

# Kinetik und molekulare Mechanismen des Plasmamembran Glutamattransports

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

Vorgelegt im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann  
Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main

Von Carsten Mim aus Gießen

Frankfurt am Main

2006

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1. Glutamattransporter in mehrzelligen Eukaryoten und im Nervensystem	6
1.2. Physiologische Bedeutung der Glutamattransporter	8
1.2.1. Pathologische Effekte des Glutamats	10
1.3. Struktur und funktionelle Aspekte der Glutamattransporter	11
1.4. Elektrophysiologische Eigenschaften von Glutamattransportern	15
1.4.1. Stöchiometrie	15
1.4.2. Transportassoziierte Ströme	16
1.5. Transportmechanismus und kinetisches Modell	19
1.5.1. Methoden zur Messung der vorstationären Kinetik	21
1.5.2. Einfluss der Temperatur auf den Transportprozess	23
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit	26
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
2.1. Molekularbiologie	29
2.2. Heterologe Expression	30
2.2.1. Zellkultur	30
2.2.1. Transfektion	31
2.3. Transportstrommessungen	32
2.3.2. Theoretische Grundlagen für elektrische Messungen	33
2.3.3. Durchführung der Ganzzelleableitungen	35
2.3.5. Messprotokolle	37
2.3.6. Photolyseexperimente	39
2.4. Lösungen	40
2.6. Datenauswertung	42
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
3.1. Expression und Glutamattransport in EAAT4	42
3.2. Eigenschaften von stationären Strömen in EAAT4	45
3.2.1. $\text{Na}^+/\text{K}^+$ gekoppelter Strom in EAAT4	47
3.2.2. Glutamat induzierter Anionenstrom	48
3.2.3. Leckanionenstrom und $\text{Na}^+$ -Bindung an den unbeladenen Transporter	53
3.2.4. Abhängigkeit der stationären Kinetik von EAAT4 von der Natriumkonzentration	54
3.3. Vorstationäre Kinetik von EAAT4	57
3.3.1. Vorstationäre Anionenströme in Abhängigkeit der kotransportierten Ionen	58
3.3.2. Abhängigkeit der vorstationären Kinetik von der extrazellulären Glutamatkonzentration	61
3.3.3. Spannungsabhängigkeit der vorstationären Ströme	66
3.2. Einfluss der Glutamattransporter assoziierten Proteine auf Glutamattransport durch EAAT4	67

<b>3.3. Einfluss der Temperatur auf das Transportverhalten von Glutamattransportern</b>	<b>70</b>
3.3.1. Temperaturabhängigkeit der Stromkomponenten und der apparenten Affinität für Substrate unter stationären Bedingungen	70
3.2.3 .Thermodynamische Untersuchung des Transportprozesses	72
3.2.4. Einfluss der Temperatur auf die Kinetik des Transportprozesses.	75
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>82</b>
<b>4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von EAAT4</b>	<b>82</b>
4.1.1. Mechanismus des Glutamattransports in EAAT4	83
4.1.2. Spannungsabhängigkeit des Glutamattransports durch EAAT4	86
4.1.3. Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen in nativ exprimierten EAAT4 in Kleinhirnneuronen	88
4.1.4. Physiologische Signifikanz	89
<b>4.2. Auswirkung der Glutamattransporter-assoziierten Proteine auf die Kinetik des Glutamattransports durch EAAT4</b>	<b>92</b>
<b>4.3. Der Einfluss der Temperatur auf die Glutamattransportreaktion</b>	<b>93</b>
<b>4.3.1. Thermodynamische Eigenschaften des Glutamattransports</b>	<b>93</b>
4.3.2. Einfluß der Temperatur auf die Kinetik des Glutamattransports.	97
4.3.3     Physiologische Signifikanz	107
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>108</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>111</b>
<b>6.1. Modellierung und Gleichung für die Kinetik von EAAT4</b>	<b>111</b>
<b>6.2. Berechnung der Temperaturabhängigkeit der Transportparameter</b>	<b>117</b>
6.2.1. Berechnung der thermodynamischen Zustandsgrößen	117
6.2.2. Berechnung der kinetischen Parameter	118
<b>6.3. Fehlerrechnung</b>	<b>120</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>122</b>

# 1. Einleitung

Glutamat besitzt eine Vielfalt von Funktionen in verschiedenen Organismen. Glutamat ist eine Aminosäure, die zur Biosynthese von Proteinen benötigt wird. Allerdings ist es keine essentielle Aminosäure, d.h. Glutamat kann von den meisten Organismen synthetisiert werden, dazu wird 2-Oxo-Glutarat aminiert, das aus dem Krebszyklus stammt (Stryer 2002). Energetisch gesehen ist es deshalb sinnvoll Glutamat nicht *de novo* zu bilden, sondern aktiv durch Transporter aufzunehmen. Glutamatspezifische Transporter sind in einem grossen Spektrum von Organismen zu finden, sowohl in Bakterien als auch im Verdauungssystem und Nervensystem von Vertebraten und Säugetieren (Slotboom, Konings et al. 1999). Funktionelle Untersuchungen haben ergeben, dass der Glutamattransport in der Plasmamembran von Säugetierzellen von Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ) im externen Medium und Kaliumionen ( $\text{K}^+$ ) im internen Medium abhängig ist (Kanner and Sharon 1978). Die Klonierung von drei Glutamattransportersubtypen aus Säugetieren hat die Erforschung der Funktionweise Anfang der 90er Jahre enorm vorangebracht (Hediger and Welbourne 1999). Im selben Zeitraum sind die ersten Sequenzen von Glutamattransportern aus Bakterien veröffentlicht worden, z.B. GLTT aus *Geobacillus stearothermophilus* (Tolner, Poolman et al. 1992). Sequenzvergleiche der verschiedenen Glutamattransporter zeigten Ähnlichkeiten, die gross genug waren, um diese Glutamattransporter als eine eigene Proteinfamilie zu definieren, die sich erheblich von anderen Transporterfamilien, wie der vesikulären Glutamattransporterfamilie, unterscheidet (Kanai and Hediger 2004). Die Suche nach Proteinen mit ähnlicher Sequenz hat neue Mitglieder dieser Familie in Säugetieren hervorgebracht (Hediger, Kanai et al. 1995).

Im Menschen und anderen Wirbeltieren ist Glutamat nicht nur für den Protein- oder Energiemetabolismus von Bedeutung. Glutamat ist der wichtigste, erregende Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. In glutamatergen Synapsen beginnt die Signalübertragung mit der präsynaptischen Fusion der, mit Glutamat gefüllten, synaptischen Vesikel. Glutamat diffundiert durch den synaptischen Spalt und aktiviert dort postsynaptische, ligandengesteuerte Glutamatrezeptoren, vor allem ionotrope AMPA-Rezeptoren (Alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid), die einen transienten  $\text{Na}^+$ -Einstrom und somit ein exzitatorisches, postsynaptisches Potential erzeugen, was zur Erzeugung eines Aktionspotentials führen kann (Kandel 2000). Die Rolle anderer Glutamatrezeptoren, z.B. des NMDA-Rezeptors (N-Methyl-D-Aspartat), ist

differenzierter, denn dieser Rezeptor wird sowohl post- als auch präsynaptisch in Neuronen exprimiert (Conti, Minelli et al. 1997). Er ist aber auch in Gliazellen zu finden (Salter and Fern 2005). Neben ionotropen Glutamatrezeptoren gibt es metabotrope Glutamatrezeptoren, letztere verwenden *second messenger*, um Ionenkanäle zu öffnen oder biochemische Reaktionen in Gang zu setzen (Anwyl 2006). Zur Beendigung des Signals muss der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt werden, aber Glutamat kann weder chemisch abgebaut werden, wie z.B. Achetycholin, noch modifiziert werden, wie z.B. Adrenalin. Darum ist Diffusion oder aktiver Transport die einzige Möglichkeit den Neurotransmitter aus der Synapse zu entfernen (Kandel 2000). Diffusion ist unvorteilhaft, da umliegende Synapsen durch das Glutamat aktiviert oder beeinflusst werden könnten (Li, Sheng et al. 2005). Daher ist aktiver Transport eine Notwendigkeit um das Signal wirksam zu beenden. Die Entfernung von Glutamat aus der Synapse hat aber auch eine schützende Funktion für das Nervensystem. Glutamat wirkt, durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und den durch sie verursachten Einstrom von Kalziumionen, toxisch, wobei auch die Möglichkeit diskutiert wird, ob AMPA-Rezeptoren dafür verantwortlich sein könnten (Weiss and Sensi 2000). Es liegt daher nahe, dass es Krankheiten gibt, die mit einer Fehlfunktion der Glutamataufnahme zusammenhängen. Es sollen nur ALS, Chorea Huntington, Schizophrenie oder Alzheimer genannt werden (Kanai and Hediger 2004). Bei Schlaganfällen kann freigesetztes Glutamat durch Exzitoxizität, die Peripherie schädigen. Dieses Thema wird nochmals im Abschnitt 1.2.1. aufgegriffen. Abb. 1 zeigt schematisch die Lokalisation der Transporter und die geschilderten Verhältnisse in der Synapse.

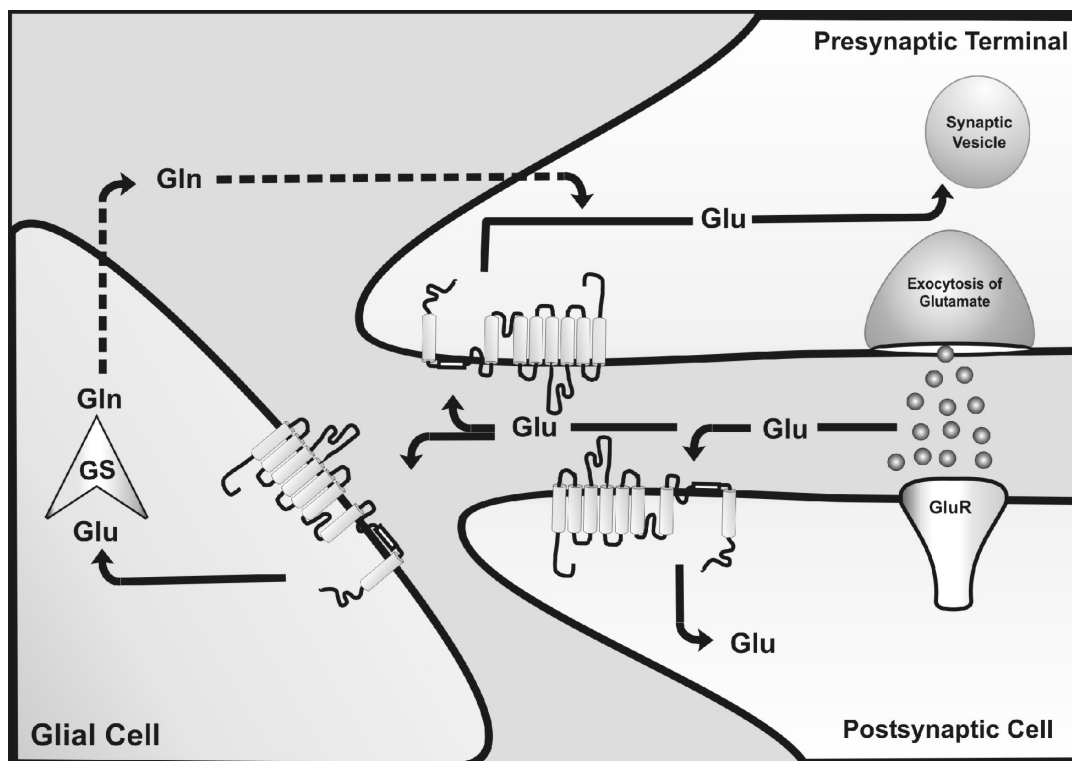


Abb.1 Verteilung und Funktion der Glutamatttransporter und beteiligter Enzyme in der Synapse. Glutamatttransporter sind nicht auf einen Ort beschränkt und kommen auf allen beteiligten Zellen sowohl post- als auch präsynaptisch vor. GS steht für Glutaminsynthetase und katalysiert die Umwandlung von Glutamat zu Glutamin in Gliazellen. Übernommen aus (Grewer and Rauen 2005).

## 1.1. Glutamatttransporter in mehrzelligen Eukaryoten und im Nervensystem

Zur Zeit sind 7 Transporter bekannt, die zu den  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -abhängigen Transportern gehören. Gemäß der Nomenklatur, wie sie von Hediger zur Klassifizierung von transmembranären Transportern vorgeschlagen wurde, gehören sie der SLC 1 Klasse an, die neben den Glutamatttransportern auch die Alanin-Serin-Cystein-Transporter und die bakteriellen Glutamatttransporter enthält (Kanai and Hediger 2004). Diese Transporter nutzen den Konzentrationsgradienten von Natriumionen, der über die Membran anliegt, zum Glutamatttransport, d.h. der energetisch ungünstige Transport von Glutamat, entgegen seines eigenen Konzentrationsgradienten, wird hauptsächlich aus der freien Energie gespeist, die im Natriumionenkonzentrationsgradienten gespeichert ist. Damit zählen diese Transporter zur Klasse der sekundär-aktiven Transporter (Kanner and Schuldiner 1987). Im Endeffekt stammt die freie Energie aus der Hydrolyse von ATP, welche die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPase nutzt, um den Natriumionen- bzw. Kaliumionenkonzentrationsgradienten über die Zellmembran aufzubauen (Läuger 1991). Später in diesem Kapitel wird näher auf die Transportstöchiometrie der Glutamattransporter eingegangen.

Anfang der Neunziger wurden die cDNA-Sequenzen der Transporter von GLT1 (GLutamate Transporter 1) (Pines, Danbolt et al. 1992), GLAST (GLutamate ASpartate Transporter) (Storck, Schulte et al. 1992), zeitgleich mit der Sequenz von EAAC1 (Excitatory AminoAcid Carrier 1) (Kanai and Hediger 1992) kloniert. Zur Vereinfachung der Nomenklatur der Glutamattransporter wurde ein System von Arriza (Arriza, Fairman et al. 1994) vorgeschlagen, das alle humanen Transporter als EAAT (Excitatory AminoAcid Transporter) kennzeichnet. Jedem Subtyp wird eine Zahl zugeordnet, EAAT1 (GLT1), EAAT2 (GLAST), EAAT3 (EAAC1). Die später entdeckten Transporter EAAT4 und EAAT5 wurden analog dieser Nomenklatur benannt (Fairman, Vandenberg et al. 1995; Arriza, Eliasof et al. 1997). Alle bisher erwähnten Transporter sind ausschliesslich für die Wiederaufnahme von extrazellulärem Glutamat zuständig, für den Transport von intrazellulärem Glutamat in die synaptischen Vesikel ist eine andere Transportfamilie (vesikuläre Glutamattransporter, SLC 17, nach Hediger) zuständig, die keine Sequenzhomologie zu den beschriebenen Transportern besitzt (Hediger, Romero et al. 2004).

Im folgenden Abschnitt werden die Subtypen der SLC1 Familie näher beschrieben. EAAT1 ist ein Transporter, der überwiegend in Astrozyten der verschiedenen Regionen des Gehirn gebildet wird. Versuche mit *knock-out*-Mäusen zeigten, dass die Abwesenheit dieses Gens tödlich für diese Mäuse ist. Die Mäuse erleiden epileptische Anfälle, die NMDA-Rezeptoren-induzierten Anfällen ähnlich sind (Tanaka, Watase et al. 1997). EAAT2 ist ebenfalls ein gliales Protein, das überwiegend im Kleinhirn gefunden wird, es kommt aber auch in der Retina und im peripheren auditorischen Nervensystem vor, wo es homöostatische und damit neuroprotektive Funktionen besitzt (Storck, Schulte et al. 1992; Hakuba, Koga et al. 2000). EAAT3 wird im ZNS und dort primär in Neuronen post- und präsynaptisch exprimiert. Die Lokalisation ist breit gestreut, denn EAAT3 kommt im Hippokampus, dem Kortex, Riechkolben, Striatum, Coliculus superior und im Thalamus vor (Rothstein, Martin et al. 1994; Berger and Hediger 1998). Ausserhalb des ZNS konnte der Transporter in der apikalen Membran der proximalen Tubuli der Niere und im Darm nachgewiesen werden (Shayakul, Kanai et al. 1997). Die Entfernung dieses Gens aus dem Mausgenom hat keine tödlichen Folgen für das Tier, allenfalls eine vermehrte

Ausscheidung von Aminosäuren, bzw. Glutamat, was die Bedeutung der Glutamataufnahme für den Gesamtglutamathaushalt von Organismen unterstreicht (Peghini, Janzen et al. 1997). Der EAAT3 Subtyp wird im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersucht. Durch Sequenzvergleiche mit Genen aus Datenbanken wurden 1997 zwei neue Subtypen identifiziert: Erstens EAAT5, der ein gewebespezifischer Transporter ist. Die Expression beschränkt sich fast ausschliesslich auf die Retina, dort ist dieses Protein der bedeutendste Glutamattransporter (Arriza, Eliasof et al. 1997). Zweitens EAAT4, der genau wie EAAT5 gewebespezifisch ist und überwiegend im Kleinhirn gebildet wird, genauer gesagt auf den Dendriten der Purkinjezellen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Transporter in den Synapsen der Parallelfasern lokalisiert ist und dort überwiegend postsynaptisch exprimiert wird (Nagao, Kwak et al. 1997). Über die Funktionsweise von EAAT4 ist bisher noch wenig bekannt, weshalb die Funktion dieses Proteins im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert wurde.

Sowohl für EAAT3, als auch für EAAT4 sind Adapterproteine nachgewiesen, die die Transporter mit dem Cytoskelett verbinden (Lin, Orlov et al. 2001). An EAAT4 binden zwei Proteine, GTRAP48 (Glutamate TRansporter Associated Protein) und GTRAP41, während an EAAT3 nur ein bisher charakterisiertes Protein bindet, GTRAP3-18. Diese Adapterproteine binden an die C-Terminale Region der Transporter und modifizieren die Transporteigenschaften. Die Bindung von GTRAP41 und GTRAP48 an EAAT4 bewirkt eine Zunahme der Maximalgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) der Glutamataufnahme, jedoch bleibt die apparente Affinität für Glutamat, gemessen durch den  $K_M$  Wert, gleich (Jackson, Song et al. 2001). Anders verhält sich GTRAP3-18 bei EAAT3, denn es bewirkt eine Erniedrigung des  $K_M$ . In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob diese Proteine die Kinetik der Glutamataufnahme dieser Transporter beeinflussen (Lin, Orlov et al. 2001).

## 1.2. Physiologische Bedeutung der Glutamattransporter

In Gehirnzellen katalysieren Glutamattransporter den Transport von Glutamat vom synaptischen Spalt in Neuronen und Gliazellen. Nach der vesikulären Freisetzung von Glutamat, kann die Konzentration in der Kletterfaser-Purkinjezellen-Synapse bis zu 9-12 mM ansteigen, wobei die Konzentration in anderen Synapsen kleiner ( $\sim 1$  mM) ist



(Clements, Lester et al. 1992; Wadiche and Jahr 2001). Um die normale Signalübertragung an glutamergen Synapsen zu gewährleisten, muss die stationäre, extrazelluläre Konzentration (im *Liquor cerebrospinalis*) von Glutamat bei  $(0,3 \pm 0,2)\mu\text{M}$  und weniger gehalten werden (Spreux-Varoquaux, Bensimon et al. 2002). Allerdings ist die Aufnahmekapazität für Glutamat von neuronalen Transportern beschränkt. In den Synapsen der Kletterfasern und Purkinjezellen, nehmen die postsynaptisch exprimierten Transporter 22 % des freigesetzten Glutamats auf (Otis, Kavanaugh et al. 1997). In anderen Experimenten konnte unter physiologischen Temperaturen gezeigt werden, dass >56% des Glutamats aufgenommen werden kann. (Auger and Attwell 2000). Mit einer Umsatzrate von z.B.  $30 \text{ s}^{-1}$ , für EAAT3, (Grewer, Watzke et al. 2000) sind Glutamattransporter allerdings nicht schnell genug, um Glutamats effektiv innerhalb eines synaptischen Ereignisses aus der Synapse zu entfernen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass es ausschliesslich die Glutamataufnahme ist, die für die schnelle Beseitigung des Glutamats verantwortlich ist. Eine mögliche Erklärung liefert die *Glutamat-Puffer-Hypothese*. Im Hippocampus der Ratte sind EAAT1 Konzentrationen von bis zu  $8500 \text{ Moleküle}/\mu\text{m}^2$  und  $2300 \text{ Moleküle}/\mu\text{m}^2$  für EAAT2 gefunden worden (Lehre and Danbolt 1998). Diese Menge ist ausreichend, um den Großteil der Glutamatmoleküle, 4000-5000 Moleküle pro Vesikel, zu binden (Barbour and Hausser 1997). Die Affinität zum Substrat ist für die Pufferungshypothese ebenfalls von Bedeutung. Als Richtwert kann der Wert der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) dienen. Im stationären Zustand nimmt der  $K_M$ , je nach Transporter Werte zwischen  $7 \mu\text{M}$  (EAAT1) und  $12 \mu\text{M}$  (EAAT2) ein (Wadiche and Kavanaugh 1998; Grewer, Watzke et al. 2000; Bergles, Tzingounis et al. 2002). Allerdings ist der Wert für  $K_M$  zeitabhängig, denn zu Beginn ist die intrinsische Affinität für Glutamat gering ( $50\text{-}100 \mu\text{M}$ ) (Grewer, Watzke et al. 2000; Bergles, Tzingounis et al. 2002). Mit dem Wechsel des Transporter/Substrat-Komplexes in andere Zustände innerhalb des Zyklus', in denen das Glutamat nicht mehr ab dissoziieren kann, nimmt die makroskopische, apparente Affinität zu. Die Pufferkapazität der Transporter ist daher auch zeitabhängig. Die intrinsische Affinität liegt zwischen den Werten, die für die glutamatgesteuerten, niederaffinen ( $K_d = 0,5\text{-}5 \text{ mM}$ ) AMPA-Rezeptoren und hochaffinen ( $K_d = 1\text{-}5 \mu\text{M}$ ) NMDA-Rezeptoren gefunden wurden (Grewer and Rauen 2005). Ein zweites Charakteristikum für einen Puffer ist die Bindungsgeschwindigkeit von Glutamat. Der Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Glutamatbindung in EAAT3 beträgt  $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei  $0 \text{ mV}$  und Raumtemperatur. Bei einer Glutamatkonzentration im synaptischen

Spalt von 1 mM, geschieht die Bindung daher innerhalb von 10-100  $\mu$ s. Auch die Dissoziation des Glutamats vom Transporter ist entscheidend für die Entfernung aus dem synaptischen Spalt (Diamond and Jahr 1997). Die Dissoziationskonstante von EAAT3 ergibt eine Verweildauer des Glutamats von 500  $\mu$ s, das bedeutet, dass Glutamat längere Zeit festgehalten wird, wodurch die Diffusion von Glutamat aus der Synapse verzögert wird (Grewer, Watzke et al. 2000).

Das von Neuronen aufgenommene Glutamat wird entweder direkt den synaptischen Vesikeln zugeführt oder enzymatisch abgebaut. Das von Gliazellen aufgenommene Glutamat wird entweder metabolisiert oder intrazellulär durch die Glutaminsynthase in Glutamin umgewandelt, in den Extrazellulärraum exportiert und gelangt mittels Glutamintransportern in die Synapse der Nervenzellen, wo es durch die Phosphat-aktivierte-Glutaminase wieder in Glutamat umgewandelt wird (Martinez-Hernandez, Bell et al. 1977). Der Glutamin-Glutamat-Zyklus ist eine wichtige Quelle für Glutamat in Nervenzellen (Rauen and Wiessner 2000).

Es ist bisher nicht viel über Kinetik der Glutamataufnahme durch EAAT4 bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Funktionsweise dieses Transporters näher beleuchtet werden. Zudem wird der Einfluss auf die Temperatur auf die Geschwindigkeit in EAAT3 untersucht und im Hinblick auf die physiologische Bedeutung diskutiert.

### 1.2.1. Pathologische Effekte des Glutamats

Die Glutamatkonzentration im *Liquor cerebrospinalis* wird sowohl durch die Blut-Hirn-Schranke, als auch durch die Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten bei 0,1  $\mu$ M gehalten, wobei über den genauen Wert diskutiert wird (Alfredsson, Wiesel et al. 1988; Rothstein, Kuncl et al. 1991; Spreux-Varoquaux, Bensimon et al. 2002). Beständig hohe (~ 1 mM) Glutamatkonzentrationen sind gefährlich für Neuronen, da sie einen massiven Zelltod verursachen. Die Gründe liegen in einer beständigen Aktivierung der ionotropen NMDA-Rezeptoren, im geringeren Maße auch AMPA-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren sind auch für  $Ca^{2+}$  permeabel, die letztlich toxisch wirken. Die Hemmung der NMDA-Rezeptoren geht mit einer Reduzierung des toxischen Effekts von Glutamat einher (Strasser, Lobner et al. 1998). Aber nicht nur Neuronen sind durch Glutamat bedroht,

sondern auch Gliazellen, doch ist der Tod dieser Zellen auf oxidativen Stress zurück zu führen (Chen, Liao et al. 2000).

Wie in Abschnitt 1. erwähnt gibt es mehrere Krankheitsbilder, an denen Glutamattransporter beteiligt sind. Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS) ist eine Krankheit, die mit einem massiven Zelltod von Motoneuronen im Rückenmark einhergeht. Die Folge ist Paralyse und letztlich der Tod des Patienten. In Patienten lässt sich eine signifikante Erhöhung ( $\sim 0,34 \mu\text{M}$  Glutamat) der Glutamatkonzentration im *Liquor cerebrospinalis* feststellen (Spreux-Varoquaux, Bensimon et al. 2002). An der Entstehung des Krankheitsbild ist eine Mutation der  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  Superoxidedismutase 1 beteiligt, die mit der Anfälligkeit von EAAT2 gegenüber Oxidation in Verbindung gebracht wird (Pedersen, Fu et al. 1998). In einem ALS-Rattenmodell konnte demonstriert werden, dass ein Rückgang der Glutamataufnahmekapazität auf EAAT1 und 2 zurück zu führen ist (Dunlop, Beal McIlvain et al. 2003). In sporadischen Fällen von ALS ist von einer Punktmutation berichtet worden, die die Transportkapazität von EAAT1 einschränkt und zum Krankheitsbild beiträgt (Trotti, Aoki et al. 2001). Einzelne Fälle von ALS sind auf die verminderte Expression von EAAT2 durch fehlerhafte RNA-Prozessierung zurück zu führen (Lin, Orlov et al. 2001). Epilepsie ist eine Krankheit, die direkt mit Glutamattransportern in Verbindung gebracht werden kann, denn die kompetitive Blockierung von Glutamattransportern resultierte in einem NMDA-Rezeptor getragenen Anfall (Demarque, Villeneuve et al. 2004). Eine kritische Rolle haben neuronale Glutamattransporter bei einer Ischämie inne. Bei ausbleibender Versorgung mit Sauerstoff bricht die Energieversorgung mit ATP und damit auch der Natriumionengradient zusammen. In glutamatergen Neuronen ist die Glutamatkonzentration höher ( $\sim 10 \text{ mM}$ ) als in Extrazellulärraum, dadurch besteht ein Konzentrationsgradient, der den Export von Glutamat aus der Zelle antreibt (Rossi, Oshima et al. 2000). Die Transporter der Gliazellen sind dafür nicht verantwortlich, da die Glutamatkonzentration in Gliazellen im Vergleich dazu geringer ist. Die selektive Blockierung von neuronalen Transportern könnte daher die Auswirkungen der Ischämie induzierten Exzitotoxizität mindern.

### 1.3. Struktur und funktionelle Aspekte der Glutamattransporter

Bei Glutamattransportern handelt es sich um Proteine, die in Eukaryoten eine Länge von ~550 Aminosäuren besitzen, in Bakterien sind die Proteine kürzer (~420 Aminosäuren). In Eukaryoten sind sie an mindestens einer Stelle glykosyliert (Slotboom, Konings et al. 1999). Die Erstellung eines Hydrophathie-Plots der Aminosäuresequenz ist eine Möglichkeit, die über die Transmembrantopologie Aufschluss geben kann, d.h. wieviele Transmembrandomänen in einem Protein vorhanden sind (Lolkema and Slotboom 1998). Die Zuordnung von 6 vermuteten Transmembrandomänen, in der N-terminalen Region, ist aufgrund des Plots eindeutig (Grunewald, Bendahan et al. 1998; Seal, Leighton et al. 2000). Die Topologie der C-terminalen Region ist wesentlich schwieriger zu bestimmen. Diese Region ist besonders interessant, da der Vergleich der Aminosäuresequenz der einzelnen Transportersubtypen dort hochkonservierte Abschnitte aufweist. Die weitergehende Untersuchung der C-terminalen Region erfolgte durch Experimente mit Cysteinaustauschmutationen, in denen die Zugänglichkeit dieser Cysteine durch verschiedenen Maleimidreagenzien, die sich z.B. in Grösse oder Ladung unterschieden, getestet wurde (Grunewald, Bendahan et al. 1998; Seal, Shigeri et al. 2001). Unterschiedliche Ergebnisse in Untersuchungen mit EAAT1 und EAAT2 führten zu zwei verschiedenen Topologiemodellen: Im ersten Modell wurden 7 Transmembranhelices vermutet, zwischen Helix 3 und 4 befindet sich eine grosse extrazelluläre Schleife (*loop*), auf dem sich die Glykosylierungsstelle befindet. Im Anschluss an Helix 7 befindet sich eine besondere Struktur, ein *reentrant loop* (RL), d.h. ein Bereich des Proteins, der sich in der Membran befindet, aber die Membran nicht komplett durchspannt. Domänen dieser Art sind als Selektionsfilter von Ionenkanälen bekannt (Hilber, Sandtner et al. 2001; Maser, Hosoo et al. 2002). An den RL schliessen sich zwei Helices an, die auf dem extrazellulärem Teil der Membran zu liegen kommen (Seal, Leighton et al. 2000). Das zweite Modell unterscheidet sich hinsichtlich der Folge und Zahl der RLs (Abb. 2 B). Der erste RL befindet sich, intrazellulär zwischen Helix 6 und 7; der zweite, extrazelluläre RL schliesst an Helix 7 an. Nach dem zweiten RL folgt ein Verbindungsstück (*linker*), das auf dem extrazellulären Teil der Membran aufliegt und der Helix 8 angeschlossen ist (Grunewald, Menaker et al. 2002). In beiden Modellen befinden sich N-Terminus und C-Terminus im Zytosol. Die RLs besitzen eine wichtige Funktion in der Bindung von Glutamat. Die Markierung von EAAT3 am extrazellulären Ende des zweiten RL mit einem Fluoreszenzfarbstoff zeigt, dass nach der Bindung von Glutamat eine Konformationsänderung erfolgt. Diese Strukturänderung schliesst wahrscheinlich die

Substratbindungsstelle vom extrazellulären Raum ab (Larsson, Tzingounis et al. 2004). In 2004 ist die Struktur von  $GLT_{ph}$ , eines bakteriellen Transporters, veröffentlicht worden (Yernool, Boudker et al. 2004). Die Topologie, die sich aus der Struktur ergibt, zeigt, dass das zweite beschriebene Modell die Topologie zutreffend vorausgesagt hat (Abb.2 A). Die Auflösung (3,8 Å) ist nicht ausreichend, um Aminosäure-Seitenketten genau definieren zu können. Doch befindet sich in dem Originaldatensatz eine nicht erklärbare Elektronendichte zwischen den beiden RLs. In Abb.2 A (linke Seite) wurde Glutamat in diese Stelle modelliert, was man als Gittermuster im linken Protomer (Pfeil), sehen kann. Im Konturmodell (rechte Seite) ist Glutamat als Kalottenmodell dargestellt. Diese Beobachtung passt zum Ergebnis, dass Aminosäure 447 in EAAT3 an der Bindung der  $\gamma$ -Carboxygruppe des Glutamats beteiligt ist (Bendahane, Armon et al. 2000). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich die vermutete Glutamat-Bindungsstelle relativ tief in der Membran befindet. Der Balken in Abb.2 (links) zeigt die vermutete Position der Membran. Ausserdem bildet der Transporter im Kristall ein Trimer (Abb.2 A rechts), was im Gegensatz zu elektronenmikroskopischen Daten von EAAT3 steht, die ein Pentamer für wahrscheinlich erschienen ließen (Eskandari, Kreman et al. 2000). Neuere elektronenmikroskopische Daten mit EAAT1 scheinen die Möglichkeit eines Pentamers ebenfalls auszuschließen. Allerdings ist auch keine Symmetrie zu sehen, wie sie bei einem Trimer zu erwarten wäre. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich um ein Multimer handelt, das mehr als drei Protomere besitzt (Raunser, Haase et al. 2005).

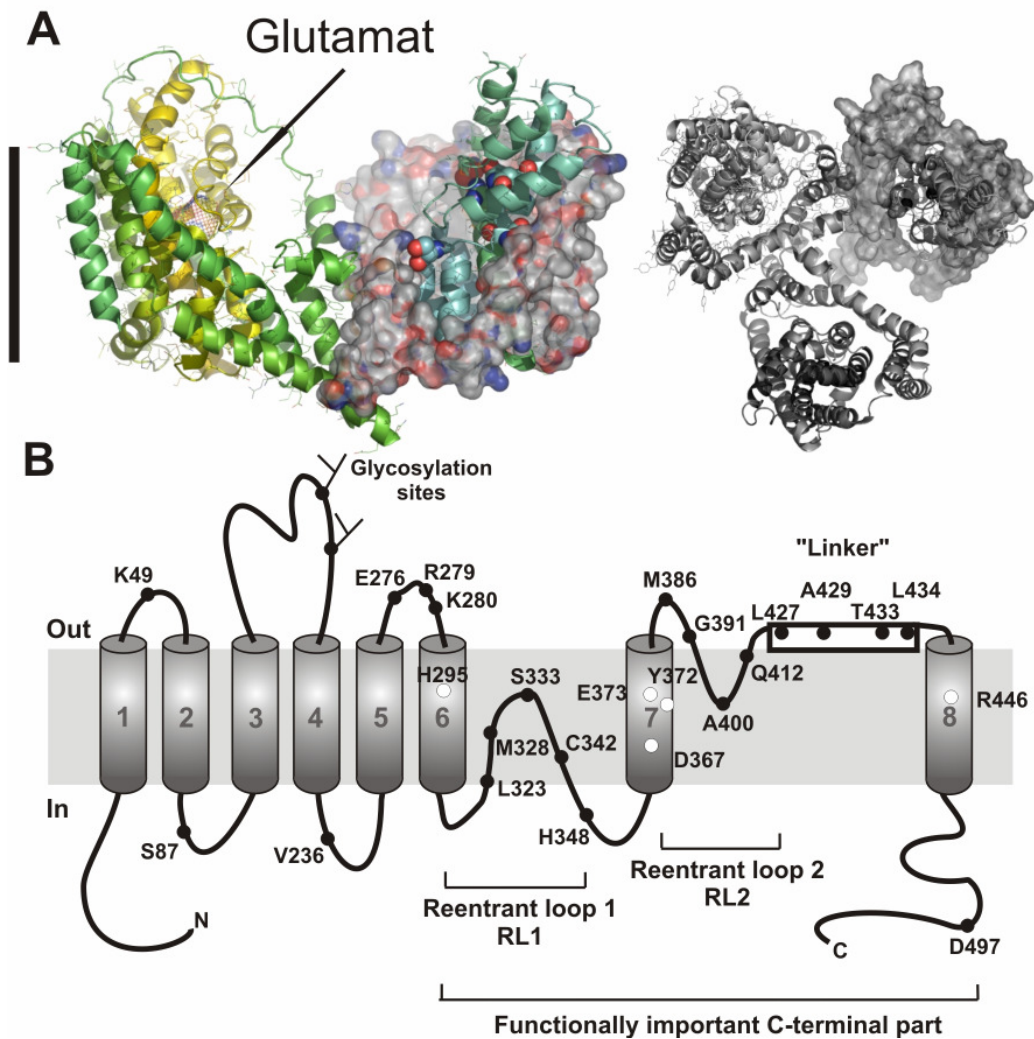


Abb. 2 (A) Kristallstruktur von  $GLT_{Ph}$  aus *P. hirokoshii* erstellt mit den Daten aus (Yernool, Boudker et al. 2004). Das Protein formt ein Trimer im Kristall. **Links** Ein Monomer dieses Trimers ist als Cartoon dargestellt. In die vermutete Glutamatbindungstelle ist Glutamat modelliert worden (Gitterdarstellung) was mit einem Pfeil markiert ist. Der extrazelluläre RL (gelb) schliesst die Bindungstelle vom umgebenden Medium ab. Der Balken gibt die vermutete Position der Membran an, oben ist extrazellulär und unten ist intrazellulär. Im Konturmodell eines anderen Protomers ist Glutamat als Kalottenmodell gezeigt. **Rechts** Extrazelluläre Aufsicht eines Trimers, wie es im Kristall gefunden wurde (B) Topologisches Modell von EAAT1, vorgeschlagen von (Grunewald, Menaker et al. 2002) adaptiert aus (Grewer and Rauen 2005), das durch Cysteinaustauschmutagenese gewonnen wurde. Die eingetragenen Aminosäuren kennzeichnen Aminosäurereste, die für die Transportfunktion wichtig sind, wie Arginin 446, das an der Bindung des  $\gamma$ -Carboxylations von Glutamat wichtig ist. Ausserdem sind der intrazelluläre RL1, zwischen Helix 6 und 7, und der extrazelluläre RL2, zwischen Helix 7 und 8 zu sehen.

## 1.4. Elektrophysiologische Eigenschaften von Glutamattransportern

### 1.4.1. Stöchiometrie

Eukaryotische Glutamattransporter nutzen den  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgradient zum Transport des Substrats (Kanner and Schuldiner 1987). Neben  $\text{Na}^+$  wird auch  $\text{K}^+$  transportiert, wie Flux- und elektrophysiologische Messungen in *Xenopus* Oozyten zeigen (Kanner and Sharon 1978). Allerdings wird  $\text{K}^+$  in die entgegengesetzte Richtung wie das  $\text{Na}^+$  Ion transloziert (Zerangue and Kavanaugh 1996). Durch Klonierung und heterologe Expression der Transporter, wurde es ermöglicht die genaue Stöchiometrie des Transportprozesses zu bestimmen. Gemäß der Stöchiometrie der Subtypen EAAT1-3 werden drei  $\text{Na}^+$ , ein Glutamat und ein Proton in das Zytosol und ein  $\text{K}^+$  aus dem Zytosol heraus transportiert (Klockner, Storck et al. 1993; Zerangue and Kavanaugh 1996; Levy, Warr et al. 1998). Demnach ist der Gesamttransport elektrogen, da 2 positive Ladungen nach innen verschoben werden (Kanai, Nussberger et al. 1995). Mithilfe dieser Stöchiometrie kann man den theoretisch möglichen Glutamatkonzentrationsgradienten über die Membran durch eine modifizierte Nernst-Gleichung berechnen (Läuger 1991). Wendet man die modifizierte Nernstgleichung auf alle im Zyklus beteiligten Ionen an, folgt daraus:

$$\frac{[\text{Glutamat}]_{ex}}{[\text{Glutamat}]_{in}} = \frac{[H^+]_{in} [K^+]_{ex}}{[H^+]_{ex} [K^+]_{in}} \left( \frac{[Na^+]_{in}}{[Na^+]_{ex}} \right)^3 e^{\left( \frac{2VF}{RT} \right)}$$

V ist das Membranpotenzial; F die Faradaykonstante, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Unter physiologischen Bedingungen ergibt sich ein möglicher Glutamatkonzentrationsquotient zwischen Zytosol und Extrazellulärraum von  $10^6$  (Zerangue and Kavanaugh 1996). Ein Sonderfall tritt ein, wenn kein Natriumkonzentrationsgradient über die Membran existiert und Glutamat intra- und extrazellulär in sättigenden Konzentrationen vorhanden ist. Die Transporter arbeiten dann wie ein Austauscher, ohne einen Glutamatnetttransport (Watzke, Bamberg et al. 2001).

## 1.4.2. Transportassoziierte Ströme

### 1.4.2.1. Glutamatabhänger Anionenstrom

Bei der funktionellen Charakterisierung des EAAT4 Subtypen stellte sich heraus, dass dieser Transporter eine aussergewöhnlich hohe Leitfähigkeit für Chloridionen besitzt (Fairman, Vandenberg et al. 1995). Diese Anionenleitfähigkeit wird durch die Bindung von Glutamat an den Transporter aktiviert. Der Transporter verhält sich daher einem ligandengesteuerten Anionenkanal ähnlich, mit verschiedener Selektivität in Bezug auf das jeweils verwendete Anion. Die getesteten Anionen lassen sich in die folgende Leitfähigkeitsreihe einordnen:  $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ , d.h. je unpolarer bzw. chaotroper das Anion ist, desto größer ist die Leitfähigkeit (Fairman, Vandenberg et al. 1995; Billups, Rossi et al. 1996; Melzer, Biela et al. 2003). Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze, indem man  $\text{Cl}^-$  in Lösungen durch  $\text{NO}_3^-$  oder  $\text{SCN}^-$  ersetzt, um Anionenströme besser messen zu können (Eliasof and Jahr 1996; Watzke and Grewer 2001). Bei der weitergehenden Überprüfung dieses Phänomens konnte die Anionenleitfähigkeit für alle eukaryotischen Glutamatttransporter der SLC1 Familie nachgewiesen werden. Die Grösse dieser Leitfähigkeit ist für jeden Transporter spezifisch. Entsprechend der Leitfähigkeit kann man die Subtypen folgendermaßen aufreihen: EAAT4/5 > EAAT1 > EAAT3 >> EAAT2 (Arriza, Eliasof et al. 1997). Der Anionenstrom ist nicht thermodynamisch mit dem Glutamatttransport verbunden und wird daher als ungekoppelt bezeichnet. Die Glutamatttransporter vereinigen deshalb Kanal- und Transportereigenschaften. In Bipolarzellen der Retina, in denen EAAT5 exprimiert wird, wirken die Transporter eher als hyperpolarisierender Anionenkanal, denn als Transporter (Picaud, Grant et al. 1993). Im Vergleich zu klassischen Ionenkanälen ist die Anionenleitfähigkeit dennoch als gering einzuschätzen. Die Leitfähigkeit der Glutamatttransporter in Stäbchenzellen der Salamanderretina (-50 mV, 140 mM  $\text{Cl}^-$  intern) wurde durch die Rauschanalyse mit etwa 0,7 pS berechnet (Larsson, Picaud et al. 1996), in EAAT3 ist der Wert mit 0,3  $\mu\text{S}$  (bei 0 mV und 140 mM  $\text{SCN}^-$  intern) abgeschätzt worden (Grewer, Watzke et al. 2000). Dies ist z.B. 20-50 mal kleiner als die Leitfähigkeit ( $g = 15 \mu\text{S}$ ) eines anionenleitenden  $\text{GABA}_A$ -Rezeptors (mit den  $\alpha_1\beta_1$ -Untereinheiten) (Farrant and Nusser 2005). In EAAT3 ist die



Leitfähigkeit an bestimmte Konformationen im Transportzyklus gebunden. Bevor der Transporter in den maximalleitenden Zustand gelangt, müssen (mindestens) 2 Na<sup>+</sup> und Glutamat gebunden sein. Darüber hinaus müssen sich weitere leitfähigen Zustände im Na<sup>+</sup>-abhängigen Teil des Zyklus befinden, weil der Anionenstrom auch in Abwesenheit von intrazellulärem K<sup>+</sup> und Anwesenheit von extrazellulärem Na<sup>+</sup> vorhanden ist (Watzke and Grewer 2001).

Über die molekulare Ursache der Anionenleitfähigkeit herrscht Uneinigkeit. Zum einen wird angenommen, dass das Chloridion denselben Pfad, wie die Substrate verfolgt (Slotboom, Konings et al. 2001). Diese Möglichkeit ist nicht auszuschliessen, doch gibt die Kristallstruktur des Transporters keinen Hinweis darauf. Gegen dieses Modell spricht, dass es möglich ist die Chloridleitfähigkeit durch Punktmutationen in der Sequenz zu beeinflussen, ohne den Transport zu beeinträchtigen (Ryan, Mitrovic et al. 2004). Ausserdem ist der Beginn des Anionenstrom und die Bindung von Glutamat zeitlich voneinander abgesetzt, was dafür spricht, dass Transport und Öffnen des Kanals räumlich getrennt ist (Watzke and Grewer 2001).

Eine zweite Möglichkeit, die diskutiert wird, zieht in Betracht, dass sich in der Mitte des Transportermultimers eine durchlässige Pore bilden könnte, in Analogie zu klassischen Ionenkanälen. Dieser Vorschlag erhielt Auftrieb, nachdem elektromikroskopische Aufnahmen des Transporters erschienen, die eine porenähnliche Struktur im Zentrum des Multimers zeigten (Eskandari, Kreman et al. 2000). Diese Möglichkeit ist widerlegt worden, da gezeigt werden konnte, dass die Anionenleitfähigkeit eine intrinsische Eigenschaft des Transportersmonomers ist (Grewer, Balani et al. 2005). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Anionenfluss in jedem einzelnen Monomer des trimeren Proteinkomplexes stattfindet, aber dass die Anionen einen Weg durch das Protein unabhängig vom Glutamattransportweg nehmen.

EAAT4 ist wie EAAT5 ein Transporter mit einer hohen Anionenleitfähigkeit, daher ist es interessant die Kinetik und das kinetische Verhalten des Anionenstroms unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu bestimmen.

#### 1.4.2.2. Leckleitfähigkeiten

Vom Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosetransporter ist bekannt, dass ein Na<sup>+</sup>-Fluss in Abwesenheit des Substrates vorhanden ist, wenn man einen Na<sup>+</sup>-Konzentrationsgradienten über die Membran anlegt (Umbach, Coady et al. 1990). EAAT1 zeigt ebenfalls einen Na<sup>+</sup>-Fluss, der glutamatunabhängig ist und durch passiven Transport verursacht wird (Vandenberg, Arriza et al. 1995). Es ist unklar ob dieser Ionenfluß durch einen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Austausch verursacht wird, oder durch eine Uniporter verursachte Aktivität.

Ausserdem konnte in allen Subtypen ein Anionenstrom festgestellt werden, der auch in Abwesenheit von Glutamat vorhanden ist. Diese Leitfähigkeit ist von der Bindung von Natriumionen abhängig, denn ohne Natriumionen ist kein Leckstrom nachweisbar (Billups, Rossi et al. 1996; Watzke and Grewer 2001). In EAAT4 ist diese Anionenleitfähigkeit eingehend untersucht worden und es scheint, als ob die Leitfähigkeit spannungsabhängig ist (Melzer, Biela et al. 2003). Interessant ist, dass dieser Strom durch kompetitive Inhibitoren, wie D,L-*Threo*- $\beta$ -*Hydroxy*aspartat (TBOA) oder Kainat, gehemmt werden kann. Das bedeutet, dass nicht alle Konformationen, in denen Substrate gebunden sind, zwangsläufig anionenleitend sind. Darüber hinaus bietet dieses Phänomen die Möglichkeit die apparente Affinität für den Inhibitor zu bestimmen und die Kinetik der Na<sup>+</sup>-Bindung (Grewer, Watzke et al. 2000). In dieser Arbeit wird die Anionenleckleitfähigkeit ausgenutzt, um die apparente Dissoziationskonstanten von Na<sup>+</sup> von EAAT3 und EAAT4 zu bestimmen. Für EAAT4 ist diese Dissoziationskonstante bisher nicht bekannt.

#### 1.4.2.3. Glutamat-induzierter Transportstrom

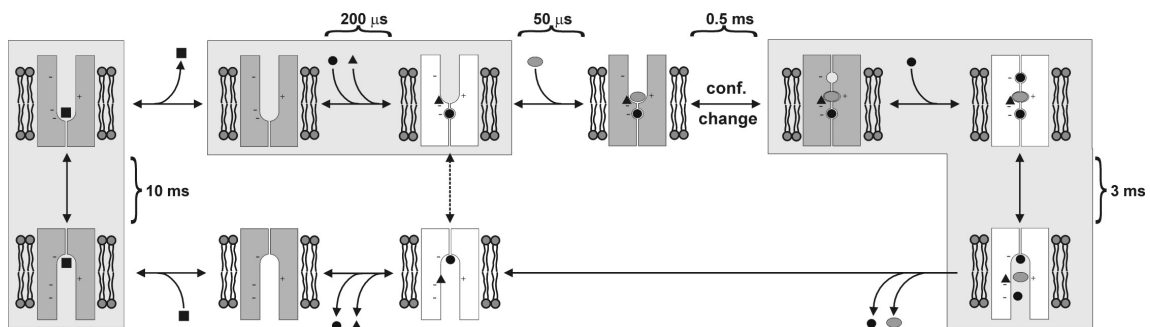
Aus der Stöchiometrie des Glutamattransports folgt eine Ladungsverschiebung von 2 positiven Ladungen ins Zellinnere pro transportiertem Glutamat. Darum ist es möglich einen Transportstrom, auch gekoppelter Strom genannt, zu messen (Brew and Attwell 1987; Kanai, Nussberger et al. 1995). Dieser Transportstrom ist einwärts gerichtet. Jedoch kann der ungekoppelte Anionenstrom, vor allem bei hohen Membranpotentialen, den

Transportstrom überlagern, weshalb man Bedingungen verwendet, bei denen keine Anionen fließen. Am einfachsten erreicht man das, indem man Anionen verwendet, die den Transporter schlecht passieren können (Greuer, Watzke et al. 2000). Aufgrund der langsamen Wechselzahl, z.B. von  $30 \text{ s}^{-1}$  für EAAT3, ist eine hohe Expression (etwa  $10^6$  für ein Signal von 1 pA) des Transporters notwendig, um den Transportstrom zu untersuchen (Greuer and Rauen 2005). Bei Transportern mit einem geringeren Umsatz, ist die Messung der Ströme weit schwieriger, insbesondere in einem Zellkultur-Expressionssystem. Dennoch ist die Untersuchung der Ströme aufschlussreich, denn damit kann man die elektrogenen Schritte im Transportzyklus ermitteln und untersuchen. Ausserdem ist die Grösse des Transportstrom ein Indiz für die Transportgeschwindigkeit. Zudem ist der Zusammenhang des Transportstroms mit der Anionenleitfähigkeit interessant. Dies gilt im speziellen für EAAT4, der eine hohe Chloridleitfähigkeit besitzt, in dem aber kein grosser Transportstrom messbar ist (Mitrovic, Plesko et al. 2001). Daher scheinen Glutamattransportgeschwindigkeit und Grösse der Anionenleitfähigkeit negativ miteinander zu korrelieren.

## 1.5. Transportmechanismus und kinetisches Modell

Im folgenden soll ein Überblick über den Kenntnisstand des Mechanismus des Transportprozesses bzw. des Transportzyklus gegeben werden. Das detaillierteste Bild besitzt man vom Mechanismus der Subtypen EAAT3 und EAAT1 (Wadiche and Kavanaugh 1998; Watzke, Rauen et al. 2000), ob diese Erkenntnisse auch auf die andere Transporter-Subtypen zutreffen, ist noch offen und die Überprüfung dieser Fragestellung ist ein Ziel dieser Arbeit. In Abb.3 sind die bisher identifizierten Teilschritte im Transportzyklus aus Untersuchungen an EAAT3 aufgeführt. Das Proton, die Natriumionen und Glutamat werden sequentiell gebunden, d.h. erst nachdem  $\text{H}^+$  und  $\text{Na}^+$  gebunden hat, können die weiteren Substrate gebunden werden. Sowohl die  $\text{Na}^+$ - als auch die Glutamatbindung verlaufen, im Vergleich zu anderen Teilreaktionen, schnell. Wo genau und in welcher Sequenz das Proton bindet ist noch unklar. Die pH-Abhängigkeit der gemessenen Ladung-Spannungskurve sprechen weder für noch gegen die Bindung eines Protons vor, bzw. nach, der Bindung des  $\text{Na}^+$  (Larsson, Tzingounis et al. 2004). Nach der

Bindung aller Substrate werden diese im Protein eingeschlossen (Bildung des *occluded state*), vergleichbar mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Läuger 1991). Es folgt eine Konformationsänderung, an deren Ende die Glutamatbindungsstelle zum Zytosol hin ausgerichtet ist. Es wird kontrovers diskutiert, ob die Substrate, die zuerst extrazellulär gebunden werden, den Transporter auch zuerst ins Zytosol verlassen. Nach der Dissoziation der Substrate vom Transporter wird eine  $\text{K}^+$ -Bindungsstelle frei.  $\text{K}^+$  bindet an diese und ermöglicht es dem Transporter in die Ausgangskonformation zurückzukehren (Kanner and Bendahan 1982). Dieser letzte Schritt ist in EAAT3 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Grewer, Watzke et al. 2000; Bergles, Tzingounis et al. 2002; Larsson, Tzingounis et al. 2004). Die elektrogenen Reaktionsschritte von EAAT3 sind über den ganzen Zyklus verteilt, wobei die Bindung des ersten Natriumions nur für 20% der Gesamtladungsverschiebung verantwortlich ist (Grewer, Watzke et al. 2000). Dies ist im Gegensatz zum  $\gamma$ -Aminobuttersäuretransporter GAT1, wo ein Großteil der Elektrogenität mit der Bindung von  $\text{Na}^+$  verbunden ist (Li, Farley et al. 2000; Bicho and Grewer 2005). Im Schema der Abb.3 sind auch die Zustände gezeigt, von denen angenommen wird, dass sie für den  $\text{Na}^+$ -Leckstrom und die Anionenleitfähigkeit verantwortlich sind. Es muss festgehalten werden, dass dieses Modell bisher nur in EAAT3 durch experimentelle Daten belegt ist.



**Abb. 3** Schematische Darstellung des Transportzyklus von EAAT3. Dieses Modell zeigt, dass ein Natriumion (schwarze Kreise) und Proton (schwarzes Dreieck) binden, bevor Glutamat (graues Oval) binden kann. Nach der Bindung entsteht eine weitere  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle, die auch besetzt wird. An die Translokation schließt sich die Dissoziation von  $\text{Na}^+$  und Glutamat und dann des verbleibenden  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}^+$  an. Zum Schluss bindet ein Kaliumion (schwarzes Quadrat). Die anionenleitenden Zustände im  $\text{Na}^+$  abhängigen Teilzyklus sind grau unterlegt. Die gestrichelte Linie stellt eine Möglichkeit dar wie der  $\text{Na}^+$ -getriebene Leckstrom zustande kommt; aus (Grewer and Rauen 2005).

### 1.5.1. Methoden zur Messung der vorstationären Kinetik

Die Untersuchung der Eigenschaften des stationären (*steady state*) Stroms, bzw. die Charakterisierung dieses Stroms ist wichtig, um Details des Transportprozesses zu verstehen, wie z.B. dessen Abhängigkeit von der  $\text{Na}^+$  Konzentration. Allerdings wird der stationäre Strom vom langsamsten Prozess innerhalb des Transportzyklus bestimmt, d.h. alle anderen, schnelleren Teilschritte können daher nicht untersucht werden. Insofern ist es notwendig Methoden anzuwenden, um vorstationäre (*pre-steady state*) Ströme verfolgen zu können, was problematisch ist, da einige dieser nicht-geschwindigkeitsbestimmenden Teilschritte in der Regel sehr schnell verlaufen (Millisekunden bis Sub-Millisekunden Zeitbereich). Eine Möglichkeit ist die schnelle Sättigung der Transporter mit Glutamat, um die existierende, stationäre Verteilung von Zuständen zu stören. Die Transporter reagieren darauf mit einer Relaxation in einen neuen stationären Zustand, was mit einem transienten Stromsignal einhergehen kann. Die Analyse der Relaxationskinetik gibt Aufschluss über die Geschwindigkeit der vorstationären Reaktionen. Ein einfacher Lösungsaustausch ist dafür zu langsam, da Diffusion durch ungerührte Schichten und die Geometrie der Zelle einen hinreichend schnellen Anstieg der Substratkonzentration an der Zelloberfläche verhindern. Lediglich ein Lösungswechselsystem mit einer Applikation des Substrats durch Piezoelemente kommt dafür in Frage (Bergles, Tzingounis et al. 2002). Die photolytische Freisetzung des Glutamats ist eine Möglichkeit das Substrat augenblicklich anzubieten, dazu werden photolabile Gruppen an das gewünschte Substrat gekoppelt (Corrie, DeSantis et al. 1993). Das aktive Substrat kann anschliessend durch Bestrahlung der geschützten Substanz mit einem kurzen Laserblitz photolytisch freigesetzt werden. Mithilfe dieses Verfahrens wurden erfolgreich Teilreaktionen im  $\gamma$ -Aminobuttersäuretransporter GAT1 und im Glutamattransporter EAAT3 beschrieben (Grewer, Watzke et al. 2000; Bicho and Grewer 2005). Zwei der in dieser Arbeit verwendeten photolabilen Gruppen sind die  $\alpha$ -carboxy-2-nitrobenzyl Gruppe ( $\alpha$ -CNB) (Wieboldt, Gee et al. 1994) und 4-methoxy-7-nitroindolin-Gruppe (MNI) (Canepari, Nelson et al. 2001). Bevor man eine Verbindung verwenden kann, muss festgestellt werden, ob sie inert gegenüber dem untersuchten Protein ist.  $\alpha$ -CNB-*caged*-Glutamat ( $\alpha$ -CNB-Glu) besitzt keine Wirkung auf AMPA-Rezeptoren, doch wirkt dieselbe Verbindung auf NMDA-Rezeptoren als ein Inhibitor (Gee, Niu et al.

1999; Maier, Corrie et al. 2005). Ausserdem muss die photolabile Verbindung hydrolysebeständig sein, bzw. eine hinreichend lange Halbwertszeit haben. Bei einer *caged*-Glutamatlösung mit einer Konzentration von 1 mM, können 1-3 % Hydrolyse die Messung erheblich beeinflussen.  $\alpha$ -CNB-Glu besitzt eine Halbwertszeit für die Hydrolyse ( $t_{1/2}$ ) von 16 h (Wieboldt, Gee et al. 1994). Die Hydrolyse von MNI-Glutamat unter physiologischem pH ist vernachlässigbar, denn diese Verbindung ist so stabil, dass nach 6 h bei 30°C und pH 12 erst die Hälfte hydrolysiert ist (Canepari, Nelson et al. 2001). Der Extinktionskoeffizient einer vergleichbaren *caged*-Verbindung  $\alpha$ -CNB-Carbamoylcholin (~1500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> bei 343 nm) unterscheidet sich vom Extinktionskoeffizient des MNI-Glu Analogon MNI-Acetat (~4500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> bei 340nm). Sowohl die Freisetzungshalbwertszeit von  $\alpha$ -CNB-Glu (21  $\mu$ s) und MNI-Glu (150 ns) als auch die Quantenausbeute der *caged*-Verbindungen sind verschieden ( $Q_{\alpha\text{-CNB-Glu}} = 0,14$  vs.  $Q_{\text{MNI-Glu}} = 0,085$ ) (Wieboldt, Gee et al. 1994; Papageorgiou, Ogden et al. 2005). Die Effizienz der Glutamatfreisetzung durch Photolyse ist bei beiden Verbindungen relativ gering (10 – 20%), darum ist eine hohe Energiedichte nötig, um genügend Glutamat zu erzeugen. Ein Laser bietet eine Möglichkeit die Energie zur Verfügung zu stellen. Durch den so erzeugten Konzentrationssprung war es möglich vorstationäre Kinetiken in EAAT3 zu untersuchen. Das vorstationäre Signal in Abwesenheit von Anionen besteht aus drei Komponenten, von denen die ansteigende Phase den Reaktionen zugeschrieben werden, die die Bindung der Substrate beinhalten. Dieser Phase folgen zwei abfallende Phasen, von denen die schnelle Phase die Bindung der restlichen Na<sup>+</sup> beschreibt und die langsame Phase der Translokation zugeschrieben wird (Grewer, Watzke et al. 2000). Um die Allgemeingültigkeit für andere Transporter zu überprüfen ist es notwendig die Kinetik anderer Transporter zu untersuchen.

Eine Störung des *steady state* kann man auch in anderer Form verursachen, nämlich durch Sprünge des Transmembranpotentials. Diese Experimente wurden in verschiedenen Na<sup>+</sup>-abhängigen Transportern, GAT1, dem Na<sup>+</sup>-abhängigen Phosphattransporter (Na/Pi 2) und Glutamatttransportern durchgeführt (Forster, Hernando et al. 1998; Lu and Hilgemann 1999; Grewer, Watzke et al. 2000). Durch die Änderung des Transmembranpotentials verändert man z.B die elektromotorische Kraft, die auf das Na<sup>+</sup> wirkt. Die Ladungsbewegung, die durch die Bindung von Na<sup>+</sup> an bzw. die Dissoziation vom Transporter verursacht wird, erzeugt einen kapazitiven Strom. Da diese Reaktionen elektrogen sein können, können sie durch die Veränderung des Membranpotentials manipuliert werden. Diese Ströme sind in GAT1 und EAAT3 nicht nachzuweisen, wenn

das Substrat oder ein kompetitiver Inhibitor vorhanden ist, d.h. die Bindung dieses Substrats ist elektroneutral (Kanai, Nussberger et al. 1995; Lu and Hilgemann 1999). In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob und welche Reaktionsschritte von EAAT4 elektrogen sind. Dazu werden unter anderem Glutamatkonzentrations sprünge und Spannungssprünge angewendet.

### 1.5.2. Einfluss der Temperatur auf den Transportprozess

Die Auswertung der Temperaturabhängigkeit des Verhaltens von Proteinen kann wertvolle Informationen über die funktionellen Eigenschaften des Proteins geben. Man erhält thermodynamische Informationen über das Protein bzw. die katalysierte Reaktion des Enzyms (Fersht 1999). Betrachtet man z.B. eine Ligandenbindungsreaktion, so ändert sich die Assoziationskonstante der Bindung mit der Temperatur, sofern die Reaktion von der Temperatur abhängt. Die Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstante wird durch die Bindungsenthalpie,  $\Delta H$ , bestimmt. Geht man davon aus, dass sich die Bindungsenthalpie im betrachteten Temperaturintervall nicht ändert, kann man die Daten mit Hilfe der Reaktionsisobare nach van't Hoff (Gleichung 20 im Anhang) auswerten (Gutfreund 1995). Die Steigung der Regressionsgerade liefert die Bindungsenthalpie, darüber hinaus kann die Freie Enthalpie und die Entropie der Reaktion berechnet werden (Hammes 2000). Zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter wird häufig die Kalorimetrie verwendet, da man die, während der Reaktion abgegebene oder aufgenommene, Wärme direkt messen kann. Diese Technik wird z.B. bei Untersuchungen verwendet, bei denen die Denaturation des Proteins oder die Bindung eines Liganden verfolgt werden soll (Weber and Saleme 2003). Jedoch schränkt die Verfügbarkeit von grösseren Mengen des Proteins diese Methode erheblich ein. Jedoch sind seit kurzem Nanokalorimetriesysteme vorhanden, die wesentlich geringere Proteinmengen erfordern (Torres, Kuhn et al. 2004).

Die Bindung eines transportierten Substrats an einen Transporter kann entweder exotherm oder endotherm sein, d.h. das Substrat kann das Protein stabilisieren und den Schmelzpunkt verschieben (Halsey, Mountcastle et al. 1977; Lepock, Rodahl et al. 1990). Zum Beispiel stabilisiert Glukose die native Form des Glukosetransporter GLUT1, was einen höheren Schmelzpunkt zur Folge hat (Epan, Epan et al. 1999), auch das kovalent

gebundene Koenzym Retinal hat diesen Effekt auf Rhodopsin (Khan, Bolen et al. 1991). Die Bindung von Glutamat wurde in zwei verschiedenen Proteinen kalorimetrisch untersucht. In der Glutaminsynthetase ist die Bindung von Glutamat ein exothermer Prozess, der mit einer Erniedrigung der Entropie verbunden ist (Ginsburg, Gorman et al. 1987). Die Bindung von Glutamat an eine heterolog-exprimierte Untereinheit des AMPA-Rezeptors ist ebenfalls exotherm. Allerdings ist die Entropie positiv und die Bindungsenthalpie temperaturabhängig, was auf eine komplexe Bindungsreaktion hinweist (Madden, Abele et al. 2000). Als Beispiel kann die Berechnung der thermodynamischen Parameter für die Bindung des MgATP-Komplexes an CFTR-Kanal (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) genannt werden, bei der die Gleichgewichtskonstante aus der Offenwahrscheinlichkeit des Proteins berechnet wurde (Aleksandrov and Riordan 1998).

Für die Charakterisierung von Transportprozessen ist es interessant die Temperaturabhängigkeit von Geschwindigkeitskonstanten des Transports oder Teilreaktionen des Transports zu beobachten. Eine einfach zu bestimmende Grösse ist der  $Q_{10}$ , d.h. das Verhältnis zweier Messgrößen, z.B. des Transportstroms, die mit einem Temperaturunterschied von  $10^{\circ}\text{C}$  (bzw.  $10\text{ K}$ ) gemessen werden. Der Wert von  $Q_{10}$  kann einem einen Hinweis auf die Natur der untersuchte Reaktion geben. Diffusionskontrollierte Reaktionen zeigen meist eine geringe Abhängigkeit von der Temperatur, daher bewegt sich der zugehörige  $Q_{10}$  in einem Bereich von 1,1-1,5. Der Stromfluß durch einen geöffneten Kanal, z.B. dem shaker- $\text{K}^+$ -Kanal, bewegt sich in dieser Grössenordnung (Rodriguez, Sigg et al. 1998). Konformationsänderungen von Proteinen erfordern das Lösen und Wiederherstellen von Wasserstoffbrücken oder Salzbrücken, daher ist der zugehörige  $Q_{10}$  weitaus grösser als 1,5 (Hille 1992)(Bamberg and Lauger 1974)

Eine andere Möglichkeit den Einfluss der Temperatur auf die Kinetik des Transportprozesses zu quantifizieren erfolgt mithilfe der Messung der Geschwindigkeitskonstanten von Teilreaktionen des Transportzyklus bei verschiedenen Temperaturen. Die Temperaturabhängigkeit von chemische, oder auch Proteinreaktionen, wird im allgemeinen durch die Eyring'sche Theorie des aktivierten Komplexes beschrieben (Eyring 1935)(siehe auch Anhang). Diese Theorie beschreibt die Bildung des Übergangszustand entlang der Reaktionskoordinate durch thermodynamische Parameter, wie Aktivierungsenthalpie und  $\Delta S^{\ddagger}$ -entropie. Dadurch kann man Anhaltspunkte erhalten, was bei der Bildung des Übergangszustand geschieht (Gutfreund 1995).



Konformationsänderungen von Proteinen zeichnen sich im allgemeinen durch hohe Aktivierungsenthalpien aus ( $> 50$  kJ/mol), während die Substratbindung an Proteine oft diffusionskontrolliert ist und mit kleinen Aktivierungsenthalpien ( $\leq 20$  kJ/mol) einhergeht. Der stationäre sekundäre Transport von Ionen oder hydrophilen Substanzen ist oft mit hohen Aktivierungsbarrieren verbunden. So ist im Zuckertransporter SGLT1 die Bindung von  $\text{Na}^+$  mit einer hohen Aktivierungsenergie ( $\sim 100$  kJ/mol,  $Q_{10} = 2,7-3,3$ ) und daher einer Konformationsänderung verbunden (Hazama, Loo et al. 1997). Im Fall der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist  $\text{Ca}^{2+}$  Translokationsreaktion, also der  $E_1/E_2$  Übergang im Alberts-Post-Zyklus, mit einer hohen Energiebarriere verbunden ( $\sim 80$  kJ/mol). Ausserdem wurde eine hohe Temperaturabhängigkeit ( $Q_{10} = 3,63$ ) der Enzymaktivität, d.h. des stationären Stroms, gefunden, wodurch man die Aktivierungsenergie des langsamsten Prozess im Zyklus erhält (Peinelt and Apell 2004).

In Glutamattransportern wurden bisher wenige funktionelle Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Stationäre Transportströme in Purkinjellen, zeigen einen hohen Temperaturkoeffizienten ( $Q_{10} = 3,24$ ). Im Gegensatz dazu ist die Energiebarriere für die Aufrechterhaltung des Anionenstroms im Bereich diffusionskontrollierter Reaktionen (Attwell 2000). Der  $Q_{10}$  für den Glutamat-induzierten Anionenstrom in EAAT2 ist in derselben Grössenordnung, was ebenfalls für ein Kanalmodell der Anionenleitfähigkeit spricht (Wadiche, Arriza et al. 1995). Ausserdem wurden vorstationäre Ströme in Purkinjellen in Bezug auf die Temperatur untersucht. Interessanterweise ist die Translokation der Substrate nur mit einer geringen Energiebarriere verbunden. Auch die Relokationsreaktion des Transporter ist nur wenig sensibel für eine Temperaturänderung (Bergles and Jahr 1998). Das wirft die Frage auf, wo sich der/die Reaktionsschritt(e) im Zyklus befindet/befinden, die zur hohen Aktivierungsenergie beiträgt/beitragen. In dieser Arbeit soll die Temperaturabhängigkeit des Glutamattransports von EAAT3 im Detail untersucht werden.

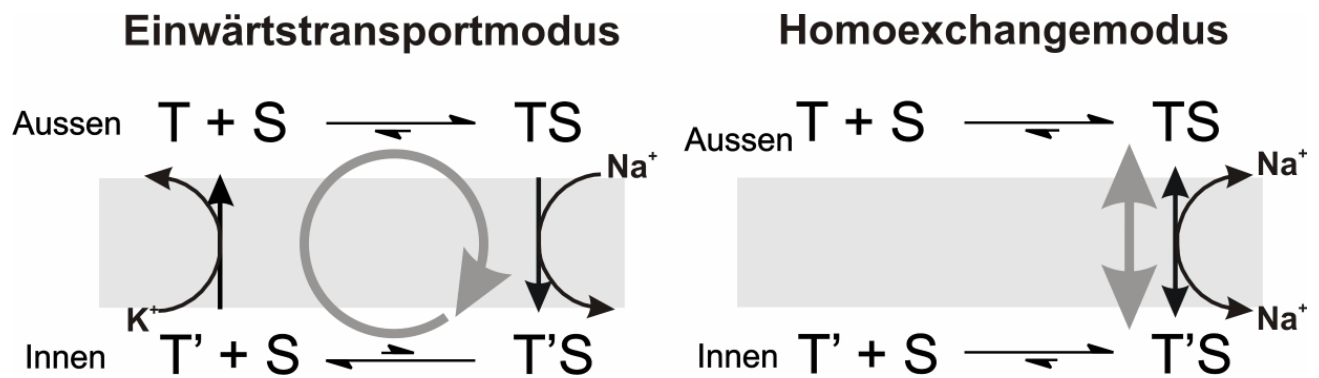
## 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Glutamattransporter spielen eine entscheidene Rolle in der glutamatergen Transmission. Eine grundlegende Aufgabe der Transporter ist es, die Glutamatkonzentration des Extrazellulärums im submikromolaren Bereich zu halten. Beeinträchtigungen dieser Funktion gehen mit neurologischen Krankheiten einher, insbesondere ALS. Darüber hinaus modulieren Glutamattransporter das postsynaptische Potential, dies gilt in besonderem Maße für den neuronal-exprimierten Subtyp EAAT4. Es stellt sich die Frage, weshalb 5 verschiedene Proteine für eine gemeinsame Aufgabe zuständig sind. Eine mögliche Antwort könnte eine Arbeitsteilung der verschiedenen Proteine sein, darauf deutet die differentielle Expression der Subtypen hin, dies gilt im Speziellen für die gewebespezifischen Glutamattransporter EAAT4 und EAAT5. Daran schliesst die Frage an, welche funktionellen Charakteristika eine Arbeitsteilung der Glutamattransporter möglich machen. Die Transporter, die mit einem hohem Umsatz arbeiten, sind gut charakterisiert, sowohl die stationären Eigenschaften, als auch was die vorstationären Reaktionsschritte. EAAT1 und EAAT3 sind Transporter, die für die schnelle Aufnahme von Glutamat optimiert sind. Allerdings ist die apparente Affinität zu Glutamat relativ gering und die Anionenleitfähigkeit ist ebenfalls niedrig. Dies steht im Gegensatz zum Subtypen EAAT4, der eine hohe Leitfähigkeit aufweist und im *Xenopus* Oozytenexpressionssystem eine hohe apparente Affinität für Glutamat zeigt, aber einen geringen Transportstrom aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit soll EAAT4 näher in einem Zellkulturexpressionssystem untersucht werden. Ziel ist es den Mechanismus des Glutamattransports durch die Messung von Glutamat-induzierten vorstationären Prozessen zu untersuchen, die zu den beschriebenen Eigenschaften des Transporters führen. Ausserdem richtet sich das Augenmerk auf die Untersuchung der ungewöhnlich hohen Anionenleitfähigkeit dieses Subtyps. Für die funktionelle Charakterisierung kommen elektrophysiologische Methoden und schnelle kinetische Methoden zur Anwendung. Schliesslich sollen die erhaltenen Ergebnisse mit Resultaten von anderen Subtypen verglichen werden.

Die Temperatur ist eine entscheidende Variable, die die Funktion von biologischen Systemen beeinflusst, die aber in vielen Veröffentlichungen, in denen die Funktionsweise des Glutamattransporters beschrieben wurde, vernachlässigt wurde. Proteine reagieren zum Teil äusserst sensitiv auf Temperaturänderungen, wie sie z.B. bei Fieber auftreten. Denaturierung ist nicht das einzige Phänomen, was die katalytische Aktivität ändern kann. Auch thermodynamische Eigenschaften, wie die Bindungskonstanten für Substrate, können temperaturabhängig sein und die Reaktion beeinflussen, die vom Enzym katalysiert wird. Ausserdem ist die Ermittlung der thermodynamischen Zustandsgrössen ein wichtiges Hilfsmittel, um etwas über die Natur der katalysierten Reaktion zu erfahren. Für Transportproteine im Speziellen lassen sich qualitative Aussagen darüber machen, was während der Substratbindungs- oder Translokationsreaktion geschieht. Es ist durchaus möglich, dass einzelne Reaktionen im Transportzyklus stark temperaturabhängig sind, während andere unabhängig oder nur schwach von der Temperatur abhängig sind. Diese Tatsache wird nicht beachtet, wenn man die Transportaktivität mit der RGT-Regel (oder van't Hoff'sche Regel) abschätzt. Diese Regel ist eine Faustregel, mit der die Temperaturabhängigkeit einer Grösse abgeschätzt wird. Dazu nimmt man an, dass bei einer biochemischen Reaktion, die Produktmenge bei einer Erhöhung der Temperatur von 10 K um ungefähr das Doppelte zunimmt. Die funktionelle Charakterisierung von Glutamattransportern erfolgte bisher meistens bei Raumtemperatur, d.h. es besteht eine Temperaturdifferenz von mehr als 10°C zwischen der untersuchten Temperatur und der Temperatur, bei der der Transporter physiologisch operiert. Es ist daher nicht klar, wie schnell Glutamat bei 37°C über die Membran verschoben wird. Ausserdem können bislang veröffentlichten Daten nicht erklären, woher die hohe Aktivierungsenergie des langsamsten Teilschritts im Transportzyklus kommt. In dieser Arbeit sollen diese Aspekte am Beispiel des Glutamattransporters EAAT3 näher beleuchtet werden. Im Rahmen der Arbeit sollen thermodynamische und kinetische Daten bei verschiedenen Temperaturen ermittelt werden. Dazu wurde eigens ein Heiz-/Kühlsystem entworfen und konstruiert. Dabei kommen elektrophysiologische Methoden in Verbindung mit Substratkonzentrationsprüngen zum Einsatz.

## 2. Material und Methoden

Für die elektrophysiologische Charakterisierung von EAAT4 und EAAT3 wurden die Transporter heterolog in HEK Zellen exprimiert. In Abhängigkeit von der externen und intrazellulären Lösung wurden die Transporter in bestimmten Transportmodi untersucht (Abb.4). Dabei konnte der einwärtsgerichtete Transportmodus (*einwärtsgerichtete Transport* ET) (Abb. 4 A) vom Austauschmodus (*Homoexchange*, HE) unterschieden werden (Abb.4 B). Der HE war zugänglich, wenn Glutamat und Na<sup>+</sup> auf beiden Seiten der Membran vorhanden waren, in der Abwesenheit von K<sup>+</sup>, sodass nur der Na<sup>+</sup> und Glutamat abhängige Teil des Zyklus durchlaufen wurde. Im ET wird der komplette Zyklus durchlaufen, wenn man extrazellulär Glutamat, Natriumionen (i.d. Badlösung) und Kaliumionen intrazellulär (i.d. Pipettenlösung) applizierte. In der Abwesenheit von permeablen Anionen war der ET mit einem einwärtsgerichteten, stationären Strom (Transportstrom) assoziiert. In der Anwesenheit von permeablen Anionen wird der Gesamtstrom hauptsächlich von Anionen getragen (Mitrovic, Plesko et al. 2001). Je nach der Richtung der Anionenkonzentrationsgradient, handelte es sich um einen Auswärts-, bzw. Einwärtstrom. Der Großteil der Versuche dieser Arbeit wurden mit Thiozyanationenhaltigen Pipettenlösungen (SCN<sup>-</sup>) und Chloridionenhaltigen Badlösungen durchgeführt, was aufgrund des SCN<sup>-</sup>-Gradienten, in einem einwärtsgerichteten Strom resultierte. Im HE waren Natriumionen (140 mM) und Glutamat (10 mM) in der Pipettenlösung in sättigenden Konzentrationen vorhanden. Wurde die Zelle mit glutamathaltiger Lösung perfundiert, fand kein Nettoglutamattransport statt. Das bedeutet, dass auch keine Nettoladungsverschiebung stattfindet, sodass kein stationärer Transportstrom zu erwarten war (Grewer, Watzke et al. 2000). Der Transportmodus ermöglichte es die Teile des Transportzyklus zu isolieren, die mit der Glutamatbindung und Translokation im Zusammenhang stehen, sofern sie elektrogen sind. In EAAT3 wurden auch vorstationäre Ströme gemessen. Der transiente Strom ist eine Summe der Ströme, die durch die Bindung von Glutamat und dessen Translokation entstehen.



**Abb. 4** zeigt ein schematisiertes Modell der untersuchten Glutamattransportmodi. In A sind Kaliumionen vorhanden, d.h. es kann der gesamte Zyklus durchlaufen werden. B In Abwesenheit von Kaliumionen kann nur der natriumabhängige Zweig des Zyklus durchlaufen werden.

## 2.1. Molekularbiologie

Das Plasmid für EAAT4-Expression wurde von Dr. S. Amara (University of Pittsburgh) zur Verfügung gestellt. Die cDNA des EAAT4 wurde in das Plasmid pCMV5 inkloniert. Das EAAT3-Konstrukt wurde von Dr. T. Rauen (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt. Beide Plasmide erhalten einen Cytomegalie-Virus-Promotor (CMV-Promotor) und eignen sich daher für die Expression in Säugetierzellen.

Das erhaltene Plasmid wurde durch die Hitze-Schock-Transformation in *E.coli* eingebracht. Für diese Methode wurden kompetente *E.coli* Zellen, d.h. Zellen, die in der Lage sind Plasmid aufzunehmen, bei Stratagene gekauft. 15µl der Zellsuspension wurden, nach dem Vermischen mit dem Plasmid, für 30 min auf Eis aufbewahrt. Danach wurden die Zellen bei 42°C für 45 s inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 700 µL NZY<sup>+</sup>-Medium (Fisher Scientific) versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. 200-350 µL der Suspension wurden auf eine LB-Medium-haltige Agarplatte (1% w/w Agar) verstrichen. Am folgenden Tag konnten die Kolonien für die DNA-Präparation angezogen werden. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit handelsüblichen Präparationskits im kleinen (5 mL Kulturvolumen) und mittlerem (50 ml Kulturvolumen) Maßstab (Novagen). Zur Herstellung des Gels wurden 1% (w/w) Agarose im TAE-Buffer gelöst und in eine Form gegossen.

## 2.2. Heterologe Expression

### 2.2.1. Zellkultur

Für die Experimente in Zellkultur wurde die menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293 (HEK 293) (ATCC Manassa, USA) verwendet. Diese Zelllinie ist in der Lage einen konfluenten, adherenten Zellrasen in Kulturschalen oder auf Deckgläser zu bilden. Für die Passage der Zellen wurden die folgenden Lösungen verwendet:

Waschlösung: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, New York, USA)

Vollmedium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (4,5 g/L Glukose, ohne Natriumpyruvat) mit 10% fötalem Kalbsserum und Penizillin-Streptomycin Lösung (Gibco, New York, USA)

Mangelmedium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, New York, USA)

0,005%-ige poly-Lysin oder Fibronectin Lösung (Sigma, St Lois, USA)

Lösung zum Disoziiieren der Zellen: 0,25% Trypsin; 0,04 % Ethylentriamintetraessigsäure (EDTA) in PBS (Gibco, New York, USA)

Sobald die Zellen einen konfluenten Rasen gebildet hatten, was nach etwa 3 Tagen der Fall war, wurden die Zellen passagiert. Wegen der im Serum vorhandenen Proteaseinhibitoren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, nachdem das Medium entfernt wurde. Anschliessend wurde die Trypsinlösung zugegeben. Unter dem Mikroskop wurde der Zeitpunkt abgewartet, bis die Zellen begonnen hatten sich vom Untergrund abzulösen (1-2 Minuten), dann wurde die Trypsinlösung entfernt. Zum vollständigen Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurde das Vollmedium auf die Zellen gegeben und durch Klopfen/Erschütterung wurden die Zellen vom Untergrund gelöst. Durch wiederholtes Pipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Ein Teil der Suspension wurde dann in Kulturschalen (Durchmesser 35 mm) verteilt, die mit Polylysin beschichtete Deckgläser enthielten. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C in einer 5%-igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre aufbewahrt.

### 2.2.1. Transfektion

Für die hier durchgeführten Versuche wurden die Proteine transient exprimiert. Neben dem Plasmid, das die Transporterprotein-cDNA enthält, wurde ein Reporterplasmid ko-transfiziert. Es handelte sich entweder um pGreenLatern (Gibco, New York, USA), das das grünfluoreszierende Protein (GFP) enthält oder um dsRed (Clontech) mit einem rotfluoreszierenden Protein. Für die Transfektion wurden drei verschiedene Methoden verwendet, die im folgenden kurz skizziert werden sollen.

Bei der Kalzium-Phosphat-Methode wird die DNA mit Kalziumapatitkristallen kopräzipiert. Für diese Methode wurden folgende Lösungen verwendet:

#### 2xBBS

50 mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,95

#### Kalziumchloridlösung

1,8 M CaCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O

Die Transfektion wurde einen Tag nach dem Ausplattieren der Zellen ausgeführt. Zunächst wurde das Vollmedium durch das Mangelmedium ausgetauscht. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden 2 µg DNA (1,5 µg Transporter DNA und 0,5 µg des Reporterplasmids) mit 25 µl Kalziumlösung, 75 µL Wasser und 100µL BBS vermischt. Diese Lösung wurde eine Minute stehengelassen und anschliessend auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Die Kulturschalen wurden dann für 3 h in einem Inkubator bei 37°C und 3 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Während dieser Zeit bildete sich ein feiner Niederschlag, dessen Korngrösse vom pH abhängt. Daher wurde genau auf den pH der verwendeten BBS Lösung geachtet (pH = 6,95). Nach Ablauf der 3h wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit frischem Vollmedium versorgt. Die Zellen konnten einen Tag später verwendet werden.

Alternativ wurden zwei kommerziell erhältliche Produkte verwendet, Fugene (Stratagene) und Effectin (Qiagen).

Fugene konnte direkt den ausplattierten Zellen zugegeben werden. Dazu wurden zunächst 94 µl Minimalmedium vorgelegt und mit 6 µl der Reagenz vermengt. Nach 5 min wurden, wie bei der zuvor erwähnten Methode, 2 µg DNA (1,5 µg Transporterplasmid und

0,5 µg des Reporterplasmids) zupipettiert und nach Inkubation für 15 min die Lösung zu den Zellen gegeben.

Für die Effectin-Methode war es erforderlich die Zellen einen Tag vor der Transfektion wachsen zu lassen. Für die Transfektion inkubierte man 1µg DNA (0,75 µg Transporterplasmid und 0,5 µg des Reporterplasmids) mit 10 µl des Enhancers für 2 min. Der Lösung wurde 25µl EC-Puffer zugesetzt und dann wurde 5 min gewartet; anschliessend wurde 12,5µl Effectin beigegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Lösung mit 500 µL Minimalmedium versetzt und in die Kulturschalen mit den Zellen pipettiert. Die Reaktion wurde nach 1 h 45 min durch Waschen mit PBS gestoppt, danach wurde wieder Vollmedium in die Kulturschalen gefüllt. Zellen, die mit dem EAAT4-Plasmid transfiziert wurden, zeigten eine hohe Mortilitätsrate. Darum war es erforderlich einen Inhibitor, D,L-*threo*-β-Benzyloxyaspartat (TBOA), zu verwenden, da das Protein toxisch für Zellen zu sein scheint. Die TBOA-Endkonzentration wurde auf 10µg/µl eingestellt.

Die Identifizierung der transfizierten Zellen erfolgte durch die Beobachtung der Fluoreszenz mittels eines Mikroskops, und den geeigneten Filtersätzen (Omega Filters). Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 532 nm (dsRed) und 493 nm (GFP). Die Emissionswellenlänge liegt bei 582 nm (dsRed) oder 505 nm.

## 2.3. Transportstrommessungen

### 2.3.1.1. Geräte und Software für *patch clamp* Ableitungen

Inverses Fluoreszenzmikroskop	Axiovert25 Zeiss (Jena)
Mikromanipulator	MNO-203; Narashige (London, UK)
Schwingungsgesteuerter Tisch	Newport
Digitalisierung	DigiData 1200; Axon Instruments/Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Patch clamp Verstärker	EPC-7; List-Medical-Electronic (Darmstadt)
Ventilsteuerung	Valve Mate 8; Dagan Corp (Minneapolis, USA)



Ventile	Quetschventile General Valve Corporation (Fairfield, USA)
Pipettenzieher	P-97; Sutter Instruments (Novato, USA)
Pipettenglas	Bororsilikatglas, GC150TF; Havard Apparatus (Kent, UK)
Laser	Xe-HCl Excimerlaser MiniEX; Lambda Physik (Göttingen)
Farbstoff	3,5 mM p-Terphenyl (PTP) in Dioxan Lambda Physik (Göttingen)
Filter	Graufilter, Andover Corp. (Salem, USA)
Thermometer	Physitemp instruments (Clifton, USA)

### 2.3.2. Theoretische Grundlagen für elektrische Messungen

Die *Voltage-clamp*-Technik ist seit den 50er Jahren im Einsatz. Mit dieser Methode misst man den Kompensationsstrom, der gemäß des Ohm'schen Gesetzes nötig ist, um die Zelle bei der gewünschten Spannung (Kommandospannung) zu halten. Dazu bedient man sich eines Operationsverstärkers, der ein abfallendes bzw. steigendes Membranpotential durch Injektion von Strom kompensieren kann. Eine Veränderung des Potentials tritt ein, wenn sich die Leitfähigkeit der Membran ändert. Abb. 5 zeigt ein vereinfachtes Schaltbild. Bei kleinen Transmembranströmen, kann der Strom mit derselben Elektrode injiziert werden, die auch die Spannung misst. Der Operationsverstärker ist parallel zu einem Rückkopplungswiderstand ( $R_f$ ) geschaltet. Besteht eine Differenz zwischen der gemessenen Spannung ( $U_{pip}$ ) und der Kommandospannung ( $U_{soll}$ ), antwortet der Operationsverstärker mit einer Potentialänderung am Ausgang. Durch die Potentialdifferenz vor und hinter dem Rückkopplungswiderstand fließt ein Strom. Dieser Strom dient zum Abgleich der Potentialdifferenz  $U_{pip}-U_{soll}$ . Mit der beschriebenen Konfiguration wird die Spannung vor der Pipette kontrolliert. Im Rahmen dieser Arbeit ist die *Patch-Clamp*-Methode mit Ganzzelleableitungen (*whole-cell-voltage-clamp*) zur Anwendung gekommen, dabei wird zunächst ein Teil der Zellmembran in die Spitze der Messelektrode eingesaugt. Die Membran schliesst die Pipette vom Aussenmedium ab (*seal*), was mit einer Erhöhung des

gemessenen Widerstands, auch *Sealwiderstand* genannt, (0,5-1 G $\Omega$ ) einhergeht. Um in die Ganzzellkonfiguration zu gelangen, wird die Membran unter der Pipettenspitze nach Erreichen des *Sealwiderstands* durchbrochen. Eine genauere technische Beschreibung befindet sich in 2.3.3.. Die zuvor erwähnte Potentialdifferenz  $U_{\text{pip}}-U_{\text{soll}}$  entsteht idealerweise durch den Abfall der Spannung über der Membran. Damit das Ergebnis nicht verfälscht wird, muss der Eingangswiderstand des Verstärkers sehr viel größer als der Rückkopplungswiderstand sein, anderenfalls fällt die Spannung vor dem Verstärker ab. Da sich bei der Aktivierung der Transporter der Membranwiderstand erniedrigt, kann auch ein Teil der Spannung an Verbindung von der Pipette zur Zelle abfallen. Diese Verbindung ist durch den sogenannten Serienwiderstand,  $R_S$ , charakterisiert. Der Serienwiderstand kann eine Fehlerquelle für die Messung darstellen, wenn er zu gross wird. In den hier vorgestellten Messungen war der Serienwiderstand im Bereich von 5-10 M $\Omega$  . Der Gesamtzellwiderstand nach Aktivierung der Transporter ist im Bereich von 200 M $\Omega$ , deshalb ist  $R_S$  20-40 mal kleiner. Im Fall der Ganzzelleableitung mit Transportern ist der Serienwiderstand daher kein grosses Problem. Eine Serienwiderstandskompensation wurde deswegen hier nicht verwendet. Für die Messung von kapazitiven Strömen wurde der verstärkerinterne Kapazitätskompensationsschaltkreis verwendet, der die Kapazität der Zellmembran kompensieren soll.

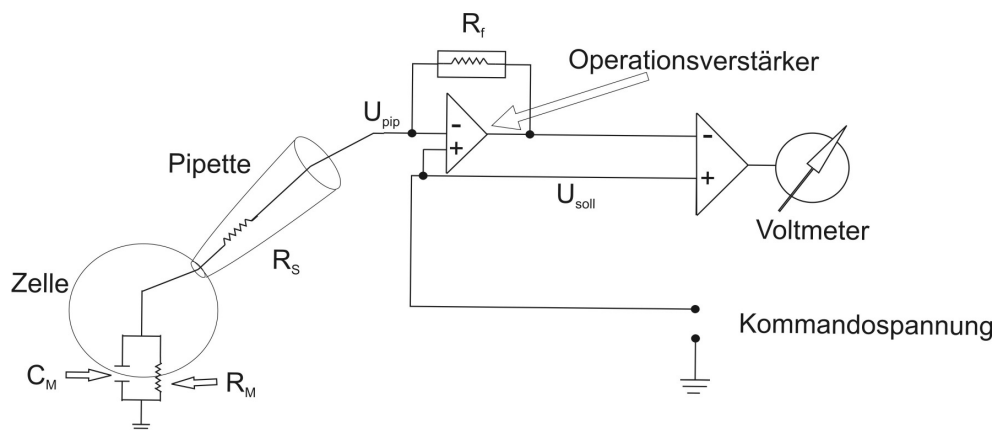


Abb. 5 zeigt ein schematisches Schaltbild einer *Whole-cell-patch-clamp* Messanordnung. Es bedeuten:  $U_{\text{pip}}$  Pipettenwiderstand;  $U_{\text{soll}}$  Soll-/Kommandospannung;  $R_f$  Rückkopplungswiderstand;  $R_S$  Serienwiderstand;  $R_M$  Membranwiderstand;  $C_M$  Membrankapazität.

### 2.3.3. Durchführung der Ganzzelleableitungen

Die Versuche wurden mit Glaspipetten durchgeführt, die einen Öffnungswiderstand von 2-5 M $\Omega$  haben, was einem Pipettenspitzen Durchmesser von etwa 1,5-2  $\mu$ m entspricht. Sowohl Mess- als auch Referenzelektrode sind Ag||AgCl-Elektroden. Die Referenzelektrode wurde in ein separates Bad getaucht, das mit der NaCl-Badlösung befüllt ist. Die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen ist in 2.4. zu finden. Der Kontakt mit dem Meßbad wurde durch eine Agarbrücke hergestellt, die mit der NaCl-Badlösung und 1% (w/w) Agarose befüllt wurde. Die Agarbrücke war notwendig, um Übergangspotentiale zu vermeiden/verringern, wenn verschiedene Badlösungen, z.B. solche mit und ohne Chlorid, verwendet wurden. Diese Art von Lösungen beeinträchtigen die Funktion der Ag||AgCl-Badelektrode. Die Elektrode basiert auf folgender Gleichgewichtsreaktion  $\text{Ag} + \text{Cl}^- \leftrightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$ . Bei einer Chlorid-freien Lösung ist, bei einem positivem Strom durch die Elektrode, die Hinreaktion nicht mehr möglich, d.h. es fließt kein Strom. Bei einem negativen Strom durch die Elektrode verliert die Elektrode die AgCl-Beschichtung, da die Chloridionen abdiffundieren. Für die Messelektrode in der Pipette wurde deshalb eine interne Salzbrücke verwendet, die es ermöglichte eine chloridfreie Pipettenlösung zu benutzen (Abb. 6). Nachdem die Pipette befüllt und mit der Halterung verschraubt wurde, wurde ein leichter Überdruck angelegt, um die Spitze vor Verunreinigungen zu schützen, wenn sie in die Badlösung getaucht wird. Sofern eine Abweichung vom Nullpotential besteht, wurde sie abgeglichen, bevor sich der Zelle genähert wurde. Sobald man die Zelle mit der Pipettenspitze berührt hatte, bzw. sich nah daran befand, wurde ein Unterdruck angelegt, mit dem die Membran an die Spitze gesaugt wurde. Einen Rechteckpuls (5 mV für 5 ms) dient der Verfolgung der Bildung des *seals*. Bei einem Widerstand von mehr als 200 M $\Omega$  wurde die Membran unter der Pipettenspitze mit einem Strompuls (0,5 V) durchstoßen. Zellen, die EAAT4 oder EAAT3 exprimierten, besaßen eine Leckleitfähigkeit für Anionen. In Experimenten, bei denen ein unendlicher SCN<sup>-</sup>-Konzentrationsgradient über die Membran anlag, ist ein Leckanionenfluss vorhanden, mit der Konsequenz, dass der Abdichtungswiderstand nicht grösser als 100-200 M $\Omega$  werden konnte. Der Rechteckpuls erwies sich als nützlich bei der Überprüfung der Unversehrtheit der Zellmembran. Bei hohen Widerständen floss nur noch ein geringer resistiver Strom zwischen Elektrode und Badlösung. Allerdings war ein grosser, kapazitiver Strom messbar, der durch die Aufladung der Membran und Pipettenwand entstand. Die

Zeitkonstante des kapazitiven Strom ist vom Widerstand und Kapazität der Pipette bzw. der Zellmembran abhängig ( $\tau = 1/R_s C_{\text{gesamt}}$ ). Durchbricht man die Zelle, vergrößert sich die Kapazität um den Betrag der Membrakapazität ( $C_M$  in Abb.5), die wesentlich grösser als die Kapazität der Pipettenwand ist, was sich in einer grösseren Zeitkonstante niederschlägt. Sobald man im Ganzzellmodus ist, wurde die Zelle bei 0 mV geklemmt, vom Deckglas entfernt und vor den Lösungsausfluß gebracht. Der genaue Aufbau des Lösungswechselsystems wird in 2.3.5.1 näher beschrieben.

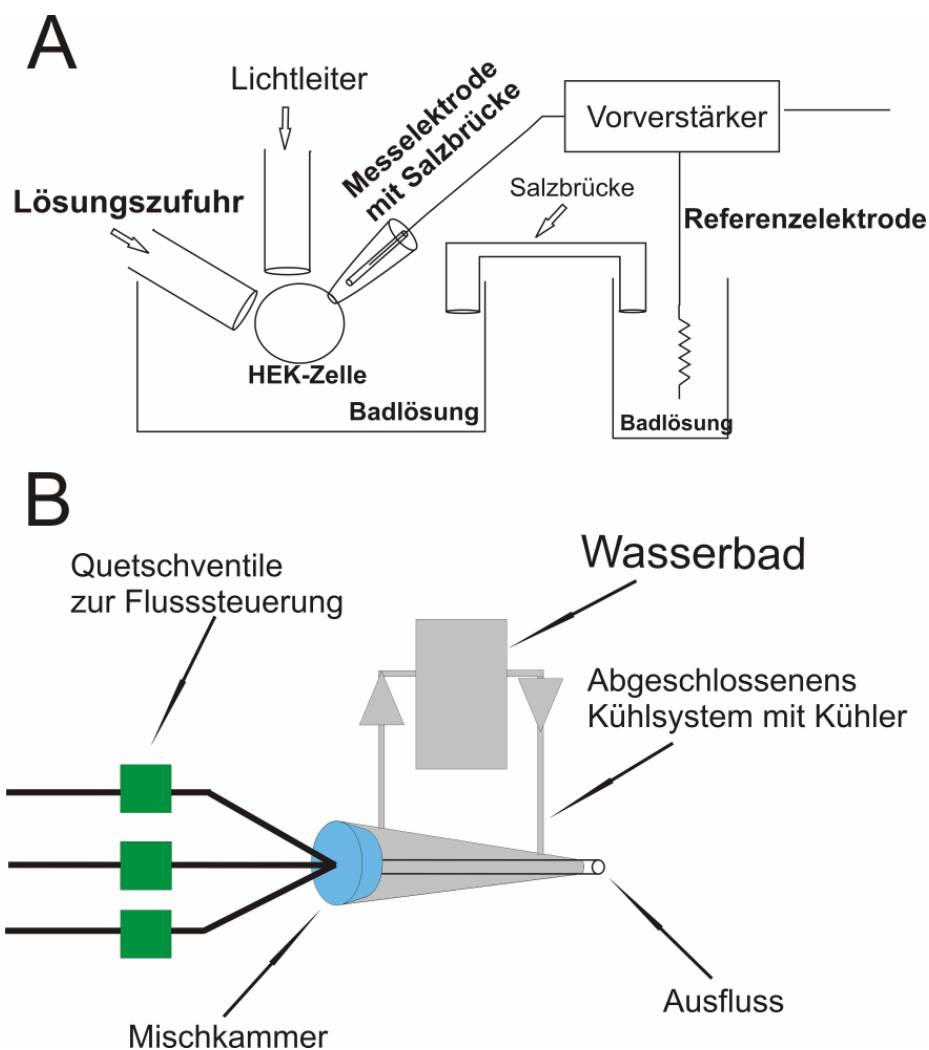


Abb.6 zeigt den schematischen Versuchsaufbau der *patch-clamp*-Experimente (A) Messanordnung bei einem Photolyseexperimente. Zur Beschreibung siehe Text (B) schematischer Aufbau eines Versuchs bei dem die Temperatur manipuliert wurde. Die Versuchslösungen fließen durch Schläuche in die Mischkammer, wobei der Fluss durch Quetschventile (grün) unterbrochen werden kann. Von der Mischkammer fließen die Lösungen durch einen Schlauch zum Ausfluß dazwischen wird die Lösung durch ein geschlossenes System (grau) gekühlt bzw. aufgeheizt.

## 2.3.5. Messprotokolle

### 2.3.5.1. Versuche mit Lösungswechsel

In dieser Arbeit sollte die Funktionsweise von Glutamtransportern untersucht werden, dazu war es notwendig Zellen mit einer glutamathaltigen Lösung zu perfundieren. Zu diesem Zweck wurde ein Aufbau konstruiert, mit dem es möglich war, einen schnellen Lösungswechsel durchzuführen. Die entsprechenden Lösungen wurden in Eppendorffreaktionsgefäßen (1,5 ml) gefüllt und durch Schläuche mit einer Mischapparatur verbunden. Auf dem Schlauchsystem befand sich ein Überdruck ( $\sim 0,07$  mbar), der die Lösungen in die Mischapparatur drückte. Zwischen den Eppendorffgefäßen und dem Mischer war ein Ventil (General Valve Corporation), das den Schlauch quetschte und so den Fluss unterbrach. Diese Ventile waren durch den Messcomputer steuerbar. Die Mischapparatur ist ein Plexiglaszylinder mit 8 Bohrungen auf der einen Seite, die als Eingänge für die Schläuche (Innendurchmesser 0,29 mm) dienten, durch die die Lösungen geflossen sind. Im Inneren des Mixers enden die Zuflüsse in einem Volumen, das durch eine Bohrung mit dem Ausgang auf der anderen Seite des Zylinders verbunden ist. In die Bohrung wurde ein Quarzrohr eingefügt (0,8 mm Aussendurchmesser), das den Ausfluss bildete, vor dem die Zelle platziert wurde. Das Quarzrohr war notwendig, da bei den Photolyseexperimenten mit UV-Licht gearbeitet wurde was von Plastikteilen absorbiert worden wäre.

Die zuvor beschriebene Konstruktion war geeignet die stationären Ströme bei Raumtemperatur zu messen, konnte aber nicht zur Bestimmung der thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften von EAAT3 bei verschiedenen Temperaturen verwendet werden. Es war daher erforderlich einen Kühler/Heizung zu konstruieren. Dazu wurde eine Plastikpipettenspitze einer 1 ml Eppendorff-Pipette verwendet. Die Pipettenspitze wurde mit zwei Bohrungen versehen, eine möglichst weit vorn und die zweite so weit wie möglich davon entfernt. In die beide Löcher wurden Schlaucholiven (Durchmesser 2 mm) eingepasst und verleimt, damit man den Zulauf von einem thermisch kontrollierbarem Wasserbad durch die Pipettenspitze durchleiten konnte (Abb. 6B). An einem Ende der Pipettenspitze wurde die Plexiglas-Mischapparatur so gefräst und eingepasst, dass sie dicht

abgeschlossen hat. In den Ausgang des Mischers wurde ein Polyethylenschlauch gesteckt, der lang genug war, um ihn durch die gesamte Pipettenspitze laufen lassen zu können. Am Ende des Schlauchs wurde ein Quarzrohr eingesetzt. (0,8 mm Aussendurchmesser) Damit der Wärmeaustausch nach dem Gegenstromprinzip funktionierte, wurden die Schläuche, die vom Wasserbad kommen, so angebracht, dass die Durchlaufrichtung des temperierten Wasser dem Lösungsfluss entgegengesetzt war. Ausserdem war es notwendig das Messbad zu temperieren, um dies zu realisieren wurde eine Kühlschleife angefertigt und in das Messbad gelegt. Die Kühlschleife war in Reihe mit dem Wärmetauscher verbunden (nicht in Abb.6 B gezeigt). Es konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die am externen Wasserbad eingestellte Temperatur, der Temperatur vor dem Ausfluss entspricht. Deshalb muss die gesamte Apparatur geeicht werden, wozu ein Thermometer mit einer kleinen Sonde benutzt (Durchmesser 0,011 inch/0,23 mm) wurde. Es wurde ein Mikromanipulator verwendet, um die Sonde vor dem Ausfluss zu positionieren. Für die Eichung wurde die korrespondierende Temperatur im Bad an der Position gemessen, in der auch die Zelle positioniert wurde. In Abb. 7 sieht man die Eichgerade, aus der zu erkennen ist, dass die Temperatur im Bad ein guter Prädiktor für die Temperatur am Ausfluss ist. Das einzige Problem stellten Temperaturen  $< 10^{\circ}\text{C}$  dar, da die Petrischale beschlug und die Sicht durch das Mikroskop stark eingeschränkt gewesen ist. Für die *whole-cell* Experimente wurde bei 3 kHz gefiltert und der elektronische Filter des Verstärkers verwendet.

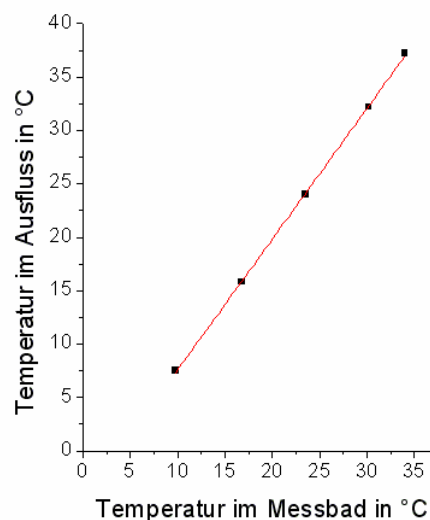


Abb. 7 Eichgerade für die Temperaturexperimente. Man sieht, dass die Temperatur, die im Messbad gemessen wird, perfekt mit der Temperatur im Ausfluss korreliert. Die Temperatur im Ausfluss und Messbad unterscheiden sich bei extremeren Temperaturen stärker, als die bei mittleren Temperaturen.

### 2.3.5.2. Spannungssprungexperimente

Im Fall dieser Experimente wurden Spannungssprünge von -100mV bis 60mV in 20 mV Intervallen durchgeführt, von einem Haltepotential zwischen dem nächsten Spannungssprung von 0 mV. Die untersuchte Spannung wurde für einen Zeitraum von 120 ms konstant gehalten. Zur Auswertung wurde die Differenz der Spannungssprung-induzierten Ströme in der Anwesenheit und Abwesenheit von Substrat gebildet. Diese Subtraktionsmethode stellt sicher, dass unspezifische Stromkomponenten, wie sie z.B. durch das kapazitive Aufladen der Membran hervorgerufen werden, eliminiert werden. Die Aufzeichnungsrate betrug 100-20 kHz. Dasselbe Programm wurde verwendet, um TBOA sensitive Ströme zu messen. Bei diesen Experimenten wurden die, durch die Na<sup>+</sup> Bindung hervorgerufenen, kapazitiven Ströme ermittelt, nachdem die erhaltenen Signale in der Anwesenheit von TBOA von denen, in der Abwesenheit von TBOA abgezogen wurden. Für diese Versuche wurden die Kapazitäten der Membran und der Pipette mit dem verstärkerinternen Schaltkreis kompensiert. Die Daten wurden mit einer Frequenz von 25 kHz aufgezeichnet und mit 3-10 kHz gefiltert.

Eine Alternative zu Spannungssprüngen für die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit von stationären Strömen bilden sogenannte Spannungsrampen, d.h. die Sollspannung wird wesentlich langsamer eingestellt, in dem verwendeten Protokoll betrug die Zeit zum Erreichen der Sollspannung etwa eine Sekunde. Danach erfolgte der Lösungswechsel, der nach einer Zeit von etwa 8 s beendet wurde, gefolgt von der Änderung des Potentials auf den Anfangswert von 0 mV. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Rate vom 20 kHz.

### 2.3.6. Photolyseexperimente

Für die Messung von vorstationären Strömen ist es notwendig innerhalb kurzer Zeit, sättigende Substratkonzentrationen zu erreichen. Der Lösungswechsel ist dafür zu langsam, daher wurde Glutamat mit einer photolabilen Schutzgruppe (*caged*-Glutamat) verwendet. Es wurden zwei Verbindungen eingesetzt:  $\alpha$ -Carboxy-o-nitrobenzyl- ( $\alpha$ -CNB) (Molecular Probes, Invitrogen) und 4-Methoxy-7-nitroindolinyll (*MNI-caged* Glutamat (Tocris). Zur

Verwendung wurden beide Verbindungen aliquotiert, dazu wurde die photolabile Verbindung in Methanol aufgenommen und auf mehrere Eppendorfgefäße verteilt. Die Aliquote werden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, nachdem das Methanol im Vakuum abgezogen wurde. Die verwendeten Verbindungen sind hydrolysierbar, auch wenn MNI im Vergleich zu CNB wesentlich stabiler ist. Trotzdem war es notwendig die Lösungen vor jedem Versuch frisch anzusetzen, dazu stellte man mit dem gewünschten Puffer eine Konzentration von ca. 0,5-1 mM *caged*-Glutamat ein. Obwohl die Quantenausbeute von CNB-Glutamat grösser als die von MNI-Glutamat ist, ist die Freisetzung von Glutamat durch MNI-Glutamat wegen des höheren Extinktionskoeffizienten ein wenig grösser. Bei beiden *caged*-Verbindungen werden in beiden Fällen nach der Photolyse sättigende Glutamat Konzentrationen erreicht. Die Zellen werden mit der Lösung etwa 2-4 sec, bei geringer Flußrate (0,03-0,07 mbar) vorinkubiert. Wenige Millisekunden vor dem Lichtblitz wird das Ventil, das den Ausfluss kontrolliert, geschlossen, damit das freigesetzte Glutamat nicht weggespült wird. Die primäre Lichtquelle stellt ein Xe/HCl Excimer Laser dar, der eine Wellenlänge von 308 nm emittierte, was zu kurzweilig für die Photolyse ist. Die gewünschte Wellenlänge von 343 nm wurde einen Fluoreszenzfarbstoff in Lösung (3,5 mM PTP in Dioxan) erzeugt, der sich am Ausgang des Lasers befand und durch Spiegel und Linsen in eine Lichtleiterfaser (Quarzglas, Durchmesser 0,365 mm) gespeist wurde. Das andere Ende des Lichtleiters endete wenige mm vor dem Lösungsausfluß (siehe Schema in Abb. 6), so dass die Zelle sowohl mit der Lösung, als auch mit dem Laserblitz versorgt wurde. Die Laserstärke wurde durch Justieren der Faser auf maximal  $800 \text{ mJ/cm}^2$  eingestellt und konnte mit Hilfe von Graufiltern (Andover Corp.) abgeschwächt werden, um die Glutamatfreisetzung zu manipulieren. Die Eigenhydrolyse stellte ein Problem dar, weshalb man das Signal kontinuierlich während der Vorinkubation im Auge behalten musste. War eine Voraktivierung des Transporters zu erkennen, musste die *caged*-Glutamatlösung frisch angesetzt werden. Die Konzentration des freien Glutamats wurde in diesem Fall per Augenmaß abgeschätzt.

## 2.4. Lösungen

### KSCN Pipettenlösung



140 mM KSCN, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA [Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure], 10 mM HEPES [N-(2-Hydroxy-ethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)], pH 7,3/KOH

#### K Chlorid-freie Pipettenlösung

140 Methansulfonat titriert mit KOH, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,3/KOH

#### KCl Pipettenlösung

140 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,3/KOH

#### Homoexchange-Mode Pipettenlösung

140 mM NaSCN, 1 mM MgCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM Glutamat, pH 7,3/NaOH

#### NaCl Badlösung

140 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES  
pH 7,3 / NaOH

#### NaSCN Badlösung

140 mM NaSCN, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES pH 7,3/NaOH

#### Na<sup>+</sup>-freie Badlösung

140 mM NMGC (N-Methyl-D-Glucamin), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES,  
pH 7,3/NH<sub>4</sub>OH

Badlösungen mit verschiedenen Natriumkonzentrationen wurden durch Mischen der NaCl und Na-freien Lösungen hergestellt.

#### *Substratlösungen:*

#### Glutamat

100 mM Natriumsalz der D-Glutaminsäure in entsalztem Wasser

bei Versuchen ohne  $\text{Na}^+$  wurde mit  $\text{NH}_3$  titrierte Glutaminsäure verwendet.

### Aspartat

100 mM D-Aspartat in entsalztem Wasser

### Glutamat-Inhibitor

10 mM D,L-threo- $\beta$ -Benzyloxyaspartat (TBOA) in entsalztem Wasser

## 2.6. Datenauswertung

Zur Auswertung der Rohdaten wurde Clampfit 9.2 aus dem pClamp-Programmpaket der Firma Axon Instruments verwendet. Die weitere Datenverarbeitung wurde entweder mit Excel (Microsoft) oder Origin (Microcal Software) durchgeführt. Die Zeitkonstanten aus den Photolyseexperimenten wurden mithilfe der Anpassung der Daten an eine Exponentialfunktion erhalten, die bis zu 3 Gliedern enthielt ( $I = I_1 e^{\left(\frac{-t}{\tau_1}\right)} + I_2 e^{\left(\frac{-t}{\tau_2}\right)} + I_3 e^{\left(\frac{-t}{\tau_3}\right)}$ ). Für die Konzentrationsabhängigkeit der Ströme in Abhängigkeit ihrer Substrate wurden die Daten an die Hillgleichung ( $I = V_{Max} \frac{[Substrat]^n}{[Substrat]^n + K^n}$ ) mit  $n = 1$  angepasst. Die erhaltende Konstante entspricht der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ). Alle anderen Formeln und Modellvorgaben sind im Anhang zu finden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Expression und Glutamattransport in EAAT4

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt um zu zeigen, dass EAAT4 in HEK-

Zellen exprimiert werden kann und dass Glutamattransport nur in transfizierten, nicht aber in Kontroll-HEK-Zellen stattfindet. Diese Versuche dienten zur Validierung des hier verwendeten Expressionssystems.

Es musste zunächst überprüft werden, ob HEK-Zellen Glutamattransporter endogen exprimieren. Die im folgenden Abschnitt gezeigten Experimente wurden von P. Balani und T. Rauen and der Universität Münster durchgeführt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Untersuchung mittels Western-Blot zeigte, dass in nicht-transfizierten Zellen kein EAAT4 nachweisbar war (Abb. 8 A Spur 1). Im Gegensatz dazu zeigten EAAT4-transfizierte Zellen eine Bande bei 65 kD (Abb.8 Spur 2), die EAAT4 entspricht. Schätzt man das Molekulargewicht anhand der Aminosäuresequenz ab, ergibt sich ein Molekulargewicht von 56 kD, daher ist es wahrscheinlich, dass das Protein in glykosylierter Form vorlag. Die Lokalisation des Transporters in der Zelle wurde durch immunzytochemische Methoden untersucht. In Abb.8 B kann man sehen, dass neben Teilen des Zytoplasmas auch der Grenzbereich zwischen den Zellen eine positive Immunreaktion zeigte. Dies ist ein starkes Indiz für die membranständige Lokalisation des Transporters.

Die Funktionalität von rekombinant-exprimiertem EAAT4 wurde mittels eines Transportassays mit radioaktivem Glutamat überprüft (Abb.8 C und D). Dafür wurden Zellmembranen einer permanent EAAT4-exprimierenden Zelllinie zu Vesikeln verarbeitet und die Vesikelsuspension mit radioaktivem L-[<sup>3</sup>H]-Glutamat inkubiert. Anschliessend wurde die Glutamataufnahme in die Vesikel gemessen. Der Transport fand statt, wenn 140 mM Natriumionen in der externen Badlösung vorhanden waren (Abb. 8 C). Ersetzte man die Natriumionen (Abb. 8 C, gefüllte Kreise) der externen Lösung durch 140 mM Kaliumionen (ausgefüllte Dreiecke), ging dies mit einer Verringerung der Transportaktivität, um mehr als 50%, einher. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit des L-[<sup>3</sup>H]-Glutamattransports von der Glutamatkonzentration (Abb. 8 C und D) wurde mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben. Die erhaltene Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) mit dem Wert  $2,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$  ( $n \geq 4$ ) bestätigt publizierte Ergebnisse aus dem Oozytenexpressionssystem (Fairman, Vandenberg et al. 1995; Mitrovic, Plesko et al. 2001). Während der  $K_M$  unabhängig von der Expression des Transporters ist, ist die maximale Geschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) von der Anzahl der Transporter in der Membran abhängig, die von der Expressions- bzw. Transfektionseffizienz beeinflusst wird. Aus diesem Grund variierte die Geschwindigkeit der Glutamataufnahme bis zu einem Faktor von 10 zwischen einzelnen Experimenten. Vergleicht man  $v_{\text{max}}$  aus EAAT4 mit den Werten, die für die

Subtypen EAAT1-3 erhalten wurden, so stellte man eine 100-fach langsamere Geschwindigkeit der Glutamataufnahme fest. Auch der  $K_M$  für Glutamat von EAAT4 war um das Zweifache geringer als in den anderen Subtypen. In vielen, der in den folgenden Abschnitten durchgeführten, Versuchen wurden Thiozyanationen ( $\text{SCN}^-$ ) als stromtragende Anionenspezies verwendet. Bei  $\text{SCN}^-$  handelt es sich um chaotropes Ion. Es ist darum nicht auszuschliessen, dass es die Funktion des Transporters beeinflusst. Zur Überprüfung wurde deshalb ein weiteres Transportexperiment durchgeführt, in dem gleiche  $\text{SCN}^-$  Konzentrationen (140 mM [ $\text{SCN}^-$ ]) auf beiden Seiten der Membran vorhanden waren. Es zeigte sich, dass der  $v_{\text{max}}$  um etwa den Faktor 3 grösser war, wenn  $\text{SCN}^-$  anwesend war, wobei der  $K_M$  unverändert blieb.  $\text{SCN}^-$  scheint den Transporter zu stimulieren, ohne die apparente Affinität zu ändern.

Abschliessend kann festgestellt werden, dass HEK Zellen als Expressionssystem für die Untersuchung von EAAT4 geeignet waren.

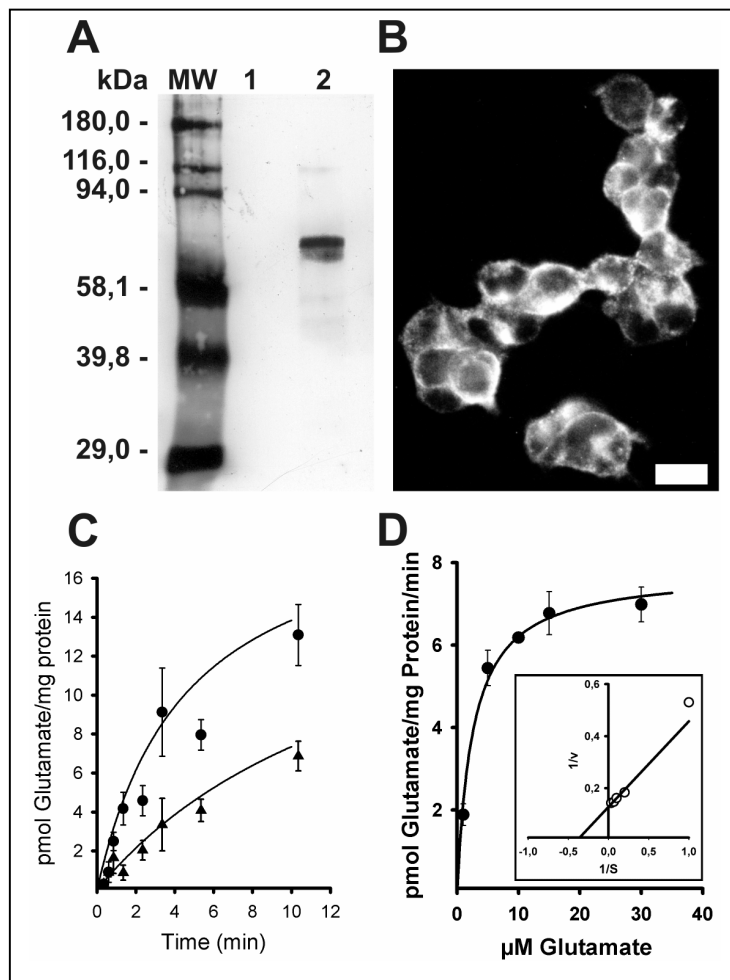


Abb.8 Proteinexpression und funktionelle Charakterisierung von heterolog exprimiertem EAAT4 in HEK293-Zellen aus (Mim, Balani et al. 2005) (A) Immuno-blot Analyse. Elektrophorese eines 10%igen SDS-Gels mit anschliessender Reaktion mit einem EAAT4-Antikörper (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit einem SDS-Extrakt (5  $\mu\text{g}$  pro Bahn), das Membranfraktionen von HEK-Zellen enthielt, die mit einem leeren Vektor (Bahn 1) und einem Vektor mit EAAT4 (Bahn 2) transfiziert wurden. Der Proteinmarker (Bahn MW) ist in kD angegeben. (B) Fluoreszenzaufnahme von  $\text{HEK}_{\text{EAAT4}}$ , die mit anti-EAAT4 markiert wurden (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), die immunochemische Färbung ist intensiv in den Zellerändern und weist auf eine membranäre Lokalisation des exprimierten Transporters hin (Balkengrösse 15  $\mu\text{m}$ ). (C) Ionen- und Zeitabhängigkeit der Glutamataufnahme

durch heterolog exprimierten EAAT4. Die Aufnahme von 1  $\mu\text{Ci}$  1- $^3\text{H}$ ]Glutamat wurde innerhalb der angezeigten Zeitintervallen gemessen, unter Verwendung Membranvesikelpräparationen von  $\text{HEK}_{\text{EAAT4}}$  mit einer Gesamtproteinmenge von 20 $\mu\text{g}$  pro Zeitpunkt. Das externe Medium enthielt 150 mM NaCl (Kreise) oder 150 mM KCl (Dreiecke). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an ( $n \geq 4$ ). (D) Kinetische Eigenschaften der 1- $^3\text{H}$ ]Glutamataufnahme in  $\text{HEK}_{\text{EAAT4}}$  Membranvesikelpräparationen. Die Aufnahmegeschwindigkeit (in  $\text{pmol Glutamat}(\text{min}\cdot\text{mg Protein})^{-1}$ ) wurde bei steigenden Konzentrationen von unmarkiertem Glutamat gemessen, bei einer Vesikelproteinkonzentration von 40 $\mu\text{g}$ . Proben wurden in dem linearen Zeitbereich der Glutamataufnahme genommen (15 und 30 s). Die Daten repräsentieren eine Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung. Die  $K_M$  und  $v_{\text{max}}$  Werte wurden von einem Lineweaver-Burk-Auftragung der Gleichung erhalten und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardschätzfehler. Alle Abbildungen und Versuche wurden von Thomas Rauen und Ponam Balani durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 3.2. Eigenschaften von stationären Strömen in EAAT4

Als erstes sollte EAAT4 unter Bedingungen untersucht werden, in dem sich der Transporter im Fließgleichgewicht, im weiteren auch *steady state* oder stationärer Zustand genannt, befand. Ganzzelleableitungen von EAAT4 transfizierten HEK-Zellen ( $\text{HEK}_{\text{EAAT4}}$ ) zeigten einen Einwärtsstrom, für die Dauer der Applikation einer glutamathaltigen Lösung. Dieser Einwärtsstrom wurde durch den Ausstrom von  $\text{SCN}^-$  Ionen hervorgerufen (KSCN-haltige Pipettenlösung). Der Maximalstrom im *steady state* wurde innerhalb von 80 ms erreicht. Der Betrag des Einwärtsstroms war von der Glutamatkonzentration abhängig und konnte durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden (Abb. 9 A). Der  $K_M$  Wert wird im folgenden synonym mit der apparenten Dissoziationskonstante für Glutamat verwendet, im Gegensatz zu der intrinsischen Dissoziationskonstante  $K_d$ . Der Wert des erhaltenen  $K_M$  betrug  $0,6 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$  ( $n = 7$ ) bei 0 mV. Dieses Ergebnis zeigte, dass der Transporter Glutamat mit einer hohen Affinität bindet, bzw. transportiert. Dies bestätigt Resultate aus dem *Xenopus* Oozyten Expressionssystem (Fairman, Vandenberg et al. 1995).

Durch EAAT4 getragene, stationäre Ströme sind eine Summe aus drei Komponenten, die in den nächsten Kapiteln getrennt voneinander untersucht wurden.

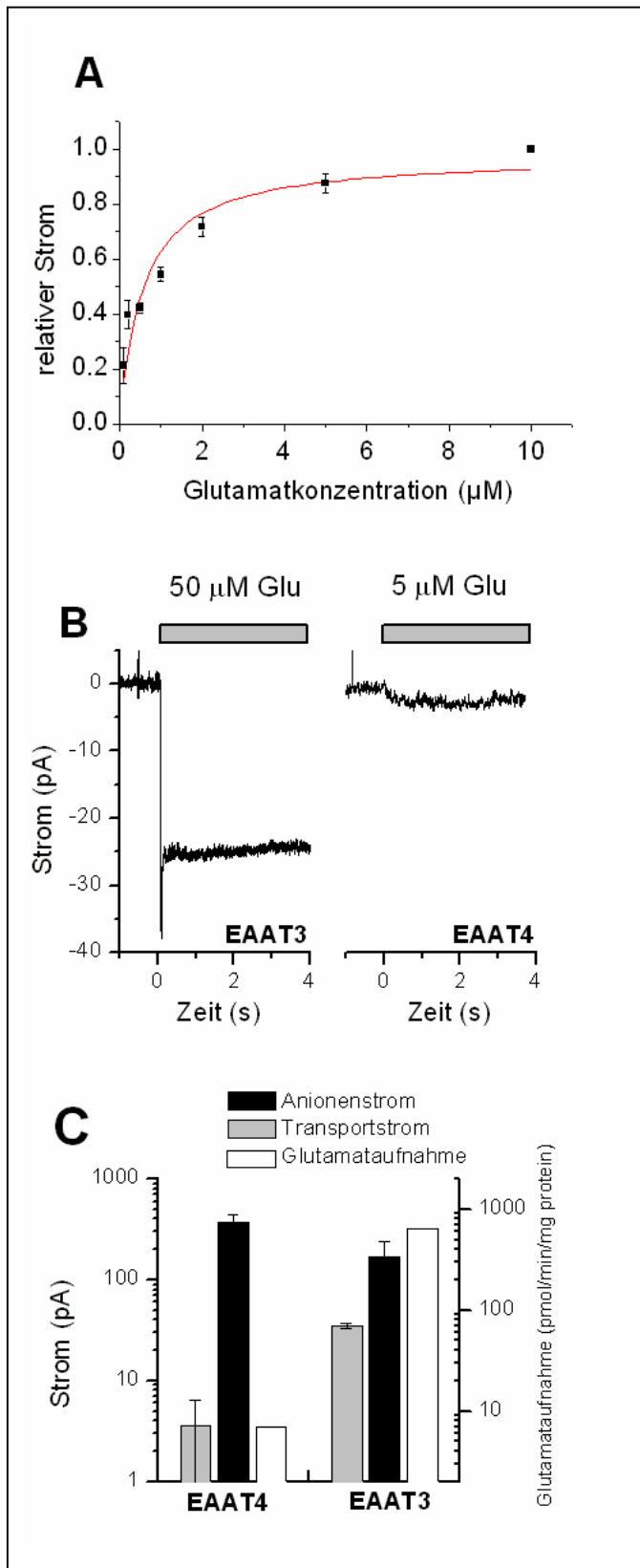


Abb. 9 Stationäre Transporteigenschaften von EAAT4 im Vergleich zu EAAT3 (A) Glutamatkonzentrationsabhängigkeit der EAAT4 Ganzzellströme. Die externe  $[\text{Na}^+]$  betrug 140 mM bei pH 7,3. Die Ströme wurden gegenüber dem Strom bei  $10\mu\text{M}$  Glutamat normalisiert. Die Hillgleichung (Hillkoeffizient = 1) wurde an den Datensatz angepasst, der  $K_M = (0,6 \pm 0,12)\mu\text{M}$ . (n =7) (B) Beispiel einer Einzelmessung des Transportstroms für EAAT3 (links) und EAAT4 (rechts), der durch  $50\mu\text{M}$  bzw.  $5\mu\text{M}$  Glutamat (markiert durch Balken) bei 0 mV ausgelöst wurde. (C) Statistische Analyse des Transport- und Anionenstrom (linke Ordinate) und der Glutamataufnahmegeschwindigkeit (rechte Ordinate) durch HEK293-Zellen, die EAAT4 bzw. EAAT3 exprimierten. Die Unterschiede zwischen EAAT4 und EAAT3 in der Stromamplitude oder Aufnahmegeschwindigkeit wurden nicht durch Unterschiede in der Expression verursacht. Entsprechend der Analyse von vorstationären Daten wurde die mittlere Anzahl der Transporter in der Membran von HEK293 ( $2,0 \pm 1,2 \cdot 10^6$  für EAAT4 und  $3,0 \pm 0,2 \cdot 10^6$  für EAAT3) abgeschätzt. Die Anionenströme wurden in der Anwesenheit von intrazellulärem  $\text{SCN}^-$  Ionen gemessen.

### 3.2.1. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> gekoppelter Strom in EAAT4

Der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> gekoppelte Strom ist direkt mit dem elektrogenen Glutamattransport assoziiert, daher spricht man auch vom Transportstrom. Transportströme können nur isoliert gemessen werden, wenn kein permeierendes Anion vorhanden ist, daher enthielt die Pippettenlösung und die Badlösung Methansulfonationen (MeS) als Anionenspezies. Eine Aktivierung des Transporters in HEK<sub>EAAT4</sub> durch extrazelluläre Applikation von Glutamat (100 µM) resultierte in einem kleinen Einwärtsstrom (~ -3 pA; Abb 9 B rechte Seite). Zum Vergleich wurde eine Spur aufgetragen, die die glutamatinduzierte Aktivierung von EAAT3 exprimierenden HEK-Zellen zeigt. Vergleicht man die Grösse der von EAAT3 mit den EAAT4 generierten Ströme, so fällt sofort auf, dass der von EAAT4 generierter Strom wesentlich kleiner war, als der von EAAT3 erzeugte Einwärtsstrom. Ausserdem war es nur möglich Transportströme in HEK<sub>EAAT4</sub> zu messen, wenn die Expression des Proteins hoch genug war. Dies war schätzungsweise bei 10% der gemessenen Zellen möglich, der mittlere Strom, bei 0 mV, beträgt (-3,6 ± 2,8)pA (n = 3). Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Transportgeschwindigkeit von EAAT4, im Vergleich zu EAAT3, erheblich langsamer ist, denn der stationäre Transportstrom ist ein direktes Maß für die Transportgeschwindigkeit. Eine detailliertere Bestimmung der Umsatzrate von EAAT4 erfolgt in späteren Abschnitten.

Aufgrund des Unterschiedes von EAAT4 und EAAT3 in der Geschwindigkeit der Glutamataufnahme (Abb. 9 C) hätte man eigentlich einen noch geringeren Transportstrom erwarten müssen. Die Glutamataufnahme kann jedoch nicht direkt mit dem Transport verglichen werden, da man die Transporterkonzentration in den Zellen und verwendeten Vesikeln nur schlecht feststellen und daher kaum vergleichen kann. Der Transportstrom konnte auch bei 0 mV beobachtet werden, wenn SCN<sup>-</sup> auf beiden Seiten der Membran in gleicher Konzentration vorhanden war. Zur Überprüfung ob der Transportstrom vorhanden ist, wurde das Umkehrpotential gemessen, welches mit +2 mV bestimmt wurde. Die Existenz des Transportstroms ist ein weiteres Indiz, dass der Transport nicht durch SCN<sup>-</sup> inhibiert wurde (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2. Glutamat induzierter Anionenstrom

Alle Glutamattransporter der SLC1 Familie besitzen eine Leitfähigkeit für Anionen. Die Subtypen EAAT4 und EAAT5 zeigen die grösste Anionenleitfähigkeit innerhalb dieser Proteinfamilie (Fairman, Vandenberg et al. 1995; Arriza, Eliasof et al. 1997), weshalb die Eigenschaften des Anionenstroms in EAAT4 näher untersucht wurden. Anstelle von Chloridionen wurde  $\text{SCN}^-$  in der Pipettenlösung verwendet, da bekannt ist, dass die Leitfähigkeit für dieses Ion erheblich grösser als für Chloridionen ist (Eliasof and Jahr 1996). Zur Bestimmung des Anionenstroms im Vorwärtstransport, wurden  $\text{HEK}_{\text{EAAT4}}$  mit einer Lösung, die  $100\mu\text{M}$  Glutamat enthält perfundiert. Es wurde ein einwärtsgerichteter Strom erhalten, mit einem Mittelwert von  $(-370 \pm 80)\text{pA}$ . Dieser Strom ist ca. 100 mal grösser als der Transportstrom (Abb. 9 C), deshalb kann man unter den gewählten Bedingungen den glutamatinduzierten Anionenstrom als isoliert vom Transportstrom betrachten. In den meisten, in der Literatur beschriebenen, Experimenten wurde Aspartat anstelle von Glutamat verwendet. Der Quotient des durch Aspartat bzw. Glutamat induzierten Maximalstroms, bei Anwendung von  $100\mu\text{M}$  des jeweiligen Substrats, lieferte einen Wert von  $1,5 \pm 0,4$  ( $n = 4$ ). Dies bestätigt die Tatsache, dass Aspartat in EAAT4 tendenziell grössere Ströme als Glutamat verursacht (Eliasof, Arriza et al. 1998). Um zu überprüfen, ob es sich bei dem gemessenen Strom wirklich um einen anionengetragenen Strom handelt, war es nötig den Strom bei verschiedenen Membranpotentialen zu messen, um das Umkehrpotential zu bestimmen. Zudem wurde der  $\text{SCN}^-$ -Konzentrationsgradient, im Vergleich zu den bisherigen Messungen ( $\text{SCN}^-$  nur in der Zelle vorhanden), umgedreht (Abb. 10). In diesem Experiment wurde  $\text{SCN}^-$  nur extrazellulär verwendet, wobei der Strom im Vorwärtstransportmodus mit  $100\mu\text{M}$  Glutamat untersucht wurde (Abb. 10 B gefüllte Dreiecke  $\text{SCN}^-$  aussen). In diesem Fall beobachtete man bei allen Spannungen einen auswärtsgerichteten Strom, der mit hyperpolarisierenden Membranpotential abnimmt. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für EAAT3 und EAAT2 beschrieben. Dieses Verhalten konnte mit der treibenden Kraft für den Anionenfluss erklärt werden, bei positiven Potentialen begünstigt die treibende Kraft den Einstrom der negativen  $\text{SCN}^-$  Ionen, während bei negativen Potentialen der umgekehrte Fall vorliegt. Dieses Verhalten konnte mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK-Gleichung) beschrieben werden (Hodgkin and Katz 1949).

Ausserdem wurde der Fall geprüft, bei dem  $\text{SCN}^-$  nur intrazellulär vorliegt. Hier



wurde eine Strom-Spannungskennlinie mit einem unerwarteten Verlauf erhalten (Abb.10 B blaue, volle Kreise). Der Strom nahm mit abnehmendem Membranpotential zunächst zu, bis, bei etwa -20 mV, ein Maximum durchlaufen wurde, dann aber fiel der Strom wieder ab. Dieser Verlauf deutete an, dass ein stark negatives Membranpotential den glutamatinduzierten Anionenstrom hemmt. Um dieses ungewöhnliche Ergebnis weitergehend zu untersuchen, wurde ein Spannungssprungexperiment in Anwesenheit von 100  $\mu$ M Glutamat durchgeführt (Abb 10 A linke Seite). Das Membranpotential wurde, ausgehend von 0 mV, auf Werte zwischen -100 und +60 mV eingestellt. Wurde der Strom, der direkt nach dem Spannungssprung gemessen wurde, gegen die Spannung aufgetragen, so erhielt man interessanterweise einen Kurvenverlauf, der mit der GHK-Gleichung übereinstimmt (Abb. 10 B blaue Quadrate). Der anfängliche Strom relaxierte jedoch auf einen neuen, stationären Wert, der kleiner als der ursprüngliche Strom direkt nach dem Spannungssprung war, mit einer spannungsunabhängigen Zeitkonstante von 14 ms ( $\tau = 14 \pm 3$  ms,  $n = 3$ ). Bei der Auswertung der Ströme im neuen stationären Zustand, 75 ms nach dem Spannungssprung, zeigte sich wieder eine glockenförmige Strom-Spannungskennlinie. Ein Sprung zu positiven Potentialen hatte eine schwache Aktivierung zur Folge, da der Strom direkt nach dem Puls 1,4 mal grösser war als vor dem Spannungssprung ( $I/I_{\text{Anfang}} = 1,4 \pm 0,1$ ;  $n=3$ ). Die Relaxation zurück auf das Niveau vor dem Spannungssprung, war ein relativ langsamer Prozess, mit einer Zeitkonstante von ( $16 \pm 0,4$ )ms verknüpft war. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der Hemmung und (Re-)Aktivierung des Anionenstroms um einen langsamen Vorgang handelte, im Gegensatz zur Manipulation der elektromotorischen Kraft, die eine Änderung des Anionenstroms innerhalb von Bruchteilen von Millisekunden bewirkte.

Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens lautet, dass der Anionenstrom das intrazelluläre  $\text{SCN}^-$  Reservoir entleert hatte, doch scheint dies aus drei Gründen nicht wahrscheinlich: Erstens war dieser Effekt bei EAAT3 transfizierten Zellen nicht zu sehen, obwohl diese Zellen glutamat-induzierte Anionenströme in derselben Grössenordnung katalysierten. Zweitens war die Zeitkonstante für die (In-)Aktivierung des Stroms unabhängig von der Größe der Zelle und dem Expressionsniveau des Transporters. Aber genau das wäre nicht zu erwarten, da die Geschwindigkeit der Entleerung des intrazellulären Reservoirs vom Zellvolumen und der Transporterkonzentration abhängen sollte. Drittens ist das theoretisch abschätzbare Ausmass des Ausflusses von Anionen zu gering, als dass es einen Einfluss haben könnte. Bei einem Zelldurchmesser von 20 $\mu$ m,

einem Membranpotential von  $-90\text{mV}$  und einem Strom von  $500\text{ pA}$ , verliert die Zelle höchstens  $5\%$  des zytosolischen  $\text{SCN}^-$  während des Spannungspuls ( $75\text{ ms}$ ).

Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass durch das Anlegen von negativer Spannung Zustände des Transportzyklus bevölkert werden, die keine oder nur eine geringe Anionenleitfähigkeit besitzen. Von anderen Transportsubtypen der SLC1 Familie ist bekannt, dass der  $\text{K}^+$ -abhängige Relokationsschritt geschwindigkeitsbestimmend für den Transportzyklus ist. Um zu überprüfen, ob es eine Verbindung zwischen dem Relokationsschritt und dem beobachteten Verhalten gibt, wurde das Experiment wiederholt, ohne dass der Transporter den  $\text{K}^+$ -abhängigen Zweig des Zyklus durchlaufen kann. Das erreicht man, indem man den Transporter im Homoexchange-Modus untersucht, d.h. anstatt  $140\text{ mM K}^+$  waren  $140\text{ mM Na}^+$  in der Pipettenlösung vorhanden, zudem wurde der Pipettenlösung  $10\text{ mM Glutamat}$  zugesetzt (siehe Abb.4). Nachdem dasselbe Spannungsprotokoll wie in den vorangegangenen Experimenten durchgeführt wurde, wurde auch hier ein vorstationärer, einwärtsgerichteter Strom gemessen, der in einen neuen, stationären Zustand abgeklungen ist. Trägt man die stationären Ströme gegen die Spannung auf, so erhält man einen fast linearen Verlauf (Abb. 10 B orange Kreise). Der Transporter wurde durch negative Potentiale zwar nicht vollständig gehemmt, dennoch war eine Teilinhibierung festzustellen. Der vorstationäre Strom wiederum verhielt sich so, wie man es anhand der GHK-Gleichung erwarten würde (Abb. 10 B, orange Quadrate). Diese Daten zeigen, dass die Hemmung bei negativen Potentialen im Homoexchange-Modus weniger stark war als im Vorwärtstransport.

Zuletzt sollte die Frage beantwortet werden, weshalb diese ungewöhnliche Strom-Spannungsbeziehung des Transporters bisher noch nicht beobachtet wurde. Die meisten elektrophysiologischen Untersuchungen an EAAT4 wurden im *Xenopus* Oozytenexpressionssystem angestellt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Experimente in HEK-Zellen mit Lösungen durchgeführt, die der ionischen Zusammensetzung des Oozytenzytosols ( $10\text{ mM Na}^+$ ,  $5\text{ mM Glutamat}$ ), bzw. der Oozyten Ringer Lösung entsprechen (Deitmer, Broer et al. 2003). Der Wert für die zytosolische Glutamatkonzentration ist evtl. zu niedrig angesetzt, da in der Literatur auch eine Glutamatkonzentration von  $10\text{ mM}$  diskutiert wird (Seal, Shigeri et al. 2001). Der zeitliche Verlauf der Ströme unter diesen Bedingungen war ähnlich dem Verlauf unter Homoexchange Bedingungen. Die Auftragung der stationären Ströme gegen die Spannung (Abb. 10 B magenta Kreise) ergibt eine Kurve, die im Einklang mit den Ergebnissen in

Oozyten war. Es ist wahrscheinlich anzunehmen, dass die Ströme, die in *Xenopus* Oozyten von EAAT4 gemessen wurden, denen ähnlich sind, die im Homoexchange Modus von EAAT4 gemessen wurden. Das bedeutet, dass EAAT4 kinetisch im Homoexchange Modus arbeitet.

Wenn die Inhibierung des Anionenstroms durch negative Membranpotentiale mit der Akkumulierung von nichtleitenden Zuständen im Transportzyklus in Verbindung gebracht werden kann, so sollte dieses Phänomen auch in der Abwesenheit von permeierenden Anionen beobachtbar sein. Um dies zu überprüfen, wurden alle Anionen durch MeS ersetzt (Abb 10 C  $\text{SCN}^-$  frei). Unter diesen ionischen Bedingungen wurde nur der Transportstrom gemessen. Die erhaltene Strom-Spannungskennlinie unterschied sich von der, die in EAAT3 gefunden wurde (Kanai, Nussberger et al. 1995). Ausgehend von +60 mV stieg der Transportstrom bis zu einem Maximum bei etwa 0 mV an, um dann, mit weiter abnehmendem Potential, wieder ab zu fallen. Die Hemmung der Transporterfunktion bei negativen Membranpotentialen war deshalb nicht nur auf die Anionenleitfähigkeit beschränkt, sondern gilt auch für den elektrogenen Glutamattransport. Dies legt nahe, dass der Umsatz von EAAT4 bei negativen Membranpotential gegenüber dem Wert bei 0 mV abnimmt.

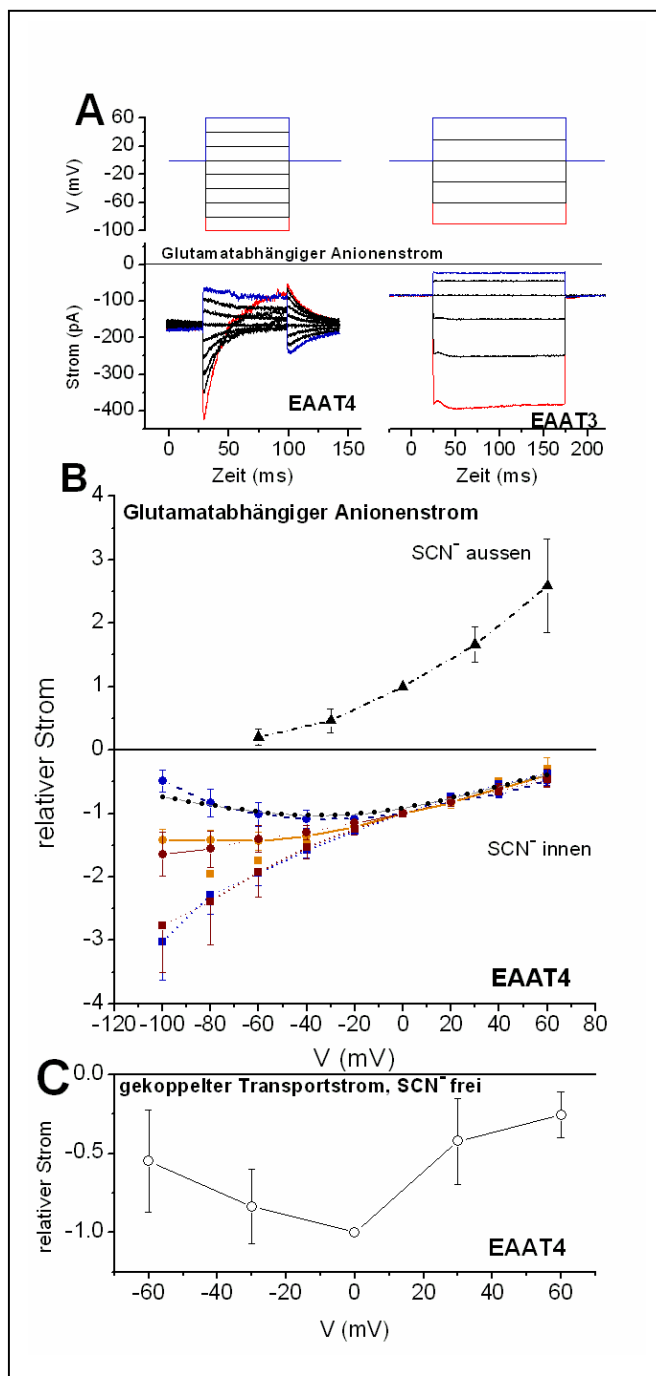


Abb. 10 Spannung induzierte Relaxationsexperimente in EAAT4 und EAAT3 (A) In der oberen Spur wurde der zeitliche Verlauf der Spannung im Spannungssprungexperiment aufgetragen, das verwendet wurde, um die glutamatinduzierten Anionenströme aufzunehmen. Das Protokoll beginnt bei -100 mV und endet bei 60 mV in Inkrementen von 20 mV (EAAT4, links), bzw. -90 mV bis 60 mV (Inkrementen von 30 mV EAAT3, rechts); die untere Spur zeigt ein typisches Signal, das durch die Substraktion des Stromsignals mit Glutamat (10  $\mu$ M) von dem in der Abwesenheit Glutamat erhalten wurde. Links sind die Spuren für EAAT4 und rechts die für EAAT3 aufgetragen. Diese Daten wurden im Vorwärtstransportmodus (140 mM KSCN intern) erhalten. (B) Spannungsabhängigkeit der Ströme bei sättigenden Glutamatkonzentrationen und in der Anwesenheit von 140 mM SCN<sup>-</sup> in der externen Lösung, die durch die Ströme bei 0 mV normalisiert wurden, (schwarze, ausgefüllte Dreiecke). Diese Messungen wurden mit einer Spannungsrampe und anschließendem Lösungswechsel von glutamatfreier auf glutamathaltige Lösung durchgeführt, d.h. einer langsamen Einstellung der Sollspannung. In den Kurven unterhalb der Abszisse war das SCN<sup>-</sup> Ion intrazellulär (140 mM) vorhanden. All diese Experimente wurden mit dem Spannungssprungprotokoll, wie in A beschrieben, durchgeführt. Die blaue Spur

repräsentiert die Messungen mit 140 mM K<sup>+</sup> in der Pipettenlösung, transiente (Kreise) und stationäre Ströme (Quadrate) wurden getrennt voneinander aufgetragen. Der orange Datensatz wurde unter Homoexchange-Bedingungen, 140 mM Na<sup>+</sup> und 10 mM Glutamat in der Zelle, aufgenommen, Quadrate zeigen die stationären und Kreise die transienten Ströme. Die Spuren in magenta stehen für Messungen, die mit Oozyten Ringerlösung und einer Pipettenlösung aufgenommen wurden, die der ionischen Zusammensetzung des Zellinneren einer Oozyten ähnlich ist. (C) *Steady-state* Strom-Spannungskennlinie des gekoppelten Transportstroms in Abwesenheit eines nicht-permeierenden Ions (MeS Austausch)

aufgenommen mit einem Spannungsrampenprotokoll. Die Glutamatkonzentration beträgt 100  $\mu$ M.

### 3.2.3. Leckanionenstrom und $\text{Na}^+$ -Bindung an den unbeladenen Transporter

In den Glutamattransportersubtypen EAAT3 und EAAT2 wurde eine glutamatunabhängige Anionenleitfähigkeit beobachtet. In der Literatur wird berichtet, dass dieser Anionenstrom, im folgenden Leckstrom genannt, auch in EAAT4 vorhanden ist (Melzer, Biela et al. 2003). In dieser Arbeit wurde der Leckstrom durch die Zugabe von  $\text{Na}^+$  aktiviert und in der Anwesenheit von intrazellulärem  $\text{SCN}^-$  gemessen (Abb. 18 C für EAAT3). Daher ist anzunehmen, dass die Bindung von  $\text{Na}^+$  an den Transporter, in Abwesenheit von Glutamat, für das Auftreten des Leckstroms notwendig ist. Die mittlere Stromstärke des Leckstroms betrug in der Anwesenheit von 140 mM extrazellulärem  $\text{Na}^+$  ( $120 \pm 24$ )pA ( $n = 4$ ), mit 140 mM  $\text{KSCN}^-$  in der Pipettenlösung und bei 0 mV. untransfizierte Zellen zeigen nach der Perfusion mit derselben  $\text{Na}^+$ -Konzentration nur einen Strom von ( $9 \pm 0,5$ )pA ( $n = 3$ ).

Zur Überprüfung der apparenten Affinität des unbeladenen Transporters für  $\text{Na}^+$  wurde die Amplitude des Leckstroms in Abhängigkeit der externen  $\text{Na}^+$ -Konzentration gemessen (Abb 11 A weiße Kreise). Der Leckstrom nahm mit zunehmender  $[\text{Na}^+]$  zu und zeigte Sättigungsverhalten bei hohen  $\text{Na}^+$  Konzentrationen. Die Daten konnten mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung angepasst werden, der  $K_M$  beträgt ( $42 \pm 5$ )mM. Als nächstes wurde getestet, ob die Bindung von  $\text{Na}^+$  an den Transporter elektrogen ist. Die Bindung von  $\text{Na}^+$  an den EAAT3 Transporter ist mit einer Ladungsbewegung verbunden (Grewer, Watzke et al. 2000). Um diese, mit der  $\text{Na}^+$  Bindung assoziierte Ladungsbewegung in EAAT4 zu messen, wurden Spannungssprünge durchgeführt. Abb. 11 B zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches. Das Membranpotential wurde von einem Haltepotential von -100 mV bis +60 mV in 20 mV Stufen geändert und am Ende jedes Pulses (Pulsdauer 10 msec) wurde wieder auf die Ausgangsspannung von -100 mV zurückgegangen. Jeder Spannungssprung war am Anfang mit einem transienten Auswärtsstrom verbunden, beim Zurückschalten zur Ausgangsspannung wurde ein Signal in umgekehrter Richtung beobachtet. In beiden Fällen war der Strom innerhalb von etwa 2-3 ms abgeklungen (0,5 ms Zeitkonstante bei 140 mM  $\text{Na}^+$  extern). Um zu überprüfen, ob diese transienten Ströme mit der  $\text{Na}^+$ -Bindung assoziiert waren, so wie es für die anderen EAAT-Subtypen

vorgeschlagen wird, wurde die Spannungs- und  $[\text{Na}^+]$ -Abhängigkeit der spannungsinduzierten Ladungsverschiebung durch Integration des transienten Stromsignals bestimmt. Abb. 11 C. zeigt, dass die Ladungsverschiebung bei stark negativen Potentialen zum Erliegen kam, ein Hinweis, dass der Transporter unter diesen Bedingungen in einem komplett  $\text{Na}^+$ -beladenen Zustand akkumulierte, was eine weitere spannungsgetriebene Ladungsverschiebung unterbunden hat. Das Mittelpunktspotential der Ladungsverschiebung wurde mit  $(+93 \pm 25)\text{mV}$  abgeschätzt (Abb. 11 C innen stehender Graph). Das Ergebnis ist im Einklang mit dem zuvor bestimmten  $K_M$  der  $\text{Na}^+$ -Bindung, der impliziert, dass der Transporter unter physiologischen Bedingung ( $140 \text{ mM Na}^+$ ) zu **77 %** im  $\text{Na}^+$  beladenen Zustand vorhanden ist. Wenn die extrazelluläre  $[\text{Na}^+]$  auf  $40 \text{ mM}$  erniedrigt wurde, einem Wert, der Nahe am  $K_M$  liegt, erhielt man ein Mittelpunktspotential der Ladungsverschiebung von  $(-10 \pm 4)\text{mV}$  (Abb. 11 C innen stehender Graph). Dies weist darauf hin, dass negative Membranpotentiale benötigt werden, um  $\text{Na}^+$  in die Bindungsstelle von EAAT4 zu treiben. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Bindung von  $\text{Na}^+$  an die extrazellulären Bindungsstelle, oder eine Konformationsänderung, die damit assoziiert ist, eine transiente Ladungsbewegung erzeugt hat, die durch die Spannungsprünge induziert ist. Die apparente Valenz dieser Ladungsverschiebung wurde mit  $0,3$  abgeschätzt. Die Formeln, die zur Berechnung des Mittelpunktspotentials und der dazu benötigten Grössen verwendet wurden, sind im Anhang zu finden.

#### 3.2.4. Abhängigkeit der stationären Kinetik von EAAT4 von der Natriumionenkonzentration

Glutamat und  $\text{Na}^+$  induzierten einen stationären Strom in EAAT4. In Anwesenheit von intrazellulären  $\text{SCN}^-$  Ionen war dieser Strom auswärtsgerichtet und von Anionen getragen, unter sättigenden Glutamatkonzentrationen nahm dieser Wert ein Maximum ein. Der Wert des glutamatinduzierten Maximalanionenstroms ( $I_{\text{max}}$ ) im *steady state* war ebenfalls von der Konzentration der Natriumionen abhängig. Eine Sättigung trat unter physiologischen  $\text{Na}^+$  Konzentrationen ( $140 \text{ mM}$ ) ein (Abb 11 A). Um die Ströme zu erhalten, wurden, entsprechend der  $[\text{Na}^+]$ , sättigende Glutamatkonzentrationen verwendet (vergl. Legende zur Abb. 11). Die Werte wurden mit Bezug auf  $I_{\text{Max}}$  bei  $140 \text{ mM } [\text{Na}^+]$

standardisiert. Der apparente  $K_M$  für  $\text{Na}^+$  wurde mit  $(8,4 \pm 1,9)\text{mM}$  bei 0 mV bestimmt, was signifikant niedriger war, als der Wert für EAAT3 ( $K_M = 22 \text{ mM}$ ) unter gleichen Bedingungen. Dies zeigt, dass eine Erhöhung der Glutamatkonzentration auf sättigende Werte nicht die Erniedrigung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration kompensieren kann, was darauf schliessen lässt, dass mindestens ein Natriumion binden muss, bevor Glutamat an den Transporter bindet, oder dass die  $\text{Na}^+$  Bindung geschwindigkeitsbestimmend wird (siehe Diskussion).

Als nächstes wurde der Effekt von  $\text{Na}^+$  auf den apparenten  $K_M$  für Glutamat bestimmt (Abb. 11 D). Man erkennt, dass der  $K_M$  grösser wurde, wenn man  $[\text{Na}^+]$  herabgesetzt hat. Dieses Ergebnis war konsistent mit dem Resultaten aus EAAT3, die zeigen, dass die Bindung eines Natriumions für die hochaffine Bindung von Glutamat notwendig ist.

Die  $K_M$  Werte für das transportierte Substrat bzw. nicht-transportierte Inhibitoren waren in anderen Glutamattransportersubtypen vom Transmembranpotential unabhängig. Dies könnte bedeuten, dass der Glutamatbindungsschritt elektroneutral ist. Um diese Idee für EAAT4 zu überprüfen, wurde die Spannungsabhängigkeit des  $K_M$  Werts für Glutamat gemessen. Unter physiologischen Bedingungen ( $140 \text{ mM Na}^+$ ) war eine schwache Abhängigkeit zu sehen, die Steigung im  $\log[K_M]$ -V Diagramm betrug  $(6.0 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}/\text{mV}$  (Abb 11 E schwarze Kreise), d.h. mit fallendem Membranpotential verringerte sich der  $K_M$ . Das Experiment wurde mit geringeren  $[\text{Na}^+]$  in der Badlösung wiederholt (Abb. 11 E; 30 mM, blaue Kreise; 10 mM, rote Kreise). Obwohl der  $K_M$  zu höheren Werten verschoben war, blieb die Steigung, im Rahmen der experimentellen Ungenauigkeit, dieselbe ( $[7,2 \pm 1,1] \cdot 10^{-3}/\text{mV}$  für 30 mM  $\text{Na}^+$  und  $[6,1 \pm 3,7] \cdot 10^{-3}/\text{mV}$  für 10 mM  $\text{Na}^+$ ). Diese Ergebnisse sind allerdings nicht mit der elektrogenen Glutamatbindung zu erklären, da eine entgegengesetzte Spannungsabhängigkeit zu erwarten wäre. Im Diskussionsteil wird dieser Befund anhand eines einfachen Transportmodells erklärt.

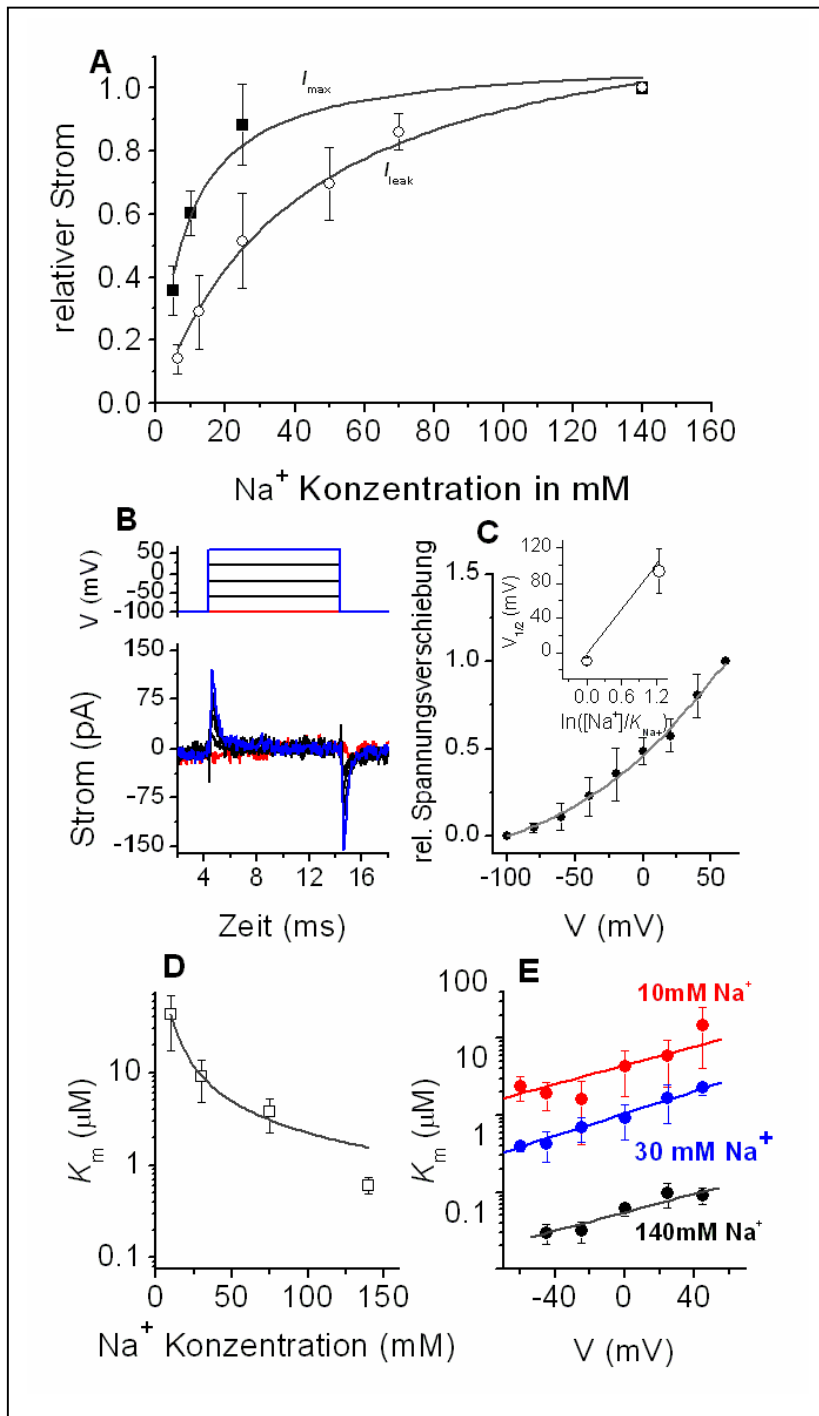


Abb. 11 Bindung von  $\text{Na}^+$  an den unbeladenen und glutamatgebundenen Transporter (A)  $[\text{Na}^+]$ -Abhängigkeit des maximalen Ganzzellstroms ( $I_{\text{max}}$ , ausgefüllte Kreise) bei sättigenden Glutamatkonzentrationen. Ströme bei 5 mM  $\text{Na}^+$  [1 mM Glu], 10 mM  $\text{Na}^+$  [1 mM] und 20 mM  $\text{Na}^+$  [0,5 mM Glu] wurden mit den Strömen bei 140 mM  $\text{Na}^+$  [0,1 mM Glu] normalisiert. Die Kurve stellt die beste Annäherung an die Hillgleichung dar, der  $K_M$  beträgt  $(8,4 \pm 1,9)\text{mM}$ . Die leeren Kreise zeigen die  $[\text{Na}^+]$ -Abhängigkeit der Leckleitfähigkeit ( $I_{\text{leak}}$ ). Auch für die Beschreibung dieses Datensatzes wurde die Hillgleichung verwendet. Man erhält einen  $K_M$  von  $(42,3 \pm 5,2)\text{mM}$ . (B) Aufzeichnung eines repräsentativen Spannungssprungexperiments mit 140 mM  $\text{Na}^+$  in der Badlösung. Die Spannung wurde vom Haltepotential, -100 mV, auf das jeweilige Sollpotential eingestellt. Das verwendete Protokoll ist in der oberen Spur zu sehen. Die Rohdaten wurden um die

Leckleitfähigkeit korrigiert, indem man einen Datensatz von den Daten subtrahiert, die unter denselben Bedingungen in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  TBOA gemessen wurden. Sowohl die Bad- als auch die Pipettenlösung enthielt MeS als Anion. (C) Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung, die durch die Integration der transienten Ströme aus B erhalten wurden. Die Ladungsverschiebung wurde mit Hilfe des Wertes bei +60 mV normalisiert. Die Linie repräsentiert eine Regression gemäß der Boltzmann-Gleichung mit einem Mittelpunktspotential von 95 mV und einem  $z_Q$  von 0,3. Der Inset zeigt die Abhängigkeit des Mittelpunktspotentials von  $[\text{Na}^+]$ . Die Gerade veranschaulicht die erwartete Korrelation aufgrund der kinetischen Parameter, die in Tabelle I aufgelistet sind. (D)  $[\text{Na}^+]$  Abhängigkeit des  $K_M$  für Glutamat. Die Linie zeigt die Anpassung an Gleichung 5B (siehe Anhang). Für die Parameter wurden folgende Werte verwendet:  $K_{\text{Na}+1}$



= 46 mM und  $K_{Na+1} = 9$  mM. (E) Korrelation von  $[Na^+]$  und Spannung des apparenten  $K_M$  für Glutamat von EAAT4. Die Daten in schwarz zeigen den Einfluß der Spannung des  $K_M$  für 140 mM  $Na^+$ . Die blauen (30 mM  $Na^+$ ) und roten (10 mM  $Na^+$ ) Datensätze wurden mit  $NMG^+$  als Ersatz für Natriumionen aufgenommen. Die  $K_M$  wurden auf eine logarithmische Achse aufgetragen. Die Geraden sind ein lineare Regressionen der semi-logarithmischen Auftragung. Die Steigung unterscheidet sich nicht signifikant innerhalb der untersuchten Bedingungen:  $(6,0 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}/mV$  für 140 mM  $Na^+$ ;  $(7,2 \pm 1,1) \cdot 10^{-3}/mV$  für 30 mM  $Na^+$ ;  $(6,1 \pm 3,7) \cdot 10^{-3}/mV$  für 10 mM  $Na^+$ .

### 3.3. Vorstationäre Kinetik von EAAT4

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Laser-Puls Photolyse Technik verwendet, um einen Sprung der Glutamatkonzentration innerhalb des Bruchteils einer Millisekunde zu erzeugen. Die Transporter reagierten auf diesen Konzentrationssprung mit der Relaxation in ein neuen stationären Zustand. Die Photolyse von MNI-Glutamat (MNI-Glu) hatte einen grossen, einwärtsgerichteten Strom in der Zelle zur Folge, bei Anwesenheit von  $SCN^-$  ( $SCN^-$  Ausfluss, Abb 12 A). Dieser Strom war spezifisch für  $HEK_{EAAT4}$ , da 100 $\mu$ M TBOA, ein spezifischer Inhibitor, die Aktivierung des Stroms durch Photolyse komplett unterband (Abb 12 A). In Abb. 12 B sieht man ausserdem, dass TBOA in Abwesenheit von Glutamat die Leckleitfähigkeit hemmte, wodurch es zu einem scheinbaren Auswärtsstrom kam. Man erkennt aus Abb. 12 A und B weiterhin, dass das Glutamat, welches durch die Photolyse von 1mM MNI-Glutamat freigesetzt wird, Ströme erzeugt, die in derselben Grössenordnung sind, die von 100  $\mu$ M Glutamat erzeugt werden ( $\sim 725$  pA vs.  $\sim 825$  pA). Daher kann man davon ausgehen, dass das photolytisch erzeugte Glutamat sättigende Konzentrationen erreicht.

Als nächstes wurde in Kontrollexperimenten sichergestellt, dass MNI-Glutamat nicht den Transporter hemmt. Dazu wurden die Ströme, die durch Applikation von 100 $\mu$ M Glutamat mittels des Lösungswechsels erzeugt wurden, mit denen verglichen, die mit 100 $\mu$ M Glutamat und in der gleichzeitigen Anwesenheit von 1 mM MNI-Glutamat generiert wurden. Abb. 12 C verdeutlicht, dass es zwischen diesen Strömen keine signifikanten Unterschiede gibt, es kann im Rahmen des Messfehlers daher ausgeschlossen werden, dass die verwendete Verbindung den Transporter inhibiert. Weiterhin wurde überprüft, dass die alleinige Zugabe von 1 mM MNI-Glutamat keine Wirkung auf den Transporter hatte, was zeigt, dass MNI-Glutamat kein Substrat für den Transporter darstellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass MNI-Glutamat eine geeignete Verbindung zur Untersuchung

von vorstationären Strömen in EAAT4 ist.

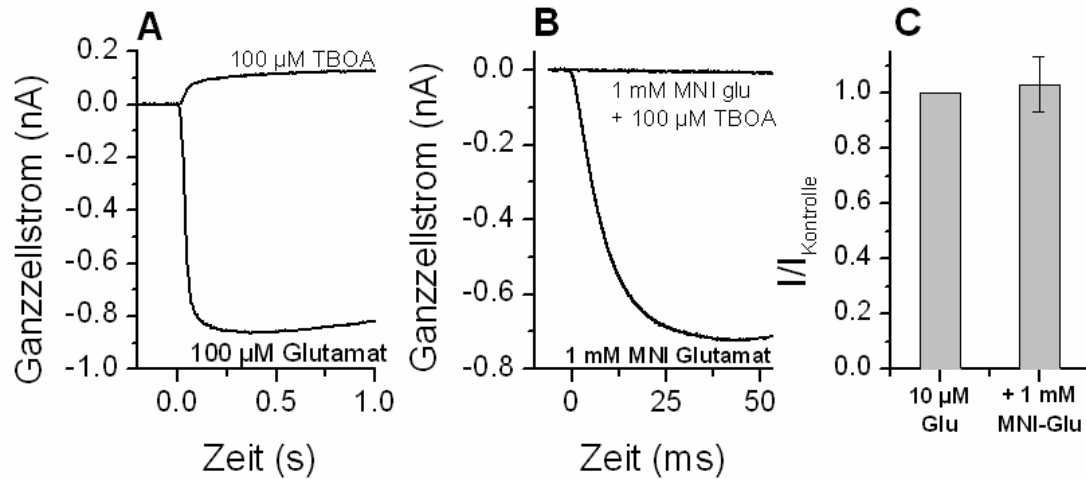


Abb. 12 Glutamatkonzentrations sprünge durch Photolyse von MNI-Glutamat als Mittel zur schnellen Aktivierung von Strömen in EAAT4. (A) Die Photolyse von 1 mM MNI-Glutamat erzeugte einen einwärtsgerichteten Anionenstrom, der durch 100 μM TBOA gehemmt wurde (obere Spur). (B) Kontrollexperimente mit EAAT4 exprimierenden HEK-Zellen. Die Zugabe von 100 μM Glutamat erzeugte einen einwärtsgerichteten Anionenstrom (140 mM KSCN intern). 100 μM TBOA inhibierte die Leckleitfähigkeit, dies zeigt, dass TBOA an den Transporter bindet. (C) 1 mM MNI-Glutamat hemmte nicht die glutamatinduzierten (10 μM) Anionenströme. Alle (A-C) Experimente wurden bei einem Membranpotential von 0 mV durchgeführt.

### 3.3.1. Vorstationäre Anionenströme in Abhängigkeit der kotransportierten Ionen

Die folgenden Versuche wurden in Anwesenheit von permeierenden Anionen (intrazelluläres  $\text{SCN}^-$ , 140 mM) durchgeführt. Für die Aktivierung des Transporters wurden 500 μM MNI-Glu verwendet. Die Aktivierung des Transporter durch den schnellen Lösungswechsel, der für die Messung der stationären Ströme verwendet wurde, zeigte einen schnellen Anstieg des Anionenstroms innerhalb von ~100 ms. Allerdings war die Applikation des Substrats durch den Lösungswechsel zu langsam, um schnelle vorstationäre Zeitkonstanten zu bestimmen. Im Gegensatz dazu erzeugte die photolytische Freisetzung von 30 μM Glutamat aus 500 μM NMI-Glutamat eine wesentlich schnellere Aktivierung des Anionenstroms (Abb. 13 A rechte Seite) mit einer Zeitkonstante von  $\tau_{\text{rise}} = (4,5 \pm 0,3)\text{ms}$  ( $n = 3$ ). Zusätzlich zum Anstieg des Stromsignals wurde eine abfallende Phase beobachtet, die nicht im Perfusionsexperiment zu erkennen war. Für die

Zeitkonstante dieses Prozesses ( $\tau_{\text{decay}}$ ) wurde ein Wert von  $(25 \pm 0,3)\text{ms}$  ( $n = 3$ , freigesetztes Glutamat  $>30 \mu\text{M}$ ) bestimmt. Glutamat-induzierte Ströme waren in einer  $\text{Na}^+$ -freien Badlösung nicht zu beobachten, wie es für einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transporter zu erwarten ist (Abb. 13 A links und rechts). Die beschriebenen Experimente wurden im Einwärtstransportmodus durchgeführt, d.h. es war KSCN in der Pipettenlösung vorhanden. Ob man Ströme in  $\text{HEK}_{\text{EAAT4}}$  im Homoexchangemodus erzeugen kann, wurde mit einer NaSCN und Glutamat basierten Pipettenlösung überprüft (10 mM Glutamat, 140 mM NaSCN intrazellulär). Auch unter diesen Bedingungen wurde ein Einwärtsstrom gemessen, wie in Abb. 13 B zu sehen ist. Eine Aktivierung mit  $30 \mu\text{M}$  freigesetztem Glutamat erzeugte ein Signal dessen Kinetik mit der vergleichbar war, die im Vorwärtstransport zu sehen ist [ $\tau_{\text{rise}} = (4,2 \pm 1,3)\text{ms}$  und  $\tau_{\text{decay}} = (21 \pm 6)\text{ms}$ ,  $n = 3$ ]. Die Transportersubtypen EAAT3 und EAAT2 zeigen bei gleichen Bedingungen ein vergleichbares Verhalten, aber mit schnellerer Kinetik (Otis and Kavanaugh 2000; Watzke, Bamberg et al. 2001; Bergles, Tzingounis et al. 2002).

In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung der kotransportierten Ionen auf die Kinetik des Anionenstroms untersucht. In der Abwesenheit von  $\text{K}^+$  in der Pipettenlösung [durch das unpermeable Ion  $\text{NMG}^+$  (N-Methyl-Glucosamin) ersetzt] war kein Strom messbar. Dies war zu erwarten, da die Glutamatbindungsstellen des Transporters unter diesen Bedingungen höchstwahrscheinlich dem Zytosol zugewandt waren. Mit einer Pipettenlösung, die  $5 \text{mM}$   $\text{K}^+$  enthielt, wurde erwartet, dass zumindest ein Teil der Glutamatbindungsstellen der extrazellulären Badlösung zugänglich ist. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wurde ein schwacher, transients Anionenstrom (Abb. 13 C) gemessen, mit einem Maximalwert von  $(8 \pm 4)\text{pA}$  ( $n = 3$ ). Dieses Signal fiel innerhalb von  $250 \text{ms}$  ab und zeigte keinen messbaren stationären Strom. Dieses Ergebnis kann man dahingehend interpretieren, dass der Transporter direkt nach der Glutamatbindung anionenleitfähige Zustände durchlief, später aber in einem Zustand geringer Leitfähigkeit festgehalten wurde, in dem die Glutamat- und Natriumionenbindungsstelle dem Zytosol zugewandt sind. Man erhält ein anderes Resultat, wenn das Experiment in Anwesenheit von  $140 \text{mM}$  internem  $\text{K}^+$  und  $5 \text{mM}$  extrazellulärem  $\text{Na}^+$  wiederholt wurde (Abb 13 D). Unter diesen Voraussetzung wurde ein stationärer Strom beobachtet, mit einer Amplitude von  $(47 \pm 9)\text{pA}$  ( $n = 4$ ). Allerdings war kein schneller, transients Strom mehr zu erkennen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine hohe externe  $[\text{Na}^+]$  aber keine hohe interne  $[\text{K}^+]$ , für die transiente Komponente

des Anionenstroms notwendig ist. Abb 13 E fasst die Ergebnisse dieses Abschnitts zusammen. Eine quantitative Erklärung dieser Ergebnisse mithilfe eines einfachen Transportmodells mit gekoppelter Anionenleitfähigkeit befindet sich im Diskussionsteil.

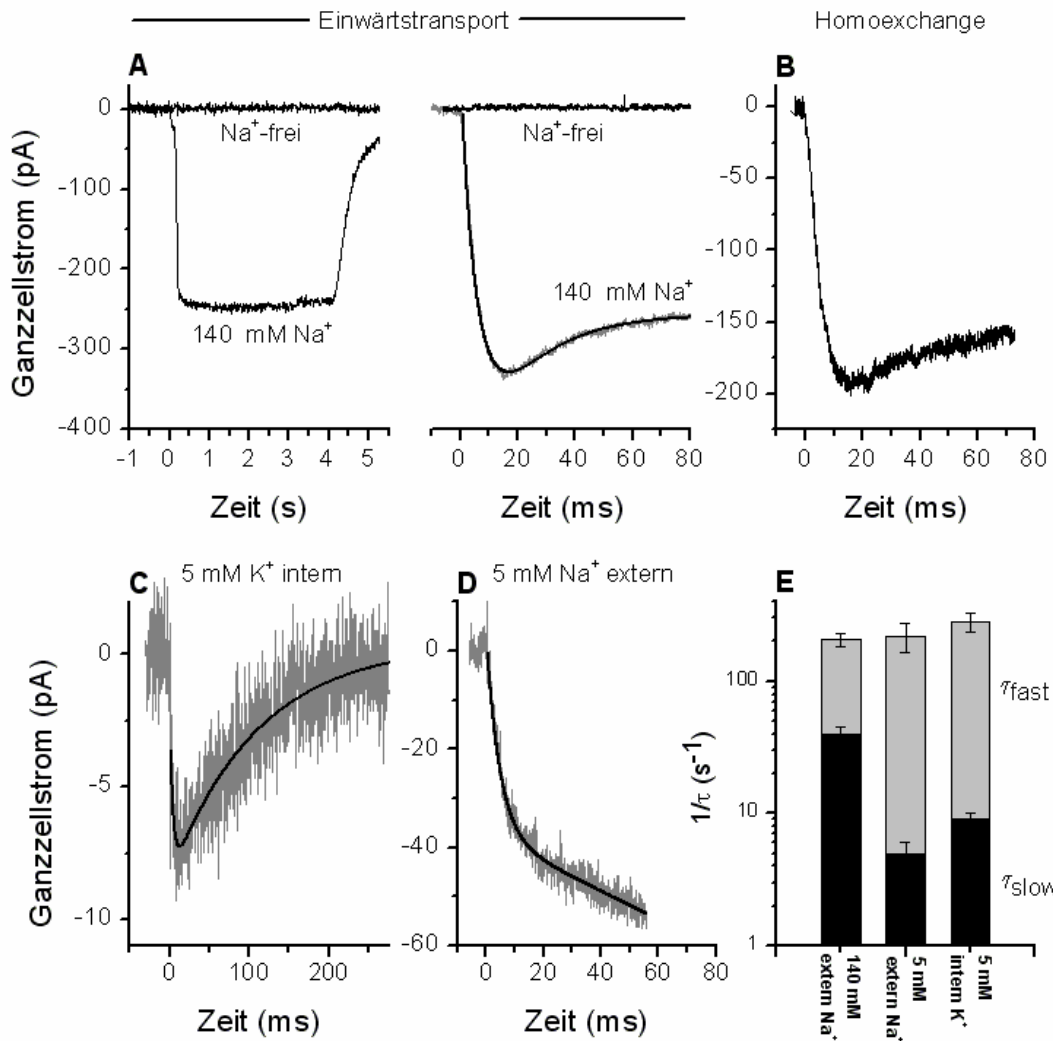


Abb. 13 Eigenschaften des vorstationären, EAAT4-katalysierten Anionenstroms. (A) Repräsentative Ganzzelleableitung in HEK<sub>EAAT4</sub> nach Perfusion mit einer Lösung (140 mM Na<sup>+</sup>) unter Vorwärtstransportbedingungen (140 mM KSCN intern, 0 mV). Links ist ein Experiment mit einem schnellen Lösungswechsel (50 μM Glutamat bei t = 0) rechts eine Spur, die nach der Photolyse von 500 μM MNI-Glutamat aufgenommen wurde [(30 ± 5) μM freigesetztes Glutamat]. Beide Signale verschwanden in Abwesenheit von extrazellulärem Na<sup>+</sup> (obere Spur). (B-D) Glutamatinduzierte Ströme, die, wie in A beschrieben, durch Photolyse von MNI-Glu hervorgerufen wurden, im Homoexchange-Modus (B, NaSCN basierte Pipettenlösung mit 10 mM Glutamat); in Anwesenheit von 5 mM K<sup>+</sup> intern (C) und von 5 mM externem Na<sup>+</sup> (D). (E) Vergleich der Relaxationsraten  $1/\tau_{fast}$  (graue Balken) und  $1/\tau_{slow}$  (schwarze Balken) des Anionenstroms bei verschiedenen Konzentrationen des externen Na<sup>+</sup> und internen K<sup>+</sup>. Das Membranpotential wurde bei 0 mV konstantgehalten.

### 3.3.2. Abhängigkeit der vorstationären Kinetik von der extrazellulären Glutamatkonzentration

Um die verschiedenen Phasen des glutamatinduzierten Anionenstrom näher zu untersuchen, wurde die Abhängigkeit des Stroms von der externen Glutamatkonzentration bestimmt (Abb. 14). Eine typische Abfolge von Signalen bei 0,5; 1,2 und 35  $\mu\text{M}$  Glutamat ist in Abb. 14 A dargestellt. Betrachtet man die geringste Konzentration (0,5  $\mu\text{M}$ ) so sieht man, dass der Strom relativ langsam anstieg und dann einen stationären Wert erreichte. Es war allerdings keine transiente Komponente zu beobachten. Insofern war dieser Verlauf des Stromsignals dem ähnlich, das der Transporter bei niedrigen extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration zeigte (vgl. Abb. 13 D und 14 A ). Dieses Ergebnis ist mit Resultaten in EAAT3 im Einklang und zeigt, dass  $[\text{Na}^+]$  und die Glutamatkonzentration ( $[\text{Glu}]$ ) den gleichen Einfluß auf den zeitlichen Verlauf des Anionenstroms hat (Watzke and Grewer 2001). Die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Relaxation ( $1/\tau$ ) der ansteigenden bzw. der abklingenden Phase des Stroms von  $[\text{Glu}]$  ist in Abb. 14 B gezeigt. Beide Geschwindigkeitskonstanten sättigten bei hohen  $[\text{Glu}]$ , was auf eine geschwindigkeitsbestimmende Änderung der Konformation des Transporters nach der Glutamatbindung hinweisen könnte (Gln 6 und alle folgenden Gleichungen sind im Anhang zu finden). Die maximale Geschwindigkeitskonstante bei hohen  $[\text{Glu}]$  beträgt  $(46 \pm 11)\text{s}^{-1}$  für die abklingende Phase und  $(350 \pm 20)\text{s}^{-1}$  für die ansteigende Phase des Stromsignals. Für geringe Glutamatkonzentrationen konnte der Zusammenhang von  $1/\tau$  und  $[\text{Glu}]$  durch eine lineare Gleichung vereinfacht werden (Gln 1, gestrichelte Linie in Abb. 14 B). Mittels linearer Regression, gemäß Gln 1 und 2, kann man die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante für die Glutamatbindung des Transporters mit  $(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  abschätzen ( $k_{+1,\text{app}}$ , Gln 1 und 2). Dieser Wert ist in der Größenordnung von Bindungskonstanten, die in anderen EAAT Subtypen gefunden wurde (Grewer, Watzke et al. 2000; Bergles, Tzingounis et al. 2002). Der berechnete Achsenabschnitt der Regressionsgeraden ist  $(18 \pm 2)\text{s}^{-1}$ . Dieser Wert stellt vermutlich die apparente Glutamatdissoziationsrate von EAAT4 dar ( $k_{-1,\text{app}}$  aus Gln 1 und 3), dies bedeutet, dass gebundenes Glutamat eine relativ lange Verweildauer am Transporter hat. Um die Kinetik der Glutamatbindung bei geringen Glutamatkonzentrationen eingehend überprüfen zu

können, wurde der Anstieg des Anionenstrom bei 100 nM Glutamat (Abb 14 C) und hoher Zeitauflösung gemessen. Sofern die Glutamatbindung schnell geschieht, würde man eine schnelle Verzögerungsphase beobachten, da Glutamat erst an den Transporter binden muss, bevor die Anionenleitfähigkeit aktiviert werden kann (Watzke and Grewer 2001). Im Gegensatz dazu konnte keine Verzögerungsphase beobachtet werden. Die gemessene Stromkurve folgte einer Kinetik erster Ordnung, so wie man es erwarten würde, wenn die Glutamatbindung für den Anstieg des Stroms geschwindigkeitsbestimmend ist (Gln 4).

Die Auswertung der Glutamatkonzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten erlaubt es die apparente Geschwindigkeitskonstante der Glutamatdissoziation abzuschätzen, jedoch nicht die intrinsische Geschwindigkeitskonstante der Glutamatdissoziation von EAAT4. Eine Abschätzung von  $k_{-1}$  erhält man, wenn man die Glutamatkonzentrationsabhängigkeit der Maximalamplitude der vorstationären Stromkomponente ( $I_{VS}$ ) auswertet. Man erkennt aus Abb 14 D, dass  $I_{VS}$  bei hohen [Glu] sättigt, mit einem  $K_M$  von  $(5,1 \pm 1,2)\mu\text{M}$ . Dieser  $K_M$  ist etwa 10mal höher, als der, der unter stationären Bedingungen gemessen wurde. Obwohl auch dies ein apparenter  $K_M$  ist, so kann man ihn verwenden, um eine untere Grenze für  $k_{-1}$  von  $55\text{ s}^{-1}$  anzugeben. Aus diesen Daten folgt, dass Glutamat zunächst mit einer relativ geringen Affinität bindet und dann in seiner Bindungsstelle eingeschlossen wird. Dies geschieht durch nachfolgende Reaktionen im Transportzyklus, die das Glutamatbindungsgleichgewicht zur gebundenen Form hin verschieben. Ein ähnliches Ergebnis ist in Untersuchungen mit EAAT3 gefunden worden (Watzke, Bamberg et al. 2001).

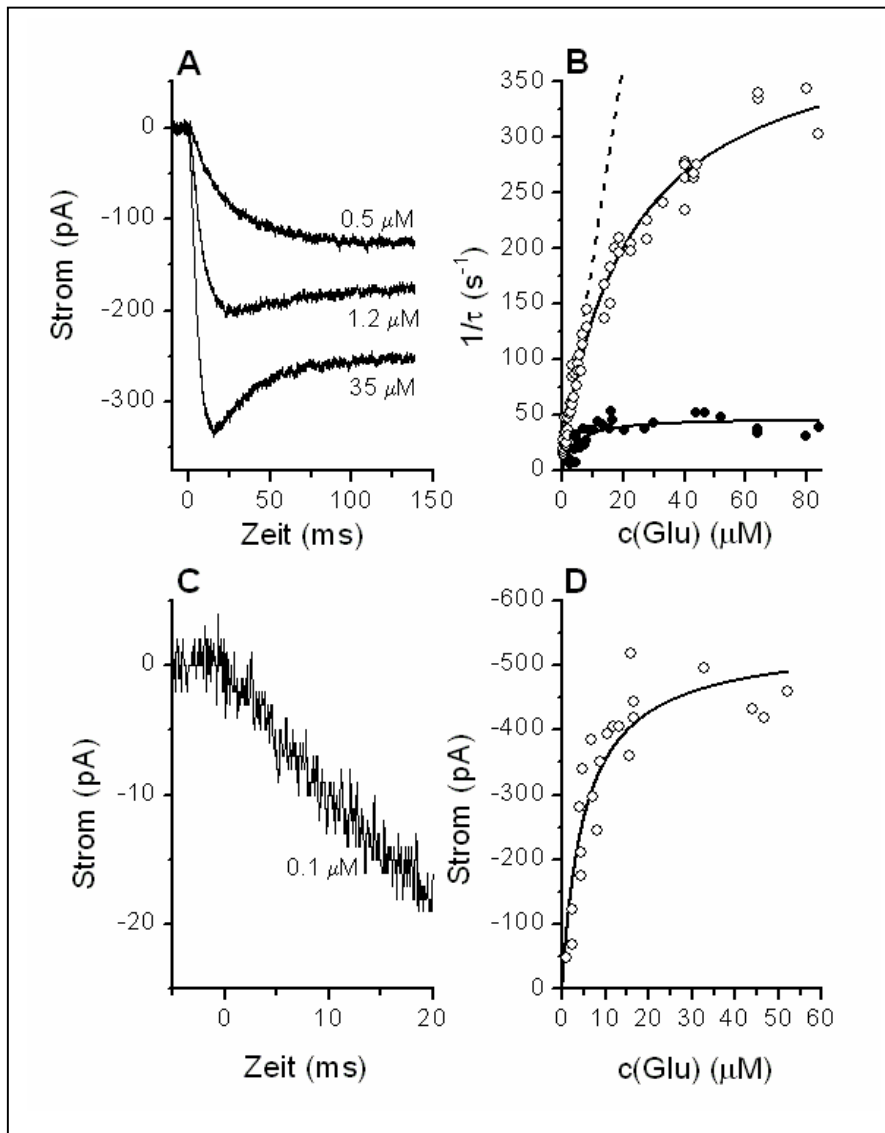


Abb.14 Korrelation zwischen vorstationären Anionenströmen und der Glutamatkonzentration (A) Typische Anionenströme nach Photolyse von 500  $\mu\text{M}$  MNI-Glutamat bei verschiedenen Laserenergien, bei denen jeweils 0,5; 1,2 und 35  $\mu\text{M}$  Glutamat freigesetzt wurde. (B) Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  von der Glutamatkonzentration. Die leeren und ausgefüllten Kreise markieren die Konstanten, die mit der ansteigenden bzw. abfallenden Phase assoziiert sind. Die durchgehenden Linien stehen für die nichtlineare Regression mittels der Gln 6 (siehe

Anhang), mit einem  $K_M$  Werten und maximalen Relaxationskonstante von  $(12 \pm 5)\mu\text{M}$  bzw.  $(350 \pm 20)\text{s}^{-1}$  (ansteigende Phase) und  $(0,6 \pm 0,2)\mu\text{M}$  bzw.  $(46 \pm 11)\text{s}^{-1}$ . Die unterbrochene Linie zeigt eine lineare Regression mit dem Datensatz der ansteigenden Phase mit einer Steigung von  $(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und einem Achsenabschnitt von  $(20 \pm 2)\text{s}^{-1}$ . (C) Anionenströme nach der photolytischen Freisetzung von 0,1  $\mu\text{M}$  Glutamat bei hohen Zeitauflösung. Zu beachten ist das Fehlen einer Verzögerung des Stromanstiegs direkt nach der Glutamatfreisetzung. (D) Korrelation der vorstationären Stromamplitude und der Glutamatkonzentration. Die Linie ist Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung mit einem  $K_M$  von  $(5,1 \pm 1,2)\mu\text{M}$ .

### 3.3.2.1. Vorstationäre Kinetik des EAAT4 Transportstroms

In den vorangehenden Abschnitten wurden nur die kinetischen Eigenschaften der

Anionenkomponente des von EAAT4 erzeugten Stroms beschrieben. Es ist aber nicht klar, ob in EAAT4, wie in den anderen Subtypen, die Anionenleitfähigkeit mit dem Glutamattransport kinetisch gekoppelt ist. Deshalb wurde auch die Transportstromkomponente des glutamatinduzierten Stroms weitergehend untersucht. Die Freisetzung von ca. 30  $\mu\text{M}$  Glutamat aus 500 $\mu\text{M}$  MNI-Glutamat erzeugte einen einwärtsgerichteten, transienten Strom unter Bedingungen, die einen vorwärtsgerichteten Transport begünstigen (Abb 15 A). Dieser Strom verschwand, wenn das Experiment unter  $\text{Na}^+$ -freien Badlösungen wiederholt wurde (Abb 15 A obere Spur). Der Transportstrom bestand aus vier Komponenten: einer ansteigenden Phase mit einer Zeitkonstante von  $\sim 2$  ms ( $n = 4$ ); einer grossen, schnell abfallenden Phase mit einer Zeitkonstanten von  $(4,2 \pm 0,8)\text{ms}$  ( $n = 4$ ); einer kleineren, langsam abklingenden Phase mit einer Zeitkonstanten von  $(32 \pm 14)\text{ms}$  ( $n = 4$ ) und einer stationären Phase. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass mindestens zwei schnelle, glutamatinduzierte, elektrogene Transportreaktionen und eine elektroneutrale, oder nur schwach elektrogene Reaktion erfolgten, bevor der stationäre Zustand in EAAT4 erreicht wurde. Um festzustellen, ob diese Reaktionen mit dem glutamatabhängigen Zweig des Transportzyklus zusammenhängen, wurden die Experimente mit  $\text{K}^+$ -freien Pipettenlösungen, in denen 140 mM  $\text{K}^+$  durch 140 mM  $\text{Na}^+$  und 10 mM Glutamat ersetzt wurde, wiederholt (Homoexchangemodus, Abb 15 B). Unter diesen Bedingungen sind nur die Reaktionen zugänglich, die mit der Glutamattranslokation zusammenhängen (Watzke, Bamberg et al. 2001). Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, dass die glutamatinduzierten Ströme im Homoexchangemodus denselben zeitabhängigen Verlauf aufweisen, wie die Signale, die im Vorwärtstransportmodus gemessen wurden. Allerdings wurde im Homoexchangemodus kein stationärer Strom beobachtet, was erwartet wurde, da der Transportzyklus in der Abwesenheit von  $\text{K}^+$  nicht gerichtet durchlaufen werden kann. Zudem ist die langsam abklingende Phase im Austauschmodus nicht ganz so ausgeprägt, wie im Vorwärtstransport.

Der elektrogene Transportstrom läuft in EAAT3 der Aktivierung des Anionenstroms voraus (Watzke and Grever 2001). In Abb 15 C ist der zeitliche Verlauf der beiden Komponenten für EAAT4 aufgetragen. Der elektrogene Transportstrom fiel innerhalb von 15 ms ab. Im gleichen Zeitbereich fand die Aktivierung des Anionenstroms statt. Zur Quantifizierung dieses Verhaltens wurden die Relaxationsgeschwindigkeitskonstanten der ansteigenden und der schnellen, abklingenden Phase des Transport- und Anionenstroms miteinander verglichen (Abb 15 D). Im Rahmen



des experimentellen Fehlers, konnte festgestellt werden, dass die Geschwindigkeitskonstanten der Aktivierung des Anionenstrom und des Abklingens des Transportstroms einander glichen. Das deutet an, dass sowohl Anionen- als auch Transportstrom dieselbe glutamatinduzierte Zustandsänderungen des Transporters anzeigen.

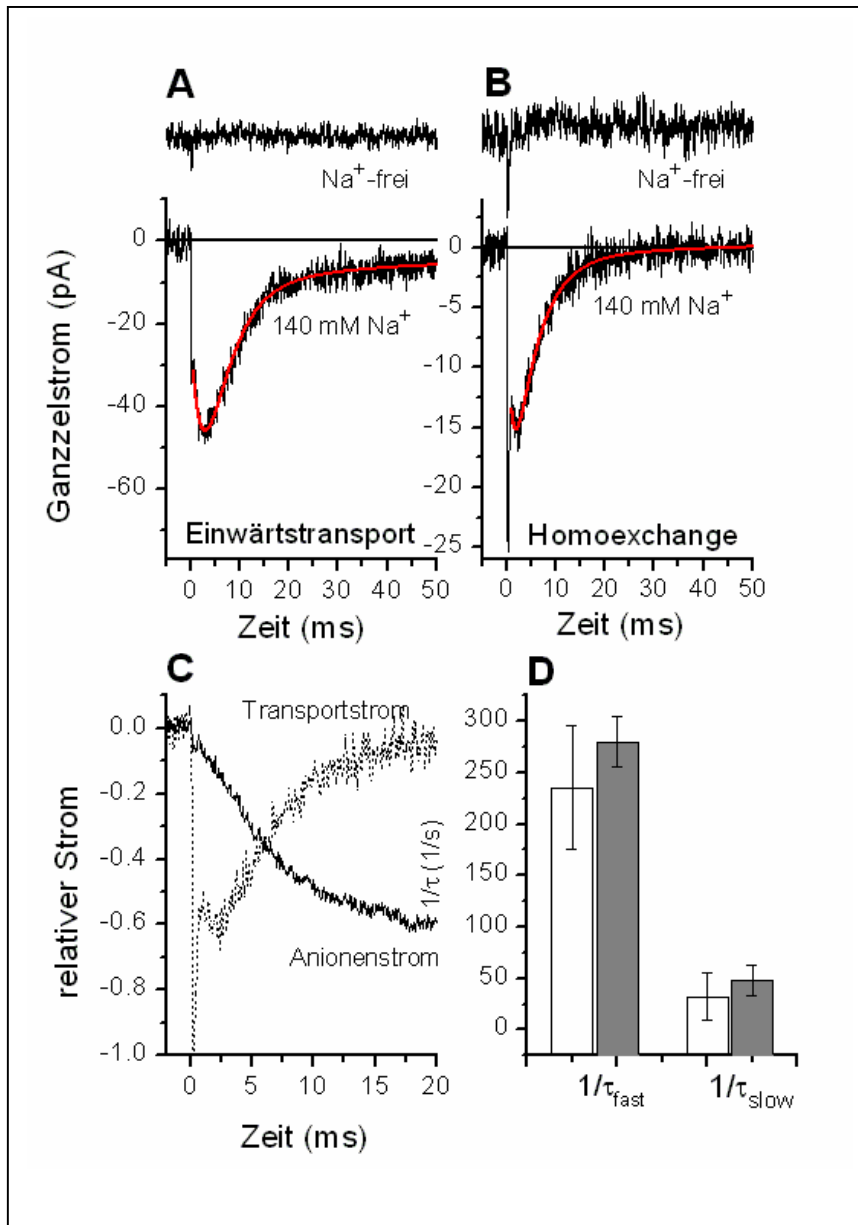


Abb 15 EAAT4 katalysiert vorstationäre Transportströme. (A) Transportströme nach Photolyse von 500  $\mu\text{M}$  MNI-Glutamat (bei  $t = 0$ ) in Anwesenheit (untere Spur) und Abwesenheit (obere Spur) von 140 mM extrazellulärem Na<sup>+</sup>. Das Membranpotential wurde bei 0 mV konstant gehalten. Die Pipettenlösung enthielt 140 mM K<sup>+</sup> (Vorwärtstransport). (B) Dasselbe Experiment wie in A, aber im Homoexchangemodus (140 mM Na<sup>+</sup>, 10 mM Glutamat in der Meßpipette). (C) Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Transportstromabfalls und Anionenstromanstiegs. Beide Ströme wurden mittels Photolyse von 500  $\mu\text{M}$  MNI-Glutamat erzeugt. (D) Statistische Analyse der Relaxationsratenkonstante der schnellen Phase des

Anionenstroms (graue Balken) und Transportstroms (weiße Balken) bei  $V_m = 0$  und  $[\text{Glutamat}] = 30 \mu\text{M}$ . Alle Lösungen enthalten MeS als Hauptanion.

### 3.3.3. Spannungsabhängigkeit der vorstationären Ströme

In diesem Abschnitt wurde die Abhängigkeit der Kinetik der vorstationären Ströme vom Membranpotential bestimmt. Wie man in Abb 16 A sieht, erhöhte sich die Relaxationgeschwindigkeitskonstante ( $1/\tau_{\text{fast}}$ ) bei negativem Transmembranpotential ( $e$ -fach/155 mV, siehe Steigung in Abb 16 A). Anders war es bei  $1/\tau_{\text{slow}}$ , hier schien die Geschwindigkeitskonstante fast spannungsunabhängig zu sein (Abb 16 A ausgefüllte Kreise). Die Amplitude des Transportstroms war ebenfalls vom Membranpotential abhängig. Die Amplitude der Stromkomponente, die mit  $\tau_{\text{fast}}$  assoziiert ist, erhöhte sich mit stärker negativen Potentialen. Es ist daher interessant die Ladung (Q) zu berechnen, die in den einzelnen Prozessen verschoben wird. Eine Variation der experimentellen Bedingungen, d.h. der Natriumionenkonzentration bzw. des Membranpotentials, kann Aufschluss darüber geben, welcher Art die Prozesse sind, die mit der Ladungsverschiebung assoziiert sind.  $Q_{\text{fast}}$  aus Abb. 16 B wurde erhalten, in dem man die schnell abfallende Phase des Transportstrom über die Zeit integriert hat. Man sieht, dass  $Q_{\text{fast}}$  spannungsabhängig war. Unter physiologischen Bedingungen ( $[\text{Na}^+] = 140 \text{ mM}$ , ausgefüllte Kreise) war  $Q_{\text{fast}}$  allerdings nur in geringem Maße spannungsabhängig, denn das Verhältnis der Ladung bei -90 mV zur Ladung bei +60 mV betrug  $1,76 \pm 0,45$  ( $n = 3$ ). Dieses Verhalten änderte sich dramatisch, wenn nur 10 mM  $\text{Na}^+$  (Abb. 16 B, leere Kreise) in der externen Lösung vorhanden war. Der Quotient der Ladung bei -90 mV und +60 war nun bei  $13,6 \pm 10,5$  ( $n = 3$ ). Ausserdem war die absolute Ladungsverschiebung bei 10 mM  $\text{Na}^+$  und 0 mV geringer als diejenige, die bei 140 mM gemessen wurde. Der Quotient der Ladungsverschiebung  $Q_{\text{fast}}(10 \text{ mM})/Q_{\text{fast}}(140 \text{ mM})$  beträgt  $0,28 \pm 0,06$  ( $n = 3$ , bei 0 mV). Die Daten wurden an eine Funktion angepasst, die auf der Boltzmannverteilung basiert (Gln 12-14; Linien in Abb 16 B). Die Funktion beschrieb die Datensätze für 140 und 10 mM gut, wenn für die Valenz ( $z_Q$  in der Boltzmanngleichung) 0,7 eingesetzt wurde. Der Unterschied zwischen beiden Kurven ist das Mittelpunktspotential ( $V_{1/2}$ ) der Ladungsverschiebung; für 10 mM  $\text{Na}^+$  erhält man  $(-30 \pm 6)\text{mV}$  und  $(+70 \pm 9)\text{mV}$  für 140 mM  $[\text{Na}^+]$ . Diese Resultate sprechen dafür, dass der Prozess, der mit  $Q_{\text{fast}}$  zusammenhängt, sowohl von  $[\text{Na}^+]$  als auch von negativen Membranpotentialen getrieben wird. Dies ist zu erwarten, wenn man davon ausgeht, dass die Natriumionenbindung an die glutamatgebundenen Form des Transporters elektrogen ist. Die Spannungsabhängigkeit von  $Q_{\text{slow}}$  konnte nicht bestimmt werden, da entweder die gemessenen Stromamplituden zu

gering waren oder die Abklingzeit zu lang, um eine zuverlässige Auswertung zu gewährleisten.

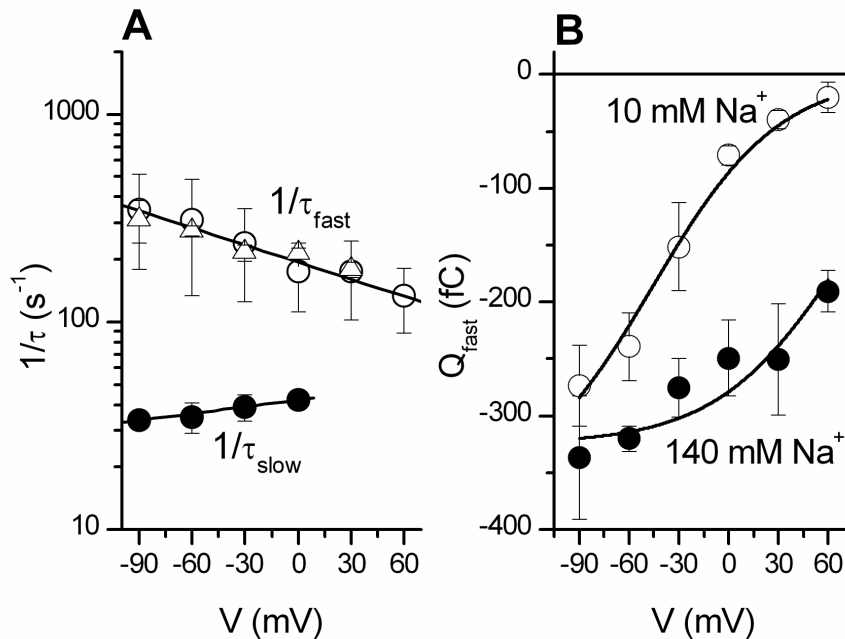


Abb. 16 Spannungsabhängigkeit der vorstationären Kinetik von EAAT4. (A) Spannungsabhängigkeit der Relaxationsgeschwindigkeitskonstante für die schnelle Phase (ansteigende Phase des Anionenstroms wird von leeren Kreisen symbolisiert; die schnelle abfallende Phase des Transportstroms von Dreiecken) und langsame Phase (abfallende Phase des Anionenstroms, ausgefüllte Kreise). (B) Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung während der schnellen Phase des Transportstroms bei 10mM (leere Kreise) und 140 mM (ausgefüllte Kreise) externen  $[Na^+]$ . Die durchgezogene Linie zeigt eine angepasste Boltzmann-Gleichung (siehe Gln. 12-14).

### 3.2. Einfluss der Glutamattransporter assoziierten Proteine auf Glutamattransport durch EAAT4

Für EAAT3 und EAAT4 sind Adapterproteine bekannt, die die Bindung des Transporters zum Zytoskelett vermitteln. Ausserdem wurde von modulierenden Eigenschaften dieser Proteine berichtet, in Bezug auf das Transportverhalten. Für EAAT4 sind zwei Adapterproteine dokumentiert, GTRAP41 und GTRAP48 (Glutamate Transporter Associated Protein). Von diesen Proteinen wurde berichtet, dass sie die Transportaktivität, ausgedrückt durch  $v_{max}$  der Michaelis-Menten-Gleichung, verdreifachen

sollen. Deshalb wurde die Kinetik des Anionenstroms durch photolytische Freisetzung von Glutamat bei verschiedenen Glutamatkonzentrationen untersucht, um festzustellen, ob diese Proteine tatsächlich die Umsatzgeschwindigkeit von EAAT4 erhöhen. Die Plasmide für die Expression von GTRAP41 bzw. GTRAP48 sind freundlicherweise von J.D. Rothstein (Johns Hopkins Universität) zur Verfügung gestellt worden. Es wurde in früheren Arbeiten von Jackson *et al.* gezeigt, dass die Expression dieses Proteins durch die erhaltenen Plasmide in HEK-Zellen stattfindet, daher wurde darauf verzichtet die Expression zu überprüfen (Jackson, Song et al. 2001). Ein Vergleich der Rohdaten des Anionenstroms zeigte keine grossen Unterschiede zwischen dem zeitlichen Verlauf des Anionenstroms, der mit dem Wildtyp EAAT4 (wt) (Abb. 17 schwarz) bzw. mit GTRAP41/GTRAP48 (wtG) aufgenommen (Abb.17 rot) wurde. Beide Datensätze wurden mittels des stationären Maximalstroms normalisiert. Der mittlere Wert der Zeitkonstante des Anstiegs ( $\tau_{\text{rise}}$ ) bei Glutamatsättigung ( $\sim 100 \mu\text{M}$  freies Glutamat) beträgt  $(3,2 \pm 0,3)\text{ms}$  (wt) bzw.  $(3,8 \pm 0,8)\text{ms}$  (wtG). Die Glutamatkonzentrationsabhängigkeit von  $\tau_{\text{rise}}$  von HEK<sub>EAAT4</sub> mit und ohne GTRAP41/GTRAP48 wurde ebenfalls untersucht. Die Glutamatkonzentrationsabhängigkeit von  $\tau_{\text{rise}}$  in HEK<sub>EAAT4</sub> unterscheidet sich nicht von der Konzentrationsabhängigkeit von HEK<sub>EAAT4</sub>, in denen GTRAP41/GTRAP48 kotransfiziert wurde (Abb. 17 B). Nur bei niedrigen ( $0,75\text{-}1,4 \mu\text{M}$ ) Glutamatkonzentrationen konnte man leichte Unterschiede zwischen beiden Dosis-Wirkungskurven feststellen. Im Maximalstrom war ein geringer Unterschied zu sehen,  $(622 \pm 92)\text{pA}$  (wt) vs.  $(547 \pm 134)\text{pA}$  (wtG), der aber im Rahmen des experimentellen Fehlers lag. Dies lässt darauf schliessen, dass das Expressionsniveau von EAAT4 in beiden Experimentalgruppen keine signifikanten Unterschiede zeigte. Es bestehen ebenfalls keine signifikanten Differenzen der Zeitkonstanten der abfallenden Phase für  $\tau_{\text{decay}}$ ,  $(22,8 \pm 1,7)\text{ms}$  (wt) und  $(25,3 \pm 2,5)\text{ms}$  (wtG). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorstationären Anionenströme keinen Anhaltspunkt liefern, dass die berichtete Erhöhung des Glutamatumsatzes mit einer Modulation der Kinetik zu tun hat.

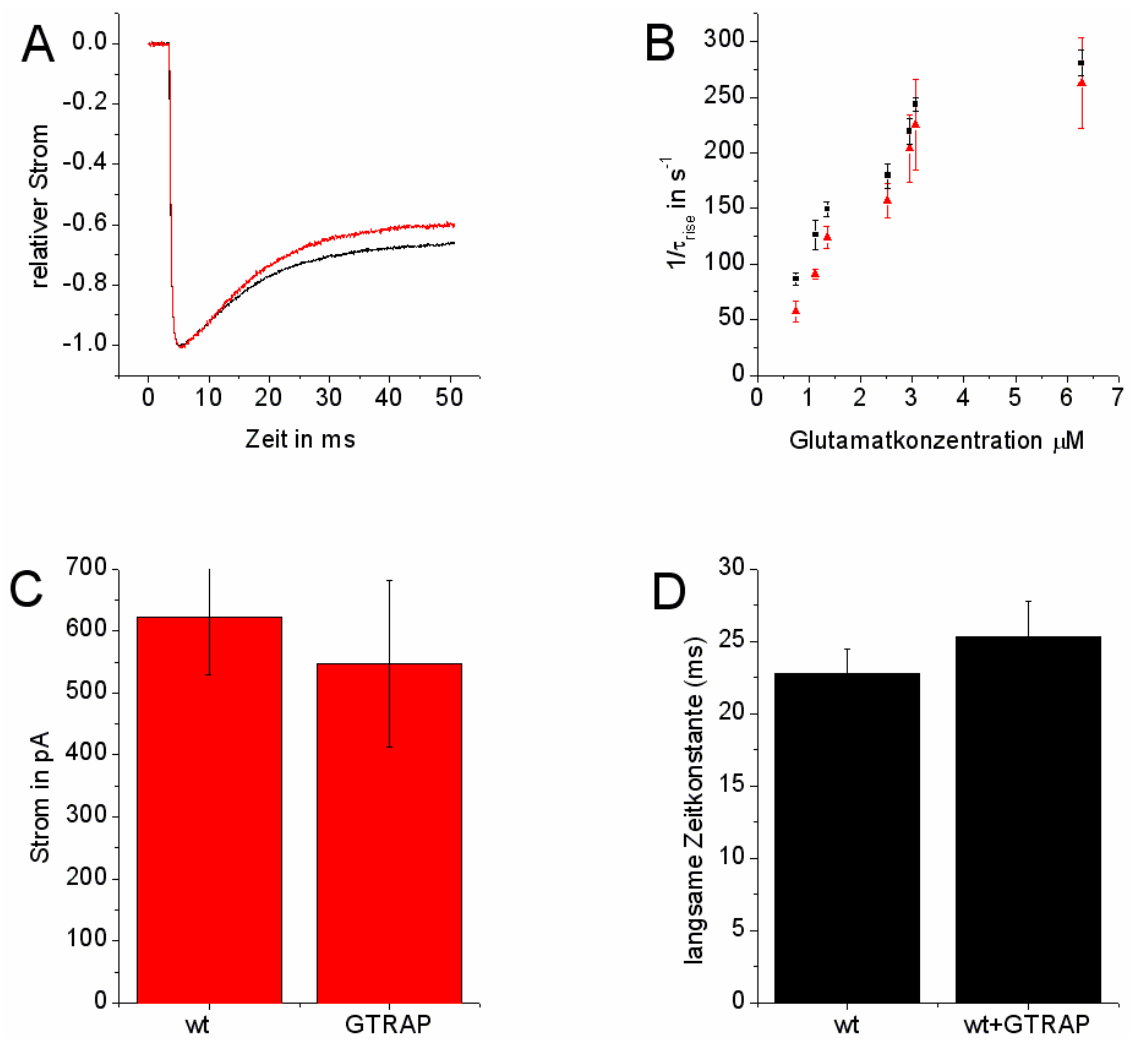


Abb. 17 (A) Rohdaten der Photolyseexperimente in denen EAAT4 (schwarz) oder EAAT4 und GTRAP41/GTRAP48 (rot) exprimiert wurden. Die Daten wurden mithilfe des maximalen, stationären Stroms normalisiert. (B) Glutamatkonzentrationsabhängigkeit der reziproken, Zeitkonstante der ansteigenden Phase des Anionenstroms ( $1/\tau_{rise}$ ) in Abwesenheit (schwarz) und in Anwesenheit (rot) von GTRAP41/GTRAP48 zeigte keine globalen, signifikanten Unterschiede (C) Vergleich des maximalen Anionenstroms in Anwesenheit (GTRAP) und in Abwesenheit (wt) von GTRAP41/GTRAP48 bei 40  $\mu\text{M}$  von freigesetztem Glutamat zeigte keinen signifikanten Unterschied (D) Vergleiche der Zeitkonstante der abfallenden Phase des Anionenstroms ( $\tau_{decay}$ ) ohne ( $22,8 \pm 1,7$ )ms (wt) und mit ( $25,3 \pm 2,5$ )ms (GTRAP) Koexpression von GTRAP41/GTRAP48 unter sättigenden Glutamatkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ).

### 3.3. Einfluss der Temperatur auf das Transportverhalten von Glutamattransportern

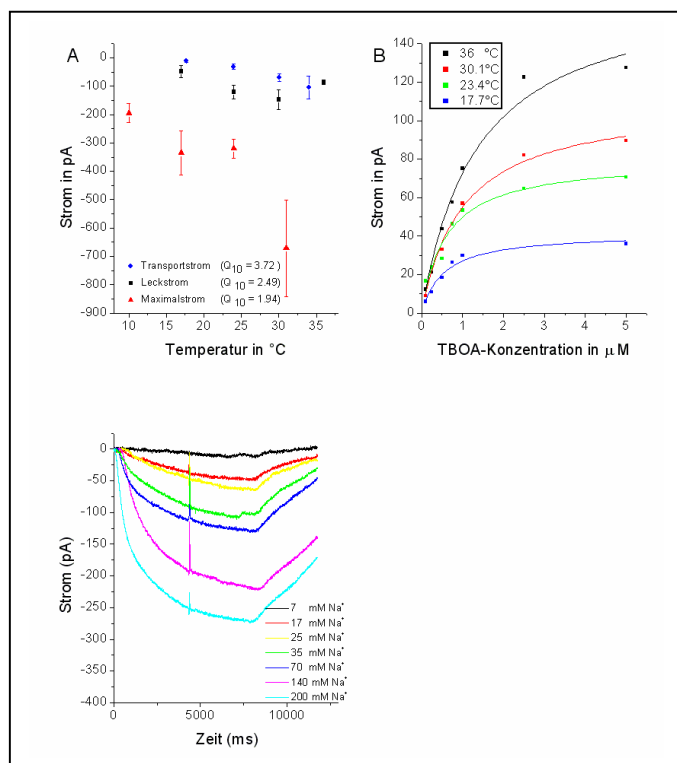
#### 3.3.1. Temperaturabhängigkeit der Stromkomponenten und der apparenten Affinität für Substrate unter stationären Bedingungen

Die Temperatur hat im allgemeinen einen grossen Einfluss auf die Geschwindigkeit von biochemischen Reaktionen. Ein großer Teil der funktionellen und kinetischen Charakterisierung von menschlichen bzw. Säugetier-Glutamattransportern ist bisher bei Raumtemperatur durchgeführt worden (Fairman, Vandenberg et al. 1995; Grewer, Watzke et al. 2000; Bergles, Tzingounis et al. 2002). Um ein besseres Verständnis der Transportfunktion von EAAT3, auch unter physiologischen Bedingungen, zu erhalten, wurden Experimente in Abhängigkeit von der Temperatur durchgeführt. Die hier gezeigten Experimente wurden hauptsächlich mit EAAT3, und nicht mit EAAT4 durchgeführt, da die Transportströme, die auch untersucht werden sollen, in EAAT3 grösser sind (Grewer, Watzke et al. 2000). Abb.18 B zeigt die Temperaturabhängigkeit des  $K_M$  für TBOA in HEK Zellen, die EAAT3 exprimieren (HEK<sub>EAAT3</sub>). Die apparente Affinität für TBOA nahm mit zunehmender Temperatur ab, von  $(0,57 \pm 0,17)\mu\text{M}$  bei  $17,7^\circ\text{C}$  auf  $(1,2 \pm 0,2)\mu\text{M}$  bei  $36^\circ\text{C}$ , was darauf hinweist, dass die Bindungsreaktion exotherm verläuft.

Als nächstes wurde die Temperaturabhängigkeit der einzelnen Stromkomponenten untersucht. Wie im Materialteil beschrieben, kann man, mittels der Zusammensetzung der Badlösung, bestimmte Komponenten des Glutamat-induzierten Gesamtstroms, wie z.B. Anionenstrom, Leckanionenstrom und Transportstrom, isolieren (Abb. 18). In der Anwesenheit von  $100\ \mu\text{M}$  Glutamat,  $140\ \text{mM}$   $\text{Na}^+$  und  $140\ \text{mM}$  intrazellulärem  $\text{KSCN}^-$  konnte ein großer Anionenstrom gemessen werden  $[(-320 \pm 30)\text{pA}$  bei  $24\ ^\circ\text{C}$   $n \geq 5$ ]. Wie die Daten in Abb. 18 A zeigen, nahm der Anionenstrom mit der Temperatur zu. Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit des Glutamat-induzierten Anionenstroms wurde ein empirischer  $Q_{10}$ -Wert benutzt (Gln 20 sowie alle anderen Gleichungen siehe Anhang).

Der von  $\text{SCN}^-$ -getragene Anionenstrom im Einwärtstransportmodus war relativ schwach temperaturabhängig ( $Q_{10} = 1,9 \pm 0,4$ ;  $n = 4$ ), da, wie von Kavanaugh und Kollegen schon für EAAT2 gezeigt wurde, der Transmembranfluss der Anionen ein diffusionsgesteuerter Prozess ist (Wadiche and Kavanaugh 1998). Diffusionskontrollierte

Reaktionen besitzen aufgrund der geringen Aktivierungsenergie der Diffusion in Wasser einen  $Q_{10}$ -Wert zwischen 1,1 und 1,5. Reaktionen, die eine Konformationsänderung des Proteins erfordern, besitzen einen  $Q_{10}$  Wert  $> 1,5$  (Hille 1992). Der Transportstrom war wesentlich stärker temperaturabhängig ( $Q_{10} = 3,7 \pm 0,4$ ;  $n = 4$ ) was zu erwarten war, da die Verschiebung der Substrate über die Membran sehr wahrscheinlich mit einer Änderung der Konformation des Transporters einhergeht. Beide Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit gemessenen Werten für den Glutamattransporter Subtyp EAAT2 (Wadiche and Kavanaugh 1998). Schliesslich wurde die Temperaturabhängigkeit des Anionenleckstroms bestimmt (Abb. 18 A). Der Leckstrom wurde durch Applikation von 140 mM  $\text{Na}^+$  in der Abwesenheit von Glutamat induziert (Abb. 18 A und C). Interessanterweise besaß die Temperatur einen Einfluss auf diesen Anionenleckstrom ( $Q_{10} = 2,5 \pm 0,7$ ;  $n = 7$ ). Dies deutet an, dass der Anionenleckstrom nicht nur durch den Fluss von  $\text{SCN}^-$  über die Membran bestimmt wird, sondern dass noch andere, stärker temperaturabhängige Prozesse eine Rolle spielen. Die Bindung von  $\text{Na}^+$  an seine extrazelluläre Bindungsstelle ist für die Aktivierung des Leckstroms notwendig. Dieses Resultat könnte daher andeuten, dass die Bindung von  $\text{Na}^+$  mit einer größeren Reorganisation der Proteinstruktur einhergeht. Diese Interpretation wird im Zusammenhang mit Literaturdaten in der Diskussion im Detail beschrieben.



**Abb. 18** (A) Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Stromkomponenten von EAAT3 bei verschiedenen Bedingungen. Der Anionenstrom im Einwärtstransportmodus (rote Dreiecke) zeigte eine geringe Temperaturabhängigkeit ( $Q_{10} = 1,95 \pm 0,4$ ,  $n = 4$ ). Während der Leckstrom (schwarze Quadrate), der in Abwesenheit des Substrats floß, wesentlich stärker abhängig von der Temperatur war ( $Q_{10} = 2,49 \pm 0,67$ ,  $n = 6$ ). Den größten Einfluss besaß die Temperatur auf die Größe des Transportstromes, der in Abwesenheit von  $\text{SCN}^-$  Ionen gemessen wurde ( $Q_{10} = 3,73 \pm 0,41$ ,  $n = 4$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. (B) Dosis-Wirkungskurven von TBOA-induzierten Ströme in  $\text{HEK}_{\text{EAAT3}}$  (Hemmung des Leckanionenstroms) bei

verschiedenen Temperaturen zeigten eine Temperaturabhängigkeit der apparenten Affinität des Proteins für TBOA. Die Linien repräsentieren Anpassungen der Michaelis-Mentengleichung an die Daten. Alle Messungen wurden bei  $V = 0$  mV durchgeführt. (C) Rohdaten der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Leckleitfähigkeit. Man sieht, dass die Leitfähigkeit bei ansteigender  $\text{Na}^+$  Konzentration zunimmt. Für die Berechnung des  $Q_{10}$  wurde der Strom bei einer  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 140 mM verwendet.

### 3.2.3 .Thermodynamische Untersuchung des Transportprozesses

Thermodynamische Zustandsfunktionen können wichtige Hilfsmittel sein, um die Natur von Reaktionen im Transportzyklus zu untersuchen. Das Vorzeichen und der Wert der Reaktionsenthalpie gibt an, ob Reaktionen endo- oder exotherm sind (Atkins 1996). Dies lässt Rückschlüsse auf den Transportmechanismus zu. Sofern die Reaktionsenthalpie innerhalb des untersuchten Intervalls als unabhängig von der Temperatur betrachtet werden kann, kann die van't Hoff'sche Gleichung verwendet werden (Gln 16) (Hammes 2000). Die Gleichungen für die Berechnung der Reaktionsenthalpie und der anderen durch die Temperaturabhängigkeit bestimmten thermodynamischen bzw. kinetischen Zustandsgrößen befinden sich im Anhang.

Zur Ermittlung der Reaktionsenthalpie für die Bindung der Substrate an EAAT3 wurde  $\ln(K_M)$  für das jeweilige Substrat gegen  $1/T$  aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Innerhalb der Fehlergrenze konnte keine Abweichung von der Linearität der van't Hoff'schen Darstellung festgestellt werden. Solche Abweichungen von der Linearität deuten einen starken Beitrag der Wärmekapazität des Proteins zur Reaktionsenthalpie an, was eine Temperaturabhängigkeit von  $\Delta H$  zur Folge hat. Im folgenden wurde daher  $\Delta H$  als temperaturunabhängig angenommen.

Der  $K_M$  Wert für die Glutamatbindung an EAAT3 wurde für den Einwärtstransportmodus in Anwesenheit von intrazellulären  $\text{SCN}^-$  Ionen (140 mM) bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (Abb. 19 A und B). Dazu wurde der Glutamat induzierte Strom in Abhängigkeit der Glutamatkonzentration gemessen und durch Anpassen der Michaelis-Menten-Gleichung an die Daten erhält man den  $K_M$ . Man sieht, dass die apparente Affinität mit steigender Temperatur abnahm, dementsprechend war die Reaktionsenthalpie negativ (exotherme Reaktion), der Wert für  $\Delta H^0$  beträgt  $(-32,7 \pm 6,4)$ kJ/mol. Die Standardreaktionsentropie beträgt  $(-14,7 \pm 7,8)$ J/Kmol, d.h. der gesamte

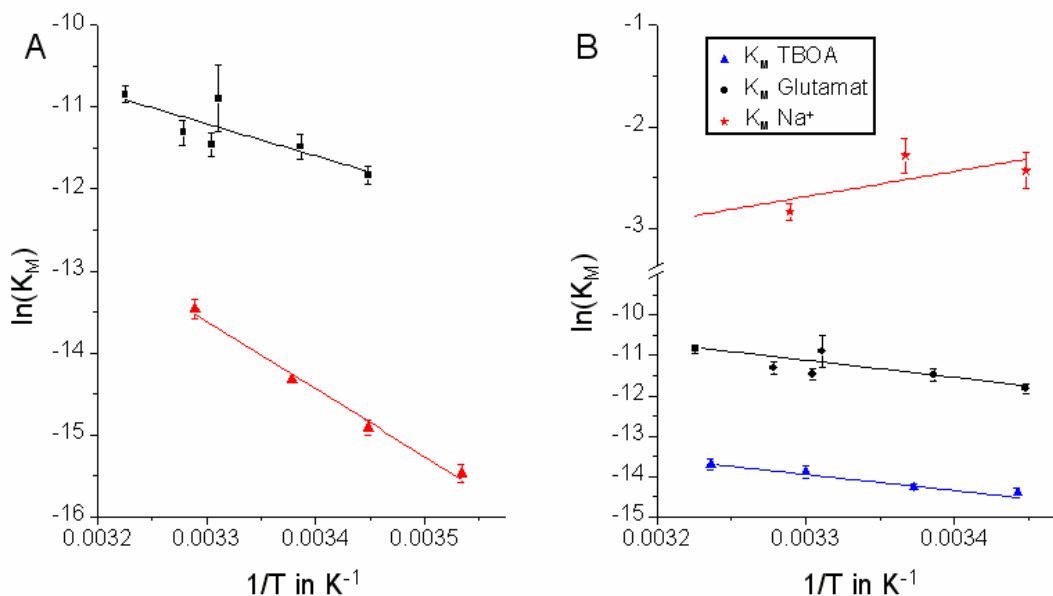


Glutamat-Bindungsprozess ist enthalpie- aber nicht entropiegetrieben.

Für die Berechnung der Enthalpie der apparenten Bindungsreaktion von Glutamat wurde der  $K_M$  Wert aus stationären Strommessungen verwendet. Dieser Wert enthält neben dem wahren  $K_d$  für die Glutamatbindung auch kinetische Parameter. Daher kann  $\Delta H^0$  nicht als wahre Bindungsenthalpie betrachtet werden, d.h. die Enthalpie enthält auch kinetische Variablen, wie die Aktivierungsenergien von nachfolgenden oder vorangehenden Reaktionen. Spezifischere thermodynamische Daten wurden durch die Messung von Teilprozessen innerhalb des Transportzyklus erhalten. Zuerst wurde die Bindung von  $\text{Na}^+$  an den leeren Transporter mithilfe des  $\text{Na}^+$ -induzierten Anionenleckstroms untersucht. Dazu wurden  $\text{Na}^+$ -Konzentrations sprünge an EAAT3-tranfizierten Zellen durchgeführt und der durch diesen Sprung hervorgerufene Anionenstrom wurde gegen  $[\text{Na}^+]$  aufgetragen. Aus der  $[\text{Na}^+]$  Abhängigkeit wurde, mittels der Michaelis-Menten Gleichung, der apparente  $K_M$  für die  $\text{Na}^+$ -Bindung ermittelt [ $K_M = (106 \pm 17)\text{mM}$ ,  $n = 4$ , bei  $24^\circ\text{C}$  und  $0\text{ mV}$ ]. Die Auftragung von  $\ln(K_M)$  gegen  $1/T$  zeigte eine starke Streuung der Daten (Abb. 19 B). Innerhalb der Fehlergrenze bestand keine oder eine nur eine schwache Temperaturabhängigkeit der  $\text{Na}^+$ -Bindung und damit keine signifikante Bindungsenthalpie (Abb. 19 B). Die  $Q_{10}$  Daten, die durch die Auswertung des Leckstroms erhalten wurden, weisen darauf hin, dass für die Aktivierung der Leckleitfähigkeit wahrscheinlich eine Konformationsänderung stattfindet. Die folgende Reorganisierung der Hydrathülle kann mit einer Aufnahme von freier Energie assoziiert sein, die von der Bindungsenthalpie der  $\text{Na}^+$ -Bindung gespeist werden könnte.  $\Delta H^0$  bei  $24^\circ\text{C}$  beträgt  $(-20,8 \pm 21,5)\text{kJ/mol}$ . Die freie Enthalpie bei dieser Reaktion wurde mit  $\Delta G^0 = (-6,3 \pm 16,9)\text{kJ/mol}$  berechnet ( $25^\circ\text{C}$ ).

Die Substratbindungsreaktion des Glutamattransporters wurde im folgenden mithilfe eines kompetitiven Inhibitors (TBOA) untersucht. Im Gegensatz zum transportierbaren Substrat Glutamat, kann TBOA nicht transportiert werden und es wird angenommen, dass die Bindung von TBOA weitere Konformationsänderungen, wie z.B. die Translokationsreaktion, unterbindet (Waagepetersen, Shimamoto et al. 2001). Die Untersuchung der thermodynamischen Parameter der TBOA-Bindung kann daher Informationen über die intrinsische Substratbindung in der Abwesenheit von Konformationsänderungen geben. Die Bindung von TBOA unterbindet die Anionenleckleitfähigkeit des Transporters, wodurch es möglich war, den  $K_M$  von EAAT3 für TBOA durch Messung des Stroms bei verschiedenen  $[\text{TBOA}]$  zu bestimmen. Die van't

Hoff'sche Reaktionsisobare ergab eine Bindungsenthalpie, die sich in derselben Größenordnung, wie die apparente Reaktionsenthalpie des Glutamattransport befindet. Die Bindungsenthalpie ergab einen Wert von  $(-30 \pm 3,3)\text{kJ/mol}$  (Abb. 19).



**Abb. 19** (A) van't Hoff Auftragung des  $K_M$  für Glutamat von EAAT3 (schwarze Quadrate) und EAAT4 (rote Dreiecke) zeigte eine Temperaturabhängigkeit der apparenten Affinität des Transporters für Glutamat. Die durch lineare Regression berechnete Reaktionsenthalpie beträgt für EAAT3  $(-32,7 \pm 6,4)\text{kJ/mol}$  und  $(-68,6 \pm 4,5)\text{kJ/mol}$  für EAAT4. (B) Zusammenfassung der van't Hoff Auftragungen von  $K_M$  verschiedener Substrate für EAAT3: Der  $K_M$  für die Bindung von  $\text{Na}^+$  an den leeren Transporter (rote Sterne) war nur schwach temperaturabhängig,  $\Delta H^0 = (20,8 \pm 21)\text{kJ/mol}$ . Im Gegensatz dazu war die apparente Affinität von TBOA (blaue Dreiecke) und Glutamat (schwarze Quadrate) von der Temperatur abhängig, d.h. beide Reaktionen sind exotherm  $\Delta H^0_{\text{Glutamat}} = (-32,7 \pm 6,4)\text{kJ/mol}$  bzw.  $\Delta H^0_{\text{TBOA}} = (-30,0 \pm 3,3)\text{kJ/mol}$ . Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Bisher wurde die Thermodynamik des Glutamattransports des Transportersubtyps EAAT3 charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit ist eine signifikant höhere apparente Affinität des Subtyps EAAT4 für Glutamat festgestellt worden, daher wäre es interessant zu überprüfen, ob sich dieser Unterschied zwischen den beiden Transportern auch in der Thermodynamik des Transportprozesses niederschlägt. Dazu wurde die Temperaturabhängigkeit des  $K_M$  von EAAT4 für Glutamat im Einwärtstransportmodus gemessen (Abb. 19 A). Man sieht auch bei diesem Transporter, dass die apparente Affinität

mit steigender Temperatur abnahm (exotherme Reaktion). Dementsprechend besitzt die durch die van't Hoff'sche Gleichung ermittelte Reaktionsenthalpie einen negativen Wert. Aus einem Vergleich mit dem  $\Delta H^0$  Wert von EAAT3 wird ersichtlich, dass die Wärme, die von EAAT4 bei der Glutamatbindung freigesetzt wurde, ca. doppelt so hoch war [ $\Delta H^0_{EAAT4} = (-68,7 \pm 4,5)\text{kJ/mol}$ ]. Das ist ein Indiz, dass die in dieser Arbeit gemessene Differenz der apparenten Affinität des EAAT4, die sowohl unter stationären, als auch unter vorstationären Bedingungen gemessen wurde, im Vergleich zu EAAT3 mit der stärkeren Bindung des Glutamats durch Ausbildung von mehr oder stärkeren H-Brücken zu erklären ist. Allerdings ist bei dieser Erklärung Vorsicht geboten, da der apparente  $K_M$ , der durch die Dosis-Wirkungskurve des stationären Stroms gemessen wurde, sich vom intrinsischen  $K_d$  der Bindungsreaktion unterscheidet. Ausserdem wurde für die Standardreaktionsentropie der Glutamatbindung von EAAT4 ein Wert von  $(-113,4 \pm 5,1)\text{J/Kmol}$  berechnet, dieser Wert ist ca. 7 mal grösser als die apparente Reaktionsentropie für die Glutamatbindung in EAAT3. Die Substratbindung in EAAT4 war daher enthalpie- aber nicht entropiegetrieben.

		$\Delta H^0$ [kJ/mol]	$\Delta S^0$ [J/Kmol]	$\Delta G^0$ [kJ/mol]
Gesamter Zyklus	EAAT3	$-32,7 \pm 6,4$	$-14,7 \pm 7,8$	$-29,9 \pm 1,4$
Gesamter Zyklus	EAAT4	$-68,6 \pm 4,5$	$-113,4 \pm 5,1$	$-34,9 \pm 0,6$
Na <sup>+</sup> -Bindung		$20,8 \pm 21,5$	$90,9 \pm 91,7$	$-6,3 \pm 16,9$
TBOA-Bindung		$-30,0 \pm 3,3$	$16,1 \pm 3,8$	$-34,8 \pm 0,5$

Tab.1 Zusammenfassung der thermodynamische Daten unter stationären Bedingungen

### 3.2.4. Einfluss der Temperatur auf die Kinetik des Transportprozesses.

#### 3.2.4.1. Temperaturabhängigkeit des Anionenstroms

Die Messung von  $Q_{10}$ -Werten unter stationären Bedingungen gibt einem einen ersten Hinweis, ob der stationäre Transportprozess mit einer energetischen Barriere verbunden ist. Wesentlich genauer als dieses Maß ist die Messung der Temperaturabhängigkeit der Zeit- ( $\tau$ ), bzw. der Geschwindigkeitskonstanten ( $k = 1/\tau$ ) der vorstationären, glutamatassoziierten Ströme, da mit dieser Methode die Aktivierungsenthalpien von spezifischen Partialreaktionen im Transportzyklus bestimmt werden können. Zur Messung der vorstationären Kinetik von EAAT4 wurde Glutamat photolytisch aus MNI-Glutamat freigesetzt, mit anschließender zeitaufgelöster Messung der glutamatinduzierten Ströme. Zuerst wurden Ströme in Anwesenheit von intrazellulärem  $\text{SCN}^-$  als permeierendem Anion gemessen. Die Rohdaten sind in Abb. 20 A aufgetragen. Alle Spuren wurden direkt so aufgetragen, wie sie in einer Zelle gemessen wurden, bis auf die Daten bei  $34^\circ\text{C}$ , die durch den gemittelten stationären Anionenstrom bei dieser Temperatur standardisiert wurden (siehe Abb. 20 A). Man sah eine deutliche Temperaturabhängigkeit des Signals. Mit höheren Temperaturen stieg die stationäre Komponente des Stroms an, wie schon in Abb. 18 A gezeigt, jedoch wurde der vorstationäre Strom am stärksten durch die Temperatur beeinflusst. Um die Auswirkung der Temperatur auf die Kinetik zu quantifizieren, wurden die Zeitkonstanten der ansteigenden ( $\tau_{\text{rise}}$ ) und der abfallenden ( $\tau_{\text{decay}}$ ) Phase bestimmt.  $\tau_{\text{rise}}$  nahm innerhalb des Temperaturintervalls von  $16,3^\circ\text{C}$  um mehr als das 10-fache ab, während  $\tau_{\text{decay}}$  um das 8-fache abnahm. Durch die Kenntnis der gemessenen Zeitkonstanten, war es möglich die Aktivierungsenthalpie der assoziierten Transportprozesse nach der Theorie des aktivierten Komplexes zu berechnen (Gln 22 + 23) (Eyring 1935; Gutfreund 1995). Für die Auswertung wurde der natürliche Logarithmus der apparenten Geschwindigkeitskonstanten ( $1/\tau$ ) minus  $\ln(k_b T/h)$  gegen die entsprechende reziproke, absolute Temperatur aufgetragen (Abb. 20 B und C). Der Vorteil dieser Auftragung gegenüber der Auftragung nach Arrhenius ist der, dass die Aktivierungsparameter direkt aus dem Achsenabschnitt ( $\rightarrow \Delta S^\ddagger$ ) oder der Steigung ( $\rightarrow \Delta H^\ddagger$ ) bestimmt werden können. Zudem ist der Achsenabschnitt, im Vergleich zur Auftragung nach Arrhenius temperaturunabhängig (Gln 21). Eine eindeutige Bestimmung der Aktivierungsenthalpie ist nur dann möglich, wenn eine Linearität der  $-\ln(k) - \ln(k_b T/h)$  gegen  $1/T$  Auftragung innerhalb des Temperaturintervalls vorliegt. In den hier gezeigten Daten konnte, innerhalb der Fehlergrenze, keine Abweichung von der Linearität beobachtet werden. Die Prozesse, die zur ansteigende Phase beitragen, sind in früheren Arbeiten den Teilschritten im Reaktionszyklus zugeordnet worden, die sich nach

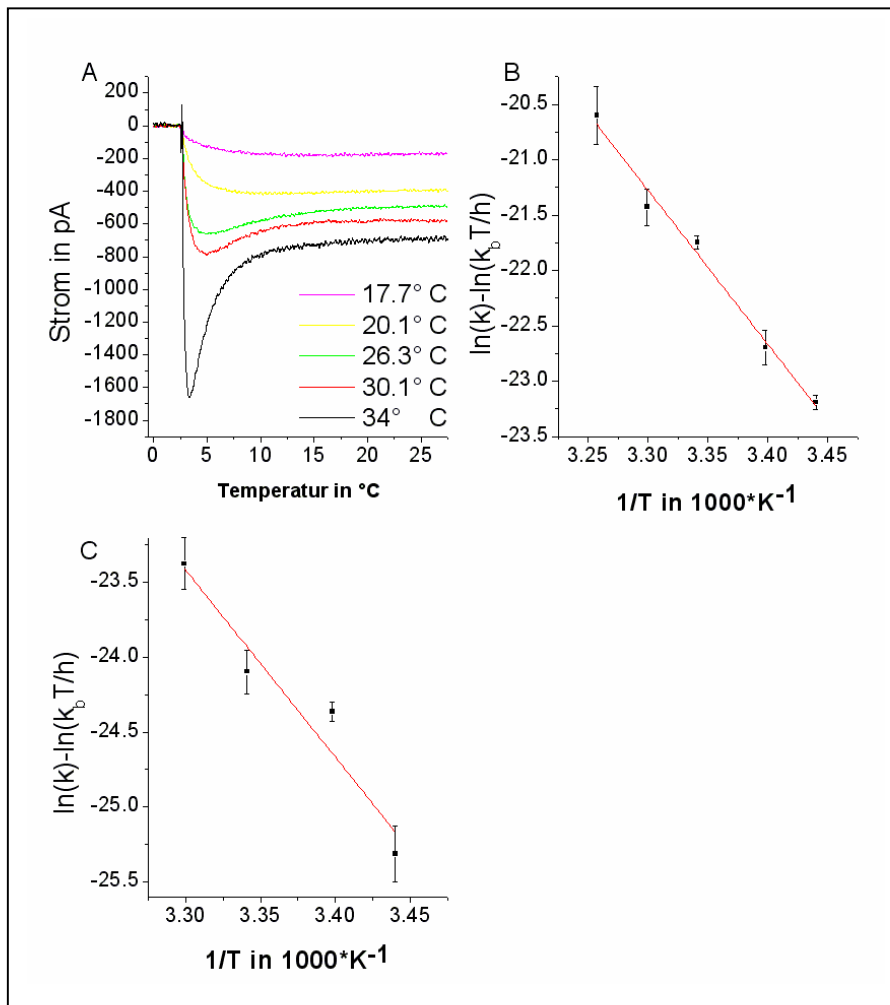
der Glutamatbindung und vor dem Glutamat-Translokationsschritt befinden (Watzke, Bamberg et al. 2001). Die Aktivierungsenthalpie für den durch  $1/\tau_{\text{rise}}$  charakterisierten Prozess betrug  $(116 \pm 7)\text{kJ/Kmol}$ . Dies deutet darauf hin, dass bei der Bildung des Übergangszustands intramolekulare Bindungen, vor allem intramolekulare Wasserstoffbrücken, gelöst werden müssen. Bei der ansteigenden Phase beobachtet man die Aktivierung des Anionenkanals, insofern kann man diesen Prozess auch als *gating* dieses Kanals betrachten. Die Grösse der Aktivierungsenthalpie weist darauf hin, dass eine relativ grosse Konformationsänderung stattfinden muss, bevor sich der Anionenkanal öffnet. Beispielsweise besitzt der Chloridkanal CFTR eine vergleichbare Aktivierungsenergie ( $E_a = 104 \text{ kJ/mol}$ ) für die Öffnung des Kanals (Aleksandrov and Riordan 1998). Von diesem Anionenkanal ist bekannt, dass eine Reorientierung des Proteins notwendig ist, um den Kanal zu öffnen. Die Aktivierungsentropie des Übergangszustands der mit der ansteigenden Phase assoziierten Reaktion war mit einem Wert von  $(205 \pm 24)\text{J/Kmol}$  positiv und relativ gross. Diese Zunahme der Entropie kann auf eine allgemeine Erhöhung der Freiheitsgrade beim Erreichen des Übergangszustands zurückgeführt werden. Diese Erhöhung kann entweder durch die Freisetzung von gebundenem Wasser, z.B. aus hydrophoben Oberflächen, erklärt werden, oder aber durch die Zunahme der Beweglichkeit des Proteins, bzw. Seitenketten (Ayala, Vindigni et al. 1995). Bei einem nativen Protein, das wahrscheinlich seine globale Struktur behalten wird, ist die Verdrängung von Wassermolekülen wahrscheinlicher.

Zusätzlich zur ansteigenden Phase des Anionenstroms wurde auch die Temperaturabhängigkeit der abfallenden Phase, charakterisiert durch die Zeitkonstante  $\tau_{\text{decay}}$ , untersucht (Abb. 20 C). Die abfallende Phase des Signals ist in der Literatur dem Translokationsschritt und der nachfolgenden intrazellulären Dissoziation von Glutamat zugeordnet worden (Wadiche and Kavanaugh 1998; Watzke, Bamberg et al. 2001). Die Werte der gemessenen Aktivierungsparameter sind in Tab. 2 enthalten. Auch dieser Prozess war mit einer hohen Aktivierungsenthalpie verbunden,  $\Delta H^\ddagger = (104 \pm 20)\text{kJ/mol}$ . Dieses Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, dass auch der Translokationsschritt mit einer Konformationsänderung verbunden ist. Die Aktivierungsentropie von  $(147 \pm 66)\text{J/Kmol}$  kann auch in diese Richtung gedeutet werden, denn bei der Translokation könnte das Protein einen Übergangszustand durchlaufen, in dem nur noch ein Bruchteil der aktiven Proteinoberfläche der wässrigen Phase zugewandt ist. Zusammenfassend bedeutet dies, dass alle geschwindigkeitsbestimmenden Prozesse nach der Bindung von Glutamat

mit einer strukturellen Reorientierung des Proteins verbunden sind.

	$\Delta H^\ddagger$ [kJ/mol]	$\Delta S^\ddagger$ [J/Kmol]	$\Delta G^\ddagger$ [kJ/mol]
$\tau_{\text{rise}}$	$116 \pm 7$	$206 \pm 24$	$54,2 \pm 0,5$
$\tau_{\text{decay}}$	$104 \pm 20$	$147 \pm 66$	$60,6 \pm 0,15$

Tab.2 Auswertung der kinetische Daten des Anionenstroms bei 25°C und 0mV



**Abb. 20** (A) Rohdaten für die Temperaturabhängigkeit der Glutamat-induzierten Anionenströme in Anwesenheit von intrazellulären  $SCN^-$  Ionen im Einwärtstransportmodus bei 0 mV. Glutamat wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  freigesetzt. Die Spur von 34°C wurde entsprechend des Anionenstroms bei 34°C standardisiert. Man erkennt eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Amplitude des transienten Stroms. (B) Das  $\ln(k) - \ln(k_b T/h) - 1/T$ -Diagramm gemäss der Eyring'schen Gleichung zeigt den

starken Einfluss der Temperatur auf die Zeitkonstante des Anstiegs ( $\tau_{\text{rise}}$ ). Die Steigung ergab eine Aktivierungsenthalpie von  $(116 \pm 7)$  kJ/mol. (C) Die Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstante der abfallende Phase ( $\tau_{\text{decay}}$ ) wurde durch dieselbe Auftragung ausgewertet. Wie man in A sieht war bei 17.7 °C keine signifikante transiente Phase vorhanden, daher fehlt dieser Datenpunkt. Die resultierende Aktivierungsenthalpie beträgt  $(104 \pm 20)$  kJ/mol. Die Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler.

### 3.2.4.2. Temperaturabhängigkeit des Transportstroms

Durch die Auswertung der Kinetik des Anionenstroms erhält man nur Informationen über den Teil des Transportprozesses, der mit der Anionenleitfähigkeit des Glutamattransporters verbunden ist. Um weitergehende Informationen zu erhalten, wurde der gekoppelte Transportstrom näher untersucht, wodurch eine Aussage über die Temperaturabhängigkeit der Kinetik der elektrogenen Schritte im Transportzyklus möglich ist. In Anwesenheit eines wenig permeierenden Anions, wie  $\text{Cl}^-$  oder Methansulfonat, kann der Transportstrom isoliert gemessen werden, da der wesentlich größere Anionenstrom ausgeblendet ist. Für die Bestimmung der Zeit- und Temperaturabhängigkeit der glutamatinduzierten, vorstationären Ströme wurde Glutamat, wie zuvor beschrieben, photolytisch freigesetzt. Im Signal des Transportstroms sind bei Raumtemperatur drei Phasen vorhanden, die in der Literatur wie folgt beschrieben wurden: Die ansteigende Phase ( $\tau_{\text{rise}}$ ) repräsentiert die Glutamatbindungsreaktion. Die abfallende Phase enthält zwei Zeitkonstanten,  $\tau_{\text{fast}}$  und  $\tau_{\text{slow}}$ , die mit den Zeitkonstanten  $\tau_{\text{rise}}$  bzw.  $\tau_{\text{decay}}$  aus dem Anionenstromexperimenten korrelieren (Watzke, Bamberg et al. 2001). Bei 24 °C waren die in dieser Arbeit erhaltenen Zeitkonstanten leicht verschieden von den in der Literatur gefundenen Werten:  $\tau_{\text{rise lit}} = (0,4 \pm 0,1)\text{ms}$  vs.  $\tau_{\text{rise}} = (0,16 \pm 0,06)\text{ms}$ ;  $\tau_{\text{fast lit}} = (1,5 \pm 0,2)\text{ms}$  vs.  $\tau_{\text{fast}} = (0,56 \pm 0,09)\text{ms}$ ;  $\tau_{\text{slow lit}} = (8,1 \pm 0,6)\text{ms}$  vs.  $\tau_{\text{slow}} = (6,1 \pm 0,5)\text{ms}$ . Von den Werten für  $\tau_{\text{rise}}$  bzw.  $\tau_{\text{fast}}$  ist bekannt, dass sie empfindlich auf die Änderung der Glutamatkonzentration reagieren. Eine Erklärung für diese Diskrepanz ist die effizientere Freisetzung von MNI-Glutamat im Vergleich zum CNB-Glutamat, das überwiegend in der zitierten Arbeit verwendet wurde. Auf diese Tatsache ist in der Einleitung hingewiesen worden. Diese Schlussfolgerung wird durch die Werte von  $\tau_{\text{rise}} = (0,45 \pm 0,09)\text{ms}$  und  $\tau_{\text{decay}} = (6,1 \pm 0,4)\text{ms}$  aus den Anionenstromexperimenten und Transportstromexperimenten in dieser Arbeit gestützt, da sich die korrespondierenden Zeitkonstanten nicht signifikant voneinander unterscheiden.

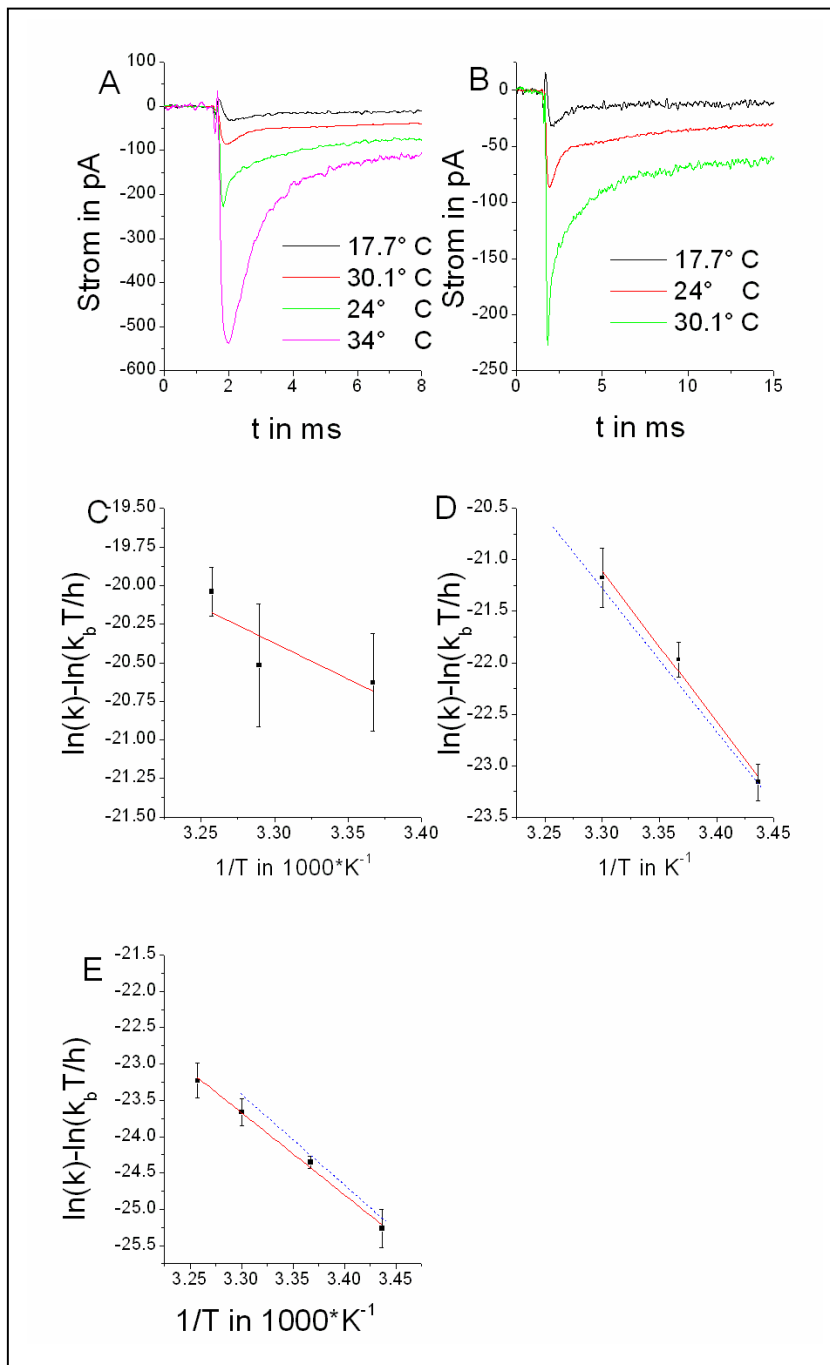
Die Daten bei höheren Temperaturen zeigten, dass insbesondere die Zeitkonstanten der beiden abfallenden Phasen temperatursensitiv sind (Abb. 21 A). Alle Ströme wurden mithilfe der, bei der jeweiligen Temperatur gemessenen, stationären Transportströme standardisiert (siehe Abb. 21 A). Ein drastischer Effekt war bei der Zeitkonstante der schnell abfallenden Phase zu sehen. Um dies zu verdeutlichen wurden die Spuren für 17,7°C bis 30°C getrennt mit höherer Zeitauflösung aufgetragen (Abb. 21 B). Bei höheren

Temperaturen ( $\geq 34^\circ\text{C}$ ) war die schnell-abklingende Phase nicht mehr nachweisbar, d.h. die Reaktion wurde lediglich von den durch  $\tau_{\text{rise}}$  und  $\tau_{\text{slow}}$  charakterisierten Prozessen kontrolliert. Die Werte der Aktivierungsparameter der drei Phasen des Transportstroms sind in Tab.3 zu finden.  $\tau_{\text{rise}}$ , als Maß für die Bindung von Glutamat, war relativ schwach temperaturabhängig  $\Delta H^\ddagger = (38 \pm 23)\text{kJ/mol}$  (Abb.21 C). Der Wert  $\Delta S^\ddagger$  besaß einen zu hohen Standardfehler, um ihn sinnvoll zu interpretieren. Die geringe Aktivierungsenthalpie war ein Zeichen dafür, dass die Bindung von Glutamat nahezu diffusionsgesteuert war. Im Gegensatz zur Bindung des ersten  $\text{Na}^+$ -Ions, die mit einer moderaten Aktivierungsenergie verbunden war. Als nächstes wurde die schnelle Zeitkonstante des abfallenden Signals untersucht ( $\tau_{\text{fast}}$ ) (Abb. 21 D). Der zugrundeliegende Prozess war stark temperaturabhängig,  $\Delta H^\ddagger = (121 \pm 12)\text{kJ/mol}$ . Die hohe Aktivierungsenthalpie spricht für eine Konformationsänderung während dieser Reaktion. Der Wert stimmte gut mit der Aktivierungsenthalpie der Zeitkonstante  $\tau_{\text{rise}}$  aus der Messung des Anionenstroms überein. Zum Vergleich wurde die Regressionsgerade für die Auswertung des Anionenstroms in demselben Graph aufgetragen (blaue, gestrichelte Linie in Abb. 21 D). Die Aktivierungsentropie betrug  $(222 \pm 46)\text{J/Kmol}$ , dieser hohe Wert kann durch die Konformationsänderung erklärt werden, die eine Verdrängung von Wasser aus hydrophoben Teilen des Proteins bei der Bildung des Übergangszustands zur Folge hat. Zuletzt wurden die Aktivierungsparameter für den Prozess, der durch  $\tau_{\text{slow}}$  charakterisiert wird, ermittelt (Abb. 21 E). In diesem Fall war die Temperaturabhängigkeit ebenfalls stark ausgeprägt, wofür die Aktivierungsenthalpie von  $(222 \pm 46)\text{kJ/mol}$  ein Merkmal ist. Ein Vergleich mit der Aktivierungsenthalpie der korrespondierenden Phase ( $\tau_{\text{decay}}$ ) im Anionenstrom lässt den Schluss zu, dass auch diese beiden Prozesse die gleichen mikroskopischen Vorgänge im EAAT3 Transportzyklus beschreiben. Das bestätigt auch der Vergleich der Regressionsgeraden vom  $1/\tau_{\text{decay}}$  (Anionenstrom) bzw.  $1/\tau_{\text{slow}}$  (Transportstrom)  $\ln(k)-\ln(k_b T/h)-1/T$ -Diagramme, die sich, im Rahmen des Messfehlers, einander gleichen. Die Aktivierungsentropie von  $(122 \pm 15)\text{J/Kmol}$  zeigt, dass dieser Reaktionsschritt im Vergleich, zur durch  $\tau_{\text{fast}}$  charakterisierten Reaktion, weniger stark entropiegetrieben war, mit der Folge, dass die freie Aktivierungsenthalpie ( $\Delta G^\ddagger$ ), die durch die Geschwindigkeitskonstante bestimmt wurde, in beiden Fällen denselben Wert besitzt.



	$\Delta H^\ddagger$ [kJ/mol]	$\Delta S^\ddagger$ [J/Kmol]	$\Delta G^\ddagger$ [kJ/mol]
$\tau_{\text{rise}}$	$38 \pm 23$	$33 \pm 84$	$52 \pm 1$
$\tau_{\text{fast}}$	$121 \pm 12$	$222 \pm 46$	$59 \pm 3$
$\tau_{\text{slow}}$	$94 \pm 5$	$122 \pm 15$	$58 \pm 1$

Tab. 3 Auswertung der kinetischen Daten des Transportstroms bei 25°C und 0 mV



**Abb. 21** (A) Rohdaten des Glutamat-induzierten Transportstroms in HEK<sub>EAAT3</sub> bei verschiedenen Temperaturen. Die Zellen wurden im Einwärtstransportmodus in Abwesenheit von SCN<sup>-</sup> Ionen (ersetzt durch Cl<sup>-</sup>) gemessen. Glutamat wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  durch Photolyse von MNI-Glutamat (1 mM) freigesetzt. Alle Werte wurden mithilfe der stationären Transportströme entsprechend ihrer Temperatur standardisiert (siehe Abb. 19 A). (B) Die Spuren von 17,7°C bis 30,1°C wurden getrennt, bei hoher Zeitauflösung aufgetragen, um zu zeigen, dass die Zeitkonstante ( $\tau_{\text{fast}}$ ) der schnellen Phase mit steigender Temperatur kleiner wurde, so dass die schnelle Phase bei 34°C nicht mehr nachweisbar war. Daher war bei 34 °C die schnell-abklingende Phase schneller als die ansteigende Phase und wurde daher nicht mehr beobachtet, da der Anstieg des Transportstroms geschwindigkeitslimitierend

wurde. (C-E)  $\ln(k)-\ln(k_p T/h)-1/T$ -Diagramme entsprechend der Eyring'schen Gleichung der einzelnen Zeitkonstanten (C)  $\tau_{rise}$  war moderat temperaturabhängig:  $\Delta H^\ddagger$  ( $39 \pm 23$ )kJ/mol (D)  $\tau_{fast}$  zeigte eine starke Temperaturabhängigkeit, die rote Linie repräsentiert die Regressionsgerade dieses Datensatzes, die entsprechende Aktivierungsenthalpie betrug ( $121 \pm 12$ )kJ/mol. Die blaue gestrichelte Linie ist die Regressionsgerade von  $\tau_{rise}$  aus der Analyse des Anionenstroms (E) Daten der Messung von  $\tau_{slow}$  die Regressionsgerade ist in rot gezeichnet, die Aktivierungsenthalpie besass einen Wert von ( $94 \pm 4$ )kJ/mol. Zum Vergleich ist die Regressionsgerade für  $\tau_{decay}$  in blau aufgetragen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von EAAT4

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 5 verschiedene Glutamattransportersubtypen der SLC1 Familie kloniert worden. Die funktionalen Eigenschaften der Subtypen 1-3, die intensiv untersucht wurden, sind einander ähnlich, insbesondere was die Kinetik des Glutamattransports anbetrifft (Watzke, Bamberg et al. 2001). Deshalb liegt die Frage nahe, wofür so viele verschiedene Subtypen benötigt werden?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich drei, im folgenden aufgeführte Charakteristika des EAAT4-Subtyps dramatisch von den Typen 1-3 unterscheiden. Unabhängig davon haben alle bisher untersuchten Glutamattransporter der SLC1 Familie denselben Transportmechanismus gemeinsam. Es wurde erstens gezeigt, dass EAAT4 5-10 mal langsamer als die Transportsubtypen 1-3 arbeitet (die kinetischen Parameter sind in Tabelle 4 aufgelistet). Zweitens, besaß der durch EAAT4 katalysierte Glutamattransport eine andere Abhängigkeit vom Transmembranpotential als die Subtypen 2 und 3. Zum Beispiel wurde EAAT4 bei Hyperpolarisation gehemmt, die Subtypen 2 und 3 zeigten aber keine derartige Hemmung (Billups, Rossi et al. 1996; Grewer, Watzke et al. 2000). Die apparente Affinität von EAAT4 für Glutamat war ebenfalls deutlich von der Spannung abhängig, wobei die Affinitäten der Subtypen 2 und 3 für Substrate spannungsunabhängig sind (Wadiche, Arriza et al. 1995; Grewer, Watzke et al. 2000). Drittens, waren die apparenten Affinitäten von EAAT4 für Glutamat und die kotransportierten  $\text{Na}^+$  Ionen signifikant höher als die in EAAT3 gemessenen Werte.

	EAAT4	EAAT3	EAAT2	EAAT1
$1/\tau_{\text{fast}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	340 <sup>g</sup>	1200 <sup>a</sup>	4000 <sup>c</sup>	1040 <sup>f</sup>
$1/\tau_{\text{slow}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	34 <sup>g</sup>	620 <sup>b</sup>	590 <sup>c</sup> 930 <sup>d</sup>	45 <sup>f</sup>
Turnover rate (s <sup>-1</sup> )	~3 <sup>g</sup>	90 <sup>b</sup>	41 <sup>e</sup>	16 <sup>f</sup>

Tab. 4 Kinetische Daten der bisher charakterisierten Glutamattransporter bei 0 mV. Zusammengestellt aus: a (Watzke, Bamberg et al. 2001), b (Grewer, Watzke et al. 2000), c (Bergles, Tzingounis et al. 2002), d (Otis and Kavanaugh 2000), e (Bergles and Jahr 1998), f (Wadiche and Kavanaugh 1998), g (Mim, Balani et al. 2005)

#### 4.1.1. Mechanismus des Glutamattransports in EAAT4

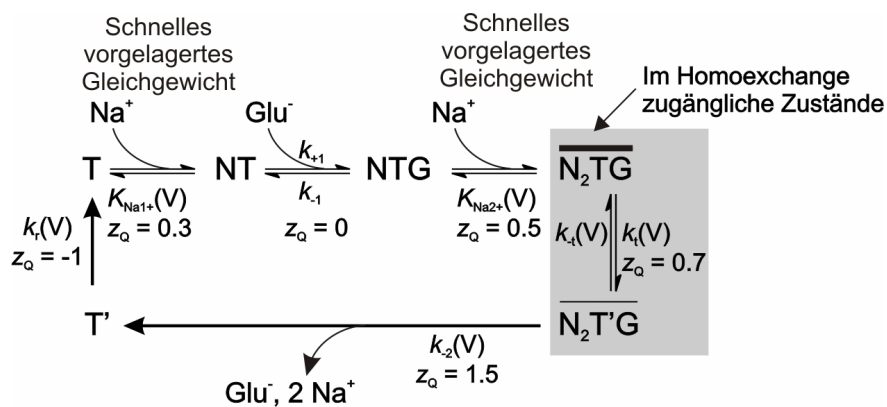
Der allgemeine Transportmechanismus des Substrattransports in EAAT4 ist sehr ähnlich zu den bereits charakterisierten Subtypen. Das Transportmodell ist in Schema 1 dargestellt, eine ausführliche Beschreibung des Modells und der resultierenden Gleichungen zur Simulation der Transportströme ist im Anhang zu finden. Das Modell beinhaltet 6 unterschiedliche Zustände, wobei der Grundzustand den unbeladenen Transporter darstellt. Der katalysierte Transport beruht auf einem sequenziellen Mechanismus, in dem Na<sup>+</sup> und Glutamat zuerst nacheinander gebunden und anschliessend in einem Reaktionsschritt transloziert werden. Dagegen bindet K<sup>+</sup> an den Na<sup>+</sup>/Glutamat-freien Transporter, mit der nach innen gerichteten Glutamatbindungsstelle und wird nach der Bindung in die entgegengerichtete Richtung über die Membran verschoben. Daher kann die Glutamattranslokation auch in Abwesenheit von K<sup>+</sup> stattfinden, allerdings ist der stationäre Glutamattransport unter diesen Bedingungen gehemmt. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird hier der K<sup>+</sup>-abhängige T-T'-Übergang aus Schema 1 vorgeschlagen. Schema 1 verdeutlicht den unterschiedlichen Einfluss der Natrium- und Kaliumionenkonzentration auf den vorstationären Strom in Bezug auf die

Teilschritte des Zyklus. In der Abwesenheit einer hohen internen  $[K^+]$  sind immer noch glutamatinduzierte, transiente Anionenströme messbar (assoziiert mit dem glutamattranslozierenden Übergang von  $\overline{N_2TG}$  zu  $\overline{N_2T'G}$  aus Schema 1), jedoch ist die stationäre Anionenstromkomponente verschwunden (Abb. 13 C). Im Gegensatz dazu resultieren niedrige extrazelluläre  $Na^+$ -Konzentrationen in einer Hemmung der glutamatinduzierten, transienten Anionenstromkomponente, wobei die stationäre Anionenstromkomponente noch beobachtet wird (Abb. 13 D). Diese Ergebnisse zeigen, dass der  $K^+$ -abhängige Relokationsschritt bei niedrigen intrazellulärem  $[K^+]$  geschwindigkeitsbestimmend für den stationären Umsatz wird. Im Gegensatz dazu wird die  $Na^+$ -abhängige Glutamattranslokation bei niedrigen extrazellulären  $[Na^+]$  geschwindigkeitsbestimmend.

Wie in EAAT3 binden die drei  $Na^+$  Ionen und Glutamat in EAAT4 in einer sequenziellen Reihenfolge. Glutamat bindet erst an EAAT4, nachdem zumindest ein Natriumion gebunden hat. Die Glutamatbindung erzeugt eine zweite, hochaffine Bindungsstelle für  $Na^+$  am Transporter. In Schema 1 ist das dritte  $Na^+$  und  $K^+$ , sowie das Proton nicht eingetragen worden, weil die hier gemessenen Daten keine Aussage zulassen, wo diese Ionen im EAAT4 Transportzyklus binden. Dadurch erhält man das vereinfachte Modell in Schema 1. Den wichtigsten Hinweis für den sequenziellen  $Na^+$ -Glutamat- $Na^+$ -Bindungsmechanismus erhält man durch die experimentell ermittelte  $[Na^+]$  Abhängigkeit des glutamatinduzierten Maximalanionenstroms bei sättigenden Glutamatkonzentrationen ( $I_{Max}$ ). Dieser Maximalstrom fällt bei geringen  $[Na^+]$  ab. Dieses Ergebnis zeigt, dass mindestens ein  $Na^+$  nach der Glutamatbindung an den Transporter binden muss, denn würden alle  $Na^+$  an EAAT4 binden, bevor Glutamat bindet, würde man erwarten, dass  $I_{Max}$  unabhängig von der externen Natriumionenkonzentration wäre (Watzke, Bamberg et al. 2001). In diesem Fall würde man erwarten, dass die Verwendung von sättigenden Glutamatkonzentrationen das  $Na^+$ -Bindungsgleichgewicht in Richtung der  $Na^+$ -beladenen Form verschiebt und so den hemmenden Einfluss der niedrigen  $[Na^+]$  überwinden würde. Diese Überlegung gilt allerdings nicht, wenn die externe  $[Na^+]$  so niedrig ist, dass sie für den stationären Transport geschwindigkeitsbestimmend wird. Die hier präsentierten Resultate schränken die Möglichkeiten für die Stöchiometrie des  $Na^+$ :Glutamat Kotransports von EAAT4 ein. Diese Stöchiometrie ist bisher noch nicht experimentell untersucht worden. Die ermittelte Stöchiometrie der  $Na^+$ -Glutamat-Kopplung beträgt

mindestens 2 Na<sup>+</sup>:1 Glutamat. Es ist aber auch möglich, und sogar wahrscheinlich, dass ein 3:1 Verhältnis besteht, wie auch bei EAAT2 und EAAT3 (Zerangue and Kavanaugh 1996; Levy, Warr et al. 1998).

Die Geschwindigkeit der stationären Glutamataufnahme war in der Anwesenheit von SCN<sup>-</sup> auf beiden Seiten der Membran etwas erhöht gegenüber der Geschwindigkeit in Cl<sup>-</sup> haltigen Lösungen. Dieser Effekt deutet an, dass SCN<sup>-</sup>, als chaotropes Ion, einen modulierenden Einfluss auf den Glutamattransport in EAAT4 haben könnte. Allerdings weisen die Geschwindigkeitskonstanten, die aus der Analyse der vorstationären Kinetik (im Homoexchange-Modus) in Anwesenheit von SCN<sup>-</sup> stammen und die den Glutamat-abhängigen Halbzyklus charakterisieren, keine Unterschiede gegenüber denen auf, die ohne SCN<sup>-</sup> erhalten wurden (Abb. 15 D). Man kann daher spekulieren, dass chaotrope Anionen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die K<sup>+</sup>-abhängige Relokation, im Transportzyklus beeinflussen. Es werden aber weitere Experimente benötigt, um diese Vermutung zu untermauern. Trotzdem zeigt dieses Ergebnis, dass man Vorsicht walten lassen sollte, wenn Daten interpretiert werden, die nur mit Hilfe der Messung von Anionenströmen gewonnen wurden.



Schema 1 beschreibt das einfachste kinetische Modell, das die in dieser Arbeit gefundenen Daten am besten beschreiben kann. In grau unterlegt sind die Spezies, die im Homoexchangemodus zugänglich sind. Die kinetischen Parameter sind durch numerische Integration der entsprechenden Gleichungen erhalten worden, die im Anhang zu finden sind.  $z_Q$  sind die apparenten Valenzen, die zur Simulation der Ströme verwendet wurden. Alle  $z_Q$  sind so gewählt, dass sie sich zu +2 addieren, um der Gesamtbilanz der im Zyklus verschobenen Ladungen Rechnung zu tragen.

#### 4.1.2. Spannungsabhängigkeit des Glutamattransports durch EAAT4

Interessanterweise zeigt der Glutamattransport durch EAAT4 eine einzigartige Spannungsabhängigkeit, die bisher noch in keinem anderem Subtyp der Glutamattransporterfamilie beobachtet wurde. EAAT4 besitzt seine maximale Transportaktivität zwischen 0 und -20 mV, bei geringeren Membranpotentialen wird EAAT4 inaktiviert. Dieser Inaktivierungsprozess wurde in dieser Arbeit zeitaufgelöst gemessen und kann mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden. Die Zeitkonstante der Inaktivierung liegt im Bereich von 15 ms. Die Inaktivierung ist am deutlichsten bei den Einwärtstransportbedingungen ausgeprägt und weniger stark im Homoexchange-Modus zu sehen. Dies deutet an, dass die Reaktionsschritte im  $K^+$ -abhängigen Zweig des Transportzyklus bei stark negativen Potentialen verlangsamt werden. Dies hat zur Folge, dass EAAT4 in den Zuständen akkumuliert, die mit der Relokation assoziiert sind. Diese Zustände des  $K^+$ -abhängigen Teilzyklus sind nicht anionenleitend. Darum wird nicht nur der Glutamattransport, sondern auch die Anionenleitfähigkeit bei stark negativen Potentialen gehemmt. Im Homoexchange-Modus sind die  $K^+$ -assoziierten Zustände nicht zugänglich, wie für EAAT3 demonstriert wurde (Watzke, Bamberg et al. 2001). Aus diesem Grund ist die Deaktivierung des Anionenstroms auch nicht so stark wie im Transportmodus. Ein einfaches kinetisches Modell (Schema 1) beschreibt die experimentellen Daten sehr gut, wie anhand der numerischen Simulation ersehen werden kann (Abb. 22, A und B). Das Modell sagt eine Inhibierung bei negativen Potentialen voraus, die entweder von einer Inhibierung der intrazellulären Bindung von  $K^+$ , oder aber von der extrazellulären  $K^+$ -Dissoziation (Ansammlung des T'-T Übergangs in Schema 1) verursacht wird. Die apparente Valenz, die mit dem Übergang assoziiert ist, beträgt nach diesem Modell -1 und ist dem Vorzeichen aller anderen Teilreaktionen, die bisher in Glutamattransportern beschrieben wurden, entgegengesetzt. Folglich ist diese Reaktion verlangsamt, wenn die Transmembranspannung herabgesetzt wird, während die  $Na^+$ -assoziierten Reaktionen, wie Bindung und Translokation, beschleunigt werden. Diese Interpretation steht im Gegensatz zu vorangehenden Berichten von anderen Transportersubtypen (Grewer and Rauen 2005). In EAAT3 wurde vorgeschlagen, dass die geschwindigkeitsbestimmende, kaliumioneninduzierte Relokationsreaktion bei negativen Potentialen beschleunigt wird, weil die Verschiebung der positiven Ladung während des  $K^+$ -Transports durch die negativen Ladungen der Kationenbindungsstelle überkompensiert

werden (Grewer, Watzke et al. 2000). In Übereinstimmung mit diesem Modell ist bei EAAT3 keine Anionenstrominaktivierung bei negativen Membranpotentialen zu sehen (Abb. 10 A und die Simulation in 22 A). Die positive Ladung, die durch den  $K^+$ -Transport nach aussen transportiert wird, wird daher in EAAT4 entweder nicht durch negative Ladungen kompensiert oder die elektrogene  $K^+$ -Bindung an die intrazelluläre Bindungsstelle wird geschwindigkeitsbestimmend.

Eine zweite interessante Beobachtung in EAAT4 ist die Spannungsabhängigkeit der apparenten Affinität des Transporters für Glutamat. Diese apparente Affinität steigt mit hyperpolarisierendem Membranpotential (Abb. 11 E). Demgegenüber steht das Verhalten in EAAT3, hier besteht keine Spannungsabhängigkeit der apparenten Affinität für Glutamat. Dieses Verhalten von EAAT4 kann auch mit dem Transportmodell aus Schema 1 erklärt werden. Entsprechend dieses Modells hat das Einfangen des Glutamats durch EAAT4 und die die Wiederherstellung der Glutamatbindungsstelle eine umgekehrte Spannungsabhängigkeit, daher verweilt Glutamat bei negativen Potentialen länger am Transporter, was eine höhere apparente Affinität zur Folge hat. Dieses Verhalten kann durch die Gleichungen 5A und 5B im Anhang genauer quantifiziert werden, wie Abb. 22 B zeigt. Jedoch ist die simulierte Spannungsabhängigkeit des  $K_M$  etwas stärker als die experimentell bestimmte Abhängigkeit. Der Grund dafür liegt evtl. in anderen Teilreaktionen im Transportzyklus, die nicht beobachtet wurden und die die Spannungsabhängigkeit ebenfalls modulieren könnten.

Es sollte erwähnt werden, dass die apparenten Valenzen aus Schema 1 gewählt wurden, um eine Gesamtlandungsverschiebung von +2 für den kompletten Zyklus zu erhalten. Dies macht es erforderlich, dass ein Proton und ein drittes Natriumion zusammen mit dem Glutamat transportiert wird. Diese Ionen sind aus Gründen der Vereinfachung in Schema 1 weggelassen worden. Auch wenn keine Daten zum Beitrag der Bindung und/oder der Transmembranbewegung dieser beiden Ionen zur Elektrogenität des Transporters zur Verfügung stehen, so ist es doch denkbar, dass die durch ihre Bewegung verursachte Ladungsverschiebung im elektrischen Feld zur Elektrogenität einzelner Reaktionsschritte in Schema 1 beiträgt. Darum sind die Valenzen in Schema 1 apparente Valenzen und keine intrinsischen Valenzen einzelner Reaktionsschritte, die evtl. weitere Ionenbindungsreaktionen enthalten, die dort nicht gezeigt sind.

#### 4.1.3. Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen in nativ exprimierten EAAT4 in Kleinhirnneuronen

In zwei vorangehenden Veröffentlichungen wurde die vorstationären Kinetik von Transportern behandelt, die nativ in cerebellaren Purkinjezellen exprimiert werden (Otis and Jahr 1998; Auger and Attwell 2000). Im ersten Bericht wurde die Kinetik der Anionenleitfähigkeit dieses nativ-exprimierten Glutamattransporters untersucht (Otis and Jahr 1998). Die Kinetik aus dieser Untersuchung unterscheidet sich signifikant von der des rekombinanten EAAT4, der in dieser Arbeit charakterisiert wurde: Erstens ist die Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls der transienten Stromkomponente erheblich grösser, als die hier gemessenen Werte, z.B. fällt die transiente Komponente des glutamatinduzierten Anionenstroms im Purkinjezellentransporter innerhalb  $< 50$  ms ab, während dieselbe Anionenstromkomponente im rekombinanten Protein innerhalb von  $< 100$  ms abfällt (Abb. 14 B). Zweitens ist das Verhältnis von transienten zu stationären Strom im Otis und Jahr Bericht signifikant grösser, als in den hier präsentierten Ergebnissen. Drittens hat der Purkinjezelltransporter eine apparente Glutamataffinität im Bereich von  $3 \mu\text{M}$ , dagegen sind hier Werte im submikromolaren Bereich gefunden worden. Zusammen deuten diese Beobachtungen an, dass es sich womöglich nicht um EAAT4 bei dem nativ-exprimierten Transporter handelt. Im Gegensatz dazu scheinen die kinetischen Daten des von Otis und Jahr beobachteten Transporters sehr ähnlich denen zu sein, die im rekombinanten, heterolog exprimierten EAAT3 gefunden wurden (Grewer, Watzke et al. 2000), der auch in cerebellaren Purkinjezellen vorhanden ist (Rothstein, Martin et al. 1994; Furuta, Martin et al. 1997).

In der zweiten Veröffentlichung wurden sowohl glutamatgesteuerte Anionenströme als auch Transportströme ausgewertet (Auger and Attwell 2000). Ein direkter Vergleich der berichteten Resultate von Auger *et al.* und den hier präsentierten Ergebnissen ist schwieriger, da die Autoren Glutamat nur für eine kurze Zeit (1 ms) appliziert haben. Es scheint aber so, dass die ansteigende und abfallende Stromkomponente eine schnellere Kinetik als die hier ermittelten Kinetik des EAAT4 haben. Auch die von Auger *et al.* beschriebenen Kinetiken erinnern eher an diejenigen, die mit heterolog exprimierten EAAT3 in HEK-Zellen bestimmt wurden (Grewer, Watzke et al. 2000; Watzke, Bamberg et al. 2001). Allerdings gibt es auch zwei andere Erklärungsansätze für die Andersartigkeit zwischen der Kinetik in dem hier verwendeten Expressionssystem und der Kinetik der



nativen Transporter: (1.) Die nativ-exprimierten Transporter könnten von den Neuronen posttranslational verschieden modifiziert/prozessiert werden. (2.) Die Glutamatkonzentrationen waren in den berichteten Untersuchungen wesentlich höher (2 mM) als die maximale Konzentration, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (~ 100  $\mu$ M). Jedoch zeigt EAAT4 ein sättigendes Verhalten bei Konzentrationen > 50  $\mu$ M, es ist darum unwahrscheinlich, dass höhere Glutamatkonzentrationen eine erheblich schnellere Kinetik bewirken könnten.

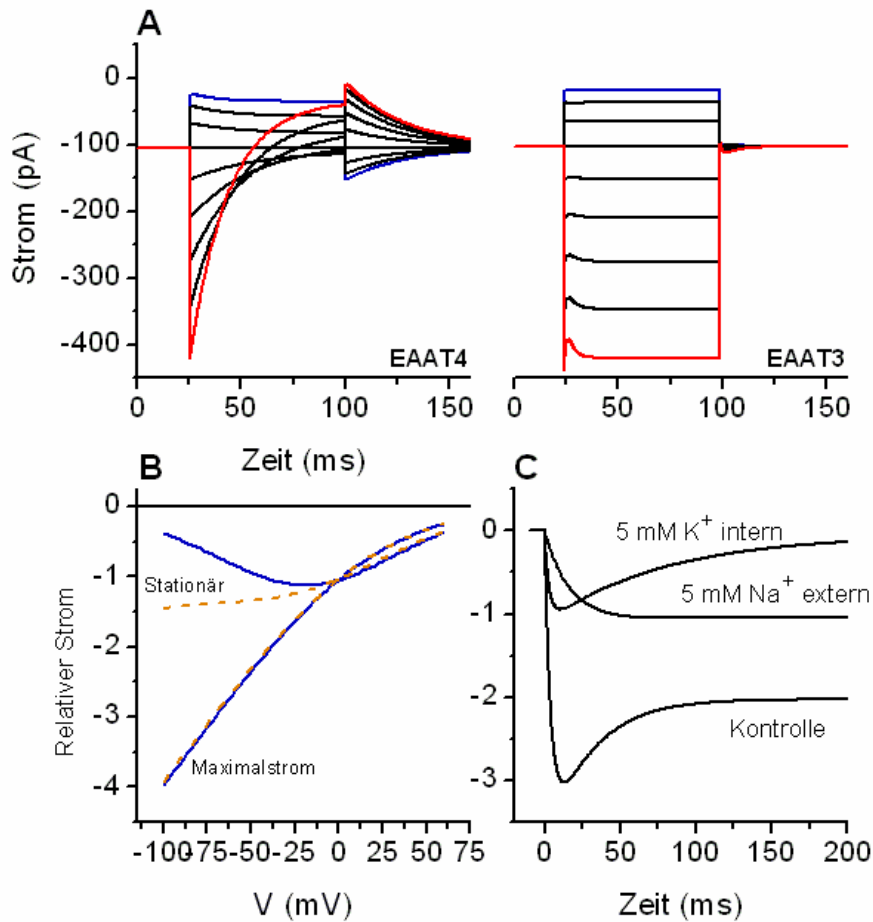
#### 4.1.4. Physiologische Signifikanz

EAAT4 wird in grösserem Maß im Kleinhirn exprimiert, genauer in Purkinjezellen (Furuta, Martin et al. 1997). Die Expression in Purkinjezellen erstreckt sich eher auf die dendritischen Dornen (*dendritic spines*), und dort in Bereichen, die von den exzitatorischen, synaptischen Kontakten ein wenig abgesetzt sind, an denen Glutamat freigesetzt wird (Dehnes, Chaudhry et al. 1998). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass präsynaptisch, freigesetztes Glutamat zuerst mit dem niedrig-affinen, schnell-transportierenden Transporter EAAT2 in Kontakt kommt, der in den Gliazellen gebildet wird, die die Synapse der Kletterfasern fest umschliessen (Bergles, Dzubay et al. 1997). Dieses niedrig-affine System entfernt den Großteil des freigesetzten Glutamats, aber es arbeitet mangelhaft, wenn die Glutamatkonzentrationen einen niedrigen Wert im submikromolaren Bereich erreichen. Aus diesem Grund scheint die Annahme gerechtfertigt, dass Glutamatmoleküle aus dem synaptischen Kontakt heraus diffundieren können, wo sie dann von dem hoch-affinen, langsam-transportierenden Transporter EAAT4 aufgenommen werden. Daher könnte die Hauptfunktion von EAAT4 der Vermeidung eines Überlaufens von Glutamat in benachbarte Synapsen dienen. Wegen der langsamen Kinetik und der entfernten Lokalisation von der Synapse, scheint es unwahrscheinlich, dass der Transporter direkt an der Beendigung der synaptischen Übertragung beteiligt ist, vorallem auch wegen der geringen Glutamataufnahmekapazität.

Weil zu erwarten ist, dass EAAT4 bei nanomolaren- bis submikromolekularen Glutamatkonzentrationen arbeitet, kann man vermuten, dass der Transporter nicht für eine schnelle Funktionsweise optimiert ist. Bei einer Glutamatkonzentration von 0,5  $\mu$ M bindet

EAAT4 nur ein Glutamatmolekül alle 100 ms. Folglich ist die Bindung von Glutamat an den Transporter der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und alle anderen Reaktionsschritte können demgegenüber als schnell betrachtet werden. Dagegen scheint EAAT4 für die feste Bindung von Glutamat optimiert zu sein. Mehrere Anhaltspunkte sprechen für diese Optimierung im Vergleich zu anderen Transportersubtypen: (a) die höhere Affinität der Na<sup>+</sup>-Bindungsstellen resultieren in einer höheren apparenten Affinität für Glutamat; (b) eine langsamere Dissoziation von Glutamat führt zu einer festeren Bindung; (c) die einzigartige Spannungsabhängigkeit des Transports hat eine höhere apparente Affinität bei physiologischen Transmembranpotentialen und folglich ein effizienteres Zurückhalten des Glutamats zur Folge. Es wäre sicherlich interessant die molekulare Basis dieser Optimierung hin zu einem hochaffinen Transporter zu untersuchen.

Ein längeres Verweilen von Glutamat an der EAAT4 Bindungsstelle bei physiologischen Membranpotentialen wird auch die Lebenszeit des anionenleitenden Zustands von EAAT4 verlängern. Die hyperpolarisierende Wirkung von EAAT4 könnte der depolarisierenden Wirkung der niedrig-affinen und schnell-transportierenden Transportersubtypen, wie EAAT3, entgegenwirken. EAAT3 und EAAT4 werden auf den Dendriten der Purkinjezellen koexprimiert (Conti, DeBiasi et al. 1998; Dehnes, Chaudhry et al. 1998; Kugler and Schmitt 1999), was eine mögliche kooperative Interaktion zwischen beiden Transportersubtypen nahelegt.



**Abb. 22** Simulation der stationären und vorstationären Anionenströme von EAAT4, berechnet durch numerische Integration der Differentialgleichungen, die Schema 1 beschreiben. Folgende Parameter wurden für EAAT3 verwendet:  $k_{+1} = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $z_Q = 0$ ),  $k_{-1} = 50 \text{ s}^{-1}$  ( $z_Q = 0$ ),  $k_t = 100 \text{ s}^{-1}$  ( $z_Q = 0$ ),  $k_2 = 200 \text{ s}^{-1}$  ( $z_Q = +1,5$ ),  $k_r = 30 \text{ s}^{-1}$  ( $z_Q = 0,5$ ). (A, links) Antwort des Anionenstroms von EAAT4 auf Spannungssprünge von einem Haltepotential von 0 mV auf Werte von -100 bis +60 mV in Inkrementen von 20 mV (vergl. Spannungsprotokoll in Abb. 10 A). Der Anionenstrom wurde anhand Gln.10 ermittelt (140 mM  $\text{SCN}^-$  im Zytosol) multipliziert mit der Population der anionenleitenden Zustände als eine Funktion der Zeit. Die relative Einheitsleitfähigkeit des Zustands  $\overline{N_2 T' G}$  wurde als 30% zu dem Wert von  $\overline{N_2 T' G}$  festgesetzt. (A, rechts) Antwort des Anionenstroms, der für EAAT3 berechnet wurde für dasselbe in A gezeigte Spannungsprotokoll. Folgende Parameter wurden für EAAT3 verwendet:  $k_{+1/-1} = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}/50$  ( $z_Q = 0$ ),  $k_{t/-t} = 14/14$  ( $z_Q = +0,7$ ),  $k_2 = 200 \text{ s}^{-1}$  ( $z_Q = +1,5$ ),  $k_r = 20 \text{ s}^{-1}$  ( $z_Q = -1$ ),  $K_{\text{Na}+1} = 50$  ( $z_Q = +0,3$ ),  $K_{\text{Na}+2} = 8,4$  ( $z_Q = +0,5$ ). Bei beiden  $\text{Na}^+$ -Bindungen wurde angenommen, dass sie sich in einem schnellen Vorgleichgewicht befinden mit einer apparenten Valenz von 0,5, bzw. 0,5. (B, oben) Simulation des maximalen Anionenstroms sofort nach dem Spannungssprung und des stationäre Anionenstroms für den einwärtsgerichteten Transport (blau), und Homoexchange (orange) als eine Funktion der Spannung. (B, unten) Simulation des  $K_M$  für Glutamat als eine Funktion der Spannung bei 140 mM  $\text{Na}^+$ , gemäß der Gln 5A und 5B. (C) Simulation der Zeitabhängigkeit des EAAT4 Anionenstroms bei 0 mV im einwärtsgerichteten Transportmodus ( Kontrolle, 140 mM  $\text{Na}^+$  extern) und in der Anwesenheit von niedrigem internen  $[\text{K}^+]$  und niedrigem, externem  $[\text{Na}^+]$ , in Übereinstimmung mit den Experimenten, die in Abb. 13 abgebildet sind.

## 4.2. Auswirkung der Glutamattransporter-assoziierten Proteine auf die Kinetik des Glutamattransports durch EAAT4

GTRAP41 (für Glutamate TRansporter Associated Protein 41), ein Bindungspartner für EAAT4, ist ein relativ grosses Adapterprotein (~270 kD), das Ähnlichkeiten mit Spektrin besitzt. Spektrin verknüpft Proteine mit dem Zytoskelett (Jackson, Song et al. 2001). Rho, ein Aktinfilament modifizierendes Protein, ist fähig an GTRAP48 zu binden, was einen sekundären Bindungspartner für EAAT4 darstellt. Beide Proteine besitzen, den hier gemessenen Daten zu Folge, keinen Einfluss auf die Kinetik von EAAT4. Weder die Zeitkonstante der ansteigenden Phase ( $3,21 \pm 0,27$ )ms (wt) bzw. ( $3,76 \pm 0,78$ )ms (wtG), noch die der abfallende Phase wird bei sättigenden Glutamatkonzentrationen durch die Koexpression der GTRAPs beeinflusst. Der einzige, wenn auch geringe Effekt, ist bei geringen Glutamatkonzentrationen, d.h. die Daten bei 0,8  $\mu$ M; 1,1  $\mu$ M und 1,4  $\mu$ M, zu sehen (Abb. 17 B). Die einfachste Erklärung hierfür ist, dass GTRAP41/GTRAP48 eine Erniedrigung der Geschwindigkeit der Dissoziation von Glutamat verursacht, was eine Erniedrigung des intrinsischen  $K_d$  der Glutamatbindung zur Konsequenz hat. Die Geschwindigkeitskonstante der Glutamatdissoziation kann durch den Achsenabschnitt der Regressionsgeraden bei geringen Glutamatkonzentrationen erhalten (Abb. 17 B) werden. Allerdings lässt die Qualität der Daten nur eine qualitative Diskussion zu.

In der Veröffentlichung haben Jackson *et al.* gezeigt, dass der Wert des  $v_{max}$  etwa um den Faktor 2-3 steigt, nachdem GTRAP41 bzw. GTRAP48 exprimiert wurde. Die einhergehende Veränderung des  $K_M$  war äusserst gering (< 1,5 fach). Allerdings war eine erhöhte Expression von EAAT4 nachweisbar. Aufgrund der hier erhaltenen Daten, die eine Veränderung der Kinetik unwahrscheinlich erscheinen lassen und der erhöhten Expression, kann man spekulieren, dass die gefundenen Unterschiede in  $v_{max}$  durch eine verstärkte Insertion des Transporters in die Membran verursacht wird. Dafür spricht auch die Verwandtschaft der Proteine mit Adapter- und Zytoskelett-assoziierten-Proteinen.

## 4.3. Der Einfluss der Temperatur auf die Glutamattransportreaktion

### 4.3.1. Thermodynamische Eigenschaften des Glutamattransports

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob (und in welcher Weise) der Transport von Glutamat durch Glutamattransporter von der Temperatur abhängt. Zuerst soll der Effekt der Temperatur auf die stationären Ströme diskutiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die apparente Affinität für Glutamat im Einwärtstransportmodus bei steigenden Temperaturen abnimmt. Bei EAAT3 stieg der  $K_M$  um das 3-fache in einem 20°C Intervall an, und bei EAAT4 um das 7,5-fache im selben Intervall. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die apparente Substratbindung in beiden Proteinen exotherm ist, was die Auswertung der van't Hoff'schen Isobaren bestätigt hat (negatives  $\Delta H^0$ , leChatelier'sches Prinzip). Allerdings war die Reaktionsenthalpie von EAAT4 doppelt so hoch, wie die Enthalpie von EAAT3. Im vorigen Abschnitt wurden die Eigenschaften, wie Umsatzgeschwindigkeit und apparenter  $K_M$  für die Glutamatbindung, von EAAT4 mit den Werten für EAAT3 verglichen. Die Daten zeigten, dass die apparente Affinität für Glutamat von EAAT4 8 mal höher als bei EAAT3 ist. Dieses Ergebnis wurde durch die berechnete Freie Reaktionsenthalpie bestätigt [ $\Delta G_{EAAT4} = (-34,9 \text{ kJ/mol} \pm 0,6) \text{ kJ/mol}$  vs.  $\Delta G_{EAAT3} = (-29,9 \pm 1,4) \text{ kJ/mol}$ ]. Im vorigen Abschnitt wurde auch gezeigt, dass eine Spannungsabhängigkeit des  $K_M$  für Glutamat in EAAT4 besteht. Zusammen mit der hier gefundenen Temperaturabhängigkeit lässt dies den Schluss zu, dass sich die Bindungseigenschaften von Glutamat, evtl. sogar die direkten Protein-Substrat Interaktionen in der Substratbindungsstelle, von EAAT3 und EAAT4 unterscheiden. EAAT4 ist ein Protein, das Glutamat fest bindet, aber nicht schnell transportiert. Im Gegensatz dazu scheint sich EAAT3 evolutionär dahingehend entwickelt zu haben Glutamat schwach zu binden, aber schnell zu transportieren. In manchen Enzymen wird ein Teil der Substratbindungsenthalpie zur Stabilisierung des Übergangszustands verwendet (Fersht 1999). Dies ist nur dann möglich, wenn das Enzym das Substrat im Übergangszustand stärker bindet als im Grundzustand. In der Tyrosyl-tRNA-Transferase sind einzelne Aminosäureseitenketten ausschliesslich für die Bindung des Substrats im Übergangszustand verantwortlich, ohne an der eigentlichen Reaktion beteiligt zu sein, d.h. hier wird ein Teil der Bindungsenthalpie aus der Bindungsreaktion des Übergangszustands

zur Stabilisierung des Übergangszustands verwendet (Leatherbarrow, Fersht et al. 1985). Ein anderes Beispiel ist Lysozym. Verwendet man bei diesem Enzym Substrate, die Analoga zum Übergangszustand darstellen, erhält man Dissoziationskonstanten, die 100-160-fach kleiner sind, als die Dissoziationskonstanten für das ursprüngliche Substrat. Dieselbe Eigenschaft wurde in der Prolin-Racemase beobachtet (Lienhard and Secemski 1973; Keenan and Alworth 1974). Überträgt man diese Phänomene auf EAAT3, so kann man spekulieren, dass die Bindungsenthalpie für Glutamat im Übergangszustand des Proteins durch zusätzliche Interaktionen zwischen Protein und Substrat zunimmt, was den Übergangszustand des Proteins auf der Translokationsreaktionskoordinate stabilisieren könnte. Die Folge wäre eine niedrigere Aktivierungsenergie und damit eine höhere Umsatzrate. Ein Teil der Glutamatbindungsstellen wären dann in EAAT3 nur im Übergangszustand komplementär zum Substrat. Im Kontrast dazu kann spekuliert werden, dass in EAAT4 die Glutamatbindungsstellen im ursprünglich geformten Transporter-Substrat-Komplex komplementär sind, d.h. ein grosser Teil der Reaktionsenthalpie wird schon bei der Bindung des Substrats frei. Diese Hypothese könnte einen Teil der funktionellen Unterschiede dieser beiden Proteine erklären.

In beiden Proteinen ging die apparente Substratbindung mit einer Verringerung der Entropie einher. Eine Abnahme der Entropie deutet an, dass während des Bindungsprozesses die Anzahl der Freiheitsgrade abnimmt. Eine Änderung der Solvatisierung der Substratbindungsstelle durch H<sub>2</sub>O Moleküle könnte dabei eine Rolle spielen. Allerdings sind im apparenten  $K_M$  für Glutamat, der unter stationären Bedingungen gemessen wurde, neben der intrinsischen Dissoziationskonstante für Glutamat auch kinetische Parameter des gesamten Transportprozesses enthalten. Daher ist bei der Interpretation von thermodynamischen Bindungsparametern aus dem apparenten  $K_M$  für Glutamat Vorsicht geboten. Bei der Charakterisierung von EAAT4 hat man bezüglich der Spannungsabhängigkeit gesehen, dass auch andere Prozesse zum  $K_M$  beitragen. Der Unterschied zwischen vorstationärem  $K_M = (5,1 \pm 1,2)\mu\text{M}$  und stationärem  $K_M = (0,6 \pm 0,1)\mu\text{M}$  für EAAT4 war ein weiteres Beispiel für Abhängigkeit von Prozessen, die verschieden von der intrinsischen Bindungsreaktion an den unbeladenen Transporter sind.

Zwar wäre es theoretisch möglich die Substratbindung im Homoexchangemodus zu untersuchen, in dem kein stationärer Umsatz des Transporters stattfindet, aber in diesem Modus ist, neben dem intrinsischen  $K_d$  für Glutamat, auch die Gleichgewichtskonstanten für die Translokation und die Dissoziation von Glutamat auf der intrazellulären Seite im im

apparenten  $K_m$  für Glutamat enthalten (Grewer, Watzke et al. 2000; Watzke, Bamberg et al. 2001). Die Temperaturabhängigkeit des apparenten  $K_M$  Werts für Glutamat wäre daher auch im Homoexchange Modus nur schwer interpretierbar. Aus diesem Grund wurde die Temperaturabhängigkeit der Bindungsreaktion mit dem nichttransportierbaren Inhibitor TBOA bestimmt, um die intrinsischen Eigenschaften der Substratbindung näher zu untersuchen. Im Gegensatz zu transportierbaren Substraten, wie Glutamat, finden im Transporter nach der Bindung von TBOA keine weiteren Konformationsänderungen und  $\text{Na}^+$  Bindungsreaktionen statt (Z. Tao, unveröffentlichte Daten). Daher kann die TBOA Bindung in Isolation untersucht werden. Wie in Abb. 18 B gezeigt wurde, war der  $K_M$  für die TBOA Bindung temperaturabhängig. Die aus der Temperaturabhängigkeit des  $K_M$  bestimmte Bindungsenthalpie beträgt  $(-30,0 \pm 3,3)\text{kJ/mol}$ . Dieser Wert liegt in der Größenordnung von Bindungsenthalpien, die in zwei anderen glutamatbindenden Proteinen gemessen wurden.

Die Bindung von Glutamat ( $\Delta H^0 = -24,2 \text{ kJ/mol}$ ;  $\Delta S^0 = -33,4 \text{ J/Kmol}$ ) bzw. dem Analogon L-Methionin-(S)-Sulfoximin ( $\Delta H^0 = -43,5 \text{ kJ/mol}$ ;  $\Delta S^0 = -87,8 \text{ J/Kmol}$ ) an die Glutamatsynthetase ist durch die Bindungsenthalpie getrieben, aber entropisch ungünstig (Ginsburg, Gorman et al. 1987). Das Bindungsverhalten von Glutamat wurde auch an einem anderem System untersucht, in AMPA-Rezeptoren, einem Glutamat gesteuertem Ionenkanal. Glutamat bindet an die sogenannte S1S2 (substratbindende) Domäne, die aus 2 verschiedenen Peptidsequenzen besteht. Für die Bindungsreaktion wurden diese beiden Domänen als ein lösliches Fusionsprotein exprimiert. Die Glutamatbindungsreaktion ( $\Delta H^0 = -17,6 \text{ kJ/mol}$ ;  $\Delta S^0 = 55,6 \text{ J/Kmol}$ ) ist sowohl Enthalpie- als auch Entropie-getrieben (Madden, Abele et al. 2000). Es ist bemerkenswert, dass sowohl in der S1S2-Domäne des Glutamattransporters, als auch in EAAT3 ein Argininrest für die Bindung einer Carboxylatgruppe von Glutamat zuständig ist (Bendahan, Armon et al. 2000). In beiden Fällen trägt die Bildung einer ionischen Wechselwirkung in der Bindungstasche (Ionenpaarbildung) zur Bindungsenthalpie bei. Im Gegensatz zur Bindungsreaktion von EAAT3, hängt der Wert der Bindungsenthalpie in der S1S2-Domäne von der Temperatur ab. Dieses Verhalten scheint typisch für Proteine zu sein, bei denen die Substratbindung nach dem „Venusfliegenfallen-Modell“ funktioniert. Ein Großteil der untersuchten Proteine dieser Gruppe sind zuckerbindende Proteine, wie z.B. das Maltose bindende Protein (MBP) oder die Hexokinase. Jedoch unterscheiden sich die thermodynamischen Parameter erheblich innerhalb dieser Gruppe von Proteinen (Thomson, Liu et al. 1998). EAAT3 zeigte

eine konstante Bindungsenthalpie, im untersuchten Temperaturintervall (keine Abweichung von der Linearität in der van't Hoff Auftragung, siehe Anhang Gleichungen 15-17), weshalb die van't Hoff'sche Gleichung angewendet werden konnte. Insofern kann spekuliert werden, dass für die Bindungsreaktion keine konzertierte Bewegung von zwei Domänen, wie im „Venusfliegenfallen- Modell“, notwendig ist.

Interessant ist auch der Vergleich der Bindungsentropie der Substratbindung der S1S2-Domäne zwischen Antagonisten mit verschiedener Kanalöffnungsaktivität und dem Glutamat. Entsprechend der höheren Assoziationskonstante ist die Bindungsenthalpie bei den Antagonisten im Vergleich zu Glutamat stärker negativ. Allerdings ist die Bindungsentropie negativ. Zur Interpretation dieses Effekts wurde die Kristallstruktur mit den gebundenen Antagonisten ausgewertet. Alle Antagonisten verhindern das Schliessen der Bindungstasche, so dass Wasser, das an hydrophobe Bereiche des Proteins gebunden ist, nicht verdrängt wird. Daher ist der Entropieverlust der Bindungsreaktion bei dem Antagonisten im Vergleich zu den anderen getesteten Antagonisten, am geringsten, der den größten Raum einnimmt und damit die meisten Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt. (Kasper, Pickering et al. 2006). Auch wenn ein direkter Vergleich der Bindungsstelle für Glutamat in strukturell so verschiedenen Proteinen nur ungenaue Aussagen zulässt, so kann man zumindest davon ausgehen, dass die physikochemischen Prinzipien, wie die Verdrängung von Wasser durch das Volumen, das das Substrat einnimmt, ähnlich sind. In EAAT3 ging die Bindung von TBOA mit einer positiven Entropieänderung einher  $[(16,1 \pm 3,8)\text{J/Kmol}]$ . Man kann daher spekulieren, dass Wassermoleküle, die in der Bindungsstelle gebunden waren, freigesetzt werden, d.h. der Inhibitor besetzt einen grossen Teil der Bindungsstelle. Eine andere Möglichkeit ist eine mögliche Konformationsänderung, die nach der Bindung von TBOA stattfindet und hydrophobe Abschnitte des Proteins der Lösung entzieht und dadurch Wassermoleküle freisetzt. Die letztere Möglichkeit scheint wahrscheinlich, da die Kristallstruktur des bakteriellen Glutamattransporter, bei dem vermutet wird, dass er Glutamat gebunden hat, eine dichte Packung des Proteins, insbesondere der bindenden Domäne, impliziert (Yernool, Boudker et al. 2004).

EAAT3 besitzt nur dann eine hochaffine Bindungsstelle für Glutamat, wenn zuvor ein  $\text{Na}^+$  Ion an den Transporter gebunden hat (Wadiche, Arriza et al. 1995; Grewer, Watzke et al. 2000; Tao, Zhang et al. 2006). Um die Thermodynamik der  $\text{Na}^+$ -Bindung genauer zu untersuchen, wurden Teilprozesse des Transportzyklus in EAAT3 gemessen, die mit der



Kationenbindung assoziiert sind. Die Anionenleckleitfähigkeit des Transporters wird durch die Bindung eines  $\text{Na}^+$  Ions aktiviert, daher wurde die Temperaturabhängigkeit des  $K_M$  für dieses  $\text{Na}^+$  mithilfe der  $[\text{Na}^+]$  Abhängigkeit der Anionenleitfähigkeit bestimmt. Wie man in Abb.19 B erkennen kann, war die Reaktion nicht oder nur wenig temperatursensitiv. Dieses Ergebnis wirft neue Fragen auf, da gezeigt werden konnte, dass mindestens eine negativgeladene Carboxygruppe eines Aspartatrests (D367) direkt an der Bindung des  $\text{Na}^+$  beteiligt ist (Tao, Zhang et al. 2006). Da es sich bei der Bindung an  $\text{Na}^+$  um eine ionische Wechselwirkung (Ionenpaarbildung) handelt, wurde erwartet, dass diese Reaktion mit einer starken Enthalpieänderung einhergeht, deshalb ist es auch erstaunlich, dass die freie Enthalpie vergleichsweise gering war [ $\Delta G^0 = (-6,3 \pm 16,9)\text{kJ/mol}$ ]. Allerdings befindet sich das vermutete Bindungszentrum für  $\text{Na}^+$  relativ tief in der Transmembrandomäne des Transporters, wenn das von Gouaux und Kollegen vorgeschlagene Strukturmodell auf EAAT3 angewendet wird (Yernool, Boudker et al. 2004). Die Bindungsstelle befindet sich daher in einer hydrophoben Umgebung innerhalb des Proteins, weshalb angenommen wird, dass das  $\text{Na}^+$  auf dem Weg zur Bindungsstelle eine hydrophobe Barriere überschreiten muss (Wadiche, Arriza et al. 1995; Tao, Zhang et al. 2006). Insofern ist zu vermuten, dass  $\text{Na}^+$  in der desolvatisierten Form ohne seine Hydrathülle bindet. In diesem Fall verringert sich die messbare Reaktionsenthalpie um den Betrag der Desolvatisierungsenthalpie. Konformationsänderungen die erforderlich sind, um  $\text{Na}^+$  zu binden, könnten die Enthalpie des Gesamtprozesses ebenfalls beeinflussen, wenn netto mehr Wasserstoffbrücken gelöst als gebildet wurden. Der Wert der Entropie der  $\text{Na}^+$ -Bindungsreaktion war statistisch nicht signifikant von 0 verschieden. Eine Erklärung könnte die vermutete Konformationsänderung bieten, da der hydrophobe Effekt, durch Freisetzung von gebundenem Wasser an hydrophoben Teilen des Proteins, während der  $\text{Na}^+$  Bindung mit einer Entropieverminderung einhergeht, könnte dies dem Entropiegewinn durch die Dehydratisierung des  $\text{Na}^+$  entgegenwirken

#### 4.3.2. Einfluß der Temperatur auf die Kinetik des Glutamattransports.

Zur Bestimmung der schnellen Kinetik des Glutamattransports wurden *caged*-Verbindungen (CNB-Glutamat, MNI-Glutamat) eingesetzt, die Glutamat photolytisch

freisetzen. Darum muss sicher gestellt werden, dass die Temperaturabhängigkeit der Photolyse die Messungen nicht beeinflusst. Bei Raumtemperatur photolysiert MNI-Glutamat im Sub- $\mu$ s-Zeitbereich (150 ns), während CNB-Glutamat im 20  $\mu$ s-Zeitbereich photolysiert (Wieboldt, Gee et al. 1994; Canepari, Nelson et al. 2001). Für die temperaturabhängigen Messungen wurde nur MNI-Glutamat eingesetzt. Die niedrigste hier verwendete Temperatur betrug  $\sim 17^\circ\text{C}$ . Ein 100-facher Anstieg der Halbwertszeit in diesem Temperaturintervall (Raumtemperatur bis  $17^\circ\text{C}$ ) entspricht einem  $Q_{10}$  von  $\sim 720$ . Es ist unwahrscheinlich, dass die Photolyse mit einer Aktivierungsenergie verbunden ist, die einen solch hohen  $Q_{10}$  verursacht. Aber selbst, wenn dies der Fall wäre, würde die Freisetzungsgeschwindigkeit noch ausreichen, um die hier gemessene Zeitkonstante für  $\tau_{\text{fast}} = 1,9$  ms bei  $18^\circ\text{C}$  zeitlich aufzulösen. Bei einem anderen *caged*-Glutamat, CNB-Glutamat, mit einer Halbwertszeit von  $21\mu\text{s}$ , wäre ein solcher (höchst unwahrscheinlicher)  $Q_{10}$  allerdings kritisch für die Analyse der Ergebnisse.

Die Temperatur ist ein entscheidender Faktor in der Kinetik von Proteinreaktionen. Die Bildung eines Übergangszustand und die Reaktion zu den Endprodukten einer enzymatischen Reaktion ist im allgemeinen mit der Überwindung einer Energiebarriere verbunden (Hammes 2000). Der Strom, der durch Substrattransport mittels EAAT3 erzeugt wird, kann in 3 verschiedene Komponenten aufgeteilt werden, die alle getrennt als Funktion der Temperatur untersucht wurden (Abb.18 A). Der Glutamat-induzierte Anionenstrom, der in Anwesenheit von Glutamat und  $\text{SCN}^-$  gemessen wurde, war nur schwach von der Temperatur abhängig ( $Q_{10} = 1,95 \pm 0,4$ ). Dieses Ergebnis deckt sich mit Messungen des transporter-generierten Anionenstroms ( $Q_{10} = 1,07 \pm 0,18$ ) in Purkinje-Zellen (Auger and Attwell 2000). Die geringe Aktivierungsenergie macht es unwahrscheinlich, dass eine grössere Reorientierung des Transporters nötig ist, um den Anionenstrom aufrecht zu erhalten. Der Strom wird wahrscheinlich nur durch Diffusion der Anionen im elektrischen Feld der Membran verursacht. Die spannungsgetriebene Diffusion von Anionen durch klassische Ionenkanäle ist ein Prozess, der mit einer niedrigen Energiebarriere verbunden ist. Als  $Q_{10}$  wurde ein Wert von 1,44 für den *shaker*- $\text{K}^+$ -Kanal angegeben, deshalb ist anzunehmen, dass EAAT3 im stationären Zustand, wie ein klassischer Anionenkanal funktioniert (Rodriguez, Sigg et al. 1998).

Im Gegensatz zum Anionenstrom war der glutamatinduzierte Transportstrom stark von der Temperatur abhängig ( $Q_{10} = 3,7 \pm 0,4$ ), was ebenfalls die früheren Messungen an nativen Transportern in Purkinje Zellen (Auger and Attwell 2000) und an rekombinant-

exprimiertem EAAT2 bestätigt (Wadiche and Kavanaugh 1998). Diese Stromkomponente ist von der stationären Transportrate abhängig, die wiederum hauptsächlich vom geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Transportzyklus kontrolliert wird. In den bisher untersuchten Glutamatttransportern ist, bei Raumtemperatur, die  $K^+$ -abhängige Relokation des Transporters als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angenommen worden. Untersuchungen in Abhängigkeit der Temperatur zeigten allerdings, dass dieser Schritt in glialen Transportern nur mit einer geringen Aktivierungsenergie verbunden ist,  $Q_{10} = 1,8$  (Bergles and Jahr 1998). Deshalb kann der hier gefundene Wert für die Aktivierungsenergie der stationären Transportrate nicht alleine durch die Relokation des leeren Transporters erklärt werden kann. Es müssen daher weitere temperaturabhängige Schritte im Transportzyklus vorhanden sein, die zur hohen Aktivierungsenergie beitragen. Zudem ist es auffällig, dass die Aufrechterhaltung des Anionenstroms und die  $K^+$ -induzierte Relokationsreaktion einen ähnlichen  $Q_{10}$  besitzen. Die anionenleitenden Zustände innerhalb des Transportzyklus befinden sich im  $Na^+$ -abhängigen Zweig des Zyklus (Watzke and Grewer 2001; Grewer and Rauen 2005). Deshalb kann man annehmen, dass die Amplitude des Anionenstroms von der Geschwindigkeit der Relokation des Transporters abhängt, was im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen ist.

Ausserdem wurde in dieser Arbeit die Temperaturabhängigkeit der Aktivierung des Anionenleckstroms untersucht, die durch die Applikation von  $Na^+$  an den unbeladenen Transporter gemessen wurde. Die Aktivierung dieser Stromkomponente war offensichtlich ebenfalls mit einer Konformationsänderung des Glutamat freien Transporters verbunden, wie der Wert des  $Q_{10} = 2,5 \pm 0,7$  anzeigt, d.h. nach der Bindung von  $Na^+$  nimmt der Transporter eine neue Konformation ein. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Fluoreszenzmessungen an EAAT3, bei denen ein fluoreszierender Farbstoff kovalent an den Transporter gebunden wurde (in Position 430). Es wurde eine Änderung der Fluoreszenz nach der Bindung von  $Na^+$  festgestellt, die durch eine Änderung der Mikroumgebung um die Position 430 hervorgerufen wurde (Larsson, Tzingounis et al. 2004). Außerdem haben Versuche in EAAT1 gezeigt, dass Mutationen im extrazellulären *reentrant loop* zwischen Position 427-432 und zwischen Position 436-438 für Cysteinmodifikationen nicht zugänglich sind, nachdem  $Na^+$  gebunden hat (Grunewald, Menaker et al. 2002). Im Gegensatz dazu konnten dieselben Stellen in der Abwesenheit von  $Na^+$  mit cysteinreaktiven Reagenzien modifiziert werden. Ein ähnliches  $Na^+$ -Bindungsverhalten wurde auch für den  $Na^+$ /Glukose Kotransporter SGLT1 beschrieben.

Zum einen ist die apparente Affinität für  $\text{Na}^+$  ebenfalls nicht temperaturabhängig, zum anderen ist die  $\text{Na}^+$ -Bindungsreaktion mit einer Konformationsänderung verbunden (Hazama, Loo et al. 1997).

Allein mit der Bestimmung des  $Q_{10}$  Werts unter stationären Bedingungen ist es nicht möglich präzise Aussagen über einzelne Reaktionsschritte im EAAT3 Reaktionszyklus zu machen, da unter diesen Bedingungen hauptsächlich der langsamste Schritt im Transportzyklus beobachtet wird. Deshalb ist die Laserpulsphotolyse Methodik zur Anwendung gekommen, um vorstationäre Ströme nach einem schnellen Glutamatkonzentrationssprung zu messen und den Einfluss der Temperatur auf schnelle, elektrogene Reaktionsschritte im Transportzyklus zu bestimmen. Zunächst wurde die Kinetik des glutamatinduzierten Anionenstroms in Abhängigkeit der Temperatur ausgewertet. Die Zeitabhängigkeit des Anionenstromsignals kann nach einem Glutamat-Konzentrationssprung mit zwei Phasen beschrieben werden, eine ansteigende Phase mit der Zeitkonstante  $\tau_{\text{rise}}$  und eine abfallende Phase  $\tau_{\text{decay}}$  (Grewer, Watzke et al. 2000). Die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten ( $k = 1/\tau$ ) unterscheiden sich beträchtlich zwischen den einzelnen Glutamattransportern: EAAT1 ( $k_{\text{fast}} = 1040 \text{ s}^{-1}/k_{\text{slow}} = 45 \text{ s}^{-1}$ ); EAAT2 ( $k_{\text{fast}} = 4000 \text{ s}^{-1}/k_{\text{slow}} = 590 \text{ s}^{-1}$ ); EAAT3 ( $k_{\text{fast}} = 1200 \text{ s}^{-1}/k_{\text{slow}} = 620 \text{ s}^{-1}$ ); EAAT4 ( $k_{\text{fast}} = 340 \text{ s}^{-1}/k_{\text{slow}} = 34 \text{ s}^{-1}$ ) (Wadiche and Kavanaugh 1998; Grewer, Watzke et al. 2000; Watzke, Bamberg et al. 2001; Bergles, Tzingounis et al. 2002). Diese Unterschiede muss man in Betracht ziehen, wenn man die kinetischen Daten von verschiedenen Transportersubtypen vergleicht. Beide Phasen des Anionenstroms zeigen in EAAT3 eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit (Abb. 20 A). Für die quantitative Bestimmung wurden die Daten mithilfe eines  $\ln(k)-\ln(k_b T/h)-1/T$ -Diagramms untersucht. Die Aktivierungsenthalpie für den Prozess, der mit der ansteigenden Phase verknüpft ist, beträgt  $(116 \pm 7)\text{kJ/mol}$  und die Aktivierungsenthalpie der absteigenden Phase wurde mit  $(104 \pm 20)\text{kJ/mol}$  bestimmt. Alle experimentell bestimmten Aktivierungsparameter sind in Tab.2 zu finden. In der Literatur sind der ansteigenden Phase des Anionenstroms die Reaktionen zugeschrieben worden, die vor der Glutamatbindung und bis zum Translokationsschritt stattfinden, wie die Bindung von zwei  $\text{Na}^+$  Ionen und der Einschluß der Substrate (Bildung des „occluded state“) und die damit verbundene vollständige Aktivierung der Anionenleitfähigkeit (Watzke and Grewer 2001). Die hohe Aktivierungsenthalpie deutet an, dass der Anstieg des Anionenstroms mit einer Konformationsänderung von EAAT3 einhergeht. Es wurde von Watzke et al. (2001)

vorgeschlagen, dass es sich bei der Reaktion, die für den Anstieg des Anionenstroms geschwindigkeitsbestimmend ist, um eine Konformationsänderung handelt, da die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{rise}}$  zwar abhängig von der Glutamatkonzentration, aber nicht abhängig von der  $\text{Na}^+$  Konzentration war. Damit konnte die Bindung von  $\text{Na}^+$  als ratenlimitierend für diesen Schritt ausgeschlossen werden. Ausserdem war  $1/\tau_{\text{rise}}$  nicht linear von der Glutamatkonzentration abhängig, sondern sättigte bei hohen [Glutamat]. Dieses Ergebnis deutete an, dass die Glutamatbindung nur bei niedrigem [Glutamat] geschwindigkeitsbestimmend für  $1/\tau_{\text{rise}}$  wird. Die hohe Aktivierungsenthalpie für  $1/\tau_{\text{rise}}$  liefert zum ersten mal einen eindeutigen Hinweis, dass diese vorgeschlagene Konformationsänderung tatsächlich stattfindet. Wenn die  $\text{Na}^+$  oder Glutamatbindung ratenlimitierend für  $1/\tau_{\text{rise}}$  wäre, würde eine wesentlich niedrigere Aktivierungsenergie, wie man sie für diffusionskontrollierte Reaktionen findet, erwartet ( $E_a \sim 20 - 30 \text{ kJ/mol}$ ) (Hille 1992). Der hohe Wert der Aktivierungsenthalpie [ $\Delta H^\ddagger = (115 \pm 7) \text{ kJ/mol}$ ] ist ein Indikator für das Lösen von nicht-kovalenten Bindungen, wie Wasserstoffbrücken, während der Bildung des Übergangszustands. Die Bildung des Übergangszustands dieser Konformationsänderung ist mit einem großen Anstieg der Entropie verbunden ( $205 \pm 24) \text{ J/Kmol}$ ). Die Reaktion zum Übergangszustand ist damit durch den Entropiegewinn begünstigt, was zur Erniedrigung der freien Aktivierungsenergie dieser Reaktion beiträgt. Es kann spekuliert werden, dass dieser Anstieg der Entropie durch die Freisetzung von, an das Protein gebundenen, Wassermolekülen im Übergangszustand erzeugt wird. Diese Erklärung erscheint wahrscheinlicher als eine Entropiezunahme durch Erhöhung der Freiheitsgrade innerhalb des Proteins, denn der Transporter bleibt im nativen Zustand eine geordnete Struktur. Bei einer Konformationsänderung werden keine derart massiven Strukturänderungen auftreten, wie bei einer Denaturierung, worauf auch das Fehlen einer Aktivierungswärmekapazität hindeutet (siehe auch Anhang zur Erklärung der Auswirkung der Wärmekapazität auf Eyring Plots).

*Reentrant loops* sind konservierte Strukturen im Glutamatttransporter, die für die Bindung der Substrate verantwortlich sind und von denen angenommen wird, dass sie sich während der Bindungsreaktion stark bewegen (Larsson, Tzingounis et al. 2004). Die Kristallstruktur des bakteriellen Transporters zeigt, dass der extrazelluläre *reentrant loop 2* in der substratgebundenen Struktur tief im hydrophoben Teil des Proteins gebunden ist (Yernool, Boudker et al. 2004). Die Bewegung dieses *reentrant loops* hin zum Protein, während der Konformationsänderung würde die hydrophobe Oberfläche dieses *loops* dem

wässrigen Medium weniger zugänglich machen, was mit einer Erhöhung der Entropie einhergehen würde. Damit wären die hier vorgestellten Daten im Einklang mit einem von Gouaux und Kollegen angedachten Modell, in dem die Bindung von Glutamat eine Konformationsänderung hervorruft, in der sich *reentrant loop 2* über die Glutamatbindungsstelle schiebt und damit das Substrat okkludiert (Yernool, Boudker et al. 2004).

Die für EAAT3 erhaltenen Aktivierungsparameter können mit Messungen an anderen Membranproteinen verglichen werden. So ist z.B. die Öffnung (*gating*) des CFTR-Ionenkanals mit einer Aktivierungsenthalpie in der gleichen Größenordnung verbunden ( $\Delta H^\ddagger = 89 \text{ kJ/mol} \pm 5 \text{ kJ/mol}$ ) und geht ebenfalls mit einer hohen Entropieänderung einher (Aleksandrov and Riordan 1998). Diese Aktivierungsentropie kompensiert die ungünstige Aktivierungsenthalpie für die Bildung des Übergangszustands. Die Daten für  $1/\tau_{\text{rise}}$  in EAAT3 können in gleicher Weise interpretiert werden, d.h. trotz der hohen Aktivierungsenthalpie war die freie Aktivierungsenthalpie relativ gering, was ein Beispiel für die Enthalpie-Entropie Kompensation ist (Dunitz 1995).

$\tau_{\text{decay}}$  ist die Zeitkonstante, mit der der transiente Anionenstrom in den stationären Zustand abklingt. Der zugrundeliegende mikroskopische Prozess besitzt ebenfalls eine hohe Aktivierungsenthalpie von  $(104 \pm 20) \text{ kJ/mol}$ , was die Vermutung bestätigt, dass es sich dabei um den Glutamattranslokationschritt handeln könnte. Da in diesem Schritt Glutamat über die Membran verschoben wird, ist anzunehmen, dass sich im Sinne des im allgemeinen diskutierten *alternating access* Mechanismus die Zugänglichkeit der Bindungsstelle für Glutamat von der Aussenseite der Membran auf die Innenseite verschiebt, was eine Strukturänderung des Proteins erfordert (Jardetzky 1966; Yernool, Boudker et al. 2004). Die hier gefundene hohe Aktivierungsenthalpie ist ein weiterer Hinweis, dass es sich bei der, die abklingende Phase des Anionenstroms bestimmenden Reaktion, um die mit der Translokation einhergehende Strukturänderung handelt. Die positive Aktivierungsentropie [ $\Delta S^\ddagger = (148 \pm 66) \text{ J/Kmol}$ ] für diesen Prozess spricht für eine Änderung der lösungszugewandten hydrophoben Oberfläche des Proteins, was für einen Translokationsprozess durchaus wahrscheinlich erscheint. Während es auf der intrazellulären Seite nur geringe Veränderungen der der hydrophoben Oberfläche gibt. Wäre dies nicht der Fall, würden sich Wassermoleküle durch den hydrophoben Effekt an unpolare Bereiche an der intrazellulären Seite anlagern. Dieser Effekt ist mit einer Erniedrigung der Entropie verbunden, die den Entropiegewinn für die extrazelluläre

Konformationsänderung kompensieren würde. Da aber ein grosser Entropiegewinn zu messen ist, kann man daraus schliessen, dass die Veränderung der Oberfläche durch die Translokation extrazellulär grösser als intrazellulär ist.

Die hier erhaltenen Aktivierungsparameter können mit Versuchen verglichen werden, bei denen Glutamat durch einen schnellen Lösungswechsel an *outside-out patches* appliziert wurde. In diesen Versuchen ist eine wesentlich schwächere Temperaturabhängigkeit ( $\sim 50\% \approx Q_{10} = 1,8$ ) der Zeitkonstante der abfallenden Phase zwischen 24° C und 36°C gefunden worden (Bergles and Jahr 1998). Die berichteten Werte für die ansteigende Phase sind kaum vergleichbar, da der Lösungswechsel zu langsam für den beobachteten Prozess ist. Die Diskrepanz zwischen diesen Werten und den hier vorgestellten Daten könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Geschwindigkeit des Lösungswechsels teilweise auch die Rate des Abfalls des transienten Anionenstroms limitiert, was zu einer schwächeren apparenten Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante führen würde.

Durch die Auswertung der Kinetik des transienten Anionenstroms kann man nur Aussagen bezüglich der Population von anionenleitenden Zustände im Transportzyklus treffen. Durch die Abwesenheit von permeierenden Anionen, wie  $\text{SCN}^-$ , in den Messlösungen war es möglich transiente, durch schnelle Glutamatapplikation induzierte Transportströme zu messen. Wie in der Literatur beschrieben, setzt sich der Transportstrom aus drei Phasen, die durch die jeweiligen Zeitkonstanten ( $\tau_{\text{rise}}$ ,  $\tau_{\text{fast}}$  und  $\tau_{\text{slow}}$ ) charakterisiert sind, zusammen (Watzke, Bamberg et al. 2001). Watzke *et. al* schlugen vor, daß die ansteigende Phase des Transportstroms ( $\tau_{\text{rise}}$ ) mit der Glutamatbindungsreaktion korreliert. In der Tat hing die Geschwindigkeitskonstante der ansteigenden Phase des Transportstroms, in den hier durchgeführten Experimenten, nur in geringem Maße von der Temperatur ab,  $\Delta H^\ddagger = (39 \pm 23)\text{kJ/mol}$ , was typisch für eine diffusionskontrollierte Reaktion ist (Gutfreund 1995). Das bedeutet, dass keine Konformationsänderung stattfinden muss, um Glutamat zu binden, im Gegensatz zur Bindung des ersten  $\text{Na}^+$  Ions an den leeren Transporter. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass bei den Substraten Glutamat und  $\text{Na}^+$  ein reziprokes Verhältnis von apparenter Affinität und Aktivierungsenthalpie besteht. Den Befund kann man dahingehend interpretieren, dass durch die Bindung von  $\text{Na}^+$  und die folgende Konformationsänderung eine hochaffine Bindungsstelle für Glutamat geschaffen wird.

Die Zeitkonstanten der beiden exponentiellen Komponenten der abfallenden Phase

des Transportstroms sind bei Raumtemperatur identisch mit den beiden Zeitkonstanten, die aus dem vorstationären Anionenstrom bestimmt wurden, d.h.  $\tau_{\text{fast}}$  (Transportstrom) =  $\tau_{\text{rise}}$  (Anionenstrom) und  $\tau_{\text{slow}}$  (Transportstrom) =  $\tau_{\text{decay}}$  (Anionenstrom) (Watzke, Bamberg et al. 2001). Die in dieser Arbeit bei Raumtemperatur gemessenen Zeitkonstanten bestätigten die von Watzke et al. gefundenen Werte.  $\tau_{\text{fast}}$  war stark temperaturabhängig, die Aktivierungsenthalpie ist vergleichbar mit dem Wert von  $\tau_{\text{rise}}$  des Anionenstroms,  $\Delta H_{\text{Transport}}^{\ddagger}$  ( $121 \pm 12$ ) kJ/mol vs.  $\Delta H_{\text{Anion}}^{\ddagger}$  ( $116 \pm 7$ ) kJ/mol. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der Aktivierung des Anionenstroms und der schnell-abklingenden Phase des Transportstroms um identische Prozesse im Transportzyklus handelt (Watzke, Bamberg et al. 2001). Das verdeutlicht auch der Vergleich der Regressionsgeraden der beiden  $\ln(k)-\ln(k_b T/h)-1/T$ -Diagramme, wobei jedoch beachtet werden muss, dass für die Auswertung von  $\tau_{\text{fast}}$  des Transportstroms nur drei Datenpunkte zur Verfügung standen, da bei einer Temperatur von 34 °C die schnell-abklingende Phase des Transportstroms nicht mehr zu beobachten war, d.h. der vorstationäre Transportstrom wurde kinetisch nur noch von der Glutamatbindung und Glutamattranslokation kontrolliert. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die Zeitabhängigkeit des Anionenstroms dieselben individuellen Prozesse im Transportzyklus widerspiegelt, die auch im Transportstrom beobachtet werden. Ausserdem deuten die Resultate an, dass zur Aktivierung des Anionenstroms eine Konformationsänderung des Transporters notwendig ist, während die Glutamatbindung alleine nicht ausreicht, um die Anionenleitfähigkeit zu aktivieren. Aufgrund dieses Verhaltens kann angenommen werden, dass die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit Ähnlichkeit mit Liganden-gesteuerten Prozessen in Ionenkanälen, wie dem CFTR, hat, in denen auch die Ligandenbindung einer Konformationsänderung, die zum offenen Kanal führt, voraussetzt (Aleksandrov and Riordan 1998).

Beim Vergleich der thermodynamischen Parameter von  $\tau_{\text{slow}}$  (Transportstrom) mit  $\tau_{\text{decay}}$  (Anionenstrom) stellt sich die Situation ähnlich dar, wie bei  $\tau_{\text{rise}}$  (Anionenstrom) und  $\tau_{\text{fast}}$  (Transportstrom). Die beobachteten Unterschiede bewegten sich im Rahmen der Messungenauigkeit, so dass angenommen werden kann, dass die Reaktionen, die diese beiden Phasen bestimmen, identisch miteinander sind. Dies deutet an, dass auch hier die Kinetik des Anionenstroms das Durchlaufen von anionenleitfähigen Zuständen im Transportzyklus widerspiegelt, die auch im Transportstrom beobachtet werden. Die hier gemessene Aktivierungsenthalpie der Glutamattranslokationsreaktion von EAAT3



unterschied sich signifikant von Werten, die aus dem Abklingverhalten von Transportsströmen im Hippocampus gemessen wurden (Bergles and Jahr 1998). Die Aktivierungsenergie für  $\tau_{\text{slow}}$  kann unter Vorbehalt aus der Arbeit von Bergles et al. mit 37 kJ/mol abgeschätzt werden ( $\tau_{\text{slow}}$  wurde von diesen Autoren nur bei zwei verschiedenen Temperaturen gemessen). Allerdings ist es schwer möglich die Werte aus dieser Untersuchung zu vergleichen, da das Glutamat aus Synapsen freigesetzt wurde und daher die Kinetik leicht unterschiedliche Prozesse beschreibt. Interessant an dieser Untersuchung ist allerdings die Tatsache, dass die Kinetik der Relokationsreaktion ( $E_a \sim 50$  kJ/mol) wesentlich schwächer temperaturabhängig, als die der Translokationsreaktion war (Bergles and Jahr 1998). Die Relokation des Transporters ist daher anscheinend nicht mit einer großen Konformationsänderung verbunden.

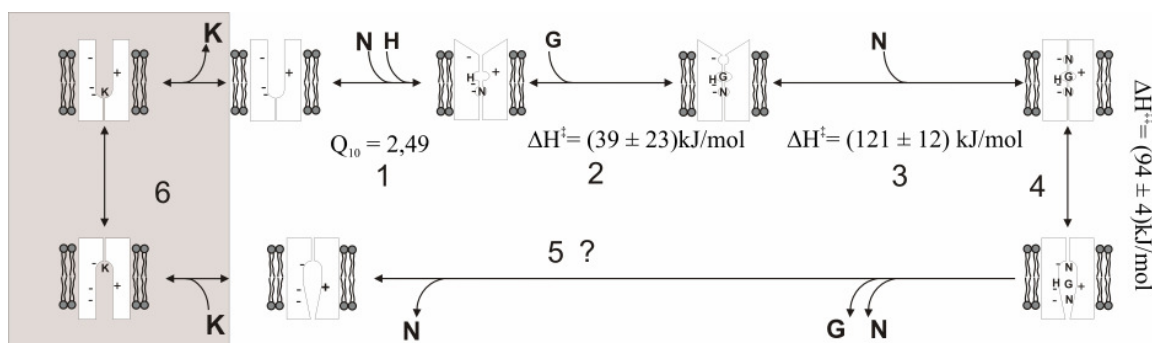


Abb. 23 Transportmodell von EAAT3 aufgrund der gemessenen Aktivierungsenthalpien. N repräsentiert  $\text{Na}^+$ , G Glutamat, H das Proton und K  $\text{K}^+$ . Die Bindungsreaktion des ersten  $\text{Na}^+$  (1) ist mit einer leichten Konformationsänderung verknüpft. Die Glutamatbindung verändert das Protein kaum (2). Während die Bindung des nächsten  $\text{Na}^+$  (3) und die nachfolgende Translokation (4) mit einer hohen Energiebarriere verbunden sind. Der Transportstrom ist mit einem hohen  $Q_{10} = 3,73$  verbunden, der in dieser Größenordnung auch bestätigt wurde. Allerdings ist die Relokation (6) nur mit einem niedrigen  $Q_{10}$  verknüpft. Daher kann man spekulieren, ein anderer Prozess vorhanden ist, der evtl. mit einer Konformationsänderung einhergeht (5).

Durch die temperaturabhängigen Messungen ist es möglich das kinetische Modell von EAAT3 zu erweitern. Ein Modell ist in Abb.23 gezeigt. Zunächst bindet das erste  $\text{Na}^+$  an den Transporter, was eine Konformationsänderung nach sich zieht. Dieser Befund stützt frühere Arbeiten (Grunewald, Menaker et al. 2002; Larsson, Tzingounis et al. 2004). Ein weiteres Indiz sind die Spannungssprungexperimente, mit denen in dieser Arbeit die  $\text{Na}^+$ -Bindungsreaktion untersucht wurde, denn die Relaxationszeit für den Strom ist zu langsam, um nur durch die Diffusion eines Ions zu seiner Bindungsstelle in der Membran erklärt zu

werden ( $\tau = 0,71 \pm 0,09$  von 0 auf -100 mV  $n = 15$ ). Durch die  $\text{Na}^+$ -induzierte Konformationsänderung bildet sich eine hoch-affine Bindungsstelle für Glutamat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bindungsreaktion von Glutamat wahrscheinlich diffusionsgesteuert ist und nur mit einer geringen Aktivierungsenthalpie einhergeht (Abb.20). Danach folgt die Bindung eines weiteren  $\text{Na}^+$  und die Okklusion der Substrate, was mit einer umfassenden strukturellen Reorganisierung des Proteins einhergeht, die zur Aktivierung der vollen Anionenleitfähigkeit führt (Abb.23 3) (Watzke and Grewer 2001). Obwohl die Transport- und Kanalfunktion im Protein örtlich getrennt zu sein scheinen (Ryan, Mitrovic et al. 2004) sind beide Eigenschaften funktionell miteinander gekoppelt. Dies wurde durch den Vergleich der schnellen Zeitkonstante ( $\tau_{\text{fast}}$ ) der abfallenden Phase des Transportstroms und der Zeitkonstanten der ansteigenden Phase ( $\tau_{\text{fast}}$ ) des Anionenstroms gezeigt (Watzke and Grewer 2001). In der hier vorgestellten Arbeit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass diese beiden Phasen identische Prozesse beschreiben. Im Anschluss findet die Translokation der Substrate statt (Abb.23 4). Dieser Prozess beinhaltet eine Konformationsänderung, nach der die Glutamat- und  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle dem Zytosol zugewandt sind. Die stark positive Aktivierungsentropie verleitet zur Spekulation, dass die Oberfläche, die im Übergangszustand dem Zytosol zugewandt ist, kleiner ist, als die Oberfläche, die vor der Konformationsänderung dem Extrazellulärraum zugewandt war. Diese Vermutung wird durch das *alternating access* Modell gestützt (Jardetzky 1966; Yernool, Boudker et al. 2004). Dieses Modell bietet, wenn die Struktur von  $\text{GLT}_{\text{Ph}}$  berücksichtigt wird, auch eine alternative Erklärung über die Ursache der schnellen und langsamen Phase des Transportstroms. Die schnelle Phase könnte die Schliessung der extrazellulären Seite des Transporters repräsentieren, mit der die Aktivierung der Anionenleitfähigkeit einhergeht, während die langsame Phase die Öffnung des Transporters zur intrazellulären Seite darstellt. Von Yernool und Kollegen wurde spekuliert, dass es sich bei dieser Reaktion um die Bewegung des *reentrant loops 1* aus der Membran zur Zellinnenseite der Membran hin handelt, durch die ein wässriger Zugangsweg zur Glutamatbindungsstelle vom Zytosol aus hergestellt würde (Yernool, Boudker et al. 2004). Bei *reentrant loop 1* würde es sich demnach um das intrazelluläre Tor (gate) im *alternating access* Mechanismus handeln. Diese Interpretation ist mit den hier vorgestellten Messungen im Einklang.

Die nachfolgenden Schritte im Reaktionszyklus sind schwerer zu interpretieren. Bergles *et al.* berichten von einer schwachen Temperaturabhängigkeit des

Relokationsschrittes (Abb.23 6), von dem bisher angenommen wurde, dass er geschwindigkeitbestimmend ist (Bergles and Jahr 1998). Diese Tatsache ist schlecht mit der starken Temperaturabhängigkeit des stationären Transportstroms zu vereinbaren, da dieser vom langsamsten Schritt im Zyklus bestimmt wird (Grewer, Watzke et al. 2000; Bergles, Tzingounis et al. 2002). Es gibt zwei Möglichkeiten diese Ergebnis zu erklären, zum einen kann es sein, dass die Resultate aus der Untersuchung von Bergles *et al.* ein Einzelfall sind, denn es gibt 2 andere Veröffentlichungen, in denen Werte von  $\sim 3$  für  $Q_{10}$  für den Transportstrom gefunden wurden (Wadiche and Kavanaugh 1998; Auger and Attwell 2000). In diesem Fall ist es möglich, dass die Relokation des Transporters temperaturabhängig ist und der  $Q_{10}$  dies anzeigt. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass es Zustände gibt, die bisher nicht entdeckt wurden, die mit grösseren Konformationsänderungen einhergehen (Abb.23 5). Welche Möglichkeit zutrifft kann nur durch weitere Experimente überprüft werden.

#### 4.3.3 Physiologische Signifikanz

Bei der glutamatergen, synaptischen Übertragung muss der Neurotransmitter innerhalb des Zeitintervalls von einer synaptischen Aktivierung bis zur nächsten entfernt werden ( $\sim 1$  ms), um die Neuronen nicht in ihrer Funktion zu beeinträchtigen. Es wird angenommen, dass Glutamattransporter in der Hauptsache durch die Pufferwirkung zur Beseitigung des Glutamats beitragen (Lehre and Danbolt 1998; Otis and Jahr 1998). Dies liegt in der Hauptsache daran, dass die Transporter als zu langsam betrachtet werden, um einen signifikanten Beitrag zur Entfernung des Transmitters beizutragen, die Umsatzzeiten der bisher charakterisierten Transporter lauten  $90 \text{ s}^{-1}$  (EAAT3),  $41 \text{ s}^{-1}$  (EAAT2),  $16 \text{ s}^{-1}$  (EAAT1) und  $\sim 3 \text{ s}^{-1}$  (EAAT4) (Bergles and Jahr 1998; Wadiche and Kavanaugh 1998; Grewer, Watzke et al. 2000). Insofern reicht die Zeit bei weitem nicht aus, um einen kompletten Zyklus innerhalb von 1 ms zu durchlaufen. Allerdings sind die meisten funktionellen Charakterisierungen der Transporter bisher bei Raumtemperatur durchgeführt worden. Die Werte für die entsprechenden Grössen konnten durch die RGT-Regel (Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel, auch van't Hoff'sche Regel genannt) abgeschätzt werden. Diese Regel kann man aber nicht ohne Vorbehalt anwenden. Wie man anhand von  $\tau_{\text{fast}}$  aus den Transportstrommessungen sehen kann, ist  $\tau_{\text{fast}}$  bei physiologischen

Temperaturen nicht mehr von  $\tau_{\text{rise}}$  unterscheidbar, so dass der Anstieg des Stromes durch die (temperaturunabhängige) Zeitkonstante  $\tau_{\text{rise}}$  bestimmt wurde. Das bedeutet, dass unter physiologischen Temperaturen und bei 0 mV die Translokation nur noch von der Glutamatbindung und  $\tau_{\text{slow}}$  abhängig ist. Weiterhin ist die hohe Geschwindigkeit der Translokationsreaktion bei physiologischen Temperaturen bemerkenswert. Darum kann die Frage gestellt werden, ob Glutamattransporter nicht im Stande sind, einen signifikanten Teil des Glutamats durch Translokation von Glutamat zu entfernen. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Zeitkonstante für die Translokation unter physiologischen Temperaturen beträgt  $\sim 2$  ms. Allerdings sind alle Versuche bei 0 mV durchgeführt worden, unter physiologischen Membranspannungen (-80 mV) ist die Translokation bei Raumtemperatur ungefähr um den Faktor 3 schneller (Watzke, Bamberg et al. 2001). Deshalb kann extrapoliert werden, dass die Translokation unter physiologischen Bedingungen schneller als 1 ms ist, was Glutamattransporter zu einem wichtigen Faktor in der Beseitigung des extrazellulären Glutamats nach der präsynaptischen Ausschüttung, nicht nur durch die Glutamatpufferung, macht.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die neuronalen Glutamattransporter EAAT4 (Excitatory Amino Acid Transporter) und EAAT3 in einem HEK (Human Embryonic Kidney) Zellsystem untersucht, in dem die Transporter transient exprimiert wurden. Das Protein wurde aus dem Rattenhirn (EAAT3) und Rattenretina (EAAT4) kloniert. Diese Proteine katalysieren den Transport von Glutamat aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol. Die Energie dieses Transport, entgegen des Konzentrationsgradienten, stammt aus dem Kotransport von Natriumionen und Protonen und dem Gegentransport von Kaliumionen. Für EAAT3 ist bekannt, dass das Verhältnis  $3 \text{ Na}^+ : 1 \text{ H}^+ : 1 \text{ Glutamat} : 1 \text{ K}^+$  beträgt, dadurch werden 2 positive Ladungen pro Transportzyklus verschoben. Das führt zu einem messbaren positiven Einwärtststrom. Dieser Strom ist wesentlich schwächer in EAAT4, zudem ist die Stöchiometrie unbekannt. Zusätzlich besitzen beide Proteine eine Anionenkanaleigenschaft, die bei der Bindung von  $\text{Na}^+$  und der Bindung von Glutamat voll aktiviert wird. Diese Eigenschaft ist bei EAAT4 besonders ausgeprägt. Die Transporter

wurden in Abhängigkeit von verschiedenen intra- und extrazellulären Ionen- und Substratkompositionen, sowie bestimmter Haltepotentialen charakterisiert. Ausserdem ist bei der Untersuchung die extrazelluläre Temperatur durch eine für diesen Zweck entworfene Apparatur variiert worden.

Die Charakterisierung der stationären Eigenschaften des wenig bekannten Transporters EAAT4 brachten Erkenntnisse zu Tage, die 1) Klarheit über die apparente Affinitäten der Substrate bringen, insbesondere Glutamat und  $\text{Na}^+$  2) neu in Bezug auf die Spannungsabhängigkeit der apparenten Affinität von Glutamat sind. Die Untersuchung der vorstationären Ableitungen waren fruchtbar in Bezug auf a) die Ähnlichkeit des Transports, der durch EAAT4 katalysiert wird, zu anderen Glutamattransportern b) spezifische Parameter des Transports, wie den Unterschied in der Transportgeschwindigkeit c) die neuartige Kinetik der Anionenleitfähigkeit. Aus den Daten ergibt sich folgendes Bild über den Mechanismus des Transports. Die Substrate binden an EAAT4, im Vergleich zu den anderen Transportern, mit wesentlich höheren  $K_M$  [ $(0,6 \pm 0,1)\mu\text{M}$  für Glutamat und  $(42,3 \pm 5,2)\text{mM}$  für  $\text{Na}^+$ ]. Die Bindung von Glutamat, die schnell verläuft, ist, wie bei EAAT3, stark  $\text{Na}^+$  abhängig, genau wie die Leckleitfähigkeit, die ebenfalls durch  $\text{Na}^+$  aktiviert wird. Die folgenden glutamatabhängigen, vorstationären Reaktionen, inklusive der Translokation der Substrate verläuft wesentlich langsamer, als in anderen Transportersubtypen. Die Folge ist eine langsame Umsatzrate ( $<3 \text{ s}^{-1}$ ) und daher ein geringer Transportstrom [ $(-3,6 \pm 2,8)\text{pA}$ ]. Allerdings kann aufgrund der apparenten Affinität bei verschiedenen externen  $[\text{Na}^+]$  darauf geschlossen werden, dass mindestens 2, wahrscheinlich aber 3  $\text{Na}^+$  pro Zyklus transportiert werden. Insofern teilt EAAT4 denselben prinzipiellen Mechanismus. Das Verhalten der Anionenleitfähigkeit zeigt allerdings erhebliche Unterschiede zu anderen Subtypen, da die Anionenleitfähigkeit durch negative Membranpotentiale inhibiert wird. Dies wird durch die Inhibierung der  $\text{K}^+$ -Relokationsreaktion des Transporters erklärt. Zusammengenommen spricht die geringe Umsatzrate und die hohe apparente Affinität für Glutamat dafür, dass EAAT4 ein hochspezialisierter Transporter für die schnelle Pufferung von Glutamat und den langfristigen Transport von Glutamat bei niedrigen Konzentrationen ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Temperaturabhängigkeit des Glutamattransports durch EAAT3 untersucht. Die Temperaturabhängigkeit des Glutamattransports unter stationären Bedingungen zeigte interessante neue Ergebnisse. Die Ergebnisse lassen Aussagen zu bezüglich 1) der Thermodynamik der Bindung der Substrate

und 2) der molekularen Natur bestimmter Teilreaktionen im Zyklus Die Bindung eines nicht-transportierbaren Glutamat analogons zeigt, dass die Inhibitorbindung exotherm ist ( $\Delta H^0 = 30,0 \pm 3,3$ )kJ/mol. Die Bindung von  $\text{Na}^+$  an den unbeladenen Transporter ist im Gegensatz dazu nicht signifikant von der Temperatur abhängig mit  $\Delta H^0 = (20,8 \pm 21,5)$ kJ/mol. Es ist ebenfalls interessant, dass die Freie Enthalpie des Gesamtzyklus bei EAAT4 signifikant grösser ist als bei EAAT3, was in Übereinstimmung mit der höheren, apparenten Glutamataffinität ist [ $\Delta G_{\text{EAAT4}} = (35 \pm 1)$ kJ/mol vs.  $\Delta G_{\text{EAAT3}} = (30 \pm 1)$ kJ/mol]. Die Temperaturabhängigkeit der vorstationären Kinetik von EAAT3 enthüllt gleichfalls neue Ergebnisse. Zum einen ist die Bindung des  $\text{Na}^+$  Ions an den unbeladenen Transporter mit einer Konformationsänderung begleitet. Im Gegensatz dazu hat die Reaktion, die der Glutamatbindung zugeordnet wurde, nur eine moderate Aktivierungsenthalpie [ $\Delta H^\ddagger = (39 \pm 23)$ kJ/mol], wie für eine diffusionskontrollierte Reaktion erwartet wird. Die nachfolgenden zwei langsameren Phasen des Transportstroms, die in der Literatur der Aktivierung der Anionenleitfähigkeit und der Glutamattranslokation zugeordnet wurden, sind mit hohen Aktivierungsenthalpien verbunden [ $\Delta H^\ddagger = (121 \pm 12)$ kJ/mol bzw.  $(94 \pm 4)$ kJ/mol]. Dies bedeutet zum einen, dass zur Öffnung des Anionenkanals und der Translokation von Glutamat eine grössere Umstrukturierung des Transporters notwendig ist. Ausserdem konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die zwei Phasen, die in vorstationären Anionenstrommessungen beobachtet wurden, wahrscheinlich dieselben Teilreaktionen im Transportzyklus widerspiegeln, die die beiden abfallenden Phasen im Transportstrom erzeugen. Durch die hier gefundenen, neuen Daten für die Translokationsgeschwindigkeit bei physiologischen Temperaturen kann die Hypothese in Frage gestellt werden, die besagt, dass Glutamattransporter nicht schnell genug seien, um zur schnellen Entfernung des Glutamats nach der synaptischen Transmission beizutragen. Es scheint vielmehr so, dass bei physiologischen Temperaturen und Membranpotentialen, die Translokation von Glutamat hinreichend schnell verläuft.

## 6. Anhang

### 6.1. Modellierung und Gleichung für die Kinetik von EAAT4

In dieser Arbeit wurde ein vereinfachtes, sequentielles 6-stufiges Transportmodell verwendet um die experimentelle Befunde zu erklären. Dieses Modell enthält: **(I)** eine reversible Glutamatbindungsreaktion an die extrazelluläre Seite des Transporter, die durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{+1}$  und  $k_{-1}$  beschrieben wird. Es wird angenommen, dass die Bindung und Dissoziation von Glutamat von vorangehenden und nachfolgende  $\text{Na}^+$ -Bindungsreaktionen moduliert wird. Diese Reaktionen befinden sich vermutlich in einem schnellen vorgelagertem Gleichgewicht, verglichen mit der Glutamatbindung. Daher reduziert sich die Gesamtreaktion von T nach  $\overline{\text{N}_2\text{TG}}$  zu einem Prozess mit scheinbar nur einem Reaktionsschritt. **(II)** Eine reversible Glutamattranslokationsreaktion (Geschwindigkeitskonstanten  $k_t$  und  $k_{-t}$ ). Die Glutamattranslokation wird für die Simulation des Homoexchangemodus als reversibel angesehen. In diesem Modus sind hohe Konzentrationen von Glutamat und  $\text{Na}^+$  intrazellulär appliziert worden, um die intrazellulären Bindungsstellen zu sättigen. Folglich wird Glutamat und  $\text{Na}^+$  daran gehindert in das Zytoplasma zu diffundieren, wodurch der Transporter zwischen den Zuständen  $\overline{\text{N}_2\text{TG}}$  und  $\overline{\text{N}_2\text{T}'\text{G}}$  gefangen bleibt (grau unterlegte Fläche im Schema 1). Das verwendete Modell enthält im Einwärtstransportmodus zwei quasi irreversible Schritte: **(III)**  $k_2$  ist einer Reaktion zugeordnet worden, die mit jeder der beiden Reaktionen verbunden sein könnte, die zur intrazellulären Dissoziation von  $\text{Na}^+$  und Glutamat führt (vgl. Schema 1). Dieser Schritt wird als quasi irreversibel angesehen, da der Wert der  $[\text{Na}^+]$  und  $[\text{Glutamat}]$  unter Bedingungen, die den Einwärtstransport begünstigen, quasi 0 beträgt. Daher ist die Assoziation von  $\text{Na}^+$  und Glutamat nach der Dissoziation praktisch unterbunden. **(IV)** Die  $\text{K}^+$  getriebene Relokation ist durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_r$  repräsentiert, diese Reaktion stellt den eigentlichen Relokationsprozess, die intrazelluläre Assoziation von  $\text{K}^+$  oder die extrazelluläre Dissoziation von  $\text{K}^+$  dar. Dieser Schritt kann ebenfalls als quasi reversibel betrachtet werden, da die extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration bei 0 liegt und darum die Reassoziations des abgegebenen  $\text{K}^+$  verhindert und EAAT4 in den Zustand T zwingt (Schema 1). Obwohl die Glutamatbindung in Schritt 1 als elektroneutral angesehen wird ist dieser Schritt mit einer apparenten Valenz von + 0,8 verbunden, was auf

die vorangehenden schnellen  $\text{Na}^+$ -Bindungsschritte zurückzuführen ist, auf die die Glutamatbindung folgt. Von den Schritten 4,5 und 6 wird angenommen, dass sie elektrogen sind, mit einer apparenten Valenz von  $z_Q$  von +0,7 und +1,5, bzw. -1,0 (siehe Schema 1). Diese apparenten Valenzen wurden so gewählt, dass Gesamtladungsverschiebung +2,0 beträgt, in Übereinstimmung mit der experimentellen Stöchiometrie für EAAT2 und EAAT3 von  $3 \text{Na}^+ : 1\text{H}^+ : 1\text{Glu}^-$  und einem kotransportiertem  $\text{K}^+$ . Anhand unserer Daten konnte kein Unterschied in der Stöchiometrie von EAAT4 zu den Daten aus den EAAT2 und 3 festgestellt werden. Die Werte der obigen apparenten Valenzen ergeben sich aus den Simulationen, die die experimentellen Daten am besten abbilden (Abb. 22). Wenn  $z_Q$  für  $k_t$  stark von -1 abgewichen ist, wurden starke Abweichungen der simulierten Strom-Spannungskennlinie des Anionen- und Transportstroms im Einwärtstransportmodus festgestellt. Am schwächsten ist die apparente Valenz (+1,5) für den Schritt 3 definiert, da eine Veränderung des Wertes von +0,5 bis +2 keine wesentlichen Unterschiede in der Simulation nach sich gezogen hat. Dieser Befund kann erwartet werden, da  $k_{-2}$  die schnellste Reaktion darstellt und daher weder für die stationären noch für eine der betrachteten vorstationären Phasen geschwindigkeitsbestimmend ist.

Der Zustand auf den sich das Hauptaugenmerk gerichtet hat, ist der Zustand mit der maximalen Anionenleitfähigkeit,  $\overline{N_2TG}$ . Daneben gibt es noch einen anionenleitfähigen Zustand,  $\overline{N_2T'G}$ , dessen  $\text{Na}^+$  und Glutamatbindungsstellen nach innen gerichtet sind, dem aber nur 30% der maximalen Leitfähigkeit zugeschrieben wurden. Die Grundlage dieser Annahme bildet die Spannungsabhängigkeit des stationären Anionenstroms, der im Homoexchangemodus gemessen wurde. Wenn  $\overline{N_2T'G}$  überhaupt nicht anionenleitfähig wäre, würde die Strom-Spannungsbeziehung ein Maximum besitzen und der Strom würde bei hyperpolarisierenden Potentialen abnehmen, da der Transporter unter diesen Bedingungen im  $\overline{N_2T'G}$  Zustand akkumulieren würde. Im anderen Fall, dass  $\overline{N_2T'G}$  dieselbe Leitfähigkeit wie  $\overline{N_2TG}$  besitzen würde, sollte der Anionenstrom exponentiell mit dem stärker hyperpolarisierendem Strom ansteigen. Der experimentell bestimmte Strom befindet sich zwischen diesen beiden Extrema. Der Wert 30% wurde gewählt, weil er die Daten der Strom-Spannungsbeziehung am besten beschreibt. Der gemessene Anionenstrom ist proportional zur Summe aus ( $\overline{N_2TG}$  und  $\overline{N_2T'G}$ ), dem Anionnstrom, der von einem Transporter getragen wird und der Gesamtzahl ( $N$ ) der untersuchten Transporter.



Wenn die Glutamatbindung unter geringen Glutamatkonzentrationen geschwindigkeitsbestimmend wird, kann die apparente Geschwindigkeitskonstante ( $1/\tau_{app}$ ) der Bildung von  $\overline{N_2TG}$  und daher der Anstieg des Stroms kann wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{1}{\tau_{app}} = k_{+1,app}[\text{Glu}] + k_{-1,app} \quad (1)$$

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung,  $k_{+1}$ , und Dissoziation,  $k_{-1}$ , sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten, die in der folgenden Gleichung verwendet wurden. Diese Konstanten sind durch die vorgelagerten und nachfolgenden Ionenbindungsgleichgewichte bestimmt (siehe Schema 1).

$$k_{+1,app} = k_{+1} \frac{[\text{Na}^+]}{[\text{Na}^+] + K_{\text{Na}+1}} \quad (2)$$

$$k_{-1,app} = k_{-1} \frac{K_{\text{Na}+2}}{[\text{Na}^+] + K_{\text{Na}+2}} \quad (3)$$

$K_{\text{Na}+1}$  and  $K_{\text{Na}+2}$  repräsentieren die Dissoziationskonstanten von  $\text{Na}^+$  aus seiner Bindungsstelle des glutamatfreien, bzw. glutamatbeladenen Transporter. Zur Vereinfachung wird die Bindung des dritten Natriumions vernachlässigt, da man durch die Daten nicht unterscheiden kann, ob dieses  $\text{Na}^+$  vor oder nach Glutamat bindet. Sofern [Glutamat] geschwindigkeitsbestimmend wird, kann der Spannungsanstieg, der proportional zu  $\overline{[N_2TG]}$  ist, durch eine einfache Exponentialfunktion ausgedrückt werden:

$$\overline{[N_2TG]}(t) \approx 1 - \exp(-(k_{+1,app}[\text{Glu}^-] + k_{+1,app} + k_{ss}) \cdot t) \quad (4)$$

, wobei  $k_{ss}$  die stationäre Umsatzrate bei sättigenden Glutamatkonzentrationen darstellt.

Die stationäre  $\overline{N_2TG}$  Konzentration im Einwärtstransportmodus (d.h. die Transporttranslokation kann als irreversibel angesehen werden) kann bei höheren

Glutamatkonzentrationen, bei denen die Bindung in einem schnellen Vorgleichgewicht, im Vergleich zu anderen Reaktionen ist, wie folgt beschrieben werden:

$$\overline{[N_2TG]}_{ss} = \frac{[Glu^-]}{[Glu^-] + K_m} \frac{k_t k_{-2}}{k_t k_{-2} + k_{-2} k_r + k_t k_r} \quad (5)$$

mit

$$K_m = K_{d,app} \frac{k_{-2} k_r}{k_t k_{-2} + k_{-2} k_r + k_t k_r} \quad (5A)$$

$$K_{d,app} = K_d \frac{K_{Na+1} + [Na^+]}{[Na^+]} \frac{K_{Na+2}}{K_{Na+2} + [Na^+]} \quad (5B)$$

In dieser Gleichung ist  $K_{d,app}$  die apparente Gleichgewichtskonstante für die Glutamatbindung, die sowohl von den vorangegangenen und nachfolgenden  $Na^+$  Bindungsreaktionen (die durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_{Na+1}$  und  $K_{Na+1}$  definiert werden) als auch von  $K_d$ , der intrinsische Dissoziationskonstante für Glutamat, beeinflusst wird. Gleichung 5 wurde verwendet um die Abhängigkeit des  $K_M$  von der externen  $Na^+$ -Konzentration und des Transmembranpotential zu modellieren. Zur Vereinfachung wurden nur 2 der 3  $Na^+$  betrachtet, die mit Glutamat kotransportiert werden.

Die apparente Geschwindigkeitskonstante für den absteigenden, vorstationären Strom kann bei hohen Glutamatkonzentrationen, bei denen ein schnelles Bindungsgleichgewicht angenommen werden kann, kann wie folgt beschrieben werden:

$$1/\tau = k_r + k_t \frac{[Glu^-]}{[Glu^-] + K_m} \quad (6)$$

Für die Simulation der Zeitabhängigkeit des Anionenstroms bei sättigenden Glutamatkonzentrationen wurden die Geschwindigkeitsgleichungen aus Schema 1 numerisch integriert, um den Unterschied der Konzentration von  $\overline{N_2TG}$  als Funktion der Zeit zu bestimmen.

Die Spannungsabhängigkeit des Stroms wurde rechnerisch durch die Einführung der Spannungsabhängigkeit von

(a) der Geschwindigkeitskonstanten  $k_t$  und  $k_{-2}$  erreicht

$$k_t(V_m) = k_t(0) \exp\left(\frac{-z_Q F V_m}{2RT}\right) \quad (7)$$

$$k_{-2}(V_m) = k_{-2}(0) \exp\left(\frac{-z_Q F V_m}{2RT}\right) \quad (8)$$

$$k_r(V_m) = k_r(0) \exp\left(\frac{-z_Q F V_m}{2RT}\right) \quad (9)$$

und

(b) des Einheitsstroms, der durch die Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung beschrieben wird:

$$I_{SCN} = \frac{P_{SCN} F^2 V_m}{RT} \frac{([SCN^-]_i - [SCN^-]_o \exp(-V_m F / RT))}{1 - \exp(-V_m F / RT)} \quad (10)$$

F ist die Faradaykonstante, T die Temperatur, R die Gaskonstante und  $P_{SCN}$  die Einzelkanaldurchlässigkeit für  $SCN^-$ . Die Umsatzgeschwindigkeit des Transporters wird aus der simultanen Messung der vorstationären Ladungsbewegung,  $Q_{ps}$ , und dem stationären Strom, derselben Zelle abgeschätzt. Es gilt:

$$k_{ss} = \frac{I_{ss}}{e z_{ss} N} = \frac{I_{ss} z_{ps}}{Q_{ps} z_{ss}} \quad (11)$$

Im Einklang mit der Stöchiometrie anderer Transportersubtypen wird  $z_{ss}$  auf +2 gesetzt. Die apparente Valenz der vorstationären Ladungsverschiebung,  $z_{ps}$  erhält man aus der Spannungsabhängigkeit der Ladungsbewegung, was im folgenden Absatz näher erläutert

wird.

Nimmt man an, dass die Glutamatbindung an EAAT4 zu einer schnellen Bindung von  $\text{Na}^+$  an den Transporter führt, wie man in Schema 1 gezeigt ist. Folgt daraus:

$$Q_{\text{fast}}(V, [\text{Na}^+]) = \frac{Q_{\text{max}} [\text{Na}^+]}{[\text{Na}^+] + K_{\text{Na}+2}(V_m)} \quad (12)$$

In dieser Gleichung ist  $Q_{\text{max}}$  ein Skalierungsfaktor, der den Wert der maximalen Ladungsverschiebung repräsentiert, was die Anzahl der beobachteten Transporter, die Elementarladung und die apparente Valenz,  $z_Q$  der Ladung beinhaltet. In Bezug auf die Spannungsabhängigkeit, ähnelt Gleichung 12 einer Verteilung, die einer Boltzmannverteilung. Das Mittelpunktspotential ist  $[\text{Na}^+]$ -abhängig und kann durch:

$$V_Q = \frac{RT}{z_Q F} \ln\left(\frac{[\text{Na}^+]}{K_{\text{Na}+2}(0)}\right) \quad (13)$$

berechnet werden.

Die Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung kann durch die Spannungsabhängigkeit von  $K_{\text{Na}+2}(V_m)$  mit der folgenden Gleichung in (13) eingeführt werden.

$$K_{\text{Na}+2}(V_m) = K_{\text{Na}+2}(0) \exp\left(\frac{z_Q F V_m}{RT}\right) \quad (14)$$

## 6.2. Berechnung der Temperaturabhängigkeit der Transportparameter

### 6.2.1. Berechnung der thermodynamischen Zustandsgrößen

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet worden, um die apparente Affinität zu einem Substrat unter stationären Bedingungen zu bestimmen. Dazu ist vereinfachend angenommen worden, daß die Generierung des Stroms entsprechend des Michaelis-Menten-Modells folgt, d.h. die bimolekulare Bindungsreaktion des Substrats an das Protein und der darauf folgende elektrogene Transport des Substrats. Unter dieser Annahme besitzt die Michaelis-Menten-Konstante die Form einer apparenten Dissoziationskonstante. Der Kehrwert von  $K_M$  stellt daher die apparente Assoziationskonstante dar. Die Annahme, dass man die Bindungsreaktion des Glutamats unter sättigenden Glutamatkonzentrationen, aus den Daten des Gesamtzyklus verwenden kann ist nur bedingt zutreffend. Daher sind auch die  $K_M$  von Teilprozessen des Transportzyklus untersucht worden, zum einen die Bindung des ersten  $\text{Na}^+$  an den Transporter und zum anderen die Bindung des nicht-transportierbaren Inhibitor TBOA. Den Zusammenhang zwischen der absoluten Temperatur und der Assoziationskonstante bei konstantem Druck wird durch die van't Hoff'sche Gleichung beschrieben:

$$d \ln K = \frac{\Delta H}{RT^2} dT \quad (15)$$

Sofern die Enthalpie unabhängig von der Temperatur ist, lässt sich die Gleichung einfach integrieren und man erhält:

$$\ln K = \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} \quad (16)$$

Die Auftragung von  $\frac{1}{T}$  gegen  $\ln K$  ergibt eine Gerade, dessen Steigung die Enthalpie enthält. Für den Fall, dass diese Auftragung nicht linear verläuft, bedeutet das, dass die

Reaktionsenthalpie temperaturabhängig ist. Die Reaktion geht daher mit einer Änderung der Wärmekapazität einher, die dann zur Berechnung der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante einbezogen werden muss:

$$\ln K = \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \int \Delta C_p dT \quad (17)$$

Die Gleichgewichtskonstante bei einer bestimmten Temperatur gibt Aufschluss über die freie Enthalpie der Reaktion, es gilt:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (18)$$

Durch die Kenntnis der Enthalpie ( $\Delta H$ ) aus der van't Hoff'schen Reaktionsisobaren und der freien Enthalpie ( $\Delta G$ ) kann man die Entropie ( $\Delta S$ ) der Bindungsreaktion durch:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (19)$$

berechnen, wobei  $T$  die absolute Temperatur in K darstellt.

### 6.2.2. Berechnung der kinetischen Parameter

Die Temperaturabhängigkeit einer enzymatischen Reaktion kann durch das Verhältnis der Produktmenge bei verschiedenen Temperaturen ( $T_1$  bzw.  $T_2$ ) ausgedrückt werden. In unserem Fall ist das Produkt des Transporter der geflossene Strom. Der  $Q_{10}$  ist ein Maß für die Temperaturabhängigkeit und wird wie folgt berechnet:

$$Q_{10} = \left( \frac{T_1}{T_2} \right)^{\left( \frac{10}{T_1 - T_2} \right)} \quad (20)$$

Mithilfe der Arrhenius-Gleichung kann man den Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Geschwindigkeitskonstanten nach folgender Formel beschrieben:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (21)$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k = 1/\tau$ ,  $E_a$  ist die empirische Aktivierungsenergie,  $\ln A$  ist der präexponentielle Faktor,  $R$  die Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur in K. Trägt man  $\ln k$  gegen  $\frac{1}{T}$  auf erhält man eine Gerade, wenn die Aktivierungsenergie im gewählten Temperaturintervall konstant ist. Die Eyring'sche Theorie des aktivierten Komplexes ist eine quantenmechanische Theorie die den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstante  $k$  und den thermodynamischen Zustandsgrößen,  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  des Übergangszustands herstellt. Der wie folgt ausgedrückt werden kann.

$$\ln(k) = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) \cdot \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \frac{-\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (22)$$

$k_B$  stellt die Boltzmann-Konstante dar,  $h$  ist das Planck'sche Wirkungsquantum und  $T$  die absolute Temperatur in K.

Mithilfe dieser Gleichung erhält man eine modifizierte Arrhenius Gleichung folgender Form erstellen:

$$\ln(k) - \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \frac{-\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (23)$$

Aus der man die Aktivierungsentropie direkt durch den Achsenabschnitt bestimmen kann und die Aktivierungsenthalpie ergibt sich analog der Arrheniusgleichung aus dem Achsenabschnitt. Der Vorteil dieser Auftragung ergibt sich aus der Einfachheit und der Unabhängigkeit des Achsenabschnitts von der Temperatur, denn im Fall der Arrheniusgleichung ist  $\ln A$  temperaturabhängig.

### 6.3. Fehlerrechnung

An mehreren Stellen in dieser Arbeit wurde ein Wert angegeben, der aus anderen fehlerbehafteten Messwerten berechnet wurde. Für die Berechnung des Fehlers wurden die Regeln der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung verwendet. Gleichung (25) ist eine allgemeine Form:

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{\partial f(x, y, \dots, n)}{\partial x}\right)^2 \Delta x^2 + \left(\frac{\partial f(x, y, \dots, n)}{\partial y}\right)^2 \Delta y^2 + \dots + \left(\frac{\partial f(x, y, \dots, n)}{\partial n}\right)^2 \Delta n^2} \quad (25)$$

$\sigma$  stellt die Standardabweichung dar,  $\Delta x$  den absoluten Fehler der Grösse  $x$  und  $\frac{\partial f(x, y, \dots, n)}{\partial x}$  ist die partielle Ableitung der Berechnungsfunktion nach  $x$ .

### 6.4. Lebenslauf

Name: Carsten Mim  
Geburtsdatum und ~ort: 17. November 1976 in Giessen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Adresse (z.Z): 1350 Pennsylvania Ave # 201, Miami Beach, Fl 33139

#### **Ausbildung**

1997 Abitur, Landgraf-Ludwig-Schule, Giessen  
1997-2002 Studium der Biochemie, Johann Wolfgang Goethe Universität,  
Frankfurt/Main  
1999 Vordiplom in Biochemie  
2002 Diplom in Biochemie  
2001-2004 Studium der Psychologie, Johann Wolfgang Goethe Universität,  
Frankfurt/Main  
2004 Vordiplom in Psychologie



## Wissenschaftliche Tätigkeit

2002-heute	Doktorand, Max Planck Institut für Biophysik, Frankfurt/Main
seit 2004	Forschungsaufenthalt an der Universität von Miami
1999-2001	wissenschaftliche Hilfskraft, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt/Main Institut für biophysikalische Chemie Am Arbeitskreis von Prof. Dr. H. Rüterjans Ph.D.

## 6.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre. Der Umstand wie die Arbeit zustande gekommen ist und die Hürden, die sie genommen hat, machte eine optimale Unterstützung unverzichtbar.

Ich möchte zunächst bei Dr. E. Bamberg danken, der mich fachlich und persönlich unterstützt hat. Ohne diese transkontinentale Zusammenarbeit wäre der Aufenthalt in den USA in dieser Form nicht möglich geworden. C. Grewer ist in gleichem Maße zu danken, da er immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mich ermutigt hat, wenn es nötig war. Zudem hat er und seine Frau mir das Einleben in eine neue Umgebung erleichtert. Nicht zu vergessen Heidi Bergemann, der gute Geist, die leider meine Gedanken öfter sortieren musste.

Ich bin glücklich, dass mich eine große Zahl von Leuten privat begleitet haben. Dazu zählen meine Eltern und meine Brüder, jeder auf seine Weise. Meine Freunde vor allem Matthias und Sascha Ried. Mit denen ich das Vergnügen hatte 6 Jahre zusammen zu wohnen, inklusive ihrer großzügigen Lebensmittelspenden und der Vielzahl der großartigen Momente, während des Studiums und der Doktorarbeit. Den gleichen Stellenwert hat für mich meine Freundin Abiola Shitta-Bey, durch die selbstlose Unterstützung und die gemeinsam verbrachte Zeit, die mir in stürmischen Zeiten die nötige Ruhe gegeben hat. Auch weil sie mir ein Stück der Heimat zurück gegeben hat, die ich verloren hatte.

Zuletzt bedanke ich mich bei allen, die mir auf meinem langen Weg begegnet sind und mir unter die Arme gegriffen haben bzw. mich neue Wege gehen liessen, wie die Mitglieder der Band in der spielen durfte: Litzrudi Justinvil, Juan Cabrera.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aleksandrov, A. A. and J. R. Riordan (1998). "Regulation of CFTR ion channel gating by MgATP." FEBS Lett **431**(1): 97-101.
- Alfredsson, G., F. A. Wiesel, et al. (1988). "Glutamate and glutamine in cerebrospinal fluid and serum from healthy volunteers--analytical aspects." J Chromatogr **424**(2): 378-84.
- Anwyl, R. (2006). "Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression." Prog Neurobiol **78**(1): 17-37.
- Arriza, J. L., S. Eliasof, et al. (1997). "Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4155-60.
- Arriza, J. L., W. A. Fairman, et al. (1994). "Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex." J Neurosci **14**(9): 5559-69.
- Atkins, P. (1996). Physikalische Chemie. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Attwell, D. (2000). "Brain uptake of glutamate: food for thought." Journal of Nutrition **130**: 1023S-1025S.
- Auger, C. and D. Attwell (2000). "Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters." Neuron **28**(2): 547-58.
- Ayala, Y. M., A. Vindigni, et al. (1995). "Thermodynamic investigation of hirudin binding to the slow and fast forms of thrombin: evidence for folding transitions in the inhibitor and protease coupled to binding." J Mol Biol **253**(5): 787-98.
- Bamberg, E. and P. Lauger (1974). "Temperature-dependent properties of gramicidin A channels." Biochim Biophys Acta **367**(2): 127-33.
- Barbour, B. and M. Hausser (1997). "Intersynaptic diffusion of neurotransmitter." Trends Neurosci **20**(9): 377-84.
- Bendahan, A., A. Armon, et al. (2000). "Arginine 447 plays a pivotal role in substrate interactions in a neuronal glutamate transporter." J Biol Chem **275**(48): 37436-42.
- Berger, U. V. and M. A. Hediger (1998). "Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization." Anat Embryol (Berl) **198**(1): 13-30.
- Bergles, D. E., J. A. Dzubay, et al. (1997). "Glutamate transporter currents in bergmann

- glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14821-5.
- Bergles, D. E. and C. E. Jahr (1998). "Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus." J Neurosci **18**(19): 7709-16.
- Bergles, D. E., A. V. Tzingounis, et al. (2002). "Comparison of Coupled and Uncoupled Currents during Glutamate Uptake by GLT-1 Transporters." J. Neurosci. **22**(23): 10153-10162.
- Bicho, A. and C. Grewer (2005). "Rapid substrate-induced charge movements of the GABA transporter GAT1." Biophys J **89**(1): 211-31.
- Billups, B., D. Rossi, et al. (1996). "Anion conductance behavior of the glutamate uptake carrier in salamander retinal glial cells." J Neurosci **16**(21): 6722-31.
- Brew, H. and D. Attwell (1987). "Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells." Nature **327**(6124): 707-9.
- Canepari, M., L. Nelson, et al. (2001). "Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindoliny- and 4-methoxy-7-nitroindoliny-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters." Journal of Neuroscience Methods **112**(1): 29-42.
- Chen, C. J., S. L. Liao, et al. (2000). "Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes." J Neurochem **75**(4): 1557-65.
- Clements, J. D., R. A. Lester, et al. (1992). "The time course of glutamate in the synaptic cleft." Science **258**(5087): 1498-501.
- Conti, F., S. DeBiasi, et al. (1998). "EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex." Cereb Cortex **8**(2): 108-16.
- Conti, F., A. Minelli, et al. (1997). "Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex." Mol Neurobiol **14**(1-2): 1-18.
- Corrie, J. E., A. DeSantis, et al. (1993). "Postsynaptic activation at the squid giant synapse by photolytic release of L-glutamate from a 'caged' L-glutamate." J Physiol **465**: 1-8.
- Dehnes, Y., F. A. Chaudhry, et al. (1998). "The Glutamate Transporter EAAT4 in Rat Cerebellar Purkinje Cells: A Glutamate-Gated Chloride Channel Concentrated near the Synapse in Parts of the Dendritic Membrane Facing Astroglia." J. Neurosci. **18**(10): 3606-3619.
- Deitmer, J. W., A. Broer, et al. (2003). "Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways." J Neurochem **87**(1): 127-35.
- Demarque, M., N. Villeneuve, et al. (2004). "Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex." J Neurosci **24**(13): 3289-94.

- Diamond, J. S. and C. E. Jahr (1997). "Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale." J Neurosci **17**(12): 4672-87.
- Dunitz, J. D. (1995). "Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions." Chem Biol **2**(11): 709-12.
- Dunlop, J., H. Beal McIlvain, et al. (2003). "Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis." J Neurosci **23**(5): 1688-96.
- Eliasof, S., J. L. Arriza, et al. (1998). "Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function." J Neurosci **18**(2): 698-712.
- Eliasof, S. and C. E. Jahr (1996). "Retinal glial cell glutamate transporter is coupled to an anionic conductance." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(9): 4153-4158.
- Epand, R. F., R. M. Epand, et al. (1999). "Glucose-induced thermal stabilization of the native conformation of GLUT 1." Biochemistry **38**(1): 454-8.
- Eskandari, S., M. Kreman, et al. (2000). "Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8641-6.
- Eyring, H. (1935). "The activated complex in chemical reactions." J. Chem. Phys. **3**: 107-115.
- Fairman, W. A., R. J. Vandenberg, et al. (1995). "An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel." Nature **375**(6532): 599-603.
- Farrant, M. and Z. Nusser (2005). "Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors." Nat Rev Neurosci **6**(3): 215-29.
- Fersht, A. (1999). Structure and Mechanism in Protein Science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York, W.H. Freeman and Company.
- Forster, I., N. Hernando, et al. (1998). "The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter (NaPi-2)." J Gen Physiol **112**(1): 1-18.
- Furuta, A., L. J. Martin, et al. (1997). "Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4." Neuroscience **81**(4): 1031-42.
- Gee, K. R., L. Niu, et al. (1999). "Synthesis and photochemistry of a photolabile precursor of N-methyl-D-aspartate (NMDA) that is photolyzed in the microsecond time region and is suitable for chemical kinetic investigations of the NMDA receptor." Biochemistry **38**(10): 3140-7.
- Ginsburg, A., E. G. Gorman, et al. (1987). "Thermodynamics of active-site ligand binding to Escherichia coli glutamine synthetase." Biochemistry **26**(19): 5989-96.
- Grewer, C., P. Balani, et al. (2005). "Individual subunits of the glutamate transporter

- EAAC1 homotrimer function independently of each other." Biochemistry **44**(35): 11913-23.
- Grewer, C. and T. Rauen (2005). "Electrogenic Glutamate Transporters in the CNS: Molecular Mechanism, Pre-steady-state Kinetics, and their Impact on Synaptic Signaling." J Membr Biol **203**(1): 1-20.
- Grewer, C., N. Watzke, et al. (2000). "Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9706-11.
- Grunewald, M., A. Bendahan, et al. (1998). "Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology." Neuron **21**(3): 623-32.
- Grunewald, M., D. Menaker, et al. (2002). "Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1." J Biol Chem **277**(29): 26074-80.
- Gutfreund, H. (1995). Kinetics for the Life Sciences. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Hakuba, N., K. Koga, et al. (2000). "Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils." J Comp Neurol **418**(2): 217-26.
- Halsey, J. F., D. B. Mountcastle, et al. (1977). "Detection of a ouabain-induced structural change in the sodium, potassium-adenosine triphosphatase." Biochemistry **16**(3): 432-5.
- Hammes, G. G. (2000). Thermodynamics and kinetics for the biological sciences. New York, Wiley-Interscience.
- Hazama, A., D. D. Loo, et al. (1997). "Presteady-state currents of the rabbit Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1)." J Membr Biol **155**(2): 175-86.
- Hediger, M. A., Y. Kanai, et al. (1995). "Mammalian ion-coupled solute transporters." J Physiol **482**: 7S-17S.
- Hediger, M. A., M. F. Romero, et al. (2004). "The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction." Pflugers Arch **447**(5): 465-8.
- Hediger, M. A. and T. C. Welbourne (1999). "Introduction: Glutamate transport, metabolism, and physiological responses." Am J Physiol Renal Physiol **277**(4): F477-480.
- Hilber, K., W. Sandtner, et al. (2001). "The selectivity filter of the voltage-gated sodium channel is involved in channel activation." J Biol Chem **276**(30): 27831-9.
- Hille, B. (1992). Ion channels of excitable membranes, Sinauer, Sunderland, Mass.

- Hodgkin, A. L. and B. Katz (1949). "The effect of calcium on the axoplasm of giant nerve fibers." J Exp Biol **26**(3): 292-4, pl.
- Jackson, M., W. Song, et al. (2001). "Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins." Nature **410**(6824): 89-93.
- Jardetzky, O. (1966). "Simple allosteric model for membrane pumps." Nature **211**(52): 969-70.
- Kanai, Y. and M. A. Hediger (1992). "Primary Structure and Functional Characterization of a High-Affinity Glutamate Transporter." Nature **360**(6403): 467-471.
- Kanai, Y. and M. A. Hediger (2004). "The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects." Pflugers Arch **447**(5): 469-79.
- Kanai, Y., S. Nussberger, et al. (1995). "Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high affinity glutamate transporter." J Biol Chem **270**(28): 16561-8.
- Kandel, E. R. S., J.H. Jessell, T.M. (2000). Prinziples of Neural Science. Columbus, McGraw-Hill.
- Kanner, B. I. and A. Bendahan (1982). "Binding order of substrates to the sodium and potassium ion coupled L-glutamic acid transporter from rat brain." Biochemistry **21**(24): 6327-30.
- Kanner, B. I. and S. Schuldiner (1987). "Mechanism of transport and storage of neurotransmitters." CRC Crit Rev Biochem **22**(1): 1-38.
- Kanner, B. I. and I. Sharon (1978). "Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain." Biochemistry **17**(19): 3949-53.
- Kasper, C., D. S. Pickering, et al. (2006). "The Structure of a Mixed GluR2 Ligand-binding Core Dimer in Complex with (S)-Glutamate and the Antagonist (S)-NS1209." J Mol Biol **357**(4): 1184-201.
- Keenan, M. V. and W. L. Alworth (1974). "The inhibition of proline racemase by a transition state analogue: delta-1-pyrroline-2-carboxylate." Biochem Biophys Res Commun **57**(2): 500-4.
- Khan, S. M., W. Bolen, et al. (1991). "Differential scanning calorimetry of bovine rhodopsin in rod-outer-segment disk membranes." Eur J Biochem **200**(1): 53-9.
- Klockner, U., T. Storck, et al. (1993). "Electrogenic L-glutamate uptake in *Xenopus laevis* oocytes expressing a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST-1)." J Biol Chem **268**(20): 14594-6.
- Kugler, P. and A. Schmitt (1999). "Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system." Glia **27**(2): 129-42.
- Larsson, H. P., S. A. Picaud, et al. (1996). "Noise analysis of the glutamate-activated

- current in photoreceptors." Biophys J **70**(2): 733-42.
- Larsson, H. P., A. V. Tzingounis, et al. (2004). "Fluorometric measurements of conformational changes in glutamate transporters." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3951-6.
- Läuger, P. (1991). Electrogenic Ion Pump. Sunderland, Sinauer Associates.
- Leatherbarrow, R. J., A. R. Fersht, et al. (1985). "Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7840-4.
- Lehre, K. P. and N. C. Danbolt (1998). "The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain." J Neurosci **18**(21): 8751-7.
- Lepock, J. R., A. M. Rodahl, et al. (1990). "Thermal denaturation of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains." Biochemistry **29**(3): 681-9.
- Levy, L. M., O. Warr, et al. (1998). "Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake." J Neurosci **18**(23): 9620-8.
- Li, G., Z. Sheng, et al. (2005). "Kinetic Mechanism of Channel Opening of the GluRD(flip) AMPA Receptor." Biochemistry **44**(15): 5835-41.
- Li, M., R. A. Farley, et al. (2000). "An intermediate state of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT1 revealed by simultaneous voltage clamp and fluorescence." J Gen Physiol **115**(4): 491-508.
- Lienhard, G. E. and Secemski, II (1973). "P<sub>1</sub>, P<sub>5</sub> -Di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase." J Biol Chem **248**(3): 1121-3.
- Lin, C. I., I. Orlov, et al. (2001). "Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18." Nature **410**(6824): 84-8.
- Lolkema, J. S. and D. J. Slotboom (1998). "Hydropathy profile alignment: a tool to search for structural homologues of membrane proteins." FEMS Microbiol Rev **22**(4): 305-22.
- Lu, C. C. and D. W. Hilgemann (1999). "GAT1 (GABA:Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup>) cotransport function. Kinetic studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches." J Gen Physiol **114**(3): 445-57.
- Madden, D. R., R. Abele, et al. (2000). "Large-scale expression and thermodynamic characterization of a glutamate receptor agonist-binding domain." Eur J Biochem **267**(13): 4281-9.
- Maier, W., J. E. T. Corrie, et al. (2005). "Comparative analysis of inhibitory effects of caged ligands for the NMDA receptor." **142**(1): 1.

- Martinez-Hernandez, A., K. P. Bell, et al. (1977). "Glutamine synthetase: glial localization in brain." Science **195**(4284): 1356-8.
- Maser, P., Y. Hosoo, et al. (2002). "Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6428-33.
- Melzer, N., A. Biela, et al. (2003). "Glutamate Modifies Ion Conduction and Voltage-dependent Gating of Excitatory Amino Acid Transporter-associated Anion Channels." J. Biol. Chem. **278**(50): 50112-50119.
- Mim, C., P. Balani, et al. (2005). "The glutamate transporter subtypes EAAT4 and EAATs 1-3 transport glutamate with dramatically different kinetics and voltage dependence but share a common uptake mechanism." J Gen Physiol **126**(6): 571-89.
- Mitrovic, A. D., F. Plesko, et al. (2001). "Zn<sup>2+</sup> Inhibits the Anion Conductance of the Glutamate Transporter EAAT4." J. Biol. Chem. **276**(28): 26071-26076.
- Nagao, S., S. Kwak, et al. (1997). "EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum." Neuroscience **78**(4): 929-33.
- Otis, T. S. and C. E. Jahr (1998). "Anion currents and predicted glutamate flux through a neuronal glutamate transporter." J Neurosci **18**(18): 7099-110.
- Otis, T. S. and M. P. Kavanaugh (2000). "Isolation of current components and partial reaction cycles in the glial glutamate transporter EAAT2." J Neurosci **20**(8): 2749-57.
- Otis, T. S., M. P. Kavanaugh, et al. (1997). "Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse." Science **277**(5331): 1515-8.
- Papageorgiou, G., D. Ogden, et al. (2005). "Synthetic and photochemical studies of substituted 1-acyl-7-nitroindolines." Photochem Photobiol Sci **4**(11): 887-96.
- Pedersen, W. A., W. Fu, et al. (1998). "Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients." Ann Neurol **44**(5): 819-24.
- Peghini, P., J. Janzen, et al. (1997). "Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration." Embo J **16**(13): 3822-32.
- Peinelt, C. and H. J. Apell (2004). "Time-resolved charge movements in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase." Biophys J **86**(2): 815-24.
- Picaud, S., G. B. Grant, et al. (1993). "The glutamate transporter is a chloride channel in salamander cone photoreceptors." 23rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA, November **19**(1-3): 230.
- Pines, G., N. C. Danbolt, et al. (1992). "Cloning and Expression of a Rat Brain L Glutamate



- Transporter." Nature **360**(6403): 464-467.
- Rauen, T. and M. Wiessner (2000). "Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS." Neurochem Int **37**(2-3): 179-89.
- Raunser, S., W. Haase, et al. (2005). "High-yield expression, reconstitution and structure of the recombinant, fully functional glutamate transporter GLT-1 from *Rattus norvegicus*." J Mol Biol **351**(3): 598-613.
- Rodriguez, B. M., D. Sigg, et al. (1998). "Voltage gating of Shaker K<sup>+</sup> channels. The effect of temperature on ionic and gating currents." J Gen Physiol **112**(2): 223-42.
- Rossi, D. J., T. Oshima, et al. (2000). "Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake." Nature **403**: 316 - 321.
- Rothstein, J. D., R. Kuncl, et al. (1991). "Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update." Ann Neurol **30**(2): 224-5.
- Rothstein, J. D., L. Martin, et al. (1994). "Localization of neuronal and glial glutamate transporters." Neuron **13**(3): 713-25.
- Ryan, R. M., A. D. Mitrovic, et al. (2004). "The chloride permeation pathway of a glutamate transporter and its proximity to the glutamate translocation pathway." J Biol Chem **279**(20): 20742-51.
- Salter, M. G. and R. Fern (2005). "NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury." Nature **438**(7071): 1167-71.
- Seal, R. P., B. H. Leighton, et al. (2000). "A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines." Neuron **25**(3): 695-706.
- Seal, R. P., Y. Shigeri, et al. (2001). "Sulfhydryl modification of V449C in the glutamate transporter EAAT1 abolishes substrate transport but not the substrate-gated anion conductance." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15324-9.
- Shayakul, C., Y. Kanai, et al. (1997). "Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney." Am J Physiol **273**(6 Pt 2): F1023-9.
- Slotboom, D. J., W. N. Konings, et al. (1999). "Structural features of the glutamate transporter family." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 293-307.
- Slotboom, D. J., W. N. Konings, et al. (2001). "Glutamate transporters combine transporter- and channel-like features." Trends Biochem Sci **26**(9): 534-9.
- Spreux-Varoquaux, O., G. Bensimon, et al. (2002). "Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients." J Neurol Sci **193**(2): 73-8.
- Storck, T., S. Schulte, et al. (1992). "Structure, expression, and functional analysis of a

- Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10955-9.
- Strasser, U., D. Lobner, et al. (1998). "Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures." Eur J Neurosci **10**(9): 2848-55.
- Stryer, L. (2002). Biochemistry. NY, W.H. Freeman.
- Tanaka, K., K. Watase, et al. (1997). "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1." Science **276**(5319): 1699-702.
- Tao, Z., Z. Zhang, et al. (2006). "Neutralization of the Aspartic Acid Residue Asp-367, but Not Asp-454, Inhibits Binding of Na<sup>+</sup> to the Glutamate-free Form and Cycling of the Glutamate Transporter EAAC1." J Biol Chem **281**(15): 10263-72.
- Thomson, J., Y. Liu, et al. (1998). "A thermodynamic study of the binding of linear and cyclic oligosaccharides to the maltodextrin-binding protein of Escherichia coli." Biophys Chem **70**(2): 101-8.
- Tolner, B., B. Poolman, et al. (1992). "Characterization and functional expression in Escherichia coli of the sodium/proton/glutamate symport proteins of Bacillus stearothermophilus and Bacillus caldotenax." Mol Microbiol **6**(19): 2845-56.
- Torres, F. E., P. Kuhn, et al. (2004). "Enthalpy arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9517-22.
- Trotti, D., M. Aoki, et al. (2001). "Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity." J Biol Chem **276**(1): 576-82.
- Umbach, J. A., M. J. Coady, et al. (1990). "Intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expressed in Xenopus oocytes is electrogenic." Biophys J **57**(6): 1217-24.
- Vandenberg, R. J., J. L. Arriza, et al. (1995). "Constitutive ion fluxes and substrate binding domains of human glutamate transporters." J Biol Chem **270**(30): 17668-71.
- Waagepetersen, H. S., K. Shimamoto, et al. (2001). "Comparison of effects of DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [3h]D-aspartate in astrocytes and glutamatergic neurons." Neurochem Res **26**(6): 661-6.
- Wadiche, J. I., J. L. Arriza, et al. (1995). "Kinetics of a human glutamate transporter." Neuron **14**(5): 1019-27.
- Wadiche, J. I. and C. E. Jahr (2001). "Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses." Neuron **32**(2): 301-13.
- Wadiche, J. I. and M. P. Kavanaugh (1998). "Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel." J Neurosci **18**(19): 7650-61.
- Watzke, N., E. Bamberg, et al. (2001). "Early intermediates in the transport cycle of the

- neuronal excitatory amino acid carrier EAAC1." J Gen Physiol **117**(6): 547-62.
- Watzke, N. and C. Grewer (2001). "The anion conductance of the glutamate transporter EAAC1 depends on the direction of glutamate transport." FEBS Lett **503**(2-3): 121-5.
- Watzke, N., T. Rauen, et al. (2000). "On the mechanism of proton transport by the neuronal excitatory amino acid carrier 1." J Gen Physiol **116**(5): 609-22.
- Weber, P. C. and F. R. Salemme (2003). "Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions." Curr Opin Struct Biol **13**(1): 115-21.
- Weiss, J. H. and S. L. Sensi (2000). "Ca<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup> permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration." Trends Neurosci **23**(8): 365-71.
- Wieboldt, R., K. R. Gee, et al. (1994). "Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8752-6.
- Yernool, D., O. Boudker, et al. (2004). "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." Nature **431**(7010): 811-8.
- Zerangue, N. and M. P. Kavanaugh (1996). "Flux coupling in a neuronal glutamate transporter." Nature **383**(6601): 634-637.