch führt zu einer lokalen De- oder Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran. Hierbei unterscheidet man entsprechend exzitatorische (EPSPs) und inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs). Die Summe mehrerer depolarisierender bzw. hyperpolarisierender Einflüsse entscheidet darüber, ob im postsynaptischen Neuron ein Aktionspotential gebildet wird. Die elektrischen Potentiale können sich sowohl zeitlich als auch räumlich summieren und dabei zwar kein einzelnes Aktionspotential modifizieren, aber dessen Entstehung verhindern oder begünstigen. EPSPs sind für gewöhnlich

mit einem  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das postsynaptische Neuron assoziiert, während IPSPs mit einem  $\text{Cl}^-$ -Einstrom einhergehen (Parker, 2006).

Neuromodulatoren hingegen wirken vorwiegend über metabotrope Rezeptoren, die keine direkten Ionenverschiebungen über die Zellmembran verursachen (Parker, 2006). Vielmehr aktivieren sie G-Protein-gekoppelt intrazelluläre Signalwege, die zelluläre oder synaptische Eigenschaften verändern können (Wettschureck und Offermanns, 2005). Durch die komplexe Signalweiterleitung erfolgt die Reizantwort bei metabotropen Rezeptoren langsamer als bei ionotropen (Giocomo und Hasselmo, 2007). Dementsprechend haben Neuromodulatoren langsamere, länger anhaltende und vielfältigere Effekte auf Neurone. Sie wirken nicht einfach exzitatorisch oder inhibitorisch, sondern können je nach gebundenem Rezeptor beispielsweise die Ausschüttungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittern modulieren. Metabotrope Rezeptoren kommen sowohl an der prä- wie auch an der postsynaptischen Membran vor. Die präsynaptisch vorkommenden metabotropen Rezeptoren sind gewöhnlich an inhibitorische  $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt. Bei Bindung von Neurotransmittern an diese Rezeptoren kommt es  $G_{i/o}$ -vermittelt zu einer Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Zelle. Hierdurch wird die weitere Neurotransmitterausschüttung inhibiert und somit eine Art negativer Rückkopplung erzeugt (Wettschureck und Offermanns, 2005). Die Bindung metabotroper Rezeptoren, die an exzitatorische  $G_q$ -Proteine gekoppelt sind, führen entsprechend zu einem transienten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Trotz dieser Unterschiede kann ein und derselbe Botenstoff je nach gebundenem Rezeptor sowohl als Neurotransmitter als auch als Neuromodulator wirken, so z. B. Glutamat (Giocomo und Hasselmo, 2007).

## **2.2.2. GLIAZELLEN**

Auf drei verschiedene Gliazellen soll hier näher eingegangen werden: Astroglia, Oligodendroglia und Mikroglia.

### **2.2.2.1. ASTROGLIA**

Die Helferfunktion der Gliazellen wird vorwiegend den Astrozyten zugesprochen, die einen wichtigen Beitrag zum Neurotransmittermetabolismus leisten (Fodstad, 2001). Astrozyten sind für die Aufrechterhaltung des physiologischen Milieus, das aktive Neurone umgibt, zuständig. Sie regulieren die extrazelluläre Ionenkonzentration, das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen sowie den Energiemetabolismus. Hierzu dienen verschiedene Ionenkanalpumpen, Transporter und

Rezeptoren. Insbesondere regeln Astrozyten den Austausch und die Regeneration von Neurotransmittern. Die Aufrechterhaltung der physiologischen Neurotransmitterkonzentration geschieht mittels Transporter und Rezeptoren, die an der der Synapse zugewandten astrozytären Membran lokalisiert sind (Benarroch, 2005). Hierbei scheinen Astrozyten einem Feedback-Mechanismus zu unterliegen, der bewirkt, dass es je nach Neurotransmitterausschüttung zu einem mehr oder weniger starken Recycling der Neurotransmitter durch die Astrozyten kommt (Uwechue et al., 2012).

Die hieraus resultierende entscheidende Abhängigkeit der Neurone von den Astrozyten verleiht Letzteren die wichtige Aufgabe der Neuroprotektion (Bélanger und Magistretti, 2009).

Astrozyten sind zu aufwendigen Netzwerken zusammengeschlossen. Sie bilden, im Gegensatz zu den Neuronen, die über Synapsen miteinander kommunizieren, über gap junctions ein funktionelles Synzytium. So besteht das zwischen den Neuronen gelegene Gewebe - genannt Neuropil - vorwiegend aus nichtmyelinisierten Dendriten und Gliazellfortsätzen. Es bildet bei Wirbeltieren den größten Teil der grauen Substanz. Aufgrund des hohen Organisationsgrades der Astrozyten lässt sich eine Unterteilung des Neuropils in kleine astrozytär definierte Domänen vornehmen. Dabei können mehrere Synapsen in einer solchen Domäne von nur einem Astrozyten beeinflusst werden.

#### **2.2.2.2. OLIGODENDROGLIA**

Oligodendrozyten sind Gliazellen, die ausschließlich im ZNS ansässig sind. Ihre Funktion ist die Bildung der Myelinscheide um die neuronalen Ausläufer im ZNS. Die Myelinscheide hat einen spiraligen Aufbau, der durch die mehrfach um die Axone gewickelte gliale Plasmamembran entsteht. So werden die Axone optimal elektrisch isoliert und können die maximale Leitgeschwindigkeit erreichen. Ringförmige Aussparung der Myelinscheide werden Ranvier-Schnürringe genannt. An diesen Stellen können neue Aktionspotentiale generiert werden, da die Dichte an spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanälen sowie  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen hier höher ist als an den myelinisierten Abschnitten, den Internodien. Die Ranvier-Schnürringe gewährleisten entsprechend die sogenannte saltatorische Erregungsleitung (Simons und Trajkovic, 2006).

Die einzige andere auf die Bildung der Myelinscheide spezialisierte Gliazelle ist die sogenannte Schwann-Zelle. Sie kommt jedoch nur im peripheren Nervensystem vor.

Am Neurotransmittermetabolismus nehmen Oligodendrozyten nur zu einem geringen Maß teil. Mithilfe der gliaspezifischen Glutamin-Synthetase, die jedoch zum weitaus größeren Anteil in

Astrozyten vorhanden ist, können sie jedoch zum Glutamat-Glutamin-Zyklus (siehe Kapitel 5.4.1.) beitragen (Warringa et al., 1988).

### **2.2.2.3. MIKROGLIA**

Die Zellen der Mikroglia sind die Phagozyten des ZNS. Sie teilen viele Eigenschaften mit Makrophagen anderer Gewebe. In ihrer Ruheform haben sie jedoch eine charakteristische verzweigte Morphologie, die bei residenten Makrophagen anderer Gewebe noch nicht gesehen wurde. Mikroglia kann auch eine amöboide Aktivform annehmen und sind so zur Fortbewegung fähig. Es wird vermutet, dass es die Astrozyten sind, die die Mikroglia dazu stimulieren sich zu verzweigen und so Verbindung zum umliegenden Gewebe herzustellen (Rock et al., 2004).

Der Stellenwert der Mikroglia als Helferzellen wird häufig unterschätzt. Sie machen mit einem Anteil von 15 % an allen Zellen im ZNS einen ebenso großen Anteil wie die Neurone aus (Rock et al., 2004).

### **2.2.3. ENERGIEVERSORGUNG DER ZELLULÄREN STRUKTUREN**

Das Gehirn ist von einer ausreichenden Energieversorgung abhängig. Erschwert wird die Versorgung des Hirngewebes durch die Präsenz der Bluthirnschranke. Sie stellt die physiologische Barriere zwischen Blutkreislauf und dem ZNS dar. Ihre Funktion ist die Aufrechterhaltung des Wasser- und Ionenhaushaltes sowie die Abgrenzung der Homöostase im ZNS zum Milieu des Blutes außerhalb des ZNS. Die Bluthirnschranke besteht aus Endothelzellen, die durch „tight junctions“ verknüpft sind. Die Endknöpfchen der Astrozyten geben die Signale zur Expression dieser „tight junctions“ wie auch zum Einbau von Transportmolekülen, wie den Glucosetransportern (GLUT). Nährstoffe wie Glucose werden von Endothelzellen und von den die Kapillaren umgebenden Astrozyten über GLUT-1 aufgenommen und von dort ggf. weitergegeben. Neurone nehmen Glucose vorwiegend über den GLUT-3 auf. Astrozyten sind außerdem imstande, über Adenosin-Triphosphat- (ATP), Zytokin-, Stickstoffmonoxid- oder Glutamatfreisetzung die Permeabilität der Bluthirnschranke zu regulieren. So kann der Glucosetransport über die Bluthirnschranke hinweg einem vermehrten Glucosebedarf, z. B. bei gesteigerter neuronaler Aktivität, angepasst werden (Benarroch, 2005).

Im Astrozyten wird die Glucose für die Synthese von Glykogen und für die Glykolyse verwendet. Der Glykogenumsatz in Astrozyten steigt mit erhöhter neuronaler Aktivität, um das Neuron mit ausreichender Energie zu versorgen. Sowohl für L-Glutamat als auch für Insulin wurde gezeigt,

dass sie die Glykogensynthese in Astrozyten in vitro steigern. Bei Hypoglykämie ist ein ausreichender Glykogenvorrat besonders wichtig (Benarroch, 2005).

Dennoch ist das Hauptprodukt des Glykogenabbaus nicht Glucose, sondern Laktat. Astrozyten formen Pyruvat mithilfe der LDH-5, einem Isoenzym der Laktat-Dehydrogenase (LDH), in Laktat um. Laktat wird über die H<sup>+</sup>-gekoppelten Monocarboxylasetransporter (MCT) MCT1 und MCT4 aus dem Astrozyten transportiert, um dann über MCT2 in ein Neuron aufgenommen zu werden. Dort wird das Laktat mithilfe der LDH-1 in Pyruvat umgewandelt, sodass Pyruvat im Neuron als Substrat für oxidative Prozesse verwendet werden kann (Benarroch, 2005).

## **2.3. NEUROTRANSMITTER**

### **2.3.1. ZUSAMMENSPIEL VON NEURONEN UND GLIAZELLEN**

Die vorliegende Arbeit untersucht das Zusammenspiel von Gliazellen und Neuronen anhand von frischen Gewebeschnitten aus dem zerebralen Kortex von Ratte und Mensch. Störungen der Interaktionen zwischen Astrozyten und Neuronen spielen eine große Rolle in der Pathophysiologie neurologischer Krankheitszustände. Da die Gehirnfunktion vor allem auf dem Zusammenspiel von Gliazellen und Neuronen beruht, ist es essentiell dieses näher zu untersuchen. Hierfür ist das Verständnis der Kommunikation zwischen diesen Zellen mittels Neurotransmittern essentiell, die in diesem Kapitel erläutert wird.

### **2.3.2. NEUROTRANSMITTERMETABOLISMUS**

Neurotransmitter sind endogene, biochemische Botenstoffe, die zur Signalübertragung zwischen Neuronen ausgetauscht werden. Um Neurotransmitter wieder aus dem synaptischen Spalt zu entfernen, sie in Transportzwischenstufen umzuwandeln und die Neurotransmitterspeicher im Neuron wieder aufzufüllen, gibt es einen Neurotransmittermetabolismus, an dem auch Gliazellen beteiligt sind. Neurotransmitter können in biogene Amine, Neuropeptide, Aminosäuren und lösliche Gase unterteilt werden. Die wichtigsten Neurotransmitter im ZNS sind Glutamat,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin. Sie gehören zu den Aminosäuren. Als Zwischenstufe ist hierbei Glutamin von besonderer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wird die Ausschüttung, deren Beeinflussbarkeit und die Interaktionen der Neurotransmitter Glutamat, Glutamin und GABA untersucht.

### 2.3.3. GLUTAMAT

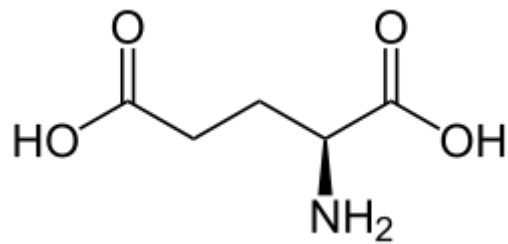


ABBILDUNG 2: L-GLUTAMAT

Die Aminosäure L-Glutamat (siehe Abbildung 2) kommt als exzitatorischer Botenstoff im ZNS aller Säugetiere vor. Sie ist beteiligt an Bewusstseins-, Gedächtnis- sowie Lernprozessen und spielt auch in der Entwicklung des ZNS eine große Rolle. Sie trägt hierbei zur Bildung sowie zum Abbau von Synapsen wie auch zur Zellmigration, Zelldifferenzierung und zum Zelltod bei. Aufgrund der umfangreichen Bedeutung von Glutamat sind Neurone und auch Gliazellen mit Glutamatrezeptoren in ihrer Plasmamembran ausgestattet (Danbolt, 2001).

Im Astrozyten dient Glutamat der oxidativen Metabolisierung, der Glutaminsynthese und bei der Glutathionproduktion dem Austausch mit Cystin (Benarroch, 2005).

#### 2.3.3.1. VORKOMMEN VON GLUTAMAT IM ZNS

Trotz einer hohen Konzentration von Glutamat im ZNS von ca. 5-15 mmol pro kg Feuchtwicht, befindet sich davon nur ein Bruchteil extrazellulär. Die extrazelluläre Flüssigkeit hat einen Anteil von ca. 13-22 % am Volumen des Hirngewebes und enthält Glutamat in einer Konzentration von 0,5-2  $\mu\text{M}$ , während das Glutamat im Zytoplasma in einer Konzentration von ca. 30-100  $\mu\text{M}$  vorliegt (Meldrum, 2000).

Dadurch entsteht ein 15- bis 200-facher Konzentrationsgradient über die Plasmamembran. Schon eine geringe Veränderung der extrazellulären Glutamatkonzentration kann eine signifikant verstärkte Stimulation der entsprechenden Rezeptoren wie auch toxische Effekte hervorrufen. Darüber hinaus ist es energetisch sehr aufwendig das sezernierte Glutamat wieder in die Zelle zurückzubefördern. Folglich sollte die Glutamatkonzentration im Extrazellulärraum (EZR) möglichst gering gehalten werden.

#### 2.3.3.2. GLUTAMATAUSSCHÜTTUNG

Glutamat kann sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch freigesetzt werden. Der größte Teil des Glutamats wird jedoch synaptisch ausgeschüttet. Man unterscheidet hierbei vesikuläre von nichtvesikulärer Ausschüttung (Danbolt, 2001). Eine Vielzahl an Studien hat sich die direkte

selektive Blockade verschiedener Kanäle und Transporter zunutze gemacht, um die Herkunft des Glutamats zu ergründen. Eine Studie von Jabaudon et al. (1999) hat Hinweise erbracht, dass das meiste im EZR befindliche Glutamat einer nichtvesikulären Ausschüttung entstammt (Danbolt, 2001).

### **2.3.3.2.1. NICHTVESIKULÄRE GLUTAMATAUSSCHÜTTUNG**

Ein Mechanismus für die nichtvesikuläre Glutamatausschüttung besteht in der carriervermittelten Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren. Dabei wird Glutamat über Glutamattransporter gegen andere exzitatorische Aminosäuren wie L-Cysteat, D- und L-Aspartat oder über den Cystin-Transporter gegen Cystin ausgetauscht. Auch ein Austausch über andere weniger selektive Heterocarrier ist denkbar (Danbolt, 2001).

So wird auch der Einfluss der Ausschüttung anderer Aminosäuren wie Aspartat, auf die eine carriervermittelte Austauschreaktion und damit effektiv eine Glutamatausschüttung folgt, auf die Glutamatkonzentration deutlich (Danbolt, 2001).

Eine weitere Möglichkeit der nichtvesikulären Glutamatausschüttung wird in den vesikulären Glutamattransportern vermutet. Es wird angenommen, dass diese eine nichtvesikuläre Ausschüttung von Glutamat über die Plasmamembran bewirken, wenn sie in Folge einer vesikulären Glutamatausschüttung mit der Plasmamembran verschmolzen sind (Danbolt, 2001).

Diese beiden Ausschüttungsmechanismen sind unabhängig von ATP und Calcium (Danbolt, 2001).

Eine dritte, bislang allerdings noch nicht vollständig verstandene Möglichkeit besteht in der durch ein Anschwellen des Zellvolumens provozierten Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren. Bei osmotischem Stress versuchen Zellen ein konstantes Zellvolumen aufrechtzuerhalten und exprimieren daher eine Vielzahl verschiedener Proteine wie Kanäle, Transporter und metabolische Reaktionswege, um das Volumen den veränderten Bedingungen anpassen zu können. Einige der volumenregulierten Anionenkanäle können einen Glutamatverlust in den EZR herbeiführen (Danbolt, 2001).

In-vitro-Studien zeigten, dass Glutamat unter bestimmten Konditionen, wie einer niedrigen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder durch metabolische Inhibition, auch durch Hemikanäle freigesetzt wird (Benarroch, 2005).

### **2.3.3.2.2. VESIKULÄRE GLUTAMATAUSSCHÜTTUNG**

Die vesikuläre Glutamatausschüttung erfolgt durch Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran. In den Vesikeln ist Glutamat in einer Konzentration von ca. 100 mM gespeichert (Meldrum, 2000). Diese Exozytose wird durch eine erhöhte lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Rahmen eines fortgeleiteten Aktionspotentials oder durch präsynaptische Aktivierung von  $\text{Na}^+$ -Kanälen initiiert. In beiden Fällen handelt es sich um eine lokale Depolarisation der Zellmembran, die zur vesikulären Ausschüttung von Glutamat führt (Benarroch, 2005).

### **2.3.3.3. GLUTAMATREZEPTOREN**

Über Glutamat erfolgt ein Großteil der exzitatorischen synaptischen Neurotransmission bzw. Neuromodulation im ZNS. Um diese zu gewährleisten, befinden sich in den Zellwänden von Astrozyten und Neuronen sowohl intra- als auch extrasynaptisch Glutamatrezeptoren. Die Rezeptoren werden in metabotrope und ionotrope Glutamatrezeptoren unterteilt (Benarroch, 2005).

#### **2.3.3.3.1. METABOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN**

Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) sind an GTP-bindende Proteine gekoppelt, die eine Signaltransduktion vermitteln. Die Familie der mGluRs beinhaltet acht verschiedene Subtypen (mGluR<sub>1-8</sub>), die auf der Grundlage ihrer Aminosäuresequenz, Pharmakologie und intrazellulärer Signaltransduktion wiederum in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden können. Zur Gruppe I gehört mGluR<sub>1</sub> und mGluR<sub>5</sub>, die an ein  $G_q$ -Protein gekoppelt die Phospholipase C aktivieren. Die Rezeptoren der Gruppe II (mGluR<sub>2+3</sub>) und III (mGluR<sub>4</sub>, mGluR<sub>6-8</sub>) sind an ein  $G_{i/o}$ -Protein gekoppelt und inhibieren die Adenyllylcyclase (Gladding et al., 2009).

#### **2.3.3.3.2. IONOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN**

Bei den ionotropen Glutamatrezeptoren unterscheidet man AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren, die als ligandenaktivierte Ionenkanäle für die schnelle exzitatorische Neurotransmission verantwortlich sind (Gladding et al., 2009). Sie alle sind hochaffin für Glutamat und unterscheiden sich in ihren Bindungseigenschaften für die Glutamatagonisten  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) und Kainat. Die Rezeptoren werden aktiviert, indem Glutamat oder ein Agonist an der zentralen Pore bindet und hier direkt eine Ionenverschiebung über die Zellmembran verursacht. Alle ionotropen Glutamatrezeptoren provozieren eine Depolarisation und damit einen exzitatorischen

postsynaptischen Strom. Sie unterscheiden sich lediglich in der Geschwindigkeit und Dauer ihrer Wirkung.

Der AMPA-Rezeptor ist ein Kationenkanal und besteht aus vier Untereinheiten. Er besitzt vier Bindungsstellen für Glutamat bzw. seine Agonisten. Sobald mindestens zwei Bindungsstellen besetzt sind, öffnet sich der Ionenkanal rasch und führt zu  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der umso stärker ist, je mehr Bindungsstellen besetzt sind. Die Zusammensetzung aus vier möglichen Untereinheiten  $\text{GluR}_{1-4}$  entscheidet über die Ionenleitfähigkeit des Kanals: Bei Vorhandensein einer  $\text{GluR}_2$ -Untereinheit ist der Kanal nur für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen leitfähig und unterscheidet sich damit vom NMDA-Rezeptor. Die Unfähigkeit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu leiten, soll vor weiterer Glutamatausschüttung und damit vor Exzitotoxizität schützen. AMPA-Rezeptoren, die die  $\text{GluR}_2$ -Untereinheit enthalten, können im Falle einer Membrandepolarisation durch Polyamine gehemmt werden, die einen  $\text{K}^+$ -Ausstrom verhindern und damit die Depolarisation über einen  $\text{Na}^+$ -Einstrom verstärken.

Durch die über AMPA-Rezeptoren induzierte Depolarisation können wiederum NMDA-Rezeptoren aktiviert werden, die in ihrer Aktivität entsprechend von den AMPA-Rezeptoren abhängig sind. In der Ruheform ist der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors durch  $\text{Mg}^{2+}$  blockiert. Für eine Aktivierung erfordert es nicht nur die Depolarisation der postsynaptischen Zelle, sondern auch die Bindung der Agonisten Glutamat bzw. Aspartat sowie der Co-Agonisten Glycin bzw. D-Serin an den Rezeptor. Erst dann wird  $\text{Mg}^{2+}$  aus dem Ionenkanal entfernt und es kommt spannungsabhängig zu einem  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sowie einem  $\text{K}^+$ -Ausstrom und damit zu einer Depolarisation. Durch hochfrequente wiederholte Depolarisation oder synchrone Depolarisation über mehrere Synapsen der gleichen postsynaptischen Zelle kann eine länger anhaltende Verstärkung der synaptischen Transmission erzeugt werden, die sogenannte long term potentiation (LTP). Synapsen, die einer LTP unterliegen, weisen eine stärkere elektrische Antwort auf Signale auf als andere Synapsen. Die Möglichkeit der LTP ist in einigen Hirnregionen, wie z. B. dem Hippocampus, stärker ausgeprägt als in anderen.

Um einen statischen Informationsfluss bzw. ein ständiges Hinaufregulieren der synaptischen Transmission zu verhindern, existiert auch das Gegenteil der LTP: Die sogenannte long term depression (LTD). LTD besteht einerseits als negatives Feedback der LTP. So erhöht sich die Schwelle, ab der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ein exzitatorisches postsynaptisches Potential ausgelöst wird, im Rahmen der LTP automatisch. Ein niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kann daher LTD einleiten. Andererseits kann durch Internalisierung von AMPA-Rezeptoren LTP verhindert und damit LTD veranlasst werden.

Kainat-Rezeptoren kommen prä- und postsynaptisch vor. Postsynaptisch tragen sie nach Bindung von extrazellulärem Glutamat durch  $\text{Na}^+$ -Einstrom und  $\text{K}^+$ -Ausstrom zur exzitatorischen Neurotransmission bei. Präsynaptisch lokalisierte Kainat-Rezeptoren wiederum modulieren die Freisetzung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA (Sihra et al., 2013).

### **2.3.3.3. SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT**

Die zelluläre Unterbrechung zwischen Nervenzellen in Form von Synapsen ermöglicht es neue Verbindungen einzugehen oder bestehende aufzugeben bzw. synaptische Aktivität zu stärken oder zu schwächen. Durch diese sogenannte synaptische Plastizität werden Lernvorgänge und die Bildung eines Gedächtnisses ermöglicht. Synaptische Plastizität bedeutet, dass die Aktivität einer Synapse und damit die Stärke der synaptischen Übertragung modulierbar ist. Dadurch entsteht ein formbares neuronales Netzwerk. Die beiden bereits beschriebenen Haupttypen der synaptischen Plastizität sind „long-term potentiation“ (LTP) und „long-term depression“ (LTD). Als Kurzzeitplastizität bezeichnet man die Möglichkeit, die Übertragungsstärke einer Synapse für Millisekunden bis zu wenigen Minuten zu verändern. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Aktivität einer Synapse präsynaptisch durch Modulation der Neurotransmitterausschüttung oder postsynaptisch durch Anpassung der Rezeptorstärke zu steuern (Gladding et al., 2009).

### **2.3.3.4. EXZITOTOXIZITÄT, ENERGIEUNTERVERSORUNG UND NEURODEGENERATION**

Als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter kommt Glutamat überall im ZNS vor. Jedoch wirkt es in erhöhter Konzentration stark toxisch auf die umliegenden Zellen. Man spricht daher von der Exzitotoxizität des Glutamats (Danbolt, 2001).

Da der wesentliche Abtransport von Glutamat aus dem EZR über membranständige ATP-abhängige Transporter erfolgt, kommen die Transportvorgänge in hypoxischen oder hypoglykämischen Zuständen zum Erliegen (siehe Kapitel Glutamattransporter). Dies führt zu einer Potenzierung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt, wodurch Glutamatrezeptoren verstärkt aktiviert werden (Benarroch, 2005). Bezüglich der exzitotoxischen Wirkung hoher Glutamatkonzentrationen über die Glutamatrezeptoren unterscheidet man eine akute und eine verzögerte Form der rezeptorvermittelten neuronalen Degeneration.

Bei der akuten Form kommt es durch Aktivierung glutamatabhängiger Kationenkanäle zu einem massiven  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Einstrom. Durch begleitenden  $\text{H}_2\text{O}$ -Einstrom schwillt die betreffende Zelle an und es kann zur osmotischen Lyse kommen (Castillo und Babson, 1998). Dieser exzitotoxische

Zelltodmechanismus tritt vor allem in Phasen akuten Energiemangels, wie z. B. bei einer zerebralen Ischämie, einer Hypoglykämie, einem Schädelhirntrauma oder einem Status epilepticus auf (Benarroch, 2005). Bei nur gering erhöhter Glutamatkonzentration kann der Zelltod unter Umständen erst mehrere Stunden nach dem initialen Stimulus eintreten. Diese Verzögerung kann aus medizinischer Sicht sehr interessant sein, da die einzelne Zelle evtl. noch lebt, wenn der Patient bereits deutliche klinische Symptome zeigt. Zellen könnten gerettet werden, wenn durch das Anhalten der Glutamatfreisetzung die exzitotoxische Wirkung aufgehoben wird (Danbolt, 2001).

Im Gegensatz dazu wird die verzögerte Form der rezeptorvermittelten neuronalen Degeneration durch Aktivierung von NMDA- und Kainat-Rezeptoren getriggert. Sie führt zu einem starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. So kommt es NMDA-rezeptorvermittelt zu einer Aktivierung der Phospholipase  $\text{A}_2$  und der darauf folgenden Freisetzung von Arachidonsäure. Dabei werden Sauerstoffradikale gebildet. Außerdem führt die Arachidonsäurefreisetzung zum Gewebeschaden, v.a. des Zytoskeletts (Liu et al., 2008). Arachidonsäure und Sauerstoffradikale wiederum erhöhen die Freisetzung von Glutamat und hemmen seine Aufnahme in umliegende Neurone und Gliazellen. NMDA-rezeptorvermittelt wird außerdem die NO-Synthase aktiviert. Das entstehende Stickstoffmonoxid (NO) reagiert mit Superoxidanionen zum Peroxinitritanion, welches beim Abbau Hydroxidradikale ( $\cdot\text{OH}$ ) freisetzt. Außerdem aktiviert die erhöhte intraneuronale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Peptidasen wie Calpain. Calpain katalysiert die enzymatische Umwandlung der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase. Beim Katabolismus von Purinbasen durch die Xanthin-Oxidase entstehen Superoxidanionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Die beschriebene Entstehung freier Radikale führt zum oxidativen Stress der Zellen (Coyle und Puttfarcken, 1993). In neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Huntington oder der Amyotrophen Lateralsklerose spielt die glutamatinduzierte Neurodegeneration vom verzögerten Typ eine wichtige Rolle (Benarroch, 2005).

Glutamat wirkt auch toxisch, indem es den Cystintransporter bindet und hemmt. Dadurch wird der Cystinnachschub behindert, sodass die intrazelluläre Glutathionkonzentration sinkt. Folglich akkumulieren intrazellulär Oxidantien, ohne von Glutathion abgebaut und unschädlich gemacht zu werden. Insgesamt sind Astrozyten weniger vulnerabel gegenüber oxidativem Stress als andere Gliazellen, da sie höhere Glutathionkonzentrationen vorweisen (Cheung et al., 1998).

Das intrazellulär lokalisierte Glutamat wird als nichttoxisch angesehen. Dennoch kann es in bestimmten Zellen, wie den pankreatischen  $\beta$ -Zellen, als intrazellulärer Botenstoff wirken und an

der Regulation der Expression verschiedener Glutamatrezeptoren an der Zelloberfläche mitwirken (Danbolt, 2001).

### **2.3.3.5. GLUTAMATREUPTAKE**

Da sich Glutamatrezeptoren bzw. -transporter sowohl an Dendriten, Axonen und Somata der Neurone als auch an Gliazellen befinden, muss die Glutamatkonzentration im gesamten EZR, also sowohl innerhalb des synaptischen Spalts wie auch extrasynaptisch reguliert werden (Danbolt, 2001). Aufgrund seiner exzitatorischen und neurodegenerativen Eigenschaften liegt es nahe, dass die extrazelluläre Glutamatkonzentration gering gehalten werden muss (Coyle und Puttfarcken, 1993).

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Glutamat innerhalb kürzester Zeit aus dem synaptischen Spalt zu entfernen, um eine stabile basale Glutamatkonzentration im EZR aufrechtzuerhalten. Die einfache Diffusion in die Zelle ist eine denkbare Möglichkeit hierfür, jedoch funktioniert dies nur effizient bei Synapsen mit einem geringen Durchmesser von wenigen Hundert Nanometern und gering erhöhter extrazellulärer Glutamatkonzentration. Aufgrund der Dicke des Gewebes im Millimeterbereich, die bei der Diffusion an menschlichen Synapsen überwunden werden muss, kann diese Möglichkeit keinen großen Stellenwert bei der Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt einnehmen (Danbolt, 2001). Es besteht außerdem die Möglichkeit einer extrazellulären enzymatischen Umwandlung von Glutamat, deren Einfluss allerdings vernachlässigbar klein ist. Vielmehr wird die extrazelluläre Glutamatkonzentration fast ausschließlich durch die aktive Glutamatwiederaufnahme (engl. *reuptake*) in die Zelle aufrechterhalten (Danbolt, 2001).

Dieser sogenannte Glutamatreuptake aus dem EZR erfolgt über Glutamattransporter prä- oder postsynaptisch in Neurone oder extrasynaptisch in Astrozyten (Danbolt, 2001).

### **2.3.3.6. GLUTAMATTRANSPORTER**

Die Zellen des ZNS exprimieren eine Vielzahl verschiedener Proteine, die fähig sind, Glutamat zu transportieren. Einige befinden sich in der Plasmamembran, andere sind intrazellulär lokalisiert (Danbolt, 2001).

#### **2.3.3.6.1. GLUTAMATTRANSPORTER IN DER PLASMAMEMBRAN**

Bislang wurden in der Plasmamembran von Gliazellen und Neuronen fünf verschiedene Glutamattransporter identifiziert. Sie alle gewährleisten den Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-gekoppelten Transport

der exzitatorischen Aminosäuretransmitter L-Glutamat, L- und D-Aspartat von extra- nach intrazellulär. Dementsprechend werden sie als *excitatory amino acid transporters* (EAAT) bezeichnet und mit EAAT1-5 abgekürzt (Saier, 1999). Es handelt sich um Polypeptide mit einer Sequenz aus 500-600 Aminosäuren (Shigeri et al., 2004). 50-60% der Aminosäuresequenz stimmen zwischen den fünf Subtypen überein, während 30-40% Übereinstimmung mit einigen Carriern für neutrale Aminosäuren, wie z. B. den Alanin-Serin-Cystein-Transportern, bestehen (Utsunomiya-Tate et al., 1996). Analoge Subtypen der Glutamattransporter wurden im Menschen (Shashidharan et al., 1994), in der Maus (Maeno-Hikichi et al., 1997), der Ratte (Grewer et al., 2000) und anderen Spezies gefunden. Die jeweils äquivalenten Proteine unter den verschiedenen Säugetieren sind zu 90% in ihrer Aminosäuresequenz identisch (Danbolt, 2001).

EAAT1 und EAAT2 sind primär astroglial lokalisiert, während der EAAT3 ein neuronaler Transporter ist (Danbolt, 2001). EAAT2 erbringt mehr als 90% der gesamten Glutamataufnahme aus dem zerebralen EZR und spielt somit eine zentrale Rolle in der EAAT-Funktion (Shigeri et al., 2004). Bei der Amyotrophen Lateralsklerose betrifft eine Mutation der Superoxid-Dismutase 1 die Expression aller fünf EAAT2-Spleiß-Varianten, was nahelegt, dass die Funktion von EAAT2 mit der Pathophysiologie dieser Erkrankung zusammenhängt (Münch et al., 2002). EAAT4 und EAAT5 sind vorwiegend in Purkinje-Zellen im Kleinhirn sowie in retinalen Müller-Zellen exprimiert (Danbolt, 2001).

Die Glutamataufnahme über EAATs wird durch einen elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten angetrieben, der durch eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrecht erhalten wird, und ist damit von einer ausreichenden Energieversorgung abhängig. Die steigende intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration kann als Signal dienen die synaptische Aktivität mit Glucoseverbrauch zu koppeln, da die durch den ATP-Verbrauch steigende ADP/ATP-Relation zu einer Aktivierung der Glykolyse führt (Benarroch, 2005).

### **2.3.3.6.2. VESIKULÄRE GLUTAMATTRANSPORTER**

Bislang wurden drei verschiedene intrazelluläre Glutamattransporter gefunden. Es handelt sich bei allen um vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT), die mit VGLUT1-3 bezeichnet werden. Sie sind in über 70% ihrer Aminosäuresequenz homolog und innerhalb des Gehirns unterschiedlich stark exprimiert. VGLUT3 ist auch außerhalb des ZNS, z. B. in Leber und Niere, vorhanden (Shigeri et al., 2004).

Alle bekannten VGLUT-Subtypen transportieren Glutamat mit einer 100- bis 1000-fach niedrigeren Affinität als die EAATs ( $K_m \text{ VGLUT} \approx 1 \text{ mM}$  vs.  $K_m \text{ EAAT} \approx 4\text{-}40 \text{ }\mu\text{M}$ ). Außerdem

transportieren VGLUTs im Gegensatz zu EAATs kein Aspartat. Aber auch andere Neurotransmitter wie GABA, Serotonin und Acetylcholin werden über VGLUTs nicht aufgenommen. VGLUTs benötigen einen elektrochemischen  $H^+$ -Gradienten über die Vesikelmembran, der durch vesikelmembranständige ATPasen aufrechterhalten wird. Die Transporter sind biphasisch von der  $Cl^-$ -Konzentration abhängig: Bei niedrigen  $Cl^-$ -Konzentrationen steigt, bei hohen  $Cl^-$ -Konzentrationen sinkt die Aktivität der VGLUTs. Der genaue Mechanismus wie  $Cl^-$ -Ionen die Carrier beeinflussen ist jedoch nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass die  $Cl^-$ -Ionen eine Zählfunktion für den  $H^+$ -Einstrom einnehmen, der über die ATPase oder einen allosterischen Effektor der VGLUTs reguliert wird (Shigeri et al., 2004).

### 2.3.4. GLUTAMIN

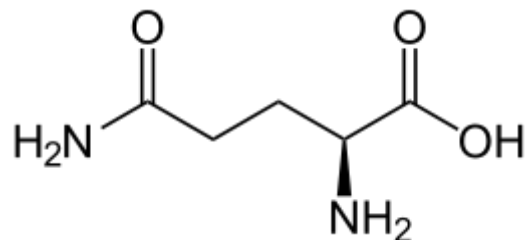


ABBILDUNG 3: L-GLUTAMIN

Die proteinogene Aminosäure Glutamin (siehe Abbildung 3) kommt im EZR mit einer Konzentration von 200-500  $\mu M$  vor (Danbolt, 2001). Es ist die wichtigste Vorstufe für Neurotransmitter wie z. B. Glutamat und GABA (Rae et al., 2003).

#### 2.3.4.1. FUNKTION

Glutamaterge Neurone haben schlechtere Fähigkeiten Glutamat wiederaufzunehmen und können - im Gegensatz zu Astrozyten - Glutamat nicht aus Glucose herstellen. Daher sind sie in der Glutaminzufuhr zur Metabolisierung von Glutamat durch die Glutaminase von Astrozyten abhängig (Benarroch, 2005). Entsprechendes gilt für GABAerge Neurone: Das GABA-erge Neuron benötigt Glutamin (siehe Kapitel 5.4.3., Abbildung 33) zur Metabolisierung von GABA (Solbu et al., 2010). Als Vorstufe für Glutamat wird Glutamin durch die mitochondriale phosphataktivierte Glutaminase, die sich vorwiegend in Neuronen befindet, zu Glutamat desaminiert (Danbolt, 2001).

Die Funktion von Glutamin besteht somit vorwiegend darin Zwischenprodukt in der Metabolisierung von u.a. Glutamat und GABA zu sein. Weitere Funktionen werden in dieser Arbeit neu aufgearbeitet. Die entsprechenden Grundlagen bzgl. weiterer Funktionen,

Metabolisierungswege und Transporter von Glutamin werden daher in den Kapiteln 5.6. und 5.7. der Diskussion besprochen.

### 2.3.5. GABA

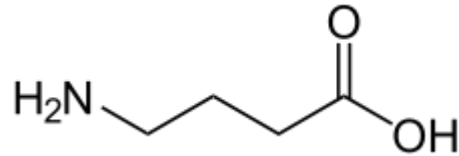


ABBILDUNG 4:  $\gamma$ -AMINO BUTTERSÄURE (GABA)

Als inhibitorischer Neurotransmitter spielt die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA, siehe Abbildung 4) eine besondere Rolle. Der Austausch von GABA zwischen Neuronen und Astrozyten ist außerordentlich wichtig, da nur so das exzitatorisch-inhibitorische synaptische Gleichgewicht aufrecht erhalten werden kann (Benarroch, 2005). Es handelt sich bei GABA um keine alpha-Aminosäure wie Glutamat oder Glutamin, sondern um eine nichtproteinogene Substanz.

#### 2.3.5.1. GABA-AUSSCHÜTTUNG

Die neuronale Ausschüttung von GABA kann sowohl vesikulär mittels einer lokal erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wie auch nichtvesikulär, also  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, über inversen Transport erfolgen (Mantovani et al., 2009).

#### 2.3.5.2. GABA-REZEPTOREN

GABA wirkt auf drei verschiedene Rezeptorklassen: Bei  $\text{GABA}_A$ - sowie  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren handelt es sich um Liganden-gesteuerte Chlorid-Kanäle, während der metabotrope  $\text{GABA}_B$ -Rezeptor an ein G-Protein gekoppelt ist (Macdonald und Olsen, 1994).  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert, wobei präsynaptische inhibitorische  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren nicht nur auf GABAergen, sondern auch auf glutamaterge Neuronen nachgewiesen werden konnten (Sieghart und Sperk, 2002). Präsynaptische  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren haben eine selbstaktivierende Funktion, während präsynaptische  $\text{GABA}_B$ -Rezeptoren als inhibitorische Autorezeptoren agieren (Mantovani et al., 2009).

Die Aktivierung postsynaptischer  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren führt zu einer Verschiebung von hauptsächlich  $\text{Cl}^-$ , aber auch  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen über die neuronale Plasmamembran. Abhängig von der intraneuronalen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration und des jeweiligen Membranpotentials kann ein Ein- wie auch Ausstrom der Anionen erfolgen, sodass es sowohl zu einer De- wie auch eine Hyperpolarisation kommen kann (Benarroch, 2005).

### **2.3.5.3. GABA-METABOLISIERUNG**

Im Gegensatz zu Glutamat wird GABA größtenteils in GABAerge Neurone wiederaufgenommen und dort als Neurotransmitter wiederverwendet (Jursky et al., 1994). Im GABAergen Neuron kann GABA sowohl durch die Glutamat-Decarboxylase aus Glutamat synthetisiert als auch im Citratzyklus aus Glutamin metabolisiert werden (Patel et al., 2005; Schousboe, 2003).

## **2.4. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG**

Um das Verständnis der Interaktionen zwischen den Neurotransmittern Glutamat und GABA sowie der Zwischenstufe Glutamin zu vertiefen, wurde deren Ausschüttung in der vorliegenden Arbeit in Superfusionsexperimenten moduliert (Barnes et al., 1988). Kortikale Hirnschnitte von sechzehn Ratten sowie von zwölf Probanden wurden jeweils von artifiziellm Liquor cerebrospinalis umspült. Das menschliche Gewebe wurde in epilepsie- oder tumorchirurgischen Operationen gewonnen und beinhaltete makroskopisch gesunden frontalen sowie temporalen Kortex. Nach Dekapitation der Wistar-Ratten wurde ausschließlich frontaler Kortex präpariert. Nach einer Auswaschphase von 40 Minuten wurde die basale Freisetzung von Glutamat, Glutamin und GABA in dieses Inkubationsmedium über weitere 40 Minuten (Min40-80) in vier Proben festgehalten. Weitere acht Proben des Inkubationsmediums wurden in den letzten 40 Minuten (Min80-120) genommen. In diesem Intervall wurde durch verschiedene Zusätze neuronale und astrogliale Transporter, Kanäle sowie Enzyme inhibiert bzw. stimuliert. Zudem erfolgten Kontrollexperimente, in denen in diesem Intervall die basale Neurotransmitterausschüttung bestimmt wurde, also ohne dem Inkubationsmedium Modulatoren zuzusetzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung und Analyse der synaptischen Interaktionen der Neurotransmitter Glutamat und GABA sowie deren Zwischenstufe Glutamin. In zahlreichen Studien wurden bereits die molekularen Vorgänge an zerebralen Synapsen sowie ihre Modulationsfähigkeit untersucht und aufgeklärt. Die Experimente wurden dabei vorwiegend an der Ratte und nicht am Menschen durchgeführt. Der nächste Schritt besteht nun in der Untersuchung der Übertragbarkeit der Experimente auf menschliches Gewebe. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit die kortikale Ausschüttung von Neurotransmittern der Ratte mit der des Menschen verglichen. Die basale Ausschüttung soll gemessen und mithilfe von stimulierenden und hemmenden Zusätzen beeinflusst werden. Um die unterschiedlichen Effekte an neuronalen und glialen Rezeptoren und Kanälen zu quantifizieren, wird die extrazelluläre Konzentration von Glutamat, Glutamin und GABA gemessen.

Die Methode der Wahl ist hierbei die Superfusion, bei der in diesem Fall native zerebrale Kortexschnitte mit artifiziellem Liquor cerebrospinalis umspült werden. Sie erlaubt den Wechsel des die Zellen umspülenden Mediums sowie die stete Entnahme von Probenmaterial.

Zur quantitativen Auswertung der Neurotransmitterkonzentrationen werden die gewonnenen Proben mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) getrennt und elektrochemisch detektiert.

## 3. MATERIAL UND METHODEN

### 3.1. MATERIAL

#### 3.1.1. GERÄTE

##### 3.1.1.1. ALLGEMEINE LABORAUSSTATTUNG

---

Analysenwaage Sartorius Research R200D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage Mettler PM2000	Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland
graduierte Messbecher: 25 ml, 50 ml, 100 ml	DURAN® Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
graduierte Messbecher: 3000 ml, 5000 ml	VITLAB GmbH, Großostheim, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Messzylinder: 100 ml, 1000 ml, 2000 ml	DURAN® Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
One-time Plastikspatel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter 761 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland
Pipettenspitzen Ultratip: 10-200 µl, 100-1000 µl	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipetten: 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß mit Deckel: 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Ultraschallbad Bandelin Sonorex TK52H	Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Messkolben: 200 ml	Omnilab, Bremen, Deutschland
Vortexer VF2	Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Tube mit Stopfen: 10 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Cryobox 136 x 136 x 50 mm <sup>3</sup> , weiß	Geyer Th. GmbH, Renningen, Deutschland
Cryobox-Stegeinsatz 12x12, 25 mm	Geyer Th. GmbH, Renningen, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S., 0,1-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

---

### 3.1.1.2. GERÄTE FÜR DIE GEWEBEGEWINNUNG UND -PRÄPARATION

Gewebeschneider „Tissue Sectioner TC-2“	Sorvall Inc., Norwalk, CT, USA
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Kleintier-Guillotine	Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA
Knochenzange	Keller-Medizintechnik, Tuttlingen, Deutschland
Pinzette, Spatel, Schere	Lennartz GmbH Medizintechnik, Hamburg, Deutschland

### 3.1.1.3. GERÄTE FÜR DIE SUPERFUSION

Einhängethermostat Julabo	Hassa Laborbedarf, Lübeck, Deutschland
Rollenpumpe Ismatec ecoline VC-MS/CA 8-6	Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
Superfusionskammer	Hassa Laborbedarf, Lübeck, Deutschland
Superfusionsschläuche	Ismatec, Glattbrugg, Schweiz

### 3.1.1.4. GERÄTE FÜR HPLC

Injektionsspritze, Volumen 200µl, TP5-100-71 Art.-Nr. A0726	Knauer, Berlin, Deutschland
HPLC Vertex Plus Säule Eurosphere 100-5 C18, 5 µM (Vorsäule: 30 × 4 mm <sup>2</sup> ID; Hauptsäule: 250 × 4 mm <sup>2</sup> ID), Art.-Nr. B6Y535	Knauer, Berlin, Deutschland
HPLC Säulen-Ofen	Knauer, Berlin, Deutschland
HPLC Injection & Switching Valve (Injektionsventil A0263) A1357	Knauer, Berlin, Deutschland
Electrochemical Detector CLC 100	ChromSystems, München, Deutschland
WellChrom HPLC Pumpe K501	Knauer, Berlin, Deutschland
Chromatography Data Station HPLC System Manager D-7000, Version 4.1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Programmable Autosampler Merck-Hitachi L-7250 LaChrom	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäß ohne Deckel : 0,5 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

### 3.1.2. CHEMIKALIEN

#### 3.1.2.1. ALLGEMEINE LABORAUSSTATTUNG

Ethanol (99,8% [v/v], C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, denatured), Art.-Nr. 111727	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl) 1 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid-Lösung (NaOH, Titrisol) 2 M, 5M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasser, HPLC Analyzed (H <sub>2</sub> O), Art.-Nr. 4218	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Spüllösung Plastipur 1000 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Helium N50 99,999% (He)	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland

#### 3.1.2.2. CHEMIKALIEN FÜR DIE GEWEBEGEWINNUNG UND -PRÄPARATION

CO <sub>2</sub> -Gas	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
----------------------	--

#### 3.1.2.3. CHEMIKALIEN FÜR DIE SUPERFUSION

Ascorbinsäure (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ), Art.-Nr. A7506	Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, MO, USA
DL-threo-β-Benzyloxyasparaginsäure (TBOA, C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> ), Art.-Nr. 205309-81-5	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Calciumchlorid dihydrate (CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O) Art.-Nr. 102382	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carbogen (5% CO <sub>2</sub> in O <sub>2</sub> ), Art.-Nr. P3750S10R5A001	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ), Art.-Nr. 108337	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl), Art.-Nr. 104936	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Methionin sulfoximin (LMS, C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S) Art.-Nr. 15985-39-4	Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, MO, USA
Kaliumphosphat monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), Art.-Nr. 104873	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

Natriumchlorid (NaCl), Art.-Nr. 0278	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) Art.-Nr. 106329	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O), Art.-Nr. 105886	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tetrodotoxin (C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> ), Art.-Nr. 18660-81-6	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Veratridin (C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>11</sub> ), Art.-Nr. 71-62-5	Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, MO, USA

---

### 3.1.2.4. CHEMIKALIEN FÜR HPLC

---

γ-Aminobuttersäure (GABA, C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> ) Art.-Nr. A5835	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
5-Kalium-hydrogen-L-Glutamat Monohydrat (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> KNO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O), Art.-Nr. G1501	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), Art.-Nr. G5763	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O), Art.-Nr. 111727	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) Art.-Nr. 11278	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Methanol (CH <sub>4</sub> O), HPLC Analyzed, Art.-Nr. 8402	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
ortho-Phthaldialdehyd (OPA, C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> , FW = 134,14), Art.-Nr. P0657	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdihydrogenorthophosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Art.-Nr. S8282	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumsulfit (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ), Art.-Nr. S0505	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumtetraborat (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) Art.-Nr. 106309	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

## 3.2. METHODEN

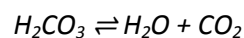
### 3.2.1. INKUBATIONSMEDIEN FÜR DIE SUPERFUSIONSVERSUCHE

Da in den Experimenten dieser Arbeit mit nativen Schnitten gearbeitet wurde, musste das das Gewebe umspülende Inkubationsmedium spezielle Bedingungen erfüllen. Entsprechend vorangegangener Arbeiten (Li et al., 2006; Mantovani et al., 2006, 2009) wurden für Ratten- und humane Versuche zwei verschiedene Inkubationsmedien hergestellt, deren Zusammensetzungen in den folgenden Kapiteln erläutert werden. Ihre Bestandteile sind denjenigen im physiologischen Liquor cerebrospinalis angepasst.

Zum einen musste eine ausreichende Energieversorgung der Zellen während der Experimente gewährleistet sein.

Die gewählte Glucosekonzentration von 10 mM in beiden Inkubationsmedien entspricht einer erhöhten Glucosekonzentration im Liquor sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen. Der Bereich der normalen Glucosekonzentration im Liquor liegt beim Erwachsenen bei 1,1-4,4 mM (Lothar, 1998), bei einer Ratte bei 3,5-4,2 mM (Nakamura und Hochwald, 1983; Steffens et al., 1988; Yaksh, 2004). Die Glucoseversorgung des Versuchsgewebes durch das umspülende Inkubationsmedium ist als schlechter einzuschätzen als durch ein intaktes Blutgefäßsystem in vivo. Daher wurde die erhöhte Konzentration gewählt, um eine Unterzuckerung der Zellen während des Experiments zu verhindern.

Zum anderen musste die Pufferung des Säure-Base-Haushaltes sicher gestellt sein. In vivo spielt hierbei das Carbonatpuffersystem  $H_2CO_3/NaHCO_3$  die wichtigste Rolle. Die folgende Reaktionsgleichung wird durch die Carboanhydrase katalysiert.



Die Elimination des  $CO_2$  erfolgt in vivo durch Abatmung, in vitro konnte das  $CO_2$ -Gas über Schläuche entweichen.

Entsprechend obiger Gleichung wurden beiden Inkubationsmedien sowohl  $NaHCO_3$  als auch  $NaCl$  in physiologischer Konzentration hinzugefügt.

Es wurde zur Herstellung aller hier beschriebenen Lösungen HPLC- $H_2O$  verwendet.

### 3.2.1.1. HERSTELLUNG DER ARTIFIZIELLEN CEREBROSPINALFLÜSSIGKEIT FÜR DIE HUMANEN VERSUCHE

Das bei den humanen Versuchen genutzte Inkubationsmedium hat eine dem Liquor cerebrospinalis analoge Ionenkonzentration. In ähnlicher Zusammensetzung wurde diese artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) schon mehrfach eingesetzt (Hiller et al., 2007; Löffler, 2008; Mantovani et al., 2009). Die Zusammensetzung der aCSF ist in Tabelle 1 aufgeführt.

TABELLE 1

<i>Zusammensetzung der fertigen aCSF:</i>		
121	mM	NaCl
1,8	mM	KCl
1,2	mM	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
1,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,3	mM	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
25	mM	NaHCO <sub>3</sub>
10	mM	Glucose

Die aCSF wurde immer frisch angesetzt. Hauptbestandteil war die sogenannte nDEKA-Lösung, die 2-3 Monate haltbar war und deren Zusammensetzung in Tabelle 2 aufgeführt ist.

TABELLE 2

<i>nDEKA-Lösung, 400ml</i>					
276,57	ml	1,75	M	NaCl	(30,69g/300ml)
7,2	ml	1	M	KCl	(1,865g/25ml)
21,82	ml	0,22	M	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	(2,810g/50ml)
19,2	ml	0,25	M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(1,760g/50ml)
13	ml	0,4	M	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	(2,940g/50ml)
62,21	ml			HPLC-H <sub>2</sub> O	

Die Glucose-Stammlösung war bei 4°C 2 Wochen haltbar, während die NaHCO<sub>3</sub>-Stammlösung immer frisch angesetzt wurde, da diese Lösung nicht stabil ist. Beide Lösungen wurden erst am Versuchstag der nDEKA-Lösung zugesetzt. Ihre Zusammensetzungen finden sich in Tabelle 3.

TABELLE 3

<i>Glucose- und NaHCO<sub>3</sub>-Stammlösungen</i>			
1	M	Glucose	(9,008g/50ml)
0,25	M	NaHCO <sub>3</sub>	(1,050g/50ml)

Die Herstellung von 500 ml der aCSF aus nDEKA-Lösung, den fertigen Stammlösungen sowie HPLC-Wasser ist in Tabelle 4 aufgeführt. Nach Zufügen aller Substanzen wurde die Lösung für 20 Minuten mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast und der Puffer im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, um die gleichen Bedingungen, wie später im Versuch vorliegen, herzustellen. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die darauf folgende Einstellung des pH-Wertes repräsentativ für die Höhe des pH-Wertes während des Versuches ist. Der physiologische pH-Wert von 7,40 wurde zunächst durch Grobtitration mit einer 2 M NaOH- bzw. 1 M HCl-Lösung, anschließend durch Feintitration mittels CO<sub>2</sub>-Begasung des Puffers erreicht. In Tabelle 4 ist die Herstellung von 500 ml der humanen aCSF aufgeführt.

TABELLE 4

<i>Herstellung der aCSF, 500 ml</i>			
50	ml	nDEKA-Lösung	
5	ml	Glucose	10 mM
50	ml	NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
+ 395 ml HPLC-H <sub>2</sub> O			
20 Minuten begasen mit Carbogen			
pH 7,4 bei 37°C			

### **3.2.1.2. HERSTELLUNG DER ARTIFIZIELLEN CEREBROSPINALFLÜSSIGKEIT FÜR DIE RATTENVERSUCHE**

Als Inkubationsmedium für die Rattenversuche wurde nKRBP (normal Krebs Ringer Bicarbonat Puffer (Shalla und Fisher, 1971)) hergestellt. Seine Grundzusammensetzung ist in Tabelle 5 dargestellt.

TABELLE 5

<i>Zusammensetzung des fertigen nKRBP</i>		
125	mM	NaCl
5	mM	KCl
1,1	mM	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
1,25	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2	mM	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
0,001	mM	Ascorbinsäure
25	mM	NaHCO <sub>3</sub>
10	mM	Glucose

Als Grundbaustein wurde im nKRBP die gleiche nDEKA-Lösung verwendet wie bei den humanen Versuchen. Im Unterschied zur aCSF der humanen Versuche ist im nKRBP als Antioxidans eine Ascorbinsäurelösung hinzugesetzt, die aufgrund des schnellen Zerfalls immer frisch angesetzt wurde. Die Zusammensetzungen dieser sowie der den humanen Versuchen entsprechenden Glucose- und NaHCO<sub>3</sub>-Stammlösungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

TABELLE 6

<i>Glucose-, Ascorbinsäure- und NaHCO<sub>3</sub>- Stammlösungen</i>			
1	M	Glucose	(9,008g/50ml)
0,25	M	NaHCO <sub>3</sub>	(1,050g/50ml)
0,01	M	Ascorbinsäure	(0,00176g/1ml)

Aus den angegebenen Stammlösungen konnte nKRBP hergestellt werden. Dessen Herstellung ist in Tabelle 7 dargestellt.

TABELLE 7

<i>Herstellung des nKRBP, 500ml</i>				
50	ml	nDEKA-Lösung		
5	ml	Glucose	10	mM
50	ml	NaHCO <sub>3</sub>	25	mM
0,05	ml	Ascorbinsäure	0,001	mM
394,95	ml	HPLC-H <sub>2</sub> O		
20 Minuten begasen mit Carbogen				
pH 7,4 bei 35°C				

### 3.2.2. WEITERE EINGESETZTE LÖSUNGEN

#### 3.2.2.1. HERSTELLUNG DER ZUSATZLÖSUNGEN

Es wurden für die unterschiedlichen Versuchsreihen verschiedene Zusätze zum Inkubationsmedium gegeben.

Die einzelnen in Tabelle 8 aufgeführten und ab Kapitel 4.3. beschriebenen Substanzen wurden zunächst in einer Stammlösung mit HPLC-H<sub>2</sub>O in Lösung gebracht. Um eine bestimmte Endkonzentration der jeweiligen Substanz im Inkubationsmedium zu erreichen, wurde die entsprechende Menge der Grundsubstanz berechnet und zum Inkubationsmedium gegeben.

In Tabelle 8 sind die benötigten Stammlösungen sowie die später genutzten Endkonzentrationen im Überblick dargestellt.

TABELLE 8

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration in der Stammlösung</i>	<i>Endkonzentration im Inkubationsmedium</i>
Veratridin (VER)	10 mM	10 µM
Tetrodotoxin (TTX)	5 mM	3 µM
DL-threo-β-Benzoyloxyaspartat (TBOA)	5 mM	3 µM
L-Methionin sulfoximin (LMS)	5 mM	3 µM

#### 3.2.2.2. HERSTELLUNG DES ELUENTEN

Zur Messung der Konzentrationen von Neurotransmittern wurden diese mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) getrennt und anschließend durch elektrochemische Detektion quantifiziert. Die Zusammensetzung der in der HPLC eingesetzten isokratischen mobilen Phase, des Eluenten, ist in Tabelle 9 aufgeführt.

TABELLE 9

<i>Eluent, 4000 ml</i>			
48	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
0,5846	g	EDTA	0,5 mM
ca. 3000	ml	HPLC-H <sub>2</sub> O	
1000	ml	HPLC-Methanol	
20 Minuten mit Helium entgasen			

Zur Herstellung von 4000 ml des Eluenten wurden zunächst 48 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  abgewogen und mit HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt, sodass sich ein Volumen von 2000 ml ergab. Durch Rühren war das  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  nach 10 Minuten gelöst und es wurde ein pH-Wert von 4,5 mit einer 1 M NaOH-Lösung eingestellt. Anschließend wurden 0,5846 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA) hinzugegeben und die Lösung mit 1000 ml HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  sowie 1000 ml Methanol vermennt. Abschließend erfolgte eine 20-minütige Entgasung des Eluenten mit Helium-Gas.

### 3.2.2.3. HERSTELLUNG DER GLUTAMAT-GLUTAMIN-GABA- STANDARDLÖSUNGEN

Neben den Proben der Inkubationsmedien der Superfusionsversuche wurden in dieser Arbeit auch Standardlösungen per HPLC gemessen. Da diese eine bekannte Konzentration besaßen, konnten ihre Peaks im Chromatogramm als Referenz genutzt werden, um aus der Peakhöhe der Standards auf die Neurotransmitterkonzentration in den Proben der Superfusionsexperimente zu schließen.

Zunächst wurden jeweils  $10^{-2}$  M Glutamat- (Einbuchstabencode = E), Glutamin- (Einbuchstabencode = Q) bzw. GABA-Lösungen (Einbuchstabencode =  $\gamma$ ) hergestellt. Hierzu wurde aus der angestrebten Konzentration ( $c_E$ ), dem Molekulargewicht der jeweiligen Substanz ( $M_E$ ) und des gewünschten Volumens ( $V$ ) das Gewicht der Aminosäure ( $m_{E \text{ Soll}}$ ) berechnet. Beispielhaft ist nachfolgend die Rechnung für Glutamat aufgeführt.

$$m_{E \text{ Soll}} = c_E \cdot M_E \cdot V = 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 203,2 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 10^{-3} \text{l} = 0,002032 \text{ g}$$

In einem 2ml-Reaktionsgefäß wurde das errechnete Gewicht auf der Feinwaage eingewogen und das tatsächliche Gewicht ( $m_{E \text{ Ist}}$ ) notiert. Über die folgende Formel konnte berechnet werden wie viel HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  hinzupipettiert werden muss, um eine Lösung der Konzentration von  $c_E = 10^{-2}$  M zu erhalten.

$$V = \frac{m_{E \text{ Ist}}}{c_E \cdot M_E} = \frac{m_{E \text{ Ist}}}{10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 203,2 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{m_{E \text{ Ist}}}{2,032 \frac{\text{g}}{\text{l}}}$$

Von dieser Lösung wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  in ein Reaktionsgefäß überführt, in das 990  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  vorgelegt war. Somit wurde eine 1:100 Verdünnung vollzogen. Dieser Verdünnungsvorgang wurde für jede der Aminosäurelösungen insgesamt zweimal vorgenommen. Folglich entstanden erst  $10^{-4}$  M, dann  $10^{-6}$  M Lösungen, aus denen dann Lösungen hergestellt wurden, die alle 3 Aminosäuren enthielten. Für den  $10^{-7}$  M Glutamin-Glutamat-GABA-Standard (QE $\gamma$ -STD) wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der  $10^{-6}$  M Aminosäurelösungen mit 700  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  vermennt, was für jede einzelne

Aminosäurelösung eine 1:10-Verdünnung und somit eine Konzentration von  $10^{-7}$  M bedeutete. Entsprechend wurden für den  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M QE $\gamma$ -STD 250  $\mu$ l jeder der drei  $10^{-6}$  M Aminosäurelösungen mit 250  $\mu$ l HPLC-H<sub>2</sub>O vermengt. Für den  $5 \cdot 10^{-7}$  M QE $\gamma$ -STD wurden die  $10^{-4}$  M Aminosäurelösungen herangezogen und jeweils 10  $\mu$ l auf insgesamt 1970  $\mu$ l HPLC-H<sub>2</sub>O gegeben, sodass eine 1:200-Verdünnung entstand (siehe auch Tabelle 10).

TABELLE 10

	Glutamin (Q)	Glutamat (E)	GABA ( $\gamma$ )	QE $\gamma$ -STD
$10^{-2}$ M	Stammlösung	Stammlösung	Stammlösung	
	↓ 10 $\mu$ l	↓ 10 $\mu$ l	↓ 10 $\mu$ l	
$10^{-4}$ M	in 990 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	in 990 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	in 990 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	je 10 $\mu$ l → in 1970 $\mu$ l H <sub>2</sub> O für $5 \cdot 10^{-7}$ M
	↓ 10 $\mu$ l	↓ 10 $\mu$ l	↓ 10 $\mu$ l	
$10^{-6}$ M	990 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	990 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	990 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	je 100 $\mu$ l → in 700 $\mu$ l H <sub>2</sub> O für $10^{-7}$ M je 250 $\mu$ l → in 250 $\mu$ l H <sub>2</sub> O für $2,5 \cdot 10^{-7}$ M

Die QE $\gamma$ -STDs in den drei verschiedenen Konzentrationen wurden insgesamt dreimal angesetzt. Die hieraus resultierenden 9 Lösungen wurden in einer Standardtestreihe per HPLC gemessen, um Abweichungen zu erkennen.

Die QE $\gamma$ -STDs wurden auch in den Messreihen der Proben der Superfusionsexperimente verwendet. Dabei wurden die QE $\gamma$ -STDs in den Konzentrationen von  $10^{-7}$  M und  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M jeweils dreimal gemessen, sodass in den Messreihen sechs QE $\gamma$ -STDs vorkamen. Die jeweiligen Bezeichnungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

TABELLE 11: KONZENTRATIONEN DER VERSCHIEDENEN QE $\gamma$ -STANDARDS

$10^{-7}$ M	QE $\gamma$ -STD1	QE $\gamma$ -STD3	QE $\gamma$ -STD5
$2,5 \cdot 10^{-7}$ M	QE $\gamma$ -STD2	QE $\gamma$ -STD4	QE $\gamma$ -STD6

Die Standards wurden bei einer Lagerung bei 4°C maximal 1 Woche benutzt.

### 3.2.2.4. HERSTELLUNG VON INTERNEN STANDARDS

Gemeinsam mit den Proben der Inkubationsmedien und Standardlösungen wurden in den gleichen Messreihen per HPLC auch interne Standards gemessen. Aufgrund ihrer

Zusammensetzung aus Proben der Superfusionsexperimente als auch aus Standardlösung konnten sie als Hilfsmittel herangezogen werden, um im Chromatogramm die Retentionswerte der Neurotransmitter genau zu bestimmen. Hierzu wurden interne Standards mit aufsteigender Konzentration an Aminosäuren genutzt.

Pro Messreihe gab es 6 interne Standards (intSTD). Die intSTD1-3 bestanden je zur Hälfte aus der Probenlösung von Min40-50 der jeweils gemessenen Superfusionskammer, intSTD4-6 zur Hälfte aus der Probenlösung von Min115-120 der gleichen Kammer. Als Standardstammlösung wurde der  $5 \cdot 10^{-7}$  M QE $\gamma$ -STD herangezogen, dessen Herstellung in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben wurde. Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung sowie die jeweilige Endkonzentration des QE $\gamma$ -STD ( c(QE $\gamma$ -STD) ) in der internen Standardlösung.

TABELLE 12: ZUSAMMENSETZUNG DER INTERNEN STANDARDS MIT KAMMERPROBEN DER KAMMER 1 (K1)

	HPLC-H <sub>2</sub> O	K1-Min40-50	K1-Min115-120	$5 \cdot 10^{-7}$ M QE $\gamma$ -STD	c(QE $\gamma$ -STD)
intSTD1	125 $\mu$ l	125 $\mu$ l	-	-	0
intSTD2	75 $\mu$ l	125 $\mu$ l	-	50 $\mu$ l	$10^{-7}$ M
intSTD3	-	125 $\mu$ l	-	125 $\mu$ l	$2,5 \cdot 10^{-7}$ M
intSTD4	125 $\mu$ l	-	125 $\mu$ l	-	0
intSTD5	75 $\mu$ l	-	125 $\mu$ l	50 $\mu$ l	$10^{-7}$ M
intSTD6	-	-	125 $\mu$ l	125 $\mu$ l	$2,5 \cdot 10^{-7}$ M

### 3.2.2.5. HERSTELLUNG DER DERIVATISIERUNGSLÖSUNG

Die in dieser Arbeit nachzuweisenden Aminosäuren Glutamat, Glutamin sowie GABA liegen außerhalb ihres isoelektrischen pH-Wertes in polarer Form vor. Für ihre Auftrennung mittels HPLC (siehe Kapitel 3.2.4. und 3.2.5.) war somit eine Vorsäulenderivatisierung nötig. Die Herstellung der Derivatisierungslösung wird im Folgenden erläutert (siehe auch Tabelle 13).

Die stark reduzierend wirkende 1 M Natriumsulfit-Lösung (12,604 g in 100 ml HPLC-H<sub>2</sub>O) konnte 4 Wochen lang bei 4°C gelagert werden. Für die Herstellung des 0,1 M Di-Natrium-Tetraborat-Puffers wurden 2,0122 g Di-Natrium-Tetraborat in 100 ml HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst und ein pH-Wert von 10,4 mit einer 5 M NaOH-Lösung eingestellt (siehe auch Tabelle 13). Die Lösung konnte bei Raumtemperatur einen Monat gelagert werden.

TABELLE 13

<i>Stammlösungen für die Derivatisierungslösung</i>						
1	M	Natriumsufit-Lösung	(12,604 g	$\text{Na}_2\text{SO}_3$ /100	ml	HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ )
4 Wochen bei 4°C haltbar						
0,1	M	Di-Natrium-Tetraborat-Puffer	(2,0122 g	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /100	ml	HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ )
pH 10,4; 4 Wochen bei Raumtemperatur haltbar						

Zur Herstellung der Derivatisierungslösung (siehe auch Tabelle 14) wurden 0,0022 mg ortho-Phtaldialdehyd (OPA) in 50  $\mu\text{l}$  der 1 M Natriumsulfit-Lösung gelöst. Bei Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Ethanol wurde eine Präzipitation sichtbar. Schließlich wurden 900  $\mu\text{l}$  des 100 mM Di-Natrium-Tetraborat-Puffers hinzugegeben.

TABELLE 14

<i>Derivatisierungslösung, 1 ml</i>					
0,0022	g	ortho-Phtaldialdehyd		16,4	mM
0,050	ml	Natriumsulfitlösung		10	mM
0,050	ml	Ethanol			
0,900	ml	Di-Natrium-Tetraborat-Puffer		90	mM

Die Derivatisierungslösung wurde für jede HPLC-Messreihe frisch hergestellt und im Dunkeln gelagert, da OPA empfindlich auf UV-Licht und Luftoxidation reagiert. Eine genaue Beschreibung der Derivatisierungsreaktion erfolgt in den Kapiteln 3.2.4. und 3.2.5.

### 3.2.3. SUPERFUSIONSVERSUCH

Zur Durchführung der Versuche wurde sowohl mit menschlichem als auch mit Gewebe der Ratte gearbeitet. Insgesamt wurden zwölf humane und sechzehn Rattenversuche durchgeführt.

Die für die beschriebenen Experimente eigens hergestellten Superfusionskammern enthielten einen Netzhalter, der sich zwischen den kolbenartigen Aufweitungen der Kammerober- und -unterseite befand (siehe Abbildung 5). Die beiden Kammeranteile zusammen ergaben das Kammervolumen von 720  $\mu\text{l}$ . Die Kammern wurden während der Versuche in aufsteigender Flussrichtung vom Inkubationsmedium durchspült. Zwischen den einzelnen Versuchen wurden alle Kammeranteile mit Ethanol gereinigt, mit Spülwasser gespült und vor jedem Versuch ca. 30 Minuten mit dem jeweiligen Inkubationsmedium durchflossen.

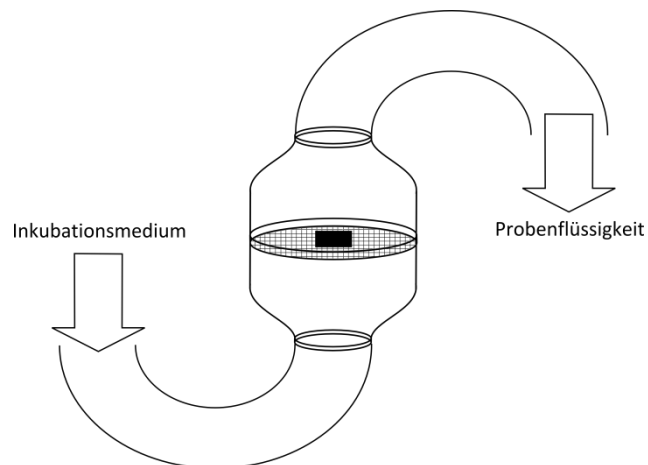


ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES UMSPÜLTEN GEWEBES (■) IM SUPERFUSIONSKOLBEN

### 3.2.3.1. GEWEBEGEWINNUNG

#### 3.2.3.1.1. HUMANE VERSUCHE

Die Aufklärung und schriftliche Einwilligung des jeweiligen Probanden erfolgte gemäß den Bestimmungen der Deklaration von Helsinki wie vom lokalen Ethikkomitee gefordert. Das humane Hirngewebe wurde während neurochirurgischer Operationen subkortikaler Hirntumore entnommen. Dabei wurden ca. 2 cm<sup>3</sup> makroskopisch gesunden frontalen bzw. temporalen Kortexgewebes präpariert und unmittelbar in aCSF (Herstellung und Zusammensetzung siehe Kapitel 3.2.1.1.) überführt. Dieses Inkubationsmedium war in Eis gekühlt und auf einen pH-Wert von 7,40 eingestellt. Innerhalb weniger Minuten nach Entnahme wurde die Gewebeprobe im Labor weiter bearbeitet.

Durch manuelle Präparation wurden Arachnoidea, sichtbare Blutgefäße sowie weiße Substanz entfernt und die zurückbleibende graue Substanz der Hirnrinde annähernd auf einen Kubus genormter Größe (ca. 0,5 x 0,5 x 1 cm<sup>3</sup>) zugeschnitten. Es wurden mithilfe eines Schneidegerätes Gewebeschnitte einer Dicke von 300 µm orthogonal zum Verlauf der zerebralen Gyri angefertigt.

#### 3.2.3.1.2. RATTENVERSUCHE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Tierexperimente mit insgesamt 12 männlichen Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, Strain Code: 003) durchgeführt. Die Experimente standen im Einklang mit dem *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Alle Arbeiten mit den Tieren wurden durch die *Universität zu Lübeck* sowie das *Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein in Deutschland* geprüft und genehmigt.

Bei den Versuchen hatten die Tiere ein Alter von 4-6 Wochen und ein durchschnittliches Gewicht von  $344 \pm 26$  g. Die Ratten waren zu zweit bis viert in transparenten Makrolonkäfigen ( $42 \times 26 \times 15$  cm<sup>3</sup>) untergebracht und hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Trinkwasser. Die regelmäßige Reinigung der Käfige war gewährleistet. Es herrschte ein Tag-Nacht- bzw. Licht-Dunkelheit-Zyklus von 12-12 Stunden, eine konstante Raumtemperatur von  $22 \pm 1$  °C und eine gleichbleibende Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5$  %.

Zur Gewebegewinnung wurde pro Versuch eine Ratte über 2 Minuten mit CO<sub>2</sub>-Gas narkotisiert und sogleich mit einer Guillotine dekapitiert. Nach Entfernung aller knöchernen Strukturen, der oberflächlichen Hirnhäute und der Durchtrennung der extrazerebral verlaufenden Hirnnerven wurde das Gehirn umgehend in eisgekühlten nKRBP (Herstellung und Zusammensetzung siehe Kapitel 3.2.1.2.) überführt.

Ohne das Gewebe aus dem Inkubationsmedium zu entfernen wurde durch einen Schnitt entlang der Fissura longitudinalis das Corpus callosum durchtrennt und das Gehirn in seine beiden Hemisphären geteilt. Anschließend wurde der frontale Kortex einer Hirnhemisphäre abgetrennt und gemäß der humanen Präparation auf eine Größe von ca.  $0,5 \times 0,5 \times 1$  cm<sup>3</sup> zugeschnitten. Entsprechend wurde das Gewebe auf eine Schichtdicke von 350 µm mithilfe eines Schneidegerätes zugeschnitten. Die Schnitte verliefen auch hier orthogonal zum Verlauf der Gyri.

Die gesamte Präparation erfolgte in weniger als 10 Minuten.

### **3.2.3.2. GEWEBEPREPARATION**

Das geschnittene Hirngewebe wurde komplett in ein mit dem Inkubationsmedium versehenes 10 ml-Gefäß überführt. Durch Aufrütteln des Inhalts für wenige Sekunden auf einem Rüttler trennten sich die Gewebeschnitte leicht voneinander. Acht der Gewebeschnitte wurden mithilfe einer 100 ml-Pipette, die mit einer gekürzten Spitze versehen war, randomisiert auf die acht Superfusionskammern verteilt.

### **3.2.3.3. GEWINNUNG VON PROBENMATERIAL DURCH SUPERFUSION**

Die mit den Gewebeschnitten bestückten Superfusionskammern wurden in ein auf 37°C vorgewärmtes Wasserbad eingelassen. Sogleich begann die Superfusion der Schnitte. Die Kammern wurden mit einer konstanten Flussrate von 280 µl/min pro Kammer von dem ebenfalls angewärmten Inkubationsmedium nKRBP bzw. aCSF durchflossen. Die kontinuierliche Flussgeschwindigkeit wurde durch eine Rollenpumpe sichergestellt. Dabei wurde das Inkubationsmedium während des gesamten Versuches kontinuierlich mit Carbogen

(95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast und neu hinzukommende Inkubationsmedien ab 20 Minuten vor ihrem Einsatz mit Carbogen begast und vorgewärmt (Mantovani et al., 2009).

Das in einer Vorlaufzeit von 40 Minuten gewonnene Inkubationsmedium wurde verworfen, um nach dieser Auswaschphase eine stabile basale Neurotransmitterausschüttung zu gewährleisten. Danach wurde das Inkubationsmedium zunächst in Intervallen über 10 Minuten aufgefangen, sodass von Min0-40 pro Gewebeschnitt vier verschiedene Proben gewonnen wurden. Die in diese Proben ausgeschütteten Neurotransmitter sollten der basalen Neurotransmitterausschüttung der Gewebeschnitte entsprechen (Mantovani et al., 2009). Von Min40-80 wurde dem Inkubationsmedium einiger Gewebeschnitte verschiedene Modulatoren zugesetzt, deren hemmende bzw. stimulierende Wirkung auf Kanäle, Transporter oder Enzyme von Neuronen und Gliazellen bekannt sind. Andere Gewebeschnitte wurden in Min40-80 mit dem gleichen physiologischen Inkubationsmedium umspült wie in Min0-40 und dienten als Kontrolle. Um die unter Variation des Inkubationsmediums auftretenden Veränderungen der Neurotransmitterausschüttung im zeitlichen Zusammenhang besser zu erfassen, wurden bei allen Versuchen im Intervall von Min40-80 Proben der Inkubationsmedien in 5-minütigen Abständen gewonnen, sodass hier pro Versuch acht verschiedene Proben entstanden.

Insgesamt belief sich die Dauer eines Versuches auf 120 Minuten. Ein schematischer Ablauf eines beispielhaften Superfusionsversuches ist in Abbildung 6 dargestellt.

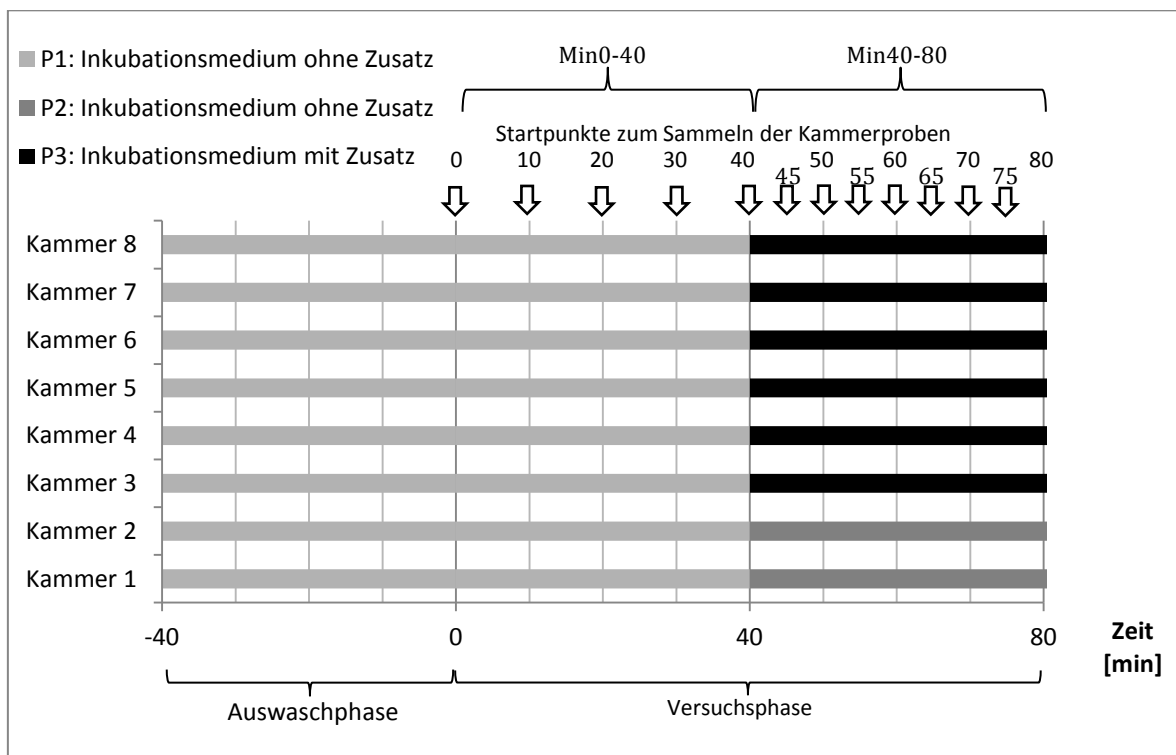


ABBILDUNG 6: ZEITLICHER VERLAUF EINES BEISPIELHAFTEN VERSUCHES

In Abbildung 6 wird außerdem ersichtlich, dass alle Kammern bei Min40 ein neues Inkubationsmedium erhielten, auch wenn dieses von der Zusammensetzung her dem ersten entsprach. Dieses Vorgehen soll die Vergleichbarkeit der Kammern gewährleisten. Die Kammern 1 und 2 in Abbildung 6 entsprechen Kontrollbedingungen. Ihren Puffern war zu keiner Zeit ein Zusatz hinzugefügt.

Die Inkubationsmedien wurden nach ihrem Einsatzzeitpunkt durchnummeriert, z. B. mit P1-P3. Zu Beginn der Versuchsphase, also bei Min0, wie auch beim Hinzufügen und Entfernen jedes Inkubationsmediums bei Min40 und Min80 wurden hiervon Proben gesammelt noch bevor das Inkubationsmedium die Superfusionskammer durchlief. Diese wurden beispielsweise mit P1-40 für Inkubationsmedium 1 bei Minute 40 bezeichnet. Durch Messung der Proben sollte die Abwesenheit von Neurotransmittern im Inkubationsmedium sowie die dessen konstante Zusammensetzung im Versuchsverlauf nachgewiesen werden.

Am Ende eines jeden Versuches wurden die Gewebeschnitte gewogen. Hierbei wurde der Gewebeschnitt mittels einer 1000 µl-Pipette mit gekürzter Spitze auf die Feinwaage überführt und überschüssige Flüssigkeit mit einer 100 µl-Pipette entfernt. Das Feuchtgewicht der Gewebeschnitte über alle Versuche gemittelt betrug  $4,076 \text{ mg} \pm 0,160 \text{ SEM}$ .

### **3.2.4. MESSUNG DER PROBEN MITTELS HPLC**

Im weiteren Verlauf wurden die Proben der Inkubationsmedien bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert und für die Messung mittels HPLC aufgetaut. Die HPLC gehört zu den wichtigsten chromatographischen Trennverfahren für unpolare sowie polare Substanzen, aber auch für die Trennung von Isomeren und Biopolymeren. Die Auftrennung des Substanzgemisches erfolgt in einer Säule, die aus einem stabilen, dicht gepackten Verband von kleinen porösen Teilchen besteht, die ein hohes Oberflächen/Volumen-Verhältnis schaffen (Unger, K., 1989).

Die Auftrennung chemischer Substanzen aus einem Stoffgemisch mittels HPLC erfolgt durch Einstellung eines Adsorptionsgleichgewichts durch Verteilung der einzelnen Stoffe zwischen einer stationären festen und einer mobilen flüssigen Phase.

In der in dieser Arbeit verwendeten „reversed phase“-Chromatographie enthält die Trennsäule silanisierte Kieselgele, die an der Oberfläche n-Alkylketten (C18) enthalten. Man spricht daher von einer unpolaren stationären Phase. Die zu trennenden unpolaren Substanzen werden von der mobilen polaren Phase, dem Eluenten, zur unpolaren stationären Phase gedrängt und sorbiert. Die Verweildauer an der stationären Phase ist für die unterschiedlichen Moleküle entsprechend ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften verschieden groß, sodass die einzelnen

Komponenten zeitlich und räumlich getrennt die Säule verlassen. Durch die unterschiedlichen, für eine Substanz spezifischen Eigenschaften entstehen verschiedene Retentionszeiten im Chromatogramm. So gelingt die Identifikation der einzelnen Substanzen.

Um Aminosäuren trennen und vor allem quantifizieren zu können, werden diese mit Derivatisierungsreagenzien umgesetzt. Bei der ortho-Phthaldialdehyd (OPA) -Sulfit-Vorsäulenderivatisierung entstehen N-Alkyl-1-Isoindolsulfonate. Diese Umsetzung ist essentiell für die elektrische Detektion, da hier oxidierbare Substanzen benötigt werden. Eine der gebräuchlichsten und auch in dieser Arbeit angewendeten Vorsäulenreaktion ist die Derivatisierung mit OPA-Sulfit nach Smith & Sharp (Smith und Sharp, 1994).

Für jede HPLC-Messung wurde pro 200 µl Probe 4 µl OPA-Reagenz hinzugefügt.

Die gesamte HPLC-Messung wurde unter isokratischen Bedingungen durchgeführt; das heißt die Zusammensetzung des Eluenten und die Flussgeschwindigkeit blieben während des Trennvorgangs konstant. Während der Messung herrschten konstant 30°C sowie eine kontinuierliche Flussgeschwindigkeit der mobilen polaren Phase, dem Eluenten, von 1,0 ml/min. Die Elution der Substanzen erfolgte unter hohem Druck von ca.  $19 \pm 0,4$  kPa. Zum Spülen der Schläuche zwischen den einzelnen Messvorgängen wurde eine 25 %-Methanol-Spüllösung benutzt.

In jeder HPLC-Messreihe konnten 50 Proben gemessen werden. Tabelle 15 gibt eine Übersicht über die beispielhafte Messung von Kammer 1 und 2 (K1 und K2). Es wurden fünf verschiedene Probenarten gemessen: HPLC-H<sub>2</sub>O wurde immer im Wechsel mit Gruppen zu messender Lösungen gemessen, verkürzend ist in der Tabelle nur H<sub>2</sub>O angegeben. Außerdem wurden die schon in Kapitel 3.2.3.3. erwähnten Proben der Inkubationsmedien gemessen, die vor Durchlauf der Superfusionskammern gewonnen wurden (z. B. P1-40). Diese und auch HPLC-H<sub>2</sub>O dienen vornehmlich als Referenzwerte zum Ausschluss einer systemischen Kontamination der Proben. Neben den QEγ- und internen Standards (siehe Kapitel 3.2.2.3. und 3.2.2.4.) wurden ansonsten hauptsächlich Proben der Inkubationsmedien gemessen, die mit der Kammernummer und dem Zeitpunkt ihres Sammelbeginns bezeichnet wurden. Beispielsweise entstammt die Kammerprobe K1-10 der Superfusionskammer 1 und wurde von Minute 0 bis 10 gesammelt.

TABELLE 15

<i>Probe</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<i>Inhalt</i>	H <sub>2</sub> O	P1-0	P1-40	H <sub>2</sub> O	P2-40	P2-80	H <sub>2</sub> O	QEY-STD1	QEY-STD2	H <sub>2</sub> O
<i>Probe</i>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<i>Inhalt</i>	intSTD1	intSTD2	intSTD3	H <sub>2</sub> O	K1-10	K1-20	K1-30	K1-40	K1-45	K1-50
<i>Probe</i>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>
<i>Inhalt</i>	K1-55	K1-60	K1-65	K1-70	K1-75	K1-80	H <sub>2</sub> O	QEY-STD3	QEY-STD4	H <sub>2</sub> O
<i>Probe</i>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
<i>Inhalt</i>	K2-10	K2-20	K2-30	K2-40	K2-45	K2-50	K2-55	K2-60	K2-65	K2-70
<i>Probe</i>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>49</b>	<b>50</b>
<i>Inhalt</i>	K2-75	K2-80	H <sub>2</sub> O	QEY-STD5	QEY-STD6	H <sub>2</sub> O	intSTD4	intSTD5	intSTD6	H <sub>2</sub> O

### 3.2.5. ELEKTROCHEMISCHE DETEKTION

An die Trennung mittels HPLC schließt sich die elektrochemische Detektion zur Quantifizierung der Komponenten im Chromatogramm an. Der elektrochemische Detektor setzt sich aus einer Glas-/Carbon-Arbeits Elektrode, einer Ag-/AgCl-Referenzelektrode und einer Hilfselektrode zusammen. Es wird ein Potential zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode aufgebaut, das zur Oxidation bzw. Reduktion der aufgetrennten Substanzen dient. Die Hilfselektrode hält dabei dieses Potential aufrecht, sodass ein Stromfluss an der Referenzelektrode vermieden wird. Sobald eine elektrochemisch aktive Substanz das elektrische Feld der Messzelle durchläuft, wird sie durch das angelegte Potential elektrolysiert. Dabei werden bei Vorliegen eines positiven Potentials an der Arbeitselektrode Elektronen von der Probensubstanz abgegeben. Die Größe des Potentials richtet sich nach dem Redoxpotential  $E_0$  der nachzuweisenden Substanzen. Sulfonate, wie sie durch die OPA-Sulfit-Derivatisierung entstehen, haben ein Redoxpotential von  $E_0 \approx 850$  mV. Der durch die elektrochemische Reaktion entstehende Strom wird durch die Hilfselektrode abgeleitet und ist proportional zur Analytenkonzentration in der Messzelle. Der gemessene Strom wird elektrisch verstärkt an das Aufzeichnungsgerät weitergeleitet. Dieses übersetzt die erhaltenen Signale in einzelne Bildpunkte, die in Form eines Chromatogramms ersichtlich werden.

In dieser Arbeit wurde im elektrochemischen Detektor ein Potential von 800 mV sowie eine Empfindlichkeit von 5 nA voreingestellt (Moser et al., 1996) und bei allen Messungen konstant gehalten.

### 3.2.6. AUSWERTUNG DER CHROMATOGRAMME

Die in der mobilen Phase enthaltenen Substanzen erzeugten in den Chromatogrammen Peaks, die nach einer bestimmten Retentionszeit auftraten und eine gewisse Höhe hatten, die in Millivolt (mV) angegeben wurde. Mithilfe der Retentionszeit gelang es eine bestimmte Substanz zu identifizieren, bzw. sie von Substanzen mit anderen Retentionszeiten abzugrenzen.

#### 3.2.6.1. INTERNE STANDARDS

Zunächst mussten in den Proben der Inkubationsmedien die genauen Retentionszeiten der Peaks von drei für diese Arbeit wichtigen Substanzen bestimmt werden: Glutamin (Q), Glutamat (E) und GABA ( $\gamma$ ). Hierzu wurden sechs verschiedene internen Standards (intSTD) verwendet, deren Herstellung bereits in Kapitel 3.2.2.4. beschrieben wurde. Da diese zur Hälfte aus Proben der Inkubationsmedien und zur anderen Hälfte aus HPLC-H<sub>2</sub>O bzw. QE $\gamma$ -Standards bestanden, konnten die QE $\gamma$ -Retentionszeiten in Proben der Inkubationsmedien und internem Standard verglichen und identifiziert werden. Als gültige Retentionszeit wurden die Peaks des intSTD3 definiert, in dem eine QE $\gamma$ -Konzentration von jeweils  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M herrschte. Dementsprechend wurde der Peak, der in den Chromatogrammen der Proben der Inkubationsmedien der jeweiligen Messreihe an dieser Retentionszeit auftrat, als Glutamin-, Glutamat- bzw. GABA-Peak für die entsprechende Probe identifiziert (siehe Abbildung 7).

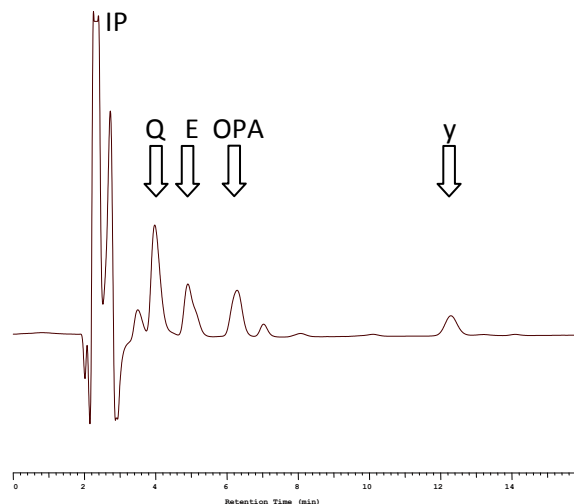


ABBILDUNG 7: CHROMATOGRAMM EINER PROBE NACH ZUSATZ VON VERATRIDIN MIT PEAKS VON GLUTAMIN (Q), GLUTAMAT (E), OPA UND GABA ( $\gamma$ ). IP = INJECTION PEAK.

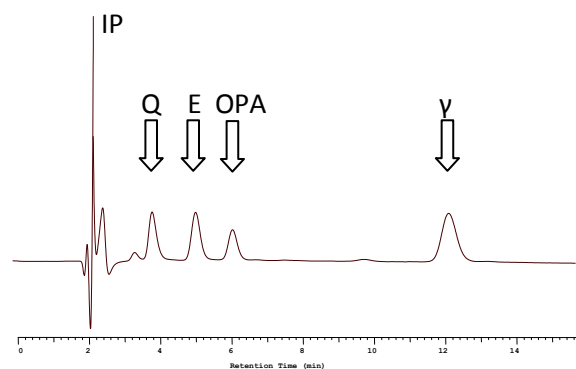
Die über alle Messreihen gemittelten QE $\gamma$ -Retentionszeiten werden in Tabelle 16 aufgeführt.

TABELLE 16: DURCHSCHNITTICHE RETENTIONSZEITEN DER GEMESSENEN NEUROTRANSMITTER

Glutamin (Q)	3,93 min
Glutamat (E)	4,91 min
GABA ( $\gamma$ )	12,06 min

### 3.2.6.2. QEY-STANDARDS

Nach Identifizierung der Retentionszeiten der QEY-Peaks sollten die entsprechenden Neurotransmitterkonzentrationen in den Proben bestimmt werden. Hierzu wurden bei jeder HPLC-Messung sechs QEY-Standards (QEY-STD) gemessen, die sowohl Glutamin, Glutamat als auch GABA in bekannter Konzentration enthielten (siehe Abbildung 8). Die QEY-STDs wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen hergestellt ( $c_1 = 10^{-7}$  M und  $c_2 = 2,5 \cdot 10^{-7}$  M), die pro HPLC-Messung je dreimal gemessen wurden. Ihre Herstellung wurde bereits in Kapitel 3.2.2.3. erläutert.



ABILDUNG 8: CHROMATOGRAMM EINES QEY-STANDARDS MIT GLUTAMIN, GLUTAMAT UND GABA IN DER KONZENTRATION  $10^{-7}$  M MIT PEAKS VON GLUTAMIN (Q), GLUTAMAT (E), OPA UND GABA ( $\gamma$ ). IP = INJECTION PEAK.

Die aus diesen Messungen entstehenden Peaks konnten mit ihrer Konzentration korreliert werden, da die Fläche unter dem Peak proportional zur Substanzkonzentration ist. Als Annäherung wurde in dieser Arbeit jedoch nicht die Fläche, sondern die Peakhöhe verwendet. In der Folge konnten die QEY-Peakhöhen der Proben der Inkubationsmedien jeweils einer bestimmten Konzentration zugeordnet werden. Mithilfe der gemessenen Peakhöhe des Standards ( $Peakhöhe_{Standard}$ ) als auch der Probe ( $Peakhöhe_{Probe}$ ) bei bekannter Standardkonzentration ( $c_{Standard}$ ) ergab sich die Neurotransmitterkonzentration der einzelnen Proben ( $c_{Probe}$ ) somit aus folgender Formel.

$$c_{Probe} [nM] = \frac{c_{Standard} [nM] \cdot Peakhöhe_{Probe} [mV]}{Peakhöhe_{Standard} [mV]}$$

Die Neurotransmitterkonzentrationen lagen nun in der Einheit nM = nmol/l = pmol/ml vor. Durch Multiplikation mit der Flussgeschwindigkeit von 0,280 ml/min und Division durch das durchschnittliche Gewicht der Gewebeschnitte von 4,076 mg  $\pm$  0,160 SEM wurden die Ergebnisse in die Einheit pmol/min/mg umgewandelt.

### 3.2.7. STATISTIK

Die Ergebnisse wurden entsprechend dem jeweiligen Zusatz zum Inkubationsmedium in sieben Gruppen eingeteilt: Die Gruppe ohne Zusätze zum Inkubationsmedium, die basalen Bedingungen entsprach, sowie sechs Gruppen mit jeweils verschiedenen Zusätzen zum Inkubationsmedium im Zeitraum Min40-80 der Experimente. Die Zusätze bestanden aus Veratridin (VER), Tetrodotoxin (TTX), DL-threo- $\beta$ -Benzyloxyaspartat (TBOA) und L-Methionin sulfoximin (LMS), die einzeln oder zusammen dem Inkubationsmedium im Zeitraum Min40-80 der Experimente hinzugefügt wurden. So entstanden die 6 Versuchsgruppen mit Zusätzen: VER, TTX, TBOA, LMS, TBOA+LMS sowie TBOA+LMS+TTX. Im Zeitraum Min0-40 unterlagen alle Experimente basalen Bedingungen, die Hirnschnitte wurden hier also ohne Zusätze vom Inkubationsmedium umspült. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen wurden wiederum bezüglich der Spezies (Ratten- bzw. Menschengewebe) oder der Zeit (Min0-40 bzw. Min40-80) unterteilt. Anschließend wurden die Werte jeder Versuchsgruppe anhand der 12 Zeitintervalle der Probenentnahme mit dem Statistikprogramm SPSS<sup>®</sup> (IBM SPSS Statistics 20) auf Normalverteilung überprüft. Mithilfe von Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurden innerhalb der Versuchsgruppen jeweils Mittelwerte für Min0-40 und Min40-80  $\pm$  Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) berechnet. Signifikante Unterschiede bezüglich der Zeit oder der Spezies wurden durch SPSS mithilfe einer 2-way-ANOVA ausgemacht. Außerdem wurde die kumulative Neurotransmitterausschüttung jeder Versuchsgruppe mittels Excel (Microsoft<sup>®</sup> Office Excel<sup>®</sup> 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 4<sup>®</sup> (GraphPad Prism 4 for Windows, Version 4.03, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## 4. ERGEBNISSE

Der Gehalt an Neurotransmittern wird in dieser Arbeit in der Einheit pmol/mg/min angegeben. Die Messung herkömmlicher Konzentrationsangaben, z.B. in mmol/l, ist aufgrund des fiktiven Raumes der Superfusionskammern sowie der nicht physiologischen Umspülung des Hirngewebes nicht sinnvoll. Daher wird der Gehalt an Neurotransmittern in pmol angegeben, der pro Minute und pro Milligramm Hirngewebe im Inkubationsmedium gemessen wurde. Dieser Gehalt wird im Folgenden als Ausschüttung bezeichnet. Sie stellt die Differenz aus aktiver sowie passiver Freisetzung und aktiver sowie passiver Aufnahme der Neurotransmitter dar und spiegelt somit die interstitielle Neurotransmitterkonzentration als Resultat der Neurotransmitterinteraktionen zwischen Zellen wider. Die Tabellen 17 und 18 fassen die Mittelwerte der GABA-, Glutamat- und Glutamin-Ausschüttung aller Versuchsreihen zusammen.

TABELLE 17

Ratte	GABA		Glutamat		Glutamin	
	Min0-40	Min40-80	Min0-40	Min40-80	Min0-40	Min40-80
<b>basal</b>	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	2,64 ± 0,13	2,59 ± 0,10	5,37 ± 0,26	5,16 ± 0,24
<b>VER</b>	0,14 ± 0,01	7,97 ± 0,20	2,45 ± 0,12	14,32 ± 0,90	6,83 ± 0,59	13,77 ± 0,64
<b>TTX</b>	0,16 ± 0,01	0,08 ± 0,00	2,57 ± 0,13	1,62 ± 0,06	4,87 ± 0,20	3,26 ± 0,09
<b>TBOA</b>	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,00	2,73 ± 0,12	15,32 ± 0,84	5,88 ± 0,23	4,86 ± 0,14
<b>LMS</b>	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,01	2,56 ± 0,14	2,55 ± 0,14	6,06 ± 0,40	2,07 ± 0,11
<b>TBOA+</b>						
<b>LMS</b>	0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,01	2,78 ± 0,23	5,49 ± 0,29	4,96 ± 0,10	2,22 ± 0,10
<b>TBOA+</b>						
<b>LMS+TTX</b>	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,00	2,72 ± 0,12	5,26 ± 0,08	5,11 ± 0,10	3,02 ± 0,07

MITTELWERTE DER AUSSCHÜTTUNG VON GABA, GLUTAMAT UND GLUTAMIN ± SEM AUS KORTEXGEWEBE DER RATTE UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) UND NACH ZUGABE VON ZUSÄTZEN (MIN40-80) IN PMOL/MG/MIN. VERATRIDIN (VER, 10 µM), TETRODOTOXIN (TTX, 3 µM), DL-THREO-β-BENZYLOXYASPARTAT (TBOA, 3 µM) UND L-METHIONIN SULFOXIMIN (LMS, 3 µM) BZW. KOMBINATIONEN DER ZUSÄTZE (TBOA+LMS SOWIE TBOA+LMS+TTX).

TABELLE 18

Mensch	GABA		Glutamat		Glutamin	
	Min0-40	Min40-80	Min0-40	Min40-80	Min0-40	Min40-80
<b>basal</b>	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	2,45 ± 0,14	2,34 ± 0,09	5,57 ± 0,29	5,57 ± 0,21
<b>VER</b>	0,13 ± 0,01	8,43 ± 0,40	2,16 ± 0,11	13,18 ± 0,37	5,62 ± 0,57	14,98 ± 1,35
<b>TTX</b>	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01	2,60 ± 0,12	1,77 ± 0,07	4,81 ± 0,25	3,53 ± 0,13
<b>TBOA</b>	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	2,62 ± 0,13	8,39 ± 0,20	6,22 ± 0,20	4,91 ± 0,20
<b>LMS</b>	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,01	2,72 ± 0,38	3,00 ± 0,18	6,38 ± 0,36	3,42 ± 0,18
<b>TBOA+</b>						
<b>LMS</b>	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	2,52 ± 0,09	4,90 ± 0,25	5,18 ± 0,34	2,53 ± 0,15
<b>TBOA+</b>						
<b>LMS+TTX</b>	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,01	2,39 ± 0,24	3,66 ± 0,19	5,45 ± 0,07	3,10 ± 0,06

MITTELWERTE DER AUSSCHÜTTUNG VON GABA, GLUTAMAT UND GLUTAMIN ± SEM AUS HUMANEM KORTEXGEWEBE UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) UND NACH ZUGABE VON ZUSÄTZEN (MIN40-80) IN PMOL/MG/MIN. VERATRIDIN (VER, 10 µM), TETRODOTOXIN (TTX, 3 µM), DL-THREO-β-BENZYLOXYASPARTAT (TBOA, 3 µM) UND L-METHIONIN SULFOXIMIN (LMS, 3 µM) BZW. KOMBINATIONEN DER ZUSÄTZE (TBOA+LMS SOWIE TBOA+LMS+TTX).

### 4.1. BASALE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG

Die basale Ausschüttung von Glutamin, Glutamat und GABA bei der Ratte bzw. beim Menschen ist in Tabelle 17 bzw. 18 sowie graphisch in den Abbildungen 9, 10 und 11 dargestellt.

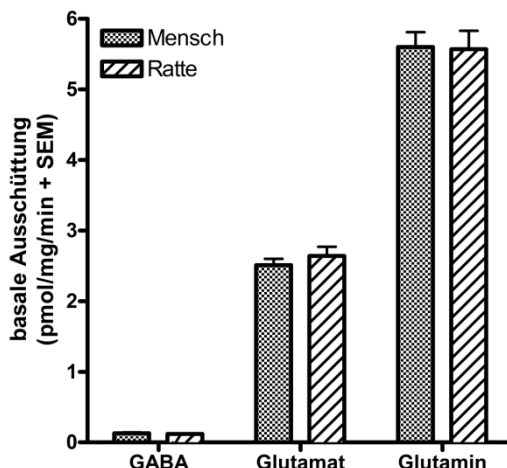
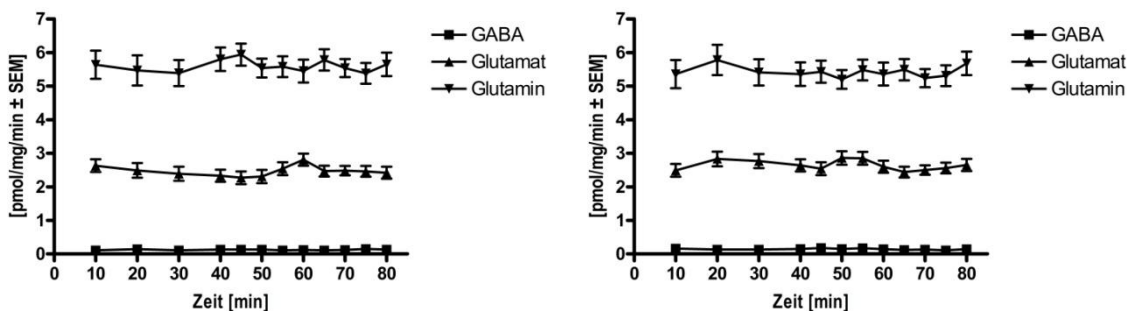


ABBILDUNG 9: MITTELWERTE + SEM DER BASALEN AUSSCHÜTTUNG VON GABA, GLUTAMAT UND GLUTAMIN



ABBILDUNGEN 10 & 11: MITTELWERTE ± SEM DER BASALEN NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG BEIM MENSCHEN (LINKS) UND BEI DER RATTE (RECHTS)

Es konnte eine konstante basale Ausschüttung von Glutamin, Glutamat und GABA nachgewiesen werden, denn die Varianzanalyse zeigte keinen signifikanten Effekt über die Zeit für Glutamin ( $p = 0,618$ ;  $F = 0,253$ ), Glutamat ( $p = 0,383$ ;  $F = 0,787$ ) und GABA ( $p = 0,717$ ;  $F = 0,134$ ).

### 4.2. VERGLEICH MENSCH UND RATTE

Der Vergleich der Ergebnisse von Experimenten mit humanem und Rattengewebe ergab keine signifikanten Unterschiede. Die entsprechenden p-Werte und F-Werte sind in Tabelle 19 dargestellt. Aufgrund der fehlenden signifikanten Unterschiede wurden im Folgenden die Ergebnisse der humanen Versuche graphisch dargestellt und auf zusätzliche Graphiken der Ergebnisse von Rattenexperimenten verzichtet.

TABELLE 19

	GABA		Glutamat		Glutamin	
	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert
basal	p = 0,858	F = 0,033	p = 0,764	F = 0,092	p = 0,499	F = 0,467
VER	p = 0,569	F = 0,371	p = 0,475	F = 0,561	p = 0,156	F = 0,783
TTX	p = 0,215	F = 0,812	p = 0,704	F = 0,153	p = 0,593	F = 0,310
TBOA	p = 0,754	F = 0,108	p = 0,113	F = 0,867	p = 0,595	F = 0,307
LMS	p = 0,215	F = 0,817	p = 0,258	F = 0,725	p = 0,204	F = 0,845
TBOA+LMS	p = 0,783	F = 0,083	p = 0,843	F = 0,042	p = 0,967	F = 0,002
TBOA+LMS+TTX	p = 0,246	F = 0,656	p = 0,194	F = 0,445	p = 0,220	F = 0,767

F-WERTE UND P-WERTE ALS AUSDRUCK DES FEHLENDEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDS DER GRUPPENMITTELWERTE ZWISCHEN DEN SPEZIES RATTE UND MENSCH FÜR 7 VERSCHIEDENE VERSUCHSREIHEN: UNTER BASALEN BEDINGUNGEN SOWIE NACH ZUGABE DER ZUSÄTZE VERATRIDIN (VER, 10 µM), TETRODOTOXIN (TTX, 3 µM), DL-THREO-β-BENZYLOXYASPARTAT (TBOA, 3 µM) UND L-METHIONIN SULFOXIMIN (LMS, 3 µM) IN MIN40-80.

### 4.3. BEEINFLUSSUNG DER NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG

#### 4.3.1. NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER VERATRIDIN

Veratridin (VER) öffnet spannungsabhängige Na<sup>+</sup>-Kanäle und verhindert ihre Inaktivierung. Durch den Na<sup>+</sup>-Einstrom werden spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle geöffnet, sodass durch Depolarisation erregbaren Gewebes eine Neurotransmitterausschüttung induziert wird. Durch Zusatz von VER in Min40 stieg die Ausschüttung von Glutamat (p < 0,001; F = 160,921), Glutamin (p < 0,001; F = 185,798) und GABA (p < 0,001; F = 522,111) signifikant an (siehe Tabellen 17 bzw. 18 sowie Abbildung 12) als Hinweis auf eine vermehrte Depolarisations-abhängige Freisetzung von Glutamat und GABA. Dabei konnte eine konstant erhöhte Ausschüttung für Glutamat und GABA nachgewiesen werden entsprechend einem linearen Graphen (siehe Abbildungen 13 und 14). Die Glutaminausschüttung zeigte unter stimulierten Bedingungen eine sigmoidale Kurve mit einem asymptotischen Trend, was eine Abnahme der Glutaminausschüttung unter kontinuierlicher Stimulation aufzeigt (siehe Abbildungen 12 - 14).

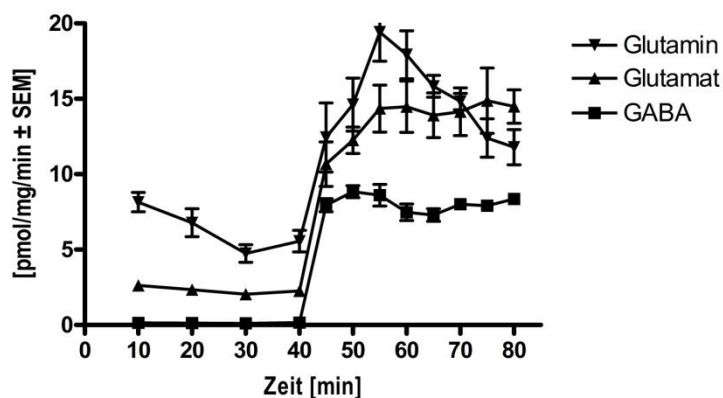
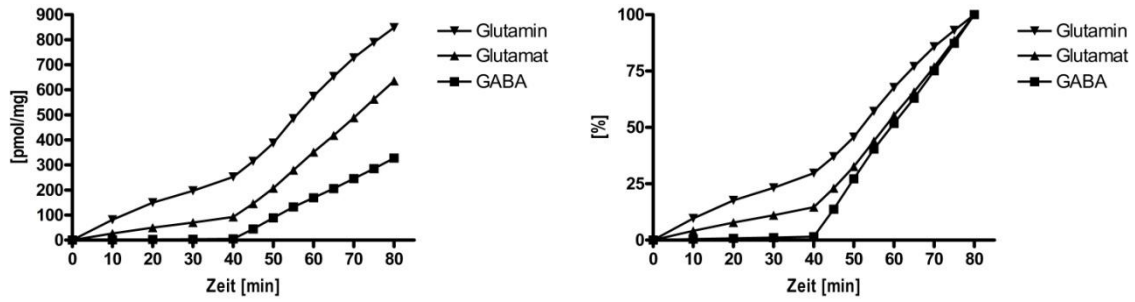


ABBILDUNG 12: MITTELWERTE ± SEM DER NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 10 µM VERATRIDIN (MIN40-80) BEIM MENSCHEN



ABBILDUNGEN 13 & 14: KUMULATIVE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG IM ZEITLICHEN VERLAUF BEIM MENSCHEN (QUANTITATIV UND PROZENTUAL) UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 10  $\mu$ M VERATRIDIN (MIN40-80)

### 4.3.2. NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER TETRODOTOXIN

Tetrodotoxin (TTX) ist ein stark selektiver Inhibitor von  $\text{Na}^+$ -Kanälen, der diese reversibel, aber mit hoher Affinität bindet und somit die Depolarisation erregbaren Gewebes verhindert.

Nach Zugabe von TTX in Min40 nahm die Ausschüttung von Glutamat ( $p < 0,001$ ;  $F = 58,656$ ), Glutamin ( $p < 0,001$ ;  $F = 40,190$ ) und GABA ( $p < 0,001$ ;  $F = 38,718$ ) signifikant ab (siehe Tabellen 17 bzw. 18 sowie Abbildungen 15 - 17), was durch die 2-Way-ANOVA belegt wurde. Die kumulative Ausschüttung aller drei Substanzen war nahezu linear über die Zeit und zeigte somit eine konstant abnehmende Ausschüttung unter dem hemmenden Einfluss von TTX auf die depolarisationsabhängige Freisetzung von Neurotransmittern.

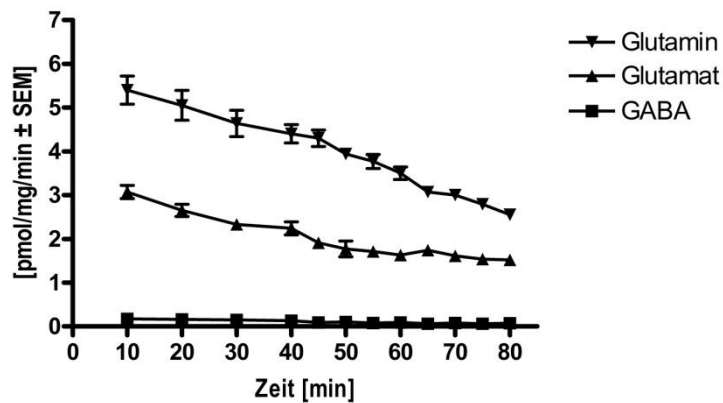
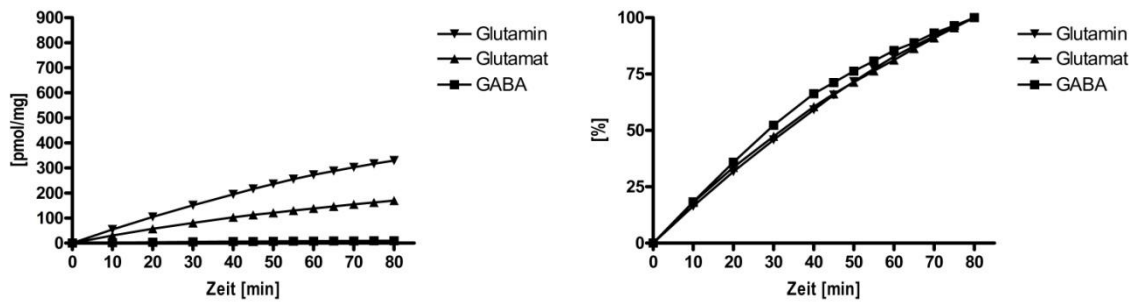


ABBILDUNG 15: MITTELWERTE  $\pm$  SEM DER NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3  $\mu$ M TETRODOTOXIN (MIN40-80) BEIM MENSCHEN



ABBILDUNGEN 16 & 17: KUMULATIVE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG IM ZEITLICHEN VERLAUF BEIM MENSCHEN (QUANTITATIV UND PROZENTUAL) UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3  $\mu$ M TETRODOTOXIN (MIN40-80)

### 4.3.3. NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER TBOA

DL-threo- $\beta$ -Benzyloxyaspartat (TBOA) ist ein unspezifischer Inhibitor astroglialer Transportproteine (engl. excitatory amino acid transporter, EAATs), die exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat oder Aspartat aus dem Extrazellulärraum in Astrozyten überführen.

Der Zusatz von TBOA in Min40 führte zu einem signifikant und konstant erhöhten Nachweis von Glutamat ( $p < 0,001$ ;  $F = 69,565$ ), entsprechend einer verminderten Aufnahme von Glutamat. Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten Abnahme von Glutamin ( $p = 0,002$ ;  $F = 21,350$ ), während sich keine signifikante Änderung in der Ausschüttung von GABA ergab ( $p = 0,652$ ;  $F = 0,225$ ).

Die Ausschüttung von Glutamin, Glutamat und GABA bei der Ratte bzw. beim Menschen jeweils vor und nach Zugabe von TBOA (DL-threo- $\beta$ -Benzyloxyaspartat) ist in den Tabellen 17 bzw. 18 sowie für den Menschen graphisch in den Abbildungen 18 - 20 dargestellt.

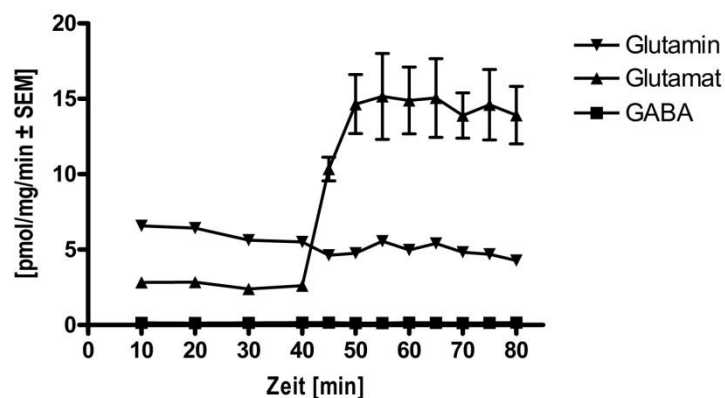
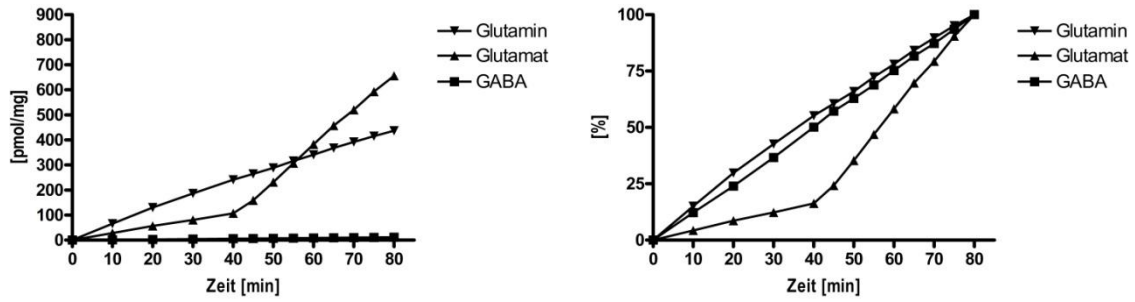


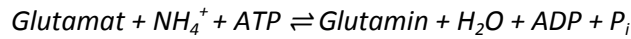
ABBILDUNG 18: MITTELWERTE  $\pm$  SEM DER NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3  $\mu$ M DL-THREO- $\beta$ -BENZYLOXYASPARTAT (MIN40-80) BEIM MENSCHEN



ABBILDUNGEN 19 & 20: KUMULATIVE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG IM ZEITLICHEN VERLAUF BEIM MENSCHEN (QUANTITATIV UND PROZENTUAL) UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3  $\mu$ M DL-THREO- $\beta$ -BENZYLOXYASPARTAT (MIN40-80)

### 4.3.4. NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER LMS

L-Methionin sulfoximin (LMS) hemmt die Glutamin-Synthetase, die in Gliazellen folgende Reaktion katalysiert:



Unter Einfluss von LMS kam es ab Min40 entsprechend einer verminderten Glutamin-Synthese zu einer signifikanten Abnahme der Ausschüttung von Glutamin ( $p < 0,001$ ;  $F = 84,482$ , siehe Tabellen 17 und 18 sowie Abbildung 21). Dabei weist der lineare Graph der kumulativen Glutaminausschüttung auf eine konstante Abnahme der Glutaminausschüttung hin (siehe Abbildungen 23 und 24). Die Konzentration von Glutamat ( $p = 0,091$ ;  $F = 3,575$ ) änderte sich unter Einfluss von LMS nicht signifikant, während GABA ( $p = 0,005$ ;  $F = 23,482$ ) signifikant vermindert nachgewiesen wurde (siehe Tabellen 17 und 18 sowie Abbildungen 21, 23 und 24). Dabei fiel die GABA-Ausschüttung nicht konstant ab, vielmehr ergab der Graph der kumulativen Ausschüttung von GABA einen nahezu asymptotischen Trend nach Zugabe von LMS (siehe Abbildung 22).

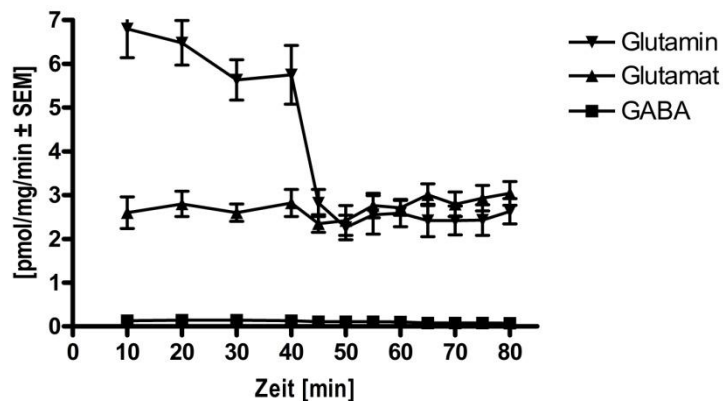


ABBILDUNG 21: MITTELWERTE  $\pm$  SEM DER NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3  $\mu$ M L-METHIONIN SULFOXIMIN (MIN40-80) BEIM MENSCHEN

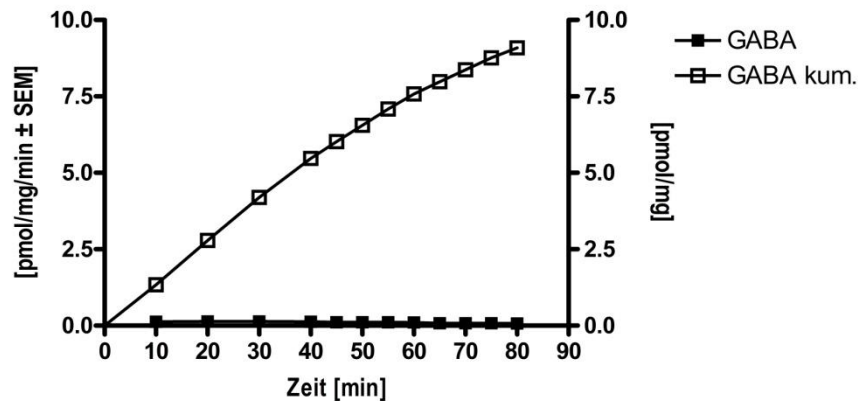
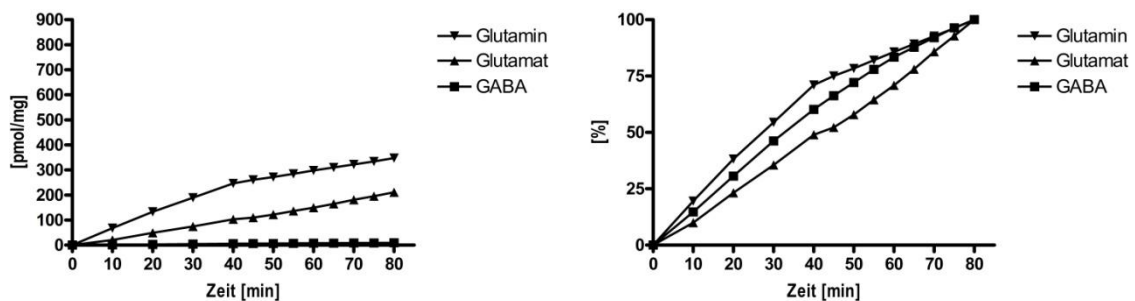


ABBILDUNG 22: GABA-AUSSCHÜTTUNG ANHAND DER MITTELWERTE ± SEM SOWIE KUMULATIV UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) UND UNTER ZUGABE VON 3 µM L-METHIONIN SULFOXIMIN (MIN40-80) BEIM MENSCHEN



ABBILDUNGEN 23 & 24: KUMULATIVE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG IM ZEITLICHEN VERLAUF BEIM MENSCHEN (QUANTITATIV UND PROZENTUAL) UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3 µM L-METHIONIN SULFOXIMIN (MIN40-80)

### 4.3.5. NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER TBOA UND LMS

Nach der simultanen Zugabe von TBOA und LMS in Min40 kam es einerseits zu einem signifikanten Anstieg der Glutamat- ( $p = 0,002$ ;  $F = 18,471$ ) und andererseits zu einer signifikanten Abnahme der Glutamin- ( $p < 0,001$ ;  $F = 181,527$ ) und GABA-Ausschüttung ( $p = 0,011$ ;  $F = 12,897$ ) (siehe Tabellen 17 bzw. 18 sowie Abbildung 25). Hierbei zeigte der Graph der kumulativen Glutaminausschüttung zunächst eine verringerte Steigung, die bis zum Ende des Experiments wieder fast auf das basale Ausgangsniveau anstieg (siehe Abbildungen 26 und 27). Die kumulative Ausschüttung von Glutamat und GABA war linear über die Zeit, entsprechend einer konstanten Neurotransmitterausschüttung mit einer erhöhten Glutamat- und einer verminderten GABA-Ausschüttung im Vergleich zu basalen Bedingungen (siehe Abbildungen 26 und 27).

Zusammengefasst wurde der Effekt (wenn vorhanden, siehe nicht signifikanten Effekt von LMS auf die Glutamat- bzw. von TBOA auf die GABA-Ausschüttung) der einzelnen Zugabe von TBOA bzw. LMS auf die Neurotransmitterausschüttung durch simultane Zugabe von TBOA+LMS jeweils verstärkt.

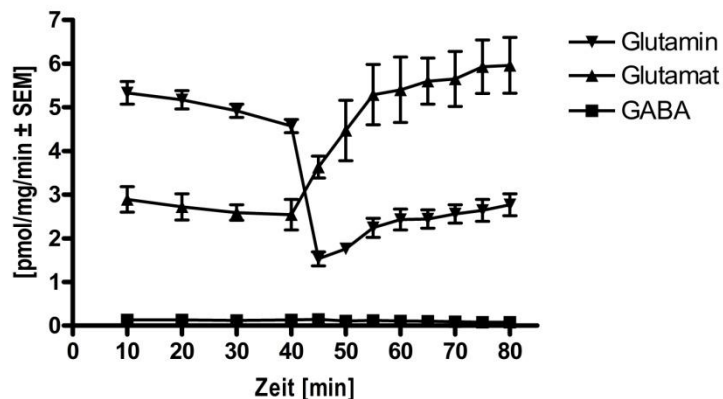
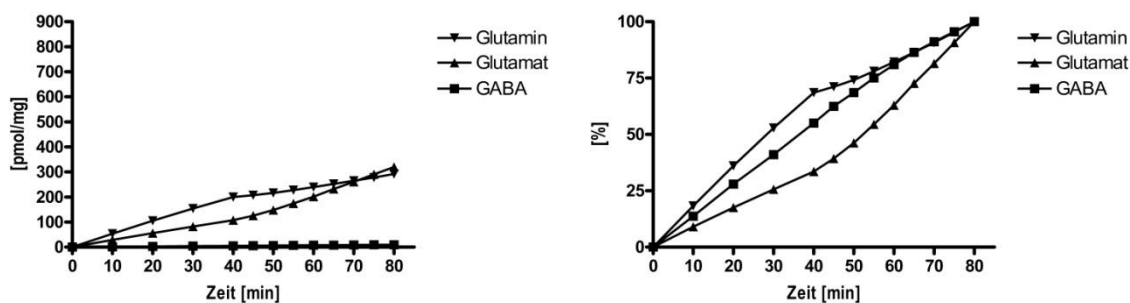


ABBILDUNG 25: MITTELWERTE ± SEM DER NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3 µM DL-THREO-β-BENZYLOXYASPARTAT UND 3 µM L-METHIONIN SULFOXIMIN (MIN40-80) BEIM MENSCHEN



ABBILDUNGEN 26 & 27: KUMULATIVE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG IM ZEITLICHEN VERLAUF BEIM MENSCHEN (QUANTITATIV UND PROZENTUAL) UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3 µM DL-THREO-β-BENZYLOXYASPARTAT UND 3 µM L-METHIONIN SULFOXIMIN (MIN40-80)

### 4.3.6. NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER TBOA, LMS UND TTX

Der simultane Einfluss von TBOA, LMS und TTX ab Min40 führte zu einem signifikanten Anstieg der Glutamat- ( $p = 0,007$ ;  $F = 19,699$ ) sowie zu einer signifikante Abnahme der Glutamin- ( $p < 0,001$ ;  $F = 558,318$ ) und GABA-Ausschüttung ( $p = 0,020$ ;  $F = 9,889$ ). Siehe hierzu die Tabellen 17 bzw. 18 sowie die Abbildung 28. Jeder der Graphen, der die kumulative Ausschüttung von Glutamin, Glutamat oder GABA vor und nach Stimulation darstellt, hat einen linearen Trend und offenbart eine konstante Ausschüttung (siehe Abbildungen 29 und 30).

Während die einzelne Zugabe von TBOA, LMS bzw. TTX auf die Glutamin- und GABA-Ausschüttung einen verringernden oder fehlenden signifikanten Effekt hat, verstärkt die simultane Zugabe von TBOA+LMS+TTX die verringernde Wirkung auf die Neurotransmitterausschüttung. Die Glutamatausschüttung verändert sich unter einzelner Zugabe von LMS nicht signifikant, während sich die Ausschüttung unter TBOA erhöht bzw. unter TTX verringert. Unter simultanem Einfluss von TBOA+LMS+TTX zeigt sich die dominierende, verstärkende Wirkung von TBOA auf die Glutamatausschüttung.

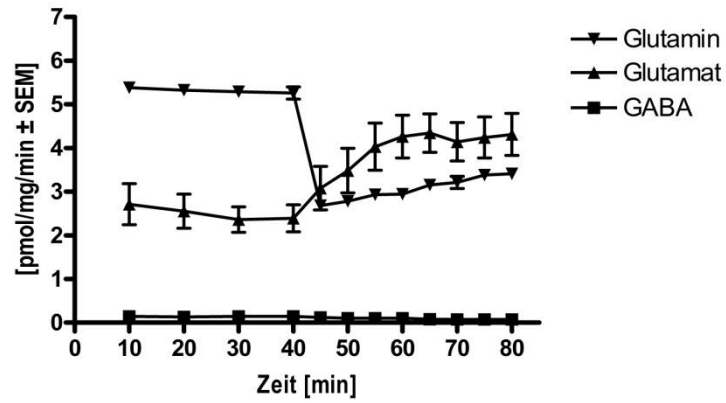
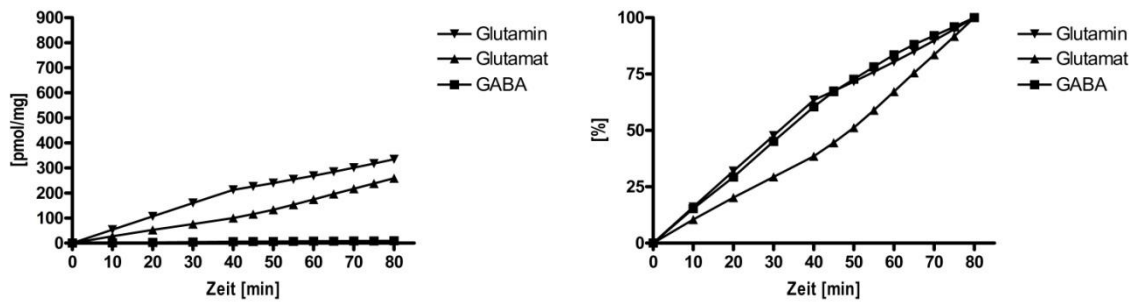


ABBILDUNG 28: MITTELWERTE ± SEM DER NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3 µM DL-THREO-β-BENZYLOXYASPARTAT, 3 µM L-METHIONIN SULFOXIMIN UND 3 µM TETRODOTOXIN (MIN40-80) BEIM MENSCHEN



ABBILDUNGEN 29 & 30: KUMULATIVE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG IM ZEITLICHEN VERLAUF BEIM MENSCHEN (QUANTITATIV UND PROZENTUAL) UNTER BASALEN BEDINGUNGEN (MIN0-40) SOWIE UNTER ZUGABE VON 3 µM DL-THREO-β-BENZYLOXYASPARTAT, 3 µM L-METHIONIN SULFOXIMIN UND 3 µM TETRODOTOXIN (MIN40-80)

## 5. DISKUSSION

### 5.1. VALIDIERUNG DER METHODE DER SUPERFUSION

#### 5.1.1. METHODIK

Für Studien mit menschlichem Gewebe bietet sich aus vielen Gründen die Superfusion an (Gaddum, 1953). Zum einen ist hierbei nur eine geringe Menge Gewebe nötig, wodurch diese Technik ethisch vertretbar bleibt. Der entscheidende Faktor ist jedoch die Tatsache, dass bei der Superfusion natives Gewebe *in vitro* untersucht werden kann. So können nach einer Auswaschphase endogene Neurotransmitter direkt bestimmt werden, was Rückschlüsse auf Speicherkapazitäten und die endogene Beeinflussung verschiedener Neurotransmitter aufeinander zulässt. Hierin unterscheidet sich die Superfusionstechnik essentiell von beispielsweise MRT-gestützten Methoden, bei denen Hirngewebe mit exogen zugeführten, 3H-gelabelten Neurotransmittern inkubiert wird (Harada et al., 2010).

Im Unterschied zu *In-vivo*-Studien bietet die Superfusion zudem den Vorteil die lokalen Bedingungen unmittelbar mit Zusätzen in bekannter Konzentration zu beeinflussen. Dabei wird während des gesamten Experiments stets dieselbe Zellen-Population pro Versuchsreihe untersucht, sodass der Einfluss fremden Gewebes ausgeschlossen und damit eine hohe Spezifität erzeugt wird. Der Einfluss pharmakokinetisch limitierender Eigenschaften auf die eingesetzten Testsubstanzen wie die Bluthirnschranke oder die orale Bioverfügbarkeit von Substanzen wird in der Superfusionstechnik umgangen. So kann die Konzentration der Testsubstanzen vom Untersucher bestimmt werden und ist bekannt.

Limitiert ist die Methode dieser Superfusionsstudie dadurch, dass kein Hirngewebe gesunder menschlicher Kontrollen zur Verfügung steht. Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich Kortex-Gewebe von Probanden mit subkortikalen Hirntumoren verwendet. Der Einfluss der tumorösen Grunderkrankung auf das entnommene Gewebe wurde durch exakte Präparation im gesunden, makroskopisch tumorfreien Gewebe minimiert. Die Vergleichbarkeit der basalen Messreihen an Gewebe einzelner Probanden lässt den Rückschluss auf eine gut reproduzierbare Präparationstechnik sowie die Verlässlichkeit der Methode zu. Auch scheint die Größe des untersuchten Gewebes auszureichen, um mögliche lokale Unterschiede der Zusammensetzung sowie der Dichte an Rezeptoren und Transportern zu kompensieren.

### **5.1.2. VITALITÄT DES GEWEBES**

Während der Superfusionsversuche diente eine jeweils 40-minütige Auswaschphase der Elimination kontaminierender Stoffe sowie dem Ausgleich des durch das Gewebetrauma möglicherweise aus dem Gleichgewicht gebrachten Neurotransmittermilieus. Anschließend wurden über weitere 80 Minuten basale Messreihen bestimmt. In diesen konnte gezeigt werden, dass es unter kontinuierlicher Umspülung mit artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) zu einer messbaren und konstanten Ausschüttung von Glutamat, Glutamin und GABA aus den Gewebeschnitten kam. Die Nachweisbarkeit der Neurotransmitter ist hiermit belegt.

Zum Nachweis der funktionellen Vitalität des Gewebes folgten weitere Versuche. Durch Einsatz von Veratridin (VER), einem Stimulator der spannungsabhängigen Natriumkanäle, wurde eine konstant erhöhte Neurotransmitterausschüttung gezeigt. Diese kann nur Folge einer endogenen Freisetzung sein. Die gute Stimulierbarkeit und der Nachweis der konstanten Neurotransmitterausschüttung in den In-vitro-Versuchen beweisen die funktionelle Vitalität der Gewebeschnitte über die gesamte 120-minütige Dauer der Superfusionsexperimente. Dies ist neben der messbaren und konstanten Ausschüttung der Neurotransmitter ein weiterer Indikator für die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Superfusionsversuche.

## **5.2. VERGLEICHBARKEIT VON EXPERIMENTEN MIT RATTENGEWEBE UND HUMANEM GEWEBE**

Für die Humanmedizin ist die Kenntnis der molekularen Mechanismen für das Verständnis physiologischer sowie pathologischer Vorgänge und die damit verbundenen Möglichkeit zur therapeutischen Intervention von zentraler Bedeutung. Erkenntnisse aus Tierversuchen können jedoch nicht einfach auf den Menschen übertragen werden. Umso wichtiger ist die Untersuchung menschlichen Gewebes, insbesondere als vergleichende Studie mit tierischem und humanem Gewebe, um eine Aussage über die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Spezies machen zu können.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal simultan die Ausschüttung und Interaktion der Neurotransmitter Glutamat und GABA sowie deren Metabolit Glutamin am Kortexgewebe des Menschen im Vergleich zur Ratte untersucht. Als Spezies wurde die Ratte gewählt, da diese neben einer geeigneten Größe des Tieres bezogen auf die Handhabung und Präparation des Gehirns vor allem eine mit dem Menschen vergleichbare Anatomie des zentralen Nervensystems bietet. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen Ergebnissen aus humanen und Rattenexperimenten keine signifikanten Unterschiede bzgl. des Nachweises, der Ausschüttung und der Interaktionen von

Glutamin, Glutamat und GABA bestanden. Somit legt diese Arbeit eine Grundlage, um ähnlichen Studien einen Rückschluss von Ergebnissen aus Tierversuchen mit Ratten auf den Menschen zu erlauben.

### **5.3. BASALE ENDOGENE NEUROTRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG**

Die „dreigeteilte“ Synapse wurde erstmals durch Araque et al. (1999) beschrieben. Diese besteht aus den prä- und postsynaptischen Nervenendigungen sowie der synaptisch assoziierten Gliazelle. Aus der Summe der Vorgänge an synaptischen Transportern, Rezeptoren und glial sowie neuronal assoziierten Enzymen entsteht ein basales Neurotransmitter-Milieu.

In dieser Arbeit konnte eine konstante Ausschüttung an Glutamat, Glutamin und GABA über die gesamte Versuchsdauer nachgewiesen werden. Durch die 40-minütige Auswaschphase und die konstante basale Neurotransmitterkonzentration kann von einer dauerhaften endogenen Synthese ausgegangen werden. Diese spiegelt die Neurotransmitterkonzentrationen im Extrazellulärraum wider (Del Arco et al., 2003; Cavus et al., 2005).

### **5.4. NEUROTRANSMITTERINTERAKTIONEN**

Um die dauerhafte Ausschüttung und Regeneration von Neurotransmittern sowie die Entleerung des synaptischen Spalts von metabolisch aktiven Substanzen zu gewährleisten, bestehen komplexe Kreisläufe, u.a. der Glutamat-Glutamin-Zyklus sowie der Citratzyklus. Diese sind Grundlage zum Verständnis der Erkenntnisse dieser Arbeit und werden im Folgenden erläutert.

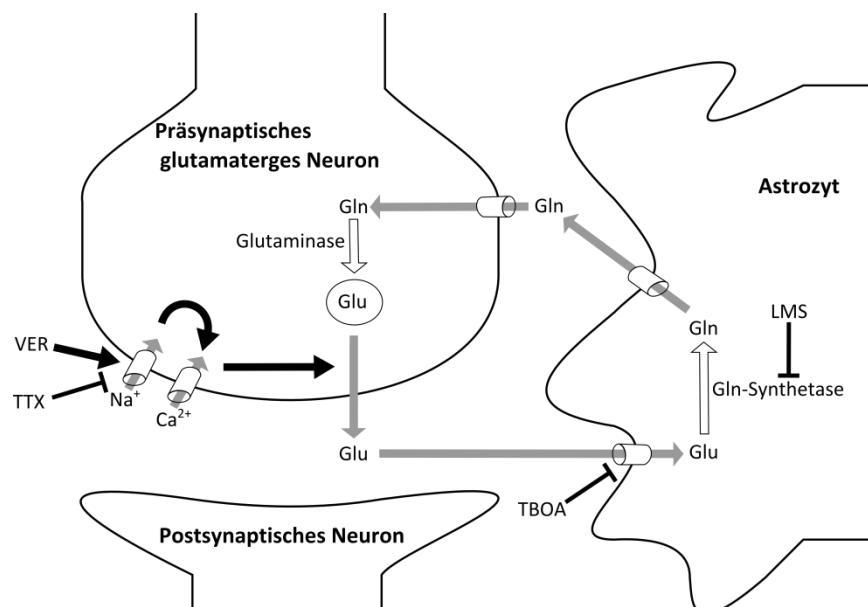
#### **5.4.1. GLUTAMAT-GLUTAMIN-ZYKLUS**

Glutamat wird aus Neuronen vesikulär oder nichtvesikulär freigesetzt und gelangt in den synaptischen Spalt. Dort aktiviert es als exzitatorischer Neurotransmitter verschiedene Glutamatrezeptoren. Transporter exzitatorischer Aminosäuren (EAAT, engl. *excitatory amino acid transporter*, siehe Kapitel 2.3.3.6.1) regulieren die Glutamataufnahme vor allem in Gliazellen, aber auch in Neurone (Danbolt, 2001). Um die Wirkung von Glutamat zu beenden und seine extrazelluläre Konzentration unterhalb der exzitotoxischen Schwelle zu halten, kann Glutamat über die EAATs schnell aus dem EZR entfernt werden. Im Zytosol des Astrozyten wird das Glutamat mittels der gliaspezifischen Glutamin-Synthetase ATP-abhängig in Glutamin umgewandelt. Dieses kann in geringer Konzentration in den EZR und von dort in umliegende Neurone diffundieren (Danbolt, 2001). Zum größten Teil wird Glutamin jedoch über SN1-Transporter aus den Gliazellen befördert (Uwechue et al., 2012). Im glutamatergen Neuron wird Glutamin mitochondrial durch die phosphataktivierte Glutaminase wiederum in Glutamat

überführt. Mithilfe vesikulärer Glutamattransporter (VGLUTs) wird das Glutamat in synaptische Vesikel überführt und darin gespeichert (Benarroch, 2005). Durch diesen Glutamat-Glutamin-Zyklus (siehe Abbildung 31) können die neuronalen Glutamatspeicher wieder aufgefüllt werden (Shigeri et al., 2004). Dieses Vorgehen ist aufgrund der mangelnden anaplerotischen Reaktionswege im Neuron notwendig (Waagepetersen et al., 2003).

Glutamat und Glutamin sind metabolisch zwischen Astrozyt und Neuron kompartimentiert. Dabei ist ausschlaggebend, dass die Glutamin-Synthetase fast ausschließlich in Astrozyten lokalisiert ist, während sich der größere Anteil der phosphataktivierten Glutaminase im Neuron befindet (Bak et al., 2006).

Auch in GABAergen Neuronen hat der Glutamat-Glutamin-Zyklus eine regulierende Funktion. Entsprechend zum oben beschriebenen Mechanismus wird Glutamat über einen EAAT oder GLT-1 in den Astrozyten aufgenommen, wo es über die Glutamin-Synthetase in Glutamin überführt wird. Glutamin wird über System N-Transporter in den EZR freigesetzt und gelangt über System A-Transporter ins GABAerge Neuron. Hier erfolgt die Desaminierung von Glutamin zu Glutamat durch die Glutaminase. Nach der Decarboxylierung von Glutamat zu GABA wird letzteres bis zur Freisetzung vesikulär gespeichert (Liang, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass durch Unterbrechung des Glutamat-Glutamin-Zyklus durch kompetitive Hemmung der Einschleusung von Glutamin mittels Histidin der neuronale GABA-Speicher abnahm (Rae et al., 2003).



**ABBILDUNG 31: GLUTAMAT-GLUTAMIN-ZYKLUS MIT MÖGLICHKEITEN DER BEEINFLUSSUNG MITTELS VER, TTX, TBOA BZW. LMS. GLN = GLUTAMIN, GLN-SYNTHESE = GLUTAMIN-SYNTHESE, GLU = GLUTAMAT, LMS = L-METHIONIN SULFOXIMIN, TBOA = DL-THREO- $\beta$ -BENZYLOXYASPARTAT, TTX = TETRODOTOXIN, VER = VERATRIDIN.**

## 5.4.2. NEUROTRANSMITTERMETABOLISIERUNG IM RAHMEN DES CITRATZYKLUS

Eine Möglichkeit für Neurone Glutamat glutaminunabhängig zu gewinnen, besteht im Citratzyklus (siehe Abbildung 32). Hierbei muss Pyruvat carboxyliert und das entstehende Oxalacetat im Citratzyklus zu  $\alpha$ -Ketoglutarat metabolisiert werden (Bak et al., 2006). Alternativ kann Pyruvat mittels der Pyruvat-Dehydrogenase über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust und hier zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt werden. Dieses wird durch die Glutamat-Dehydrogenase aminiert oder mithilfe einer Transaminase zu Glutamat transaminiert. Der Ursprung der Aminogruppe ist bislang jedoch ungewiss. Sie könnte durch Transaminasen von anderen Aminosäuren wie Alanin, Leucin oder Isoleucin übertragen werden oder durch die Glutaminasereaktion entstehen (Danbolt, 2001). Glutamat kann dann mithilfe der Glutamat-Decarboxylase im Zytoplasma in GABA umgewandelt werden.

Insgesamt werden 60% der GABA-Synthese aus Glutamin im Neuron über Glutamat synthetisiert, das im Citratzyklus metabolisiert wurde (Waagepetersen et al., 2003). Für die graphische Darstellung dieser Prozesse siehe auch Abbildung 32. Entsprechend dient Glutamat, das postsynaptisch in GABAergen Neuronen über dort lokalisierte EAATs aufgenommen wird, als Vorläufer zur Synthese von GABA. Es konnte gezeigt werden, dass Glutamat somit Einfluss auf den vesikulären GABA-Gehalt und dessen Hemmstärke an Synapsen im Hippocampus hat (Shigeri et al., 2004). Als letzter Schritt kann GABA durch die GABA-Transaminase und die Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase zu Succinat umgewandelt werden, welches wiederum im Citratzyklus metabolisiert werden kann (Bak et al., 2006).

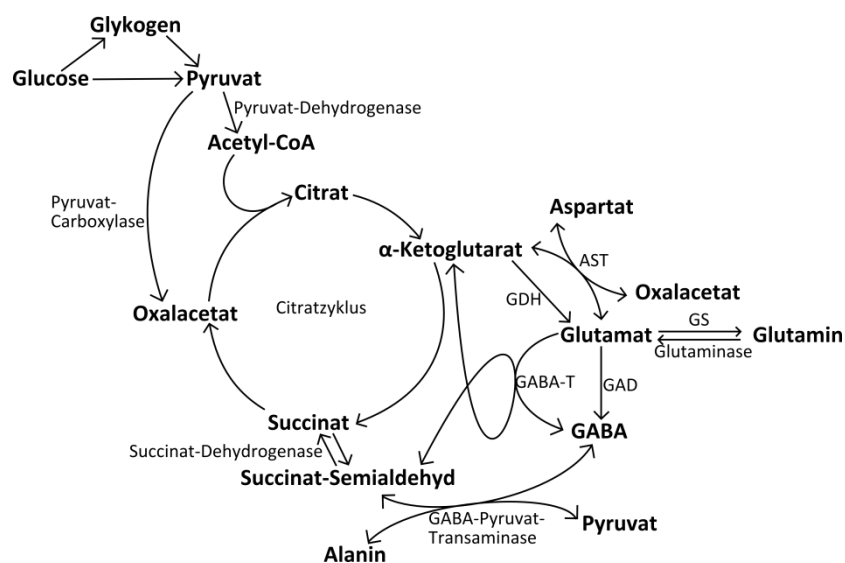


ABBILDUNG 32: METABOLISIERUNG DER NEUROTRANSMITTER GLUTAMAT, GLUTAMIN UND GABA IN VERBINDUNG MIT DEM CITRATZYKLUS. ASAT = ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE, GABA-T = GABA-TRANSAMINASE, GAD = GLUTAMAT-DECARBOXYLASE, GDH = GLUTAMAT-DEHYDROGENASE, GS = GLUTAMIN-SYNTHESE (NUR IM ASTROZYTEN).

Astrozyten beteiligen sich ebenfalls an der Regulation inhibitorischer GABAerger Synapsen. Astrozyten nehmen GABA auf und wandeln es in Succinat um, das in den Citratzyklus einfließt. So entsteht  $\alpha$ -Ketoglutarat, das, wie oben beschrieben, in Glutamat metabolisiert wird (siehe Abbildung 32). Die Umwandlung von Glutamat in GABA ist in Astrozyten nicht möglich (Benarroch, 2005).

### 5.4.3. METABOLISIERUNG VON GABA

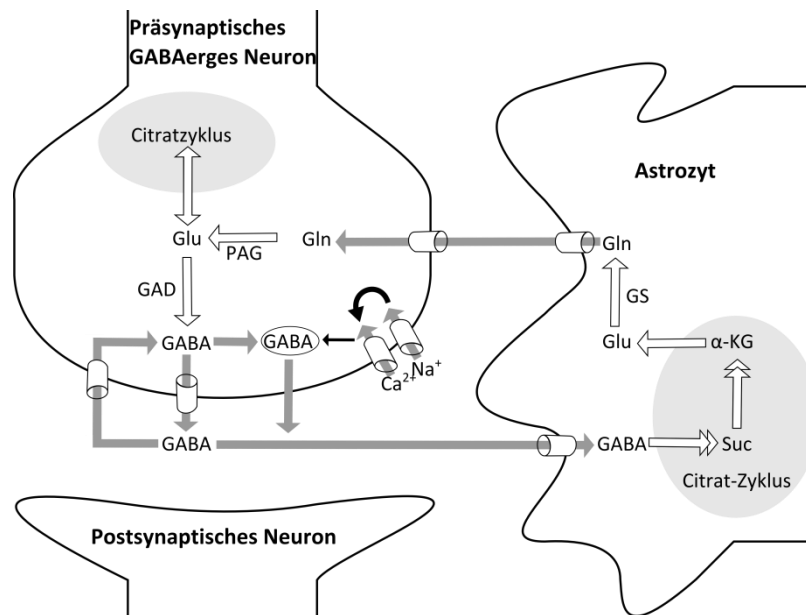


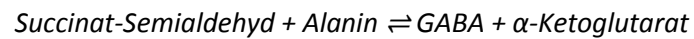
ABBILDUNG 33: GABA-METABOLISMUS. GABA =  $\gamma$ -AMINOBUTTERSÄURE, GAD = GLUTAMAT-DECARBOXYLASE, GLN = GLUTAMIN, GLU = GLUTAMAT, GS = GLUTAMIN-SYNTHESE,  $\alpha$ -KG =  $\alpha$ -KETOGLUTARAT, PAG = PHOSPHAT-AKTIVIERTE GLUTAMINASE, SUC = SUCCINAT.

Die Glutamat-Decarboxylase setzt Glutamat, das im Citratzyklus metabolisiert wurde, zu GABA um und stellt damit bis zu 60% der GABA-Synthese im Interneuron bereit (Liang, 2006). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die präsynaptische Glutamatkonzentration GABAerger Neurone proportional zum vesikulären GABA-Gehalt ist (Mathews und Diamond, 2003). Hiermit wird auch die regulierende Funktion von Glutamat auf die GABA-Ausschüttung deutlich. Dabei stellt die unterstützende Wirkung hoher extrazellulärer Glutamatspiegel auf inhibitorische Signale GABAerger Neurone einen negativen Rückkoppelungsmechanismus dar, womit beispielsweise Exzitotoxizität verhindert werden kann (Mathews und Diamond, 2003).

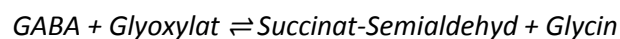
Während in glutamatergen Neuronen Glutamat vorwiegend aus Glutamin hergestellt wird, leistet die GABA-Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt einen weiteren bedeutenden Beitrag zur GABA-Bereitstellung im GABAergen Neuron (Schousboe et al., 2004). Das durch ein GABAerges Neuron ausgeschüttete GABA wird in den meisten Fällen durch eine Wiederaufnahme ins Neuron aus dem synaptischen Spalt entfernt. Hierbei kann GABA über GABA-Transporter wieder zurück in

die Interneurone aufgenommen werden. GABA kann allerdings auch von umliegenden Astrozyten aufgenommen werden (siehe Abbildung 33).

Es gibt jedoch noch alternative Metabolisierungswege von GABA, die zum Teil graphisch in Abbildung 33 dargestellt sind. Hierbei ist einerseits die GABA-Transaminase bekannt (Schousboe et al., 1973). Das hierfür notwendige Succinat-Semialdehyd entstammt dem Succinat aus dem Citratzyklus:



Die GABA-Pyruvat-Transaminase kann zwei verschiedene Reaktionen katalysieren, die ebenfalls zur Herstellung von GABA dienen. Glyoxylat wiederum kann über Oxalacetat in den Citratzyklus eingeschleust werden (Clark et al., 2009; Shelp et al., 1999). Die Reaktionswege der GABA-Pyruvat-Transaminase sind im Folgenden dargestellt:



## 5.5. INTERAKTIONEN ZWISCHEN GLUTAMAT UND GABA

Glutamat und GABA sind die jeweils wichtigsten exzitatorischen bzw. inhibitorischen Neurotransmitter im zerebralen Kortex. Zusammen bilden sie 90% aller kortikalen Synapsen (Peters und Jones, 1984), wobei es fünffach mehr exzitatorische als inhibitorische Synapsen gibt (Beaulieu und Colonnier, 1985). Dies zeigt die Bedeutung der Exzitation im ZNS auf.

Die glutamatergen und GABAergen Prozesse der Neurotransmission werden durch die Neurotransmitterausschüttung und deren Wirkung an der post- und teils auch an der präsynaptischen Membran initiiert. Der synaptische Spalt wird dann hauptsächlich durch Wiederaufnahme der Neurotransmitter in Astrozyten oder in das präsynaptische Neuron wieder geleert.

### 5.5.1. BASALER EXZITATORISCHER ÜBERHANG

Unter basalen Bedingungen zeigte sich eine deutlich höhere Glutamat- als GABA-Ausschüttung mit einem Glutamat:GABA-Quotienten von 20:1. Ähnliche Ergebnisse erzielten Cataltepe et al. (1996), die einen basalen Glutamat:GABA-Quotienten von ca. 20-30:1 im mittels Lumbalpunktion gewonnenem humanen Liquor cerebrospinalis bestimmten. Hieraus folgt ein basaler exzitatorischer Überhang im Extrazellulärraum des Kortex. Diese Beobachtung wird durch

Waagepetersen et al. (2008) und Kaura et al. (1995) gestützt, die die Neurotransmitterausschüttung aus superfundierten zerebralen Kortexschnitten der Maus bzw. den Gehalt und die Ausschüttung von Aminosäuren aus dem Corpus amygdaloideum der Ratte untersuchten.

### **5.5.2. DEPOLARISATIONSABHÄNGIGE GLUTAMAT- UND GABA-AUSSCHÜTTUNG**

Tetrodotoxin (TTX) blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle und inhibiert somit die Impulsfortleitung entlang der Axone sowie die vesikuläre Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt (Levi et al., 1980; Santos et al., 1992). Die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass TTX die Glutamat- und GABA-Ausschüttung signifikant reduziert und somit ein Großteil der Glutamat- und GABA-Ausschüttung depolarisationsabhängig ist. Gemäß der verringerten Ausschüttung müsste es sich um ca. 30 % der Glutamat- und ca. 50 % der GABA-Ausschüttung handeln. Es zeigte sich, dass die Neurotransmitterausschüttung nach Zugabe von TTX nicht vollständig sistiert. Dies könnte auf eine inkomplette Hemmung der Natriumkanäle durch eine unzureichende TTX-Dosis, auf nichtvesikuläre Ausschüttung oder auch auf einen Neurotransmitterausstrom durch präparationsbedingte Verletzung des untersuchten Gewebes zurück geführt werden (Attwell et al., 1993).

### **5.5.3. FEEDBACK-MECHANISMUS ALS SCHUTZ VOR EXZITOTOXIZITÄT**

Durch Einsatz von VER, das spannungsabhängige Natriumkanäle aktiviert (Danbolt, 2001; Neusch et al., 2000), kam es in der vorliegenden Arbeit zu einer deutlichen depolarisationsabhängigen Neurotransmitterausschüttung. Hierbei stieg die GABA-Konzentration stärker an als die Glutamatkonzentration, sodass dem exzitatorischen Überhang unter basalen Bedingungen eine ausgeglichene inhibitorische und exzitatorische neuronale Aktivität folgte. Sowohl in humanen als auch in Kortexschnitten der Ratte konnte bereits zuvor eine verstärkte GABA-Ausschüttung unter Einsatz von VER gezeigt werden (Kammerer et al., 2011; Li et al., 2004, 2006). Vermutlich soll der Ausgleich neuronaler Aktivität durch vermehrte GABA-Ausschüttung in Folge erhöhter Glutamat-Spiegel eine Exzitotoxizität durch Glutamat verhindern. Diesbezüglich konnten Potapenko et al. (2013) mittels Patch-Clamp-Technik einen Feedback-Mechanismus nachweisen, bei dem die vermehrte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch erhöhte Glutamat-Spiegel zu erhöhter GABA<sub>A</sub>-Rezeptoraktivität und verstärkter GABA-Ausschüttung führt.

## **5.6. GLUTAMINABHÄNGIGE REGULATION DER AUSSCHÜTTUNG VON GLUTAMAT UND GABA**

Bislang wurde davon ausgegangen, dass Glutamin weder toxische Effekte hat, noch Glutamatrezeptoren stimuliert und daher keinen direkten Einfluss auf die Neurotransmission hat (Danbolt, 2001). Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten jedoch wichtige regulierende Einflüsse von Glutamin auf die Neurotransmitterinteraktionen nachgewiesen werden, was im Folgenden aufgearbeitet wird.

### **5.6.1. FUNKTIONEN VON GLUTAMIN**

In Astrozyten hat Glutamin vorwiegend zwei Funktionen: Erstens dient es der Wiederauffüllung der Glutamatspeicher im Neuron im Rahmen des sogenannten Glutamat-Glutamin-Zyklus (siehe Abbildung 31). Zweitens ist es zur Entgiftung von Ammoniak im ZNS unerlässlich, da im ZNS kein ausreichender Harnstoffzyklus vorhanden ist (Suárez et al., 2002). Diese Reaktion wird durch die gliaspezifische (Ottersen et al., 1992) und vorwiegend astrozytäre Glutamin-Synthetase katalysiert, die im Zytosol unter ATP-Verbrauch aus Ammoniak und Glutamat Glutamin herstellt (Benarroch, 2005).

Außerdem trägt Glutamin durch Einschleusung in den Citratzyklus zur Energiebereitstellung bei. Hierbei metabolisiert die Glutaminase Glutamin zu Glutamat, das wiederum durch die Glutamat-Dehydrogenase in  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt wird. In-vivo-Studien haben ergeben, dass die Energiegewinnung im Sinne der Metabolisierung von Glutamin zu  $\text{CO}_2$  eine größere Rolle spielt als bislang angenommen (Zielke et al., 2002).

Bei den Transaminierungsvorgängen wird im Neuron bei der Desaminierung von Glutamin zu Glutamat ein Ammoniumion abgespalten, während im Astrozyten Glutamat zu Glutamin aminiert wird, wobei ein Ammoniumion verbraucht wird. Da eine erhöhte Ammoniakkonzentration toxisch im Neuron wirken kann, müssen Ammoniumionen aus dem Neuron ausgeschleust und von Astrozyten aufgenommen werden (Bak et al., 2006).

### **5.6.2. GLUTAMINTRANSPORTER**

Zwei verschiedene Glutamintransportergruppen sorgen für die Aufrechterhaltung einer stabilen extrazellulären Glutaminkonzentration sowie für eine ausreichende Versorgung von Neuronen mit Glutamin zur Neurotransmittermetabolisierung: Der System N Transporter SN1 ist perisynaptisch an Astrozyten lokalisiert (Solbu et al., 2010). Er ist für die spezifische Freisetzung der Aminosäuren Glutamin, Histidin und Asparagin zuständig mit begleitendem  $\text{Na}^+$ -Cotransport und Protonantiport

(Reimer et al., 2000). Dabei ist der Transport auch abhängig von der jeweiligen extrazellulären Konzentration der Aminosäuren, sodass dieser Transporter an der Aufrechterhaltung eines physiologischen Neurotransmittermilieus beteiligt ist (Reimer et al., 2000). Physiologischerweise findet eine Ausschüttung von Glutamin aus der Zelle statt, prinzipiell ist jedoch ein bidirektionaler Transport möglich (Jenstad et al., 2009). Der System A Transporter SA1 sorgt für eine  $\text{Na}^+$ -abhängige Aufnahme neutraler Aminosäure, wie Glutamin, aber auch Alanin und Serin (Reimer et al., 2000). SA1 ist an Zellkörper sowie an Axonen und Dendriten glutamatergen Neuronen zugeordnet und ermöglicht damit zusammen mit dem SN1 den Shuttle von Glutamin von der Gliazelle ins Neuron, z. B. im Rahmen des Glutamat-Glutamin-Zyklus (Jenstad et al., 2009; Solbu et al., 2010). Dadurch, dass der Glutamintransport über SA1 im Gegensatz zu SN1 nicht an einen  $\text{H}^+$ -Antiport gekoppelt ist, kann beim SA1 sowohl der elektrische wie auch der chemische  $\text{Na}^+$ -Gradient genutzt werden, wodurch ein stärkerer Glutaminkonzentrationsgradient erzeugt werden kann (Jenstad et al., 2009). Der System A Transporter SA2 ist ebenfalls ein Glutamintransporter. Dieser wird am Zellkörper sowie an Axonen GABAerger Neurone exprimiert (Solbu et al., 2010).

### **5.6.3. GLUTAMINABHÄNGIGE REGULATION DER GLUTAMATKONZENTRATION**

#### **5.6.3.1. BASALER GLUTAMAT:GLUTAMIN-QUOTIENT**

Die intragliale Metabolisierung von Glutamat zu Glutamin durch die Glutamin-Synthetase ist bereits gut untersucht (Shank und Campbell, 1984). Außerdem ist bekannt, dass Glutamintransporter das in den Gliazellen entstehende Glutamin in den synaptischen Spalt ausschütten. Als letzter Schritt des sogenannten Glutamat-Glutamin-Zyklus wird Glutamin von Neuronen aufgenommen, wo es als wichtigste Vorstufe für die Produktion von sowohl Glutamat als auch GABA dient (Rae et al., 2003). In unseren Experimenten war der unter basalen Bedingungen bestimmte Glutamat:Glutamin-Quotient von 1:2 auch unter Hemmung der vesikulären Glutamatausschüttung durch Zugabe von TTX stabil.

#### **5.6.3.2. EAAT-VERMITTELTE REGULATION DER EXTRAZELLULÄREN GLUTAMATKONZENTRATION**

Für die Aufrechterhaltung eines stabilen Glutamat:Glutamin-Quotienten von 1:2 auch unter Zugabe von TTX weist auf einen bislang nicht näher beschriebenen Regulationsmechanismus hin. Dieser könnte durch das von Bröer et al. (2004) beschriebene Zusammenspiel zwischen der extrazellulären Glutamatkonzentration und der Aktivität der glialen System N Glutamintransporter (SN1), die eine Glutaminausschüttung hervorrufen, erklärt werden. Nach

Uwechue et al. (2012) führt eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration zur Aktivierung glialer EAATs, die wiederum die Funktion des SN1-Systems perisynaptischer Astrozyten triggern. Auch Martínez-Lozada et al. (2013) konnten in Kulturen zerebellärer Bergmann-Gliazellen von Hühnern einen Zusammenhang zwischen EAAT-1 und SN-1 (SNAT3) nachweisen. Diese Ergebnisse unterstützen unsere These, dass extrazelluläres Glutamat über die EAATs zu einer starken Aktivierung des Glutamat-Glutamin-Zyklus führt, um so den Nachschub für weitere Glutamatsynthese zu sichern. Wir setzten daher DL-threo- $\beta$ -Benzyloxyaspartat (TBOA) ein, um das EAAT-System zu blockieren. Dabei kam es zu einem Absinken der extrazellulären Glutaminkonzentration. Gleichzeitig konnte ein Glutamatanstieg beobachtet werden, sodass es annäherungsweise zu einer Umkehr des Glutamat:Glutamin-Quotienten kam. Hiermit wird die Annahme bestätigt, dass die durch die extrazelluläre Glutamatkonzentration stimulierte Aktivierung der EAATs zu einer intrinsischen Aktivierung der glialen SN1 Glutamintransporter führt. Es wird davon ausgegangen, dass TBOA sowohl die Aktivität beider Transportersysteme inhibiert als auch die intragliale Glutamatkonzentration verringert, sodass es zu einer geringeren enzymatischen Synthese von Glutamin kommt.

Obwohl der einzelne Zusatz des spezifischen Glutamin-Synthetase-Inhibitors L- Methionin sulfoximin (LMS) zum Inkubationsmedium keinen signifikanten Effekt auf die Glutamatausschüttung zeigte, kam es unter simultaner Zugabe von LMS+TBOA zu einer konstant erhöhten Glutamatausschüttung. Hierbei wurde jedoch nur rund 60% der Glutamatausschüttung erreicht, die unter alleinigem Einsatz von TBOA beobachtet wurde. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beweis dafür, dass Glutamat, insbesondere im Zustand gefüllter Glutamatspeicher, mithilfe der EAATs in Gliazellen transportiert werden muss. So kann die Glutamatsynthese aufrechterhalten werden, die mit Glutamin als Glutamatvorstufe für den Nachschub des Glutamats unerlässlich ist. Das EAAT-System erscheint daher essentiell für die Aufrechterhaltung einer stabilen extrazellulären Glutamatkonzentration.

#### **5.6.4. GLUTAMINABHÄNGIGE REGULATION DER GABA-KONZENTRATION**

Unter LMS verringerte sich der extrazelluläre Glutamat- und GABA-Spiegel in unseren Experimenten. Eine einfache Erklärung hierfür ist der reduzierte Glutaminnachschub. Da die Abnahme der GABA-Ausschüttung jedoch nicht linear über die Zeit war, scheint die Glutaminzufuhr für die GABA-Produktion gedrosselt zu sein, sobald die Glutamatsynthese nicht sichergestellt ist.

### **5.7. INTRAZELLULÄRER GLUTAMINSPEICHER**

Durch Blockade der EAATs mit TBOA kommt es zu einer signifikant verringerten Glutaminkonzentration durch Hemmung der für die intrazelluläre gliale Glutaminsynthese essentiellen Glutamatzufuhr. Folglich könnte die unter TBOA verringerte Glutaminkonzentration auf einen kleinen intragialen Glutamin-Pool hinweisen. Diese These wird von zwei weiteren Ergebnissen gestützt. Erstens führte die VER-induzierte stark erhöhte Glutamatausschüttung zum Erliegen der Glutaminausschüttung nach längerer Inkubationszeit. Zweitens kam es zu einem schnellen Absinken der Glutaminausschüttung unter Einsatz des Glutamin-Synthetase-Inhibitors LMS.

### **5.8. AUSBLICK**

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede der Neurotransmitterausschüttung zwischen Ratten- und humanem Gewebe festgestellt werden. Die untersuchten Neurotransmitterinteraktionen sowie das Transporter- und Rezeptorverhalten erscheinen daher bei Ratte und Mensch vergleichbar, was Rückschlüsse von Ergebnissen aus Tierversuchen mit Ratten auf den Menschen erlaubt.

Aufbauend auf zahlreiche bestehende Studien an Ratten werden auch zukünftige Studien von den Erkenntnissen des Vergleichs von Vorgängen an Ratten- und Menschengewebe dieser Arbeit profitieren können.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Vorgänge an Neuronen und Gliazellen sind maßgeblich durch die Ausschüttung der wichtigsten exzitatorischen bzw. inhibitorischen Neurotransmitter Glutamat und GABA sowie deren Zwischenstufe Glutamin bestimmt. In dieser Arbeit wurden native Gewebeschnitte aus dem zerebralen Kortex von Ratte und Mensch mittels Superfusion verschiedenen Pufferlösungen ausgesetzt. Hierbei wurde ein physiologisches Milieu mit ebenfalls physiologischer Neurotransmitterausschüttung und -interaktionen angestrebt. Neben der Messung der basalen Neurotransmitterfreisetzung wurden die Experimente unter Zusatz verschiedener Additiva durchgeführt. So wurden Rezeptoren stimuliert bzw. inhibiert und so die synaptischen Regelkreise entscheidend beeinflusst. Aus den aufgefangenen Pufferproben wurden Glutamat, Glutamin und GABA mittels HPLC aufgetrennt und durch elektrochemische Detektion quantifiziert.

Diese Arbeit konnte eine konstante Neurotransmitterausschüttung sowie eine konstante Stimulierbarkeit des nativen zerebralen Kortexgewebes nachweisen. So gelang es die gewählte Methode der Superfusion zu validieren. Zudem wurde erstmals simultan die endogene Ausschüttung von Glutamat, GABA und Glutamin in nativen humanen Kortexschnitten im Vergleich zur Ratte nachgewiesen und verglichen. Die Experimente an kortikalen Hirnschnitten der Ratte sowie des Menschen lieferten miteinander vergleichbare Ergebnisse *in vitro*, sodass von einer Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen mit Ratten auf den Menschen ausgegangen werden kann.

Insgesamt gibt diese Arbeit einen eindeutigen Nachweis der Interaktionen der Neurotransmitter Glutamat und GABA. Während basal ein exzitatorischer Überhang vorliegt, greift bei weiter steigender Glutamatkonzentration ein Feedback-Mechanismus, der kompensatorisch die GABA-Ausschüttung erhöht. Zudem konnte eine glutaminabhängige Regulation der Ausschüttung von Glutamat und GABA nachgewiesen werden. Eine über exzitatorische Aminosäuretransporter (EAAT) vermittelte Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration scheint die Zelle vor schädigender Exzitotoxizität zu bewahren. Dabei könnten SN1-Glutamintransporter EAAT- vermittelt die Aufrechterhaltung des basalen Glutamat:Glutamin-Quotienten von 1:2 bewirken. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei der Glutamat-Glutamin-Zyklus. Es ergaben sich zudem Hinweise auf einen kleinen intrazellulären Vorrat an Glutamin, das als Vorstufe für Glutamat sowie GABA essentiell ist.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22, 208–215

Del Arco A, Segovia G, Fuxe K, Mora F (2003) Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 85, 23–33

Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11, 401–407

Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513, 532–541

Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98, 641–653

Barnes S, Leighton GE, Davies JA (1988) A novel superfusion chamber for the measurement of endogenous glutamate release from cerebellar slices. *J Neurosci Methods* 23, 57–61

Beaulieu C, Colonnier M (1985) A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat. *J Comp Neurol* 231, 180–189

Bélangier M, Magistretti PJ (2009) The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* 11, 281–295

Benarroch EE (2005) Neuron-Astrocyte Interactions: Partnership for Normal Function and Disease in the Central Nervous System. *Mayo Clinic Proceedings* 80, 1326–1338

Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues (Leipzig)

Bröer A, Deitmer JW, Bröer S (2004) Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia* 48, 298–310

Campbell AW (1904) Histological Studies on the Localisation of Cerebral Function. *BJP* 50, 651–662

Castillo MR, Babson JR (1998) Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms of cell injury in cultured cortical neurons. *Neuroscience* 86, 1133–1144

Cataltepe O, Towfighi J, Vannucci RC (1996) Cerebrospinal fluid concentrations of glutamate and GABA during perinatal cerebral hypoxia-ischemia and seizures. *Brain Research* 709, 326–330

Cavus I, Kasoff WS, Cassaday MP, Jacob R, Gueorguieva R, Sherwin RS, Krystal JH, Spencer DD, Abi-Saab WM (2005) Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol* 57, 226–235

Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, John CA, Beart PM (1998) Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology* *37*, 1419–1429

Clark SM, Di Leo R, Dhanoa PK, Van Cauwenberghe OR, Mullen RT, Shelp BJ (2009) Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsis gamma-aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. *J Exp Bot* *60*, 1743–1757

Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* *262*, 689–695

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* *65*, 1–105

Fodstad H (2001) The neuron theory. *Stereotact Funct Neurosurg* *77*, 20–24

Gaddum JH (1953) The technique of superfusion. *Br J Pharmacol Chemother* *8*, 321

Giocomo LM, Hasselmo ME (2007) Neuromodulation by glutamate and acetylcholine can change circuit dynamics by regulating the relative influence of afferent input and excitatory feedback. *Mol Neurobiol* *36*, 184–200

Gladding CM, Fitzjohn SM, Molnár E (2009) Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. *Pharmacol Rev* *61*, 395–412

Grewer C, Watzke N, Wiessner M, Rauen T (2000) Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proc Natl Acad Sci USA* *97*, 9706–9711

Harada M, Taki MM, Nose A, Kubo H, Mori K, Nishitani H, Matsuda T (2010) Non-Invasive Evaluation of the GABAergic/Glutamatergic System in Autistic Patients Observed by MEGA-Editing Proton MR Spectroscopy Using a Clinical 3 Tesla Instrument. *J Autism Dev Disord* *41*, 447–454

Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* *3*, 31

Hiller A, Loeffler S, Haupt C, Litza M, Hofmann U, Moser A (2007) Electrical high frequency stimulation of the caudate nucleus induces local GABA outflow in freely moving rats. *J Neurosci Methods* *159*, 286–290

Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 8733–8738

Jenstad M, Quazi AZ, Zilberter M, Haglerød C, Berghuis P, Saddique N, Goiny M, Buntup D, Davanger S, S Haug F-M (2009) System A transporter SAT2 mediates replenishment of dendritic glutamate pools controlling retrograde signaling by glutamate. *Cereb Cortex* *19*, 1092–1106

Johnson HA, Goel A, Buonomano DV (2010) Neural dynamics of in vitro cortical networks reflects experienced temporal patterns. *Nat Neurosci* *13*, 917–919

Jursky F, Tamura S, Tamura A, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1994) Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J Exp Biol* *196*, 283–295

- Kammerer M, Rassner MP, Freiman TM, Feuerstein TJ (2011) Effects of antiepileptic drugs on GABA release from rat and human neocortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384, 47–57
- Kaura S, Bradford HF, Young AM, Croucher MJ, Hughes PD (1995) Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vivo and in vitro studies. *J Neurochem* 65, 1240–1249
- Laughlin SB, Sejnowski TJ (2003) Communication in Neuronal Networks. *Science* 301, 1870–1874
- Levi G, Gallo V, Raiteri M (1980) A reevaluation of veratridine as a tool for studying the depolarization-induced release of neurotransmitters from nerve endings. *Neurochem Res* 5, 281–295
- Li T, Qadri F, Moser A (2004) Neuronal electrical high frequency stimulation modulates presynaptic GABAergic physiology. *Neurosci Lett* 371, 117–121
- Li T, Thümen A, Moser A (2006) Modulation of a neuronal network by electrical high frequency stimulation in striatal slices of the rat in vitro. *Neurochem Int* 48, 83–86
- Liang S-L (2006) Dynamic Regulation of Synaptic GABA Release by the Glutamate-Glutamine Cycle in Hippocampal Area CA1. *Journal of Neuroscience* 26, 8537–8548
- Liu J, Liu MC, Wang KKW (2008) Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity. *Sci Signal* 1, re1
- Löffler SK (2008) Charakterisierung der durch Hochfrequenzstimulation induzierten GABA-Freisetzung im Corpus Striatum der Ratte in vivo. Master's Thesis, Universität zu Lübeck
- Lothar T (1998) Clinical laboratory diagnostics : use and assessment of clinical laboratory results (TH-Books)
- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17, 569–602
- Maeno-Hikichi Y, Tanaka K, Shibata T, Watanabe M, Inoue Y, Mukainaka Y, Wada K (1997) Structure and functional expression of the cloned mouse neuronal high-affinity glutamate transporter. *Brain Res Mol Brain Res* 48, 176–180
- Mantovani M, Van Velthoven V, Fuellgraf H, Feuerstein TJ, Moser A (2006) Neuronal electrical high frequency stimulation enhances GABA outflow from human neocortical slices. *Neurochem Int* 49, 347–350
- Mantovani M, Moser A, Haas CA, Zentner J, Feuerstein TJ (2009) GABA(A) autoreceptors enhance GABA release from human neocortex: towards a mechanism for high-frequency stimulation (HFS) in brain? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380, 45–58
- Martínez-Lozada Z, Guillem AM, Flores-Méndez M, Hernández-Kelly LC, Vela C, Meza E, Zepeda RC, Caba M, Rodríguez A, Ortega A (2013) GLAST/EAAT1-induced glutamine release via SNAT3 in Bergmann glial cells: evidence of a functional and physical coupling. *J Neurochem* 125 545–554
- Mathews GC, Diamond JS (2003) Neuronal Glutamate Uptake Contributes to GABA Synthesis and Inhibitory Synaptic Strength. *J Neurosci* 23, 2040–2048

Mechelli A, Friston KJ, Frackowiak RS, Price CJ (2005) Structural covariance in the human cortex. *J Neurosci* 25, 8303–8310

Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130, 1007S – 15S

Moser A, Siebecker F, Vieregge P, Jaskowski P, Kömpf D (1996) Salsolinol, catecholamine metabolites, and visual hallucinations in L-dopa treated patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 103, 421–432

Mountcastle V (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120, 701–722

Münch C, Ebstein M, Seefried U, Zhu B, Stamm S, Landwehrmeyer GB, Ludolph AC, Schwalenstöcker B, Meyer T (2002) Alternative splicing of the 5'-sequences of the mouse EAAT2 glutamate transporter and expression in a transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* 82, 594–603

Nakamura S, Hochwald GM (1983) Spinal fluid formation and glucose influx in normal and experimental hydrocephalic rats. *Exp Neurol* 82, 108–117

Neusch C, Böhme V, Riesland N, Althaus M, Moser A (2000) The dopamine D2 receptor agonist alpha-dihydroergocryptine modulates voltage-gated sodium channels in the rat caudate-putamen. *J Neural Transm* 107, 531–541

Ottersen OP, Zhang N, Walberg F (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46, 519–534

Parker D (2006) Complexities and uncertainties of neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 81–99

Patel AB, de Graaf RA, Mason GF, Rothman DL, Shulman RG, Behar KL (2005) The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5588–5593

Peters A, Jones EG (1984) *Cerebral Cortex: Volume 1: Cellular Components of the Cerebral Cortex* (New York: Springer)

Potapenko ES, Biancardi VC, Zhou Y, Stern JE (2013) Astrocytes Modulate a Postsynaptic NMDA–GABAA-Receptor Crosstalk in Hypothalamic Neurosecretory Neurons. *J Neurosci* 33, 631–640

Rae C, Hare N, Bubb WA, McEwan SR, Bröer A, McQuillan JA, Balcar VJ, Conigrave AD, Bröer S (2003) Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: further evidence for metabolic compartmentation. *J Neurochem* 85, 503–514

Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH (2000) Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 7715–7720

Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 942–964

Saier MH (1999) Eukaryotic transmembrane solute transport systems. *Int Rev Cytol* 190, 61–136

- Santos MS, Rodriguez R, Carvalho AP (1992) Effect of depolarizing agents on the Ca(2+)-independent and Ca(2+)-dependent release of [3H]GABA from sheep brain synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 44, 301–308
- Schousboe A (2003) Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res* 28, 347–352
- Schousboe A, Wu JY, Roberts E (1973) Purification and characterization of the 4-aminobutyrate--2,ketoglutarate transaminase from mouse brain. *Biochemistry* 12, 2868–2873
- Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS, Larsson OM (2004) Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Int* 45, 521–527
- Shalla CL, Fisher AK (1971) Buffering Action of Krebs-Ringer-Phosphate Solutions in Respiration Studies of Dental Pulp. *J Dent Res* 50, 116–118
- Shank RP, Campbell GL (1984) Glutamine, glutamate, and other possible regulators of alpha-ketoglutarate and malate uptake by synaptic terminals. *J Neurochem* 42, 1162–1169
- Shashidharan P, Huntley GW, Meyer T, Morrison JH, Plaitakis A (1994) Neuron-specific human glutamate transporter: molecular cloning, characterization and expression in human brain. *Brain Res* 662, 245–250
- Shelp BJ, Bown AW, McLean MD (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4, 446–452
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45, 250–265
- Shipp S (2007) Structure and function of the cerebral cortex. *Curr Biol* 17, R443–R449
- Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2, 795–816
- Sihra TS, Flores G, Rodríguez-Moreno A (2013) Kainate Receptors: Multiple Roles in Neuronal Plasticity. *Neuroscientist* 20, 29-43
- Simons M, Trajkovic K (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119, 4381–4389
- Smith GE (1927) Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen. *J Anat* 61, 264–266
- Smith SE, Sharp T (1994) An investigation of the origin of extracellular GABA in rat nucleus accumbens measured in vivo by microdialysis. *J Neural Transm Gen Sect* 97, 161–171
- Solbu TT, Bjørkmo M, Berghuis P, Harkany T, Chaudhry FA (2010) SAT1, A Glutamine Transporter, is Preferentially Expressed in GABAergic Neurons. *Front Neuroanat* 4, 1
- Steffens AB, Scheurink AJ, Porte D, Woods SC (1988) Penetration of peripheral glucose and insulin into cerebrospinal fluid in rats. *Am J Physiol* 255, R200–R204

- Suárez I, Bodega G, Fernández B (2002) Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int* 41, 123–142
- Tahirovic S, Bradke F (2009) Neuronal Polarity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, a001644–a001644
- Unger K (1989) *Handbuch der HPLC* (Darmstadt: GIT Verl)
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271, 14883–14890
- Uwechue NM, Marx M-C, Chevy Q, Billups B (2012) Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol (Lond)* 590, 2317–2331
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Schousboe A (2003) Compartmentation of glutamine, glutamate, and GABA metabolism in neurons and astrocytes: functional implications. *Neuroscientist* 9, 398–403
- Waagepetersen HS, Døring S, Schousboe A (2008) Metabolism of [1,6-(13)C]glucose and [U-(13)C]glutamine and depolarization induced GABA release in superfused mouse cerebral cortical mini-slices. *Neurochem Res* 33, 1610–1617
- Warringa RA, van Berlo MF, Klein W, Lopes-Cardozo M (1988) Cellular location of glutamine synthetase and lactate dehydrogenase in oligodendrocyte-enriched cultures from rat brain. *J Neurochem* 50, 1461–1468
- Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol Rev* 85, 1159–1204
- Yaksh TL (2004) Intrathecal Ketorolac in Dogs and Rats. *Toxicological Sciences* 80, 322–334
- Zielke HR, Collins RM, Baab PJ, Huang Y, Zielke CL, Tildon JT (2002) Compartmentation of [14C]Glutamate and [14C]Glutamine Oxidative Metabolism in the Rat Hippocampus as Determined by Microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 71, 1315–1320
- Zilles K, Palomero-Gallagher N, Schleicher A (2004) Transmitter receptors and functional anatomy of the cerebral cortex. *Journal of Anatomy* 205, 417–432

## **8. DANKSAGUNG**

## **9. LEBENS LAUF**